



**FACULTAD DE MEDICINA  
DEPARTAMENTO DE MEDICINA**

**“PAPEL DE LOS POLIMORFISMOS DE LOS GENES  
HEMO-OXIGENASA 1 Y 2 EN EL RIESGO DE  
DESARROLLO DE ESCLEROSIS MÚLTIPLE”**

**TESIS DOCTORAL**

**JORGE MILLÁN PASCUAL**

**SEVILLA, 2015**



# Tesis Doctoral:

“Papel de los polimorfismos de los genes hemo-oxigenasa 1 y 2 en el riesgo de desarrollo de esclerosis múltiple”

DOCTORANDO: JORGE MILLÁN PASCUAL

DIRECTORES: JOSE AUGUSTO GARCÍA-AGÚNDEZ PÉREZ-COCA  
GUILLERMO IZQUIERDO AYUSO  
FELIX JAVIER JIMÉNEZ JIMÉNEZ

DEPARTAMENTO DE MEDICINA  
UNIVERSIDAD DE SEVILLA



"When you reach for the stars, you may not quite get one,  
but you won't come up with a handful of mud either"

*Leo Burnett*

"El amor junta los cetros con los cayados; la grandeza con la  
bajeza;  
hace posible lo imposible; iguala diferentes estados y viene a  
ser poderoso  
como la muerte."

*Miguel de Cervantes, Don Quijote de la Mancha*



## AGRADECIMIENTOS

Este trabajo no hubiera sido posible sin la ayuda, sin la participación, sin el aliento y sin la colaboración de muchas personas. Por ello es para mí una obligación sumamente placentera utilizar este espacio para ser justo y consecuente con lo recibido y expresar mis agradecimientos.

A todos los pacientes con esclerosis múltiple quienes me enseñan día tras día y me alientan para mejorar mi trabajo cada mañana.

A mis directores de Tesis: Javier, José y Guillermo por su generosidad, por su apoyo y por la ayuda a mantener el rumbo de este proyecto en mis momentos de zozobra. Sus conocimientos, sus orientaciones y su paciencia han sido fundamentales para mí en esta Tesis.

A mis compañeros de trabajo actuales y pasados, de quien tanto he aprendido y aprendo no solo en mi profesión si no también de su tiempo, de su respaldo y de su amistad. Entre ellas quiero destacar especialmente, sin menospreciar a nadie, a Emilio Franco, José Luís Casado, Manuel Carballo, Marta Pacheco, Enrique Botia y Mercedes García sin quienes por su cercanía, conocimientos, aportaciones, comprensión o ejemplo no sería quien ahora soy.

A mis amigos que han sabido comprender mis ausencias, salvar la distancia que el trabajo nos ha impuesto y darme ese último aliento. Muchas gracias especialmente a Miguel Sánchez, Miguel García y Ana Serrano.

A toda mi familia que es el motor de mi vida. A mi hermano Santiago, por su complicidad y aliento que tanto me ha dado. A mi hermano José Miguel, que nunca se apague ese cariño e ilusión que derrochas en los que te rodeamos. A mis padres, por darme tanto amor y ejemplo, por darme la mejor educación y lecciones de vida aun sacrificando vuestras ilusiones y por creer siempre en mí y apoyarme en todo cuanto he hecho aun con dudas de éxito y certeza de fracaso en más de una ocasión.

A mi hijo Guillermo, quien me ha ayudado a vencer mediante la ilusión los momentos de flaqueza.

A Laura. Nada de que lo que he podido lograr estos últimos años hubiera podido hacerlo sin tu ayuda y sin tu amor. Estas páginas contienen tanto de tí que no sería justo no reconocer el tiempo que te he robado y el derroche con que no solo lo has compensado sino que más me has dado. Esa es tu generosidad, esa eres tú. Este es sin duda también tu premio.

<h1>INDICES</h1>	



## **INDICE GENERAL**

<b>INTRODUCCIÓN</b>	<b>13</b>
<b>1 LA ESCLEROSIS MÚLTIPLE</b>	<b>14</b>
1.1 Aspectos Generales	14
1.2 Historia de la EM	16
1.3 Epidemiología de la EM	19
1.4 Anatomía patológica de la EM	22
1.5 Cuadro clínico de la EM	28
1.6 Diagnóstico de la EM	43
1.7 Tratamiento de la EM	58
<b>2 ETIOPATOGENIA Y FISIOPATOGENIA DE LA ESCLEROSIS MÚLTIPLE</b>	<b>74</b>
2.1 Etiopatogenia de la EM	74
2.2 Fisiopatogenia de la EM	86
<b>3 ESTRÉS OXIDATIVO</b>	<b>95</b>
3.1 Conceptos básicos de estrés oxidativo	95
3.2 Papel de las especies reactivas de nitrógeno	96
3.3 Excitotoxicidad por glutamato	99
3.4 Papel del estrés oxidativo en la EM y otras enfermedades neurológicas	100
<b>4 HEMO-OXIGENASA</b>	<b>103</b>
4.1 Isoformas de la Hemo-oxigenasa: HO-1 y HO-2	103
4.2 Reacción enzimática de la Hemo-oxigenasa	107
4.3 Funciones no enzimáticas de la Hemo-oxigenasa	112
4.4 Papel de la vía de la Hemo-oxigenasa en las enfermedades neurológicas	114
<b>HIPÓTESIS</b>	<b>123</b>
<b>OBJETIVOS</b>	<b>125</b>
<b>PACIENTES, MATERIAL Y MÉTODOS</b>	<b>127</b>
<b>1 PACIENTES Y CONTROLES</b>	<b>128</b>
1.1 Aspectos éticos	129
1.2 Casos	129
1.3 Controles	130
<b>2 RECOGIDA DE VARIABLES</b>	<b>131</b>
<b>3 METODOLOGÍA DEL ANÁLISIS GENÉTICO</b>	<b>132</b>
3.1 Extracción y purificación del DNA a partir de sangre periférica	132
3.2 Cuantificación del DNA y estimación de su pureza	134
3.3 Genotipado de los SNPs <i>rs2071746</i> y <i>rs2071747</i> del gen <i>HMOX1</i> y <i>rs2270763</i> y <i>rs1051308</i> del gen <i>HMOX2</i>	135
<b>4 ANALISIS ESTADÍSTICO</b>	<b>142</b>

<b>RESULTADOS</b>	<b>144</b>
<b>1 ANALISIS DE LAS VARIABLES DEMOGRÁFICAS ENTRE GRUPOS</b>	<b>145</b>
<b>2 ANALISIS DE LAS VARIABLES CLÍNICAS EN EL GRUPO PACIENTES</b>	<b>148</b>
<b>3 ANALISIS DE LOS SNPs</b>	<b>152</b>
3.1 Subanálisis de los SNPs <i>rs2071746</i> y <i>rs2071747</i> del gen <i>HMOX1</i> y <i>rs2270363</i> y <i>rs1051308</i> del gen <i>HMOX2</i> por sexo	161
3.2 Subanálisis de la edad de inicio en función de los SNPs <i>rs2071746</i> y <i>rs2071747</i> del gen <i>HMOX1</i> y <i>rs2270363</i> y <i>rs1051308</i> del gen <i>HMOX2</i>	178
3.3 Subanálisis de los SNPs <i>rs2071746</i> y <i>rs2071747</i> del gen <i>HMOX1</i> y <i>rs2270363</i> y <i>rs1051308</i> del gen <i>HMOX2</i> por tipo clínico de EM	179
<b>DISCUSIÓN</b>	<b>184</b>
<b>1 COMPOSICIÓN Y REPRESENTATIVIDAD DE LA MUESTRA</b>	<b>185</b>
<b>2 PAPEL DEL ESTRÉS OXIDATIVO EN LA EM</b>	<b>187</b>
2.1 Datos de estrés oxidativo a nivel tisular de SNC	189
2.2 Datos de estrés oxidativo en modelos EAE	192
2.3 Datos de estrés oxidativo a nivel de LCR	192
<b>3 HEMO-OXIGENASA Y EM</b>	<b>194</b>
<b>4 POLIMORFISMOS <i>HMOX1</i> Y <i>HMOX2</i> Y RIESGO DE DESARROLLO DE EM</b>	<b>195</b>
4.1 Utilidad de los estudios genéticos en EM	195
4.2 Polimorfismos de los genes <i>HMOX1</i> y <i>HMOX2</i>	198
4.3 Asociación <i>HMOX2 rs1051308</i> y riesgo de desarrollo de EM	199
4.4 Asociación <i>HMOX1 rs2071746</i> y riesgo de desarrollo de EM	201
<b>5 LIMITACIONES DE NUESTRO ESTUDIO</b>	<b>205</b>
<b>CONCLUSIONES</b>	<b>207</b>
<b>ANEXOS</b>	<b>209</b>
<b>BIBLIOGRAFÍA</b>	<b>215</b>

## INDICE DE ABREVIATURAS

ARE	Genes de respuesta antioxidante (“ <i>Antioxidant Response Element</i> ”)
BOC	Bandas oligoclonales
BVR	Biliverdina reductasa
CIS	Síndrome clínico aislado
CMH/ <i>MHC</i>	Complejo mayor de histocompatibilidad (del inglés “ <i>Major histocompatibility complex</i> ”)
CO	Monóxido de carbono
CPO	Célula precursora del oligodendrocito
DMD	Tratamiento modificador de la enfermedad
EAE	Encefalomiелitis Aguda Experimental
EDSS	“ <i>Expanded Disability Status Scale</i> ”
EM	Esclerosis Múltiple
EMPP	Esclerosis Múltiple Primariamente Progresiva
EMPR	Esclerosis Múltiple Progresiva Recidivante
EMRR	Esclerosis Múltiple Remitente-Recurrente
EMSP	Esclerosis Múltiple Secundariamente Progresiva
HLA	Antígeno leucocitario humano
HO	Hemo-oxigenasa
HO-1	Hemo-oxigenasa tipo 1
HO-2	Hemo-oxigenasa tipo 2
<i>HMOX1</i>	Gen de la HO-1
<i>HMOX2</i>	Gen de la HO-2
HSP	“ <i>Heat shock protein</i> ” o proteína de choque térmico
Ig G/ Ig M	Inmunoglobulina G / Inmunoglobulina M
LCR	Líquido cefalorraquídeo
MG/MGA	Microglía/Microglía activada

MHC/CMH	Complejo mayor de histocompatibilidad (del inglés “ <i>Mayor histocompatibility complex</i> ”)
NF- κ B	Factor nuclear Kappa B
Nfr2	Factor nuclear tipo 2 similar al derivado de eritrocito
NO	Neuritis óptica
NQO1	NADPH quinona oxido-reductas 1a
OG	Oligodendrocito
Redox	Reducción-oxidación
RIS	Síndrome radiológicamente aislado
RM	Resonancia Magnética
RNS	Especies reactivas de nitrógeno
ROS	Especies reactivas de oxígeno
SNC	Sistema Nervioso Central
SNP	Polimorfismos de nucleótido único (“ <i>Single Nucleotide Polymorphism</i> ”)
TNF α	Factor de necrosis tumoral tipo α
VEB	Virus de Epstein-Barr

# INTRODUCCIÓN

## **1. LA ESCLEROSIS MÚLTIPLE.**

### **1.1. ASPECTOS GENERALES**

La esclerosis múltiple (EM) es una enfermedad crónica, adquirida y discapacitante que afecta de modo específico al sistema nervioso central (SNC) mediante la interrupción de los tractos mielinizados . Es una enfermedad inflamatoria, desmielinizante y al mismo tiempo neurodegenerativa de etiopatogenia íntima desconocida(1,2). En la mayoría de los pacientes la enfermedad comienza como un trastorno episódico y evoluciona a lo largo del tiempo hacia un trastorno progresivo. El pronóstico a largo plazo es habitualmente pobre ya que a los quince años del diagnóstico la mayoría de los pacientes poseen limitaciones funcionales o cognitivas y hasta un 50% requieren de apoyo para la deambulación(2).

Probablemente la enfermedad sea la convergencia de numerosos factores genéticos y ambientales. De este modo individuos genéticamente susceptibles (variaciones alélicas) bajo la influencia de determinados agentes ambientales (dieta, tóxicos como el tabaco, infecciones víricas como el virus de Epstein Barr (VEB) o bajos niveles de vitamina D) desarrollarían una cascada autoinmune dirigida hacia la mielina y a las terminaciones axónicas de las neuronas conllevando su daño(3).

Los estudios de prevalencia han demostrado una distribución muy irregular a nivel mundial con cifras de incidencia y prevalencia mayores en poblaciones en latitudes más alejadas del ecuador (4).

Patológicamente se caracteriza por la presencia de infiltrados perivasculares de células inflamatorias mononucleares, desmielinización, daño axonal y gliosis preferentemente en la sustancia blanca del SNC conformando “placas” múltiples a nivel de cerebro y médula espinal(1).

Es una enfermedad característicamente impredecible y con una profunda variabilidad interindividual. Clínicamente, los pacientes pueden presentar una amplia variedad de signos y síntomas neurológicos atribuidos a bloqueos de conducción en las lesiones de sustancia blanca(5). Estos síntomas pueden ocurrir en

episodios súbitos o de modo insidioso y progresivo. Aunque el repertorio de síntomas posibles es sumamente amplio se reconocen como síntomas característicos parestesias, debilidad, diplopia o vértigo.

El diagnóstico suele realizarse entre la tercera y cuarta década de la vida y constituye la primera causa de discapacidad no traumática en población laboral en países industrializados(2) suponiendo un impacto socioeconómico de una magnitud considerable tanto por costes directos como indirectos la enfermedad(6,7), así como de una merma considerable y añadida en la calidad de vida de pacientes y cuidadores(8).

Los principios que rigen el diagnóstico de la EM son la diseminación y la exclusión, ya que no existe ningún dato clínico o paraclínico patognomónico. La diseminación se basa en la demostración de evidencia clínica o paraclínica (mediante resonancia magnética (RM) o mediante estudios analíticos o neurofisiológicos) de actividad de la enfermedad consistente con desmielinización focal y que haya afectado a más de una región del SNC en más de una ocasión(9).

La EM carece de tratamiento curativo aunque desde la década de 1990 existen tratamientos capaces de modificar el curso de la enfermedad con aparición sucesiva de nuevos tratamientos en las siguientes décadas(10). Hoy en día el inicio precoz de fármacos inmunomoduladores constituye el principio básico del tratamiento(1,10) de la EM ya que es la única medida capaz de retrasar la evolución a una fase degenerativa y progresiva(11).

## 1.2. HISTORIA DE LA ESCLEROSIS MÚLTIPLE

Las raíces históricas de la enfermedad son difíciles de trazar antes de finales del siglo XIX por la ausencia de conocimiento de localización clínico anatómico por lo que es el advenimiento de éste lo que determina el nacimiento de la Neurología y de algunas enfermedades como la esclerosis múltiple.

### 1.2.1. La Esclerosis Múltiple como castigo divino

Las primeras descripciones que definen la EM como una entidad clínico-patológica diferenciada las podemos encontrar en la segunda mitad del siglo XIX aunque hay reportes de casos anteriores imbuidos en la literatura y creencias populares. Una de las primeras descripciones de la enfermedad puede ser la de Lidwina de Schiedam(12) que vivió en una pequeña villa en la Holanda del siglo XIV. La joven sufrió ataques de ceguera y de debilidad de las extremidades con recuperaciones milagrosas que fueron atribuidas al poder de las oraciones de su comunidad. De hecho la joven fue atendida por el médico de la corte, Godfried de Zondendank, quien definió la enfermedad como “incurable porque viene de Dios” y aconsejó a los padres que “el mejor tratamiento es la resignación a lo insuperable”(12). El aire de santidad que inundaba el caso y la veneración popular conllevaron a que fuera canonizada en el siglo XIX.

Otro caso razonablemente documentado puede ser el de Augustus Frederic D’Este (1794-1848)(2), nieto ilegítimo del rey Jorge III de Inglaterra. En su diario personal, dejó una detallada descripción de sus síntomas a lo largo del tiempo, aunque no fue diagnosticado en vida, ya que la enfermedad se describió 20 años después. Otro caso menos documentado es el del poeta del siglo XIX Heinrich Heine quien tras una fase inicial diversos síntomas con recidivas y remisiones, comenzó un deterioro neurológico progresivo a los 25 años de los primeros síntomas. Víctima de su enfermedad nos dejó una cita muy reproducida: “*La vida es una enfermedad; el mundo un gran hospital y la muerte, el médico que nos cuida a todos*”. Llama la atención como la descripción de los síntomas ha sido muy estable en los numerosos casos históricos(13). Aun hoy en día siguen revisándose casos históricos como el de



Constance, la esposa de Oscar Wilde, desterrando mitos y acercándolos a la EM tal y como la conocemos hoy en día(14).

### **1.2.2. Construyendo los cimientos de la esclerosis múltiple: la escuela de “La Pitié-Salpêtrière”**

Jean Marie Charcot (1825-1893) realizó en 1868 probablemente la primera descripción de la esclerosis múltiple como una entidad nosológica. Existen descripciones patológicas previas como las de Robert Carswell (1793-1857) y Jean Cruveilhier (1791-1874) quienes realizan una descripción minuciosa de lesiones escleróticas a nivel de la médula espinal e incluso Cruveilhier publicó un atlas en el que detalló con bastante precisión las características anatomopatológicas de las lesiones de esta enfermedad, describiéndolas como “*sclerose en taches e îles*” (esclerosis en manchas e islas)(1).

En 1849, Friedrich Theodor von Freichs (1819-1885), fue el primero en observar que las remisiones eran características de la enfermedad. Este autor, además, refirió el nistagmo como signo inequívoco de la enfermedad y dio una primera descripción clínica de un vínculo entre la EM y ciertos trastornos mentales.

Sin embargo, las aportaciones de Charcot(1,15,16), catedrático del hospital de vanguardia del París de aquella época “La Pitié-Salpêtrière”, son cruciales para el nacimiento de la EM como enfermedad:

- identificó el curso de la enfermedad, por la presencia de síntomas recurrentes y progresivos en el tiempo
- realizó la primera descripción clínica completa en un paciente en vida
- correlacionó inequívocamente las observaciones clínicas con los cambios patológicos (“La larga persistencia de los cilindro-ejes, despojados de su envoltura de mielina, en el seno de los focos esclerosados, es posible que juegue aquí un importante papel” extraído de Lecciones sobre las enfermedades del sistema nervioso)
- finalmente acuñó para la enfermedad el concepto de “*sclerose en plaque*” (esclerosis en placas), perdurando el concepto “placa” en la actualidad.

Charcot reconoció el nistagmus, el habla escandida y el temblor intencional(17) como elementos patognomónicos de la enfermedad dando lugar a

lo que luego se reconoció como “la tríada de Charcot” y datos “patognomónicos” de la enfermedad, hecho que hoy se reconoce como erróneo(1), pero que conserva el mérito de haber sido probablemente el primero de los criterios diagnósticos para la EM y la primera aproximación al concepto de “diseminación” eje rector de los actuales criterios diagnósticos.

### **1.2.3. Hitos de la esclerosis múltiple en el siglo XX**

A lo largo del siglo XX se producen cambios a ritmo exponencial que incrementan el conocimiento de la enfermedad(18). El siguiente gran avance sobre la patogenia de la EM fue la demostración en Edimburgo, por parte de James Walker Dawson (1870-1927) en 1916, de una íntima relación entre las placas de EM y los pequeños vasos sanguíneos cerebrales con una adopción de las lesiones de una marcada distribución perivenular lo que se da en llamar, años más tarde, “dedos de Dawson”(2).

Posteriormente, Elvin Kabat (1914-2000) observó que el líquido cefalorraquídeo (LCR) de los pacientes con EM contenía una superior cantidad de gammaglobulinas confirmando este hallazgo la participación del sistema inmune en el desarrollo de la enfermedad. En esta misma línea, en 1947, Töre Broman demostró la alteración de la barrera hematoencefálica (BHE) en la placa de desmielinización(1).

Desde el punto de vista clínico dos hechos merecen especial relevancia en la segunda mitad del siglo XX. El primero fue la introducción en 1961, por parte de Kurtzke(19), de una escala que permitía medir el grado de afectación de cada paciente. La escala inicial conocida como “*Disability Status Scale*” (DSS) sufrió modificaciones(20) hasta convertirse en la “*Expanded Disability Status Scale*” (EDSS)(21) que es la principal herramienta hoy en día para evaluar la discapacidad de los pacientes.

El segundo hecho es el establecimiento de unos criterios diagnósticos universales y basados en el principio de la diseminación de las manifestaciones de la EM en el tiempo y en el espacio. Los primeros criterios diagnósticos elaborados con estas directrices fueron encabezados por Schumacher(9) en 1965, posteriormente siguieron los de Poser(22) y los de McDonald con sus sucesivas revisiones (23–25) que incorporan la posibilidad de demostrar evidencia paraclínica de actividad de la

enfermedad mediante el estudio de LCR o de resonancia magnética (RM). No obstante, esto se desarrollará en el capítulo de “Diagnóstico de la EM”.

### **1.3. EPIDEMIOLOGÍA DE LA ESCLEROSIS MÚLTIPLE**

Los estudios de prevalencia han mostrado de modo repetido una amplia variabilidad geográfica en la distribución de la enfermedad con una concentración de los casos entre los 40 y 60 grados de latitud norte y con un fenómeno similar en el hemisferio sur. En el estudio clásico de 1975, Kurtzke definió ya tres zonas mundiales de frecuencia para EM(4) en función del riesgo: alto, intermedio y bajo. Las zonas de alto riesgo comprendían el norte de Europa, norte de Estados Unidos, gran parte del sur de Canadá, Nueva Zelanda y probablemente el sur de Australia, con unas tasas de prevalencia en su mayoría de 30 a 80 por 100.000 habitantes. La zona de frecuencia media, con una prevalencia de 5 a 25 por 100.000 habitantes (y en su mayoría de 10 a 15), se localizaba en la cuenca del Mediterráneo europeo, mientras que áreas de bajo riesgo incluían Asia, las islas del Pacífico, África, América Latina, Alaska y Groenlandia. Estas regiones se siguen constatando aunque de modo más difuminado hoy en día(26) y con intervalos de prevalencia diferentes: >100/100000 para las regiones de alto riesgo, 50-100/100000 para el riesgo medio y <50/100000 para el riesgo bajo. La imagen 1 muestra la última versión del “Atlas de EM” a cerca de la distribución de la enfermedad a nivel mundial(27).

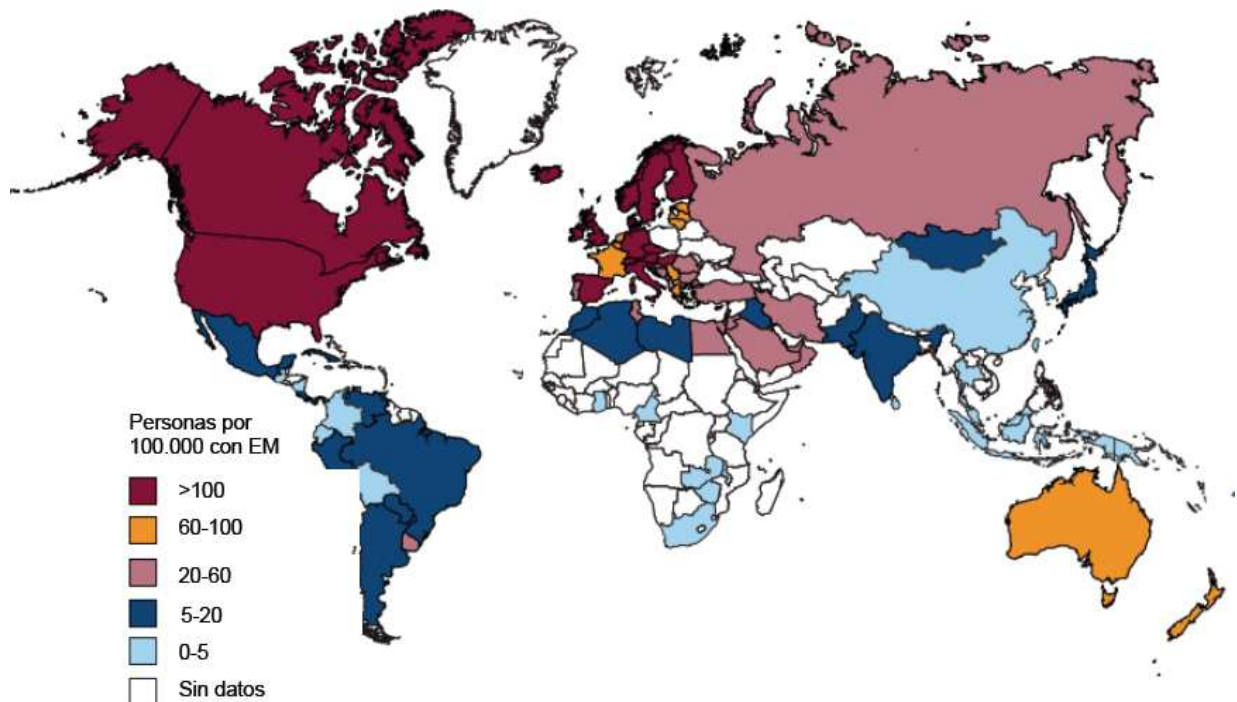


Imagen 1. Distribución mundial de la prevalencia de la EM según el Atlas de EM de 2013(27)

Existe un razonable consenso en que en las últimas décadas se está asistiendo a un aumento de la incidencia y prevalencia de la EM en todo el mundo(28,29). Diversos estudios(30) apuntan a cambios en el acceso sanitario y cambios técnicos (acceso universal a RM) como la base del incremento de incidencia y a la mayor supervivencia como responsable del incremento de prevalencia. Sin embargo no pueden ignorarse otros factores que pueden responder a los recientes cambios en el estilo de vida como el tabaquismo, el incremento de consumo de sal o la menor fotoexposición solar(31). Artículos epidemiológicos recientes como los de Koch-Henriksen(32,33) apuntan que la distribución desigual de la enfermedad a nivel mundial se debe a interacciones complejas entre la genética y el ambiente; observa un aumento de la incidencia más notorio en mujeres y la desaparición del gradiente de latitud en Europa y Norteamérica y sugiere que los estudios epidemiológicos se deberían focalizar en analizar los estilos de vida de la mujer occidental (uso de tabaco, obesidad, incorporación al mercado laboral, control de natalidad, etc).

En España se han publicado al menos 30 estudios de prevalencia(34-37) que muestran tasas de prevalencia crecientes desde 5-23 casos/100.000 habitantes entre 1968 a 1991, hasta 70-80/100.000 casos en estudios posteriores al año 2000,

llegando a demostrarse en estudios epidemiológicos en el sur de España (Sevilla y Málaga) cifras de prevalencia de 90 y 125 casos por 100.000 habitantes respectivamente, similar a las observadas en el sur de Francia(38) lo que constata la atenuación del gradiente latitudinal y el incremento de la prevalencia de la EM(30,33,37). Actualmente se reconoce a España como una zona de elevada prevalencia con más de 100 casos por 100000 habitantes/año(27). En cuanto a la incidencia, los resultados varían entre 3-5 casos por 100.000 habitantes/año(28,36,37).

Aunque las primeras descripciones de la enfermedad(4) postulaban que la EM es una enfermedad predominante en el sexo masculino, está demostrado que posee un importante predominio femenino que además se está acentuando desde un ratio inicial mujer/hombre de 1,5 a cifras actuales cercanas a 2,7(39).

Existen múltiples estudios acerca de las causas de mortalidad en los pacientes con EM realizados habitualmente en países anglosajones aunque pocos en nuestro entorno(40). Los pacientes con EM poseen pérdida de entre 6 y 10 años potenciales de vida(41) con una supervivencia media desde el inicio de los síntomas cercana a los 30-40 años(40,42) aunque con mayor variabilidad entre diferentes series en torno a la edad de fallecimiento(43,44) lo que constata la amplia variabilidad individual pronóstica(1,2).

La EM no es una enfermedad letal en sí misma y el exceso de mortalidad es secundario a las complicaciones neurológicas que sufre el paciente en estadios avanzados de la enfermedad casi siempre en el contexto de la pérdida de movilidad, aunque también condicionados por hábitos de vida como el tabaquismo o abuso de alcohol(2,45,46). Los procesos infecciosos, sobre todo respiratorios y facilitados por la broncoaspiración, y las enfermedades cardiovasculares son las principales causas de mortalidad, aunque en el caso de las enfermedades cardiovasculares y otras causas como el cáncer, dependen significativamente de la edad media de la población estudiada. Numerosas series han apuntado un incremento en la tasa de suicidios(45) comparado con la población general principalmente en países septentrionales aunque en muchas ocasiones aspectos culturales puedan infraestimar esta causa de mortalidad en algunos países.

## 1.4. ANATOMÍA PATOLÓGICA DE LA ESCLEROSIS MÚLTIPLE

Las bases patológicas de la EM fueron sentadas en el s XIX por Charcot y otros científicos y dieron el nombre a la enfermedad durante muchos años, “*sclerose en plaque*”(18).

El hallazgo característico en la EM es la presencia de múltiples lesiones focales en la sustancia blanca del SNC, denominadas placas, con notoria pérdida de mielina (desmielinización) con grado variable de destrucción axonal, infiltrado inflamatorio y gliosis(47). Aunque la inflamación esté invariablemente presente en cualquier lesión de EM y a lo largo de la evolución de la enfermedad, la intensidad disminuye con la edad del paciente, duración de la enfermedad y en fases progresivas. Las lesiones se encuentran en diferentes estadios evolutivos, característicamente se disponen en torno a una vénula y su tamaño inicial no suele exceder los 10-15 milímetros aunque tienden a coalescer conforme avanza la enfermedad formando grandes lesiones de hasta 2-3 centímetros(47). La EM se ha considerado históricamente una enfermedad con afectación primaria de la sustancia blanca con predilección topográfica en nervios ópticos, nivel subpial en médula espinal tronco cerebral, hemisferios y pedúnculos cerebelosos y sustancia blanca periventricular(48,49). Recientemente, el foco de la atención a nivel histopatológico se ha desplazado a tres fenómenos: las lesiones de sustancia gris, los folículos linfoides a nivel subpial y la patología de la sustancia blanca aparentemente normal.

### 1.4.1. Patología de Sustancia Blanca: Lesiones Agudas y Lesiones Crónicas

Las lesiones desmielinizantes pueden clasificarse por su estadio evolutivo en agudas o crónicas. Habitualmente coexisten ambas lesiones aunque en estadios avanzados de la enfermedad la presencia de lesiones agudas se hace muy infrecuente.

#### **1.4.1.1. Lesión aguda**

Las placas agudas son las más frecuentes en EM en fase remitente-recurrente y representan el sustrato patológico de los ataques clínicos. Son característicamente placas desmielinizadas hipercelulares, de bordes mal definidos, con un importante infiltrado inflamatorio preferentemente de macrófagos, en los que aparecen restos de mielina en distintas fases de digestión(50) y de modo secundario de otras poblaciones como linfocitos T CD8+, linfocitos B, microglía activada. El tipo de resto de mielina puede determinar la cronología de la placa(47). El cambio más precoz suele ser la activación de la microglía y la pérdida de oligodendrocitos (OG) con degradación de las vainas de mielina, degeneración y transección axonal(51). Posteriormente da paso a una proliferación de astrocitos, denominados gemistocitos por su forma redondeada, presencia de numerosos procesos fibrilares y citoplasma eosonifílico y finalmente la fragmentación y vacuolización de las vainas de mielina por los macrófagos en presencia de infiltrados de células T(52).

#### **1.4.1.2. Patrones de lesiones agudas**

En base a la pérdida específica de mielina, la extensión de la placa y su topografía, la destrucción de OG, la presencia o ausencia de remielinización, depósito de inmunoglobulinas y complemento y la activación temprana de las lesiones de sustancia blanca las placas pueden clasificarse en cuatro patrones (53). Esta clasificación puede implicar diferentes mecanismos fisiopatogénicos subyacentes y puede comprobarse desde estadios iniciales(54) (ver Tabla 1).

- **Patrón tipo I.** Se encuentra en el 15% de las biopsias. Característicamente son placas perivasculares bien delimitadas, con datos de inflamación activa y afectación similar de todos los componentes mielínicos. No se aprecia depósito de inmunocomplejos lo que sugiere que la desmielinización puede deberse a factores tóxicos como el factor de necrosis tumoral tipo  $\alpha$  (TNF  $\alpha$ ) liberado desde los macrófagos. La pérdida de OG es variable aunque suelen reaparecer y remielinizar el centro de la lesión.
- **Patrón tipo II.** Es el más frecuentemente encontrado (58% de las biopsias). Consiste en placas bien delimitadas, con desmielinización activa afectando de modo similar a todos los componente mielínicos y asociado a



depósito de inmunocomplejos y complemento sobre la mielina con fagocitosis de esos restos por macrófagos. Muestra un grado variable de pérdida de OG en los bordes de la lesión aunque una alta incidencia de remielinización en el centro lesional. Esto sugiere que el mecanismo patogénico es mediado por anticuerpos y complemento aunque el autoantígeno hacia el que se dirigen dichos anticuerpos es desconocido.

- **Patrón tipo III.** Suele hallarse en un 26% de las muestras. Muestra bordes mal definidos con desmielinización activa, apoptosis de OG y pérdida preferencial de la mielina periaxonal como la glicoproteína asociada a la mielina (MAG). La pérdida de OG es marcada en el borde activo de la placa y se introduce en la sustancia blanca adyacente aparentemente normal. No se observa remielinización ni se identifican inmunocomplejos. Las alteraciones precoces que se aprecian en los sitios más distales del cuerpo del OG sugieren una oligodendropatía “*dying-back*” (degeneración “retrógrada”). Estos cambios pueden apreciarse en modelos animales (desmielinización inducida por virus) o tóxicos (como la cuprizona) y pueden estar vehiculizados por daño tisular por especies reactivas de oxígeno (ROS) o disfunción mitocondrial(55).
- **Patrón tipo IV.** Es extremadamente infrecuente (1%) y muestra una extensa muerte no apoptótica de OG en la sustancia blanca periplaca lo que sugiere un trastorno metabólico primario del OG que lo hiciera especialmente susceptible a mediadores inflamatorios o tóxicos.

En algunos pacientes(50) se ha encontrado coexistencia de los patrones II y III en una misma placa. El daño axonal es más pronunciado durante la fase inflamatoria desmielinizante activa y la cuantía del daño axonal se correlaciona de modo inequívoco con la proporción de linfocitos y microglía activada del infiltrado celular(56).



**Tabla 1. Patrones anatomopatológicos de desmielinización (53,54).**

	<b>Patrón I</b>	<b>Patrón II</b>	<b>Patrón III</b>	<b>Patrón IV</b>
<b>Mecanismo patogénico</b>	<b>Células T citotóxicas</b> <b>Macrófagos</b> <b>Microglía</b> Proteasas Radicales libres ROS/RNS Citoquinas Excitotoxinas	<b>Anticuerpos (IgG)</b> Macrófagos Microglía Complemento	<b>Hipoxia</b> <b>Disfunción mitocondrial</b> Macrófagos Microglía Daño vascular Radicales libres ROS/RNS	<b>Resistencia tisular reducida</b> <b>Macrófagos</b> <b>Microglía</b> Susceptibilidad genética ApoE, ADN mitocondrial
	Desmielinización activa perivenular con infiltrados de células T y macrófagos (Modelo autoinmune)		Lesión de los oligodendrocitos (Modelos virales, tóxicos, isquémicos, metabólicos)	
<b>Frecuencia</b>	15%	58%	26%	1%
<b>Borde regular</b>	+	+		+
<b>Remielinización</b>	+	++		
<b>Afectación de proteínas mielínicas</b>	Afectación de todas las proteínas mielínicas	Afectación de todas las proteínas mielínicas	Pérdida de la glucoproteína asociada a la mielina (MAG)	Afectación de todas las proteínas mielínicas
<b>Muerte de oligodendrocitos</b>			++ (por apoptosis)	++

Tabla 1. Diferencias entre los patrones de desmielinización. ROS =Especies reactivas de oxígeno, RNS = Especies reactivas de nitrógeno, ApoE = apolipoproteína E(53,54).

### 1.4.1.3. Lesión crónica y placas remielinizadas

La lesión crónica consiste en una placa desmielinizada, bien delimitada con numerosos macrófagos cargados de productos de mielina y concentrado en la periferia dejando un centro hipocelular e inactivo. Existe una marcada astrogliosis, pérdida significativa de axones (de hasta un 80%) y OG con escaso infiltrado inflamatorio (52). En las lesiones crónicas existe una preservación relativa de oligodendrocitos maduros y de células precursoras de oligodendrocitos (CPO).

Recientemente se ha detectado la presencia de estructuras foliculares linfoides ricas en células plasmáticas en los espacios perivasculares y a nivel subpial (56) incluso cuando la inflamación por linfocitos T y B ha desaparecido.

Las placas remielinizadas se caracterizan por la presencia de axones vainas mielínicas adelgazadas con distancias internodales muy cortas. Las placas agudas suelen poseer amplias zonas de remielinización detectadas por la frecuencia de CPO. En algunos casos la diferenciación no es tan evidente, pues se trata de áreas de remielinización oligodendroglial defectuosa o realizada a expensas de la mielina

procedente de células de Schwann en placas adyacentes a raíces nerviosas. Esta remielinización parcial recibe el nombre de “placas en sombra” (47,57). Sin embargo la extensión de la remielinización dependerá no solo de la abundancia de CPO si no del tamaño de la lesión, del balance pro/antiinflamatorio y probablemente de características fenotípicas individuales(53). En pacientes en estadios tardíos, únicamente el 20% de las lesiones presentan remielinización, frente al 70% de aquéllos en estadios más precoces(48,54).

#### **1.4.2. Patología de Sustancia Gris**

Se ha demostrado, en contra de la idea inicial de la EM, que existe afectación en la sustancia gris del SNC, tanto a nivel de corteza como de sustancia gris profunda(58) y probablemente desde estadios iniciales(59). Sin duda las limitaciones de estudio histopatológico con los métodos de tinción clásicos han condicionado que durante años perdurara la idea inicial de la EM como una enfermedad exclusiva de sustancia blanca.

La corteza puede afectarse en la EM tanto manifestada como pérdida neuronal y atrofia como por lesiones desmielinizantes clásicas(60). La primera puede ser el resultado de degeneración retrógrada o anterógrada desde lesiones localizadas en sustancia blanca, otras regiones corticales o núcleos grises profundos. Sin embargo existe una afectación desmielinizante espacialmente en la corteza cerebral anatómicamente independiente de la patología de sustancia blanca(58,61) .

Existen tres tipos de lesiones corticales(58,62) (Imagen 2):

- **Tipo I o córtico-subcorticales.** Lesiones desmielinizantes que comprometen tanto a la corteza como a la sustancia blanca subyacente respetando las capas más externas de la corteza. Probablemente sean las únicas capaces de ser detectadas mediante las secuencias de RM en los equipos de resolución convencional(63).
- **Tipo II o intracorticales.** Lesiones desmielinizantes pequeñas perivasculares y limitadas a la profundidad cortical.
- **Tipo III o subpiales.** Lesiones extensas que comprenden desde la superficie pial hasta las capas III o IV e incluso todo el grosor cortical a lo

largo de muchos surcos. Fisiopatológicamente se han relacionado con la presencia de folículos linfoides a nivel de los espacios subaracnoideos(63,64). Aunque son muy específicas de la enfermedad(65), estas placas son probablemente las más difíciles de apreciar con los métodos histológicos y radiológicos clásicos aunque los equipos de RM de ultracampo (7 Teslas o más) consiguen apreciarlas(66).

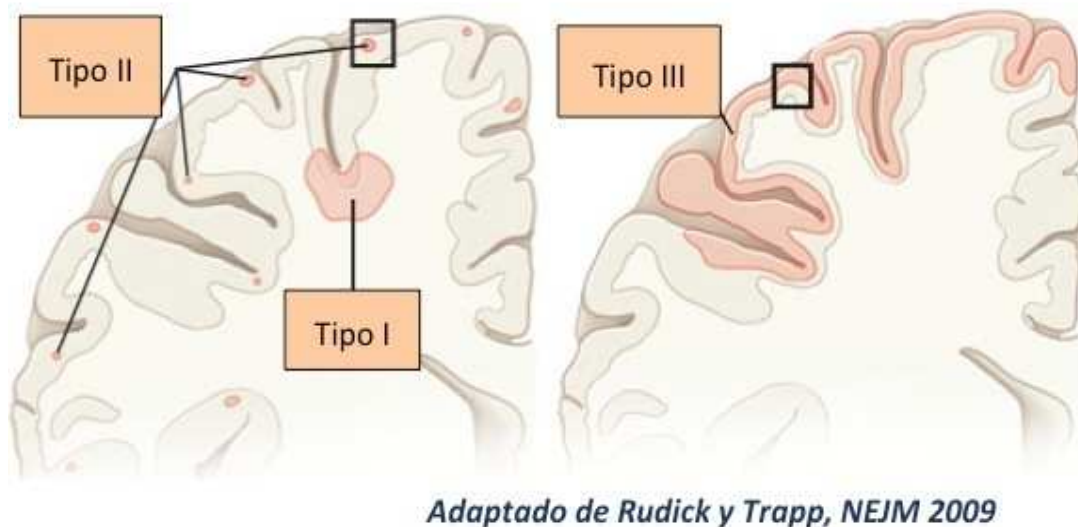


Imagen 2. Tipología de las placas corticales en el EM. Adaptado de Rudick y Trapp(62).

Las lesiones corticales pueden detectarse desde estadios muy precoces y pueden representar el sustrato patológico del daño cognitivo y en gran parte de la discapacidad residual(59). Muestran infiltrados perivasculares y parenquimatosos y desmielinización activa. Se desconocen los mecanismos íntimos que conducen a las lesiones desmielinizantes a nivel cortical pero recientemente se ha comprobado que una respuesta T específica frente a la contactina-2 puede explicar, al menos parcialmente, la aparición de estas lesiones en cualquiera de sus patrones(67). El daño oxidativo que conduce a la disfunción mitocondrial es otro factor etiológico en estas lesiones(65).

Su presencia en estadios iniciales imprime robustez a la hipótesis inflamatoria de la enfermedad en contrapartida a la hipótesis que la afectación cortical sea manifestación de un proceso neurodegenerativo primario (47,63,64,68–70).

## **1.5. CUADRO CLÍNICO DE LA ESCLEROSIS MÚLTIPLE**

La característica clínica más llamativa de la EM es su gran variabilidad de manifestaciones clínicas y su profunda variabilidad pronóstica, estando los síntomas y signos determinados por la localización de las lesiones desmielinizantes a lo largo del neuroeje. No obstante, las lesiones presentan predilección por ciertas regiones del SNC (periventricular, nervio óptico, tronco cerebral, cerebelo, médula espinal) configurándose conjuntos de síntomas y signos más o menos característicos que permiten su fácil reconocimiento(2).

### **1.5.1. Formas Clínicas de Evolución**

El curso clínico de la EM varía sustancialmente de un paciente a otro. Sin embargo pueden establecerse una serie de patrones evolutivos diferenciables: hay pacientes que experimentan síntomas recurrentes mientras que otros sufren un empeoramiento mantenido.

#### **1.5.1.1. Clasificación fenotípica de Lublin & Reingold de 1996**

En 1996 se realiza un consenso de expertos para unificar la nomenclatura referente a las formas evolutivas obteniéndose 4 formas clínicas(71):

- Remitente-Recurrente (EMRR)
- Secundariamente Progresiva (EMSP)
- Primariamente Progresiva (EMPP)
- Progresiva-Recurrente (EMPR)

Durante los primeros años de la enfermedad, aproximadamente el 85-90% de los enfermos presentan un curso clínico caracterizado por la aparición de episodios o brotes de disfunción neurológica más o menos reversibles, que se repiten en el tiempo(72). Esta forma clínica es conocida con el nombre de **EM remitente-recurrente** (EMRR)(71). Los brotes se caracterizan por la aparición de síntomas y signos de disfunción neurológica que se instauran a lo largo de uno o varios días, posteriormente se estabilizan y después se resuelven total o parcialmente al cabo de varias semanas. Para poder hablar de la aparición de un brote es necesario que la

clínica dure más de 24 horas, y debe haber transcurrido un periodo de al menos un mes entre cada brote para poder decir que ha ocurrido uno nuevo(22–25). En los primeros años de la enfermedad suele haber una buena recuperación de los brotes, con lo que el paciente permanece sin secuelas hasta el siguiente episodio. Tras el brote inicial, más del 25% presentan un segundo brote en el año siguiente y un 50% en los siguientes tres años(73,74). La tasa de brotes en las fases iniciales de la enfermedad varía según las series entre 0.8 a 1.3 brotes/año(73,75) aunque con el paso del tiempo tiende a disminuir dicha frecuencia así como el grado de recuperación de los brotes, produciéndose la aparición de secuelas neurológicas(75).

Tras 10-15 años de evolución, aproximadamente un 50% de los pacientes con EMRR entran en otra fase de la enfermedad caracterizada por un progresivo deterioro neurológico sin relación con los brotes, conocida como forma de **EM secundariamente progresiva** (EMSP)(71). Los factores que contribuyen a que un paciente desarrolle con mayor probabilidad o celeridad una fase SP no están determinados aunque numerosas series de historia natural apuntan al sexo masculino, a una mayor tasa de brotes los primeros años de la enfermedad, a una menor recuperación entre brotes o a una mayor frecuencia de brotes troncoencefálicos(73–79).

Tan sólo un 10-15% del total de los pacientes muestran un curso progresivo desde el comienzo de la enfermedad, recibiendo esta forma el nombre de **esclerosis múltiple primariamente progresiva** (EMPP)(71). Finalmente, existe un número reducido de estos enfermos que pueden presentar, tras un curso progresivo, ocasionales exacerbaciones. Esta forma se conoce como **EM progresiva recurrente** (EMPR)(71).

#### 1.5.1.2. Síndrome Clínico Aislado

Se conoce como síndrome clínico aislado (CIS) al primer episodio de disfunción neurológica altamente sugestivo de enfermedad desmielinizante(80); también puede encontrarse en la literatura en castellano como síndrome clínico (o desmielinizante) aislado (SCA/SDA) . El estudio del CIS cobra importancia tras la aparición de los tratamientos modificadores de la enfermedad(72) (DMD, del inglés “*Disease Modifying Drugs*”) y comienza a establecerse como una “nueva” entidad en el espectro temporal de la EM. Los CIS que más típicamente sugieren la existencia de

una EM son la neuritis óptica (NO) unilateral(81), la mielitis incompleta y un síndrome de tronco cerebral (se desarrollarán más adelante)(25).

El término SCA/CIS para algunos expertos es inadecuado porque engloba distintas situaciones de presentación clínica con posibles diferentes mecanismos fisiopatogénicos y evolución(82). En base a la presencia de uno o más síntomas y a la de lesiones en RM pueden distinguirse cinco tipos de CIS:

Tabla 2. Clasificación de los CIS(80).		
CIS tipo 1	Clínica monofocal y con al menos una lesión asintomática en RM.	Mayor riesgo de conversión a EM
CIS tipo 2	Clínica multifocal con al menos una lesión asintomática en RM	
CIS tipo 3	Clínica monofocal con RM normal	
CIS tipo 4	Clínica multifocal con RM normal	
CIS tipo 5	No presentación clínica sugestiva de enfermedad desmielinizante, pero con evidencia en IRMB de anomalías típicas de desmielinización.	Síndrome radiológicamente aislado
Las lesiones asintomáticas deberían ser típicas de desmielinización y en lugares también típicos para EM.		

Tabla 2. Clasificación de los síndromes clínicos aislados(80).

Se han estudiado detalladamente los factores que conllevan mayor riesgo de conversión a EM tras un CIS en numerosas series prospectivas destacando la presencia de bandas oligoclonales (BOC) en el LCR y la presencia de lesiones asintomáticas en una RM basal como los factores más determinantes, estas últimas con mayor riesgo a mayor número de lesiones(83–85). Aunque un debut de un CIS como NO tiene menor riesgo de desarrollo de EM que otros tipos(83) un paciente con NO incluso en ausencia de lesiones en RM posee un riesgo de conversión a EM de un 25% a 15 años(86).

Recientemente, y queda recogido en la clasificación de Miller(80), comienza a cobrar cuerpo nosológico el denominado “Síndrome Radiológicamente Aislado” o RIS (del inglés “*Radiologically Isolated Syndrome*”)(87) y que define la situación de una enfermedad desmielinizante silente y asintomática detectada de modo incidental en una RM efectuada por otro motivo. No se conoce la frecuencia exacta de estos hallazgos(88) y para intentar unificar los estudios se han propuesto unos criterios radiológicos de consenso(87). Se han realizado estudios prospectivos que cifran en un 33% el riesgo de conversión clínica a 5 años destacando como factores de riesgo la presencia de lesiones en médula cervical y dorsal y la presencia de BOC en LCR(89).

### **1.5.1.3. Nueva clasificación de 2013**

En 2012 se reúne una plataforma de expertos con idea de revisar la clasificación de Lublin & Reingold de 1996(71), con la nueva evidencia científica acumulada desde su publicación y la necesidad de modificar la clasificación fenotípica. Los cambios más importantes (ver imagen 3) son(90,91):

- Se incorporan a los fenotipos clínicos la categorización mediante modificadores de la enfermedad: la actividad y la progresión que son valorados tanto clínica como radiológicamente con una frecuencia anual. Estos modificadores poseen impacto en el pronóstico y en las decisiones terapéuticas.
- Desaparece la categoría EMPR.
- Se incorpora el CIS aunque no el RIS en los fenotipos de presentación.
- Se mantienen como fenotipos diferentes EMPP y EMSP englobados en “enfermedad en progresión” aunque fisiopatológicamente y en patrones de progresión son más similares que diferentes.



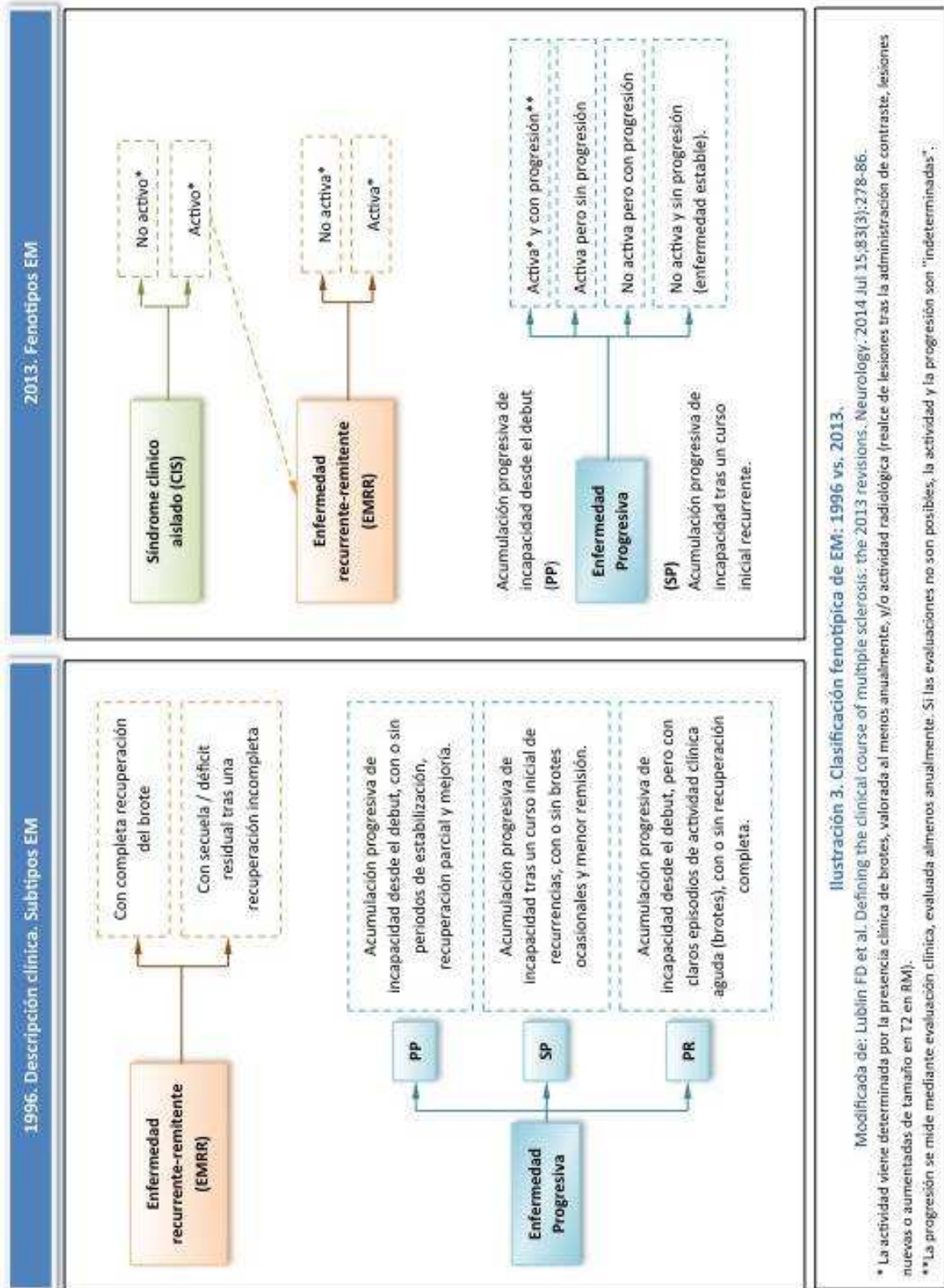


Imagen 3. Diferencias entre los fenotipos clínicos de 1996 y la revisión de 2013(71,90).



### **1.5.2. Signos y Síntomas**

La EM carece de cualquier dato clínico (o radiológico) patognomónico y de hecho puede cursar con cualquier posible síntoma de disfunción del SNC. Dichos síntomas se producen por un bloqueo de la conducción axonal en un punto concreto del SNC. No obstante, dado que las lesiones de la enfermedad tiene predilección topográfica en determinadas áreas de cerebro y médula existen determinados síntomas más típicos de la enfermedad. Otros síntomas no se basan estrictamente en el bloqueo de la conducción si no en su ineficiencia energética como pueden ser la fatiga o el fenómeno de Uhthoff o en la transmisión efáptica<sup>1</sup> o en hiperexcitabilidad axonal como pueden ser el signo de Lhermitte o los síntomas paroxísticos(5).

#### **1.5.2.1. Síntomas Sensitivos**

Constituyen la manifestación inicial más frecuente de la enfermedad en casi el 40% de los casos aunque a lo largo de la enfermedad casi la totalidad de los pacientes desarrollan síntomas sensitivos(2,92). La EM puede afectar a cualquier modalidad sensitiva e incluir síntomas negativos (hipoestesia o hipopalestesia) como positivos (disestesia, parestesia o dolor) cuya distribución corresponderá a las proyecciones de la vía afecta.

Un signo sensitivo muy característico, aunque nada específico, de la EM es el signo de Lhermitte que puede ser el debut hasta en 14%. Consiste en una sensación de descarga eléctrica descendente precipitada por la flexión cervical y que refleja la transmisión efáptica entre axones desmielinizados a este nivel(93,94).

#### **1.5.2.2. Síntomas Motores**

Las manifestaciones motoras son también muy habituales en el curso de la enfermedad aunque muy infrecuentes como forma de debut (alrededor del 8%) (92). Al igual que los síntomas sensitivos, la distribución de los síntomas motores dependerá de las proyecciones aferentes afectadas. La clínica motora es

---

<sup>1</sup> La **transmisión efáptica** es la transmisión de un impulso nervioso desde una fibra nerviosa, axón o dendrita, hacia otra a través de las membranas que habitualmente se encuentran dañadas como en una placa desmielinizante.

habitualmente de primera motoneurona con debilidad, hiperreflexia y espasticidad por lesión tractos corticoespinales piramidales. Raras veces la debilidad se acompaña de atrofia, debido a la presencia de lesiones medulares que afectan al asta anterior de la médula(5).

Los síntomas motores son la forma de presentación más común en la EMPP a modo de paraparesia o hemiparesia espástica progresiva(95).

### **1.5.2.3. Neuritis Óptica**

La neuritis óptica (NO) constituye el síntoma inicial de la EM en aproximadamente un 16% de los pacientes(92) característicamente unilateral y retrobulbar. Generalmente cursa con dolor retro-ocular que aumenta con la movilización del ojo, disminución de la agudeza visual y/o discromatopsia en el campo central de la visión. La pérdida total de la percepción visual es rara. Aunque los síntomas visuales suelen ser unilaterales, en población pediátrica pueden ser bilaterales con cierta frecuencia(81). Habitualmente el pronóstico visual es favorable aunque en estadios avanzados los pacientes pueden presentar una pérdida significativa de agudeza visual(81).

### **1.5.2.4. Manifestaciones del Tronco del Encéfalo y Cerebelo**

Los síntomas del tronco encefálico y cerebelo son el debut en el 15-20% y 10% de los pacientes respectivamente en las formas RR; en el caso de los pacientes con EMPP suponen la segunda forma más frecuente de presentación(92,95). Las lesiones desmielinizantes que afectan al tronco cerebral pueden producir una gran variedad de síntomas y signos dada la complejidad anatómica de la región con numerosas fibras y núcleos axonales. Los pacientes pueden presentar debilidad facial, alteraciones gustativas, pérdida de audición, vértigo, disartria y disfagia, etc. Sin embargo, el síntoma más común es la diplopía binocular, siendo la EM la causa más frecuente de diplopía en adultos jóvenes (96). Habitualmente suele deberse a una oftalmoplejía internuclear o a una paresia del VI par craneal. El signo más comúnmente observado es el nistagmus(96) que puede ser tanto pendular como horizontorrotatorio.

La EM afecta al cerebelo en un porcentaje elevado de pacientes, produciendo principalmente temblor, incoordinación y ataxia.

La presencia al debut tanto de síntomas troncoencefálicos como cerebelosos suelen condicionar peor pronóstico a medio y largo plazo(77,97,98) y son habitualmente muy incapacitantes en cualquier momento de la evolución(96).

#### **1.5.2.5. Síntomas genitourinarios e intestinales**

Los síntomas de la esfera esfinteriana o genital son frecuentes a lo largo del curso clínico de la enfermedad aunque excepcionales como forma de debut. Es común que las alteraciones urinarias y genitales coexistan en algún momento de la evolución; las alteraciones intestinales son menos frecuentes tanto al debut como en el curso de la EM(99). Cualquiera afectación a este nivel compromete seriamente la calidad de vida y desempeño social de los pacientes(100).

La alteración vesical puede presentar tres patrones de afectación: 1) vejiga hiperactiva con urgencia e incontinencia miccional, como manifestación de fallo en la retención urinaria; 2) vejiga flácida con retraso en inicio de la micción y frecuente retención urinaria, secundaria a un fallo en el vaciado urinario; y 3) disinergia vesico-esfinteriana. Un componente asociado de morbilidad es la predisposición a sufrir frecuentes infecciones urinarias(99).

Tras varios años de evolución, un elevado porcentaje de los enfermos presentan alteraciones en la esfera sexual, secundarias a las lesiones de la EM, pero también a factores psicológicos y como efecto secundario de los tratamientos recibidos(100). Los hombres pueden presentar disfunción eréctil, dificultades en la eyaculación, disminución de la libido y pérdida de sensación perineal. Las mujeres pueden referir disminución de la libido, anorgasmia, lubricación vaginal y sensación perineal disminuidas.

#### **1.5.2.6. Deterioro cognitivo y trastornos neuropsiquiátricos**

El deterioro cognitivo ha sido comúnmente infravalorado aunque estudios observacionales recientes apuntan a que más de la mitad de los pacientes sufren algún tipo de deterioro en las funciones superiores con repercusión socio-laboral(101). La alteración cognitiva comúnmente es leve o moderada aunque puede abarcar desde alteraciones sutiles en algún dominio cognitivo hasta un deterioro cognitivo grave. La intensidad del deterioro cognitivo no guarda una relación directa con el grado de discapacidad alcanzado en otros sistemas funcionales. Si bien el

deterioro cognitivo tiende a agravarse con el paso del tiempo, puede ser relevante desde los estadios iniciales de la enfermedad(59). Los dominios cognitivos habitualmente más afectados suelen ser la memoria de evocación, la atención mantenida y la velocidad de procesamiento de información(102), los dominios más respetados hasta estadio avanzados son el lenguaje y la memoria retrógrada. No se conoce con certeza la base fisiopatológica del deterioro cognitivo en la EM(5) aunque probablemente sea la convergencia de una serie de factores destacando las lesiones y la atrofia en sustancia gris cortical y subcortical(68), la reserva cognitiva previa(103) y los procesos metabólicos neurotóxicos como el estrés oxidativo(104). Los síntomas psiquiátricos son muy comunes entre los pacientes de EM en algún momento de su evolución siendo los más frecuentes la ansiedad y la depresión.

#### **1.5.2.7. Fenómeno de Uhthoff**

El fenómeno de Uhthoff fue inicialmente descrito por Wilhem Uhthoff (1853-1927) y su descripción inicial se circunscribió a manifestaciones oculares(105). Consiste en el empeoramiento transitorio clínico de un síntoma preexistente (o no) en un paciente con EM a consecuencia del incremento de la temperatura corporal (por fiebre, exposición solar, actividad física,...)(5). Hoy se reconoce este empeoramiento transitorio en cualquier función neurológica incluidas las capacidades cognitivas(106).

#### **1.5.2.8. Fatiga**

La fatiga es un síntoma muy frecuente a lo largo de la evolución de la EM (92) y se caracteriza por la falta de energía física o mental que empeora a lo largo del día o en el contexto de mayor actividad física, remedando un fenómeno de Uhthoff(5). Puede observarse en el 80% de los enfermos y es una importante causa de discapacidad(107). Probablemente ningún otro síntoma en la EM permanezca tan mal comprendido fisiopatológicamente, carente de tratamientos eficaces e infravalorado(107). Es un síntoma multifactorial, difícil de medir y que puede responder fisiopatológicamente, al menos de modo parcial, a otros trastornos subyacentes como trastornos de sueño, estados hipotiroideos o anémicos o trastornos de la esfera anímica.

### **1.5.2.9. Síntomas paroxísticos**

Algunos pacientes con EM refieren la presencia de síntomas transitorios, de escasa duración y característicamente repetitivos. En ocasiones pueden constituir el síntoma de inicio de la enfermedad(92). Los fenómenos paroxísticos motores incluyen espasmos tónicos, movimientos distónicos, y espasmos faciales, entre otros. Se consideran ejemplos de fenómenos paroxísticos sensitivos, la neuralgia del trigémino, el dolor neuropático en extremidades y el fenómeno de Lhermitte(93). Según los criterios diagnósticos de McDonald(23–25) si estos episodios persisten durante más de 24 horas deben ser considerados como un brote.

### **1.5.3. Nuevos datos en la Progresión de la Discapacidad**

A lo largo de la historia de la EM se han identificado varios factores cuya presencia al diagnóstico se relaciona al incremento rápido de la discapacidad en formas EMRR, siendo este hecho menos conocido en el caso de formas EMPP. Aunque se desarrollarán o lo han sido a lo largo de la presente introducción cabe destacar el sexo masculino(79), la raza negra(97), una mayor tasa de brotes los primeros años(75), una mayor carga lesional en las primera RM(108) y la presencia de bandas oligoclonales de IgM en el LCR(109). Incluso se han desarrollado trabajos que buscaban el valor pronóstico de la combinación de varios de estos factores(110).

Numerosos estudios de historia natural han determinado la existencia de un fenómeno “bifásico” en la EM dos fases bien definidas(111). Existe una primera fase, denominada “sensible a la inflamación” donde el paciente presenta una velocidad muy variable en la adquisición de discapacidad. Sin embargo a partir de un determinado momento que los estudios ubican en una puntuación de 3-4 en la escala EDSS(111) (se desarrollará más adelante), la velocidad de adquisición de discapacidad se hace muy constante independientemente de la fase previa; esta fase se denomina “fase amnésica”. Estos estudios de historia natural indican que una vez se ha alcanzado un determinado punto de discapacidad, que clínicamente suele coincidir con el paso de EMRR a EMSP, la velocidad de progresión de la discapacidad se hace constante e insensible hasta la fecha a los diversos tratamientos disponibles(10,112–114).

#### 1.5.4. Escalas de Valoración en la EM

La exploración neurológica convencional constituye la primera aproximación del neurólogo al paciente con EM, si bien de forma poco estandarizada y escasamente comparable entre los distintos evaluadores del paciente, por lo que se han propuesto diversas escalas clínicas de valoración de la disfunción neurológica en EM. Cada escala tiene ventajas e inconvenientes y a día de hoy ninguna cumple todos los criterios ideales como medida final del grado de discapacidad.

Kurtzke(21) desarrolló una escala de disfunción neurológica denominada “*Expanded Disability Status Scale*” (EDSS) con valores comprendidos entre 0 (exploración normal) hasta 10 puntos (fallecimiento por EM), con incrementos de 0.50 puntos entre ambos extremos (imagen 4 y tabla 3).

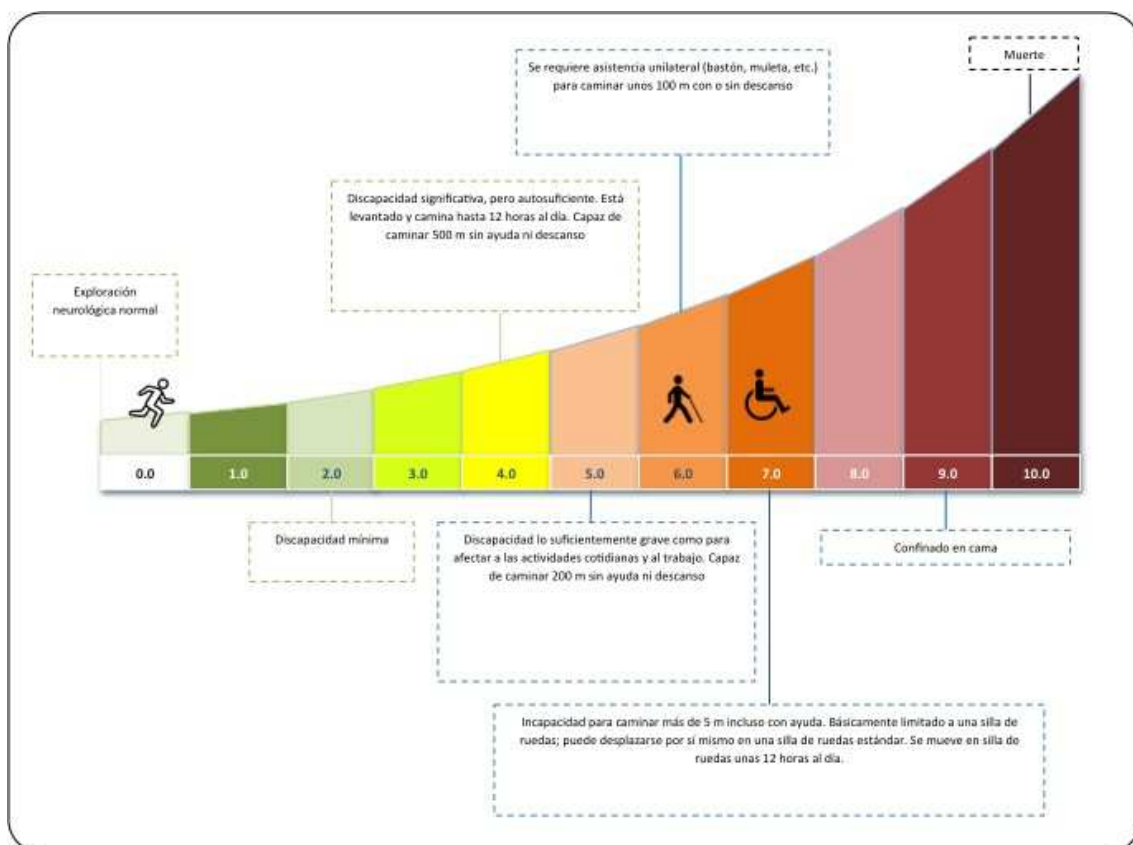


Imagen 4. Representación de la escala EDSS (*Expanded Disability Status Scale*). Adaptado de Kurtzke(21).

Tabla 3. Escala de estado de discapacidad ampliada (EDSS)	
<b>0</b>	Exploración neurológica normal (en todos los sistemas funcionales [SF] en grado 0; en las funciones mentales se acepta el grado 1).
<b>1,0</b>	Ninguna incapacidad. Mínimos hallazgos exploratorios en uno de los SF (grado 1, exceptuando las funciones mentales).
<b>1,5</b>	Ninguna incapacidad. Mínimos hallazgos en más de uno de los SF (más de un grado 1, exceptuando las funciones mentales).
<b>2,0</b>	Mínima incapacidad en uno de los SF (un grado 2, el resto con grados 0 ó 1).
<b>2,5</b>	Mínima incapacidad en dos de los SF (dos grados 2, el resto con grados 0 ó 1).
<b>3,0</b>	Moderada incapacidad en uno de los SF (un grado 3, el resto con grados 0 ó 1) o ligera incapacidad en tres o cuatro SF (tres/cuatro con grados 2 y grados 0 ó 1 en el resto). Completamente ambulante.
<b>3,5</b>	Completamente ambulante, pero con moderada incapacidad en uno de los SF (un grado 3) y uno o dos SF con grado 2; o dos SF con grado 3; o cinco SF con grado 2 (con 0 ó 1 en el resto).
<b>4,0</b>	Completamente ambulante sin ayuda, independiente, más de 12 horas al día pesar de sufrir una grave incapacidad consistente en un SF con grado 4 (con grados 0 ó 1 en el resto), o combinaciones de grados menores con puntuaciones mayores que las mencionadas. Puede caminar sin ayuda o descanso unos 500 metros.
<b>4,5</b>	Completamente ambulante sin ayuda la mayoría del día. Puede trabajar una jornada completa, aunque tiene alguna limitación para tener una actividad plena, o necesita una ayuda mínima. Grave incapacidad consistente en un SF con grado 4 (con grados 0 ó 1 en el resto) o combinaciones de grados menores con puntuaciones mayores que las mencionadas antes. Puede caminar sin ayuda o descanso 300 metros.
<b>5,0</b>	Camina sin ayuda o descanso unos 200 metros. Tiene una incapacidad grave que dificulta todas sus actividades diarias (por ejemplo, para trabajar necesita condiciones especiales). (Grado 5 en uno de los SF y con grados 0 ó 1 en el resto, o combinaciones de grados menores que habitualmente sobrepasan la puntuación de 4,0).
<b>5,5</b>	Camina sin ayuda o descanso unos 100 metros. Tiene una incapacidad grave que imposibilita todas sus actividades diarias. (Grado 5 en uno de los SF con grados 0 ó 1 en el resto, o combinaciones de grados menores que habitualmente sobrepasan la puntuación de 4,0).
<b>6,0</b>	Necesita apoyo (bastón, muleta o corrector) intermitente o unilateral para caminar 100 metros con o sin descanso. (Normalmente la combinación de SF tiene, al menos, más de 2 grados 3).
<b>6,5</b>	Necesita apoyo bilateral (bastones, muleta o corrector) constante para andar 20 metros sin descanso. Normalmente la combinación de SF tiene, al menos, más de 2 grados 3.
<b>7,0</b>	No puede andar más de 5 metros sin ayuda, está en silla de ruedas casi permanentemente. Utiliza una silla normal que conduce él mismo y puede cambiarse solo. Suele estar en la silla más de 12 horas al día. Normalmente la combinación de SF tiene, al menos, más de 1 grado 4. Excepcionalmente es un grado 5 de la vía piramidal aislado.
<b>7,5</b>	No puede dar más que unos pocos pasos, está en silla de ruedas permanentemente, necesita ayuda para cambiarse. Conduce él mismo, pero no puede utilizar una silla normal durante todo el día; puede necesitar una silla con motor. (Normalmente la combinación de SF tiene, al menos, más de un grado 4).
<b>8,0</b>	Actividad limitada a la cama o silla, puede usar una silla de ruedas para desplazarse. Puede estar levantado la mayor parte del día. Conserva en parte su cuidado personal. Generalmente mantiene la funcionalidad de sus brazos. (Tiene habitualmente varios SF en grado 4).
<b>8,5</b>	Pasa la mayor parte del día en la cama. Conserva en parte su cuidado personal. Generalmente mantiene parcialmente la funcionalidad de sus brazos. (Tiene habitualmente varios SF en grado 4).
<b>9,0</b>	Paciente encamado, puede comunicarse y comer (usualmente los equivalentes en los SF son combinaciones, la mayor parte grado 4+).
<b>9,5</b>	Paciente encamado, incapaz de comunicarse o comer/deglutir (generalmente los equivalente en los SF son combinaciones, la mayor parte grado 4+).
<b>10</b>	Fallecimiento debido a EM

Tabla 3. Escala de discapacidad EDSS (*Expanded Disability Status Scale*). Adaptada de Kurtzke(21).

La puntuación se obtiene de la valoración cuantitativa de las alteraciones presentes en lo que Kurtzke denominó sistemas funcionales (SF) (Tabla 4), cuyo valor de obtiene de ocho subescalas destinadas a cuantificar los hallazgos de la historia y la exploración neurológicas en diferentes apartados, o “sistemas”, funcionales neurológicos: piramidal, cerebelo, tronco encefálico, sistema sensitivo, esfínteres,



visión, estado mental y otros (cualquier otro síntoma atribuible a la EM como la espasticidad). La escala permite al clínico monitorizar la progresión de la enfermedad y detectar con más facilidad el momento en que pasa a la forma progresiva.

Aun siendo la escala más empleada tanto en práctica clínica habitual como en monitorización en ensayos clínicos tiene cuatro inconvenientes principales:

- La escala muestra una diferente sensibilidad al cambio a lo largo de la misma y con un cambio acentuado antes y después del valor de puntuación 4(115); previo a la misma tiene un comportamiento aparentemente lineal aunque a partir de la misma es logarítmica. Además dicho valor diferencia dos métodos de valoración siendo dependiente el primer tramo (0-4) de las combinaciones de los SF mientras que el segundo tramo (4-10) es más dependiente de la capacidad de deambulación.
- Elevada dependencia del observador(116) y menor del paciente(117) por lo que se requiere que el neurólogo esté entrenado en dicha escala.
- Se trata de una escala estática que solo traduce un valor de la discapacidad en una evaluación puntual traduciendo mal la progresión de la discapacidad.
- No es especialmente sensible a aspectos limitantes como puede ser el deterioro cognitivo o la alteración esfinteriana en estadios moderados de discapacidad(115).

Sin embargo su amplia aceptación y la demostración de validez a lo largo de numerosos estudios determinan que sea la escala más empleada(115).

La herramienta “*Multiple Sclerosis Severity Score*” trata de solventar la tercera flaqueza relacionando la puntuación de la EDSS con el tiempo transcurrido para adquirir esa puntuación(118). De este modo se plasma la “virulencia” de la enfermedad en cada paciente. Ha demostrado una mejor correlación pronóstica que la medida aislada de la EDSS(119).



Sistemas funcionales incluidos en la escala ampliada del estado de discapacidad (EDSS)	
<b>Vía piramidal</b>	0. Normal.
	1. Exploración anormal sin incapacidad.
	2. Mínima incapacidad.
	3. Paraparesia o hemiparesia leve o moderada o monoparesia grave.
	4. Paraparesia o hemiparesia graves. Tetraparesia moderada o monoplejía.
	5. Paraplejía, hemiplejía o tetraparesia graves.
	6. Tetraplejía.
V. Desconocido.	
<b>Cerebelo</b>	0. Normal
	1. Exploración anormal sin incapacidad.
	2. Ataxia ligera.
	3. Ataxia truncal o de miembros moderada.
	4. Ataxia grave de todos los miembros.
	5. Incapacidad para realizar movimientos coordinados debido a la ataxia.
	V. Desconocido.
X. Se añade si la exploración está artefactada por la paresia.	
<b>Tronco cerebral</b>	0. Normal.
	1. Exploración anormal sin incapacidad.
	2. <i>Nistagmus</i> moderado u otras incapacidades leves.
	3. <i>Nistagmus</i> u oftalmoparesias graves o disfunciones moderadas de otros nervios craneales.
	4. Disartria grave u otras disfunciones también graves.
	5. Incapacidad para hablar o para tragar.
V. Desconocido.	
<b>Sensibilidad</b>	0. Normal.
	1. Disminución solamente de las sensibilidades vibratoria o táctil epicrítica en 1 ó 2 miembros.
	2. Pérdida leve de las sensibilidades táctil, dolorosa o posicional y/o moderada de la vibratoria en 1 ó 2 miembros, o exclusivamente de la vibratoria pero en 3 de los 4 miembros.
	3. Pérdida moderada de las sensibilidades táctil o dolorosa o posicional y/o esencialmente pérdida de la vibratoria en 1 ó 2 miembros; o ligera disminución de la táctil y de la dolorosa y/o disminución moderada de todas las propioceptivas en 3 ó 4 miembros.
	4. Déficit acusado táctil o doloroso, o pérdida de la sensibilidad propioceptiva, sola o combinada en 1 ó 2 miembros; o déficit moderado táctil o doloroso y/o grave déficit propioceptivo en más de 2 miembros.
	5. Ausencia de sensibilidad en 1 ó 2 miembros o déficit moderado táctil o doloroso y/o pérdida de la propioceptiva en la mayoría del cuerpo.
	6. Sensibilidad prácticamente perdida por debajo del cuello.
V. Desconocido.	
<b>Vejiga e intestino</b>	0. Normal.
	1. Vacilación, urgencia o retención urinaria ligeras.
	2. Vacilación, urgencia o retención urinaria o fecal moderadas, o incontinencia urinaria ocasional.
	3. Incontinencia urinaria frecuente.
	4. Necesidad de sondaje casi permanente.
	5. Pérdida del control del esfínter vesical.
	6. Pérdida del control de los esfínteres vesical y rectal.
V. Desconocido.	
<b>Visión</b>	0. Normal.
	1. Escotoma con agudeza visual (corregida) superior a 20/30.
	2. El ojo peor tiene un escotoma y una agudeza visual máxima (corregida) entre 20/30 y 20/59.
	3. El ojo peor tiene un gran escotoma o defectos campimétricos moderados y una agudeza visual máxima (corregida) entre 20/60 y 20/99.

	4. El ojo peor tiene grandes defectos campimétricos y una agudeza visual entre 20/100 y 20/60; o grado 3 + agudeza del ojo mejor 20/60 o menor.
	5. El ojo peor tiene una agudeza visual <20/200 o grado 4 + agudeza del ojo mejor 20/60 o menor.
	V. Desconocido.
	X. Se añade en presencia de palidez papilar temporal.
<b>Funciones mentales</b>	o. Normal
	1. Alteración del ánimo.
	2. Deterioro mental ligero.
	3. Deterioro mental moderado.
	4. Deterioro mental marcado (síndrome cerebral orgánico crónico moderado).
	5. Demencia o síndrome cerebral orgánico crónico grave.
<b>Otras funciones</b>	V. Desconocido.
	o. Normal.
	1. Otros hallazgos neurológicos atribuidos a la esclerosis múltiple.
	V. Desconocido.

Tabla 4. Sistemas funcionales. Su ponderación forma parte de la escala de discapacidad EDSS(*Expanded Disability Status Scale*). Adaptada de Kurtzke(21).

Existen otras escalas(120) que se emplean en la valoración de los pacientes con EM destacando el “*Multiple Sclerosis Functional Composite*” (MSFC) que surge de modo cooperativo por la “*National Multiple Sclerosis Society Clinical Outcomes Assessment Task Force*” (121) para compensar las carencias de la EDSS. Es un índice estadístico obtenido a partir de los resultados en tres diferentes test: tiempo en recorrer 25 pasos, tiempo en completar una tarea bimanual (test de los “9 palitos”) y a nivel cognitivo la velocidad de procesamiento y capacidad de cálculo mediante el test PASAT (“*Paced Auditory Serial Addition Test*”). Se trata de una escala cuyos valores han sido previamente normalizados. Recientemente se trabaja para una nueva versión del MSFC(115) que sustituya el PASAT por el test de sustitución de símbolos y añade una valoración visual de bajo contraste.

## **1.6. DIAGNOSTICO DE LA ESCLEROSIS MÚLTIPLE**

La EM es una enfermedad con una alta variabilidad interindividual y característicamente carente de datos patognomónicos desde un punto de vista clínico, radiológico o analítico(2). Desde las primeras aproximaciones diagnósticas de Charcot(18) se reconoce uno de los principios fundamentales que hoy rigen el diagnóstico: la diseminación. La EM provoca una respuesta autoinmunitaria continua a nivel de SNC y esta acción progresiva conduce a que se produzcan de modo progresivo determinados signos y síntomas a lo largo del neuroeje y del tiempo; es decir, los síntomas y signos de la enfermedad se diseminan a lo largo del tiempo y el espacio.

El otro principio fundamental que rige el diagnóstico es el de exclusión ya que no existe ningún dato patognomónico de la enfermedad. El diagnóstico diferencial de la EM es muy amplio y variable en función de la situación concreta (edad, semiología,...). Existen documentos de consenso para facilitar el diagnóstico diferencial a modo de “banderas”, hitos que con mayor o menor nivel de evidencia hacen dudar del diagnóstico de EM y plantear un diagnóstico alternativo(122).

Hoy en día el diagnóstico de la EM se realiza mediante el cumplimiento de los criterios diagnósticos, que conceden un marco de probabilidad en base a datos clínicos y paraclínicos.

### **1.6.1. Criterios Diagnósticos de Esclerosis Múltiple**

Desde los primeros criterios de Schumacker(9) se han desarrollado varios criterios diagnósticos de consenso. Desarrollaremos los criterios de Poser(22), por incorporar la evidencia paraclínica y haber estado vigentes 21 años, y los criterios de McDonald(23) y sus sucesivas revisiones(24,25) al ser los actualmente vigentes<sup>2</sup>.

---

<sup>2</sup> Los criterios de Poser(22) y de McDonald(23–25) toman el nombre del primer firmante aunque cada una de las revisiones de los criterios diagnósticos de la esclerosis múltiple se concretan tras la reunión de un panel de expertos que revisan la evidencia científica disponible hasta la fecha.

### 1.6.1.1. Criterios de Poser

Los criterios de Poser (22) (tabla 5) establecían tres niveles de certeza diagnóstica (EM definida, EM probable y EM posible) en base a unos hallazgos clínicos y paraclínicos mediante el apoyo de la, en aquel momento incipiente, RM, el LCR y los datos neurofisiológicos determinaba tres niveles categóricos: EM clínicamente definida (concepto que se continua empleando hoy en día para definir aquella EM que se diagnostica por la diseminación temporoespacial clínica), EM definida con apoyo de laboratorio, EM clínicamente probable y EM probable con apoyo de laboratorio. La presencia de BOC o de un índice de IgG elevado en el LCR establecían el diagnóstico de EM definida con apoyo de laboratorio en presencia de un único brote. Las RM y los potenciales evocados permitían demostrar diseminación espacial en otras regiones no afectas clínicamente.

Quizás una de las mayores deficiencias de los criterios de Poser es que no contemplan una categoría diagnóstica para la EMPP.

Categoría	Brotos clínicos	Evidencia clínica	Evidencia paraclínica		LCR*
<b>Clínicamente definida</b>					
EMCD A1	2	2			
EMCD A2	2	1	y	1	
<b>Definida con apoyo de laboratorio</b>					
EMDAL B1	2	1	ó	1	+
EMDAL B2	1	2			+
EMDAL B3	1	1	y	1	+
<b>Clínicamente probable</b>					
EMCP C1	2	1			
EMCP C2	1	2			
EMCP C3	1	1	y	1	
<b>Probable con apoyo de laboratorio</b>					
EMPAL D1	2				+

Tabla 5. Criterios diagnósticos de Poser para el diagnóstico de EM, 1983(22). \*Bandas oligoclonales positivas. EMCD (EM clínicamente definida), EMALD (EM definida con apoyo de laboratorio), EMCP (EM clínicamente probable) y EMALP (EM probable con apoyo de laboratorio).

### 1.6.1.2. Criterios de McDonald

En el año 2001(23) y condicionado por los grandes avances que se había producido en el campo de la neuroimagen se publican unos nuevos criterios de

consenso (tabla 6). La principal novedad consistía en la posibilidad de cumplir los criterios de diseminación en tiempo (DIT) y espacio (DIS) mediante RM e incorporaba un apartado para el diagnóstico de EMPP.

<b>CRITERIOS DIAGNÓSTICOS DE MC DONALD DE ESCLEROSIS MULTIPLE</b>	
<b>Presentación clínica</b>	<b>Requerimientos adicionales para el diagnóstico de EM</b>
Dos o más brotes, evidencia clínica objetiva de dos o más lesiones	Ninguna <sup>a</sup>
Dos o más brotes, evidencia clínica objetiva de una lesión	Diseminación en espacio demostrada mediante una de: <ul style="list-style-type: none"> <li>• RM<sup>b</sup></li> <li>• Dos o más lesiones mediante RM sugestivas de EM y LCR positivo<sup>c</sup></li> <li>• Espera a un nuevo brote clínico que implique una nueva región diferente</li> </ul>
Un brote, evidencia clínica objetiva de dos o más lesiones	Diseminación en tiempo demostrada mediante una de: <ul style="list-style-type: none"> <li>• RM<sup>d</sup></li> <li>• Un segundo brote</li> </ul>
Un brote, evidencia clínica objetiva de una lesión (presentación monosintomática o síndrome clínico aislado)	Diseminación en espacio demostrada mediante una de: <ul style="list-style-type: none"> <li>• RM<sup>b</sup></li> <li>• Dos o más lesiones mediante RM sugestivas de EM y LCR positivo<sup>c</sup></li> <li>• Espera a un nuevo brote clínico que implique una nueva región diferente</li> </ul> <p style="text-align: center;">y</p> Diseminación en tiempo demostrada mediante una de: <ul style="list-style-type: none"> <li>• RM<sup>d</sup></li> <li>• Un segundo brote</li> </ul>
Progresión neurológica insidiosa sugestiva de EM	LCR positivo <sup>c</sup> y Diseminación en espacio demostrada por al menos una de: <ul style="list-style-type: none"> <li>• Nueve o más lesiones en T2 en cerebro</li> <li>• Dos o más lesiones medulares</li> <li>• Al menos 4 lesiones cerebrales y al menos una lesión medular</li> </ul> <p style="text-align: center;">o</p> Potenciales evocados visuales alterados junto con evidencia por RM de al menos 4-8 lesiones cerebrales o menos de 4 lesiones cerebrales junto con una lesión medular <p style="text-align: center;">y</p> Diseminación en tiempo establecida por: <ul style="list-style-type: none"> <li>• Progresión clínica durante 1 año</li> <li>• RM<sup>d</sup></li> </ul>
<p>a. No se requieren test adicionales, sin embargo si la RM o el LCR son realizados y son negativos debe tomarse con cautela el diagnóstico de EM y plantear si no hay una explicación alternativa más satisfactoria para el cuadro clínico.</p> <p>b. Cumplimiento de los criterios de Barkhof-Tintoré</p> <p>c. BOC presentes en líquido detectadas por un método adecuado y diferentes a las encontradas en sangre o aumento del índice IgG</p> <p>d. Cumplimiento de los criterios de diseminación en tiempo (ver Tabla 7)</p>	

Tabla 6. Criterios diagnóstico de EM de Mc Donald (2001)(23): categorías de EM

La DIS se basaba en el cumplimiento de los denominados criterios de “Barkhof-Tintoré”(123,124). Se satisfacían dichos criterios cuando se cumplían al menos 3 de:

- Existencia de al menos una lesión realzante con Gadolinio ó 9 lesiones hiperintensas en T2 de las que al menos:
- 3 sean periventriculares
- 1 yuxtacortical
- 1 infratentorial

La DIT podía establecerse clínicamente o mediante RM (tabla 7).

Uno de los siguientes:
<ol style="list-style-type: none"><li>1. Si la primera RM se efectúa 3 meses tras el inicio de los síntomas una lesión realzante de gadolinio en una localización diferente de la que originó la clínica inicial demostraría DIT. Si no existe una lesión realzante se requerirá de una nueva RM (recomendado a partir de los 3 meses) donde la evidencia de una nueva lesión T2 o de una realzante demostraría DIT.</li><li>2. Si la primera RM se efectúa antes de 3 meses del inicio de los síntomas se requerirá una nueva RM (realizada a partir de los 3 meses) donde se evidencie una nueva lesión T2 o una realzante con gadolinio para demostrar DIT</li></ol>

Tabla 7. Evidencia de diseminación en tiempo (DIT) por RM Magnética según los criterios de McDonald 2001(23).

En 2005(24) los criterios sufren una discreta revisión que básicamente consiste en la incorporación de la lesión medular al conteo total y a la lesión infratentorial en los criterios de Barkhof-Tintoré (tabla 8). Además se simplifica la DIT mediante RM (tabla 9).

Sin embargo se producen en los siguientes años avances considerables en el campo de la RM que determinan la necesidad de revisar el papel de la RM en los criterios. En primer lugar se demuestra la similitud en la determinación de DIT con una única RM siempre que muestre lesiones realzantes asintomáticas junto con otras lesiones en otra fase evolutiva(125). El segundo avance considerable fue demostrar cómo la DIS por RM mediante los criterios de Barkhof-Tintoré podía sustituirse por unos la presencia de al menos una lesión en al menos dos localizaciones típicas de las lesiones de EM (yuxtacortical, periventricular, infratentorial y medular)(125). Este nuevo conjunto de criterios de DIS mediante RM se denominó “criterios de Swanton” y junto a la nueva posibilidad de DIT por RM(126) se incorporaron a la nueva revisión de los criterios de McDonald de 2010(25) (tabla 10). Otras modificaciones

realizadas en la vigente revisión fueron la eliminación del papel de LCR en el diagnóstico de las formas RR dejándolo vigente para las formas PP.

<b>REVISIÓN DE 2005 DE LOS CRITERIOS DIAGNÓSTICOS DE MC DONALD DE ESCLEROSIS MÚLTIPLE</b>	
<b>Presentación clínica</b>	<b>Requerimientos adicionales para el diagnóstico de EM</b>
<b>Dos o más brotes<sup>a</sup>, evidencia clínica objetiva de dos o más lesiones</b>	Ninguna <sup>b</sup>
<b>Dos o más brotes<sup>a</sup>, evidencia clínica objetiva de una lesión</b>	Diseminación en espacio demostrada mediante una de: <ul style="list-style-type: none"> <li>• RM<sup>c</sup></li> <li>• Dos o más lesiones mediante RM sugestivas de EM y LCR positivo<sup>d</sup></li> <li>• Espera a un nuevo brote clínico que implique una nueva región diferente</li> </ul>
<b>Un brote<sup>a</sup>, evidencia clínica objetiva de dos o más lesiones</b>	Diseminación en tiempo demostrada mediante una de: <ul style="list-style-type: none"> <li>• RM<sup>e</sup></li> <li>• Un segundo brote</li> </ul>
<b>Un brote<sup>a</sup>, evidencia clínica objetiva de una lesión (presentación monosintomática o síndrome clínico aislado)</b>	Diseminación en espacio demostrada mediante una de: <ul style="list-style-type: none"> <li>• RM<sup>c</sup></li> <li>• Dos o más lesiones mediante RM sugestivas de EM y LCR positivo<sup>d</sup></li> <li>• Espera a un nuevo brote clínico que implique una nueva región diferente</li> </ul> <p>y</p> Diseminación en tiempo demostrada mediante una de: <ul style="list-style-type: none"> <li>• RM<sup>e</sup></li> <li>• Un segundo brote</li> </ul>
<b>Progresión neurológica insidiosa sugestiva de EM</b>	Progresión clínica de la enfermedad durante 12 meses (determinada de modo retrospectivo o prospectivo) y dos de: <ul style="list-style-type: none"> <li>• RM craneal patológica (&gt;9 lesiones en T2 o al menos 4 si los PEV son patológicos)</li> <li>• RM medular patológica (al menos 2 lesiones focales)</li> <li>• LCR positivo</li> </ul>
<p>Si los criterios indicados se cumplen y no hay una explicación mejor para la presentación clínica, el diagnóstico es EM. Si el cuadro es sospechoso pero no se satisfacen plenamente los criterios el diagnóstico es de “posible EM”; si durante la evaluación surge otro diagnóstico que explica mejor el cuadro clínico el diagnóstico sería de “No EM”.</p> <ol style="list-style-type: none"> <li>Un brote se define como un episodio de síntomas neurológicos de un sospechado origen inflamatorio y desmielinizante. Puede tratarse de una comunicación subjetiva (cuando existan hallazgos objetivos del mismo) o demostrado por una observación objetiva y durar al menos 24 horas</li> <li>No se requieren test adicionales, sin embargo si la RM o el LCR son realizados y son negativos debe tomarse con cautela el diagnóstico de EM y plantear si no hay una explicación alternativa más satisfactoria para el cuadro clínico.</li> <li>Cumplimiento de los criterios de Barkhof-Tintoré</li> <li>LCR positivo determinado por presencia de BOC detectadas por un método adecuado (isoelectroenfoque) y diferentes a las encontradas en sangre o aumento del índice IgG</li> <li>Cumplimiento de los criterios de diseminación en tiempo (ver Tabla 7)</li> </ol>	

Tabla 8. Revisión de 2005 de los criterios diagnósticos de Mc Donald(24).



Uno de los siguientes:

1. Detección de realce con gadolinio al menos 3 meses tras el inicio del debut clínico en una localización diferente de la del evento inicial
2. Detección de una nueva lesión del evento clínico inicial

Tabla 9. Criterios de DIT por RM según la revisión de 2005 de los criterios de Mc Donald de EM.

<b>CRITERIOS DIAGNÓSTICOS DE MC DONALD DE EM 2010</b>	
Presentación clínica	Requerimientos adicionales para el diagnóstico de EM
<b>Dos o más brotes<sup>a</sup>; evidencia clínica objetiva de dos o más lesiones o evidencia clínica de una lesión pero con evidencia histórica razonable de un brote previo<sup>b</sup></b>	Ninguna <sup>c</sup>
<b>Dos o más brotes<sup>a</sup>, evidencia clínica objetiva de una lesión</b>	Diseminación en espacio demostrada mediante una de: <ul style="list-style-type: none"> <li>• Presencia de <math>\geq 1</math> lesión T2 en al menos 2 de las 4 áreas típicas de EM (periventricular, yuxtacortical, infratentorial o medular)<sup>d</sup></li> <li>• Espera a un nuevo brote<sup>a</sup> clínico que implique una nueva región diferente</li> </ul>
<b>Un brote<sup>a</sup>, evidencia clínica objetiva de dos o más lesiones</b>	Diseminación en tiempo demostrada mediante de: <ul style="list-style-type: none"> <li>• Presencia simultánea de una lesión realzante de gadolinio asintomática en cualquier momento</li> <li>• Una nueva lesión T2 o realzante con Gd en una RM de control efectuada en cualquier momento tras la RM basal</li> <li>• Un segundo brote</li> </ul>
<b>Un brote<sup>a</sup>, evidencia clínica objetiva de una lesión (síndrome clínico aislado)</b>	Diseminación en espacio demostrada mediante una de: <ul style="list-style-type: none"> <li>• Presencia de <math>\geq 1</math> lesión T2 en al menos 2 de las 4 áreas típicas de EM (periventricular, yuxtacortical, infratentorial o medular)<sup>d</sup></li> <li>• Espera a un nuevo brote<sup>a</sup> clínico que implique una nueva región diferente</li> </ul> <p style="text-align: center;">y</p> Diseminación en tiempo demostrada mediante de: <ul style="list-style-type: none"> <li>• Presencia simultánea de una lesión realzante de gadolinio asintomática en cualquier momento</li> <li>• Una nueva lesión T2 o realzante con Gd en una RM de control efectuada en cualquier momento tras la RM basal</li> <li>• Un segundo brote</li> </ul>
<b>Progresión neurológica insidiosa sugestiva de EM</b>	Progresión clínica de la enfermedad durante 12 meses (determinada de modo retrospectivo o prospectivo) y más de dos de los siguientes criterios <sup>d</sup> : <ul style="list-style-type: none"> <li>• Evidencia de DIS a nivel cerebral basada en la presencia de <math>\geq 1</math> lesión T2 en al menos 2 de 3 áreas típicas de EM (periventricular, yuxtacortical o infratentorial)</li> <li>• Evidencia de DIS a nivel medular con <math>\geq 2</math> lesiones T2</li> <li>• LCR positivo (mediante isoelectroenfoco y/o índice de Ig G elevado)</li> </ul>
Si los criterios indicados se cumplen y no hay una explicación mejor para la presentación clínica, el diagnóstico es EM. Si el cuadro es sospechoso pero no se satisfacen plenamente los criterios el diagnóstico es de "posible EM"; si durante la evaluación surge otro diagnóstico que explica mejor el cuadro clínico el diagnóstico sería de "No EM".	
<p>a. Un brote se define como un episodio de síntomas neurológicos de un sospechado origen inflamatorio y desmielinizante. Puede tratarse de una comunicación subjetiva (cuando existan hallazgos objetivos del mismo) o demostrado por una observación objetiva y durar al menos 24 horas</p> <p>b. No se requieren test adicionales, sin embargo si la RM o el LCR son realizados y son negativos debe</p>	



tomarse con cautela el diagnóstico de EM y plantear si no hay una explicación alternativa más satisfactoria para el cuadro clínico.
c. Cumplimiento de los criterios de Barkhof-Tintoré
d. LCR positivo determinado por presencia de BOC detectadas por un método adecuado (isoelectroenfoque) y diferentes a las encontradas en sangre o aumento del índice IgG
e. Cumplimiento de los criterios de diseminación en tiempo (ver Tabla 7)

Tabla 10. Criterios diagnósticos de Mc Donald 2010(25).

Cuando se han realizado comparaciones entre los criterios de Poser(22) y los de McDonald(23–25) se comprueba cómo los pacientes pueden ser diagnosticados más precozmente mediante estos últimos, acentuándose este hecho con cada revisión(127). Esto ha condicionado de modo secundario, que las comparativas de la eficacia de los tratamientos en pacientes incluidos con unos u otros criterios experimenten el fenómeno estadístico conocido como “fenómeno de Will Rogers”(128)<sup>3</sup>.

### 1.6.2. Pruebas Complementarias en Esclerosis Múltiple

La EM carece de datos patognomónicos tanto clínicos como en cualquier prueba complementaria. Sin embargo muestra hallazgos muy característicos en la RM, el LCR y los exámenes neurofisiológicos que ayudan a su diagnóstico.

#### 1.6.2.1. Líquido Cefalorraquídeo

El análisis del LCR proporciona una importante información en la EM ya que es el parámetro biológico más cercano a la fisiopatología del SNC y probablemente de la enfermedad. El LCR puede considerarse como una laguna del espacio extracelular dentro del SNC. EL LCR se sintetiza a nivel de los plexos coroideos como un ultrafiltrado del espacio extracelular del SNC conteniendo solutos como la IgG o la albúmina. Por ello, el examen del LCR refleja el contenido del espacio extracelular del SNC tanto en condiciones normales como patológicas. El mayor atractivo del estudio

<sup>3</sup> Will Rogers (1879-1935) fue un cómico estadounidense. Una de sus citas humorísticas “*when Okies left Oklahoma and move to California, they raised the average intelligence level in both states*” (cuando la población de Oklahoma se mudó a California consiguió incrementar el nivel medio de inteligencia en ambos estados) fue interpretada por Alvan Feinstein para describir el fenómeno “migratorio” que observaba en los pacientes con cáncer. Con el avance de las técnicas diagnósticas mejoraba el pronóstico de los pacientes con cáncer tanto localizado como metastásico debido a que los pacientes micrometastásicos (que no se conseguían diagnosticar hasta el avance radiológico) eran los de peor pronóstico entre los de “localizado” pero mejor entre los de “metastásico” cuando fueron correctamente identificados. Esta “migración” también se produce entre los pacientes de EM clasificados por Poser o por cualquiera de las revisiones de McDonald ya que permite diagnosticar a los pacientes más precozmente y con un mejor pronóstico. De modo inverso, los ensayos de tratamientos cuyos pacientes han sido clasificados con Poser son “menos eficaces” que los ensayos en los que lo fueron con McDonald.

del LCR en la EM es que pone de manifiesto el carácter inflamatorio de esta enfermedad y supone una gran ayuda en el diagnóstico diferencial.

El perfil del LCR de los pacientes con EM se caracteriza por presentar como rasgos generales(129):

- Aspecto transparente y presión normal.
- Escasa celularidad (0-5 células/mm<sup>3</sup>). En aproximadamente el 35% de los pacientes existe un aumento de la celularidad, y sólo en un 5% el número de leucocitos es superior a 15 células/mm<sup>3</sup>. Recuentos superiores a 50 células/mm<sup>3</sup> son excepcionales y deberían hacer dudar del diagnóstico(122). Las células son de predominio linfocitario, principalmente linfocitos T.
- Normogluco y proteinorraquia. En torno al 20% de los enfermos la cifra de proteínas totales está aumentada, siendo excepcional alcanzar niveles superiores a los 100 mg/dl.

#### **1.6.2.1.1.Examen Inmunológico del LCR**

El examen inmunológico del LCR permite la comprobación del origen inflamatorio de la enfermedad ya que evidencia la respuesta inmune celular y humoral frente a los autoantígenos desconocidos del SNC. Existen diversas técnicas en función del objetivo del estudio y pueden estudiarse tanto el componente celular (mediante técnicas de citometría de flujo principalmente) como el componente humoral de la inmunidad que es con diferencia el comúnmente estudiado. La respuesta humoral se evidencia mediante la secreción intratecal de las inmunoglobulinas, casi siempre IgG, bien por técnicas cuantitativas o cualitativas.

Los **métodos cuantitativos** calculan la proporción de IgG sintetizada de modo local (intratecal) frente a la procedente del suero. La forma más común de expresar este cociente es mediante el índice de Tibbling aunque se han planteado otros como el de Tourtellote(130). El índice de Tibbling-Link se calcula dividiendo el cociente de IgG LCR/suero por el cociente de albúmina LCR/suero(131). Un valor superior a 0.78 es anormal y se observa en aproximadamente un 85% de los pacientes con EM clínicamente definida(129).

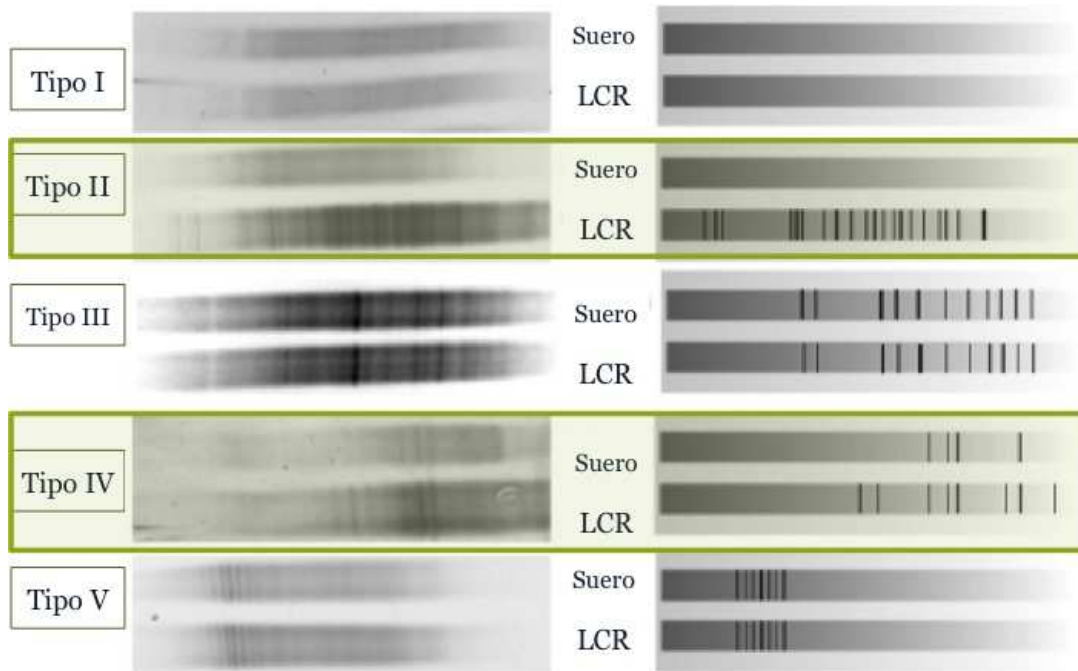
Los **método cualitativos** permiten detectar la presencia de BOC en el LCR y arrojan una sensibilidad mayor que los métodos cuantitativos(129). La técnica más

sensible es el isoelectroenfoque, que separa las inmunoglobulinas en función de sus diferentes puntos isoeléctricos(132). Las diferentes combinaciones de presencia de BOC en suero y LCR determinan los diferentes patrones de bandas oligoclonales(133) (imagen 5):

- **Tipo I.** Ausencia de BOC en suero y LCR.
- **Tipo II o “síntesis local”.** Presencia local en LCR y ausencia en suero.
- **Tipo III o “en espejo”.** El patrón de BOC es idéntico en suero y LCR. Traduce una respuesta humoral sistémica sin secreción intratecal de inmunoglobulinas.
- **Tipo IV o “más que”.** Existe una respuesta tanto en suero como en LCR aunque con más bandas en éste.
- **Tipo V o de “escalones simétricos”.** Se detectan tanto en suero como LCR de 3 a 5 bandas espaciadas y simétricas; es el patrón típico de las paraproteinemias.

Los patrones apreciados en la EM son los tipo II y IV que son los que implican síntesis intratecal de inmunoglobulinas.

Las BOC muestran una variabilidad étnica y relación latitudinal(134) similar a la observada en la prevalencia de la enfermedad y tras un reciente metaanálisis(135) es robusto su papel diagnóstico en la enfermedad donde en el contexto clínico adecuado imprimen un muy alto valor predictivo positivo y evitan falsos diagnósticos(136).



**Adaptado de Petzold 2013**

Imagen 5. Comparativa de los diferentes patrones de bandas oligoclonales que pueden identificarse (explicación en el texto). Resaltados en verde los sugestivos de EM. Adaptado de Petzold(133)

Desde los primeros estudios de LCR en los pacientes con EM se ha denominado que el patrón de BOC es como “una huella dactilar” de los pacientes y que es insensible a los tratamientos(137). Este “dogma” no parece haber sobrevivido a los nuevos tratamientos como natalizumab(138), aunque el papel de los tratamientos se desarrollará más adelante.

#### **1.6.2.1.2. Papel de las bandas de IgM**

La inmunoglobulina M es un pentámero que constituye la respuesta inmune primaria no específica y habitualmente dirigida frente a antígenos no proteicos. En un subgrupo de pacientes de EM puede detectarse la presencia de BOC de IgM en LCR y traduce mayor agresividad de la enfermedad evidenciada por datos como mayor probabilidad conversión desde CIS(139), mayor tasa de brotes(140), mayor probabilidad de evolución a formas SP y peor pronóstico(141), mayor grado de atrofia cerebral y carga lesional(142),... Hoy en día constituyen un biomarcador asentado de mal pronóstico(3,143).

### 1.6.2.2. Resonancia Magnética

La elevada sensibilidad de la RM en la descripción de las placas desmielinizantes en cerebro y médula espinal ha convertido a esta técnica en la herramienta paraclínica más importante hoy en día para el diagnóstico de la EM, además de ser empleada para monitorizar su actividad(144). La RM es hasta 10 veces más sensible que la clínica para la detección de lesiones ya que evidencia un gran número de lesiones silentes clínicamente(125), siendo habitual que un paciente pueda cumplir criterios de diseminación en espacio por RM al debut de la enfermedad (CIS).

Las características radiológicas de las placas desmielinizantes son su habitual pequeño tamaño (unos 3-6mm de diámetro), su morfología ovoidea con su eje mayor perpendicular al eje anteroposterior de los hemisferios cerebrales y su tendencia a ubicarse en regiones concretas: periventriculares, juxtacorticales, infratentoriales y a nivel medular donde no suelen comprometer habitualmente la totalidad del grosor del cordón ni extenderse más de dos cuerpos vertebrales en sentido axial y con predilección por regiones posteriores y cérvico-torácicas(145,146). Sin embargo, en ocasiones alcanzan gran tamaño debido a la confluencia de varias lesiones o a la existencia de lesiones grandes denominadas pseudotumorales. Su comportamiento hiperintenso en secuencias T2/DP (densidad protónica) o T2-FLAIR<sup>4</sup> solo refleja un aumento en la concentración tisular de agua libre por lo que no aporta información de su estadio evolutivo(144). Esto puede explicar, al menos parcialmente, la correlación no lineal entre el volumen lesional y la discapacidad(147).

En secuencias T1, las lesiones desmielinizantes suelen ser hipointensas independientemente de su sustrato patológico: las placas agudas reflejan edema y cierto grado de destrucción tisular, las placas crónicas o “agujeros negros” reflejan daño tisular irreversible.

Tras la introducción de contrastes paramagnéticos como el Gadolinio permite evidenciar datos de actividad inflamatoria definidos por la disrupción funcional de la barrera hematoencefálica (BHE) y paso del material paramagnético dentro del tejido. Suelen adoptar una morfología de “anillo incompleto” abierto hacia la sustancia gris

---

<sup>4</sup> FLAIR-T2 o “*Fluid Attenuation Inversion Recovery*” es una técnica de imagen en RM en la que, basada en una secuencia T2, se suprime la señal del LCR. Esto confiere una mayor sensibilidad para la detección de lesiones periventriculares y juxtacorticales o corticales ya que al suprimir la señal de LCR y dado que la mayoría de las lesiones se comportan como hiperintensas en T2 se incrementa el contraste entre la lesión y el parénquima sano o el LCR.

cuando se ubican cerca del córtex(145)(imagen 6). La captación de contraste persiste durante al menos 4-6 semanas aunque es esporádica en la evolución de la enfermedad.

Las definidas características radiológicas de las lesiones desmielinizantes han condicionado su uso en los criterios diagnósticos tanto para demostrar diseminación en tiempo como en espacio(123–125,145,148,149).

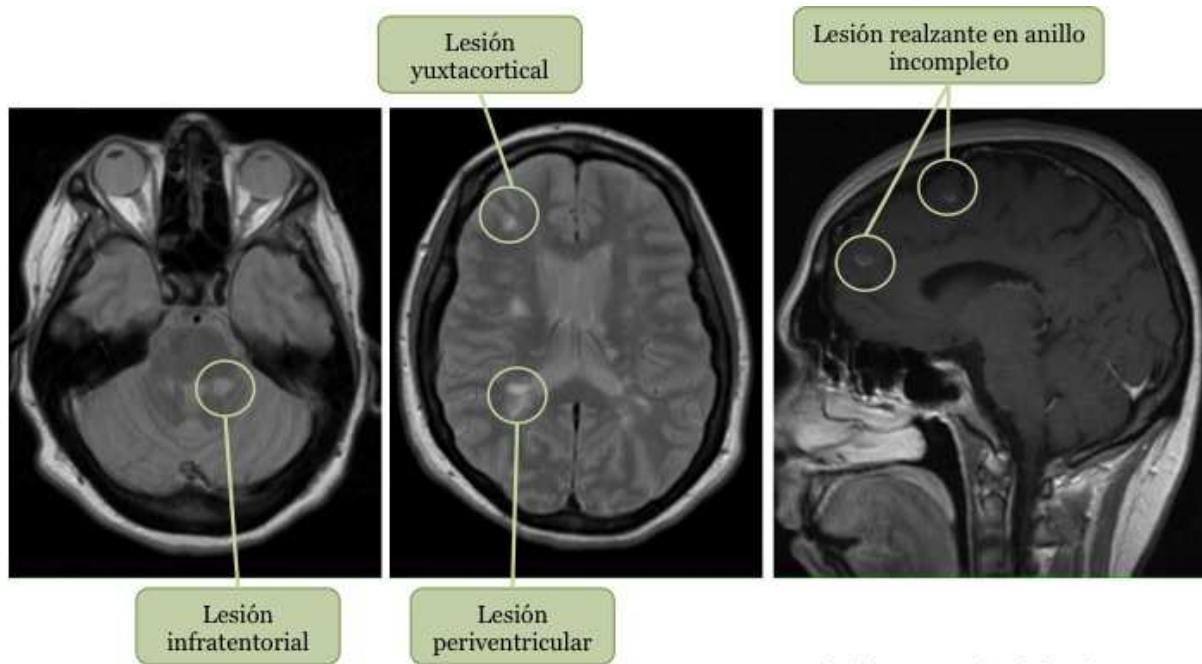
La RM también permite poner en relieve un fenómeno que acontece a lo largo de la evolución de la enfermedad como es la atrofia que se produce a razón de un 0,4-0,7% del volumen cerebral normalizado anual que contrasta con el 0,1-0,2% de pérdida en población normal(150). Además se ha demostrado que es un fenómeno muy constante independientemente del tipo de EM y del momento evolutivo(150). Esta atrofia cerebral se produce tanto a nivel de sustancia gris como de sustancia blanca y guarda correlación con la discapacidad y el deterioro cognitivo de los pacientes(61,151,152).

Hoy en día la RM es una herramienta fundamental en la evolución de la enfermedad para monitorizar la respuesta a los tratamientos(153) y la detección precoz de complicaciones como la leucoencefalopatía multifocal progresiva<sup>5</sup> (LMP)(144,154). Por ello deben realizarse bajo unas condiciones de reproducibilidad, protocolizadas y con una intensidad mínima asumible de señal de 1 Tesla(145). La periodicidad de los estudios es variable en función de las características del paciente y sus tratamientos aunque se asume, y así ha sido recogido en la última revisión de los fenotipos clínicos, que dado que posee implicaciones pronósticas debe ser con frecuencia mínima anualizada(90).

Existen “nuevas técnicas” de RM, como el tensor de difusión o la espectroscopia de protón, cuya aplicación en el manejo clínico cotidiano de la EM aún no ha sido constatada quedando relegadas al campo de la investigación(144).

---

<sup>5</sup> La leucoencefalopatía multifocal progresiva es una infección producida por el ubicuo poliomavirus JC que infecta los OG. Aunque puede producirse de modo espontáneo traduce un compromiso de la inmunovigilancia a nivel cerebral causada bien por una enfermedad hematológica o por estados de inmunosupresión tanto en el contexto de una infección por VIH como por tratamientos inmunosupresores. En este último caso, cobra relevancia el papel de tratamientos para la EM como el natalizumab.



Reproducido con permiso del paciente.  
Fondo iconográfico del SESCAM

Imagen 6. Lesiones características de EM visualizadas en RM. Las dos primeras imágenes de RM realizadas en cortes axiales y en secuencias DP muestran lesiones hiperintensas en las localizaciones clásicas de EM a nivel cerebral. La imagen de la derecha es un corte sagital en secuencia T1-Gd que muestra el realce en varias lesiones. Reproducido con el permiso del paciente.

### 1.6.2.3. Estudios Neurofisiológicos

Los estudios neurofisiológicos son un conjunto de técnicas que demuestran el funcionamiento normal o patológico de diferentes vías nerviosas. En el campo de la EM pese a su importancia inicial, recogida en los criterios de Poser(22) al mismo nivel que la RM, han perdido protagonismo tras el auge de la neuroimagen. Sin embargo son técnicas objetivas, muy sensibles y reproducibles, capaces de detectar lesiones silentes y cuyos resultados poseen valor pronóstico relacionándose con la discapacidad a largo plazo(155).

En el estudio de la EM la técnica de elección es el potencial evocado puesto que evidencia el enlentecimiento en la conducción central (dentro de SNC) de un determinado estímulo. La naturaleza de dicho estímulo (visual, sensitivo o motor) condicionará el tipo de potencial evocado: potencial evocado visual, potencial evocado somato-sensorial, potencial evocado auditivo de tronco o potencial evocado motor(156). Este descenso en la velocidad se constata por una prolongación de las latencias e interlatencias de las ondas que reflejan la desmielinización de las vías estudiadas. No obstante, esta prolongación de la latencia no es específica de la EM y debe ser puesta en relación con el resto del contexto clínico.



El potencial evocado más empleado es el visual (PEV) que traduce la respuesta de la corteza visual a la estimulación de la retina. En condiciones normales, se obtiene una onda positiva en torno a los 100ms, conocida como onda P100. Los PEV son muy sensibles para detectar desmielinización en las vías ópticas ya que están alterados en el 90% de los enfermos que han padecido una neuritis óptica y, en algunas series, hasta en el 45% de los pacientes con EM sin evidencia clínica de haber sufrido tal afectación(81).

### **1.6.3. Diagnóstico Diferencial de la Esclerosis Múltiple**

Dado que la EM puede cursar con un amplio abanico de manifestaciones clínicas y hallazgos radiológicos que no son específicos. Por ello el diagnóstico de EM es siempre un diagnóstico de exclusión. En el año 2008 se reunió un panel de expertos para sentar unas directrices que facilitarían el amplio diagnóstico diferencial de la EM identificando aquellos datos clínicos, analíticos o radiológicos que hicieran sospechar otra etiología (122).

Desarrollar todos los diagnósticos alternativos excedería el propósito de esta revisión por lo que nos centraremos en aquellas patologías a excluir en función de la presentación clínica o radiológica.

#### **1.6.3.1. Entidades que cursan con lesiones múltiples del SNC y curso remitente-recurrente**

- Enfermedades inflamatorias
  - Encefalomiелitis aguda diseminada
  - Lupus eritematoso sistémico
  - Síndrome de Sjögren
  - Enfermedad de Behçet
  - Vasculitis primaria del SNC
  - Sarcoidosis
- Enfermedades vasculares no inflamatorias: CADASIL
- Infecciones crónicas: enfermedad de Lyme, sífilis meningovascular, encefalitis por VIH, panencefalitis esclerosante subaguda, enfermedad de Whipple



- Linfoma primario del SNC
- Enfermedades mitocondriales

### **1.6.3.2. Enfermedades que provocan lesiones en diferentes regiones del SNC pero con manifestaciones asimétricas y curso progresivo**

- Ataxias y paraplejías heredodegenerativas
- Leucodistrofias: Adrenoleucodistrofia, leucodistrofia metacromática, enfermedad de Krabbe, leucodistrofia dominante de aparición en el adulto, enfermedad de la sustancia blanca evanescente,...
- Déficit de vitamina B12
- Xantomatosis cerebrotendinosa
- Fenilcetonuria
- Atrofia multisistémica
- Síndromes paraneoplásicos
- Enfermedad Celíaca
- Ataxia cerebelosa con anticuerpos anti-GAD

### **1.6.3.3. Síndromes aislados y monosintomáticos del SNC**

- Síndromes medulares crónicos: compresión, mielopatía espondilótica, malformación de Arnold-Chiari, fístula dural, mielopatía asociada al HTLV-1, mielopatía no compresiva, esclerosis lateral primaria, esclerosis lateral amiotrófica
- Síndromes medulares agudos: compresión o infarto medular, mielitis transversa idiopática, mielitis aguda necrosante
- Síndromes visuales: Neuropatía óptica isquémica anterior, neuropatía óptica hereditaria de Leber, neurorretinitis infecciosa, neuropatía óptica inflamatoria crónica recidivante, neuritis óptica paraneoplásica
- Mielinólisis central pontina

#### **1.6.3.4. Otras enfermedades desmielinizantes**

Merece la pena desarrollar someramente algunas patologías que por compartir ciertos mecanismos fisiopatogénicos pudiera dificultar la correcta diferenciación:

- **Neuromielitis óptica o enfermedad de Devic.** Aunque inicialmente se consideró una forma de EM, llamada asiática u “óptico-espinal” por su preferencia clínica, desde el descubrimiento del anticuerpo anti-aquaporina 4 (AQP-4) se considera una entidad completamente diferente a la EM. Se trata de una astrocitopatía inflamatoria, característicamente recurrente, que comparte con la EM el predominio femenino, el curso recurrente y algunas manifestaciones clínicas (neuritis óptica o mielitis) aunque el pronóstico de estas y de la enfermedad es sustancialmente más sombrío(157,158). La RM no suele mostrar los hallazgos “típicos” de EM y la seropositividad a AQP-4 facilita el diagnóstico.
- **Encefalomiелitis aguda diseminada (ADEM).** Característicamente es una entidad monofásica, de predominio infantil, que cursa clínicamente con datos encefalopáticos (afectación de conciencia, crisis comiciales,..) y que suele suceder tras una exposición a agente infeccioso o vacunación(159). No obstante, los primeros brotes de una EM pueden cursar con semiología de ADEM en población menor a 7-8 años lo que complica el diagnóstico.

### **1.7. TRATAMIENTO DE LA ESCLEROSIS MÚLTIPLE**

La EM ha sido históricamente considerada un enfermedad carente de tratamiento y no es hasta la segunda mitad del siglo XX cuando comienzan a administrarse tratamientos antiinflamatorios. Hoy en día aunque existe un amplio abanico de opciones terapéuticas no existe un tratamiento curativo frente a la enfermedad y los diferentes fármacos que muestran eficacia solo lo hacen en las fases inflamatorias quedando la EMPP y la EMSP sin tratamiento(2,160).

Podemos diferenciar dos grandes tipos de tratamientos los fisiopatogénicos y los sintomáticos en función de objetivo del mismo. No obstante vamos a diferenciar

los tratamientos en función de su mecanismo de acción y si éste guarda o no relación con el trasfondo inmunológico de la enfermedad.

### **1.7.1. Tratamientos de Base Inmunológica.**

Existen dos tipos de tratamientos de base inmune: los destinados al brote y los llamados tratamientos modificadores de la enfermedad (o DMD) que son aquellos que inciden sobre los mecanismos fisiopatogénicos de la EM(10). Entre los DMD actualmente en uso nos encontramos los interferones beta 1b y 1a (INFβ1b e INFβ1a), el acetato de glatiramero (AG), natalizumab (NTZ), fingolimod (FTY), alemtuzumab (ALZ), dimetilfumarato (DMF) y teriflunomida (TRF). También existen otros fármacos cuyo uso se ha abandonado en gran medida como azatioprina (AZT), metrotexate (MTH) o mitoxantrona (MTX) y otros que pronto se incorporarán al arsenal terapéutico como laquinimod (LQN), ocrelizumab (OCR) o daclizumab (DCL)(161,162)(ver tabla 11). Cualquier DMD se caracteriza por incidir sobre la frecuencia de los brotes, la progresión de la discapacidad o las variables de actividad radiológica (nuevas lesiones en T2 o nuevas lesiones que realcen con Gadolinio). Un hecho común a todos los DMD es la constante demostración que el inicio precoz de tratamiento conlleva un mejor pronóstico de la enfermedad definido por menor frecuencia de brotes y menor probabilidad de progresión de la discapacidad o inicio de una forma EMSP tanto iniciado en fase EM RR como al diagnóstico o CIS(11,80,112,161–164).

No existe una definición de consenso a cerca de la respuesta a un DMD aunque la observación de inflamación clínica (persistencia de brotes) o radiológica (nuevas lesiones T2 o lesiones Gd+) tras un curso completo de tratamiento es constante en muchas propuestas como indicativos de respuesta subóptima(153,165,166). Otros marcadores radiológicos como la evolución de la atrofia cerebral con el DMD correlacionan con la progresión de la discapacidad(167).

#### **1.7.1.1. Tratamiento del brote**

Se recomienda tratar aquellos brotes que cursan con síntomas discapacitantes o muy molestos para el paciente, con el objetivo de acelerar la recuperación ya que no se ha demostrado que mejore el pronóstico del mismo(86,92). El tratamiento de

elección es la metilprednisolona a altas dosis (500mg-1 g/24h) por vía intravenosa durante 3 a 5 días, seguido o no de pauta de descenso oral. Se han empleado estas dosis por vía oral con suficiente evidencia de no inferioridad para justificarse considere una razonable alternativa(168,169). Los efectos secundarios de las altas dosis de metilprednisolona son discretos y habitualmente bien tolerados, aunque se han observado trastornos hidroelectrolíticos, alteraciones mentales, trastornos gástricos e hiperglucemias entre otros.

En ausencia de respuesta a los corticoides se puede administrar inmunoglobulinas por vía intravenosa o realizar plasmaféresis(170).

### 1.7.1.2. Interferon Beta

El INF $\beta$  fue el primer fármaco que consiguió demostrar eficacia en el tratamiento de la enfermedad en diversos ensayos clínicos aleatorizados y doble ciego(171). Posteriormente se publicaron varios ensayos que avalaron su uso en CIS donde demuestra su capacidad para retrasar la conversión a EMRR(164,172). Hasta la fecha los resultados de los diferentes estudios de su uso en formas progresivas han sido dispares con una posible eficacia marginal en EMSP(162). En general, todas las presentaciones comerciales de INF $\beta$  poseen unos efectos biológicos similares y consiguen una reducción de la tasa anualizada de brotes cercana al 30-33% aunque presentan una mayor variabilidad en reducción de la progresión de la discapacidad y de la presencia de lesiones nuevas en T2 o realzantes de Gadolinio en algunos casos condicionada por el protocolo del estudio(173).

En función de su proceso de producción mediante modificación genética se diferencian dos subformas de INF $\beta$ : 1b y 1a; el primero a través de cepas de *Escherichia coli* y el segundo de células murinas. Este origen diferente condiciona una mayor inmunogenicidad para INF $\beta$ 1b pudiendo desarrollar el paciente anticuerpos neutralizantes con mayor frecuencia. La presencia de dichos anticuerpos se correlaciona con una pérdida de eficacia y aumento de algunos de los efectos adversos independientemente del tipo de INF $\beta$ (174-176).

Aunque no se conoce con certeza su mecanismo de acción en la EM, el INF $\beta$  es una molécula pleiotrópica con diversas acciones a múltiples niveles. Su principales acciones son antiinflamatorias destacando la reducción de la expresión de MHC clase II en células de sangre periférica, disminuyendo la liberación de citoquinas

proinflamatorias de respuesta tipo Th1 y potenciando la respuesta Th2 y preservando la integridad de la barrera hematoencefálica(177,178).

Existen en el mercado diferentes preparaciones de INF $\beta$  cada una con sus diferentes características de dosis, vía y frecuencia de administración:

- INF $\beta$  1b (Betaferon<sup>®</sup>, Extavia<sup>®</sup>): fue el primero en demostrar su eficacia en la EM, con una reducción en la tasa de brotes de un 30%, en la severidad de las recaídas y en la carga lesional en T2 medida por RM, así como en el número de lesiones activas. La dosis que demostró ser eficaz fue la de 8 millones de unidades de modo subcutáneo (sc) cada 48 horas(171). En pacientes con EMSP ha mostrado un retraso en la progresión de la enfermedad entre 9 y 12 meses aunque solo en el brazo europeo del estudio multicéntrico(162,179). Además, un reciente estudio ha revelado como retrasar dos años su inicio tras un primer brote posee consecuencias como una mayor actividad de la enfermedad(164). Recientemente se ha seguido la cohorte del ensayo pivotal inicial demostrándose diferencias significativas de supervivencia a 21 años en función de la administración precoz de INF $\beta$  1b(180).
- INF $\beta$  1a (Avonex<sup>®</sup>): este INF $\beta$  se administra por vía intramuscular (IM) en una única dosis de 6 millones de unidades una vez a la semana. Ha demostrado ser eficaz para disminuir la progresión de la enfermedad, la tasa de brotes en un 32%, así como la carga lesional en T2 y el número de lesiones activas en RM(181). Es el primer tratamiento que demostró retrasar la conversión a EMCD cuando era empleado precozmente en pacientes que habían sufrido un CIS(172).
- INF $\beta$  1a (Rebif<sup>®</sup> 22-44): La vía de administración INF $\beta$  es sc y se pueden utilizar dos dosis 22 y 44  $\square$ cg, administrados tres veces en semana. El estudio PRISMS demostró que disminuía la tasa de brotes en un 27% y un 33% (en la dosis baja y en la dosis alta respectivamente), la severidad de los mismos, reduciendo asimismo la progresión de la discapacidad(182). Los resultados de RM también fueron muy favorables frente a placebo. Los diferentes estudios de extensión han demostrado que el beneficio clínico y radiológico se mantenía a medio y largo plazo con mejores resultados en el grupo que recibía la mayor dosis(183). También se han desarrollado estudios donde se demuestra cómo la administración sc de INF $\beta$  1a en sujetos con CIS consigue

retrasar la conversión a EMCD a las dosis convencionales(184) y más recientemente con dosis semanales (estudio REFLEX), y aunque dicha dosis no ha obtenido licencia de uso es el único estudio hasta la fecha de INFβ en población de EM según los criterios de McDonald 2010(185,186).

Las diferentes presentaciones INFβ muestran una dilatada seguridad y una tolerabilidad aceptable. Los efectos adversos más comunes son leves y consisten en una reacción pseudogripal y reacciones locales en el punto de inyección(160). Estos efectos suelen ser transitorios y existen estrategias de mitigación como la titulación de dosis o la educación por enfermería especializada respectivamente. No obstante existen otros efectos adversos más infrecuentes como el incremento secundario de la fatiga y la espasticidad por fenómeno de Uhthoff(105), la depresión o la aparición de fenómenos autoinmunes secundarios(187). En los últimos años se han comunicado casos muy infrecuentes de microangiopatía trombótica que puede manifestarse con complicaciones potencialmente mortales como el síndrome hemolítico-urémico(188). Las alteraciones de laboratorio habituales son leucopenia e hipertransaminemia, y menos frecuentemente la presencia de anticuerpos antitiroideos. La hepatotoxicidad severa es rara, aunque se han descrito casos de lesión hepática grave(189).

Recientemente se ha desarrollado una modificación de la molécula mediante la incorporación de un grupo polietileno-glicol (PEG). Dicha PEGilación consigue reducir el aclaramiento renal de la molécula manteniendo la eficacia del fármaco durante más tiempo y reduciendo la frecuencia de administración hasta ser quincenal o mensual(190). No existen comparación directa entre PEG-INFβ e INFβ que valore su eficacia aunque la reducción de la tasa anualizada de brotes (32,5% para la administración quincenal y 27,5% para la mensual) y el perfil de efectos adversos resultaron similares a la comunicada en los ensayos pivotaes de los diferentes INFβ (190,191).

### **1.7.1.3. Acetato de Glatiramero**

Se trata de un oligopéptido sintético de 4 aminoácidos con una antigenicidad similar a la de la proteína básica de la mielina (PBM). Su principal mecanismo de acción se basa en la unión al CMH, en lugar de la PBM, compitiendo en la unión al receptor del linfocito T, alterando la respuesta inmune e induciendo una respuesta

Th2 supresora (192). Sólo existe en la actualidad un formulación licenciada para su uso y se administra diariamente, por vía SC, una dosis única de 20 mg aunque recientemente ha sido aprobada una dosis de 40 mg cada 48 horas(193). En el mundo anglosajón también es conocido como copolímero I.

En los ensayos clínicos realizados en pacientes con EMRR, el AG ha mostrado una reducción de la tasa de brotes en un 33%, de la progresión de la discapacidad, del acúmulo lesional en T2, así como de la aparición de lesiones captantes en RM(194–196). Los ensayos en formas progresivas (tanto EM PP como EMSP) han sido ineficaces(196) y al igual que el INF $\beta$  también ha demostrado su eficacia en retrasar la conversión a EMCD desde el CIS(197). Se han realizado diversos estudios que han tratado de comparar la eficacia de INF $\beta$  y de AG sin que se haya demostrado en ninguno una clara superioridad de uno frente a otro(198).

Habitualmente este fármaco es bien tolerado, siendo sus principales efectos secundarios alteraciones cutáneas leves (aunque más frecuentes que con INF $\beta$ ) en el punto de inyección y una reacción sistémica post-administración, transitoria e impredecible, consistente en enrojecimiento facial, disnea, dolor torácico, palpitations y ansiedad que puede presentarse en hasta un 15% de los pacientes(194,196). De modo excepcional se ha comunicado su capacidad para desencadenar fenómenos autoinmunes secundarios aunque claramente con menor frecuencia que INF $\beta$ (199).

#### **1.7.1.4. Natalizumab**

Natalizumab (NTZ) constituye el primer anticuerpo monoclonal que se emplea en el tratamiento de la EM. Se trata de un anticuerpo humanizado<sup>6</sup> dirigido contra la subunidad  $\alpha_4$  de la integrina VLA-4, proteína implicada en la adhesión al endotelio de los leucocitos (se desarrollará en el capítulo de Fisiopatogenia)(200). Esta unión imposibilita la interacción entre el leucocito (a excepción de los neutrófilos) y la superficie del endotelio vascular, lo que dificulta la migración de los linfocitos activados a través de la BHE(201). NTZ se administra cada 4 semanas a dosis de 300 mg IV. El ensayo pivotal de NTZ comparativo contra placebo, AFFIRM(202),

---

<sup>6</sup> Los anticuerpos monoclonales se desarrollan mediante ingeniería genética. En función de la procedencia genética de sus cadenas ligeras pueden ser quiméricos, humanizados o humanos. Esta diferenciación se refleja en su nombre ya que se añade un sufijo indicativo previo a “-mab”. Así los anticuerpos quiméricos poseen el sufijo “-xi-“ (rituximab), los humanizados “-zu” (ocrelizumab) y finalmente los humanos “-mu-“ (ofatumumab). Los anticuerpos humanizados poseen fracciones hipervariables de las cadenas ligeras de origen humano siendo el resto procedente habitualmente de ratón. La progresiva “humanización” del anticuerpo se correlaciona con la inmunogenicidad decreciente.



observó una reducción de la tasa anualizada de brotes del 68% siendo muy significativa también la reducción de la progresión de la discapacidad y de la presencia de lesiones T2 y Gd+. Este estudio permitió por primera vez acuñar el concepto “libre de enfermedad” en el campo de la EM en un análisis post-hoc del ensayo AFFIRM(203). NTZ reporta numerosos beneficios en otros aspectos de la enfermedad como calidad de vida o mejoría de la fatiga comparado con los tratamientos inyectables existentes hasta entonces (AG e a INF $\beta$ )(204).

Además NTZ abrió la puerta al planteamiento del tratamiento combinado con dos ensayos: GLANCE un fase II asociado a AG(205) y SENTINEL un estudio fase III asociado a INF $\beta$ 1a IM(206). Aunque ambos demostraron superioridad frente al tratamiento aislado la aparición de varios casos de LMP asociados al tratamiento concomitante con INF $\beta$ 1aIM condicionó se abandonase esta posibilidad. Posteriormente se ha comprobado cómo la LMP es un efecto relacionado directamente con el compromiso de la inmunovigilancia de los linfocitos a nivel de SNC provocado por el bloqueo de la unión integrina-endotelio(207). Se han desarrollado algoritmos para estratificar qué pacientes poseen un mayor riesgo de desarrollo de LMP identificándose como factores predictores el uso previo de inmunosupresores, la duración de la exposición a NTZ (con mayor riesgo por encima de 24 meses) y la seropositividad y el título de los anticuerpos contra el virus JC(208). Aunque el riesgo medio de desarrollo de LMP asociado a NTZ es de 1:1000 pacientes, en función del riesgo concreto en cada brazo del algoritmo puede llegar hasta 1:89. Recientemente se ha postulado que la presencia de BOC IgM lípido-específicas pueda desarrollar un papel “protector” frente al desarrollo de LMP aunque aun está pendiente de replicación(209). No obstante, es prioritaria la adecuada selección de los pacientes y su estrecha monitorización clínica, serológica y radiológica para prevenir o, en su defecto, diagnosticar precozmente esta grave complicación(154,210,211).

NTZ posee otros efectos adversos como reacciones a la infusión, aumento de infecciones banales y, con escasa frecuencia, fenómenos autoinmunes paradójicos(187,202,206).

#### **1.7.1.5. Fingolimod**

Fingolimod (FTY) es un análogo de la esfingosina que altera la migración linfocitaria provocando un secuestro de los linfocitos en los ganglios linfáticos al



unirse al receptor esfingosina-1-fosfato(S1P) tipo 1 presente en la membrana de los linfocitos(212). Se administra diariamente por vía oral una dosis única de 0,5 mg.

FTY ha demostrado su eficacia mediante dos ensayos fase III comparando dos dosis de FTY (0,5 mg y 1,25 mg) frente a placebo (estudio FREEDOMS)(213) o frente a un comparador activo como INF $\beta$ 1a IM (estudio TRANSFORMS)(214). En estos ensayos fingolimod consiguió un decremento significativo de la tasa anualizada de brotes, de la probabilidad de progresión de la discapacidad y de la actividad en RM (medida por nuevas lesiones T2 o Gd+) tanto frente a placebo como frente a INF $\beta$ . Además se comprobó cómo el tratamiento precoz con FTY conseguía reducir la progresión de la atrofia cerebral, retrasar la progresión de la discapacidad de modo significativo y mantener la “libertad de enfermedad” frente al inicio tardío del fármaco en un mayor porcentaje de pacientes(215,216). Se han realizado numerosos estudios de práctica clínica donde, además de comprobarse los datos de efectividad en población real, se añaden otros datos de valor como mejoría de calidad de vida y de adherencia al tratamiento respecto a los clásicos inyectables(217).

Los efectos adversos de FTY derivan fundamentalmente de su agonismo sobre los receptores S1P. Estos receptores se expresan a nivel casi pleiotrópico con diferentes funciones asociadas; y así, la unión de FTY puede condicionar bradicardia con las primeras dosis (por su unión a miocitos), edema macular (por su unión al endotelio vascular retiniano) o linfopenia severa(218,219). Otros efectos adversos supuestamente relacionados con el mecanismo inmune son las infecciones virales especialmente por el virus de la varicela-zóster (VVZ) y la reciente comunicación de casos de LMP asociados a FTY (tanto en pacientes que habían recibido o no previamente NTZ) y que pueden hacer suponer una acción asociada del agonismo de FTY sobre la inmunovigilancia a nivel de SNC (214,220).

#### **1.7.1.6. Dimetilfumarato**

El uso de di-metil-fumarato (DMF) en la EM procede de las experiencias previas con el uso de ésteres de ácido fumárico para el tratamiento de la psoriasis en Alemania y la evidencia de su mecanismo de acción(221). La acción del DMF fundamentalmente está ligada a la vía del factor nuclear similar tipo 2 al derivado de eritrocito (o Nfr2)(222,223), agente que se desarrollará posteriormente en otros apartados. La vía del factor transcripcional Nfr2 modula la expresión de diferentes biomoléculas implicadas en la respuesta antioxidante y ante otros agentes llamada

“respuesta tipo 2” que fomenta el mantenimiento de la homeostasis celular con implicaciones a nivel inmunológico, ya que consigue reducir la expresión de citoquinas inflamatorias (como IL-1 o TNF $\alpha$ ), reducir la activación del factor nuclear kappa B (NF $\kappa$ B) y aumentar los niveles de citoquinas antiinflamatorias (como IL-10 e IL-4). Estos mecanismos de acción de DMF parecen intrínsecamente ligados a la vía Nfr2, de hecho modelos animales homocigotos *knock-out* para Nfr2 no mostraron ningún beneficio de DMF en el modelo de EAE(224). Sin embargo DMF pudiera desarrollar efectos citoprotectores independientes de la vía Nfr2 aunque hasta la fecha solo en modelos *in vitro*(223).

DMF ha demostrado su eficacia mediante dos ensayos fase III en comparación directa contra placebo (DEFINE)(225) como en comparación múltiple frente a AG y placebo (CONFIRM)(226). Ambos estudios demostraron beneficio de DMF en la reducción de la tasa anualizada de brotes y los parámetros radiológicos. En la reducción de la progresión de la discapacidad DMF solo fue estadísticamente diferente de placebo. La dosis terapéutica es 240 mg cada 12 horas vía oral aunque se titula con una dosis inferior de 120 mg.

Sus principales efectos adversos son gastrointestinales (con tendencia a la atenuación a partir del mes de tratamiento y con estrategias de mitigación como la titulación y toma con alimentos) y la rubefacción facial (también transitoria y con mejoría con AAS)(223,227). DMF provoca una linfopenia leve. Hasta la fecha se han comunicado varios casos de LMP asociados al tratamiento con DMF y otros ésteres de ácido fumárico sin que sepan identificarse factores predisponentes claros salvo una probable relación con la linfopenia(228).

#### 1.7.1.7. Teriflunomida

Teriflunomida (TRF), metabolito principal de leflunomida, es un agente inmunomodulador con propiedades antiinflamatorias que inhibe de forma selectiva y reversible la enzima mitocondrial dehidroorotato-deshidrogenasa (DHO-DH), necesaria para la síntesis de *novoo* de la pirimidina sin afectar a la vía alternativa. Como consecuencia, teriflunomida bloquea la proliferación de linfocitos B y T activados que precisan de la pirimidina para expandirse. El mecanismo exacto por el cual teriflunomida ejerce un efecto terapéutico en la EM no se comprende del todo, pero puede estar relacionado con la reducción del número de linfocitos(229).

La eficacia de TRF está asentada en tres ensayos fase III, dos comparados contra placebo (TOWER y TEMSO)(230,231) y uno con comparador activo con planteamiento de no inferioridad (TENERE)(232). TRF fue más eficaz que placebo y no inferior a INF $\beta$ 1aSC en la reducción de la tasa anualizada de brotes aunque solo fue superior a placebo en la reducción de la progresión de la discapacidad. La dosis empleada es de 14 mg 1 comprimido diario.

Es un fármaco bien tolerado aunque debe monitorizarse estrechamente la función hepática durante los primeros meses; sus efectos adversos más comunes son la alopecia y la elevación de transaminasas. Sus principales limitaciones son el uso en pacientes en edad fértil ya que es tanto geno como embriotóxico y que su proceso de eliminación es muy prolongado aunque puede acelerarse mediante el uso de carbón activado o colestiramina(229).

#### **1.7.1.8. Alemtuzumab**

Alemtuzumab (ALZ) es un anticuerpo monoclonal humanizado dirigido contra la molécula de superficie CD52, una glicoproteína de membrana presente en la mayoría de células inmunes (LB, LT, células “natural killer”, macrófagos, monocitos y granulocitos..) a excepción de neutrófilos y células dendríticas(233). Esto conlleva una profunda y duradera depleción de estas células inmunes con unos tiempos variables de recuperación de sus poblaciones, por ejemplo suelen recuperarse antes los LB que los LT(234).

La eficacia de ALZ está asentada en dos ensayos clínicos fase III ambos contra comparador activo (INF $\beta$ 1aSC 44 $\mu$ g) diferenciándose según los pacientes procedieran o no de uso de DMD previos siendo denominados CARE-MS I (caso de pacientes *naïve*)(235) y CARE-MS II (caso del uso previo de DMD)(236). En ambos casos ALZ fue significativamente superior a INF $\beta$ 1a reduciendo la tasa anualizada de brotes y la actividad por RM e incrementando el porcentaje de pacientes libres de enfermedad que llegó hasta el 78% en el brazo de ALZ. En el CARE-MS I(235) no se alcanzaron diferencias significativas en la reducción de progresión de la discapacidad entre ambos grupos que sí fueron apreciadas en el CARE-MS II(236).

Los efectos adversos de ALZ son secundarios a su mecanismo de acción y características de la molécula provocando reacciones a la infusión, aumento de la tasa

de infecciones (sobre todo víricas por virus tipo herpes) y desarrollo paradójico de fenómenos autoinmunes secundarios (Púrpura Trombótica Idiopática, Enfermedad de Graves-Basedow, Síndrome de Good-Pasture...) cuando el paciente sufre la reconstitución inmune(235–240). Estos efectos adversos han condicionado que el paciente que recibe ALZ deba cumplir un estricto plan de minimización de riesgos(241).

Fármaco	Año aprobación EMA	Tasa de reducción de brotes (%)	Reducción progresión EDSS (%)	Reducción actividad de RM* (%)
Interferón beta(171,181,182)	1993-1998	30	Inconsistente	60-80
Acetato glatiramero(194)	1996	30	Inconsistente	30
Natalizumab(202)	2004	68	42	80-90
Fingolimod(213)	2011	50	37	75-80
Teriflunamida(230)	2012	30	Inconsistente	70
Dimetilfumarato(225)	2013	50	38	80-90
Alemtuzumab <sup>b</sup> (235)	2013	40-50	30	70

Tabla 11. Eficacia de los distintos tratamientos modificadores de la enfermedad en estudios pivotaes en EMRR frente a placebo. \*Nuevas lesiones captantes de gadolinio. <sup>b</sup>Datos frente a interferón beta 1<sup>a</sup> 44 uG tres veces a la semana. EMA – Agencia Europea del Medicamento

### 1.7.1.9. Otros Tratamientos

En el repertorio actual de tratamiento de la EM existen fármacos que han perdido el papel que desempeñaban como azatioprina o mitoxantrona, que no han sido aprobados pese a su eficacia demostrada como la cladribina y otros que están por completar en breve dicho abanico como ocrelizumab o laquinimod.

- Mitoxantrona: es un derivado sintético de la antraciclina con elevada actividad antitumoral y efecto inmunosupresor. Varios ensayos clínicos han demostrado su efecto favorable sobre la tasa de brotes, la progresión de la discapacidad y los hallazgos en RM(242). Aunque consta de aprobación para el tratamiento de formas agresivas de EMRR o de EMSP en las que hayan fracasado otras terapias, actualmente su uso es muy limitado. Sus principales efectos adversos son la cardiotoxicidad acumulativa y la posibilidad de desarrollar neoplasias hematológicas(243). Se administra por vía IV trimestralmente.

- Azatioprina (AZT): es un derivado de la mercaptopurina que tiene efectos inmunosupresores no específicos, por su acción antimetabolito de la purina. Los efectos primarios de este fármaco están dirigidos contra las células que se dividen rápidamente, dando como resultado la inhibición de la inmunidad celular y humoral. Se administra diariamente por vía oral (VO). En los pacientes con EM no se conocen bien sus efectos y son necesarios ensayos clínicos aleatorizados y controlados con suficiente número de pacientes. No obstante, existen revisiones que concluyen que AZT podría emplearse como una alternativa al tratamiento con INF- $\beta$  al reducir la tasa de brotes en pacientes con EM(244). Aunque es bien tolerada entre sus efectos adversos más frecuentes figuran la leucopenia y la hepatotoxicidad reversibles, efectos sistémicos (náuseas, vómitos, fiebre y un, discreto aunque contrastado, aumento del riesgo de cáncer tras 10 años de tratamiento mantenido(245).
- Cladribina: es un inmunosupresor análogo de la adenosina autorizado, en la actualidad, para la leucemia de células peludas. Dispone de un estudio fase III (CLARITY) que evaluó la eficacia de una pauta de dosis acumulada de cladribina VO frente a placebo en pacientes con EMRR observando una disminución significativa (58%) en la tasa anualizada de brotes, junto con una reducción de la progresión de la discapacidad y de la actividad en RM(246). Entre los efectos secundarios más comunes figuran la linfopenia, cefalea y nasofaringitis. Pese a la eficacia demostrada en este estudio y la demostración del beneficio en población CIS(247) las autoridades sanitarias no concedieron la licencia de uso al fármaco.
- Ocrelizumab (OCR). Anticuerpo monoclonal humanizado contra el antígeno CD20 presente en casi toda la estirpe de LB. Hasta la fecha solo dispone de un ensayo fase II contra placebo e INF $\beta$ 1a demostrando una eficacia en la reducción de lesiones realzantes de Gadolinio y en la tasa anualizada de brotes(248). Se encuentra pendiente de publicación el estudio fase III.
- Laquinimod (LQN). Es un derivado de roquinimex, fármaco ensayado anteriormente en EM, y que mantiene efectos inmunomoduladores. Ha completado un ensayo fase III (ALLEGRO)(249) que ha mostrado una reducción muy modesta de la tasa anualizada de brotes. Sin embargo LQN mostró una mejoría muy significativa en la reducción de la progresión de la

atrofia cerebral medida por RM. Se encuentra pendiente de un nuevo estudio a una dosis mayor.

#### **1.7.1.10. Esquemas de Tratamiento**

Existen dos grandes abordajes diferentes frente a la enfermedad determinados por el posicionamiento de los diferentes fármacos. Habitualmente se emplea un esquema de escalado terapéutico en la que el paciente progresa entre diferentes tratamientos de efectividad y toxicidad creciente una vez se evidencia que no ha funcionado el tratamiento del escalón actual(250,251). De este modo se posicionarían en una primera línea INF $\beta$ 1b, INF $\beta$ 1a, AG y, probablemente, DMF y TRF; reservándose para su uso en segunda línea NTZ y FTY. Sin embargo este esquema posee escasa evidencia científica, ya que los ensayos clínicos no han sido diseñados bajo este paradigma, desprendiéndose los mejores datos de estudios de efectividad o práctica clínica(173,252).

Otro esquema diferente, heredado de la Oncología, es el de inducción terapéutica donde se intenta mediante el uso inicial de fármacos muy activos inducir una respuesta rápida y mantenida de la enfermedad y posteriormente emplear fármacos de menor actividad para garantizar esta respuesta. Han sido varios los intentos de este tipo de terapias, empleando de modo inicial inmunosupresores como mitoxantrona(253), aunque no han conllevado una adopción generalizada de estos esquemas. Las razones de la no adopción de esta propuesta son varias como las normativas regulatorias de las diferentes agencias, la ausencia de una clara evidencia científica (los ensayos clínicos, probablemente por cuestiones regulatorias, suelen alinearse con el escalado terapéutico), la ausencia de un fármaco con propiedades inductoras contrastables y la ausencia de biomarcadores que puedan segregar a los pacientes que responderían mejor a uno u otro abordaje (254).

El tratamiento combinado, esquema habitual en otras enfermedades autoinmunes como la artritis reumatoide, no ha sido desarrollado en la EM probablemente por el temor a los efectos adversos como los encontrados en el caso de NTZ(206).

## **1.7.2. Tratamientos de Base no Inmunológica: Tratamientos Sintomáticos**

A lo largo de la evolución de la enfermedad el paciente con EM puede llegar a desarrollar un gran número de síntomas secundarios a la enfermedad y responsables de una importante discapacidad como la espasticidad, el dolor o los trastornos genitourinarios(5). Para intentar mitigarlos existen estrategias farmacológicas y de naturaleza fisioterapéutica. Dada la extensión y la evidencia científica disponible nos centraremos en aquellos síntomas más frecuentes y con tratamientos más contrastados.

### **1.7.2.1. Espasticidad**

Existen diversos fármacos que han demostrado ser útiles en disminuir la espasticidad en la EM aunque con efectos adversos comunes. Entre este repertorio de fármacos cabe destacar baclofeno, la tizanidina o el dantroleno para la espasticidad generalizada, la infiltración con neurotoxina botulínica en la espasticidad focal y la bomba intratecal de baclofeno para casos severos(255,256). En los últimos años existe una buena evidencia del uso de los derivados cannabinoides como una estrategia útil y que ha logrado modificar los algoritmos terapéuticos(257,258).

### **1.7.2.2. Fatiga**

Se trata de un síntoma muy frecuente pero de difícil solución(107). Es importante detectar factores tratables que puedan contribuir a la fatiga, como trastornos del sueño, depresión, anemia o disfunción tiroidea(259). Se utilizan fármacos como la amantadina, modafinilo o los antidepresivos inhibidores de la recaptación de la serotonina para intentar combatirla aunque con una eficacia muy discreta(256).

### **1.7.2.3. Dolor Neuropático y Fenómenos Paroxísticos**

Ambos síntomas pueden generar una importante disminución en la calidad de vida y comparten un manejo razonablemente similar aunque con regímenes de tratamiento diferentes. Los fármacos anticomiciales como la carbamacepina, la



gabapentina, o la pregabalina así como algunos antidepresivos tricíclicos pueden ser eficaces al dificultar la transmisión del impulso nervioso(256).

#### **1.7.2.4. Vejiga Neurógena**

La restricción vespertina de líquidos o el vaciado frecuente puede ser útil en la hiperreflexia del detrusor. Los fármacos anticolinérgicos, como la oxibutinina o la tolterodina, pueden mejorar este problema(260). En casos seleccionados puede administrarse toxina botulínica intravesical. La hipofunción del detrusor puede tratarse con cateterismos intermitentes y si no es posible, sondaje permanente(256,260).

#### **1.7.2.5. Estreñimiento**

Su tratamiento es habitualmente no farmacológico e incluye una dieta rica en fibra y abundante ingesta de líquidos. Se pueden utilizar, además, laxantes, supositorios de glicerina o enemas ocasionalmente(256). De modo anecdótico se han empleado trasplantes de flora microbiótica fecal(261).

#### **1.7.2.6. Disfunción Sexual**

En la disfunción eréctil masculina se puede emplear el sildenafil oral y como alternativa la inyección intracavernosa de prostaglandina E1(256,262). La sequedad vaginal puede responder a la aplicación local de cremas de estrógenos o lubricantes.

#### **1.7.2.7. Deterioro Cognitivo y Depresión**

El deterioro cognitivo es un síntoma muy temido por los pacientes y por los facultativos ya que implica que la progresión del fenómeno neurodegenerativo a la esfera cognitiva. No se conoce con certeza su fisiopatogenia pero los diferentes abordajes farmacológicos han sido ineficaces con fármacos empleados en otros tipos de demencia como donepezilo o memantina(102,263,264). El mejor abordaje hasta la fecha es el preventivo mediante fármacos más agresivos y, si se produce, abordaje neurorrehabilitador que fomente la plasticidad neuronal y preservación funcional del paciente(265,266).

Con respecto a la depresión la discapacidad así como la incertidumbre en el pronóstico de la EM, hacen que la depresión tenga una alta prevalencia. Los fármacos



más comúnmente utilizados son los antidepresivos tricíclicos o los inhibidores de la recaptación de la serotonina(256).

#### **1.7.2.8. Trastorno de la Marcha**

La alteración de la marcha es un proceso multifactorial donde convergen otros síntomas como espasticidad, fatiga o debilidad residual subyaciendo un fenómeno común de bloqueo de la conducción. Aprovechando las cualidades farmacológicas de los inhibidores de los canales de potasio como la 3-4 diaminopiridina (DPR) se realizó una modificación de la molécula y se testó si conseguía mejorar síntomas de los pacientes como el trastorno de la marcha(267). Actualmente la DPR de liberación retardada o fampridina es el único fármaco testado capaz de mejorar la velocidad de la marcha en la mitad de los pacientes y de un modo muy significativo (mejora del 30%) y ha conseguido mejorar de modo colateral y en menor cuantía otros síntomas como la espasticidad(268).

#### **1.7.2.9. Fisioterapia y otras Estrategias Rehabilitadoras**

Este tipo de tratamientos están diseñados en base al enfoque multidisciplinar que debe darse a la enfermedad. De esta manera es importante que los tratamientos anteriores se acompañen, cuando sea necesario, de fisioterapia, logopedia, terapia ocupacional, rehabilitación cognitiva, etc,...(256). Si la discapacidad evoluciona se pueden introducir progresivamente ayudas técnicas o adaptaciones para las actividades de la vida diaria. Aunque se ha demostrado beneficio de las medidas de fisioterapia en cualquier momento de la evolución de la enfermedad sus resultados son más pobres en fases muy avanzadas y siempre debe integrarse en un programa orientado a objetivos tangibles(269,270). La rehabilitación proporciona beneficios tanto físicos como psicológicos y consiguen mejorar la calidad de vida de los pacientes con EM.

## **2. ETIOPATOGENIA Y FISIOPATOGENIA DE LA ESCLEROSIS MULTIPLE**

La esclerosis múltiple es una enfermedad compleja cuyas causas y mecanismos íntimos no son del todo conocidos pero que sin duda implican un gran número de factores causales y un número no inferior de diferentes mecanismos patogénicos cuya combinación resulta en la profunda variabilidad de la enfermedad entre individuos.

### **2.1. ETIOPATOGENIA DE LA ESCLEROSIS MULTIPLE**

Hoy en día se considera a la EM como una enfermedad poligénica compleja con interacciones programadas o estocásticas con factores ambientales. Esta complejidad se pone en relieve por el hecho que no se puede predecir de modo exacto la expresión fenotípica desde el conocimiento aislado o control de los efectos individuales de los factores etiológicos como sucede por ejemplo en los estudios de gemelos.

#### **2.1.1. Factores Ambientales**

Determinadas características epidemiológicas de la enfermedad como la influencia latitudinal del riesgo(28) y su mayor prevalencia en determinados grupos de edad, en mujeres y en determinadas etnias(26) apuntan de modo claro a la presencia de un componente ambiental en la enfermedad. Otros dos datos confirman la existencia de los factores ambientales: en primer lugar se ha constatado un incremento reciente en la incidencia de la enfermedad(30) que no puede ser explicado por potenciales factores genéticos; en segundo lugar los estudios de migraciones sugieren la presencia de un factor ambiental que incidiría en una edad crítica (entre los 5 y 15 años) del individuo(31). Aunque se han propuesto numerosos factores ambientales en la EM nos centraremos en los más contrastados: la vitamina D, el tabaco y el papel de infecciones incluido el del VEB a través de la “hipótesis higiénica”.

### 2.1.1.1. Vitamina D.

Gran parte de la variabilidad apreciada a nivel latitudinal pudiera ser explicada por la exposición solar y los niveles de vitamina D con una correlación inversa con la de la incidencia de la EM. La radiación ultravioleta es la principal fuente síntesis endógena de vitamina D y de este modo los niveles séricos pueden correlacionarse con la fotoexposición solar(271). Además en latitudes septentrionales, la EM es menos frecuente en población costera que en población alejada del mar probablemente condicionado por el consumo de pescados grasos (segunda fuente en importancia de vitamina D).

El estudio más determinante de la relación de la vitamina D con la EM fue un estudio prospectivo de cohortes con 182000 enfermeras seguidas a lo largo de 20 años controlando sus niveles séricos de vitamina D y hábitos dietéticos(272). Tras este periodo se diagnosticaron 173 casos de EM los cuales tras ajuste por edad, tabaquismo y otros potenciales factores de riesgo, se constató que aquellas mujeres con toma regular de al menos 400 UI al día de vitamina D presentaba un 40% menos de riesgo de desarrollo de la enfermedad comparadas con población general.

Se ha constatado una variabilidad étnica en el efecto de la vitamina D; así población blanca hispánica o afroamericana mantienen la asociación aunque con un menor riesgo que población blanca no hispánica(273).

No obstante no se conoce con certeza el momento en el que una deficiencia de vitamina D puede contribuir al riesgo de la enfermedad. Las variaciones en el riesgo de desarrollo de EM en función del mes de nacimiento en ambos hemisferios coincidiendo con los periodos de menor fotoexposición pudieran hacer pensar que los niveles intrauterinos son relevantes(274).

El mecanismo que relaciona el déficit de Vitamina D con la EM no está definitivamente aclarado. Estudios in vitro o en modelos animales aprecian reducción en las concentraciones de citoquinas proinflamatorias, en la conversión hacia células plasmáticas o en la eficiencia de la presentación antigénica(273,275). Una observación procedente de la genética parece conferir el papel a la vitamina D y no a la fotoexposición: variantes raras no funcionantes de *CYP27B1*, el gen codificante de la enzima 25-hidroxi-vitaminaD-1 $\alpha$ -hidroxilasa que participa en el paso de la forma activa de la vitamina D y por tanto condiciona un déficit de esta en caso de

disfunción, conllevan un riesgo incrementado de EM independientemente de otros factores modificadores(276).

### **2.1.1.2. Consumo de Tabaco.**

Comparados con los nunca fumadores, los alguna vez fumadores poseen un 50% más de riesgo de desarrollar EM con una asociación directa con la duración e intensidad del consumo tabáquico(274). Este efecto parece ser más intenso en hombres que en mujeres, sin embargo el cambio de comportamiento de consumo de tabaco entre hombres y mujeres (incremento relativamente constante de consumo entre mujeres) puede explicar, al menos parcialmente, el incremento del ratio mujer:hombre en el riesgo de EM en varios países como Canadá(274) o Dinamarca(32). Los mecanismos que conducen a este incremento de riesgo son especulativos ya que no se ha demostrado fehacientemente que el consumo modifique el curso clínico de los pacientes por lo que solo quedaría relegado a las fases iniciales de la enfermedad probablemente por un mecanismo tóxico ligado a productos de la combustión(277).

### **2.1.1.3. Hipótesis de la Higiene**

El aumento en la incidencia de la EM y de otras enfermedades autoinmunes y alérgicas en las últimas décadas ha dado lugar a la llamada “hipótesis de la higiene” en la que un sistema inmune no adecuadamente entrenado en la diferenciación entre lo propio y ajeno a consecuencia de una falta de exposición a lo ajeno reconoce como tal moléculas propias(278).

Son varios los hechos que apoyan esta teoría como el cambio en las tendencias epidemiológicas entre la EM y la neuromielitis óptica<sup>7</sup> (NMO) en el norte de Japón, donde una “occidentalización” del modo de vida e incremento de la higiene ha conllevado a un marcado descenso de la NMO e incremento de la EM(279). La relación entre las frecuencias de NMO:EM en otros países del mundo pueden también relacionarse con los hábitos higiénicos siendo la NMO más frecuente en Brasil o India(157). No obstante la relación entre la NMO y la EM también puede ser secundaria a factores genéticos(279).

---

<sup>7</sup> La Neuromielitis Óptica o enfermedad de Devic(157) fue conocida durante muchos años en el extremo Oriente como “forma óptico-espinal” de EM dada su marcada preferencia por la afectación a nivel de nervios ópticos y médula espinal. En 2004 se consigue identificar el anticuerpo responsable: la aquoporina-4 (un canal de agua muy expresado a nivel de los procesos astrocitarios).

Datos más objetivos pueden ser la correlación inversa entre la distribución global de la EM y la del parásito *Trichuris trichuria* (280) lo que pudiera hacer pensar en un papel protector de la infecciones por helmintos(281).

No obstante, en algún momento observaciones epidemiológicas han llevado a pensar que los agentes infecciosos fueran la causa de la EM como sucedió en las islas Orcadas tras el establecimiento de tropas británicas durante la II Guerra Mundial cuando se observó un notable incremento de incidencia sospechándose un origen venéreo de la EM(282). Del mismo modo se ha llegado a plantear la posible utilidad del transplante microbiótico fecal en la EM con escasa evidencia hasta la fecha(261).

En definitiva, las infecciones a edades tempranas de la vida tienen más efecto beneficioso que perjudicial en el desarrollo de un sistema inmunitario competente y en la patogénesis de enfermedades autoinmunes como la EM(283).

#### **2.1.1.4. Infecciones Virales: Virus de Epstein-Barr**

La hipótesis de un origen viral de la EM emana entre otros factores de los estudios de migraciones que determinan que la presencia de un factor ambiental a una edad temprana modifica el riesgo que sería conferido por el perfil genético del individuo.

Un virus “responsable” de la EM debería requerir un viremia significativa para poder penetrar en SNC y un sistema inmunitario ineficaz que explicara la baja tasa de infección/EM(274). Se han propuesto e investigado varios virus potenciales como el sarampión, la rubeola o la varicela pero los argumentos más sólidos implican al virus de Epstein-Barr (VEB)(281).

Los mecanismos potenciales por lo que un agente patógeno podría guardar relación con la EM son el mimetismo molecular y la estimulación a través de superantígenos:

- **Mimetismo molecular:** se produce cuando una célula T puede activarse por reactividad cruzada entre un antígeno exógeno y un autoantígeno. La demostración de la homología de secuencias de aminoácidos entre determinados agentes infecciosos y la mielina del SNC sugiere que los antígenos peptídicos de estos microorganismos podrían desencadenar un ataque inmunomediado contra la mielina del

SNC. Durante la selección tímica, una población de células T puede adquirir la propiedad de reconocer antígenos exógenos y autoantígenos que comparten secuencias peptídicas concretas llamadas “determinantes antigénicos”. Los antígenos de los agentes patógenos serían presentados a los linfocitos T fuera del SNC por las células presentadoras de antígenos al entrar en contacto con ellos, produciéndose la activación y expansión de dicho clon LT que podría atravesar la BHE y reconocer también a los autoantígenos homólogos de la mielina del SNC, dando lugar a un ataque inmunomediado contra éstos(284).

- **Superantígenos:** son proteínas virales (aunque también pueden ser bacterianas) capaces de unirse a las moléculas CMH de la célula presentadora de antígeno fuera de la hendidura de unión antigénica, y activar a las células T autorreactivas contra los antígenos mielínicos(284).

El **Virus de Epstein-Barr** es un herpesvirus ubicuo de doble cadena de DNA causante de la mononucleosis infecciosa. Los hallazgos que relacionan al VEB con la EM de modo más consistente son:

- Existe una relación contrastada entre los títulos de anticuerpos anti-VEB y la EM(274): a) la EM es sumamente infrecuente en pacientes seronegativos, b) existe una mayor seroprevalencia de VEB en pacientes de EM que en población general pareada por edad y, c) el riesgo relativo de desarrollar EM guarda relación directa con los títulos del anticuerpo anti-EBNA(285).
- Las características BOC presentes en el LCR de los pacientes con EM contienen clonotipos reactivos contra secuencias del VEB(286).
- Se ha demostrado la presencia del virus en linfocitos B presentes en placas crónicas y en los infiltrados linfoides terciarios menínges(287).

La hipótesis higiénica no está necesariamente reñida con las observaciones patogénicas del VEB ya que individuos que no se exponen al virus durante la infancia o adolescencia pueden tener un riesgo mayor de desarrollo de EM aparente tras la

infección de éste(283). Una observación que confirmaría esta hipótesis es el corto intervalo entre la infección VEB y el desarrollo de la EM entre los militares de EEUU seronegativos frente a VEB al reclutamiento(274).

Un factor de peso considerable en la hipótesis del VEB en el riesgo de desarrollo de EM es un potencial mecanismo fisiopatogénico. Se conoce de otras enfermedades como determinados linfomas que los linfocitos B infectados por VEB tienden a la “inmortalización” conduciendo a la continua producción de autoanticuerpos y presentación antigénica a linfocitos T patogénicos(274). Así una fuerte activación de la inmunidad innata en pacientes con EM en el momento de la primoinfección por el VEB puede facilitar la expansión de clones autorreactivos que pueden a su vez ser infectados por el VEB lo que cerraría el círculo fisiopatogénico(288). Clones de LT específicos contra EBNA-1 son frecuentemente encontrados en pacientes con EM y reconocen con más probabilidad autoantígenos mielínicos que clones similares en población sana(289).

### **2.1.2. Factores Genéticos**

#### **2.1.2.1. Bases de un Componente Genético de la EM**

Desde los primeros estudios epidemiológicos se constata que la EM presenta una notoria agregación familiar aunque sin ser evidente un patrón de herencia mendeliano(290). Esta agregación familiar es directamente proporcional al grado de homología genética siendo del 30% en el caso de gemelos monocigóticos y descendiendo paulatinamente en al igual que la propia homología genética en familiares más alejados aunque siempre por encima del riesgo entre la población general(291)(imagen 7).

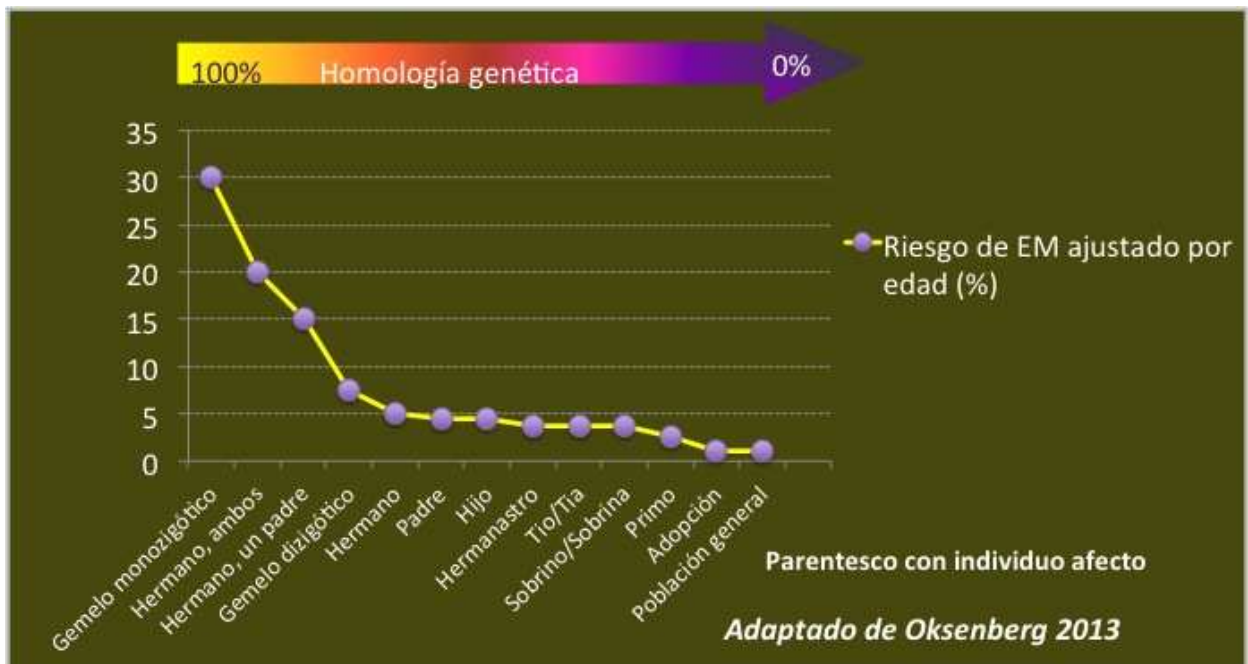


Imagen 7. Representación del riesgo relativo de desarrollo de la enfermedad en función de la homología genética compartida con el individuo afecto. Adaptado de Oksenberg(291).

No obstante, en los casos familiares se ha observado cierta asociación con el mes de nacimiento por lo que puede presuponerse una intrigante interacción entre los genes y algún factor ambiental durante la gestación o precozmente tras el nacimiento(292).

El conjunto de genes del antígeno leucocitario humano (HLA) en el brazo corto del cromosoma 6 (6p21.3) constituye el principal componente del origen genético de la EM y manifiesta una fuerza de asociación tan intensa que dificulta identificar otros genes candidatos(2). Dos son los factores principales que limitan los esfuerzos en la identificación de genes de susceptibilidad genética en enfermedades complejas como la EM(293,294):

- El efecto atribuible de genes individuales es modesto
- Existe una profunda variabilidad genética entre la población humana lo que implica que la información relevante tenga que extraerse sobre una importante señal de “ruido”

Aunque no existe un relación lineal entre la recurrencia familiar y el grado de relación, y excluido el efecto del conjunto de genes del HLA, se supone que entre 20 y



100 variantes genéticas comunes serían suficientes para explicar en un alto grado la prevalencia y heredabilidad<sup>8</sup> de la EM(291).

Existen varios tipos de estudios genéticos aunque los más empleados para estudiar la EM son los estudios de ligamiento y los estudios de asociación.

Los **estudios de ligamiento** se basan en estudios de múltiples casos familiares para localizar las regiones cromosómicas implicadas en la herencia. Es un tipo de estudios muy útil en enfermedades monogénicas aunque puede servir en enfermedades poligénicas a través del estudio de microsatélites<sup>9</sup>. Este tipo de estudios solo demostró la implicación de la región del HLA en la EM(294,295) lo que traduce que cualquier otra asociación genética (como posteriormente ha sido comprobado) sea modesta.

Los **estudios de asociación** tienen un mayor poder estadístico para detectar esas variantes genéticas ya que se realizan comparando una población de pacientes con una población sana no apareada; aquellas variaciones genéticas potencialmente implicadas en la enfermedad mostrarán frecuencias alélicas diferentes entre los casos. La potencia de dichos estudios aumentará ante mayor número de genes analizados y de casos estudiados dando lugar a los estudios de vastas regiones del genoma o GWAS (“*genome-wide association studies*”).

Los estudios GWAS(296) han conducido a la identificación de hasta 80 loci adicionales de riesgo genético aunque con un incremento muy modesto del riesgo de EM (con odds ratios de 1,1-1,3). Sin embargo, incluso en combinación, solo podrían explicar una fracción pequeña de la heredabilidad de la enfermedad implicando la idea de que los estudios GWAS no pueden explicar satisfactoriamente toda la genética de la EM, lo que se ha venido a llamar coloquialmente “materia oscura”(297); probablemente esta “materia oscura” implique otros factores como variaciones estructurales del genoma o modificaciones epigenéticas.

---

<sup>8</sup> La heredabilidad es la proporción de la variación fenotípica para una característica dada en una población concreta a la que puede atribuirse la variabilidad genética entre los individuos

<sup>9</sup> Los microsatélites son regiones cortas y polimórficas del DNA que se repiten en tándem y que tienen un comportamiento codominante. Se emplean como marcadores genéticos a través de una amplia variedad de aplicaciones como estudios de enfermedades, estudios poblacionales o forenses.

### 2.1.2.2. La región del HLA en la EM

La región del HLA<sup>10</sup> es responsable según los estudios entre el 20 y el 60% de la susceptibilidad genética en la EM(294) y codifica glicoproteínas de superficie celular altamente polimórficas que participan en el reconocimiento inmune entre lo propio y lo ajeno. La asociación entre el HLA tipo II y la EM se mantiene entre todos los tipos de enfermedad y, aunque con diferencias entre ellas, en todas las etnias siendo la señal más intensa la del haplotipo HLA-DRB1\*1501(293,295).

No obstante puede establecerse una graduación entre diferentes haplotipos y un mayor o menor riesgo de desarrollo de EM. Además el papel que confiere el haplotipo concreto en la región DRB1 se ve modificado por el de la región DRB5(294) (ver imagen 8) y otras interacciones funcionales epistáticas. Sin embargo la identificación de la predisposición real a través de la región del HLA está muy dificultada porque está expuesta a un potente desequilibrio de ligamiento<sup>11</sup>(298).

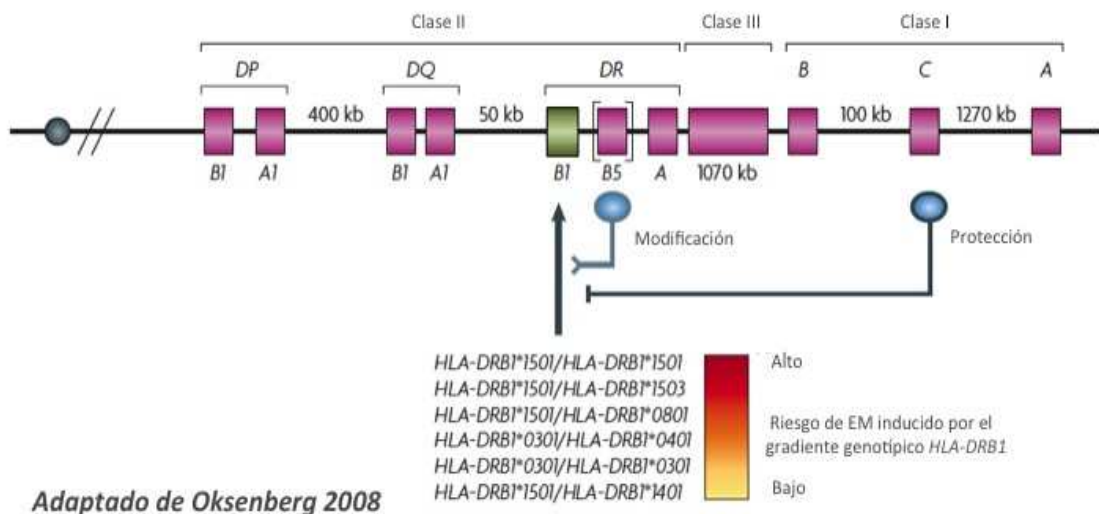


Imagen 8. Representación de la región del HLA del cromosoma 6 con las regiones codificantes para los HLA de clase I, II y III. En verde la región B1 con el gradiente de riesgo de desarrollo de EM. La región B5 modifica el riesgo de desarrollo de EM (explicación en texto). Adaptado de Oksenberg(294).

<sup>10</sup> El complejo de genes del HLA se ubica en el brazo corto del cromosoma 6 con 224 loci identificados de los que se expresan 128 suponiéndose una función inmune en el 40%. Existen dos principales regiones: HLA de clase I y HLA de clase II y codifican glicoproteínas de membrana celular cuya principal función es exponer y presentar pequeños fragmentos peptídicos antigénicos a linfocitos T específicos. Estos linfocitos pueden activarse mediante un segundo estímulo e iniciar una respuesta inmune específica contra dichos antígenos.

<sup>11</sup> El desequilibrio de ligamiento es la condición en la que la frecuencia encontrada de dos loci de un haplotipo particular es mayor de la esperada si los loci se mezclaran de modo independiente.

El papel de la influencia del HLA-DRB1 no está suficientemente aclarado pero se presupone relacionado con su función fisiológica (presentación antigénica) de modo que los haplotipos más “patogénicos” portarían modificaciones de la forma y carga de la región responsable de la unión de esos fragmentos proteicos favoreciendo la selección de los clones linfocitarios autorreactivos(299). Los haplotipos “más permisivos” para el desarrollo de la EM muestran un residuo de tirosina en la posición 60 mientras que el haplotipo HLA-DRB1\*1401 que es “protector” muestra un residuo de histidina. Esta modificación provoca una diferente interacción con la región peptídica 85-98 de la proteína básica de la mielina (MBP) lo que podría explicar la diferente autorreactividad(299).

Además recientemente se ha demostrado en un estudio GWAS con más de 6000 pacientes como polimorfismos tipo SNP en el haplotipo HLA-DRB1\*1501 se asocian de modo muy significativo a la presencia de BOC en el LCR mientras que la presencia del haplotipo HLA-DQA1\*0301 se correlaciona con la ausencia de éstas(300).

### **2.1.2.3. Papel de otros Genes no HLA**

Dado el papel más modesto que otros loci genéticos poseen en el desarrollo de la EM se han precisado numerosos estudios tipo GWAS y algoritmos matemáticos para poder evidenciar su papel en la susceptibilidad la de EM(296,300–308).

Los más de 80 loci identificados hasta la fecha guardan una serie de características concretas:

- La mayoría pueden agruparse en funciones biológicas concretas como la familia de las citoquinas (CXCR5, IL2RA, IL7R, IL12RB1, IL12A o IL12B entre otros) o de señales de coestimulación celular (CD37, CD40, CD58, CD80 o CD86 entre otros).
- Aproximadamente el 22% de los genes de susceptibilidad identificados se superponen con otras enfermedades autoinmunes como la diabetes tipo 1 o la enfermedad de Graves-Basedow(304,309).
- Su grado de asociación con la EM es modesto demostrado por el bajo valor habitual de sus odds-ratios.

- Algunos de los loci identificados interaccionan con factores ambientales asociados a la EM como los genes *CYP27B1* y *CYP24A1* en el caso la vitamina D(276).
- El número y el grado de asociación dependerá del volumen de pacientes analizados en los GWAS (297) y requerirán necesariamente de posteriores estudios específicos para comprobar fisiopatológicamente su implicación y que no sean marcadores de un desequilibrio de ligamiento con la variante alélica real(298).

Los genes implicados no HLA quedan recogidos en la tabla 12. Probablemente el mejor estudiado de los nuevos genes implicados sea el del receptor de la interleucina 7 (IL7R) en el que existe una evidencia biológica implicatoria. La asociación más fuerte se ha establecido con el polimorfismo de nucleótido único (SNP) codificante y no sinónimo *rs6897932* en el exón 6 del gen y que conduce a una variación del dominio transmembrana del IL7R(310). Esta variación, a través de “*splicing*” alternativo<sup>12</sup>, conlleva una conformación más soluble de IL7R. De este modo, los individuos portadores del alelo *rs6897932* muestran unos niveles mayores de IL7R soluble lo que puede influir a nivel de las respuestas inmunes innatas y adaptativas.

---

<sup>12</sup> El “*splicing*” o empalme alternativo es el proceso por el que se obtiene un RNA mensajero (RNAm) maduro a partir del transcrito primario o preRNAm mediante la eliminación de las secuencias intrónicas. Existen varios tipos de “*splicing*” que determinarán que puedan sintetizarse polipéptidos diferentes a partir de un mismo gen invalidando el viejo teorema de “un gen una proteína”

Gen	Posición cromosómica	Función biológica	Odds ratio
ALK (receptor tirosín-kinasa de linfoma anaplásico)	2p23	Receptor via tirosín-kinasa. Desarrollo encefálico	1,37
IL2RA (receptor tipo $\alpha$ de interleukina 2)	10p15	Apoptosis y respuesta inmune	1,25
CD58 (antígeno tipo 3 de función linfocitaria)	1p13	Adhesión celular y respuesta inmune	1,24
IL7R (receptor de interleukina 7)	5p13	Supervivencia celular y respuesta inmune	1,18
DBC1 (proteína eliminada en cáncer de vejiga tipo 1)	9q33	Detención del ciclo celular y apoptosis	1,17
RPL5 (proteína ribosómica L5)	1p22	Chaperona de RNA	1,15
CLEC16A (familia de lectinas de dominio tipo C)	16p13	Unión de glucosa y modificación información vía familia de lectinas	1,14
FAM69A (familia n <sup>o</sup> 69 con secuencia similar)	1p22	Unión de proteínas	1,12

Tabla 12. Resumen de los genes más importantes no HLA implicados en la EM. Adaptado de (296,300–308).

### 2.1.3. Evidencias a nivel del Transcriptoma

El desarrollo del daño tisular y de la afectación neurológica conllevan cambios fenotípicos celulares complejos desencadenados por la expresión específica de conjuntos genéticos. Una técnica que permite el estudio de estos conjuntos genéticos es la “reacción en cadena de la polimerasa (PCR) cuantitativa en tiempo real” que muestra los perfiles transcripcionales en un tejido y de modo indirecto las huellas genéticas de un proceso patogénico(294,311).

Aunque los estudios son difíciles de comparar, se ha demostrado un aumento de la expresión de genes relacionados con la inmunidad (como inmunoglobulinas y HLA) y de genes implicados con la homeostasis celular en los límites de placas activas. Entre estos últimos se ha evidenciado regulación al alza de genes de respuesta antioxidante incluido el gen de la hemo-oxigenasa tipo 1(312,313).

## **2.2. FISIOPATOGENIA DE LA ESCLEROSIS MULTIPLE**

Aunque muchos aspectos de la patogenia íntima de la EM no son aún del todo conocidos, la enfermedad se caracteriza por un daño inmunomediado al SNC con extensas áreas de desmielinización y de pérdida axonal(2). Se desconoce el autoantígeno que provoca la reacción inmune o si ésta se inicia en periferia o dentro del SNC. Los modelos animales como el de la EAE y todos los datos que se obtienen a múltiples niveles como radiológico, genético e histopatológico permiten aproximarnos a los mecanismos implicados. La imagen 9 muestra una aproximación esquemática a la fisiopatogenia de la enfermedad.

### **2.2.1. Activación Periférica de los Linfocitos**

La teoría más ampliamente aceptada en la actualidad postula que los pacientes con una susceptibilidad genética para la EM poseen linfocitos T CD4<sup>+</sup> autorreactivos en periferia específicas frente a antígenos del SNC que aún no han sido identificados pero entre los que se han implicado la proteína básica de la mielina (MBP), la proteína proteolípida (PLP) o la glicoproteína mielínica de los oligodendrocitos (MOG)(48).

En algún momento, estos LT autorreactivos son activados en la periferia por un factor sistémico o local, a través de un mecanismo de mimetismo molecular (epítopos compartidos por el autoantígeno del SNC y posibles agentes infecciosos) o por una estimulación a través de superantígenos virales o bacterianos (284).

Estos LT CD4<sup>+</sup> activados deben penetrar en SNC aunque para ello deben interaccionar previamente con el endotelio vascular a través de las moléculas de adhesión. Los LT activados segregan citocinas proinflamatorias tales como la IL-1, el TNF- $\alpha$  y el interferon tipo  $\gamma$  (INF- $\gamma$ ), que provocan un aumento en la expresión de las moléculas de adhesión endotelial: E-selectinas y las inmunoglobulinas ICAM- 1 (molécula de adhesión intracelular 1) y VCAM-1 (molécula de adhesión vascular 1). La primera función de las selectinas endoteliales es la ralentización y rodamiento del linfocito sobre la pared endotelial. Para ello establecen enlaces débiles con los ligandos linfocitarios y junto con las quimioquinas CCL19 y CCL21 permite el cambio conformacional del LT y la activación de las integrinas leucocitarias como el antígeno

asociado a la función linfocitaria 1 (LFA-1) y el antígeno muy tardío de tipo 4 (VLA-4), que se unirán a sus respectivos ligandos en las células endoteliales (la ICAM-1 y la VCAM-1) mediante enlaces estables(314). La integrina VLA-4 (compuesta por el heterodímero  $\alpha 4$ - $\beta 1$ ) confiere cierta especificidad tisular en la migración hacia SNC(200), así otros heterodímeros como  $\alpha 4$ - $\beta 7$  vehiculizan a los LT hacia aparato digestivo(315). Además se ha demostrado como VCAM-1, ligando de VLA-4, se encuentra sobreexpresado en el endotelio de SNC sobre todo a nivel de vénulas postcapilares en condiciones como la EM(315) lo que cierra el círculo hacia la facilitación de la migración a SNC. El bloqueo de la unión VLA-4 y VCAM-1 es una estrategia terapéutica eficaz en la EM(202).

Una vez adheridos al endotelio mediante la unión a lamininas y la producción linfocitaria de proteasas que degradan la matriz extracelular, como las metaloproteinasas de la matriz (MMP) gelatinasa A (MMP-2) y gelatinasa B (MMP-9), terminan por penetrar en SNC(57).

### **2.2.2. Reactivación y Perpetuación en el SNC**

Como en cualquier tejido los linfocitos son dirigidos dentro del SNC a través de un gradiente quimiotáctico por moléculas abundantes en el foco inflamatorio que son producidas por macrófagos y células locales como la microglía y los astrocitos(57).

Una vez en el foco inflamatorio deben ser reestimulados por una célula presentadora de antígenos (habitualmente microglía, células dendríticas o macrófagos) a través de moléculas CMH de clase II(289). Si el LT no es reestimulado abandona el SNC o muere. El LT activado en función de su subtipo (Th1, Th2 o Th17) iniciará una cascada inmunológica concreta.

Los Th1 a través de la producción de citoquinas proinflamatorias (como TNF- $\alpha$ , IL-1, IL-2 o INF- $\gamma$ ) y quimiocinas que inducen la proliferación clonal de los LT, la activación de macrófagos y microglía y la inducción de moléculas de adhesión endotelial para el reclutamiento de linfocitos citotóxicos, LB y otros efectores inmunes(284). Los macrófagos y la microglía activada secretan a su vez mediadores neurotóxicos como el TNF- $\alpha$ , MMP o especies reactivas de oxígeno (ROS) que



contribuyen al daño de mielina y axón a través del estrés oxidativo(316) (se desarrollará con mayor extensión en su epígrafe correspondiente).

Las células LT CD8+ son halladas en el infiltrado linfocitario(48) por lo que probablemente jueguen un importante papel patogénico vehiculado por su acción citotóxica y siendo activadas bien por la exposición de antígenos en el CMH tipo I de las células dendríticas pero también por mediadores solubles. Resultado de su acción citotóxica es el grado de lesión axonal que se correlaciona mejor con la intensidad de infiltración por CD8+ que con la de otros linfocitos(317).

Los Th2 liberarán citoquinas antiinflamatorias (IL-4 o IL-10) que tienden a contrarrestar el estado proinflamatorio(284) y potenciar mecanismos antioxidantes(318) pero que inducen la activación y proliferación de los linfocitos B (LB). Los LB desarrollan una doble labor: se diferencian a células plasmáticas productoras de anticuerpos que desarrollarán acción tóxica directa o mediada por complemento y actúan como células presentadoras de antígenos para perpetuar la activación de los linfocitos T mediante la expansión antigénica. El papel de los LB, anteriormente más denostado, cada día se hace más manifiesto(319) tanto por evidencias indirectas (presencia de BOC en el LCR) como directas como los folículos linfoides terciarios(64) o la respuesta favorable de la enfermedad a tratamientos específicos para LB(10).

Recientemente se ha descrito la implicación de las células T CD4+ colaboradoras tipo 17 (Th-17) en la fisiopatogenia de la EM(320) y aunque no está definitivamente aclarado su papel se conoce que potencian el reclutamiento de neutrófilos hacia el foco inflamatorio. Datos que apoyan su importancia serían el incremento de las células Th-17 en el LCR de pacientes con EMRR durante el brote o su presencia en el borde activo de las placas(321,322).

Además de los mecanismos que inducen la activación de los LT en la inflamación, existen otros que tratan de frenar su activación excesiva, como el que desarrollan las células CD4+CD25+Fox3 reguladoras o células T-reg(323). Estas células son capaces de suprimir la respuesta inmune ya sea limitando la presentación del antígeno a los linfocitos por parte de las células dendríticas, como regulando la proliferación de los linfocitos T ya activados. En los pacientes con EM se ha descrito una disminución del número y del efecto supresor de las células T-reg en sangre periférica en comparación con individuos sanos(324).



En los estadios avanzados de la EM, se crea un microambiente que favorece la atracción y establecimiento de linfocitos T y otras células efectoras y reguladoras inmunes que perpetúan la acción inflamatoria sobre el SNC y en última instancia condicionan que los DMD sean ineficaces para detener la progresión(56). Si este microambiente es o no la única causa del daño axonal no está establecido aún de modo definitivo.

### **2.2.3. Desmielinización**

El oligodendrocito (OG) es la célula responsable dentro de SNC de la formación y mantenimiento del recubrimiento mielínico axonal. El recubrimiento se realiza por arrastre en espiral desde una prolongación del OG que al ser una célula con varias prolongaciones pueden recubrir varios segmentos internodales de un mismo axón o de varios diferentes. En la EM característicamente esta cobertura mielínica está dañada postulándose varios mecanismos posibles no excluyentes(48,53):

- Mecanismos celulares como la citotoxicidad directa por LT CD8+, liberación de TNF- $\alpha$  o ROS por parte de la microglía activada o macrófagos.
- Mecanismos humorales. La presencia de inmunocomplejos en el patrón tipo 2, el más frecuentemente hallado, implica que se han liberado anticuerpos por parte de las células plasmática y activado el complejo de ataque de membrana.
- Patología primaria del OG. En el patrón tipo 3 de las lesiones desmielinizantes se aprecia la muerte apoptótica del OG bien por degeneración retrógrada como por moléculas proapoptóticas liberadas en el lecho inflamatorio.

### **2.2.4. Remielinización**

En las lesiones de EM, la remielinización se produce a través de las células progenitoras de los oligodendrocitos (OPC) que aparecen en elevado número rodeando las placas ya que los oligodendrocitos (OG) maduros son células con escasa

capacidad proliferativa(325). La remielinización suele ser incompleta, con vainas mielínicas muy finas denominadas “*shadow plaques*” o placas sombreadas por su escasa afinidad a los medios de tinción(57). La remielinización es muy heterogénea siendo más completa en placas recientes, en estadios iniciales de la enfermedad o en placas subcorticales; mientras que dicha remielinización es más pobre e incompleta en placas crónicas, estadios avanzados de la enfermedad y placas yuxtacorticales e infratentoriales(60,326). A nivel histopatológico existe una gran variabilidad en la presencia de OPC y OG a nivel de las placas desmielinizantes entre diferentes pacientes por lo que pueden existir factores primarios de los OG u OPC o factores genéticos individuales que contribuyan a dicha heterogeneidad(53,54). Además existen factores tisulares y microambientales que contribuyen a dicha variabilidad:

- episodios repetidos de desmielinización precipitan la depleción de OPC (325,326).
- la proliferación astrocitaria reactiva a las lesiones limita el crecimiento de los OG y la llegada de OPC(327).
- se liberan sustancias químicas que potencian vías de inhibición del crecimiento axonal y de la remielinización(328) que “luchan” con otras sustancias que favorecerían la migración de OPC, su diferenciación y el crecimiento del cono axonal(329).

Una de las vías más importantes identificadas hasta la fecha en la remielinización es la del LINGO-1 desarrollándose su potencial terapéutico. LINGO-1 (del inglés *leucine rich repeat and immunoglobulin domain containing Nogo receptor interacting protein-1*) es una proteína transmembrana implicada en fenómenos inhibitorios tanto sobre la maduración de los oligodendrocitos y la formación de mielina, como sobre la supervivencia neuronal y la regeneración axonal(330). Se expresa en la superficie de neuronas, OG y OPC y su activación a través del complejo del receptor de Nogo ejerce una profunda inhibición del crecimiento axonal y la remielinización(331). Esta inhibición no es exclusiva de la EM pudiendo apreciarse en otras enfermedades neurodegenerativas(332). De este modo, la inhibición de la vía LINGO-1 se constituye como una nueva vía terapéutica tanto en EM como en otras patologías(331–334).

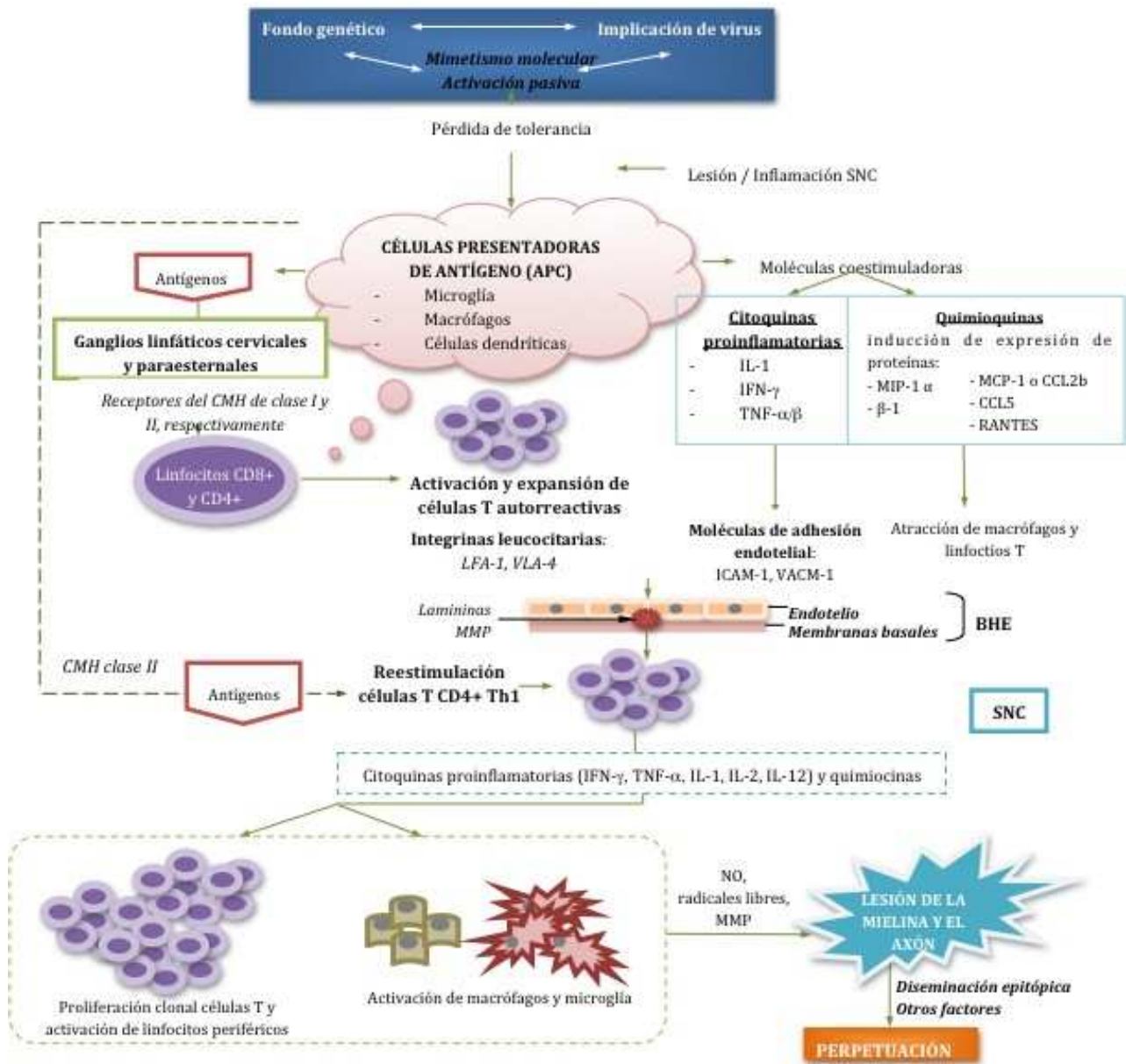


Imagen 9. Representación esquemática de la fisiopatogenia de la EM. Tras la pérdida de tolerancia inmunológica se produce una activación periférica de la respuesta inmune frente a un autoantígeno de SNC desconocido produciéndose la migración hacia SNC y perpetuación de la respuesta por la diseminación epitópica. BHE –Barrera hematoencefálica. CMH – Complejo mayor de histocompatibilidad. ICAM-1 – Molécula de adhesión intracelular tipo 1. IL – Interleuquina. LFA-1 – antígeno asociado a función leucocitaria. MCP-1/CCL-2b – proteína quimiotáctica de monocitos 1. MIP-  $\alpha$ 1 – proteína inflamatoria de macrófagos  $\alpha$ 1. MMP – Metaloproteinasas de matriz. NO – Oxido nítrico. VCAM-1. Molécula adhesión vascular tipo 1. VLA-4 – Antígeno muy tardío leucocitario.

### **2.2.5. Daño Axonal**

El daño axonal, aunque variable y tradicionalmente menos atendido, es un proceso patológico característico de la EM y responsable de la discapacidad progresiva que desarrollan los pacientes(48,56,59). Aún no existe consenso si la neurodegeneración es un fenómeno independiente o secundario a la inflamación(56) aunque sí está establecido que comienza desde estadios muy iniciales de la enfermedad(69,76,150). Incluso hay investigadores que consideran que dicha neurodegeneración es el fenómeno primario en la enfermedad iniciándose de modo secundario una aberrante respuesta inmune(70). De hecho otras enfermedades puramente neurodegenerativas como la enfermedad de Alzheimer muestran LT en regiones donde se produce depósito de proteína amiloide o formación de ovillos neurofibrilares(335). Sin embargo son más los datos que apuntan a la existencia de asociación entre ambos componentes: la neurodegeneración se asocia a una respuesta patogénica de los LB e infiltración persistente por LT CD8+(56,336), la progresión de la discapacidad puede ralentizarse mediante tratamientos inmunomoduladores o inmunosupresores(202,233) o acelerarse en sujetos con marcadores inmunológicos de mayor agresividad como las BOC IgM lípido-específicas(140,143).

Por otro lado, la pérdida axonal ha podido observarse en el “tejido aparentemente normal”. Este fenómeno se describió inicialmente en las necropsias de pacientes con EM en las que se observó una reducción considerable del número de axones en muestras de tejido que presentaban vainas de mielina intactas pero vacías. Inicialmente se consideró que este hallazgo se correspondía con la degeneración walleriana que se produce distalmente a una sección axonal proximal, en una placa de desmielinización(337). Sin embargo, recientemente un estudio ha mostrado una pobre correlación entre la pérdida axonal y la carga de lesiones desmielinizantes(56), lo que sugiere que la transección axonal(51) en las placas desmielinizantes no es el único mecanismo que conduce al daño axonal. El daño axonal puede propiciarse por un conjunto de causas probablemente interrelacionadas y convergentes(338,339):

- Citotoxicidad directa por LT CD8+ o macrófagos(317) o mediada por complemento tras la activación de éste por anticuerpos contra neurofascina, neurofilamentos o contactina(67,340).

- Estrés oxidativo provocado por la liberación de ROS/RNS por parte de las células implicadas en el infiltrado inflamatorio(104) y especialmente a través de la activación de la microglía no solo en las placas desmielinizantes sino que también puede apreciarse en la sustancia blanca aparentemente normal (se desarrollará en el apartado correspondiente)(340).
- Colapso energético por disfunción mitocondrial(55) que conduce al incremento de la concentración intracelular de sodio y este a su vez al incremento de calcio intracelular y la activación de enzimas proteolíticas(327).
- Ausencia de soporte trófico del axón por parte del OG(329).
- Astrocitosis reactiva que dificulta el crecimiento del cono axonal(327).
- Susceptibilidad condicionada por la expresión individual de determinados genes en las neuronas u otras células implicadas(332).

#### **2.2.6. Papel dual de la Microglía**

Las células de la microglía (MG) constituyen la población de macrófagos residente más abundante en el SNC aunque muestran bastantes diferencias con éstos como su alta capacidad de auto-perpetuación con independencia de los precursores mieloides. En condiciones de reposo muestran una morfología abalorada; sin embargo a consecuencia de un daño neuronal o múltiples estímulos sufren una transformación fenotípica a una forma “activada” (MGA) en la que el cuerpo celular se hipertrofia y sus procesos se ramifican progresivamente. No obstante, esta clasificación morfológica, establecida por Pío del Río-Hortega hace ya más de 100 años(341), es una sobre-simplificación ya que son células altamente especializadas y plásticas que pueden mutar entre diferentes fenotipos (M1 y M2) con cambios funcionales y en la expresión de determinados genes no necesariamente vinculados a los cambios morfológicos(342,343). El fenotipo M1 es un estado fagocítico asociado con la producción y liberación de citoquinas proinflamatorias (IL-1, IL-6, TNF- $\alpha$ ) y sustancias citotóxicas como ROS u óxido nítrico contribuyendo al estrés oxidativo; en cambio el fenotipo M2 aunque también es fagocítico promueve una respuesta antiinflamatoria (a través de IL-10). Ambos estados M1 y M2 representan el espectro

de patrones de activación y son mutables entre sí en función del microambiente inflamatorio(340) u otras sustancias como la presencia de hierro(344,345). Aunque el reconocimiento y respuesta frente a patógenos microbianos es la función principal de la MG, también pueden reaccionar frente a señales no infecciosas como la cascada del complemento o a las de neuronas dañadas(342) como sucede tras la pérdida de la estimulación de CD200. De hecho actualmente el papel de la MGA es considerado crucial para el desarrollo de las lesiones corticales y de la pérdida axonal en la sustancia blanca aparentemente normal en la EM(65,342) y ha sido implicada en otras enfermedades neurodegenerativas como la enfermedad de Alzheimer o la enfermedad de Parkinson(343).

Otro papel importante de la MG es su interacción sobre la plasticidad sináptica. En condiciones normales la MG establece breves y repetidos contactos con las sinapsis. Sin embargo bajo condiciones patológicas los contactos entre la MGA y las sinapsis son más prolongados pudiendo destruir sinapsis disfuncionantes o su capacidad de modular estímulos excitatorios como el glutamato(346). En el modelo animal de EM, la EAE se ha demostrado cómo en placas agudas existen corrientes excitatorias glutamatérgicas más prolongadas y que probablemente puedan condicionar daño neuronal sobreañadido a los mecanismos previamente descritos(347,348).

### **3. ESTRÉS OXIDATIVO**

#### **3.1. CONCEPTOS BÁSICOS DEL ESTRÉS OXIDATIVO**

Las células eucariotas están sometidas a agresiones oxidativas que proceden principalmente de tres vías: toxinas, metabolismo aeróbico y la respuesta inmune.

El metabolismo aerobio basado en el consumo de oxígeno (O<sub>2</sub>) para la producción de energía conlleva de modo inevitable la generación de radicales libres<sup>13</sup> como subproductos de reacciones enzimáticas (o no) o como residuos de la mitocondria. Además, cuando el oxígeno es parcialmente reducido pueden generarse especies menos tóxicas aunque con mayor vida media que igualmente pueden generar daño a las estructuras celulares como el anión superóxido (O<sub>2</sub><sup>·-</sup>), el radical hidroxilo (·OH) o el hidroxiperóxido (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>). De modo conjunto definiremos como especies reactivas de oxígeno (ROS) al conjunto de radicales libres y especies tóxicas que contienen un grupo de oxígeno con mayor reactividad, y especies reactivas de nitrógeno (RNS) a las constituidas con dicho elemento. Tanto las ROS como las RNS poseen la capacidad de sustraer electrones de otras moléculas como proteínas, lípidos y ácidos nucleicos desencadenando cambios estructurales y funcionales.

Los organismos han desarrollado evolutivamente mecanismos para garantizar su autoprotección de las especies reactivas y que en condiciones fisiológicas consiguen mantener la homeostasis redox. Dentro de estos mecanismos cabe destacar: a) la retirada de ROS/RNS y sus precursores, b) el secuestro de los metales catalíticos necesarios y c) la génesis y sobreexpresión de moléculas endógenas antioxidantes(349). Existen dos grandes grupos de sistemas antioxidantes: los no enzimáticos integrados por diversas sustancias “dadoras” de electrones como el glutatión (GSH), las vitaminas C y E, el ácido lipoico o la ubiquinona y sistemas enzimáticos como la superóxido dismutasa (SOD), la superóxido reductasa (SOR), catalasas, glutatión peroxidasa y la hemo-oxigenasa (HO). La expresión de la inmensa mayoría de estas enzimas antioxidantes está controlada por la unión del

---

<sup>13</sup> Un radical libre es cualquier especie química que contiene al menos un electrón no apareado que para estabilizar la molécula atrae y roba electrones de otras moléculas provocando su oxidación.



factor de transcripción llamado factor nuclear tipo 2 relacionado con el eritrocito-2 (Nfr2) a los agentes de respuesta antioxidante (ARE) en los promotores de los genes diana como la hemo-oxigenasa tipo 1 (*HMOX-1*), la NADPH-quinona oxidoreductasa 1 (NQO1) y múltiples enzimas relacionadas con el metabolismo del glutatión (GSH)(222,350,351). No obstante, la vía Nfr2/ARE se desarrollará más adelante.

Sin embargo, en condiciones patológicas cuando la producción de ROS/RNS excede la capacidad de compensación de los sistemas antioxidantes el estado resultante es conocido como estrés oxidativo(104).

Existen dos fuentes principales de producción de ROS/RNS a nivel biológico: la mitocondria y las enzimas productoras de ROS que muestran una alta expresión en macrófagos, neutrófilos y microglía. Estas enzimas, como la NADPH-oxidasa, la mieloperoxidasa o la óxido-nítrico sintasa inducible (iNOS), se han demostrado sobreexpresadas en pacientes con EM y modelos animales de EM(316,350,352).

### **3.2. PAPEL DE LAS ESPECIES REACTIVAS DE NITROGENO**

La molécula efectora clave del estrés oxidativo es el peroxinitrito (ONOO<sup>-</sup>) que se forma de la reacción entre el óxido nítrico ( $\cdot$ NO) con el anión superóxido.

El óxido nítrico (NO) es una molécula esencial en la fisiología celular junto con su labor como mensajero biológico. Sin embargo el NO puede ser tanto neurotóxico como neuroprotector estando determinado dicho comportamiento tanto por la concentración del mismo (más tóxico a mayor concentración) como por el ambiente biológico(353). A nivel de SNC existen tres isoformas de la NO sintasa: la óxido-nítrico-sintasa neuronal (nNOS), la óxido-nítrico-sintasa endotelial (eNOS) y la óxido-nítrico sintasa inducible (iNOS) localizada a nivel de mitocondria y microglía (354,355):

- En caso de disfunción de la cadena respiratoria mitocondrial se produce una síntesis excesiva de NO por parte de la nNOS



- iNOS permite generar grandes cantidades de NO durante un periodo de tiempo prolongado durante las reacciones inflamatorias
- El incremento de expresión de eNOS a nivel local suele asociarse con la disfunción de BHE.

Se ha identificado una cuarta isoforma, la óxido-nítrico sintasa mitocondrial (mtNOS) que produce RNS a través de la cadena respiratoria(353).

El peroxinitrito es el efector final molecular del estrés oxidativo y se genera *in vivo* por la combinación de dos radicales libres ubicuos como son el anión superóxido ( $O_2^{\cdot-}$ ) y el NO aunque habitualmente se genera en la mitocondria o por acción de la NADPH oxidasa a nivel de macrófagos (microglía) siendo una especie oxidante de vida media ultracorta pudiendo detectar su acción mediante la nitración de las proteínas(356).

Cuando los sistemas biológicos sufren la exposición a peroxinitrito pueden sufrir múltiples efectos que comprometen la viabilidad y función celular; aunque estos efectos son universales, a nivel de SNC y en relación con la EM podrían ser(355):

- Inhibición directa de enzimas antioxidantes y depleción de antioxidantes
- Agregación de proteínas como  $\alpha$ -sinucleína o tau asociada a microtúbulos
- Regulación al alza de moléculas de adhesión endoteliales y en superficie de neutrófilos por activación de NF- $\kappa$ B
- Disregulación del calcio intraneuronal por inhibición de bombas de calcio o bomba  $Na^+/K^+$  ATPasa
- Peroxidación de lípidos de membrana
- Oxidación del DNA
- Disfunción mitocondrial con inactivación de los complejos I, II y V, desnaturalización DNA mitocondrial o apertura de poros de permeabilidad conllevando un compromiso de la producción energética

Hoy en día se extiende el papel del peroxinitrito a otras enfermedades neurodegenerativas y junto con la acción de la excitotoxicidad por glutamato conduce



### **3.3. EXCITOTOXICIDAD POR GLUTAMATO**

La excitotoxicidad por glutamato y otros neurotransmisores excitatorios es conocida desde hace muchos años. El glutamato (GLUT) es el principal neurotransmisor excitatorio en el SNC y sus concentraciones fisiológicas son cercanas a las tóxicas por lo que sus niveles extracelulares precisan de un exquisito control(104,348,357). En condiciones fisiológicas el exceso de GLUT del espacio extracelular se vehiculiza mediante la captación activa por los astrocitos y oligodendrocitos (OG) y conversión ATP-dependiente a glutamina, mientras que al mismo tiempo las neuronas emplean la glutaminasa para convertir de nuevo en GLUT la glutamina. Sin embargo esta dependencia energética condiciona que en muchas condiciones patológicas se invierta el transportador astrocitario aumentando la concentración extracelular de GLUT. La liberación de vesículas presinápticas y la fuga desde neuronas dañadas contribuyen a este incremento de la concentración de GLUT. La excitotoxicidad por GLUT se produce a través de varias vías: el aumento de concentración de calcio intracelular, el daño mitocondrial y la producción de ROS y, sobre todo, RNS como el peroxinitrito(355,358). Otros fenómenos implicados son la reducción de la expresión de los transportadores de GLUT en los OG en presencia de TNF $\alpha$  u otros mediadores inflamatorios(359) y la acción directa sobre las sinapsis de la microglía activada probablemente vehiculado por la pérdida de la señal CD200 desde la neurona(342,346).

Las primeras referencias del potencial papel de la excitotoxicidad en la EM emanan de las experiencias del bloqueo de los canales NMDA y AMPA de glutamato en el modelo animal de EAE que conllevaban una reducción del daño axonal y de OG(358,359). Además otros hallazgos serían la inducción de lesiones desmielinizantes con la sobre-activación experimental de los receptores de GLUT o la evidencia de infraexpresión de los transportadores de GLUT y de la glutamina sintasa tanto en las placas como en la sustancia blanca aparentemente normal(360). Sin embargo estudios in vitro e in vivo muestran como la mielina y el OG son mucho más sensibles al daño por GLUT que los axones(348,357).

Además, el exceso de GLUT posee otro efecto deletéreo sobre la supervivencia neuronal ya que compite selectivamente con la cistina bloqueando la síntesis de su principal antioxidante, el glutatión(350).

### **3.4. PAPEL DEL ESTRÉS OXIDATIVO EN LA ESCLEROSIS MÚLTIPLE Y OTRAS ENFERMEDADES NEUROLOGICAS.**

Un creciente número de patologías neurológicas se relacionan directa o parcialmente con el estrés oxidativo. En el caso de la EM, cada día son mayores las evidencias que señalan al daño oxidativo como componente importante en la enfermedad siendo la activación de la microglía el fenómeno primario que vehiculiza dicho daño oxidativo y la excitotoxicidad y pudiendo relacionarse el mismo con fenómenos como la discapacidad residual y el deterioro cognitivo(353,361–363). Además las evidencias del papel del estrés oxidativo en la EM pueden detectarse incluso en plasma y guardan relación con la actividad clínica comprobándose como previamente a los brotes se incrementan los niveles séricos de proteínas nitrilizadas o mieloperoxidasa y descienden los de antioxidantes como el glutatión(364).

#### **3.4.1. Vulnerabilidad del SNC al Estrés Oxidativo**

Las neuronas y los OG son células extremadamente sensibles al estrés oxidativo por una serie de razones(349,359,365):

- La mayor parte de los requerimientos energéticos del cerebro son suplidos a través de la cadena respiratoria mitocondrial. Se estima que el SNC consume el 20% del oxígeno empleado en el organismo.
- El parénquima cerebral es muy rico en ácidos grasos poliinsaturados que constituyen un excelente sustrato para las reacciones de peroxidación de lípidos.
- El glutamato, el neurotransmisor excitador más común en el SNC puede conducir en situaciones de hiperestimulación a excitotoxicidad, génesis de ROS y muerte neuronal(348,357).
- La actividad de enzimas antioxidantes como SOD, catalasas o glutatión-peroxidasa es comparativamente menor en SNC que en otros tejidos y algunos tipos celulares como los OG apenas poseen reservas de glutatión(366).

- La microglía, las células inmunes residentes en SNC, provoca una respuesta oxidativa a los insultos patogénicos que incluyen la liberación de aniones superóxidos y peróxido de hidrógeno(340,342,343).
- El SNC es rico en metales reducidos catalíticamente activos como el óxido ferroso, ya que es requerido como cofactor para la síntesis de mielina(366) aunque su presencia puede conducir a la generación de grupos hidroxilo a través de la reacción de Fenton<sup>14</sup> (ver imagen 11)(345).

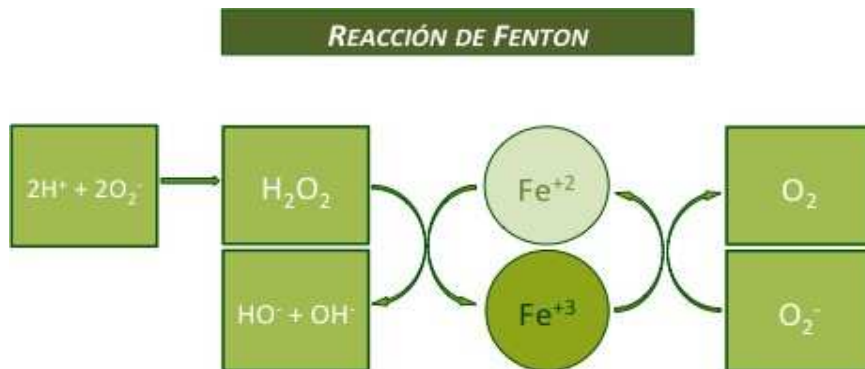


Imagen 11. Representación de la reacción de Fenton donde la oxidación del hierro conlleva la génesis de grupos hidroxilo (explicación en nota a pie de página)(367).

### 3.4.2. Mecanismos Defensivos Antioxidantes

El glutatión (GHS) es el antioxidante más abundante a nivel de SNC. Está compuesto por un tripéptido (cisteína/glicina/ $\gamma$ -glutamilo) y se distribuye de modo ubícuo a nivel intracelular siendo la concentración extracelular muy inferior lo que indica síntesis activa intracelular(350). El GHS puede encontrarse bajo dos formas en el organismo: reducido (GSHr) y oxidado (GSHo) siendo el ratio fisiológico GSHr:GSHo 100:1; alteraciones en dicho ratio son muy indicativas de desequilibrio de la homeostasis redox(350,364). Existen técnicas no invasivas como la espectroscopía mediante RM que demuestran el papel del GHS en la EM con reducción de sus concentraciones respecto a controles sanos en pacientes con EMSP en regiones frontales o en la sustancia gris(368).

<sup>14</sup> La reacción de Fenton (llamada así por su descubridor en 1894, H.J.H. Fenton) es un proceso de oxidación avanzada en el cual se producen radicales altamente reactivos del hidroxilo ( $OH^{\cdot}$ )(367). Esto se hace en condiciones de ambiente ácido y con presión y temperatura de ambiente, usando peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ) que está catalizado con metales de transición, generalmente hierro. Puede emplearse, en sentido inverso, para reducir el anión superóxido.

El GSH participa como antioxidante mediante mecanismos enzimáticos y no enzimáticos. Entre los segundos destaca la reducción del peróxido de hidrógeno a agua, posteriormente vuelve a ser reducido mediante la glutatión reductasa.

Existe un gran número de mecanismos enzimáticos que emplean en GHS en la detoxificación de radicales libres y otros agentes tóxicos. Dentro de estas las GHS-S transferasas (GST) constituyen una superfamilia englobadas en la respuesta de “fase 2” que cataliza la conjugación del GHS reducido con los grupos electrofílicos de carcinógenos, herbicidas/pesticidas y otros compuestos pro-oxidantes. Las GST se clasifican en función de su sustrato específico y distribución tisular en las isoformas GST tipo M (mu), tipo P (pi) y tipo T (tau)(350). Aunque no ha sido identificada su vinculación en los estudios GWAS sí se ha apreciado la regulación al alza de la isoforma GSTP1 en el interior de las lesiones activas(313). La relación entre diferentes polimorfismos de sus isoformas y el riesgo de desarrollo de EM posee resultados ambiguos con estudios que no encuentran relación entre diferentes polimorfismos (incluidos algunos que determinan la nula actividad enzimática) de las isoformas GSTP1, GSTT1 o GSTM1(369–371) con otros que indicarían cierta relación para las isoformas GSTT1, GSTM1, GSTM3 o GSTP1 con el riesgo de desarrollo de EM(372–374).

La NADPH-dehidrogenasa quinona 1 (NQO1) es una enzima que cataliza la reducción de quinonas endógenas o exógenas permitiendo la detoxificación de radicales libres(222). Es inducida mediante el factor de transcripción Nfr2 y está englobada en las proteínas de respuesta de “fase 2”. Su asociación con la EM se ha demostrado con su presencia en las placas desmielinizantes activas agudas y crónicas(375) aunque desde un punto de vista genético es ambigua y no ha sido propuesta en los diferentes GWAS. El polimorfismo SNP *rs1800566* es determinante de su actividad enzimática y aunque hay estudios que indicarían una vinculación entre dicho polimorfismo y el riesgo de desarrollo de EM en población griega(374,376), estudios recientes en nuestro país no confirman estos hallazgos(377).

#### 4. HEMO-OXIGENASA

El grupo hemo es una estrategia conservada evolutivamente que permite la incorporación de un átomo de hierro a la estructura terciaria de las proteínas mediante un grupo prostético(378). El estrés oxidativo puede incrementar transitoriamente el “pool” de hemo intracelular tras estimular cambios conformacionales o la degradación de hemoproteínas como citocromos, mioglobinas, peroxidasa o las enzimas de la cadena respiratoria y a su vez, este grupo hemo puede generar radicales libres(379,380). Se ha demostrado una presencia ubicua de mecanismos enzimáticos capaces de catabolizar el grupo hemo en la mayoría de organismos vivos lo que sugiere que esta reacción enzimática aparece precozmente durante la evolución siendo las enzimas responsables las hemo-oxigenasa(378).

##### 4.1. ISOFORMAS DE LA HEMO-OXIGENASA: HO-1 Y HO-2

Las hemo-oxigenasas (HO) son unas enzimas esenciales en el catabolismo de los grupos hemo y están presente en diversos tejidos mostrando su máxima actividad en cerebro, hígado, bazo y testículos. Se pueden encontrar tres isoenzimas principales: la hemo-oxigenasa tipo 1 (HO-1) inducible(381) y la hemo-oxigenasa tipo 2 (HO-2) constitutiva(382) son codificadas en los genes 22q13.1 (*HMOX1*) y 16p13.3 (*HMOX2*) respectivamente(349); la hemo-oxigenasa tipo 3 (HO-3) solo ha sido clonada hasta la fecha en ratones(383) y se ha determinado como una retrotransposición de *HMOX2*.

La vía de la HO es un importante mecanismo defensivo de las neuronas expuestas a estrés oxidativo. Mientras que la HO-3 es un catalizador de los grupos hemo de baja actividad, HO-1 y HO-2 catalizan la misma reacción: la degradación escalonada de los grupos hemo a hierro libre, concentraciones equimolares monóxido de carbono (CO) y el tetrapirrol lineal biliverdina. Esta reacción, con similar afinidad para ambas isoformas de HO, implica el uso de oxígeno molecular y transferencia de electrones desde NADPH.



#### **4.1.1. Diferencias y similitudes HO-1 y HO-2**

HO-1 y HO-2 solo comparten una homología del 43% de su secuencia aminoacídica(379) y están sujetas a mecanismos de regulación diferentes. Ambas enzimas poseen requerimientos de cofactores similares y a nivel estructural comparten un dominio de 24 aminoácidos denominado “firma HO” que les proporciona una alta capacidad para captar y catabolizar los grupos hemo(365). Sin embargo poseen diferente antigenicidad, peso molecular, movilidad electroforética, inducibilidad y sensibilidad a la degradación. Además su expresión tisular es diferente: HO-1 predomina a nivel de bazo, mientras que HO-2 predomina en SNC y testículos. También es diferente el patrón de expresión dentro de SNC de las diferentes isoformas; así HO-1 predomina tras estímulos como choque térmico o estrés oxidativo aunque en el cerebro normal sea difícil de detectar, salvo de modo puntual en hipocampo y cerebelo(384) mientras que HO-2 es más ubicua. Aunque sus diferencias principales radican en su capacidad de inducción.

#### **4.1.2. Hemo-oxigenasa tipo 2**

HO-2 se expresa de modo constitutivo, es regulada mediante modificación postranscripcional y activada mediante su fosforilación por la caseína quinasa-2 a nivel cerebral(385). Esta fosforilación conduce a una producción rápida y controlada de CO que puede desarrollar funciones neuroprotectoras (se desarrollarán en el siguiente capítulo). Se postula, además, que HO-2 pueda estar implicada en acciones neuro y vasomoduladoras(365) así como regulatorias de canales de potasio sensibles al calcio que controlan los niveles de oxígeno por parte de las células cromafines(386). A nivel estructural, conserva el dominio de unión a hemo aunque a diferencia de HO-1, HO-2 muestra un residuo de Cisteína en la posición 16(385). La distribución de la expresión de HO-2 a nivel cerebral guarda un considerable solapamiento con la de la guanilato-ciclasa soluble(379) y de hecho se supone que el CO desprendido de la degradación de hemo pueda modular la actividad neuronal a



través del estímulo de la propia guanilato-ciclasa(387). Los niveles de HO-2 no son modificados por el estrés oxidativo aunque existen promotores en *HMOX2* que responden a corticoides(388).

#### 4.1.3. Hemo-oxigenasa tipo 1

HO-1 posee una baja expresión basal y es una enzima de expresión inducible en prácticamente todos los tejidos sometidos a estrés oxidativo. De hecho, sería obvio pensar que su principal función sería contribuir a la degradación de hemo cuando se saturase HO-2(365). Parece que la expresión de HO-1 se incrementa con la edad como han demostrado algunas series necrópsicas(389).

Su principal mecanismo regulatorio sucede a nivel transcripcional ya que posee uno de los conjuntos de promotores más complejos identificados hasta la fecha con secuencias reguladoras para gran número de factores de transcripción como la proteína Sp1 captadora de Zinc, las proteínas Jun B y D, factor nuclear Kappa B (NF- $\kappa$ B), IL-10, IL-6 o el factor de hipoxia 1  $\alpha$  entre otros aunque su principal factor sea el factor nuclear tipo 2 similar al derivado de eritrocitos (Nfr2)(365,378,385,390). Esta complejidad transcripcional permite que *HMOX1* sea inducible con una amplia variedad de estímulos oxidativos o inflamatorios como presencia de grupos hemo, luz ultravioleta, metales pesados, especies reactivas de oxígeno (como H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) o de nitrógeno, proteína  $\beta$ -amiloide, dopamina, prostaglandinas, citoquinas Th1, productos de peroxidación lipídica, lipopolisacáridos, biliverdina y algunos factores de crecimiento (312,318,365,379,391–393).

Los polimorfismos en la longitud de repeticiones GT del promotor de *HMOX1* parecen determinar la expresión y función de HO-1(394); polimorfismos GT más extensos codifican un DNA relativamente inestable con menor capacidad transcripcional y menor actividad de HO-1. Polimorfismos con repeticiones menores, en cambio, se asocian a mayor actividad HO-1 y parecen ser protectores de aterosclerosis(395) aunque han sido relacionados con el comportamiento maligno de algunas neoplasias(396).

A nivel estructural HO-1 muestra un dominio C-terminal que permite la unión a la membrana del retículo endoplasmático y una región helicoidal que determina la orientación a sus productos con un “bolsillo hemo” donde el residuo que determina la unión es la Histidina-25(397,398). Aunque este bolsillo hemo es hidrofóbico (para favorecer la unión de hemo), HO-1 posee otros dominios hidrofílicos que permiten su unión a otras proteínas lo que puede indicar otras funciones no enzimáticas(397).

#### 4.1.4. Sistema ARE/Nfr2

*HMOX1* posee numerosos facilitadores en la región promotora 5' denominados de modo conjunto elementos de respuesta antioxidante (del inglés “*Antioxidant Response Element*” o ARE). Los genes promovidos por ARE, entre los que se incluye *HO1*, están fuertemente regulados por el factor de transcripción sensible a la reducción-oxidación (redox) Nfr2. En condiciones normales, Nfr2 se encuentra secuestrado en el citoplasma celular dirigido a la proteólisis mediante su unión a Keap-1, proteína de unión responsable de su ubiquitinización(222). Nfr2 es expresada de modo constitutivo en una gran variedad de tejidos. Numerosos estímulos, incluidos el estrés oxidativo, conllevan que se desacople Nfr2 de Keap-1 permitiendo su translocación al núcleo y expresión de genes de respuesta antioxidante. El conjunto de genes estimulados por ARE/Nfr2 constituyen la “respuesta de fase 2” y están implicados en la detoxificación y reacción antioxidante y además de *HMOX1* incluye a la glucoronil transferasa, glutatión-S-transferasa (GST) o la NADPH quinona oxidoreductasa (NQO1)(222,399). Actualmente Nfr2 es considerada el guardian de la homeostasis redox a nivel celular(365).

En el caso de la HO-1, una vez se desacopla Nfr2 de Keap-1 se trasloca al núcleo y junto con las proteínas Maf se une a los promotores del gen *HMOX1*(385).

#### 4.2. REACCION ENZIMÁTICA DE LA HEMO-OXIGENASA

Ambas isoformas de HO catalizan la degradación escalonada del grupo hemo produciendo hierro libre, biliverdina y monóxido de carbono (CO). El hierro es reducido a su estado férrico a través de la citocromo P450 reductasa liberándose CO tras la eliminación de un puente metileno del anillo de porfirina. Se requiere de aporte de energía para la formación de biliverdina que posteriormente se convierte a bilirrubina a través de la biliverdina-reductasa (BVR)(385). Mientras que la biliverdina y el CO poseen propiedades antiinflamatorias, el hierro libre es altamente prooxidante y puede generar radicales libres a través de la reacción de Fenton en la que cataliza radicales hidroxilos a partir de la reacción del hierro con el peróxido de hidrógeno (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>)(400). El hierro liberado de la reacción es secuestrado por la ferritina para intentar compensar su citotoxicidad almacenándolo en una forma soluble(367).

Los productos de degradación del grupo hemo, el monóxido de carbono, la biliverdina y el hierro libre, pueden generar por sí mismos consecuencias en el metabolismo celular y ser, bajo determinadas circunstancias, neurotóxicos o neuroprotectores. En conjunto, CO y biliverdina mantienen una acción antioxidante basal que se incrementa a mayor actividad de HO hasta que se alcanza el compromiso del sustrato, cuando presentan un efecto deletéreo. En cambio la acumulación de hierro libre es más tóxica, probablemente por su acción oxidativa a través de la reacción de Fenton, por lo que su toxicidad se incrementa conforme lo hace de actividad HO o la inducción de *HMOX1* (ver imagen 12)(365,379,391).

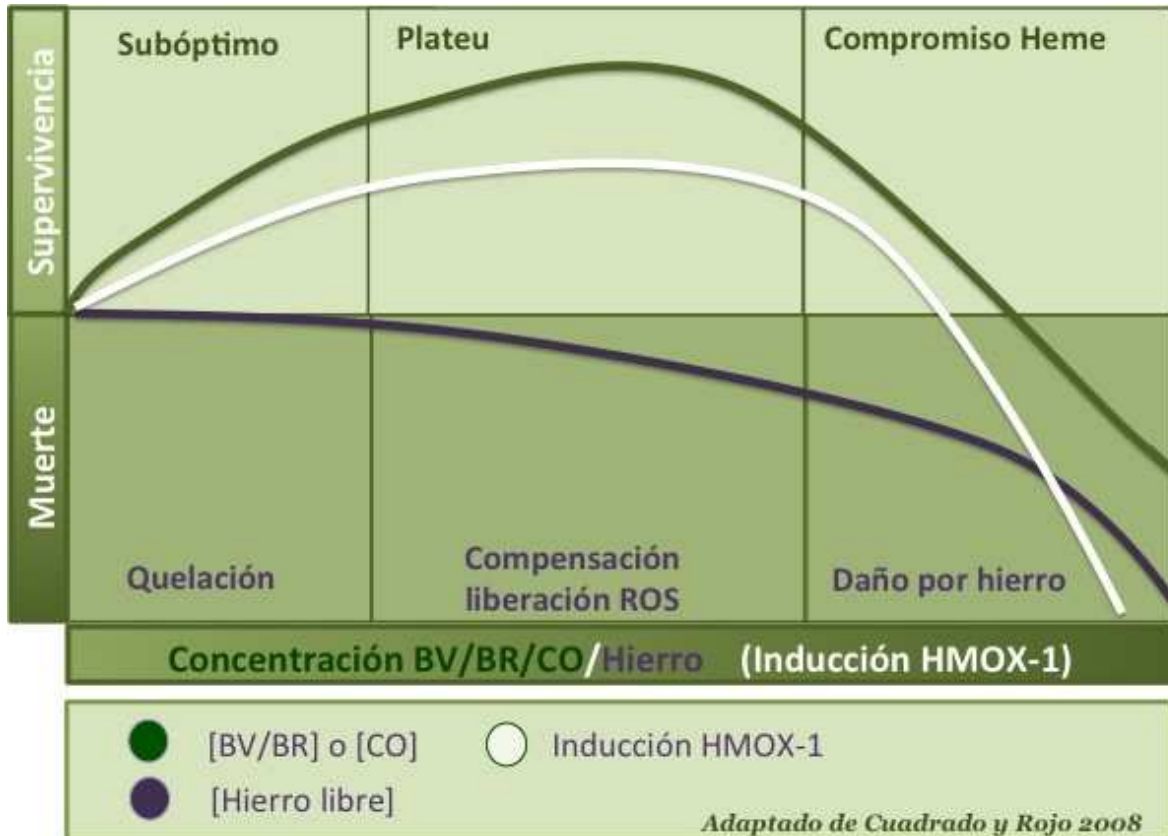


Imagen 12. Se muestra la relación de los diferentes subproductos de la reacción de la HO y el grado de inducción de HO-1 con la supervivencia o muerte celular en función de un progresivo incremento definido en tres situaciones: subóptimo, plateau y compromiso del sustrato hemo. Las concentraciones de biliverdina o bilirrubina y de CO se relacionan con la mayor supervivencia celular hasta la dosis tóxica. La inducción de HO-1 muestra una curva similar. Sin embargo la progresiva concentración de hierro libre se relaciona con la muerte celular por el secuencial fracaso de sus mecanismos compensatorios. Adaptado de Cuadrado y Rojo(365).

#### 4.2.1. Grupo Hemo

El grupo hemo es una molécula prooxidante que puede participar en la génesis de radicales libres. Está constituido por un anillo tetrapirrólico con un átomo de hierro unido en su centro y puede ser encontrado en múltiples especies ya que es el grupo prostético de numerosas proteínas fundamentales para la vida como la hemoglobina(401). La capacidad del hierro quelado para cambiar, de modo reversible, a un estado de oxidación diferente confiere al grupo hemo la capacidad de catalizar reacciones oxidativas mediante la transferencia de electrones aportando oxígeno molecular a las células(380). Esta capacidad tóxica del grupo hemo puede ser apreciada en enfermedades en las que se liberan grandes cantidades de hemoproteínas fuera de su ambiente fisiológico como cualquier enfermedad hemolítica o los fenómenos de isquemia-reperfusión(402).

El grupo hemo puede desarrollar citotoxicidad mediante varios mecanismos:

- Generación directa de ROS mediante el átomo presente en su estructura a través de la reacción de Fenton(401).
- Traslocación a membranas, ya que el anillo de porfirina es altamente hidrofóbico, provocando su desestabilización por aumento de la permeabilidad y fragilidad(403).
- Activación de señales que inducen la génesis de ROS mediante vías enzimáticas como la NADPH oxidasa a nivel de membrana u otras vías a nivel mitocondrial(404).
- Conversión de los hidroxiperóxidos orgánicos en radicales libres favoreciendo la peroxidación de los lípidos de membrana(380,401).

Junto con estas acciones citotóxicas, el grupo hemo ejerce como una molécula proinflamatoria a través de su unión al receptor “*Toll-like*” tipo 4 generando e induciendo la producción de leucotrieno-4 por parte de los macrófagos(405,406). La presencia de hemo en el ambiente extracelular induce un aumento de la expresión de moléculas de adhesión a nivel endotelial como ICAM-1, VCAM-1 y selectinas aumentando la permeabilidad vascular y favoreciendo la migración de neutrófilos y otros agentes inmunes(404). Además, hemo puede actuar como agente quimiotáctico bien de modo directo o tras la génesis de ROS(407).

La activación del receptor “*Toll-like*” tipo 4 (TLR4) activa la vía de señalización intracelular MyD88(406) que conduce a la activación de determinadas quinasas y NF- $\kappa$ B que son factores transcritores que inducen la expresión de citoquinas inflamatorias como el propio TNF $\alpha$  o la IL-6 lo que refuerzan la atracción de efectores inmunes.

No obstante aún no se conocen todos los mecanismos por los que hemo genera citotoxicidad y reclutamiento inmune. En el caso de la microglía, la presencia de hemo tiene una reacción dual ya que induce la producción de TNF $\alpha$  e IL-6 a través de la vía del receptor “*Toll-like*” tipo 4(TLR4) (406,408) aunque también potencia de apoptosis mediante la activación de las rutas intracelulares señalizadas por la quinasa Jun N-terminal(409,410).

#### **4.2.2. Monóxido de Carbono**

Más del 86% del CO generado en el organismo procede de la degradación del grupo hemo(411). Los mecanismos moleculares de la acción del CO no son plenamente conocidos. Se sabe que activa la guanilato-ciclasa(387,412) incrementando los niveles de GMP cíclico y que se une a los núcleos de hierro de los grupos hemo formando complejos con las metaloproteínas (hemoglobina, mioglobina, sintasa de óxido nítrico inducible (iNOS) o la oxidasa de NADPH) alterando su actividad y evitando su oxidación(402). Otras acciones antiinflamatorias del CO se postulan ligadas a la inhibición de citoquinas inflamatorias como IL-10, IL-2 por parte de macrófagos y linfocitos activados(411,413). La microglía activada (por estímulos como lipopolisacáridos) sometida al estímulo de CO libera moléculas antiinflamatorias lo que conduce a minimizar el daño oxidativo(414). Uno de los mecanismos potencialmente implicados es la inhibición del receptor TLR4 potenciando la interacción de este con la caveolina(415). La capacidad neuroprotectora o neurotóxica del CO depende de su concentración: dosis tóxicas pueden generar edema citotóxico o desmielinización; dosis inferiores incluyendo los niveles fisiológicos han demostrado efectos anti-apoptóticos, anti-inflamatorios o vasodilatadores(365,414) bloqueando la liberación de TNF $\alpha$  y la acumulación de ROS inducidos por glutamato(347).

Cada día existen más evidencias del papel señalizador del CO como la activación neuronas noradrenérgicas a nivel de locus coeruleus(416) o su implicación en los procesos de potenciación a largo plazo de aprendizaje(417).

#### **4.2.3. Biliverdina**

La biliverdina es convertida en bilirrubina a través de la BVR, reacción que implica el uso de NADPH como donante de electrones(400). Ambas moléculas son antioxidantes importantes capaces de evitar la peroxidación de lípidos de un modo eficiente aunque datos indirectos confieren mayor poder antioxidante a la bilirrubina, cuya única forma de síntesis en el organismo es a través de la BVR(400,418). La bilirrubina actúa como captor del exceso de NO previniendo la formación de

peroxinitrito y puede ser reducida de nuevo a biliverdina conllevando la reducción de  $H_2O_2$  a agua y oxígeno molecular(365).

Además de modular la expresión de diferentes quinasas, pueden promover una respuesta inmune antiinflamatoria al menos in vitro a través de la sobreexpresión de IL-10 por parte de los macrófagos incubados a concentraciones elevadas de biliverdina(418). Ese incremento de IL-10 se cree que se produce por la presencia de BVR en la membrana de los macrófagos/microglía activando la señalización de proteín-quinasa tipo B (o Akt) a través de la fosforilización del extremo terminal de la BVR y su translocación al núcleo(418). Además la presencia de BVR induce la fosforilación de la sintasa de NO (NOS) endotelial y neuronal promoviendo la síntesis de NO y la nitrolización de la BVR que se transloca al núcleo donde induce la represión de la expresión del promotor del gen del receptor TLR4, la regulación de vías mitogénicas o la inducción de *HMOX1*(419). Son varias las quinasas que realizan la fosforilación de NOS como las quinasas MAPK y MEK o Akt conllevando la activación o inhibición de diferentes vías metabólicas(385). Estos nuevos datos confieren a la BVR un papel pleitrópico como un agente antioxidante al igual que la biliverdina y bilirrubina(418–420).

Sin embargo dado que la bilirrubina es altamente hidrofóbica, altas concentraciones a nivel de SNC puede interferir con los lípidos de membrana y ser neurotóxica(421).

En concentraciones moderadas, la bilirrubina es junto al glutatión, el antioxidante no enzimático más importante a nivel de SNC(365).

#### 4.2.4. Hierro libre

El hierro es una molécula altamente reactiva por lo que más del 80% del hierro biodisponible en el organismo se almacena unido al anillo de porfirina formando el complejo hierro-protoporfirina-hemo para prevenir su citotoxicidad(395). Sin embargo esta solución no es definitiva y el hierro puede liberarse tras la degradación de dichas proteínas por lo que la ferritina constituye el mayor depósito de hierro no ligado a grupos hemo.

A nivel de SNC el hierro es un elemento fundamental para gran número de funciones como la mielinogénesis o la síntesis de algunos neurotransmisores(345,422). En condiciones normales se produce un incremento paulatino de su concentración hasta los 50 años aunque en numerosas enfermedades neurodegenerativas como la enfermedad de Alzheimer o la enfermedad de Parkinson se aprecia un incremento de su concentración respecto a sujetos normales pareados por edad. Este incremento también se aprecia en la esclerosis múltiple donde el hierro tiende a acumularse a nivel macroscópico en ganglios basales y corteza frontal y a nivel microscópico en los oligodendrocitos, macrófagos y microglía activada(422). Los niveles de hierro depositado en SNC se correlacionan con los marcadores de la progresión de la discapacidad y de hecho son más pronunciados en formas EMSP que EMRR(345). Además la presencia de hierro en altas concentraciones favorece una respuesta NF- $\kappa$ B en la microglía con mayor secreción de citoquinas proinflamatorias lo que añade un papel proinflamatorio en la enfermedad(344,345,423).

### **4.3. FUNCIONES NO ENZIMÁTICAS DE LA HEMO-OXIGENASA**

Tanto HO-1 como HO-2 ejercen funciones no vinculadas a su actividad enzimática(385). Además se conoce que ambas isoformas pueden unirse a nivel de sus residuos hidrofílicos sin que se traduzca en un incremento de su función enzimática por lo que la función de esta unión es desconocida(424).

#### **4.3.1. Funciones no enzimáticas de HO-2**

Se conoce poco a cerca de los roles no enzimáticos de HO-2 salvo que puede funcionar como sensor de oxígeno para canales de potasio sensibles al calcio en diferentes tipos celulares aunque está más estudiado a nivel de las células cromafines(386). No obstante mediante técnicas de fluorescencia se aprecia como además de su habitual localización citoplásmica, fragmentos carentes del extremo C-terminal pueden traslocarse al núcleo, aunque su función es desconocida hasta la fecha sin que este paso sea mediado por hipoxia a diferencia de HO-1(425).



#### 4.3.2. Funciones no enzimáticas de HO-1

HO-1 es capaz de mantener su acción citoprotectora frente al estrés oxidativo en formas enzimáticamente inactivas(426), si carece de acceso suficiente e incluso si se imposibilita a su sustrato hemo, como puede suceder en determinados tejidos en el organismo o reproducirse experimentalmente(385,395). Estas observaciones establecen que HO-1 posee acciones no vinculadas a su capacidad enzimática primaria y probablemente mediadas por su capacidad de unión a otras proteínas. La presencia de HO-1 a nivel nuclear donde no puede desarrollar su acción primaria antioxidante (al carecer de sustancias donantes de electrones, función habitualmente realizada por el citocromo P450) o a nivel mitocondrial indican que desarrolla otra función aun no conocida con profundidad y probablemente relacionada con la transcripción de genes antioxidantes(385).

A nivel nuclear, HO-1 puede unirse a proteínas como la polimerasa poli-ADP-ribosa tipo 1 (PARP1), la isoforma nativa de la proteína 14-3-3 y la DNA- helicasa tipo II(427). Estas proteínas participan en la reparación de las cadenas de DNA y en el mantenimiento de la longitud de los teloméros(385), que pueden resultar dañados en el contexto del estrés oxidativo. Además puede unirse a factores de transcripción de DNA como Nfr2, NF-κB o STAT-3 permitiendo la unión con el DNA del primero (y transcripción de genes antioxidantes ARE)(224) y regulando a la baja a los otros(428,429). Este paso a nivel nuclear se favorece en condiciones de hipoxia o estrés oxidativo donde puede existir una regulación proteolítica que elimine los anclajes citoplásmicos(425) y en la que la translocación nuclear de HO-1 autorregula al alza la transcripción de su propio gen(429). La localización nuclear de HO-1 puede tener significación fisiológica a nivel tumoral y se ha relacionado con la diseminación metastásica y progresión de varios tipos de cáncer incluyendo de estirpe glial(430,431). Este comportamiento prooncológico podría estar influenciado por la longitud de las repeticiones GT del promotor *HMOX1*(396).

También se ha evidenciado la presencia de HO-1 a nivel de mitocondria y caveola sin que se haya elucidado su función a este nivel(432). Probablemente el CO liberado pueda inhibir al TLR4 y a la NADPH oxidasa modulando así la respuesta proinflamatoria de células como la microglía(365).

HO-1 también es importante en la minimización de la excitotoxicidad por GLUT. Estudios *in vitro* con neuronas granulares cerebelosas o de neuroblastoma que sobreexpresan *HO1* demuestran su protección frente a la excitotoxicidad por GLUT, a la apoptosis inducida por H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> o frente a proteína β-amiloide(365,433). De hecho se ha demostrado que la vía HO-1/Nfr2 es crítica para la protección de la excitotoxicidad por GLUT en las neuronas corticales(399).

Finalmente la sobreexpresión de HO-1 se ha relacionado con el incremento de la expresión de factores neurotróficos derivados de cerebro y derivados de células de la glía(379).

#### **4.4. PAPEL DE LA VIA HEMO-OXIGENASA EN LAS ENFERMEDADES NEUROLÓGICAS**

La función de HO-1/HO-2 en las enfermedades neurológicas es cada día más conocida implicándose un potencial papel de HO en un rango muy amplio de patologías con diferentes mecanismos de acción. Así, se conoce que el grado de inducción de HO-1 en la hemorragia cerebral podría correlacionarse con la extensión de la lesión y el pronóstico residual(391,434). Sin embargo una excesiva activación de la vía HO podría conllevar a consecuencias deletéreas, siendo las enfermedades neurodegenerativas donde más evidencia existe del rol de las diferentes isoformas de HO. El estrés oxidativo, la alteración de los patrones de la movilización del hierro libre y la insuficiencia mitocondrial se han reconocido consistentemente como datos característicos tanto de la senescencia como de la neurodegeneración y en dichos hallazgos el papel de la vía HO es fundamental(379).

##### **4.4.1. HO y Enfermedades Neurodegenerativas**

El cuerpo de evidencia de la implicación del estrés oxidativo en las enfermedades neurodegenerativas es robusto. Así por ejemplo el incremento de los marcadores de peroxidación de lípidos, nitración u oxidación de proteínas se ha documentado en la corteza hipocampal en pacientes con enfermedad de Alzheimer

(EA), la sustancia negra de pacientes de enfermedad de Parkinson idiopática (EPI) o el LCR de pacientes con esclerosis lateral amiotrófica (ELA)(435-439). Dado que la expresión basal de HO-1 es casi indetectable a nivel de SNC su notorio incremento en la EA, EPI, ALS o EM indican que en estas condiciones el SNC sufre daño oxidativo y que dicha expresión de HO-1 representa un intento de conservar la homeostasis redox(365,414). Lo que no es deducible es si este intento conlleva de modo satisfactorio la neuroprotección. De hecho, la acumulación progresiva de hierro vinculada a las enfermedades neurodegenerativas podría sugerir que el papel mantenido de HO-1 en dichas patologías es más deletéreo que neuroprotector y justificaría parcialmente dicha acumulación de hierro a nivel mitocondrial con el consecuente colapso energético(365,392).

En la enfermedad de Alzheimer (EA) existe una inducción de *HMOX1* y un incremento de la fosforilación de residuos de serina de HO-1 que se comporta de modo dosis-dependiente sugiriendo el papel del estrés oxidativo y fomentando su propia expresión y modificaciones postranscripcionales(435). Se ha demostrado la colocalización de HO-1 en neuronas, astrocitos con positividad a proteína glio-fibrilar ácida (GFAP), ovillos neurofibrilares, placas seniles e incluso células endoteliales(379,440). La presencia de astrocitos GFAP positivos a nivel hipocampal que mostraban inmunorreactividad frente a HO-1 varió del 86% en pacientes con EA frente al 6-7% en controles sanos pareados por edad(439). La inducción de *HMOX1* parece ser un fenómeno relativamente precoz en la patogénesis de la EA(439).

En la enfermedad de Parkinson se ha demostrado una moderada inmunorreactividad frente a HO-1 en las neuronas dopaminérgicas de sustancia negra tanto en sujetos afectados como en sanos, sin embargo en los casos de EPI los cuerpos de Lewy intraneuronales muestran una reactividad muy prominente(436). Del mismo modo, la proporción de astrocitos GFAP positivos inmunorreactivos frente a HO-1 en la sustancia negra varió del 77,1% de pacientes con EPI frente 18,7% de controles pareados por edad(436). El hierro acumulado a nivel de las mitocondrias astrogliales a consecuencia de la actividad de HO es especialmente deletéreo en la EPI ya que se puede comportar como una pseudo-peroxidasa fomentando la oxidación de compuestos ricos en catecolaminas (como la dopamina) o potenciar la acción de neurotóxicos como la protoxina MPTP(441).

#### 4.4.2. HO y Esclerosis Múltiple

La considerable inducibilidad de *HMOX1* y la bioactividad pleiotrópica de los metabolitos resultantes de la degradación de hemo junto con una creciente evidencia científica sugieren un papel de HO-1, y en menor lugar HO-2, en la EM(391).

En las placas activas, donde se evidencia un daño oxidativo importante sobre lípidos, proteínas o nucleótidos, se observa una regulación al alza de los genes de respuesta antioxidante como *HMOX1* o el gen *NQO1*(312,318,375) dentro de la respuesta Nfr2/ARE(442).

En un muestreo histopatológico el porcentaje de astrocitos GFAP positivos que expresaban HO-1 a nivel medular fue significativamente superior en pacientes de EM que en controles pareados (57,3% frente al 15,4%)(403). En las lesiones tempranas de EM se ha demostrado sobreexpresión de HO-1 en OG mediada por los numerosos estímulos inflamatorios (IL-1, TNF $\alpha$ ,...) aunque tanto in vitro como in vivo si esta sobreexpresión se mantiene en el tiempo puede contribuir más a la muerte del OG que a su supervivencia porque podría inducir al depósito de hierro a nivel mitocondrial(403,443). Existe alguna evidencia que INF $\beta$ 1 podría atenuar esta inducción de HO-1 y dificultar así la mitocondriopatía por depósito(403).

Sin embargo donde más evidencias existen del papel de HO en la EM es en la modulación de la MG activada. Una vez que la MG pasa a su estado activado (MGA) se produce una liberación de ROS por la activación de la NADPH oxidasa junto con otros mediadores inflamatorios como las MPP y citoquinas proinflamatorias(342). Las ROS liberadas a su vez actúan como segundo mensajero activando quinasas y la vía NF- $\kappa$ B favoreciendo la peroxidación de lípidos de membrana lo que conlleva el daño celular. Si esta activación no es controlada adecuadamente puede conducir a un círculo vicioso de neuroinflamación y daño neuronal. Numerosas evidencias implican a HO-1, y en menor lugar a HO-2, en la modulación de los macrófagos y de la microglía(361,365,402,414,415,419):

- El CO liberado inhibe la NADPH oxigenasa impidiendo la liberación de más ROS.
- Inhibe directamente la vía TLR4 mediante la interacción de éste con la caveolina mediada por CO.

- Inhibe indirectamente la vía TLR4 por regulación de su promotor genético mediado por la forma nitrolada de BVR (nitrolización facilitada por la biliverdina/bilirrubina).
- Los ratones *knock-out* con deficiencia *HMOX1* completa desarrollan una respuesta exacerbada a agentes inflamatorios como lipopolisacáridos.

Este exceso de ROS conllevaría el desacople KEAP-1/Nfr2 potenciando la respuesta de clase II que incluye la inducción de *HMOX1*. De este modo, el eje Nfr2-HO1 incidiría en el círculo negativo de activación de la MG intentando devolverla a la situación de reposo (ver imagen 13). La variabilidad genética en las enzimas antioxidantes clave (HO-1, HO-2, NQO1,...), alteraciones ambientales o simplemente el declinar de la homeostasis redox que ocurre en el envejecimiento conllevarían a una dificultad para la regulación de la MG activada con sus consecuencias deletéreas. Paralelamente se abre la posibilidad de incidir farmacológicamente sobre el eje Nfr2/HO-1 que puede reforzar el control de la MG activada(224,361,444).

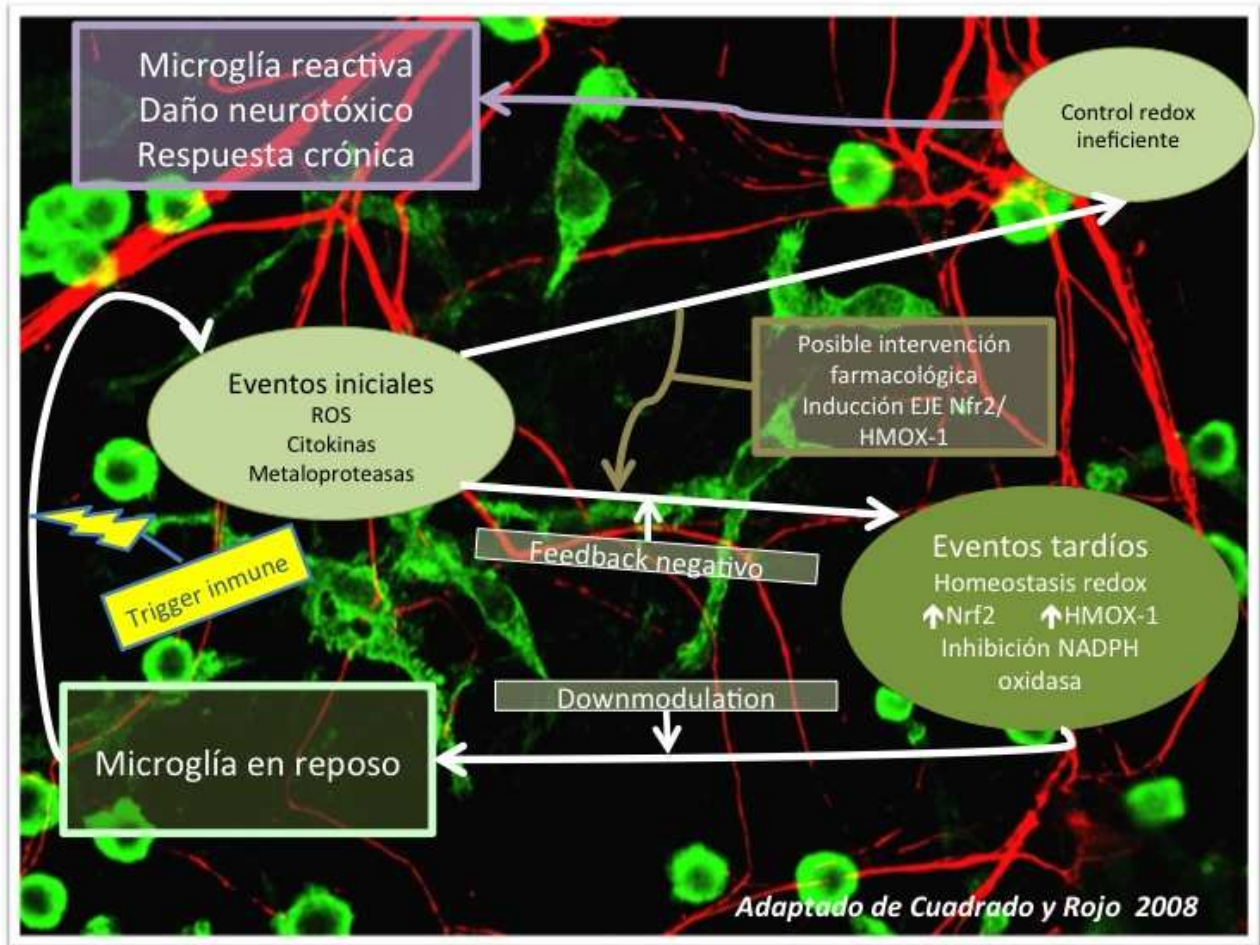


Imagen 13. Representación del modelo propuesto de la modulación de la microglía por el eje Nrf2/HO (explicación en el texto). La imagen de fondo corresponde a una inmunofluorescencia que muestra terminaciones axónicas (rojo) sobre las células de la microglía (verdes) tanto en reposo (morfología abalorada) como activada (hipertrofia somática y extensión procesos). Adaptado de Cuadrado y Rojo(342,365).

#### 4.4.3. Papel patogénico de los Polimorfismos de HMOX1/HMOX2

Existe una amplia evidencia que apoya el papel de las variaciones genéticas de *HMOX1*, y en menor medida *HMOX2*, en el riesgo o evolución de un gran número de condiciones patológicas. En el caso de *HMOX1* estas variaciones pueden encontrarse a nivel del promotor como polimorfismos de las repeticiones de dinucleótidos GT o a otro nivel del gen, incluido el promotor, como SNPs.

Los polimorfismos de la longitud de repeticiones GT ( $GT_n$ ) en el promotor de *HMOX1* se asocian con una mayor o menor expresión del gen y actividad enzimática de HO-1. Se ha constatado como alelos cortos (<25 repeticiones) o modelos experimentales que conlleven una mayor expresión y consecuentemente mayor



actividad enzimática se asocian a una menor expresión de IL-6 en diferentes modelos inflamatorios sin que se conozca con certeza el mecanismo subyacente(394,445,446).

El patrón de repeticiones GT posee una distribución trimodal con 23, 30 y 37 repeticiones (denominadas n23, n30 y n37) siendo el alelo más representado en población hispánica el n30(447,448).

Estos polimorfismos se han relacionado con numerosas enfermedades vasculares (hipertensión, malformaciones vasculares y aneurismas, reoclusiones arteriales tras procedimientos intraluminales,...), pulmonares (enfisema) o sistémicas (síndrome metabólico, insulino-resistencia en la diabetes mellitus tipo 2)(394–396,446,449). El papel de dicho polimorfismo en los tumores ha sido recientemente revisado en un metaanálisis con más de 2300 casos sin que se haya observado una clara relación salvo mayores repeticiones con el carcinoma de células escamosas(450) pese a las descripciones iniciales que apuntaban a una mayor relación(396).

El papel de los polimorfismos de las repeticiones GT ( $GT_n$ ) en el promotor de *HMOX1* en modelos de enfermedad inflamatoria o autoinmune no es concluyente:

- Estudios animales con modelos frente al virus de la gripe demuestran que animales con menor (o nula) expresión de HO-1 poseían menor supervivencia frente a la infección y menores títulos de anticuerpos tras la inmunización(451).
- En la artritis reumatoide alelos con repeticiones menores a 25 se asocian a un mejor pronóstico clínico y radiológico de la enfermedad(447,452).
- La longitud no parece relacionarse con el riesgo de desarrollo ni con la severidad de la enfermedad inflamatoria intestinal(453) ni con el de la psoriasis aunque pudiera guardar cierta relación con la edad de debut de ésta(454).

Con respecto a su papel en enfermedades neurológicas polimorfismos con mayor número de repeticiones se ha asociado al riesgo de desarrollo de enfermedad de Parkinson y a una edad más precoz(455). En el caso de la EM solo existe un estudio que haya estudiado la relación de dicho polimorfismo con la evolución de la enfermedad sin que se observaran diferencias en el riesgo de desarrollo o su evolución(456).

Se conoce que la variación de repeticiones GT se encuentra en un potente desequilibrio de ligamiento con el SNP *rs2071746* ubicado también en la región promotora 5' de *HMOX1*(457) y que probablemente sea más responsable que  $GT_n$  del grado de transcripción del gen medido al menos por la cantidad de RNA mensajero(458). El SNP *rs2071746* condiciona un cambio T/A a nivel de la posición 413 del gen *HMOX1*, se encuentra en su región no codificante y los genotipos que portan un alelo A presentan un mayor grado de expresión del gen(446). Aquellos pacientes que portan el alelo A muestran mejor evolución a nivel cardiovascular en al menos dos estudios en aterosclerosis(459,460). El alelo A también ha sido asociado a un mayor riesgo de desarrollo de enfermedad de Parkinson(455). En cambio portadores del alelo T en homocigosis, y combinado a polimorfismos del gen de la proteína tau, poseen mayor riesgo de desarrollo de enfermedad de Alzheimer(461). Recientemente se ha demostrado la asociación del alelo T al riesgo de desarrollo de temblor esencial y síndrome de piernas inquietas(462,463). Sin embargo el SNP *rs2071746* no ha mostrado asociación con otras enfermedades autoinmunes como la enfermedad inflamatoria intestinal(464).

El mecanismo íntimo que subyace a que los polimorfismos de la región promotora de *HMOX1* como  $GT_n$  o *rs2071746* condicionen variaciones en la expresión del gen o la actividad de la enzima se desconoce hasta la fecha. En el caso de  $GT_n$  se ha postulado que dicha longitud pueda condicionar un cambio conformacional en la estructura del DNA (pasando a una conformación Z-DNA) incidiendo sobre su actividad transcripcional(455,465). Con respecto al SNP *rs2071746*, estudios mediante la luciferasa han demostrado que la presencia de un alelo A confiere mayor expresión del gen(466). No obstante estudios más recientes apuntan a que pudiera corresponder a un desequilibrio de ligamiento con una variante genética desconocida a día de hoy(447) o modificaciones del contenido del transcripto por variaciones del punto de inicio de la transcripción o *splicing* alternativo(448).

El SNP *rs2071747* supone una sustitución G/C en la posición 19 del exón 1 del gen *HMOX1*, condicionando un cambio no sinónimo de la proteína por la permutación entre residuos de ácido aspártico e histidina. La presencia de un alelo C condiciona un mayor riesgo de desarrollo y peor evolución de degeneración macular



asociada a la edad (DMAE)(467) sin que se conozca con certeza el mecanismo de dicha asociación.

En el caso de *HMOX2* se han encontrado menos asociaciones. El SNP *rs2270363* del gen *HMOX2* ha sido relacionado con la enfermedad de Parkinson(468) y con el riesgo de desarrollo y peor evolución de DMAE(467) mientras que el SNP *rs1051308* se ha asociado con un mayor riesgo de desarrollo de temblor esencial(462) siendo otras asociaciones negativas(462,463,468,469).

Se han estudiado otros SNPs de los genes *HMOX1* y *HMOX2*. Por ejemplo los SNP *rs743811* y *rs5755720* de *HMOX1* y *rs2160567* y *rs11866840* de *HMOX2* se han relacionado con una menor producción de títulos de anticuerpos tras la inmunización frente a la gripe y viruela en voluntarios sanos(451) lo que indica su papel dentro del sistema inmune.

Sin embargo hasta la fecha, y salvo el estudio de Zbornikova(456), no se ha estudiado el papel de los polimorfismos de los genes *HMOX1* y *HMOX2* en la esclerosis múltiple



<h1>HIPOTESIS</h1>	

## 1. HIPÓTESIS DE TRABAJO

La EM es una enfermedad inflamatoria desmielinizante del SNC en la que coexiste un fenómeno neurodegenerativo ligado inicialmente al inflamatorio y que a la postre condiciona la discapacidad de los pacientes(2,293).

Los mecanismos comunes a ambos fenómenos no son plenamente conocidos y, desde hace años, emerge la figura del estrés oxidativo como un nexo convergente en ambos fenómenos(316). Los mecanismos antioxidantes celulares, enzimáticos y no enzimáticos, constituyen un punto de estudio de interés ya que la demostración de su participación puede ayudar a comprender aspectos fisiopatogénicos de la enfermedad y, en último extremo, permitir el diseño de nuevas dianas terapéuticas(353). Sin embargo y aunque en los diferentes estudios GWAS(296,300–308) no se ha destacado ninguna señal procedente de genes antioxidantes, existen estudios que han demostrado la implicación de estas vías tanto en la EM(372,374) como en otras enfermedades con mecanismos neurodegenerativos(461).

Las enzimas hemo-oxigenasas 1 y 2 son esenciales en la defensa de la célula frente a la toxicidad del grupo hemo libre(365,379,394). Ambas han sido implicadas fisiopatológicamente en la EM aunque la demostración desde un punto de vista genético es hasta la fecha negativa(456).

Teniendo en cuenta estos datos analizaremos si polimorfismos comunes de los genes *HMOX1* (*rs2271746* y *rs2271747*) y *HMOX2* (*rs2270363* y *rs1051308*) participan de la susceptibilidad genética de la esclerosis múltiple.

<h1>OBJETIVOS</h1>	

## **1. OBJETIVO PRIMARIO**

Determinar si los SNPs *rs2271746* y *rs2271747* del gen *HMOX1* y *rs2270363* y *rs1051308* del gen *HMOX2* condicionan una modificación del riesgo de desarrollo de EM en una muestra caucasiana española.

## **2. OBJETIVOS SECUNDARIOS**

- 1.** Determinar la relación entre la EM y las variables demográficas analizadas individual y conjuntamente en cada caso (sexo, edad de debut, edad a la inclusión en el estudio y forma clínica de EM).
- 2.** Determinar si los SNPs *rs2271746* y *rs2271747* del gen *HMOX1* y *rs2270363* y *rs1051308* del gen *HMOX2* influyen en el riesgo de desarrollo de EM en función del sexo.
- 3.** Determinar si los SNPs *rs2271746* y *rs2271747* del gen *HMOX1* y *rs2270363* y *rs1051308* del gen *HMOX2* se asocian al riesgo de desarrollo de las diferentes formas evolutivas de la EM.
- 4.** Determinar si los SNPs *rs2271746* y *rs2271747* del gen *HMOX1* y *rs2270363* y *rs1051308* del gen *HMOX2* influyen en la edad de debut de la EM

<p><b>PACIENTES MATERIAL Y MÉTODOS</b></p>	

## 1. PACIENTES Y CONTROLES

Se trata de un estudio analítico observacional con un ratio de pacientes y controles de 1: 1.82.

Se han incluido un total de 292 pacientes de origen caucásico que satisfacen diagnóstico de Esclerosis Múltiple acorde a los criterios diagnósticos de McDonald de 2001 y 2005(23,24) reclutados de modo consecutivo con varias posibles procedencias: “Asociación de Esclerosis Múltiple” de la Comunidad de Madrid (n=166), Consulta Monográfica de Esclerosis Múltiple del Complejo Hospitalario “Mancha Centro” (Alcázar de San Juan y Tomelloso, Ciudad Real, n=65), Consulta Monográfica del Hospital Universitario “12 de Octubre” (Madrid, n=31) y Consulta Monográfica de Hospital “Príncipe de Asturias” (Alcalá de Henares, Madrid, n=30). La mayoría de los pacientes ya habían participado en otros estudios de asociación genética(369,377,470–475).

En el supuesto de que existieran varios miembros familiares afectados solo se permitió incluir un caso por familia para excluir relaciones de parentesco que pudieran sesgar el análisis.

Se seleccionaron 533 controles de origen caucásico, sanos, no relacionados entre sí y pareados por sexo y edad con el grupo de casos. Dichos controles procedían de la Clínica Universitaria de Navarra (n=275) y del Hospital Universitario “Infanta Cristina” (Badajoz, n=258) siendo principalmente los acompañantes de los pacientes y otros sujetos como estudiantes y profesores universitarios.

La extracción del ácido desoxirribonucleico (DNA) de las muestras de sangre se ha realizado en el Departamento de Farmacología de la Universidad de Extremadura, y los análisis genéticos de los SNPs *rs2071746*, *rs2071747*, *rs2270363* y *rs1051308* de los genes *HMOX1* y *HMOX2* en el Departamento de Farmacología de la Universidad de Extremadura, Cáceres.

Los pacientes fueron incluidos en el estudio entre los meses de Enero de 2006 y Julio de 2009.



### **1.1. ASPECTOS ETICOS**

El estudio ha sido realizado según los principios de la Declaración Helsinki de 1975 y aprobados por el Comité Ético y de Investigación del Hospital Universitario “Príncipe de Asturias” (Alcalá de Henares, Madrid), el del Hospital Universitario “Infanta Cristina” (Badajoz) así como el de la Clínica Universitaria de Navarra (Pamplona) (Anexo III).

Todos los pacientes reclutados fueron informados por el facultativo médico y otorgaron su consentimiento por escrito. La mayoría de los pacientes ya habían participado en estudios previos de genes de riesgo asociados a EM(369,377,470–475).

### **1.2. CASOS**

#### Criterios de inclusión

- Pacientes de origen caucásico diagnosticados de EM de acuerdo a los criterios diagnósticos de McDonald y cols.(23,24), independientemente de los años de evolución de la enfermedad, el tipo de EM, la actividad de la misma y el tratamiento actual o previo utilizado para el control de la enfermedad.
- Pacientes de ambos sexos y sin límite de edad.
- Firma de consentimiento informado aprobado por el Comité Ético del Hospital Universitario Príncipe de Asturias de Alcalá de Henares (Anexo I).

#### Criterios de exclusión

- Sólo se incluyó un miembro afecto de EM por familia.
- Padecimiento, además, de otra enfermedad neurológica.
- Menores de 18 años

### **1.3. CONTROLES**

#### Criterios de inclusión

- Sujetos sanos de origen caucásico no diagnosticados de EM(23,24) mayores de edad.
- Sujetos de ambos sexos y sin límite superior de edad.
- Firma de consentimiento informado aprobado por el Comité Ético del Hospital Universitario Príncipe de Asturias de Alcalá de Henares (Anexo I y Anexo II).

#### Criterios de exclusión

- Tener un familiar diagnosticado de EM(23,24).
- Menor de 18 años
- Alteración mental que impida la correcta comprensión del consentimiento
- Sospecha de otra patología desmielinizante o autoinmune subyacente.

## **2. RECOGIDA DE VARIABLES**

La información se obtuvo, mediante entrevista personal, de acuerdo con un protocolo de recogida de datos que incluía los siguientes parámetros:

### **1. Características demográficas:**

- Fecha de nacimiento.
- Sexo: varón o mujer.
- Edad en el momento de inclusión en el estudio.

### **2. Formas clínicas de EM(71):**

- **EMRR**, definida por la presencia de brotes de la enfermedad con recuperación completa o parcial, sin existir progresión de la discapacidad entre brotes.
- **EMSP**, caracterizada por tener un curso inicial remitente-recurrente seguido de progresión de la discapacidad con o sin brotes superimpuestos.
- **EMPP**, definida por la progresión de la discapacidad desde el inicio, con estabilizaciones ocasionales pero sin brotes.
- **EMPR**, definida por la progresión de la discapacidad desde el inicio de la enfermedad con ocasionales brotes.

### **3. Edad de inicio de la enfermedad.**

**4. Riesgo para desarrollar EM.** Para investigar si los SNPs *rs2071746* y *rs2071747* del gen *HMOX1* y *rs2270363* y *rs1051308* del gen *HMOX2* influyen en el riesgo para desarrollar EM.

**5. Riesgo para desarrollar EM, según sexos.** Para investigar si los SNPs *rs2071746* y *rs2071747* del gen *HMOX1* y *rs2270363* y *rs1051308* del gen *HMOX2* influyen en el riesgo para desarrollar EM según el sexo del paciente.

**6. Forma clínica de EM** Para investigar si los SNPs *rs2071746* y *rs2071747* del gen *HMOX1* y *rs2270363* y *rs1051308* del gen *HMOX2* determinan la forma clínica de EM que desarrollará el paciente.

### **3. METODOLOGÍA DEL ANÁLISIS GENÉTICO**

La extracción del ácido desoxirribonucleico (DNA) de las muestras de sangre se ha realizado en el Departamento de Farmacología de la Universidad de Extremadura, y los análisis genéticos de los SNPs *rs2071746* y *rs2071747* del gen *HMOX1* y *rs2270363* y *rs1051308* del gen *HMOX2* en el Departamento de Farmacología de la Universidad de Extremadura, Cáceres.

Se estudiaron mediante el uso de sondas TaqMan dos polimorfismos del gen *HMOX1* y otros dos del *HMOX2*, que fueron seleccionados por su frecuencia relativa en población caucásica(455,468) y por su potencial implicación fisiopatogénica la esclerosis múltiple.

El polimorfismo *HMOX1 rs2071746* es una variante situada en la región promotora del gen mientras que *rs2071747* es una mutación sinónima del exón 1 del gen *HMOX1*. En el caso de *HMOX2 rs2270363* un polimorfismo en la región reguladora del gen y *rs1051308* un polimorfismo de la región 3'.

#### **3.1. EXTRACCIÓN Y PURIFICACIÓN DEL DNA A PARTIR DE SANGRE PERIFÉRICA.**

##### **3.1.1. Pasos de la Extracción**

El DNA usado en este estudio proviene de leucocitos sanguíneos y se obtuvo de la siguiente manera:

1. Se recogen 10ml de sangre periférica mediante venopunción estándar en tubos Venoject que contienen ácido etilén-diamino-tetraacético (EDTA) y se almacena a -80°C hasta su uso.
2. Las muestras se depositan en tubos Falcon de 50 ml y se añaden 3 volúmenes de **tampón de hemólisis** almacenado a 4°C. Se agita suavemente durante 20 minutos.
3. Se centrifuga a 1000 x g durante 10 minutos a 4°C para que los leucocitos sedimenten y decantamos el sobrenadante que contiene proteínas y restos de eritrocitos.
4. Se añaden 20ml de **tampón de hemólisis**, se agita y se vuelve a centrifugar

- a 4°C. Se decanta el sobrenadante del mismo modo que en pasos anteriores. Si es necesario, se repite esta operación 1 ó 2 veces más hasta que el sedimento de leucocitos quede limpio.
5. Se secan las paredes del tubo para que no queden restos del sobrenadante y se resuspende el sedimento de leucocitos en 5 ml de **solución SE**.
  6. Para tratar los leucocitos y romper las proteínas unidas al DNA se añaden 300µl de **proteínasa K** (10mg/ml) y 250 µ
  7. l de **SDS al 20%**. Se deja incubar toda la noche con agitación constante a temperatura ambiente.
  8. Para todos los pasos que vienen a continuación, los tiempos de agitación son de 20 minutos a 25 rpm y la centrifugación es de 10 minutos a 5000 *x g* y a 4°C.
  9. Se añade a la solución que contiene el DNA la misma cantidad de **fenol** a 4°C. Se agita y centrifuga.
  10. Se observan dos fases claramente diferentes, la superior contiene el DNA. Se recupera la fase superior con cuidado de no arrastrar nada de la fase inferior y se deposita en un nuevo tubo Falcon de 50ml estéril.
  11. Se añade el mismo volumen de una solución de **fenol/cloroformo** (1:1). Se agita, centrifuga, se extrae la fase superior y se deposita en un nuevo tubo Falcon de 50ml estéril.
  12. Se añade un volumen igual de una solución de **cloroformo/isoamil alcohol** (24:1). Se agita y centrifuga. Se extrae la fase superior y se deposita en un nuevo tubo Falcon de 50ml estéril.
  13. Se añade un volumen igual de **isopropanol**. Se agita suavemente hasta que se hagan visibles los filamentos de DNA. Poco a poco se va formando un flóculo con estos filamentos.
  14. Se extrae el flóculo con la punta de una pipeta Pasteur previamente doblada en el mechero Bunsen y se coloca en un tubo de Eppendorf. Se lava con **etanol** al 70° y a -20°C con el fin de arrastrar las impurezas.
  15. Se evaporan los restos de etanol en la campana de vacío durante 10 minutos. El DNA seco se resuspende en 500 µg de **solución buffer TE** a pH 8 y se agita durante 24 horas a 5 rpm y 4°C.
  16. Se almacena el DNA a 4°C hasta su uso en un plazo breve.

### **3.1.2. Soluciones empleadas en la Extracción y Purificación del DNA**

- **Tampón de hemólisis:** 155mM NH<sub>4</sub>Cl, 10mM KHCO<sub>3</sub> , 0.1mM EDTA . Ajustar a pH 7.4 con NaOH. Autoclavar y almacenar a 4°C.
- **Solución SE:** 115 mM NaCl , 385 mM EDTA pH 8. Autoclavar.
- **Proteinasa K** 10 mg/ml en agua MilliQ estéril. Se prepara la cantidad a emplear. Almacenar a 4°C durante 2 días máximo.
- **SDS (dodecil sulfato sódico).** Solución al 20% en agua MilliQ estéril.
- **Fenol** Se incuba a 68°C entre 1 y 2 horas. Se añade 1 g de 8-hidroxiquinolina por Kg de fenol y se agita bien. Posteriormente se añade 500 ml de Tris 0.5M sin ajustar el pH. y se agita a 4°C durante 24 horas como máximo. Se deja sedimentar durante una hora y se mide el pH de la fase superior; si es mayor o igual a 7.8, se puede almacenar a 4°C; si el pH es inferior a 7.8, se retira la fase superior por aspiración y se añaden otros 250 ml de Tris 1M pH 8. Se repite este último paso tantas veces sea necesario hasta que el pH sea de 7.8 o superior. El fenol puede almacenarse a -20°C si no va a usarse en el plazo de 1 ó 2 meses. Antes de emplearlo es recomendable medir de nuevo el pH y ajustarlo con Tris en caso necesario.
- **Solución TE** 10mM de Tris pH 8, 1mM de EDTA pH 8 y Autoclavar.

### **3.2. CUANTIFICACIÓN DEL DNA Y ESTIMACIÓN DE SU PUREZA.**

Se calcula la concentración de DNA y su pureza, midiendo la absorbancia en el espectrofotómetro:

- Se ponen 700 µl de **solución TE** en una cubeta de cuarzo de cámara estrecha y se mide la absorbancia a 260 nm. Se anota y posteriormente se mide la absorbancia a 280 nm y también se anota.
- A los 700 µl de **solución TE** se le añaden 5 µl de DNA y se mezcla bien invirtiendo la cubeta varias veces. Se mide la absorbancia a 260 nm y a 280 nm. Al valor obtenido se le resta el de la primera medida sin DNA.
- Se añaden otros 5 µl de DNA a la cubeta y se repiten las mediciones. Tiene que existir una correlación entre ambas mediciones.

- Para averiguar la pureza del DNA se calcula el cociente de absorbancias a 260 nm y 280 nm. Se consideran cifras óptimas de pureza aquellas que presentan un cociente de 1.8-2. Cocientes menores indican la presencia de proteínas en el medio y cocientes superiores indican la presencia de otras sustancias contaminantes como etanol. En ambos casos habrá que purificar de nuevo el DNA.
- La absorbancia de los ácido nucleicos es máxima a 260nm. La cuantificación de DNA se realiza teniendo en cuenta que una unidad de densidad óptica (DO) se corresponde aproximadamente con una concentración de 50 µg/ml de DNA de cadena doble. Empleando esta constante puede cuantificarse el DNA de una muestra según la fórmula: [DNA]= 50\*absorbancia a 260 nm.

### **3.3. GENOTIPADO DE LOS SNPS RS2071746 Y RS2071747 DEL GEN HMOX1 Y RS2270363 Y RS1051308 DEL GEN HMOX2**

Los SNPs *rs2071746* y *rs2071747* del gen *HMOX1* y *rs2270363* y *rs1051308* del gen *HMO2*, fueron genotipados mediante la tecnología del ensayo TaqMan (Life Technologies, Alcobendas, Madrid). Éste es un sistema de genotipado por fluorescencia que permite discriminar, mediante una PCR alelo-específica competitiva, los alelos de un SNP en un *locus* específico a partir de DNA genómico. Este ensayo utiliza una *Taq polimerasa* modificada sin actividad 3´-5´ exonucleasa. Los cebadores estaban diseñados para detectar los cuatro SNPs mencionados de acuerdo a las instrucciones del fabricante (Life Technologies). Las identificaciones de los kits fueron C\_15869717\_10, C\_22272778\_10, C\_15957370\_10 y C\_9695078\_1\_.

Esta tecnología utiliza cebadores que generan productos de PCR fluorescentes que permiten genotipar el SNP en un único paso (los procesos de amplificación y detección se producen de manera simultánea). Este sistema de genotipado está diseñado como un ensayo multiplex que detecta los alelos en un único tubo de reacción con dos cebadores específicos para el SNP marcados con fluorescencia, y dos cebadores universales.

En la tabla 13, se detallan las características de la composición de la mezcla de la reacción de amplificación. La tabla 13 muestra la composición de la denominada Mezcla de cebadores (“*Primer Mix*”). La denominada Mezcla de Reacción (“*Reaction*”

Mix”) es aportada por el laboratorio Life Technologies en forma de kit e incluye el resto de componentes necesarios para el desarrollo de la PCR: Taq polimerasa, nucleótidos (dNTPs), fluorocromo de referencia (fluorocromo ROX) y MgCl<sub>2</sub>. Los primers alelo-específicos para el estudio de los SNPs *rs2071746* y *rs2071747* del gen *HMOX1* y *rs2270363* y *rs1051308* del gen *HMOX2* fueron diseñados por Life Technologies.

H <sub>2</sub> O	1.336 µl	x1	1.336 µl
<i>Primer Mix</i>	0.1 µl	x1	0.1 µl
<i>Reaction Mix</i>	2.5 µl	x1	2.5 µl
MgCl <sub>2</sub>	0.064 µl	x1	0.064 µl
			4 µl
DNA	1 µl	por pocillo	

**Tabla 13.** Composición de la mezcla de la reacción de amplificación (x1: volumen por muestra).

<b>Composición de la <i>Primer Mix</i>:</b>	
<i>Primer</i> específico alelo A1 (100 µM)	12 µl
<i>Primer</i> específica alelo A2 (100 µM)	12 µl
<i>Primer</i> común C1 (100 µM)	30 µl
H <sub>2</sub> O	46 µl

**Tabla 14.** Composición de la *Primer Mix*.

El proceso de genotipado mediante tecnología TaqMan consta de varias fases (Imagen 14a). En una etapa inicial se produce la desnaturalización del DNA separándose en sus dos cadenas. A continuación comienza la fase de hibridación o alineamiento en la que se produce la unión específica del cebador a su secuencia complementaria en el DNA molde (el extremo 3' del cebador se posiciona sobre el nucleótido del SNP analizado). El cebador común también se une a su cadena complementaria de DNA y la PCR progresa con el primer alelo-específico quedando incorporado en el DNA molde. En estas fases, los oligonucleótidos marcados con fluorocromos permanecen unidos a sus oligonucleótidos complementarios portadores del *quencher*, por lo que no se genera ninguna señal fluorescente.



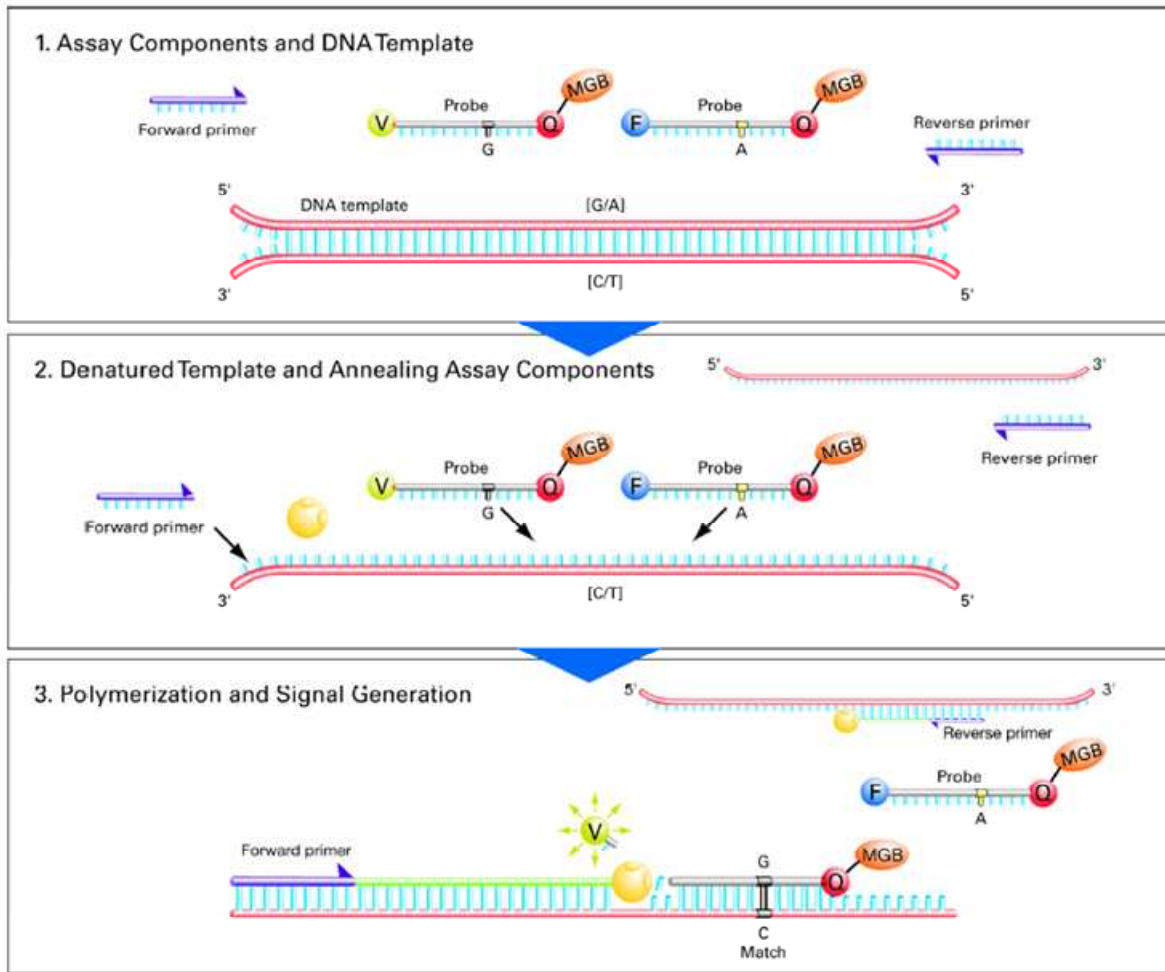


Imagen 14. Representación esquemática del proceso de genotipación por PCR-TR con sondas TAqMan® MGB



Conforme continúa la reacción de PCR el oligonucleótido marcado con el fluoróforo, y correspondiente al alelo amplificado también, se hibrida con su cadena complementaria y queda incorporado al molde de DNA. Como el fluorocromo y el *quencher* están ahora espacialmente alejados, la fluorescencia emitida por el primero no es absorbida y es captada por el lector. El incremento del DNA en cada ciclo se corresponde con un aumento de hibridación de los oligonucleótidos marcados con el fluoróforo, lo que conlleva un aumento en la misma proporción de la fluorescencia emitida. La fluorescencia observada es diferente en función del genotipo que porte cada individuo: en homocigotos se observa sólo la señal del fluorocromo correspondiente, mientras que en heterocigotos se observa las correspondientes a los

dos fluorocromos. El fluorocromo FAM se excita a 485 nm y emite a 520 nm, mientras que el VIC se excita a 538nm y emite a 554nm.

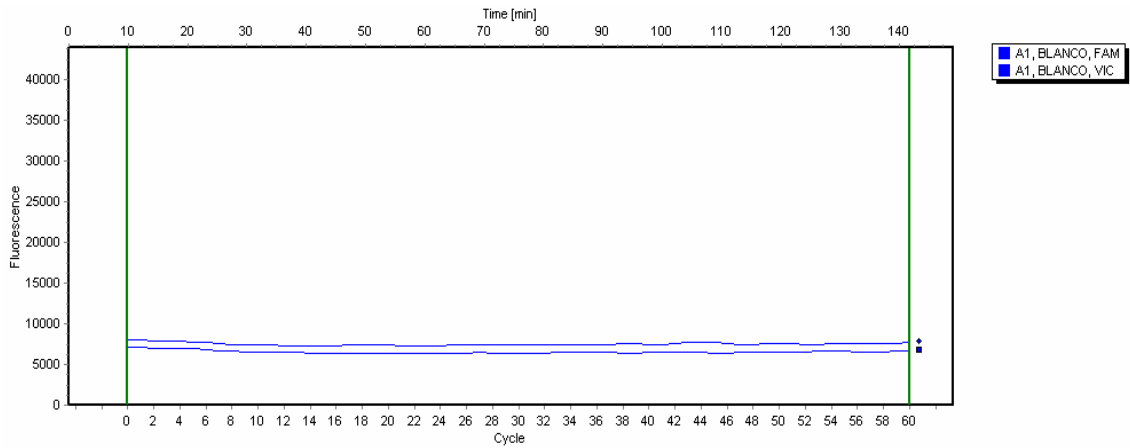


Imagen 15. Amplificación de un blanco (sin DNA) en el que ninguna de las señales fluorescentes se amplificó

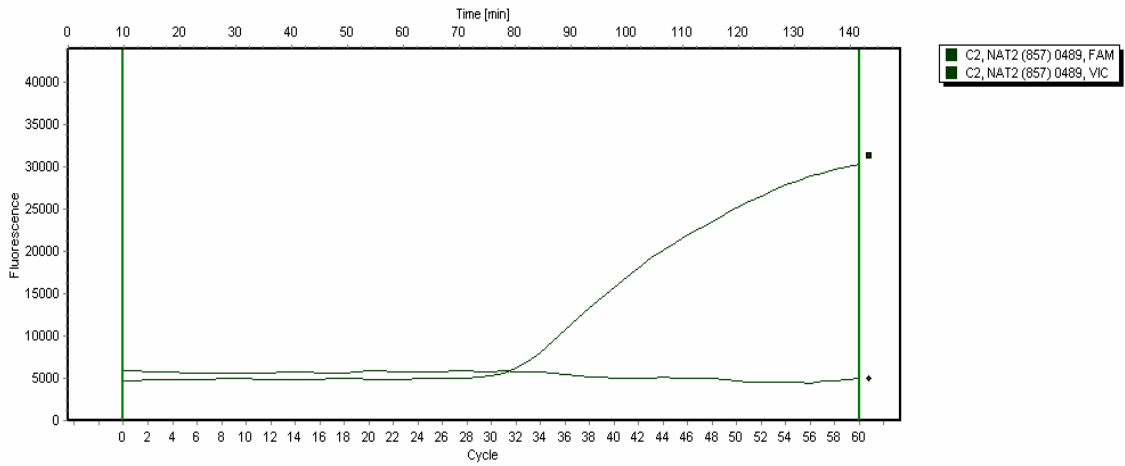


Imagen 16. Amplificación de una muestra de ADN genómico con amplificación de la señal FAM®

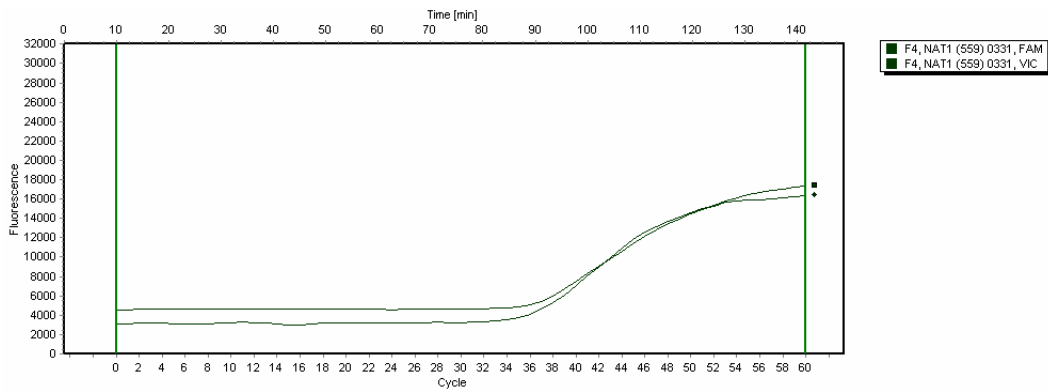


Imagen 17. Amplificación de una muestra de ADN genómico con amplificación de la señal fluorescente VIC®

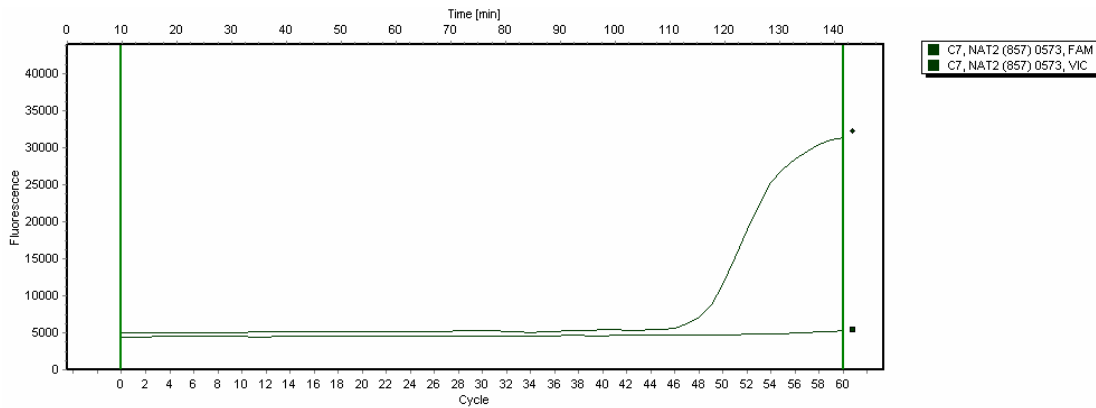


Imagen 18. Amplificación de una muestra de ADN genómico con amplificación de las señales fluorescentes FAM® y VIC®, asignado genotipo heterocigoto.

La PCR ha sido llevada a cabo en un termociclador “*Eppendorf Realplex*” de 96 pocillos (Eppendorf, Madrid, España) con las siguientes condiciones:

- Una desnaturalización inicial a 96°C durante 10 minutos.
- Cuarenta y cinco ciclos con 3 etapas cada ciclo de:
- 15 segundos a 92°C (desnaturalización).
- 90 segundos a 60°C (hibridación y elongación).
- Se midió la fluorescencia al finalizar cada ciclo y al final del proceso.

Las determinaciones se hicieron por triplicado en todas las muestras y los genotipos fueron asignados utilizando un software de identificación genética (RealPlex 2,0, Eppendorf) y analizando el número de ciclos de referencia para cada curva de fluorescencia, calculados por el algoritmo “*CalQplex*” (Eppendorf).

Las variaciones del número de copias (CNVs) de los genes *HMOX1* y *HMOX2* han sido analizadas siguiendo el “*TaqMan copy number assays*” *Hs00774483\_cn* y *Hs01223070\_cn*, respectivamente. Las sondas fueron diseñadas para detectar secuencias exónicas, de modo que incluso si el resto del gen permaneciera en los alelos nulos, la proteína traducida no sería funcional. La amplificación se ha realizado en un termociclador “*Applied Biosystems 7500 real-time*” según las instrucciones del fabricante y empleando un kit de referencia de número de copias. Según el procedimiento estándar en el análisis de CNVs se definieron las muestras con una única copia del gen correspondiente como heterocigotos (nulo/presente). Todas las reacciones se han repetido 4 veces y los resultados han sido analizados con el uso del software “*R CopyCaller*” (“Life technologies”, Alcobendas, Madrid).

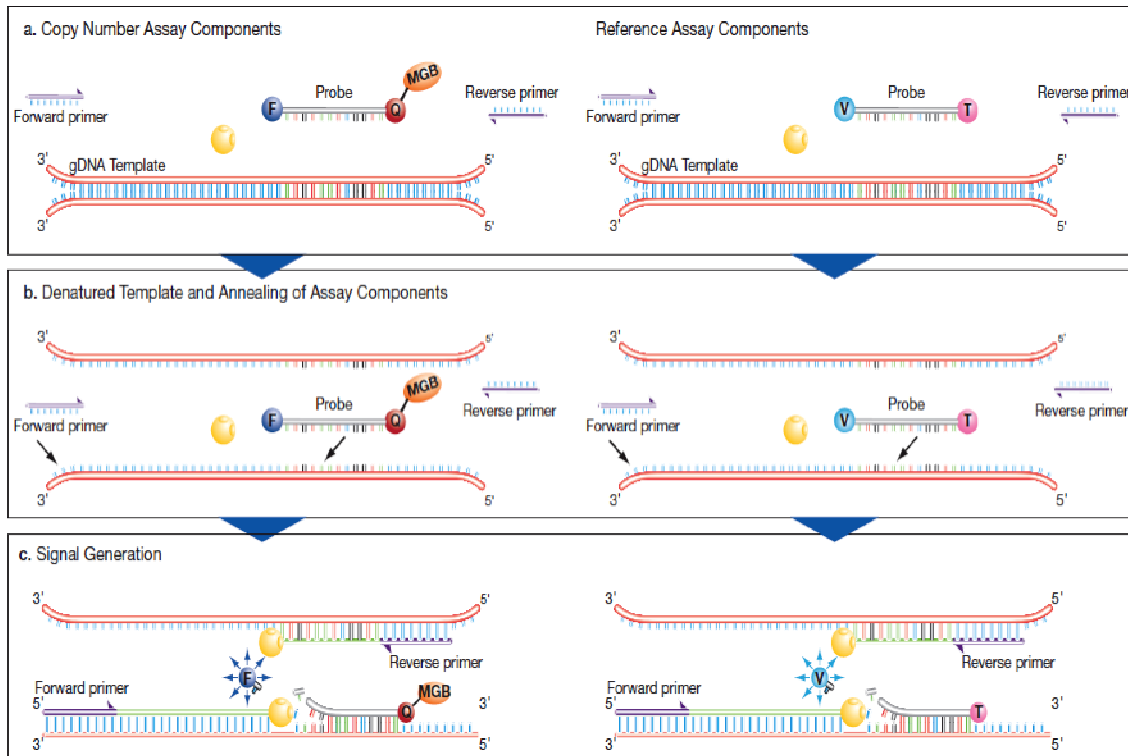


Imagen 19. Representación esquemática del proceso de determinación del número de copias de un gen PCR-TR con sondas TagMan®

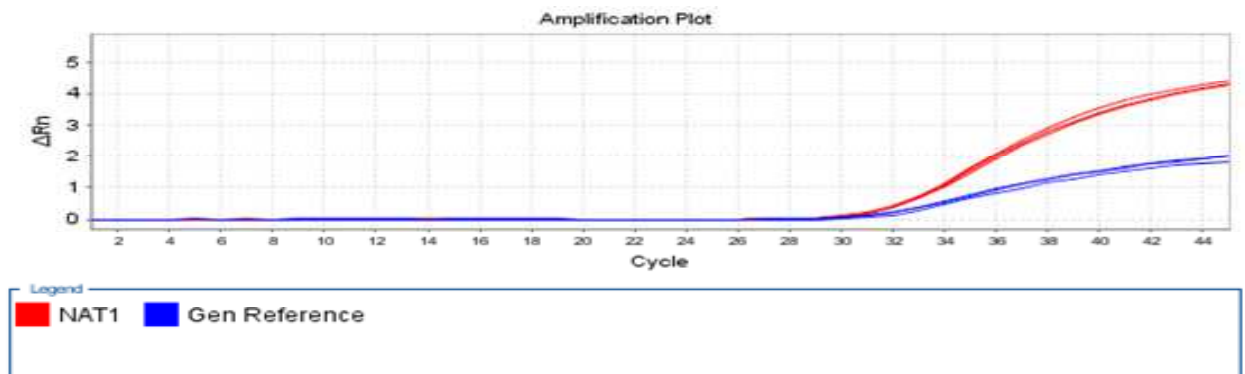


Imagen 20. Amplificación de una muestra de ADN genómico por cuadruplicado, para la determinación de CNV. En rojo aparece la señal fluorescente FAM® para el gen de interés y en azul la VIC® para el gen de referencia RNA-asa HP1.

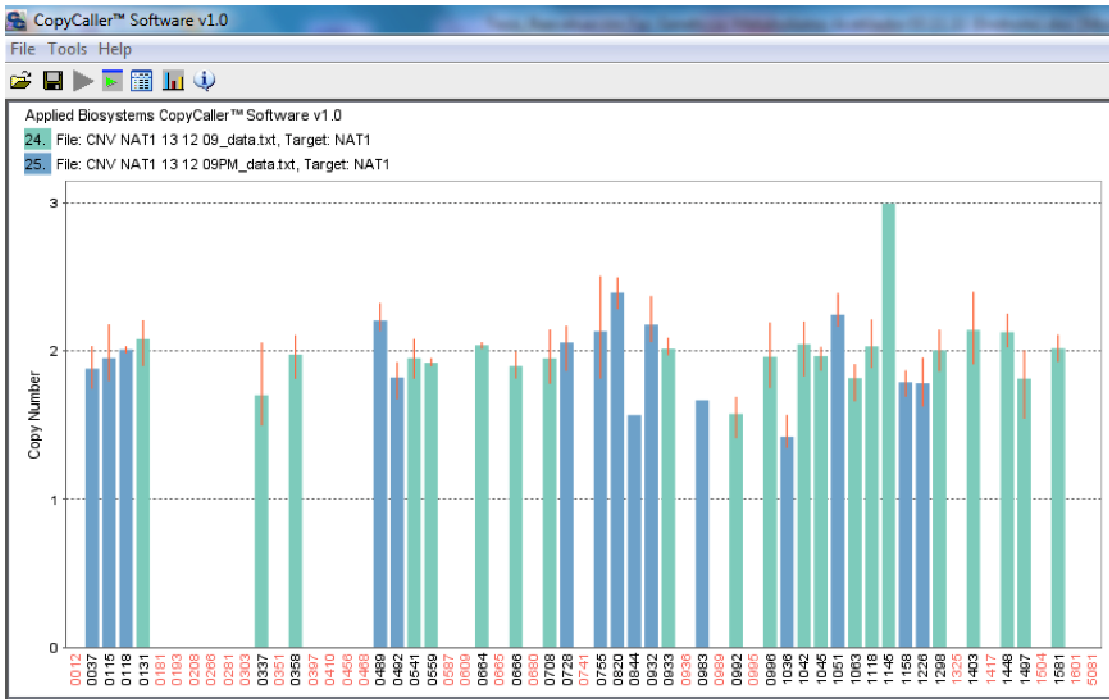


Imagen 21 . Resultados de un experimento de estudio de CNV, una vez analizado por el software CopyCaller®

#### 4. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Los datos referentes a las variables cuantitativas (fecha de nacimiento, edad en el momento de inclusión en el estudio y edad de inicio de los síntomas) y cualitativas (sexo y forma clínica de EM) fueron recogidos en una base de datos diseñada para el estudio (programa Microsoft Excel 2007®). El análisis descriptivo de las poblaciones del estudio se llevó a cabo mediante el programa SPSS 19.0 para Windows (SPSS Inc., Chicago, Illinois, USA). Los datos descriptivos son presentados mediante valores de media y su desviación estándar (DE).

En el caso de las variables cualitativas, la comparación entre los grupos de las frecuencias genotípicas y alélicas de los SNPs analizados se realizó utilizando el test Chi-cuadrado, a menos que las condiciones para su aplicación no fueran válidas, en cuyo caso se aplicó el test exacto de Fisher. En el caso de las variables cuantitativas continuas, este análisis se llevó a cabo mediante el test T de Student o el test de ANOVA (según se comparan dos o tres grupos de sujetos, respectivamente), una vez confirmado con la prueba de Kolmogorov-Smirnoff que dichas variables seguían una distribución normal. Se consideraron niveles de significación estadística a  $p \leq 0.05$ . Se calcularon los intervalos de confianza al 95%.

El procedimiento de Benjamini y Hochberg fue empleado para calcular la corrección con múltiples test (valores  $P_c$ ) y minimizar la tasa de falsos hallazgos(476,477).

El cálculo del tamaño muestral se realizó a partir de las frecuencias de variantes alélicas observadas en controles de un modelo de análisis genético para portadores de un gen de enfermedad con un RR de 1,5 ( $p = 0,05$ ). El poder estadístico para un asociaciones bilaterales para la presencia de los SNPs identificados en este estudio (*rs2071746*, *rs2071747*, *rs2270363* y *rs1051308*) fue de 97,6% 43.1%, 96.3% and 97.0% respectivamente . El test de homogeneidad de Breslow-Day fue empleado para descartar heterogeneidad en las asociaciones.

El valor predictivo negativo (VPN) se calculó mediante la fórmula  $d/r_2$  siendo “d” el número de individuos control sin el factor de riesgo y “r2” el sumatorio de pacientes y controles sin el factor de riesgo(478).

Para el análisis de las frecuencias de los distintos genotipos y variantes alélicas de SNPs *rs2071746* y *rs2071747* del gen *HMOX1* y *rs2270363* y *rs1051308* del gen

*HMOX2* se utilizó el software PLINK v.1.07 (Shaun Purcell;<http://pngu.mgh.harvard.edu/purcell/plink/>)(479) y el programa PHASE V2.1.1(480). El software “DeFinetti” (<http://ihg.gsf.de/cgi-bin/hw/hwa1.pl>) se empleó para analizar posibles desviaciones del equilibrio de Hardy y Weinberg(481) en los grupos de pacientes y controles, y en cada uno de los subgrupos analizados en esta tesis.

Los diplotipos se obtuvieron de la combinación de haplotipos con el mejor resultado posible, definido como aquel que obtuvo la mejor consistencia de resultados entre todos los análisis(482).

<h1>RESULTADOS</h1>	



## 1. ANÁLISIS DE LAS VARIABLES DEMOGRÁFICAS ENTRE GRUPOS

292 pacientes diagnosticados de EM según criterios de McDonald y cols.(23,24) fueron incluidos en el estudio. La figura X muestra la procedencia de dichos pacientes: Asociación de Esclerosis Múltiple de Madrid (ADEMM; 166 pacientes), Hospital Universitario “12 de Octubre” (Madrid; 31 pacientes), Complejo Hospitalario “Mancha-Centro” (Alcázar de San Juan y Tomelloso, Ciudad Real; 65 pacientes) y Hospital “Príncipe de Asturias” (Alcalá de Henares, Madrid; 30 pacientes). El tiempo medio de duración de la enfermedad fue de 11.1 años (DE=7.9).

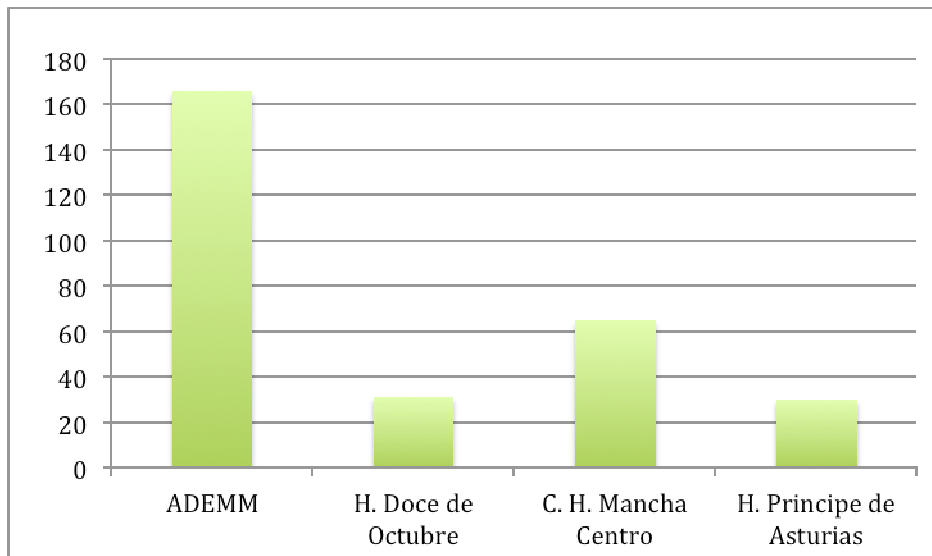


Imagen 22. Histograma de distribución según la procedencia en el grupo de pacientes con EM

Se incluyeron 533 sujetos sanos como grupo control constituido por alumnos y profesores de la Universidad de Extremadura (Badajoz; 258 sujetos), y acompañantes de pacientes afectados de una enfermedad neurológica distinta a la EM atendidos en el departamento de Neurología de la Clínica Universitaria de Navarra (Pamplona; 275 sujetos).

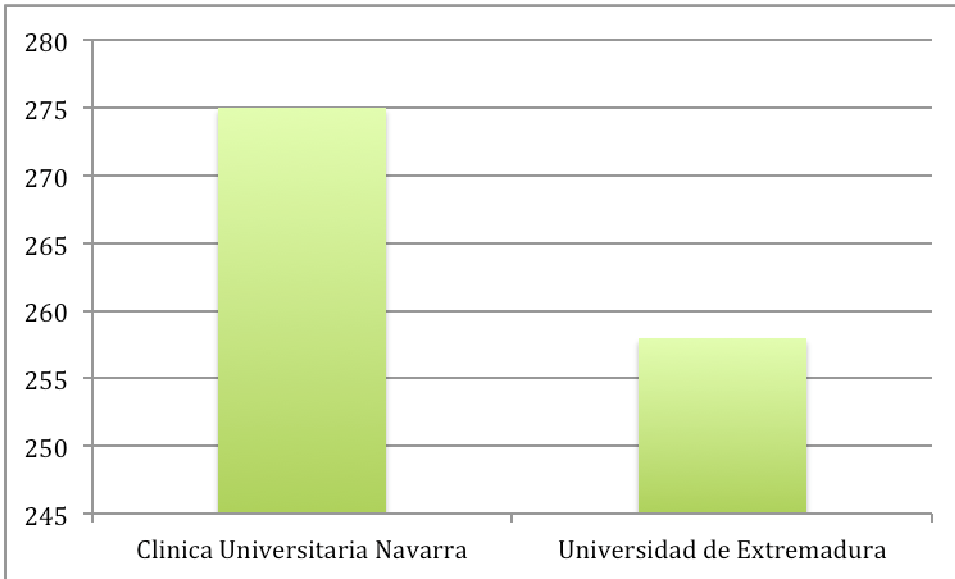


Imagen 23 .Histograma de distribución según la procedencia en el grupo control.

La distribución por sexos entre pacientes y controles fue similar. El grupo de pacientes estaba constituido por 201 mujeres (68.83%) y 91 hombres (31.16%) mientras que el de controles por 367 mujeres (68.85%) y 165 hombres (30.95%) (imagen 24).

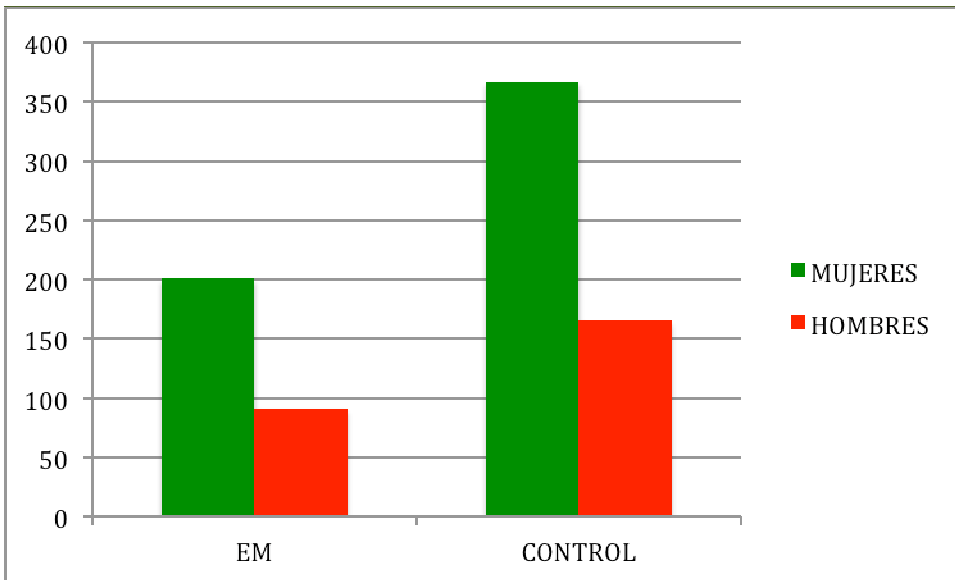


Imagen 24. Histograma de la distribución por sexos en el grupo control y en el de pacientes

La media de edad de los pacientes en el momento de inclusión en el estudio fue de 43.9 años (DE=11.4), con un pico modal entre 41 y 50 años (n=98) No se

detectaron diferencias significativas entre la media de edad en varones con EM ( $42.4 \pm 10.3$  años) y la de las mujeres ( $44.6 \pm 11.9$  años)

La media de edad de los sujetos control en el momento de participación en el estudio fue de 43.8 años (DE=12.4), con un pico modal entre 41 y 50 años (n=106). En el subgrupo de hombres sanos, la edad media fue de 45.2 años (DE=10.4) y 42.3 años (DE=13.2) en el subgrupo de mujeres. No se detectaron diferencias estadísticamente significativas al comparar la edad entre ambos grupos.

En resumen, los sujetos estudiados son comparables en edad y sexo. No hubo diferencias estadísticamente significativas para las dos variables demográficas analizadas (edad en el momento de inclusión y sexo) entre los dos grupos comparados pacientes con EM e individuos sanos (tabla 15).

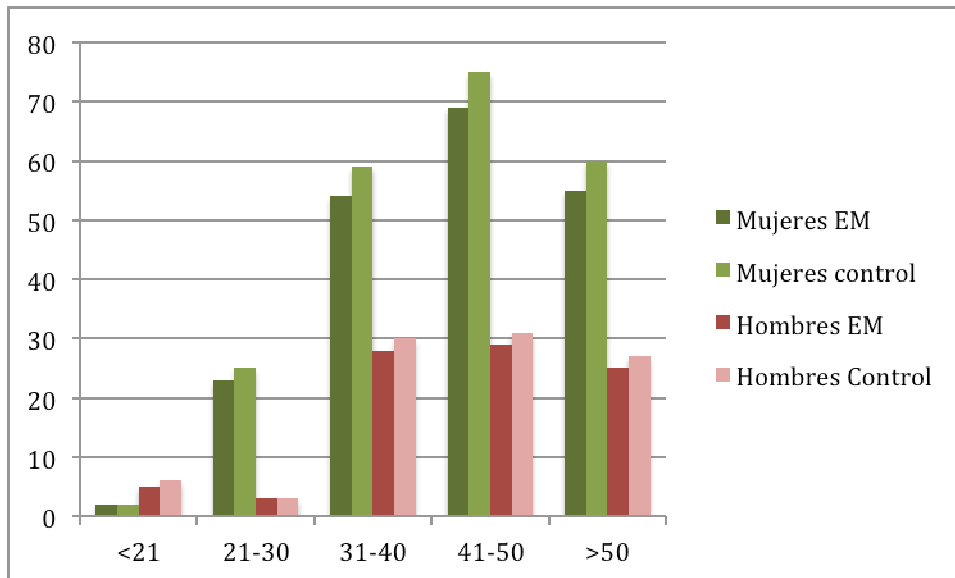


Imagen 25 Histograma de distribución por sexo y edad en el momento de la inclusión en el estudio del grupo de pacientes

	Grupo de pacientes con EM (n=292)	Grupo control (n=533)	P
Edad inclusión (media $\pm$ DE)	43.9 $\pm$ 11.4	43.8 $\pm$ 12.4	0.757
Sexo (M : H)	201 : 91	367 : 165	0.954

Tabla. 15 Comparación de las variables edad en el momento de inclusión en el estudio y sexo entre el grupo de pacientes con EM y el grupo control (M: mujer; H: hombre).

## 2. ANÁLISIS DE LAS VARIABLES CLÍNICAS DEL GRUPO DE PACIENTES

La clasificación definida por el tipo clínico de la enfermedad(71), en nuestro grupo de pacientes con EM reveló 157 pacientes con EM RR (53.76%), 93 pacientes con forma SP (31.84%) y 42 pacientes con formas EMPP (14.38%).

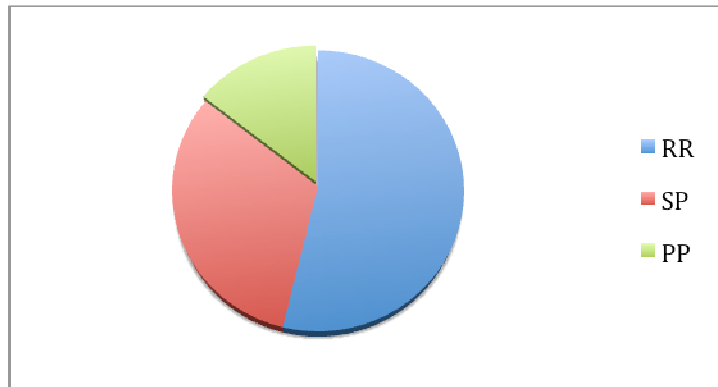


Imagen 26. Frecuencia de cada una de las formas clínicas de EM en grupo de pacientes

La duración de la enfermedad fue de  $11.14 \pm 7.9$  hasta el momento de la inclusión. Por subgrupos fue de  $10.5 \pm 8.2$  años en el grupo de pacientes con EMRR,  $12.3 \pm 9.3$  años en el de EMSP y  $11.0 \pm 7.7$  años en el de EMPP.

La EDSS media en el momento de la recogida fue de  $4.7 \pm 2.2$  para el conjunto de pacientes. Por subgrupos fue de  $2.9 \pm 1.5$  para los RR,  $6.0 \pm 1.3$  para las formas SP y de  $6.8 \pm 0.9$  para las formas PP. Si consideramos la duración media de la enfermedad podemos calcular el índice de progresión (EDSS/duración media) para cada grupo y el total dando como resultado  $0.3 \pm 0.2$ ,  $0.6 \pm 0.5$ ,  $0.7 \pm 0.4$  y  $0.5 \pm 0.4$  para los grupos RR, SP, PP y total respectivamente.

La puntuación de la escala EDSS y el índice de progresión fue estadísticamente inferior en el grupo RR respecto a los grupos SP y PP ( $p < 0,01$ ).

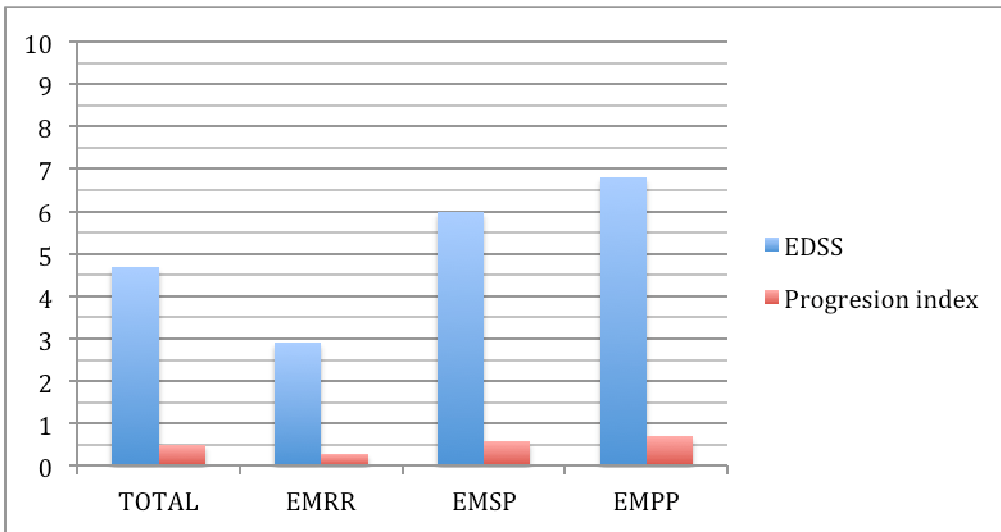


Imagen 27. Histograma de la EDSS y el índice de progresión en función del tipo clínico de EM.

Tanto en el subgrupo de hombres como en el de mujeres, la forma evolutiva predominante fue la EMRR (imagen 28). Las formas progresivas (EMSP y EMPP) mostraron un ratio M:H más cercano a la unidad aunque no estadísticamente significativo.

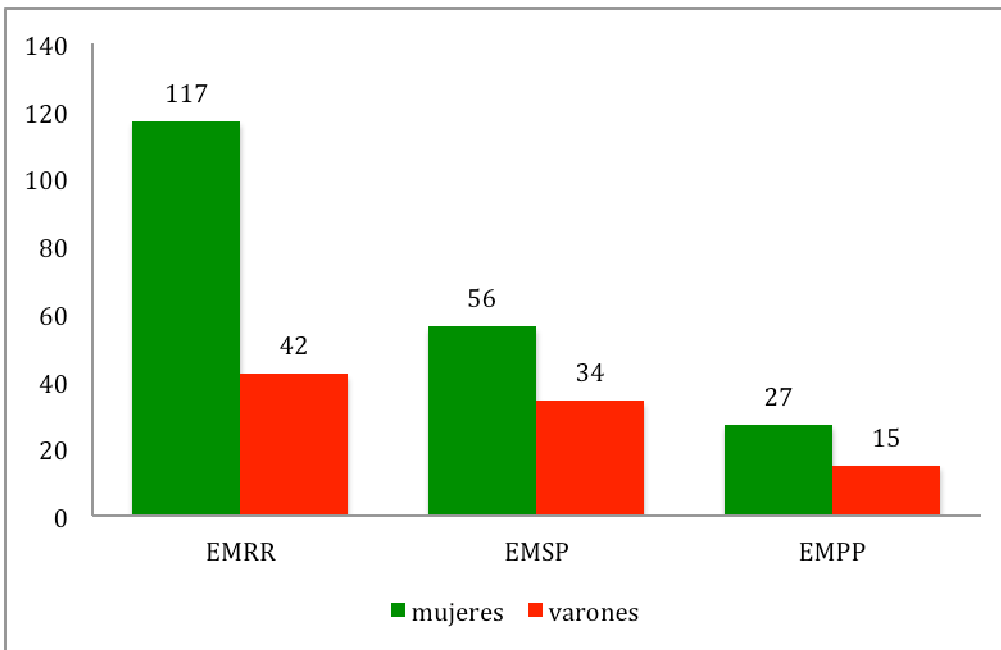


Imagen 28. Histograma de distribución por sexo y forma clínica en pacientes con EM.

La edad media de inclusión en el estudio fue superior en el grupo de pacientes con EMPP (media= 54.4 años; DE= 10.2) y EMSP (media= 47.2 años; DE= 9.9) que

en el grupo con EMRR (media= 39.9 años; DE= 10.5) (figura). Se detectaron diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0.001$ ) entre las formas progresivas (EMPP y EMSP) y la forma EMRR, y entre los pacientes con formas EMPP y EMSP ( $p = 0.009$ ).

En nuestro grupo de pacientes con EM se observó una media de edad de inicio de la enfermedad de 32.8 años (DE=10.9), con un valor mínimo de 8 años y un máximo de 67 años. La mayoría de los enfermos estudiados sufrieron los primeros síntomas de la enfermedad antes de los 40 años ( $n=169$ , 58%)

La edad media de inicio de la enfermedad en el subgrupo de mujeres fue de 32.7 años (DE= 11.4), con un mínimo de edad de 8 años y un máximo de 67 años. En el subgrupo analizado de hombres, la media de edad de comienzo de la EM fue de 33.2 años (DE= 10.1), con un mínimo de edad de 14 años y un máximo de 57 años (figura). No se detectaron diferencias estadísticamente significativas al comparar la edad de inicio entre sexos.

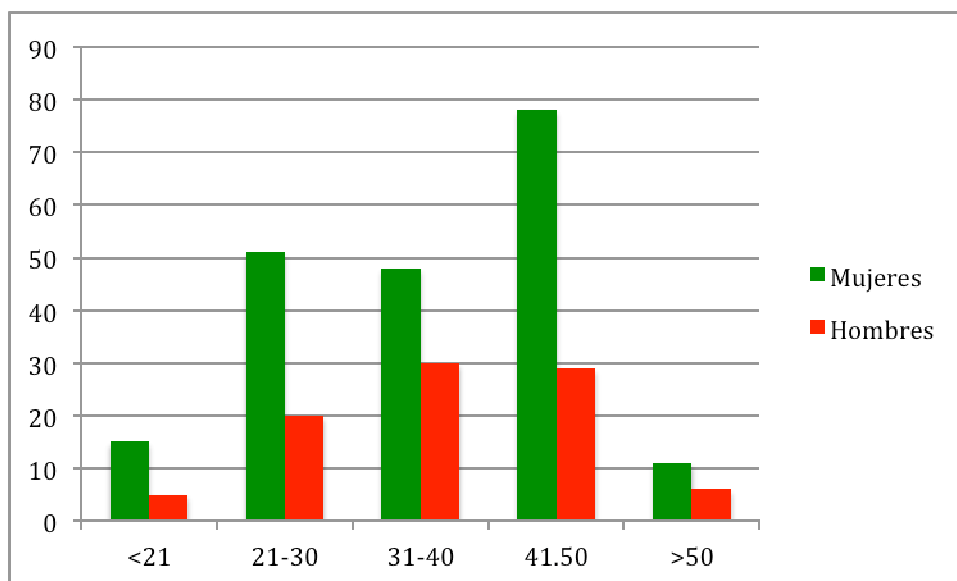


Imagen 29. Histograma de distribución por sexo y edad de inicio de la EM

Al analizar la edad de inicio de la enfermedad según las formas evolutivas de EM, se observó cómo ésta fue mayor en los pacientes con EMPP ( $43.4 \pm 11.6$  años) que en los pacientes con EMRR ( $29.5 \pm 8.5$  años) y EMSP ( $34.9 \pm 11.8$  años) (figura). Así, se detectaron diferencias estadísticamente significativas en la edad de comienzo de la enfermedad entre la forma clínica EMPP y las formas EMRR ( $p < 0.001$ ) y EMSP ( $p = 0.007$ ). Además, este análisis también mostró como los pacientes con

EMSP debutaron a una edad también más avanzada que los sujetos con EMRR (p=0.005).

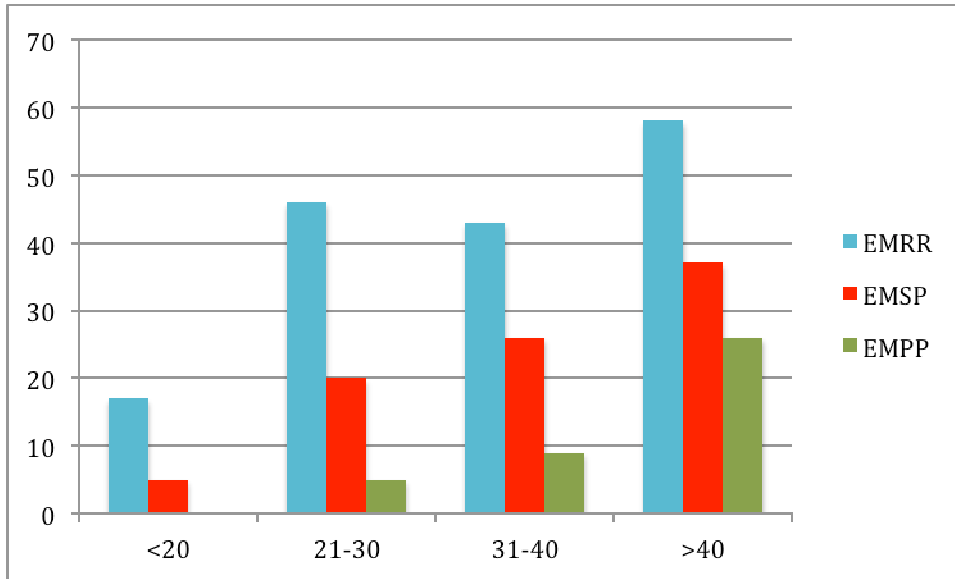


Imagen 30 Histograma de distribución por edad de inicio y forma clínica de EM.

	EM Total (n 292)	Control (n 533)	P	EMRR	EMSP	EMPP	p
Sexo (M:H)	201:92	367:165	ns	115:44	59:32	29:14	ns
Edad de inclusión	43.9 ± 11.4	43.7 ± 12.4	ns	40 ± 10.5	47.2 ± 9.9	54.4 ± 10.2	p<0.01
Edad de inicio	32.8 ± 10.9	-	-	29.5 ± 8.2	34.9 ± 11.8	43.4 ± 11.6	p<0.01
Duración enfermedad	11.1 ± 7.9	-	-	10.5 ± 8.2	12.3 ± 9.3	11 ± 7.7	ns
EDSS	4.7 ± 2.2	-	-	2.9 ± 1.5	6.0 ± 1.3	6.8 ± 0.9	P<0.01
Índice de progresión	0.5 ± 0.4	-	-	0.3 ± 0.2	0.6 ± 0.5	0.7 ± 0.4	P<0.01

Tabla 16. Resumen de las características demográficas de los grupos control y pacientes con EM y los diferentes subgrupos de pacientes con EM. Ns = no significativa.

### **3. ANALISIS DE LOS SNP *rs 2071746* y *rs2071747* DEL GEN *HMOX1* y *rs2270363* y *rs1051308* DEL GEN *HMOX2*.**

Las frecuencias de los genotipos y variantes alélicas de los genotipos *HMOX1 rs2071746* y *rs2071747* y *HMOX2 rs2270363* y *rs1051308* se distribuyeron tal y como predice el equilibrio de Hardy-Weinberg(481).

Las variaciones en el número de copias (CNV) de los genes *HMOX1* y *HMOX2* no se han considerado un factor de riesgo para el desarrollo de la EM, ya que todos los individuos incluidos en el estudio excepto un sujeto control (copia única de *HMOX1*) poseían dos copias de cada uno de los genes.

Las frecuencias genotípicas y alélicas no difirieron significativamente entre pacientes y controles.

Se observó una frecuencia significativamente mayor del genotipo *HMOX2 rs1051308AA* entre los pacientes de EM que en controles aunque tras el análisis multivariable no mantuvo dicha significación. Las frecuencias de los genotipos *HMOX1 rs2071746AA* y *HMOX1 rs2071746TT* mostraron una tendencia no significativa hacia una mayor frecuencia en pacientes (p 0.073) y controles (p 0.067) respectivamente.

Los alelos *rs2071746A* de *HMOX1* y *rs1051308A* de *HMOX2* fueron más frecuentes de modo significativo entre los pacientes con EM mientras que los alelos *rs2071746T* y *rs1051308G* lo fueron entre los controles. Aunque ninguna de estas asociaciones resistió el análisis multivariante mostraron una tendencia casi significativa (p 0.06).



GENOTIPO	EM N:292; 584 alelos		CONTROLES N=533.; 1065 alelos		Odd ratio (CI 95%)	p	pc	VPN (CI 95%)
	n	Porcentaje Intervalo confianza	n	Porcentaje Intervalo confianza				
<b>HMOX1 rs2071746</b>								
A/A	102	34% (29.5-40.4)	154	28.9% (25-32.7)	1.32(0.96-1.81)	<b>0.073</b>	0.292	0.64(0.61-0.69)
A/T	139	47.6% (41.9-53.3)	256	48% (43.8-52.3)	0.98(0.73-1.32)	0.907	0.973	0.64(0.61-0.68)
T/T	51	17.5% (13.1-21.8)	122	22.9% (19.3-26.5)	0.71(0.49-1.04)	<b>0.067</b>	0.292	0.63 (0.61-0.65)
Null/A	0	0	1	0.2% (0.2-0.6)	0 (0-31.69)	0.459	0.667	0.65 (0.65-0.65)
Null/T	0	0	0	0	--	--	--	--
<b>HMOX1 rs2071747</b>								
G/G	266	91.1% (87.8-94.4)	485	91% (88.6-93.4)	1.01(0.6-1.72)	0.961	0.973	0.65(0.53-0.75)
G/C	25	8.65% (5.4-11.8)	46	8.65% (6.2-11)	0.99(0.58-1.7)	0.973	0.973	0.65(0.64-0.66)
C/C	1	0.3% (0.3-1)	1	0.2% (0.2-0.6)	1.82(0.05-67.02)	0.666	0.819	0.65(0.65-0.65)
Null/G	0	0	1	0.2% (0.2-0.6)	0(0.00-31.69)	0.459-	0.667	0.65(0.65-0.65)
Null/C	0	0	0	0	--	--	--	--
<b>HMOX2 rs2270363</b>								
G/G	127	43.5% (37.8-49.2)	253	47.5% (43.2-51.7)	0.85 (0.63-1.15)	0.274	0.667	0.63((0.6-0.66)
G/A	130	44.5%(38.8-50.2)	227	42.6%(38.4-46.8)	1.08(0.8-1.46)	0.593	0.790	0.65(0.62-0.68)
A/A	35	12% (8.3-15.7)	52	9.8% (7.2-12.3)	1.26(0.78-2.03)	0.319	0.667	0.65(0.64-0.66)
Null/G	0	0	1	0.2% (0.2-0.6)	0(0.00-31.69)	0.459	0.667	0.65(0.65-0.65)
Null/A	0	0	0	0	--	--	--	--
<b>HMOX2 rs1051308</b>								
A/A	147	50.3% (44.6-56.1)	227	42.6% (38.4-46.8)	1.37(1.02-0.84)	<b>0.033</b>	0.292	0.68(0.65-0.71)
A/G	120	41.1% (35.5-46.7)	236	44.3% (40.1-48.5)	0.88(0.65-1.19)	0.378	0.667	0.63(0.6-0.66)
G/G	25	8.6% (5.4-11.8)	69	12.9% (10.1-15.8)	0.63(0.68-1.04)	<b>0.058</b>	0.292	0.64(0.62-0.65)
Null/A	0	0	0	0	--	--	--	--
Null/G	0	0	1	0.2% (0.2-0.6)	0(0.00-31.69)	0.459	0.667	0.65(0.65-0.65)

Tabla 17 Genotipos de HMOX1 y HMOX2 en pacientes con EM y controles. VPN valor predictivo negativo

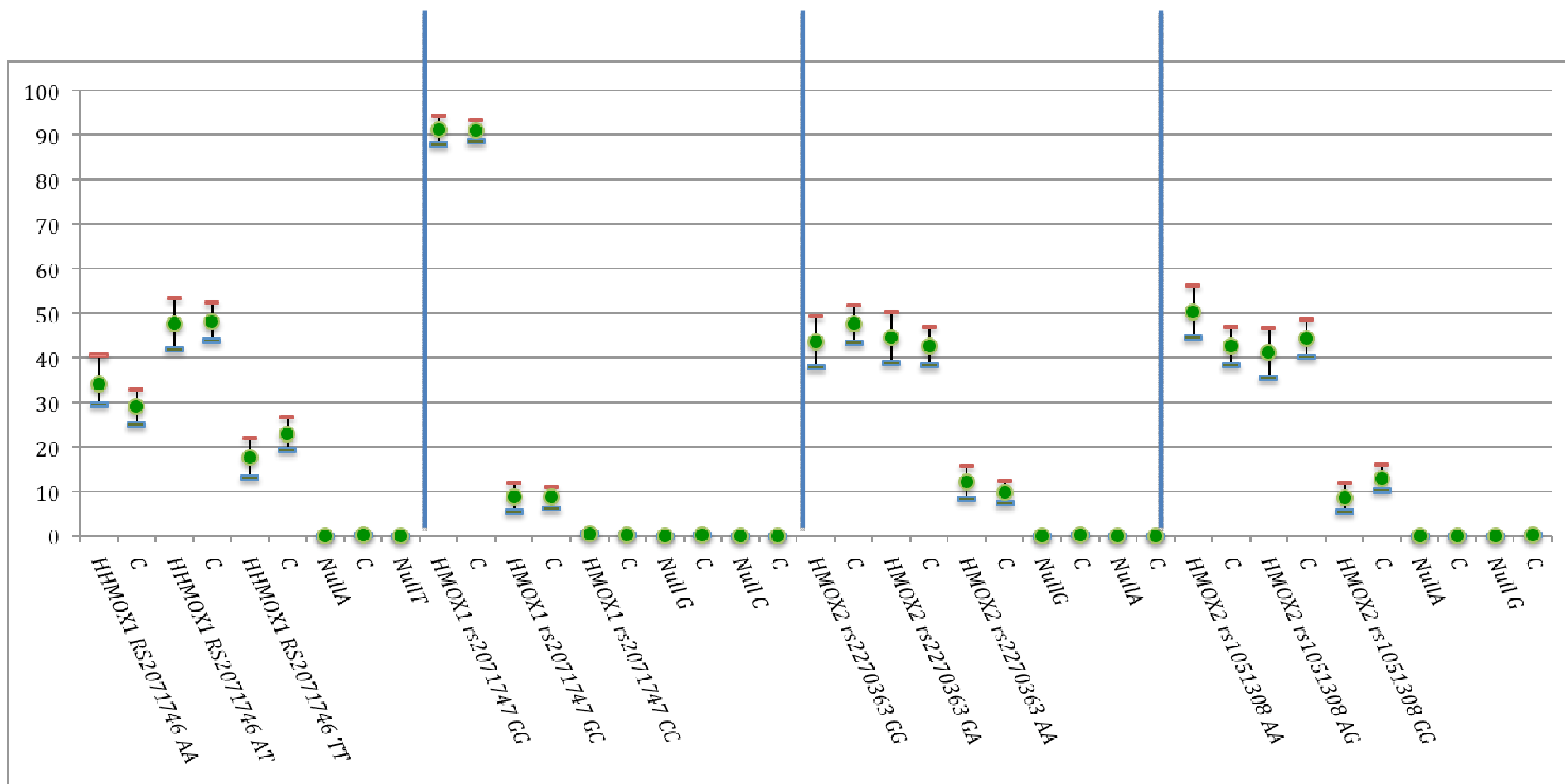


Imagen 31a. Representación de las frecuencias genotípicas entre pacientes (genotipo) y controles (C). Se indica el valor medio y desviación estándar para cada genotipo.

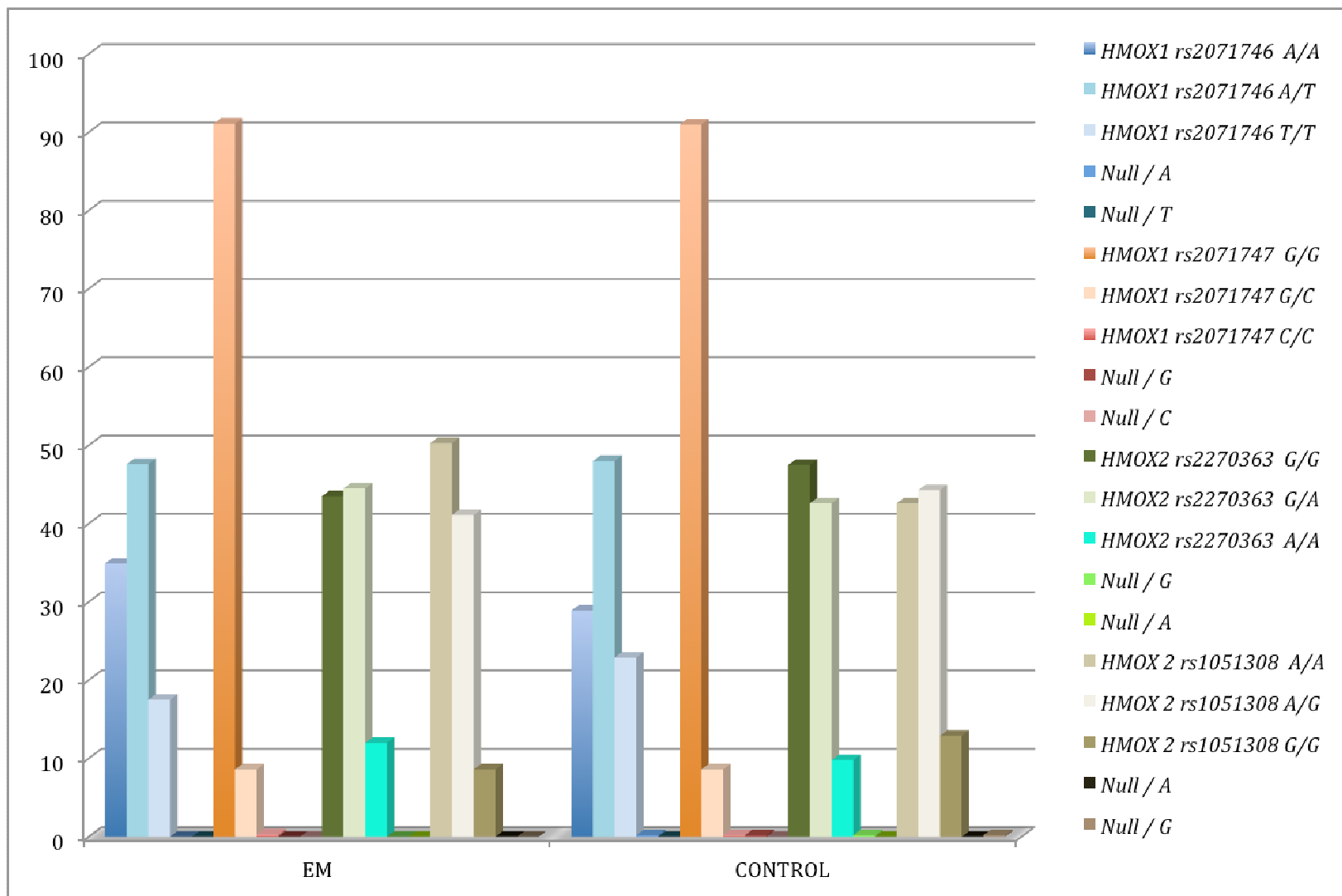


Imagen 31b Histograma de barras que compara las frecuencias encontradas de cada genotipo entre pacientes y controles

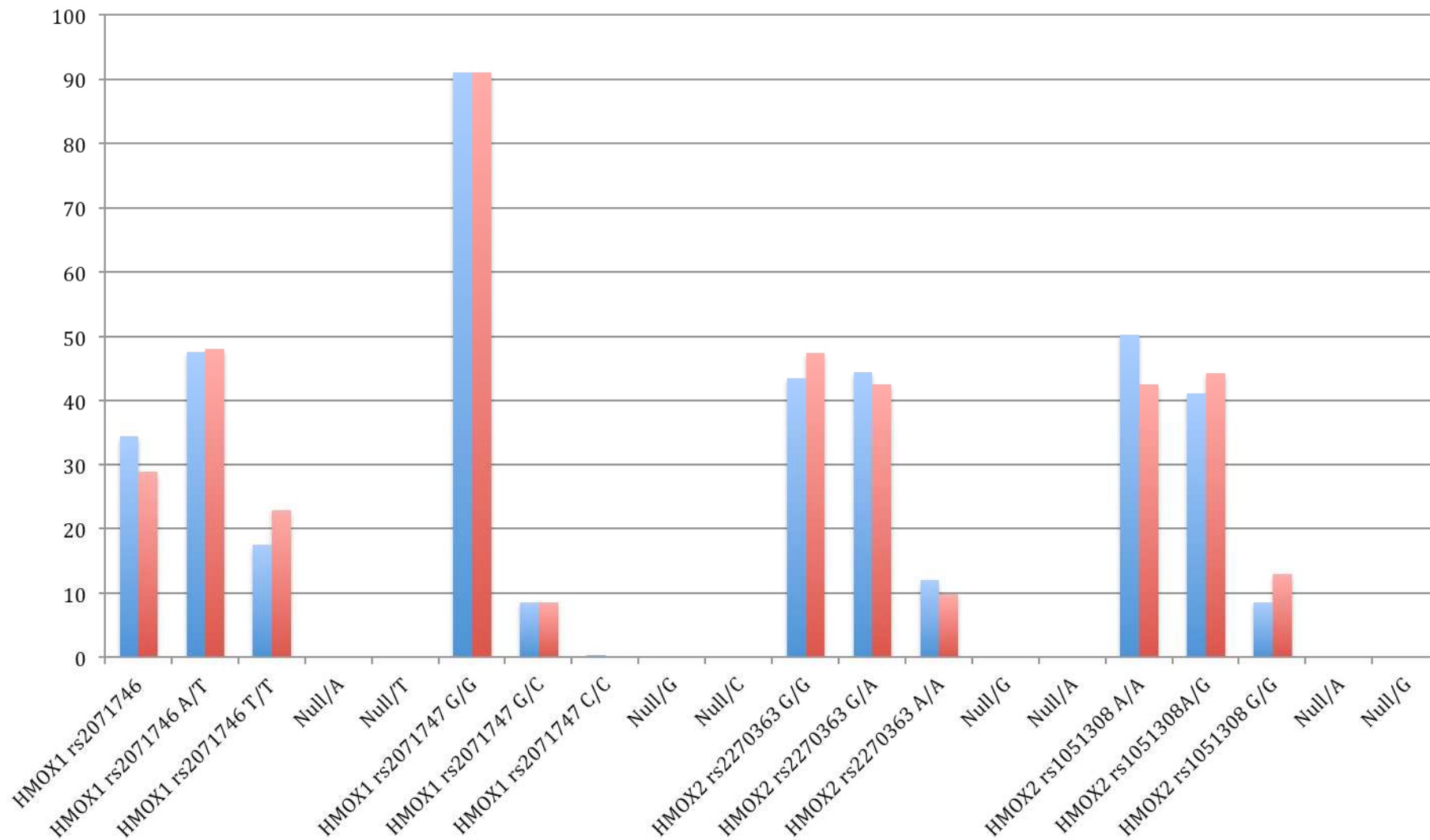


Imagen 31c. Representación de las frecuencias genotípicas entre pacientes y controles.

ALELOS	EM N:292, 584 alelos		CONTROLES N=533, 1065 alelos		Odd ratio (CI 95%)	p	pc	VPN (CI 95%)
	n	Porcentaje (DE)	n	Porcentaje (DE)				
<b>HMOX1 rs2071746</b>								
A	343	58.7% (54.7-62.7)	565	53% (50-56)	1,26 (1.02-1,56)	<b>0.025</b>	<b>0.063</b>	0.68(0.65-0.70)
T	241	41.3% (37.3-45.3)	501	47% (44-50)	0.79(0.64-0.98)	<b>0.025</b>	<b>0.063</b>	0.62(0.60-0.64)
<b>HMOX1 rs2071747</b>								
G	557	95.4% (93.7-97.1)	1017	95.5% (94.2-96.7)	0.97 (0.59-1.62)	0.914	0.914	0.64(0.52-0.74)
C	27	4.6 % (2.9-6.3)	48	4.5% (3.3-5.8)	1.03 (0.62-1.71)	0.914	0.914	0.65(0.64-0.65)
<b>HMOX2 rs2270363</b>								
G	384	65.8 %(61.9-69.6)	734	68.9 %(66.1-71.7)	0.87 (0.7-1.08)	0.188	0.313	0.62(0.59-0.66)
A	200	34.2 %(30.4-38.1)	331	31.1% (28.3-33.9)	1.16 (0.93-1.44)	0.188	0.313	0.66(0.64-0.67)
<b>HMOX2 rs1051308</b>								
A	414	70.9 %(67.2-74.6)	690	64.8% (61.9-67.7)	1.32 (1.06-1.66)	<b>0.012</b>	<b>0.060</b>	0.69(0.65-0.72)
G	170	29.1 %(25.4-32.8)	375	35.2% (32.3-38.1)	0.76 (0.60-0.95)	<b>0.012</b>	<b>0.060</b>	0.63(0.61-0.64)
HMOX1 nulo	0	-	1	0.1% (0.1-0.3)	.00 (0.00-31.61)	0.459	0.573	0.65(0.65-0.65)
HMOX2 nulo	0	-	1	0.1% (0.1-0.3)	.00 (0.00-31.61)	0.459	0.573	0.65(0.65-0.65)

Tabla 18. Frecuencia de las variantes alélicas en pacientes con EM y controles.

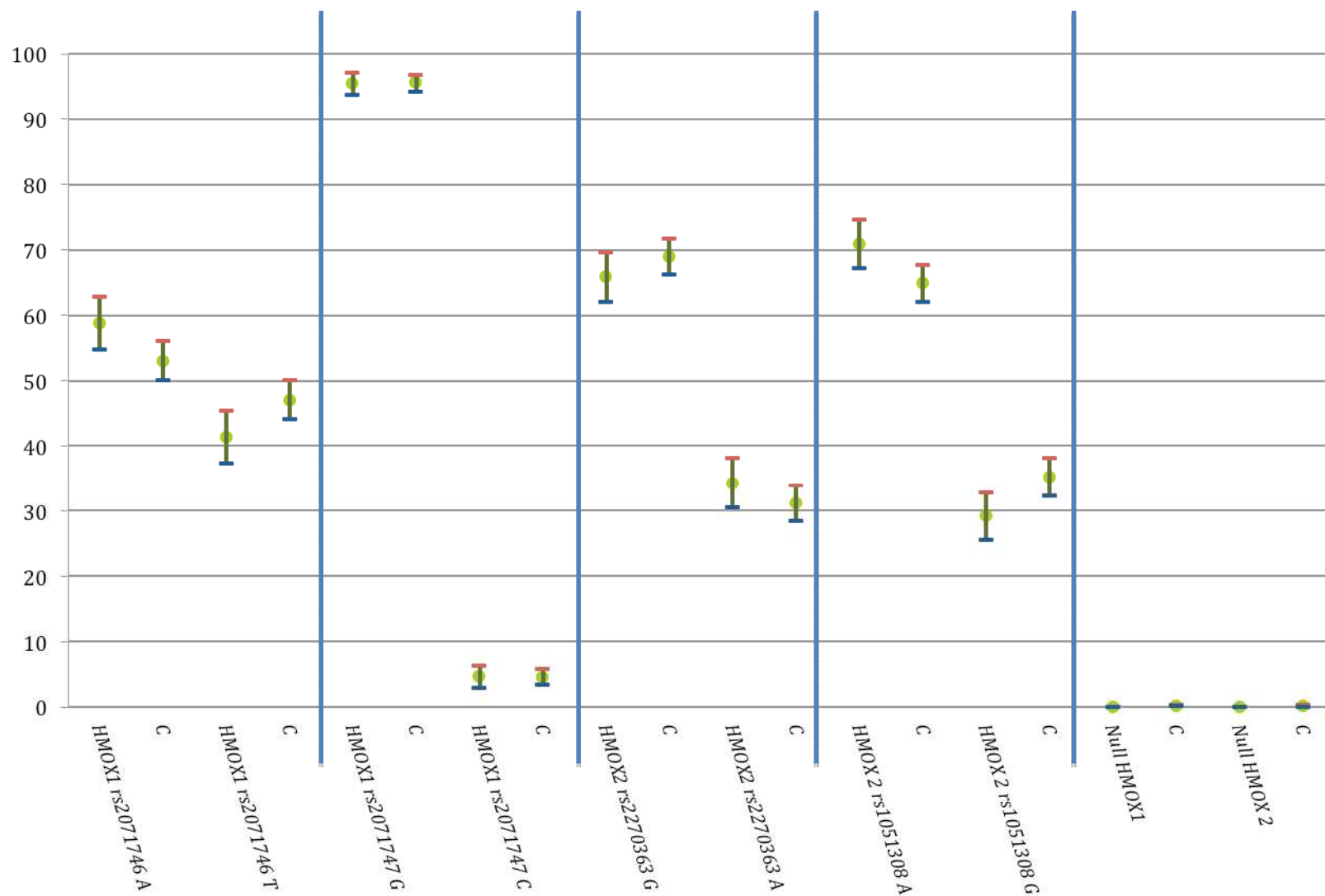


Imagen 32a. Representación de las frecuencias alélicas entre pacientes (alelo) y controles (C). Se indica el valor medio y desviación estándar para cada alelo.

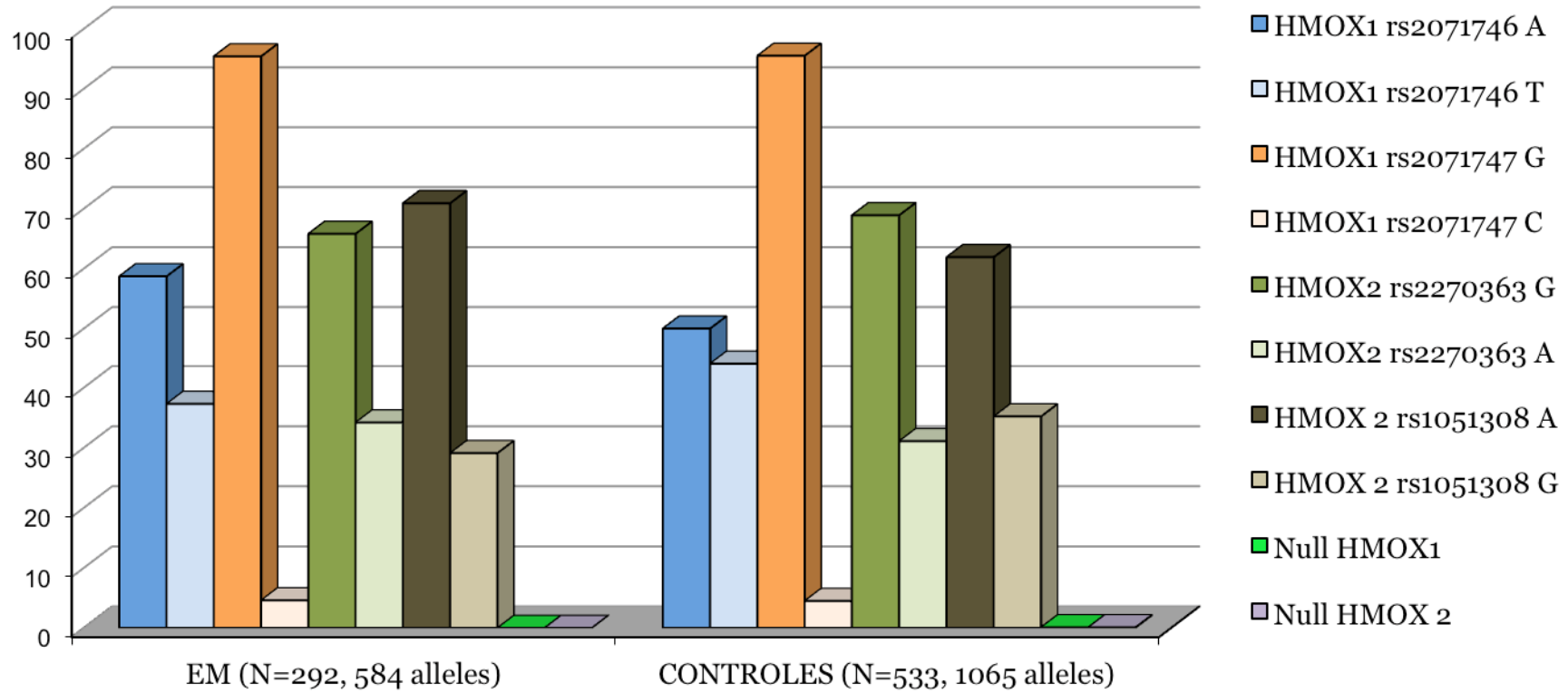


Imagen 32b. Histograma de barras representando las frecuencias alélicas entre pacientes con EM y controles.

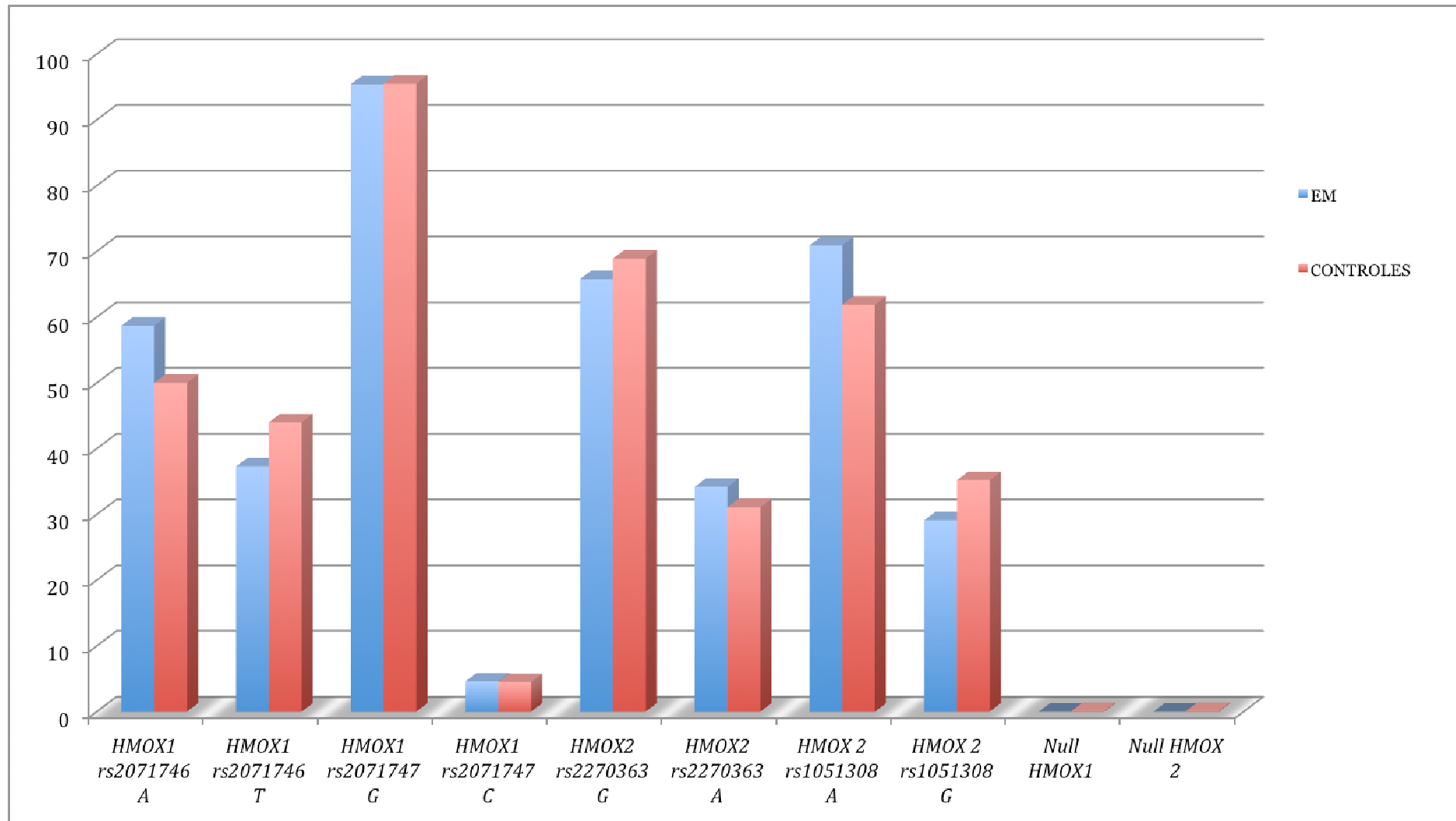


Imagen 32c. Histograma de barras representando las frecuencias de cada una de las variantes alélicas en pacientes frente EM y controles..



### **3.1. SUBANALISIS DE LOS SNP *rs2071746* y *rs2071747* DEL GEN *HMOX1* y *rs2270363* y *rs1051308* DEL GEN *HMOX2* POR SEXO**

Cuando se segrega por sexo el análisis de los SNPs de *HMOX1* y *HMOX2* se obtienen datos discordantes.

En el análisis de genotipos, los genotipos *rs1051308AA* y *rs1051308GG* del gen *HMOX2* mostraron sobrerrepresentación en el grupo de hombres entre pacientes de EM y controles respectivamente en el análisis univariante y casi manteniendo la significación en el análisis multivariante (p 0.072). Sin embargo estos mismos genotipos de *HMOX2* en el grupo de mujeres y el resto de genotipos en ambos géneros no mostraron diferencias significativas ni tendencias de diferenciación entre pacientes y controles.

En el análisis de frecuencias alélicas, los alelos *HMOX2 rs1051308A* y *rs1051308G* mostraron diferencias significativas en el análisis uni y multivariante (p 0.008) en el grupo de hombres siendo más representado entre pacientes el primero y entre controles el segundo. Estos mismos alelos no mostraron diferencias entre mujeres. Sin embargo los alelos *HMOX1 rs2071746A* y *HMOX1 rs2071746T* mostraron diferencias significativas entre mujeres afectas de EM y controles sin que se mantuvieran dichas diferencias en el análisis multivariante. Finalmente *HMOX2 rs2270363A* y *HMOX2 rs2270363G* mostraron una tendencia no significativa (p 0.08) a estar sobrerrepresentados entre pacientes de EM (alelo A) y controles (alelo G).

GENOTIPO MUJERES	EM N:201; 402 alelos		CONTROL N=367; 734 alelos		Odd ratio (CI 95%)	p	Pc	VPN (CI 95%)
	n	Porcentaje. Intervalo confianza	n	Porcentaje. Intervalo confianza				
<b>HMOX1 rs 2071746</b>								
A/A	69;	34.3% (27.8-40.9)	101	27.5% (23.0-32.1)	1.38 (0.93-2.03)	0.091	0.396	0.67(0.64-0.70)
A/T	98	48.8% (41.8-55.7)	182	49.6% (44.5-54.7)	0.97 (0.68-1.39)	0.849	0.858	0.67(0.64-0.68)
T/T	34	16.9% (11.7-22.1)	84	22.9% (18.6-27.2)	0.69 (0.43-1.09)	0.094	0.396	0.63(0.60-0.67)
<b>HMOX1 rs2071747</b>								
G/G	181	90% (85.9-94.2)	334	91.0% (88.1-93.9)	0.89 (0.48-1.67)	0.708	0.858	0.62(0.49-0.75)
G/C	19	9.5% (5.4-13.5)	32	8.7% (5.8-11.6)	1.09 (0.58-2.06)	0.770	0.858	0.65(0.65-0.65)
C/C	1	0.5% (0.5-1.5)	1	0.3% (0.3-0.8)	1.83 (0.05-67.24)	0.665	0.858	0.65(0.65-0.65)
<b>HMOX2 rs2270363</b>								
G/G	85	42.3% (35.5-49.1)	175	47.7% (42.6-52.8)	0.80 (0.56-1.15)	0.218	0.654	0.62((0.59-0.66)
G/A	87	43.3%(36.4-50.1)	156	42.5% (37.4-47.6)	1.03 (0.72-1.48)	0.858	0.858	0.65(0.61-0.69)
A/A	29	14.4% (9.6-19.3)	36	9.8% (6.8-12.9)	1.55 (0.89-2.7)	0.099	0.396	0.66(0.64-0.67)
<b>HMOX2 rs1051308</b>								
A/A	94	46.8% (39.9-53.7)	158	43.1% (38.0-48.1)	1.16 (0.81-1.67)	0.395	0.858	0.66(0.63-0.7)
A/G	85	42.3% (35.5-49.1)	161	43.9% (38.8-48.9)	0.94 (0.65-1.35)	0.716	0.858	0.63(0.6-0.66)
G/G	22	10.9% (6.6-15.3)	48	13.1% (9.6-16.5)	0.82 (0.46-1.44)	0.460	0.858	0.64(0.63-0.66)

Tabla 19. Genotipos *HMOX1* y *HMOX2* en mujeres con EM y en mujeres control. Las variantes nulas han sido excluidas al no ser relevantes como factor de riesgo potencial dado el número de copia

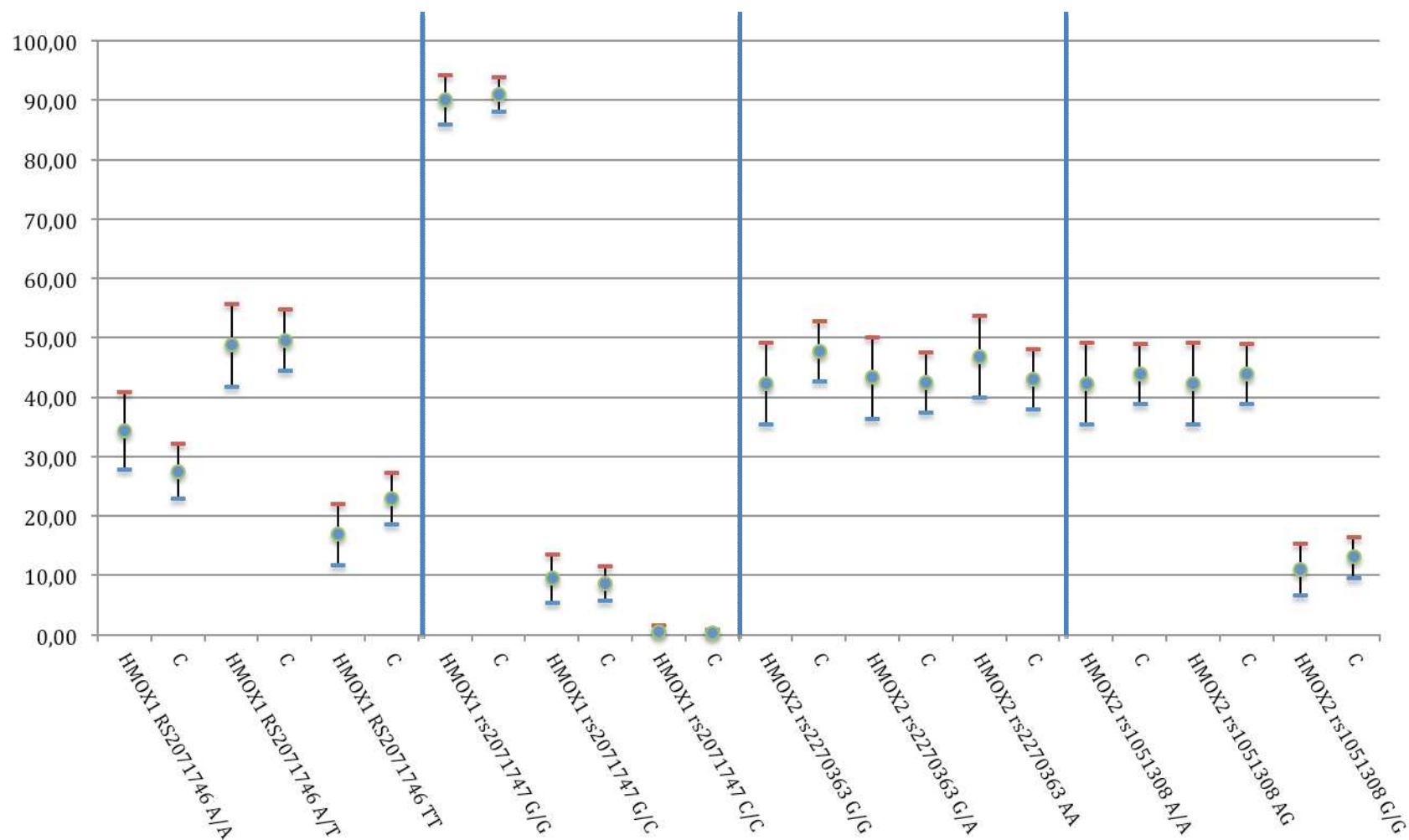


Imagen 33a. Representación de las diferentes frecuencias genotípicas entre pacientes y controles mujeres. Se muestra la frecuencia media y desviación estándar para cada valor.

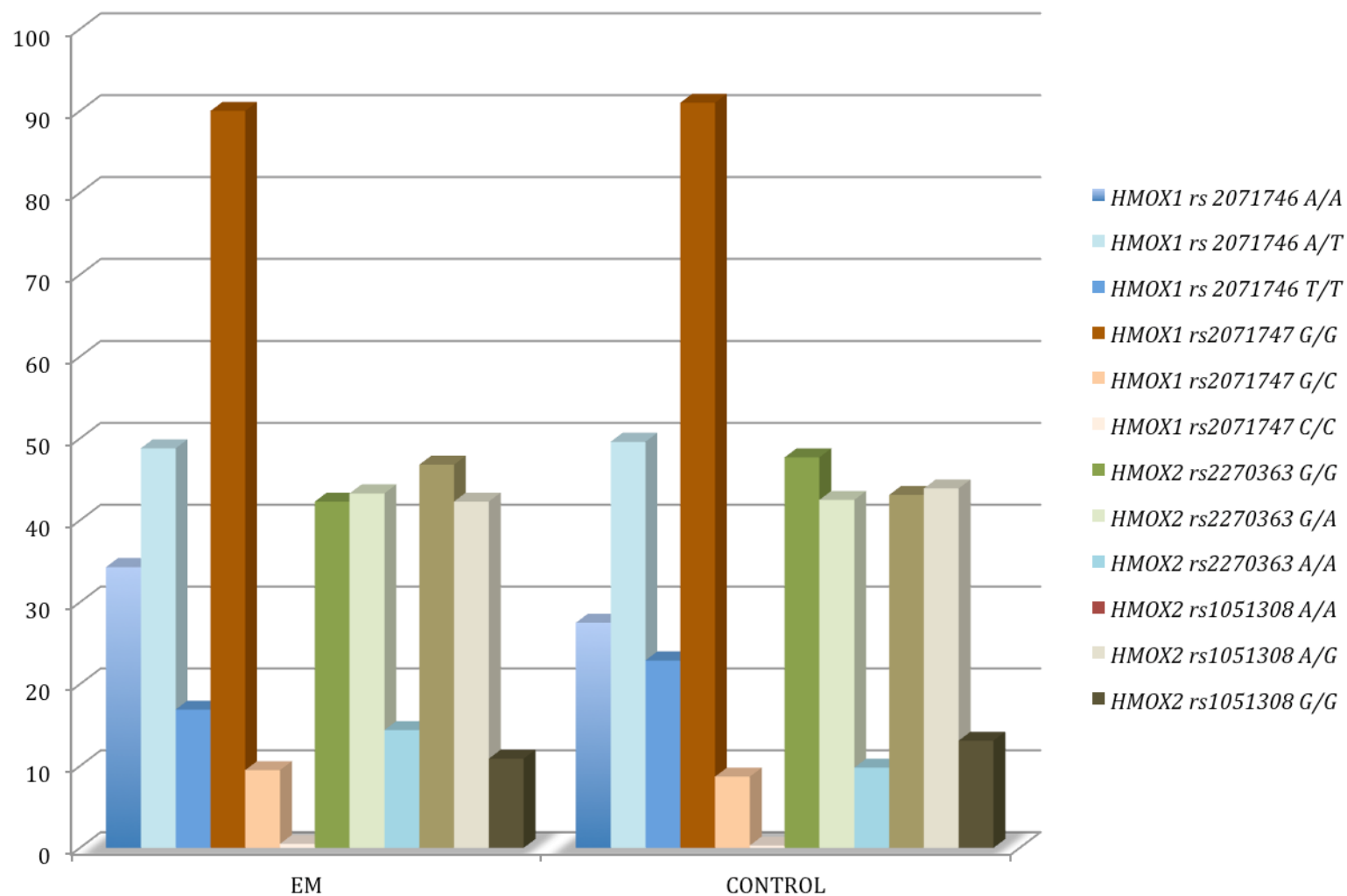


Imagen 33b. Histograma de barras representando las frecuencias genotípicas entre mujeres afectas y controles.

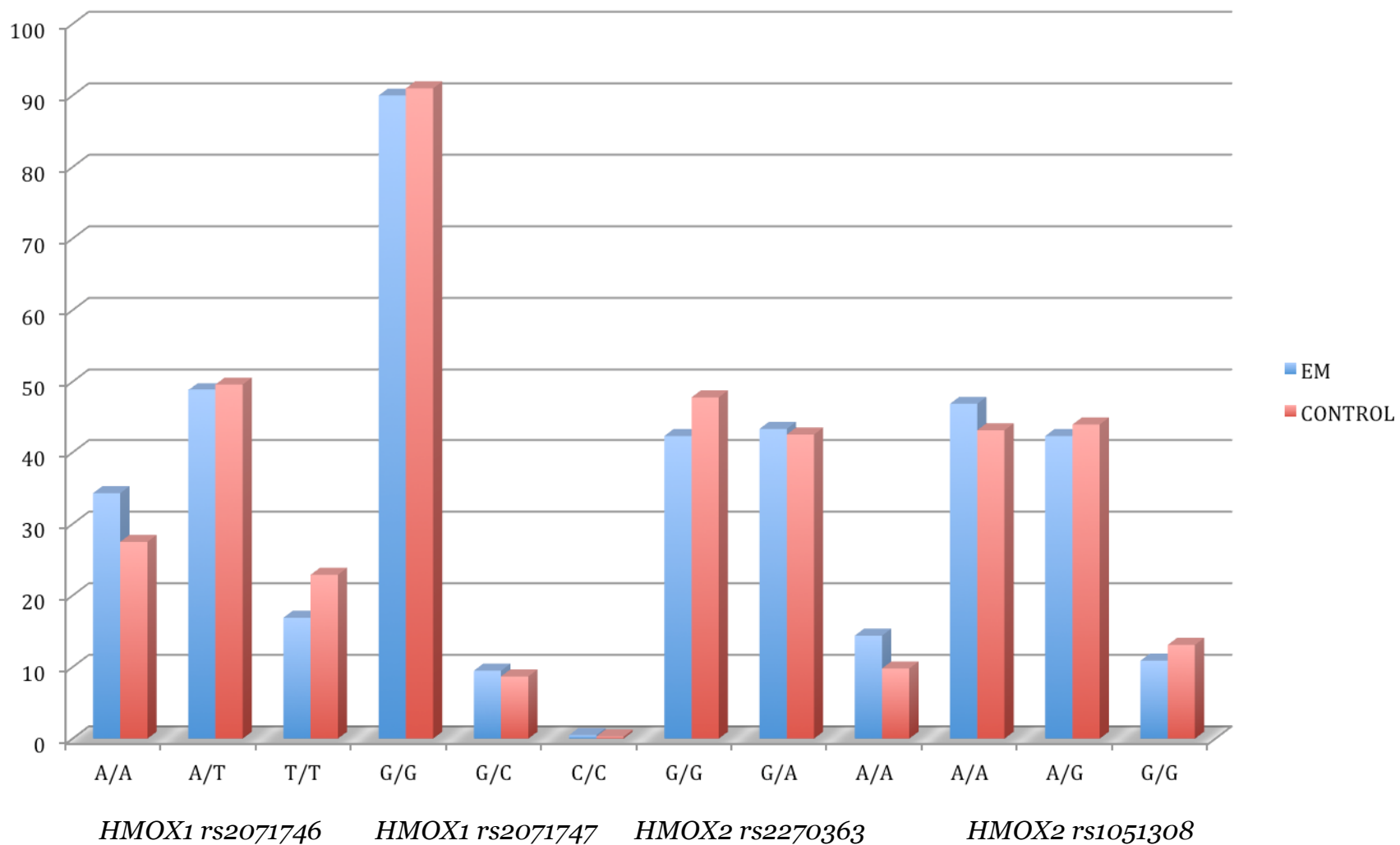


Imagen 33c. Histograma de barras representando las frecuencias de cada genotipo en mujeres afectas frente controles.

GENOTIPO HOMBRES	EM N=91; 182 alelos		CONTROL N=165; 332 alelos		Odd ratio (CI 95%)	p	pc	VPN (CI 95%)
	n	Porcentaje. Intervalo confianza	n	Porcentaje. Intervalo confianza				
<b>HMOX1 rs2071746</b>								
A/A	33	36.3% (26.4-46.1)	53	32.1% (25.0-39.2)	1.20(0.68-2.13)	0.503	0.721	0.66(0.62-0.70)
A/T	41	45.1% (34.8-55.3)	74	44.8% (37.3-52.4)	1.01(0.58-1.74)	0.097	0.975	0.65(0.59-0.70)
T/T	17	18.7% (10.7-26.7)	38	23.0% (16.6-29.5)	0.77(0.39-1.52)	0.418	0.721	0.63(0.60-0.67)
<b>HMOX1 rs2071747</b>								
G/G	85	93.4% (88.3-98.5)	151	91.5% (87.3-95.8)	1.31(0.45-4.00)	0.590	0.721	0.70(0.47-0.83)
G/C	6	6.6% (1.5-11.7)	14	8.5% (4.2-12.7)	0.76(0.25-2.22)	0.59	0.721	0.64(0.63-0.66)
C/C	0	0.0%(0.0-0.0)	0	0.0%(0.0-0.0)	-	-	-	-
<b>HMOX2 rs2270363</b>								
G/G	42	46.2% (35.9-56.4)	78	47.3% (39.7-54.9)	0.96 (0.55-1.85)	0.864	0.959	0.64((0.58-0.70)
G/A	43	47.3% (37.0-57.5)	71	43.0% (35.5-50.6)	1.19(0.69-2.05)	0.518	0.721	0.66(0.61-0.72)
A/A	6	6.6% (1.5-11.7)	16	9.7% (5.2-14.2)	0.66(0.22-1.88)	0.397	0.721	0.64(0.62-0.66)
<b>HMOX2 rs1051308</b>								
A/A	53	58.2%(48.1-68.4)	69	41.8% (34.3-49.3)	1.94(0.12-3.37)	<b>0.012</b>	<b>0.072</b>	0.72(0.66-0.77)
A/G	35	38.5% (28.5-48.5)	75	45.5% (37.9-53.1)	0.75(0.43-1.31)	0.280	0.721	0.62(0.58-0.67)
G/G	3	3.3% (0.4-7.0)	21	12.7% (7.6-17.8)	0.23(0.06-0.86)	<b>0.013</b>	<b>0.072</b>	0.62(0.61-0.64)

Tabla 20. Genotipos *HMOX1* y *HMOX2* en varones con EM y controles. Se han obviado los genotipos nulo

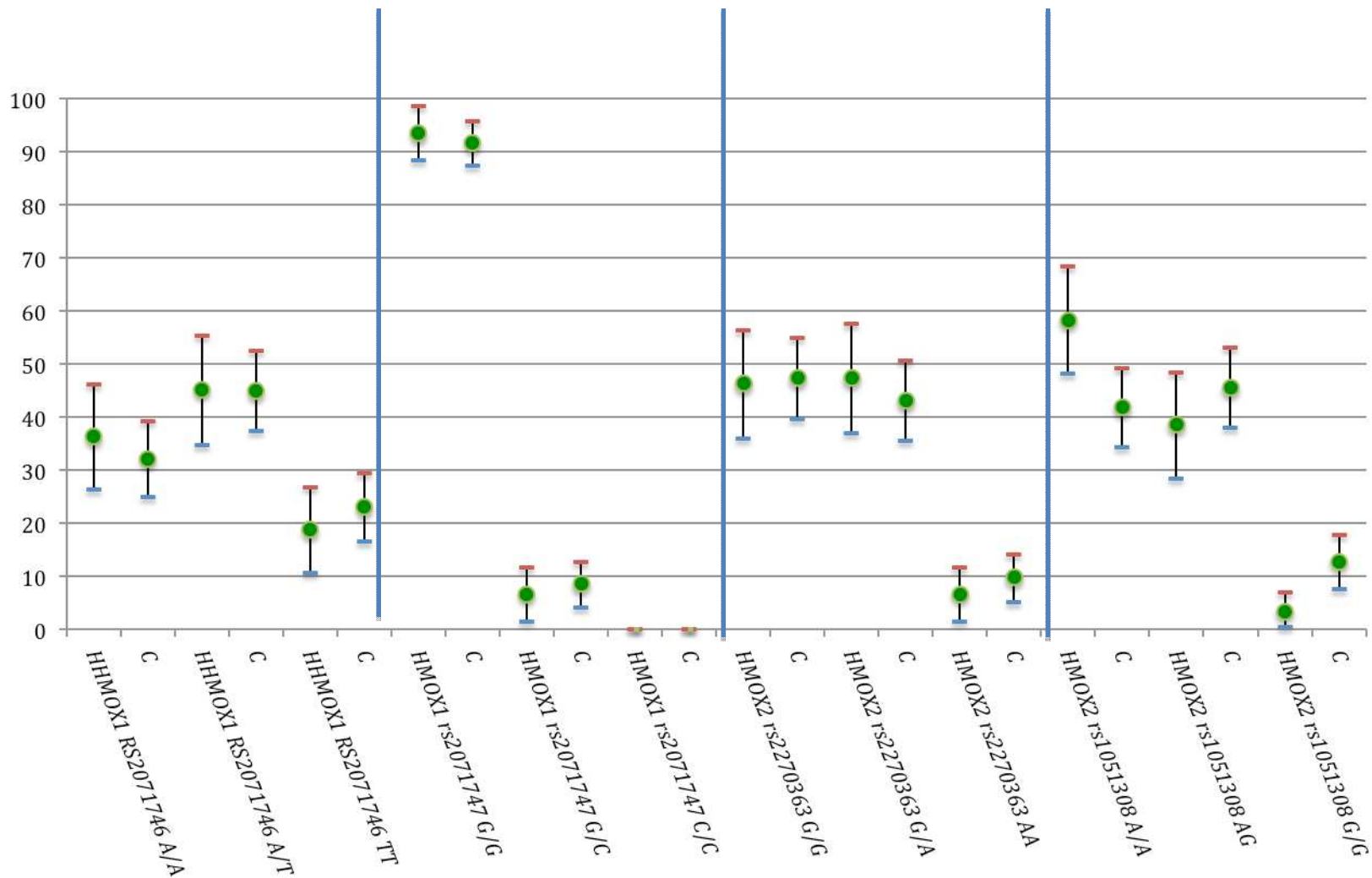


Imagen 34a. Histograma de distribución de la media e intervalo de confianza de la frecuencia de cada genotipo en varones frente a controles. Se representa el valor medio y la desviación estándar

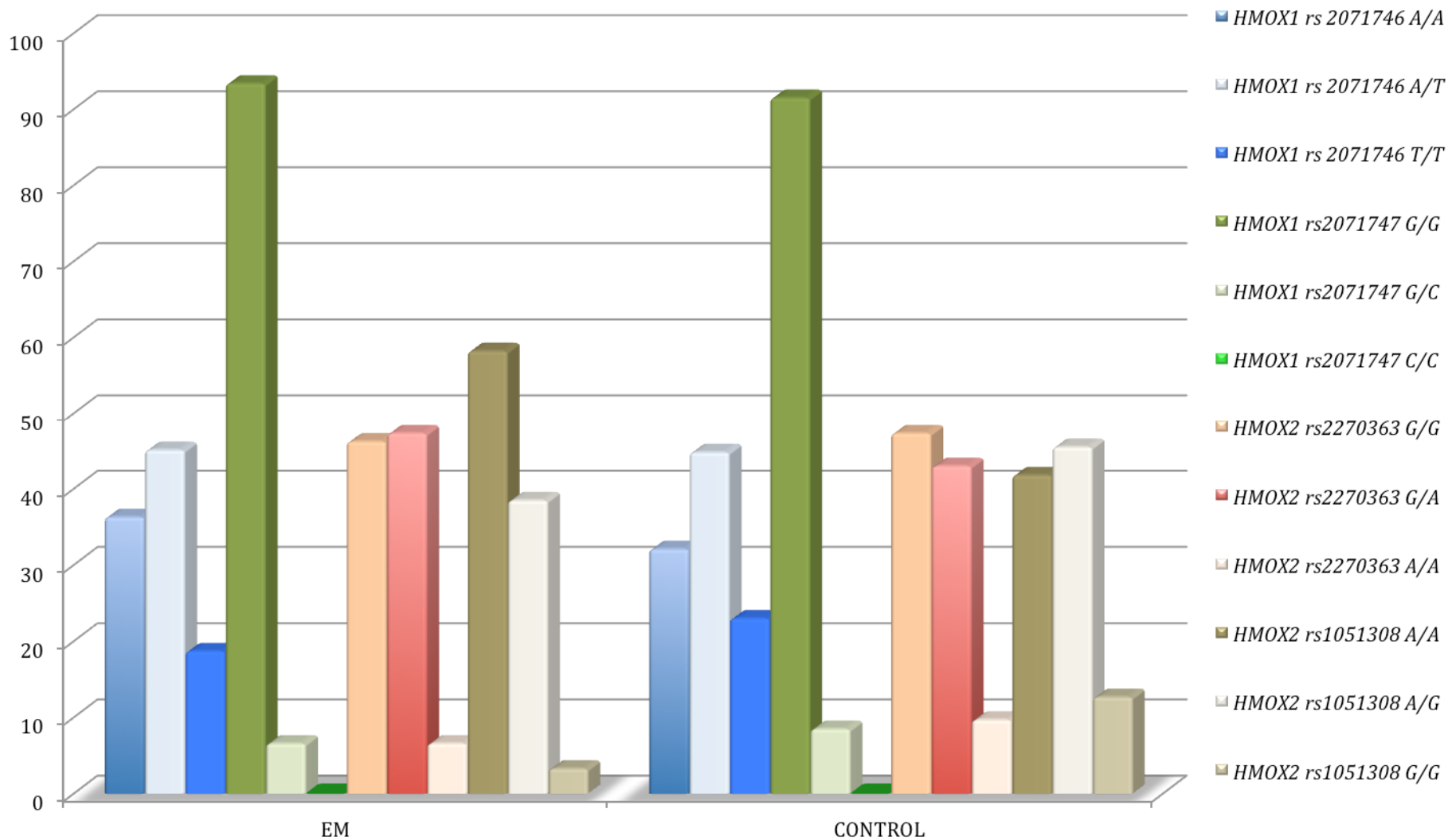


Imagen 34b. Histograma de distribución de los distintos genotipos en hombres con EM frente a controles



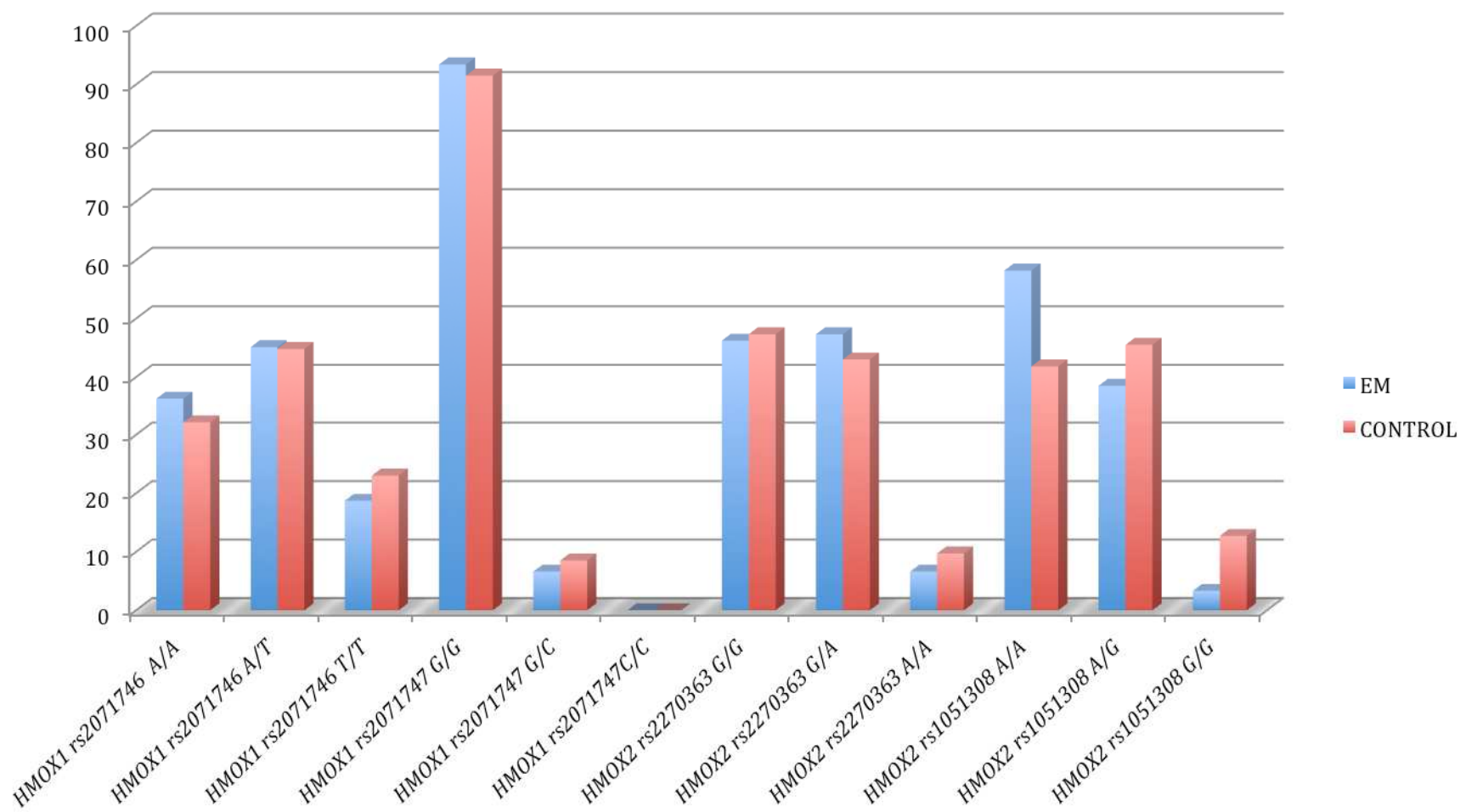


Imagen 34c. Histograma en el que se presenta comparativamente la frecuencia de cada genotipo en varones con EM frente a controles

ALELOS MUJERES	EM N:201; 402 alelos		CONTROL N=367; 734 alelos		Odd ratio (CI 95%)	p	Pc	VPN (CI 95%)
	n	Porcentaje. Intervalo confianza	n	Porcentaje. Intervalo confianza				
<b>HMOX1 rs2071746</b>								
A	236	58.7% (53.9-63.5)	384	52.3% (48.7-55.9)	1.30 (1.01-1.67)	<b>0.039</b>	0.156	0.68 (0.65-0.71)
T	166	41.3% (36.5-46.1)	350	47.7% (44.1-51.3)	0.77 (0.60-0.99)	<b>0.039</b>	0.156	0.62 (0.59-0.65)
<b>HMOX1 rs2071747</b>								
G	381	94.8% (92.6-97.0)	700	95.4% (93.8-96.9)	0.88 (0.49-1.60)	0.657	0.657	0.62 (0.48-0.74)
C	21	5.2% (3.0-7.4)	34	4.6% (3.1-6.2)	1.14 (0.63-2.05)	0.657	0.657	0.65 (0.64-0.66)
<b>HMOX2 rs2270363</b>								
G	257	63.9% (59.2-68.6)	506	68.9% (65.6-72.3)	0.80 (0.61-1.04)	<b>0.086</b>	0.172	0.61 (0.57-0.65)
A	145	36.1% (31.4-40.8)	228	31.1% (27.7-34.4)	1.25 (0.96-1.63)	<b>0.086</b>	0.172	0.66 (0.64-0.68)
<b>HMOX2 rs1051308</b>								
A	273	67.9% (63.3-72.5)	477	65.0% (61.5-68.4)	1.14 (0.87-1.49)	0.320	0.427	0.67 (0.63-0.71)
G	129	32.1% (27.5-36.7)	257	35.0% (31.6-38.5)	0.88 (0.67-1.15)	0.320	0.427	0.64 (0.62-0.66)

Tabla 21. Distribución de variantes alélicas del gen *HMOX2* en controles y pacientes con EM del sexo femenino

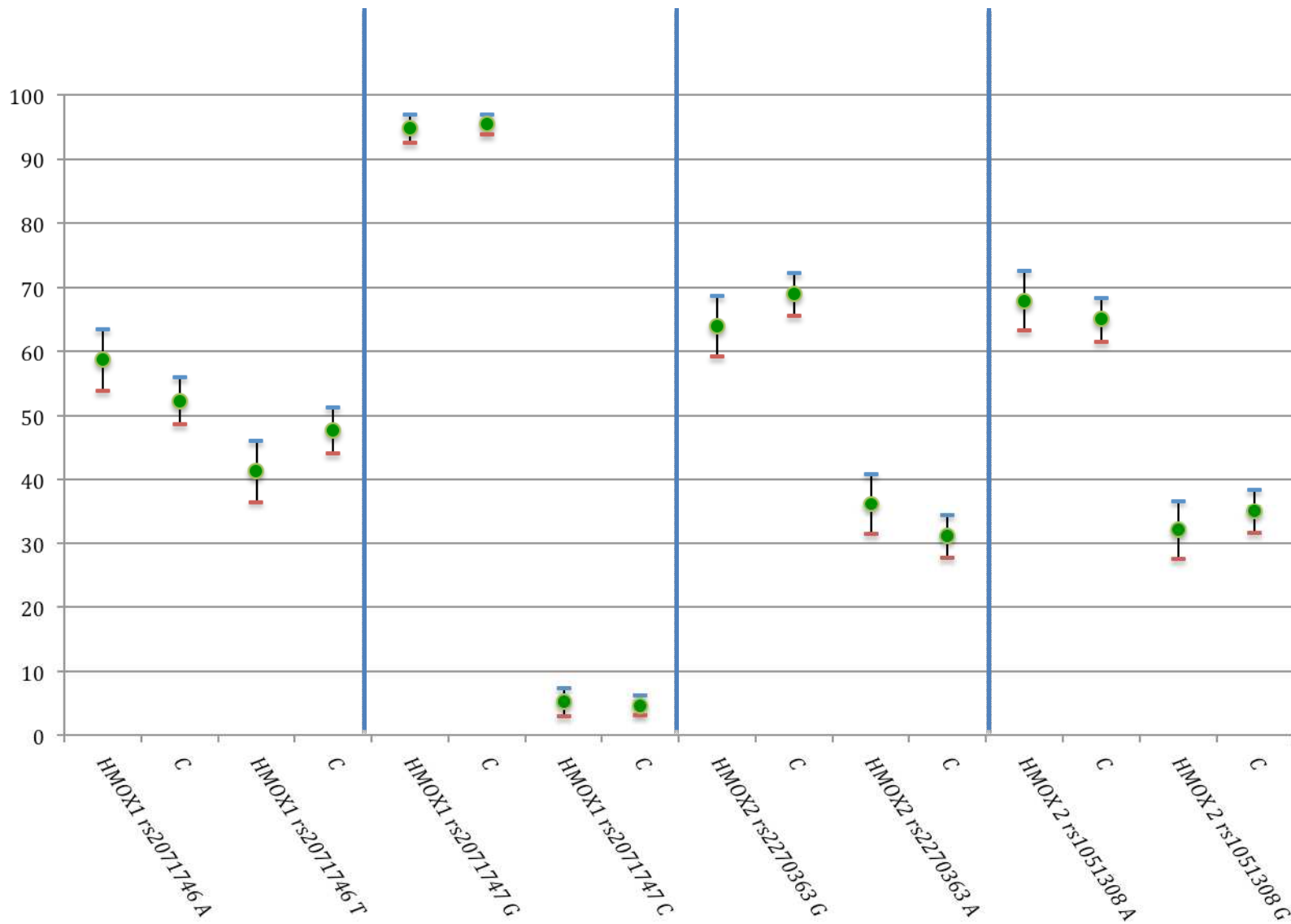


Imagen 35a. Histograma de distribución de las variantes alélicas de los genes *HMOX1* y *HMOX2* en mujeres. Se muestran los datos con valor medio y su desviación estándar.

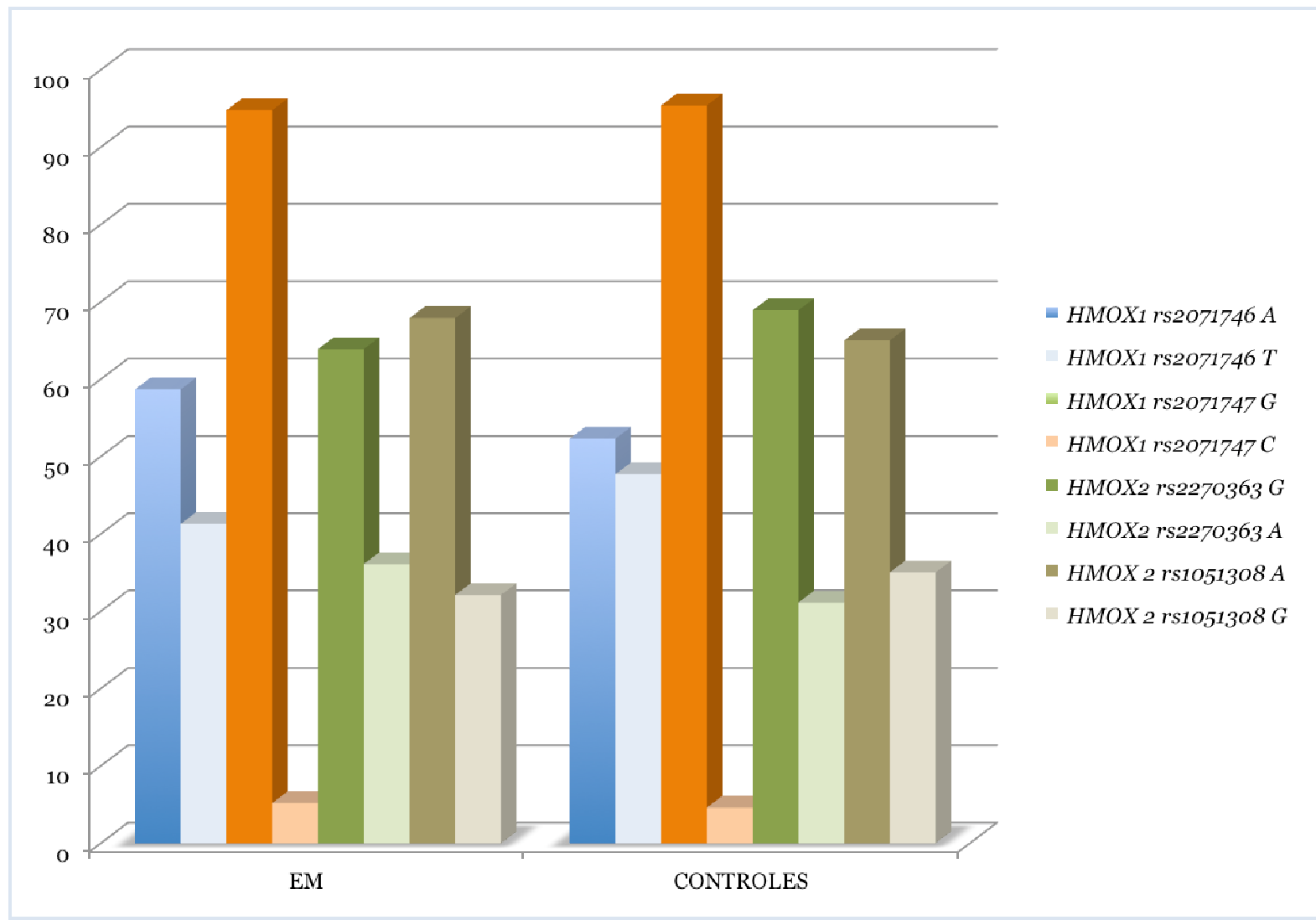


Imagen 35b. Distribución de las distintas variables alélicas en mujeres con EM y en controles

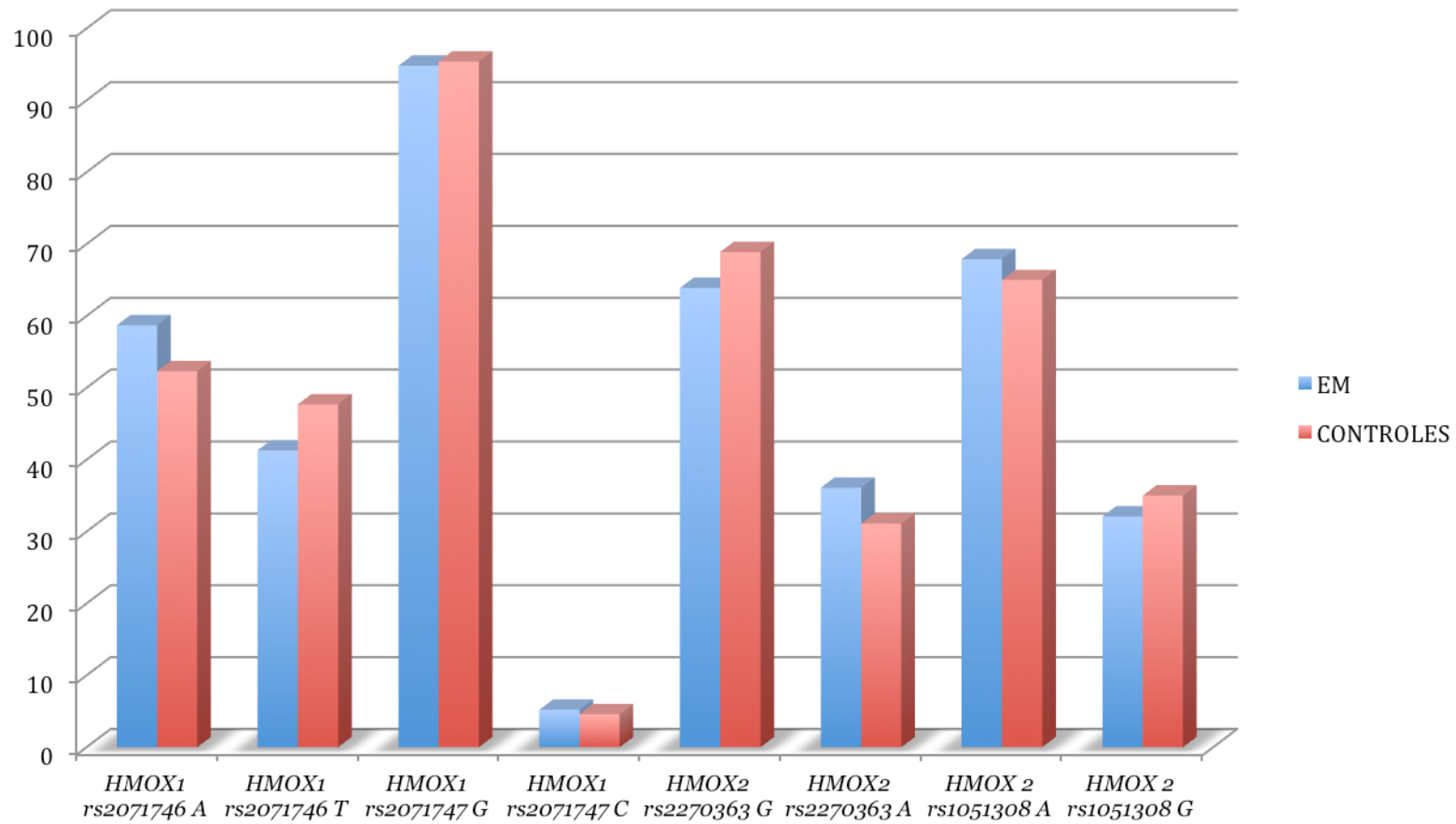


Imagen 35c. Representación en diagrama de barras de las frecuencias de las distintas variantes alélicas en pacientes frente a controles

ALELOS HOMBRES	EM N=91; 182 alelos Total Porcentaje Intervalo confianza	CONTROL N=165; 332 alelos Total Porcentaje Intervalo confianza	Odd ratio (CI 95%)	p	pc	VPN+ (CI 95%)
<b><i>HMOX1 rs2071746</i></b>						
A	107; 58.8% (51.6-65.9)	180; 54.5% (49.2-59.9)	1.19 (0.81-1.74)	0.355	0.710	0.67 (0.62-0.72)
T	75; 41.2% (34.1-48.4)	150; 45.5% (40.1-50.8)	0.84 (0.57-1.23)	0.355	0.710	0.63 (0.59-0.67)
<b><i>HMOX1 rs2071747</i></b>						
G	176; 96.7% (94.1-99.3)	316; 95.8% (93.6-97.9)	1.30 (0.46-3.86)	0.597	0.796	0.70(0.46-0.87)
C	6 ; 3.3 (0.7-5.9)	14; 4.2% (2.1-6.4)	0.77 (0.26-2.19)	0.597	0.796	0.64 (0.64-0.65)
<b><i>HMOX2 rs2270363</i></b>						
G	127 ; 69.8% (63.1-76.5)	227; 68.8% (63.8-73.8)	1.05 (0.69-1.58)	0.816	0.816	0.65 (0.59-0.72)
A	55; 30,2% (23.5-36.9)	103; 31.2% (26.2-36.2)	0.95 (0.63-1.44)	0.816	0.816	0.64 (0.61-0.67)
<b><i>HMOX2 rs1051308</i></b>						
A	141; 77.5% (71.4-83.5)	213; 64.5% (59.4-69.7)	1.89 (1.22-2.92)	<b>0.002</b>	<b>0.008</b>	0.74(0.68-0.80)
G	41; 22.5% (16.5-28.6)	117 ; 35.5% (30.3-40.6)	0.53 (0.34-0.82)	<b>0.002</b>	<b>0.008</b>	0.60(0.58-0.63)

Tabla 22. Distribución de variantes alélicas de los genes *HMOX1* y *HMOX2* en controles varones y pacientes con EM varones

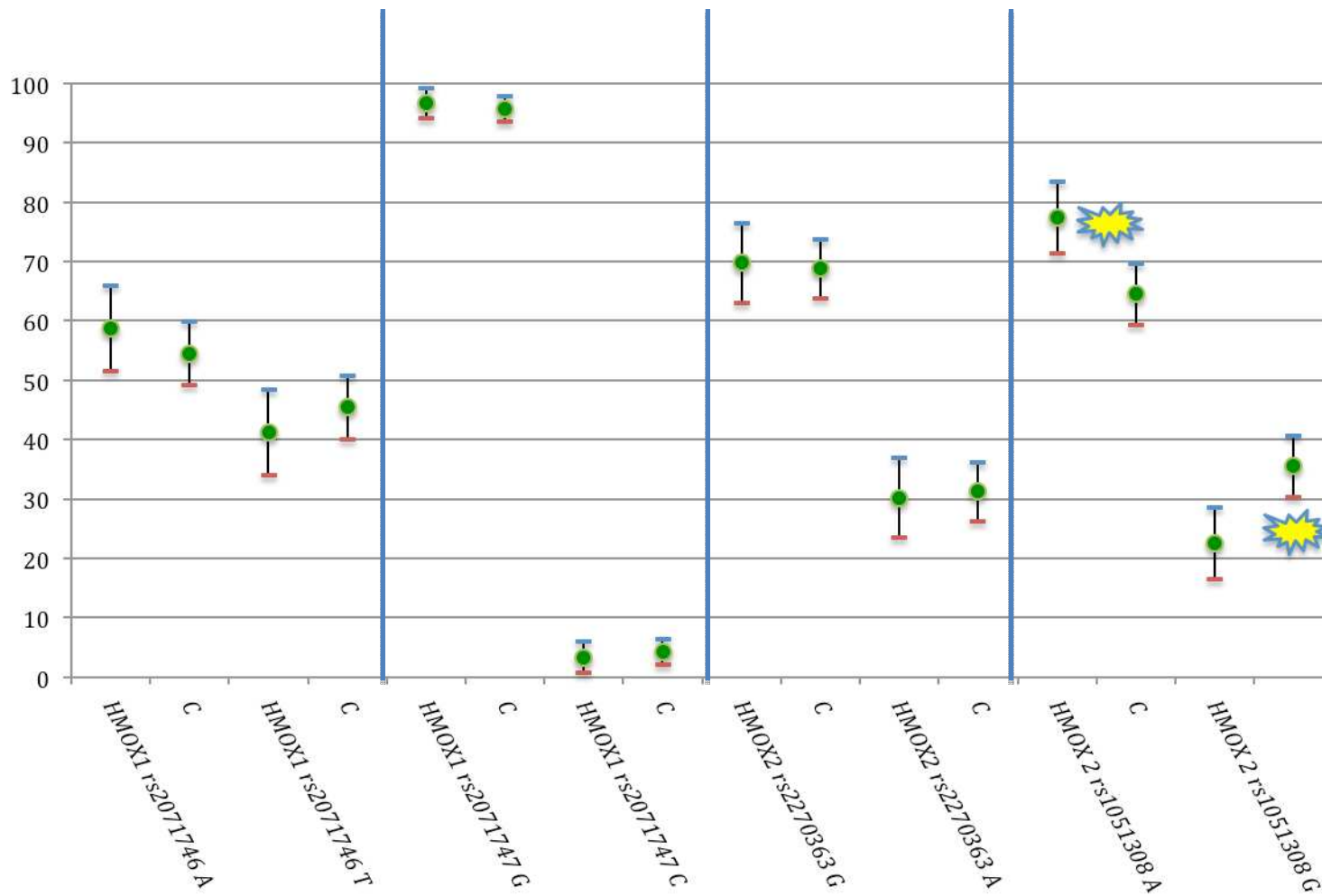


Imagen 36a. Histograma de distribución de las variantes alélicas de los genes *HMOX1* y *HMOX2* en hombres. Se muestran los datos con valor medio e intervalo de confianza.

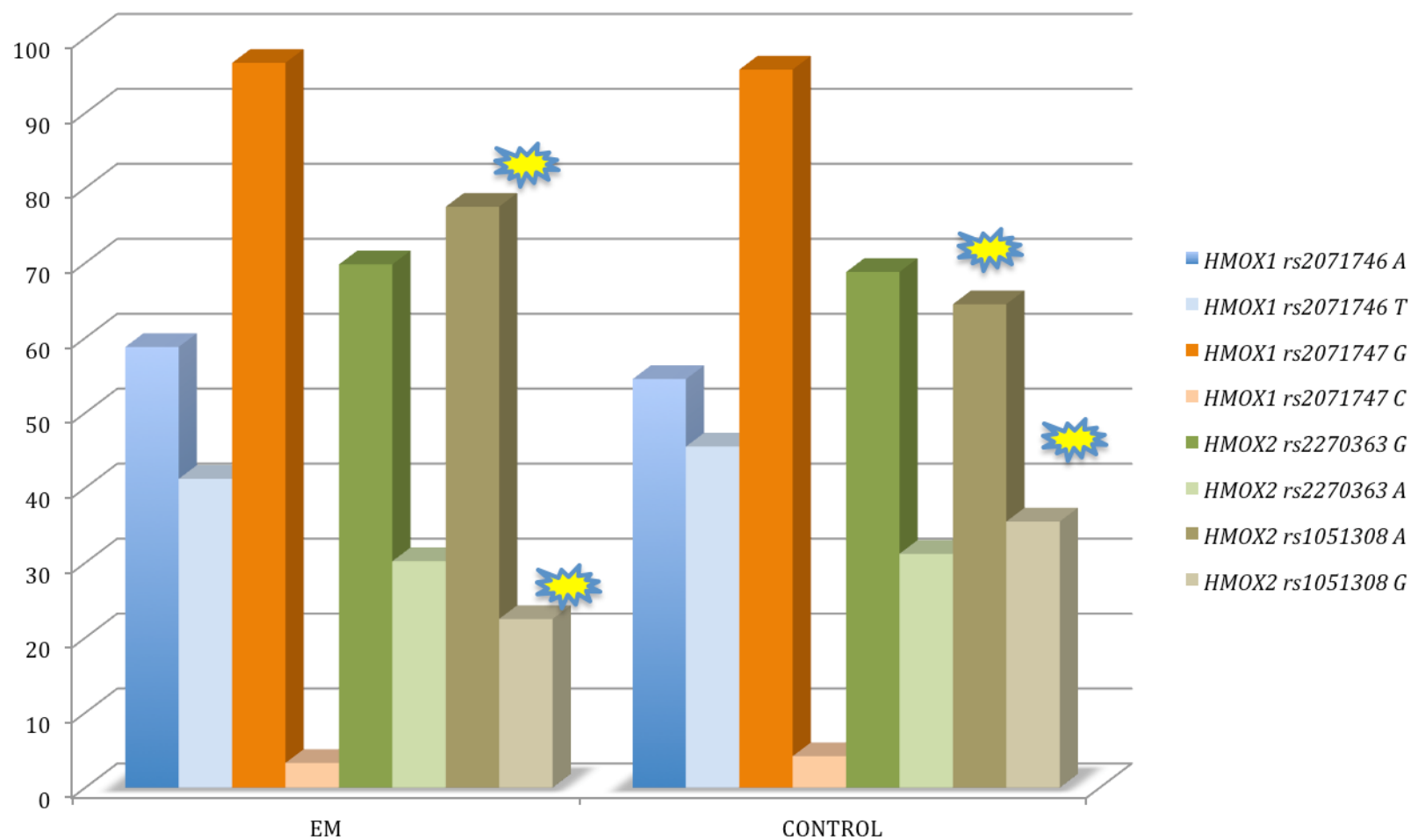


Imagen 36b. Histograma de distribución de las distintas variantes alélicas de los gen *HMOX1* y *HMOX2* en varones EM y controles.



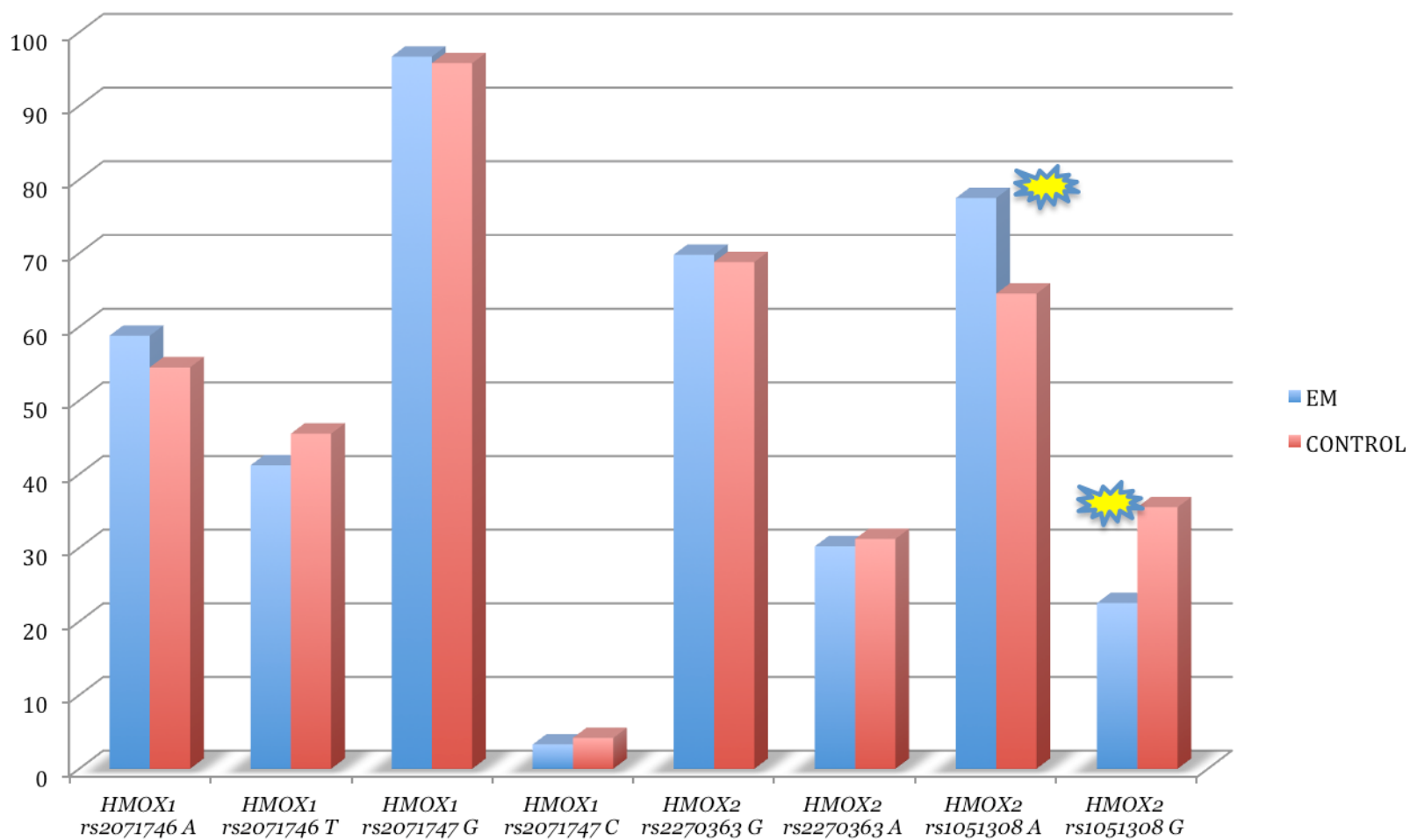


Imagen 36c. Histograma de la distribución de las distintas variables alélicas en varones controles frente a pacientes

**3.2. SUBANALISIS DE LA EDAD DE INICIO EN FUNCIÓN DE LOS  
SNP *rs2071746* y *rs2071747* DEL GEN *HMOX1* y *rs2270363* y  
*rs1051308* DEL GEN *HMOX2***

La edad media de debut no se vio modificada por la presencia de los diferentes genotipos sin que se evidenciaran diferencias significativas entre ellos. Los valores mínimo y máximo fueron para los genotipos de *HMOX2 rs1051308GG* ( $28.6 \pm 8.2$  años) y *rs1051308AG* ( $33.4 \pm 9.9$  años) respectivamente.

<i>GENOTIPOS</i>	<i>Edad media de debut (años)</i>	<i>Desviación estándar</i>
<i>rs2071746AA</i>	33.0	12.5
<i>rs2071746AT</i>	32.4	10.2
<i>rs2071746TT</i>	32.4	8.9
<i>rs2071747GG</i>	32.8	11.0
<i>rs2071747GC</i>	30.3	6.2
<i>rs2270363GG</i>	32.7	11.9
<i>rs2270363GA</i>	33.1	9.8
<i>rs2270363AG</i>	29.8	9.1
<i>rs1051308AA</i>	32.5	11.6
<i>rs1051308AG</i>	33.4	9.9
<i>rs1051308GG</i>	28.6	8.2

Tabla 23. Relación entre la edad media y cada diferente genotipo de los genes *HMOX1* y *HMOX2* analizados.

### **3.3. SUBANALISIS DE LOS SNP *rs2071746* y *rs2071747* DEL GEN *HMOX1* y *rs2270363* y *rs1051308* DEL GEN *HMOX2* POR TIPO CLÍNICO DE EM**

La distribución de los genotipos de *HMOX1* y *HMOX2* así como las frecuencias alélicas fue estadísticamente similar entre las diferentes formas clínicas de la enfermedad.

GENOTIPOS	EM RR No ; % (95% CI)	EMSP No ; % (95% CI)	EMPP No (%; 95% CI)
<b><i>HMOX1 rs2071746</i></b>			
A/A	55; 35% (27.6-42.5)	29; 31.2% (21.8-40.6)	18; 42.9% (27.9-57.8)
A/T	74 ; 47.1% (39.3-54.9)	47 ; 50.5% ( 40.4-60.7)	18; 42.9 (27.9-57.8)
T/T	28; 17.8% (11.8-23.8)	17 ; 18.3% (10.4-26.1)	6; 14.3% (3.7-24.9)
<b><i>HMOX1 rs2071747</i></b>			
G/G	145 ; 92.4% (88.2-96.5)	85; 91.4% (85.7-97.1)	36; 85.7% (75.1-96.3)
G/C	11 ; 7.0% (3.0-11.0)	8; 8.6% (2.9-14.3)	6; 14.3% (3.7-24.9)
C/C	1 ; 0.6% (0.6-1.9)	0; 0.0% (0.0-0.0)	0; 0.0% (0.0-0.0)
<b><i>HMOX2 rs2270363</i></b>			
G/G	70; 44.6% (36.8-52.4)	43; 46.2% (36.1-56.4)	14; 33.3% (19.1-47.6)
G/A	65; 41.4% (33.7-49.1)	39; 41.9% (31.9-52.0)	26; 61.9% (47.2-76.6)
A/A	22; 14.0% (8.6-19.4)	11; 11.8% (5.3-18.4)	2; 4.8% (1.7-11.2)
<b><i>HMOX 2 rs1051308</i></b>			
A/A	78; 49.7% (41.9-57.5)	48; 51.8% (41.5-61.8)	21; 50.0% (34.9-65.1)
A/G	64; 40.8% (33.1-48.5)	36; 38.7% (28.8-48.6)	20; 47.6% (32.5-62.7)
G/G	15; 9.6% (5.0-14.2)	9; 9.7% (3.7-15.7)	1; 2.4% (1.2-7.0)

Tabla 24. Genotipos del gen *HMOX1* y *HMOX2* en los diferentes subgrupos de pacientes con EM. El valor de cada celda representa número, porcentaje e intervalo de confianza al 95%.

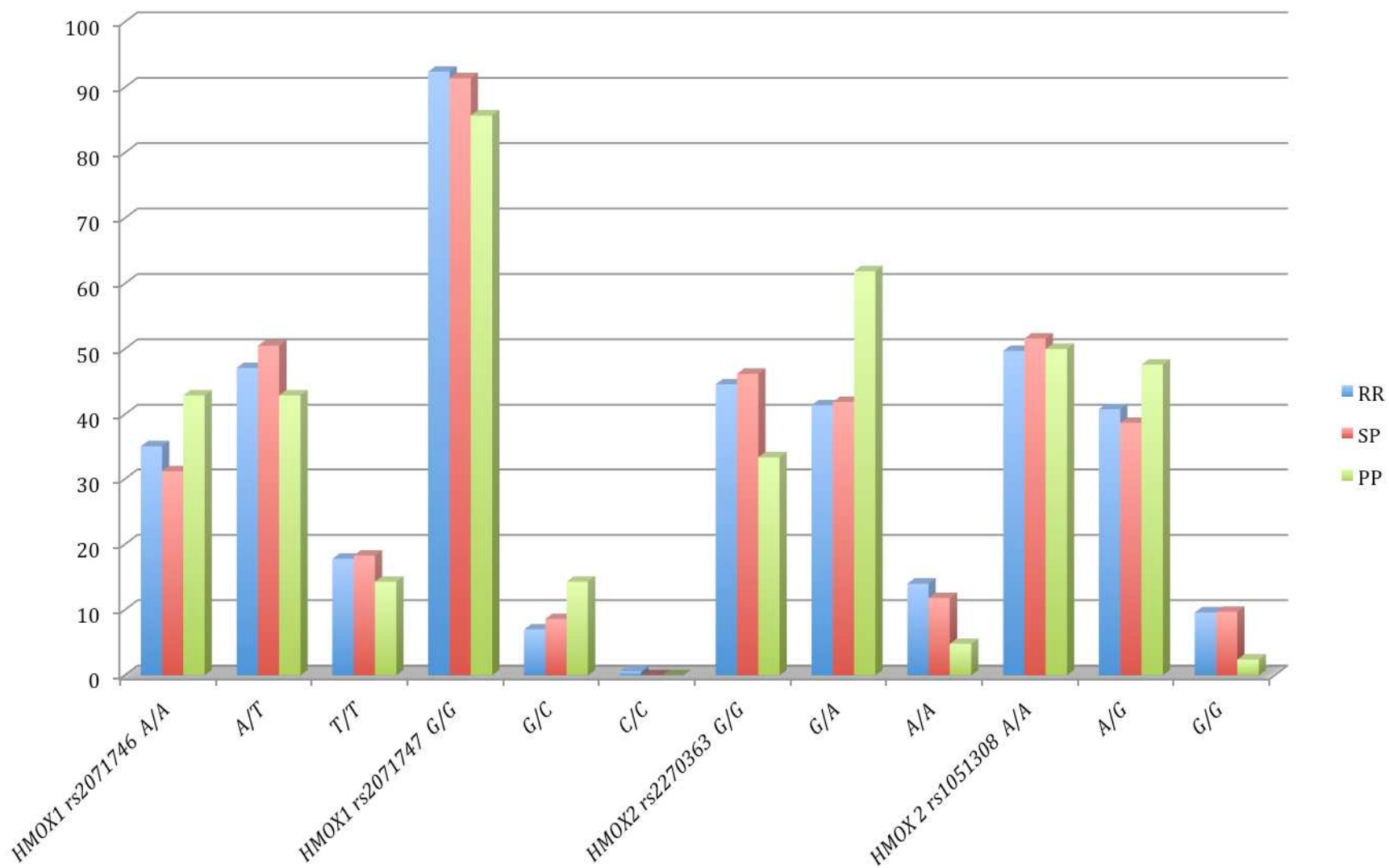


Imagen 37. Histograma de la distribución de las distintas frecuencias genotípicas en las diferentes formas de EM.

ALELOS	EMRR No ;% (95% CI)	EMSP No; % (95% CI)	EMPP No; % (95% CI)
<b><i>HMOX1 rs2071746</i></b>			
A	184; 58.6% (53.2-64.0)	105 ; 56.5% (49.3-63.6)	54; 64.3% (54.0-74.5)
T	130; 41.4% (36.0-46.8)	81; 43.5% (36.4-50.7)	30; 35.7% (25.5-46.0)
<b><i>HMOX1 rs2071747</i></b>			
G	301; 95.9% (93.7-98.1)	178; 95.7% (92.8-98.6)	78; 92.9% (87.3-98.4)
C	13; 4.1% (1.9-6.3)	8; 4.3% (1.4-7.2)	6; 7.1% (1.6-12.7)
<b><i>HMOX2 rs2270363</i></b>			
G	205; 65.3% (60.0-70.6)	125; 67.2% (60.5-74.0)	54; 64.3% (54.0-74.5)
A	109; 34.7% (29.4-40.0)	61; 32.8% (26.0-39.5)	30; 35.7% (25.5-46.0)
<b><i>HMOX 2 rs1051308</i></b>			
A	220; 70.1% (65.0-75.1)	132; 71.0% (64.4-77.5)	62; 73.8% (64.4-83.2)
G	94; 29.9% (24.9-35.0)	54; 29.0% (22.5-35.6)	22; 26.2% (16.8-35.6)

Tabla 25. Variantes alélicas de los genes *HMOX1* y *HMOX2* en pacientes con EM por subgrupos. El valor de cada celda representa número, porcentaje e intervalo de confianza (CI) al 95%

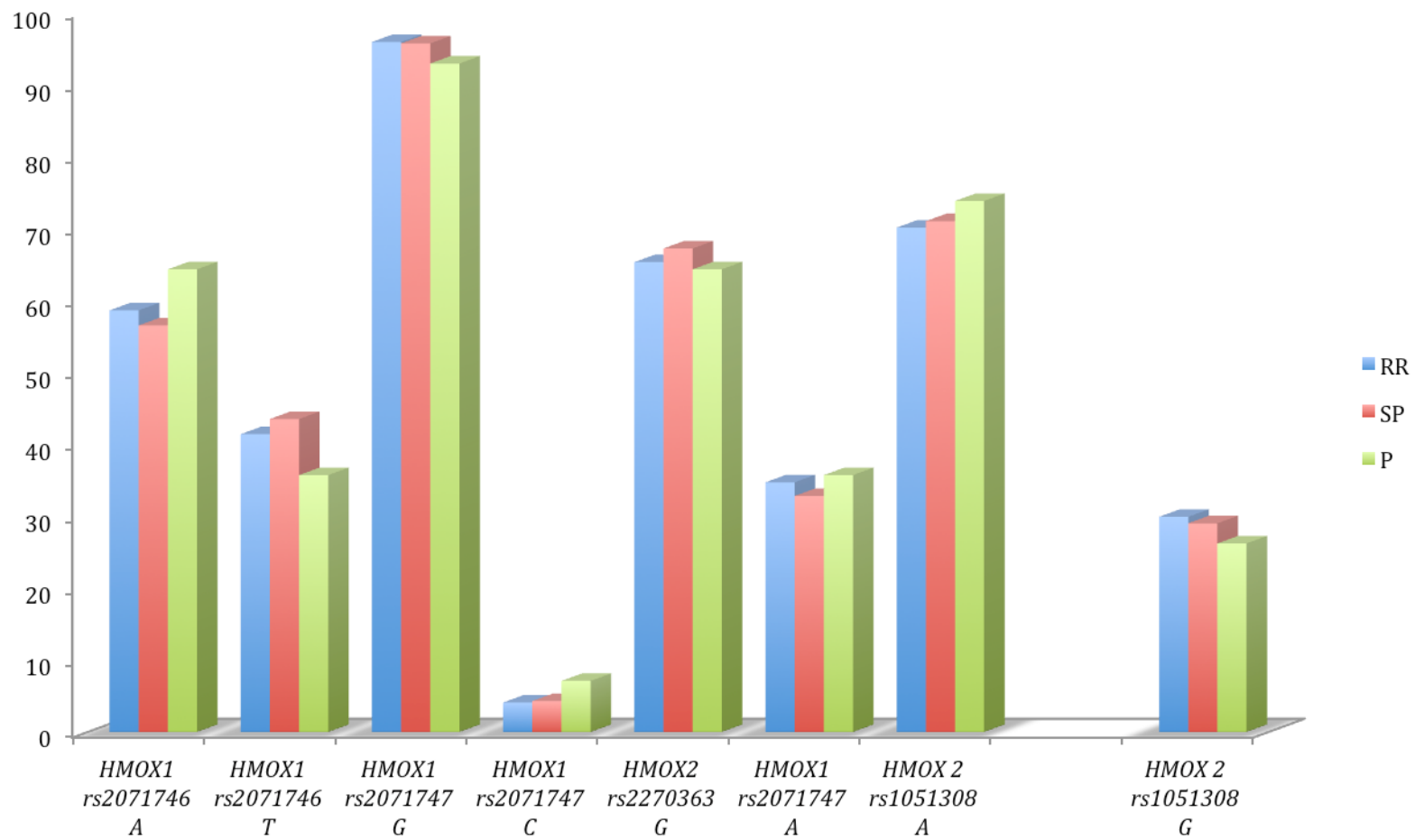


Imagen 38. Representación de diagrama de barras con las frecuencias alélicas para cada gen y tipo clínico de enfermedad.

# DISCUSIÓN



## 1. COMPOSICION Y REPRESENTATIVIDAD DE LA MUESTRA

Se ha realizado un estudio analítico observacional de casos y controles en el que se incluyeron 292 pacientes y 533 controles de ambos sexos y sin límite superior de edad. Todos los pacientes cumplían criterios clínicos de EM definidos según el panel internacional de 2001 encabezado por Ian McDonald(23) y su posterior revisión de 2005(24). Se incluyeron pacientes independientemente de su forma clínica(71), tiempo de evolución de la EM, datos de actividad clínica o radiológica o tratamiento farmacológico vigente o histórico. Se excluyeron aquellos pacientes con otra enfermedad neurológica y con familiares conocidos diagnosticados de EM.

Las variables recogidas con el fin de determinar la posible relación entre el desarrollo de EM y los SNPs *rs2071746* y *rs2071747* del gen *HMOX1* y los SNPs *rs2270363* y *rs1051308* del gen *HMOX2* fueron dos variables cualitativas (sexo y forma clínica de EM) y dos cuantitativas (edad de debut de la EM y edad en el momento de inclusión en el estudio).

Debido al diseño emparejado del estudio los grupos de pacientes con EM y de controles mostraron una proporción de géneros similar y una edad a la inclusión muy homogénea. El grupo control estaba formado por 367 mujeres y 165 hombre mientras que el de pacientes 201 mujeres y 91 hombres con unos ratios hombre:mujer de 1:2.2. La edad media de inicio de la enfermedad en los pacientes fue de 32.8 años. Ambas variables, proporción entre géneros y edad de inicio de los primeros síntomas se comportaron de modo similar a lo encontrado en la práctica clínica habitual(2,32,36,39,46,72,92) y en numerosos estudios realizados similares(374,377,471,475) en nuestro entorno geográfico. Además, las edades de inicio entre sexos no se han comportado de modo diferente (mujeres 32.7 años, hombres 33.2 años) no comprobándose el inicio más precoz en mujeres que se ha comunicado consistentemente en numerosos estudios(30,32,37), hecho probablemente condicionado por un número relativamente pequeño de pacientes.

En base a la clasificación de Lublin & Reingold de 1996(71) los pacientes fueron clasificados entre formas remitentes-recurrentes (RR), secundariamente progresivas (SP) y primariamente progresivas (PP). El fenotipo clínico más

común fue la forma RR (54.45%) tal y como suele ser habitual en numerosos estudios demográficos(2,26,28,32,37). No se identificaron formas progresivas recurrentes (PR) en nuestro estudio probablemente por su baja frecuencia. No se recogieron datos relacionados con la actividad o progresión de la discapacidad para permitir añadir los modificadores fenotípicos y así poder emplear plenamente la nueva clasificación fenotípica(90).

En nuestra serie las edades de inicio de las formas RR y PP (29.5 y 43.4 años respectivamente) mostraron diferencias significativas, siendo más tardía la edad en la forma PP tal y como es habitual en la literatura(71,92). No se encontraron diferencias entre la edad de inicio de las formas RR y SP (29,5 y 34.9 años) aunque sí una sutil tendencia a una edad más tardía de inicio en las formas progresivas tal y como recogen incontables publicaciones de historia natural de la enfermedad(73,114). La edad de transición de una forma RR a una forma SP es razonablemente similar a la edad de inicio de la forma PP(72,73). Este hecho, sumado a las numerosas similitudes en velocidad de progresión, manifestaciones radiológicas y la (ausencia de) respuesta a los fármacos inmunomoduladores hace que hoy en día sean consideradas formas más similares que diferentes aunque se mantengan como dos entidades diferenciadas por su forma de inicio(11,72,73,90,91,113,114). En nuestra serie no se ha analizado la edad de transición desde la forma RR a la forma SP, que técnicamente podría definirse como la edad de inicio de la forma SP, ya que la edad y forma clínica de cada paciente corresponden a su momento de inclusión en el estudio. Además no es descartable que algunos pacientes inicialmente clasificados como EMRR hayan evolucionado a formas SP.

La puntuación de la escala EDSS en el momento de la inclusión en el estudio determinó que las formas progresivas (SP y PP) poseían una mayor discapacidad, hecho muy constatado en las series publicadas(49,71,92). Aunando este dato con el tiempo de evolución obtendremos el índice de progresión que muestra valores razonablemente similares entre sí en las formas SP y PP (0.6 y 0.7 respectivamente) y diferentes de modo significativo del de la forma RR (0.3). El MSSS (“*Multiple Sclerosis Severity Score*”) no se empleó aunque su información está en la línea del índice de progresión(118,119).

## **2. PAPEL DEL ESTRÉS OXIDATIVO EN LA ESCLEROSIS MÚLTIPLE**

La EM es una enfermedad inflamatoria y desmielinizante del sistema nervioso central en la que se produce concomitantemente un fenómeno neurodegenerativo progresivo que condiciona en última instancia la discapacidad del paciente. La visión tradicional neuropatológica de la EM se ha focalizado en la desmielinización como el evento clave de la enfermedad. Sin embargo, crece la evidencia de que la transección parcial o total de axones y la consecuente degeneración axonal forman parte de la fisiopatogenia de la EM desde estadios muy precoces de la enfermedad sin que el fenómeno inflamatorio pueda explicar satisfactoria y plenamente estos procesos(51,338). En la actualidad se cree que ambos fenómenos, inflamación y neurodegeneración, están inicialmente interconectados pero que en un momento indeterminado de la evolución de la enfermedad la respuesta inmune se perpetúa en el SNC y la neurodegeneración progresa de modo independiente a la inflamación(56,111,293,336,337). De hecho si tomamos como marcador evolutivo del proceso neurodegenerativo la atrofia cerebral(151), la evolución temporal de ésta es muy constante a lo largo de la enfermedad y en los diferentes fenotipos clínicos(150).

La EM muestra un comportamiento bifásico con una primera fase dependiente de la inflamación y una segunda “amnésica” al fenómeno inflamatorio según ha sido demostrado en series de historia natural de la enfermedad(73,111). Durante esta primera fase inflamatoria la actividad inflamatoria, medida por la tasa anualizada de brotes o la existencia de lesiones realzantes de Gadolinio, puede correlacionarse con la progresión de la atrofia cerebral(74,76,78). Del mismo modo, la atrofia cerebral es, al menos parcialmente, sensible al control de la inflamación que promueven los diversos tratamientos disponibles hasta la fecha con una cierta proporcionalidad entre la eficacia en la reducción de actividad y el grado de reducción de la atrofia cerebral(165,167,202,203,213,214,235,236).

Además existen biomarcadores inmunológicos comunes a ambos procesos como las bandas oligoclonales de Ig M lípidoespecíficas(109,140–143) lo que apunta a posibles mecanismos subyacentes compartidos.

Estos indicios sugieren que aunque la EM es una enfermedad inflamatoria, el fenómeno neurodegenerativo está intrínsecamente ligado a la inflamación y desde estadios muy precoces de la enfermedad(69,74,111).

Los mecanismos íntimos de la fisiopatogenia de la EM en general y de la neurodegeneración en particular son desconocidos aunque cada día cobra más importancia el papel del estrés oxidativo que ha sido implicado en una variedad de subprocesos como la perpetuación de la respuesta inmune en SNC o la excitotoxicidad por glutamato(104,353). El fenómeno de la activación de la microglía(340) con la liberación de especies reactivas de oxígeno y nitrógeno y otras moléculas mediadoras (como NO, aminas o proteasas) constituye un nexo de unión entre el fenómeno inflamatorio y la neurodegeneración(56,316,353) y el nicho de un conjunto de sistemas pro y antioxidantes como la hemo-oxigenasa(318,379). La presencia de microglía activada (MGA) ha sido demostrada no solo en lesiones desmielinizantes activas sino en lesiones crónicas inactivas e incluso en sustancia blanca de apariencia normal con una estrecha correlación con fallos en el proceso de remielinización(326,329) y con el daño axonal difuso(104,316,483). La MGA se considera un agente imprescindible para el desarrollo de lesiones corticales(65,342) y dada su interacción con las sinapsis puede propiciar otros fenómenos neurotóxicos como la excitotoxicidad por glutamato(347,348).

El estudio de los mecanismos pro y antioxidantes puede aportar un conocimiento estratégico de la fisiopatogenia íntima de la neurodegeneración y, paralelamente, la identificación de nuevas dianas terapéuticas.

En respuesta al daño oxidativo y/o inflamatorio los principales mecanismos antioxidantes de la célula se activan precozmente, especialmente los regulados por el factor de transcripción Nfr2, pudiendo ser detectados incluso en placas agudas en formación(350). Sin embargo se detectan concomitantemente niveles elevados de antioxidantes endógenos junto con la elevación de marcadores de estrés oxidativo, lo que indica que la respuesta de antioxidantes endógenos no es suficiente para restaurar el delicado equilibrio

redox y prevenir el daño oxidativo sin la intervención de la vía Nfr2/ARE(316,318,350). Hoy en día disponemos de estrategias terapéuticas como el dimetilfumarato que promueven la expresión de los genes vehiculados por el factor de transcripción Nfr2 y que nos deben ayudar a comprender la importancia del estrés oxidativo en la EM(224,444).

Son numerosos los datos que implican directamente al estrés oxidativo en la EM tanto derivados del estudio directo de tejido de SNC, del estudio del LCR o de los datos obtenidos del modelo experimental de EM, la encefalomiелitis aguda experimental (EAE)(316,318,350,352–354,356,362,366,368,375,377,484–506). Estos datos quedan recogidos en la tabla 26.

Existen otros datos procedentes de estudios en marcadores plasmáticos o de estudios de asociación genética que sumarían evidencia al papel del estrés oxidativo en la EM. Los marcadores de estrés oxidativo en suero de pacientes con EM no solo se correlacionan con la enfermedad sino con su actividad tal y como demuestra el grupo de Tasset(364). También se han encontrado elevados otros marcadores de estrés peroxisomal o de estrés mitocondrial (como etanolaminas), con una correlación con formas progresivas y de evolución más prolongada(507).

### **2.1. Datos de estrés oxidativo a nivel tisular de SNC**

La demostración de la relevancia del estrés oxidativo en la EM puede ser obtenida de datos tisulares tanto en cerebro como en médula espinal. Habitualmente dicha evidencia procede de muestras histopatológicas donde se pueden detectar metabolitos secundarios de la oxidación, descenso de las moléculas antioxidantes o incremento de las vías enzimáticas antioxidantes.

Las escasas evidencias directas *in vivo* obtenidas hasta la fecha se han realizado principalmente mediante imágenes de RM de espectroscopia de protón simple<sup>15</sup> (<sup>1</sup>H-RM) que han evidenciado un descenso de glutatión

---

<sup>15</sup> La espectroscopia de protón simple o de hidrógeno (<sup>1</sup>H-RM) es una técnica de RM no convencional que permite obtener información química sobre los diferentes metabolitos de un tejido mediante su diferente

(principal antioxidante a nivel de SNC) en pacientes con EMSP(368) y la sobreactivación de las vías glutamatérgicas(363), las cuales pueden generar la síntesis de ROS/RNS contribuyendo ambos mecanismos a perpetuar fenómenos de neurodegeneración(104,351,353,355,358–360)(ver imagen 10). Independientemente del mecanismo implicado en la neurodegeneración en la EM, los pacientes muestran unos niveles aumentados de lípidos oxidados y descenso en los niveles de glutatión.

De modo indirecto el papel del estrés oxidativo puede ser demostrado en tejido cerebral o medular de pacientes con EM mediante:

- incremento de metabolitos secundarios de la peroxidación de lípidos como malonil-dialdehído(484), de moléculas oxidadas como LDL, DNA, proteínas o lípidos(316,318) o de productos de degradación de purinas(485).
- incremento de residuos carbonilo(486) o de niveles de nitrotiroxina a nivel de macrófagos(487) vehiculados por la acción del peroxinitrito y otras RNS(355).
- compromiso de algunas funciones celulares como la proteosómica(488) o la ribosómica(491).
- descenso de las concentraciones de antioxidantes como el glutatión o tocoferol(350,485,495).
- incremento de expresión de enzimas implicadas en el estrés oxidativo como la iNOS(354) o la quinasa mitocondrial PINK-1(490).
- incremento de las enzimas antioxidantes como la NADPH oxidasa, superóxido-dismutasa, NQO1 y HO-1(318,352,375) y de la expresión de la vía Nfr2 y DJ1 que puede apreciarse a nivel de las placas desmielinizantes(489).

---

frecuencia de resonancia. No ofrece una información en valores absolutos si no que se obtiene de modo relativo comparando las diferentes frecuencias sobre un metabolito estable. A nivel cerebral se identifican como los metabolitos más importantes el n-acetil-aspartato (NAA, indicativo de viabilidad neuronal), la creatina, la colina y el lactato.

<b>DATOS TISULARES EN CEREBRO Y MÉDULA ESPINAL DE PACIENTES CON EM</b>
Presencia de LDL y DNA oxidado y productos finales de la peroxidación de lípidos (malonil-dialdehído, 4-hidroxinonenal, epitopos de fosfolípidos oxidados) en placas agudas y con datos de desmielinización activa(316,484).
Presencia de daño oxidativo extendido a proteínas, lípidos y DNA junto con una llamativa regulación al alza de enzimas antioxidantes como la super-óxido dismutasa 1 y 2, catalasas, hemo-oxigenasa 1 y NAD(P)-quinona oxido-reductasa 1 (NQO1) en placas activas(318,375).
Incremento de residuos carbonilo en proteínas de sustancia gris y blanca de pacientes con EM(486). Incremento de residuos de nitrotiroxina en macrófagos con restos mielínicos en placas agudas o crónicas activas(487).
Descenso de actividad proteosómica tanto en sustancia gris como en sustancia blanca sugiriendo el fallo de los sistemas de que conducen a la carbonización de proteínas(488).
Descenso de niveles de glutatión y $\alpha$ -tocoferol en placas de EM incrementándose los niveles de ácido úrico sin modificación de los niveles de otras sustancias como cisteína o tirosina(485).
Sobre-regulación del factor de transcripción Nfr2 a nivel de macrófagos y astrocitos en placas activas e incremento de expresión de proteína DJ1 en astrocitos de placas activas y crónicas(489).
Incremento de inmunotinción de PINK1 (quinasa mitocondrial) en astrocitos de placas desmielinizantes activas(490).
Incremento de niveles de proteína CHOP (moléculas de estrés de retículo endoplásmico) en placas desmielinizantes de sustancia gris(491).
Regulación al alza de expresión de NADPH1 en placas activas y de lento crecimiento(352).
Descenso de niveles de glutatión en pacientes con EMSP sobre todo en lóbulo frontal medido mediante <sup>1</sup> H-RM(368).
<b>DATOS TISULARES EN CEREBRO Y MEDULA ESPINAL EN MODELOS EAE</b>
Incremento de expresión de Nrf2 y <i>HMOX1</i> a nivel de OG en placas desmielinizantes(366).
Incremento de residuos proteicos carbonilos en astrocitos y microglía de sustancia blanca en placas agudas y crónicas a nivel cerebral(366,492) y medular asociado a agregación de proteínas y apoptosis(493).
Inmuno-reactividad de nitrotirosina aumentada (marcador de síntesis de peroxinitrito) en sustancia blanca medular de EAE que se correlaciona pérdida de oligodendrocitos maduros(494).
<b>DATOS EN LÍQUIDO CEFALORRAQUÍDEO DE PACIENTES CON EM</b>
Niveles aumentados de marcadores de peroxidación de lípidos como pentano/etano(495) , malonil-dialdehído (496,497), isoprostanos o hidroxinenal(498–500). Niveles normales de productos finales de glicoxidación avanzada(501).
Niveles incrementados de residuos proteicos carbonilos(356,499) y productos de oxidación de proteínas(502) con descenso de niveles totales de grupos thiol(502).
Incremento de actividad de la glutatión-reductasa con descenso de la glutatión-peroxidasa(496).
Niveles normales de $\alpha$ -tocoferol(503) e incrementados de nitrotirosina(504).
Niveles de ácido úrico elevados(505) o normales(506).
Incremento de niveles de proteínas de choque térmico (“ <i>heat shock proteins</i> ”) Hsp72 y Hsp70 y hemo-oxigenasa 1(499).

Tabla 26. Datos agrupados de estudios de marcadores de estrés oxidativo en cerebro, medula y LCR de pacientes con EM y modelo animal de encefalomiелitis autoinmune experimental (EAE). Modificado de Agúndez 2014(377).



## **2.2. Datos de estrés oxidativo en modelo animal de EAE**

El estrés oxidativo también ha podido demostrarse en la encefalomiелitis aguda experimental (EAE), el modelo experimental tradicional de la EM, al observarse incremento de residuos carbonilo en astrocitos y microglía a nivel de lesiones cerebrales(366,492) y medulares(493), incremento de nitrotirosina en la sustancia blanca(494) y, asociado a ambos fenómenos, pérdida y tendencia a la apoptosis de oligodendrocitos maduros(493,494). De modo compensatorio se aprecia un incremento de los genes vehiculados por Nfr2 como *HMOX1*(366).

## **2.3. Datos de estrés oxidativo a nivel de LCR**

El LCR permite estudiar de modo directo y relativamente accesible numerosos aspectos del SNC en condiciones de salud y enfermedad. En la EM es una herramienta crítica tanto a nivel diagnóstico como pronóstico pero muy vinculada con el conocimiento de los mecanismos de la enfermedad(109,136,138,140,142). La demostración directa o indirecta de marcadores de estrés oxidativo a este nivel imprime robustez al papel de éste en la enfermedad.

La demostración del estrés oxidativo en muchos casos es indirecta bien por aumento de los metabolitos secundarios o por descenso de las moléculas antioxidantes destinadas a contrarrestar los agentes oxidantes(355). En el primer caso podemos encontrar en el LCR de pacientes con EM biomarcadores que reflejan diferentes subprocesos oxidativos como:

- peroxidación de lípidos de membrana (como el malonil-dialdehído o isoprostanos entre otros)(495–500).
- carbonilación o nitración de proteínas como la nitrotirosina vehiculadas por RNS(356,499,504).
- productos finales de la glicoxidación avanzada(501) y oxidación de proteínas(502).
- productos de degradación de purinas como incremento de ácido úrico(505), aunque este hecho no ha sido confirmado(506).



El descenso de las concentraciones o de la actividad de sistemas antioxidantes implica al estrés oxidativo y en LCR se ha demostrado descenso de actividad de la glutatión-peroxidasa e incremento de la glutatión-reductasa(496) o de grupos tiol, probablemente consecuencia del consumo de GHS en los procesos de estrés oxidativo(502).

Finalmente un incremento de concentración en LCR de moléculas inducibles por el estrés oxidativo como la HO-1 o las HSP 70 y 72(499) nos indicarían un papel de éste en la enfermedad y un intento de contrarrestar dicho estrés oxidativo.

### 3. HEMO-OXIGENASA Y EM

Las hemo-oxigenasas (HO) son enzimas esenciales en el catabolismo de los grupos hemo presentes de modo casi ininterrumpido a lo largo de la evolución(349,378). En el ser humano existen dos isoformas: la hemo-oxigenasa 1 (HO-1) y la hemo-oxigenasa 2 (HO-2) codificadas por los genes *HMOX1* y *HMOX2* respectivamente. Ambas metabolizan la misma reacción generando, a partir del grupo hemo, hierro libre, biliverdina y monóxido de carbono (CO)(365,379). La principal diferencia entre ambas isoformas HO-1 y HO-2 reside en la amplia y rápida inducibilidad del gen de HO-1 (*HMOX1*) cuyo promotor responde a una muy amplia variedad de estímulos oxidantes(349,365,394,448). En cambio HO-2 es una enzima constitutiva que puede aportar cierto nivel de protección contra el grupo hemo libre aunque al no modificarse su expresión en respuesta al estrés oxidativo es menos probable que juegue un rol determinante en la citoprotección frente al grupo hemo libre. Probablemente participe en otras funciones como la síntesis de antioxidantes endógenos como bilirrubina/biliverdina y de CO como señalizador intracelular(378,434). Las dos isoformas de HO, HO-1 y HO-2, con sus grandes diferencias, constituyen un importante eslabón de la respuesta antioxidante con un mecanismo de acción pleiotrópico(351).

Se ha demostrado una sobreexpresión muy marcada de HO-1 en la EM, al igual que en varias enfermedades neurodegenerativas, probablemente secundaria a la liberación masiva de grupos hemo y vehiculizada por la respuesta Nfr2/ARE(436,442,443). A nivel histopatológico la presencia de HO-1 ha sido demostrada en astrocitos de modo precoz e incluso en placas agudas en formación(350,403). Aunque la vía donde más evidencia está depositada es en la implicación de HO en la modulación de la microglía activada. Los metabolitos del catabolismo del grupo hemo producen una acción antiinflamatoria como la inhibición de la NADPH oxidasa y que intentaría frenar la activación de la microglía en respuesta a estímulos inmunes aunque la acción de éstos pudiera haber sido ya controlada(224,361,365,402,414,415,418).

#### **4. POLIMORFISMOS HMOX1 Y HMOX2 Y RIESGO DE DESARROLLO DE EM**

##### **4.1. UTILIDAD DE ESTUDIOS GENÉTICOS EN LA ESCLEROSIS MÚLTIPLE**

La esclerosis múltiple muestra una susceptibilidad genética conocida desde las primeras descripciones de la enfermedad y aunque los esfuerzos para desentrañar y comprender las bases genéticas de la enfermedad han sido continuos, tanto con abordajes poblacionales como moleculares, los resultados son hasta la fecha modestos(293). La susceptibilidad genética se confirma en hechos incuestionables como la existencia de un riesgo étnico diferente, la agregación familiar y la asimetría entre géneros. La EM posee un comportamiento no mendeliano y un modelo de herencia poligénico(290,291).

Se han desarrollado tanto estudios de asociación como de ligamiento, de análisis de microsatélites o de genoma completo y hasta la fecha la señal más consistente y potente identificada es la que confiere el conjunto de genes del HLA(295,298), en concreto al haplotipo DRB1\*1501-DQA1\*0102-DQB1\*0602, que podría llegar a explicar casi el 50% del componente genético de la enfermedad(294). Actualmente el mayor conocimiento alcanzado, nos hace ver cómo el genoma humano está jalonado de polimorfismos de nucleótido único (SNPs del inglés “*single nucleotide polymorphism*”) que junto con otros mecanismos como el “*splicing* alternativo” pueden justificar la gran variabilidad fenotípica que apreciamos no solo en la EM si no en cualquier condición(294,508). Además dichos SNPs han sido el objetivo de los sucesivos estudios de vastas regiones del genoma (o GWAS) y con el advenimiento de nuevas técnicas de análisis genético y reclutamiento de mayor número de casos se han realizado numerosos estudios(296,300–308). Sin embargo hasta la fecha solo se han demostrado unas 80 variantes genéticas relacionadas con la EM aunque con un riesgo muy modesto (odds ratios de 1,1-1,3) por lo que se supone que otros factores como variaciones estructurales o modificaciones epigenéticas puedan contribuir a la susceptibilidad genética de la EM(297). Los loci genéticos implicados en la EM no correspondientes a la señal de los genes del HLA

comparten como características su implicación en funciones de estimulación celular (IL-7, IL-2,..) y su participación en otras enfermedades autoinmunes(309).

El tipo de SNP puede condicionar de modo muy significativo diferentes resultados en la transcripción de RNA o en la proteína codificada. Así los polimorfismos codificantes no sinónimos, junto con los polimorfismos en las regiones regulatorias de un gen, son considerados como los SNPs con mayor potencial de influencia fenotípica(508) y hay algunos ejemplos en los que un único SNP determina la actividad final de la proteína como el SNP *rs1695* del gen *GSTP1*(371,372).

El progresivo conocimiento fisiopatogénico de la EM a través de una multitud de vías (metabólica, proteómica,...) nos bosqueja nuevos agentes que han podido no evidenciarse en los sucesivos estudios GWAS. Dentro de estos nuevos agentes los sistemas antioxidantes cobran un interés muy especial. La implicación fisiopatogénica del estrés oxidativo en la EM está muy constatada (ver tabla 26) por lo que modificaciones genéticas en los sistemas antioxidantes podrían, teóricamente, incrementar el efecto nocivo del estrés oxidativo en la EM así como en otras enfermedades(222,350,351). De hecho se ha constatado la implicación fisiopatogénica en la EM de las vías antioxidantes de NADPH dehidrogenasa quinona 1 (NQO1)(352,375) y de las diferentes glutation-S-transferasas (GST)(313) no identificadas como señales genéticas en los estudios GWAS. Los diferentes estudios de asociación de polimorfismos concretos de las vías de GST y NQO1 con la EM han obtenido resultados ambíguos; hay grupos que han encontrado asociación de las diferentes isoformas de GST(372-374) y de NQO1(374,376) con la enfermedad mientras que otros grupos no hallaron dicha asociación ni para GST(369-371) ni NQO1(377). Probablemente factores como modificaciones postranscripcionales, asociaciones epigenéticas o el diferente origen étnico de los casos puedan contribuir a la ambigüedad de los resultados.

No obstante la búsqueda de asociaciones genéticas con la enfermedad es sumamente importante ya que la demostración del efecto, incluso modesto, de un gen en el desarrollo o en el curso de la EM podría fundamentalmente

modificar los conceptos establecidos de la EM y potencialmente crear nuevas posibilidades para el tratamiento o prevención de la enfermedad(291).

Debido a la complejidad que caracteriza la EM, deben desarrollarse sistemas de estudio integrados para dar significación a los hallazgos que se produzcan a algún nivel. Un reto a priori más desalentador, y aún no convenientemente alcanzado, será el diseño de estudios funcionales a partir de señales genéticas prometedoras que conecten de modo convincente estas variaciones genéticas con la fisiopatología de la EM y poder transferir rápidamente este conocimiento para el mejor cuidado de los pacientes(291) (ver imagen 39).

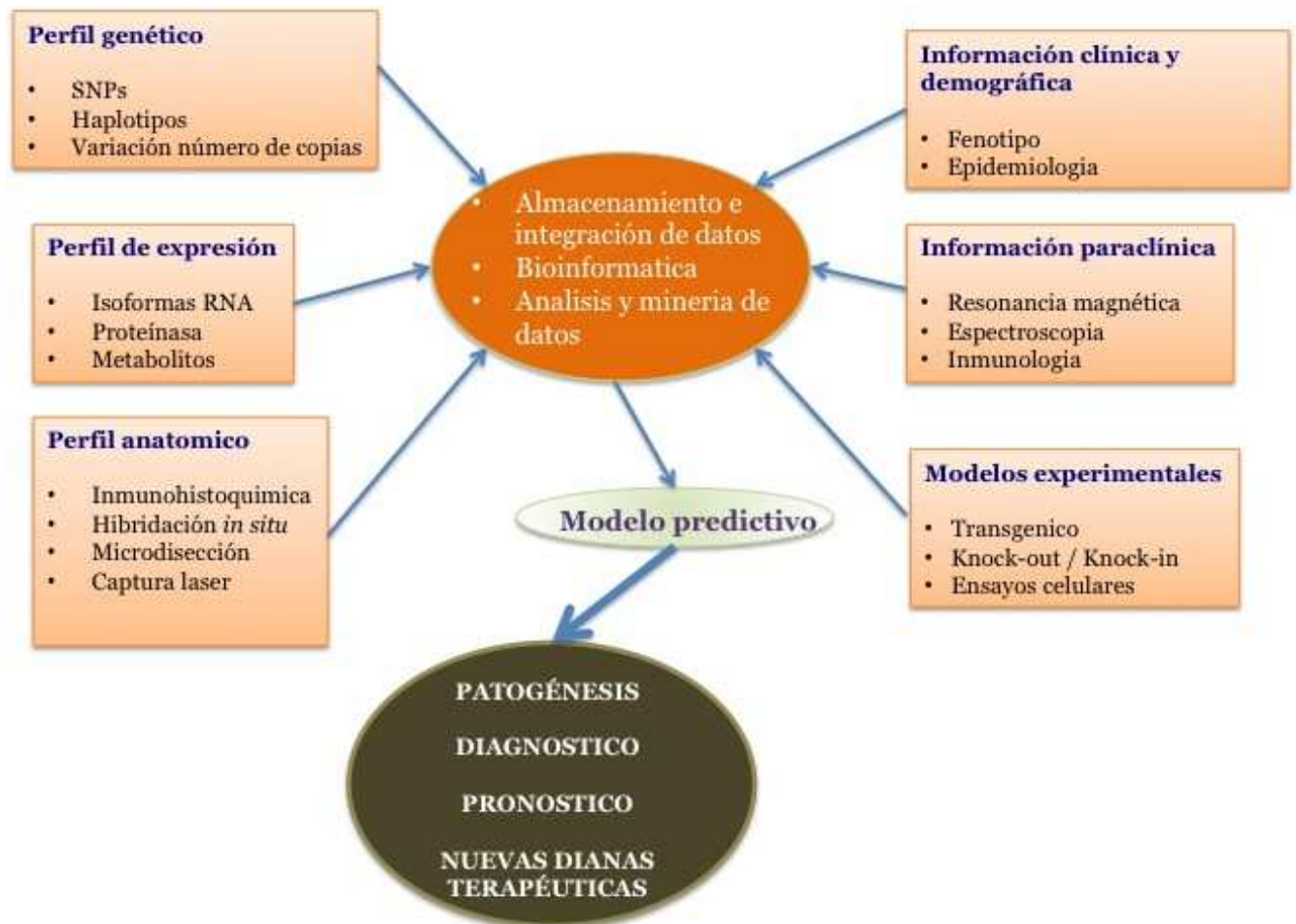


Imagen 39. Representación de la necesidad de sistemas de integración de la información en enfermedades como la EM. Adaptado de Oksenberg(291).

#### 4.2. POLIMORFISMOS DE LOS GENES *HMOX1* Y *HMOX2*

A pesar de que los genes *HMOX1* y *HMOX2* no ha sido identificados como genes de susceptibilidad por los diferentes estudios GWAS, los datos fisiopatogénicos sugieren que pueden ser genes candidatos para modificar el riesgo de EM. Esta tesis evalúa la hipótesis de que polimorfismos de los genes *HMOX1* y *HMOX2* influirían en el riesgo de desarrollo y evolución de la esclerosis múltiple en una población caucasiana española. En nuestro conocimiento solo existe un estudio que analice el papel del polimorfismo del gen *HMOX1* y el riesgo de EM con un resultado negativo(456).

Hasta la fecha se han descrito 778 SNPs dentro del gen *HMOX1* y 879 SNPs dentro de *HMOX2* para *Homo sapiens* (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene>). Se escogieron SNPs con una frecuencia alélica menor no inferior al 3% en población europea a través del dominio público del Centro Nacional Estadounidense de Información Biotecnológica (“National Center of Biotechnology Information” - <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/snp>).

En esta tesis hemos analizado la influencia de los SNP *rs2071746* y *rs2071747* del gen *HMOX1* y los SNP *rs2270363* y *rs1051308* del gen *HMOX2* con el riesgo de desarrollo y evolución de la EM. En global podemos afirmar que la asociación encontrada es débil, aunque consistente, y limitada al SNP *rs1051308* del gen *HMOX2* y al sexo masculino, donde muestra una distribución alélica estadísticamente significativa diferente con una sobrerrepresentación del alelo A entre pacientes de EM y G entre controles. El alelo A de este SNP también fue hallado más frecuentemente entre los pacientes con EM en la muestra completa aunque la significación estadística no resistió el análisis de comparaciones múltiples. En cambio en mujeres no se demostraron diferencias respecto a este SNP. El otro polimorfismo que alcanzó diferencias estadísticamente significativas fue la presencia del alelo A en el SNP *rs2071746* del gen *HMOX1* tanto en la muestra global como entre las mujeres aunque no mantuvo por poco dichas significaciones en los análisis de comparaciones múltiples ( $p = 0.067$  y  $p = 0.068$  respectivamente). Los otros dos polimorfismos

*rs2071747* del gen *HMOX1* y *rs2270363* del gen *HMOX2* no mostraron ninguna relación con la EM.

No se ha observado relación entre los genotipos o variantes alélicas posibles de *HMOX1* o *HMOX2* atendiendo a los SNP analizados y la edad de debut de la enfermedad o un fenotipo clínico concreto de EM.

Desarrollaremos a continuación las asociaciones encontradas entre *rs1051308* y *rs2271746* en nuestros pacientes.

### **4.3. ASOCIACION *HMOX2* *rs1051308* Y RIESGO DESARROLLO EM**

En nuestra serie la asociación más consistente de los polimorfismos de los genes de la hemo-oxigenasa con la EM emanó del SNP *rs1051308* en el gen *HMOX2*.

El SNP *rs1051308* está situado en la región no codificante 3' del gen por lo que podría condicionar cambios en la estabilidad de la transcripción de RNA y afectar a su codificación aminoacídica(469), tal y como parece suceder con otros polimorfismos en el gen *HMOX1*(448).

*HMOX2* tiene una expresión constitutiva y el SNC es uno de los órganos donde más se expresa, por lo que sus polimorfismos podrían desarrollar un rol en patologías neurodegenerativas. Dada su expresión constitutiva y no modificable por el estrés oxidativo podría no jugar un papel capital en la defensa frente al grupo hemo libre, postulándose un papel en la síntesis de biliverdina/bilirrubina como reserva de antioxidantes y de CO con sus propiedades neuromoduladoras y antiinflamatorias(378,400,411,413,415).

Sin embargo, la implicación del SNP *rs1051308* de *HMOX2* desde el punto de vista de asociación genética en enfermedades neurodegenerativas como la enfermedad de Parkinson, en otras entidades como el síndrome de piernas inquietas o puramente degenerativas como la degeneración macular ha sido negativa y solo ha podido ser asociado con el temblor esencial(462,463,468,469). El SNP *rs1051308* muestra un desequilibrio de



ligamiento parcial con el SNP *rs2270363*(468) que, aunque no ha demostrado en nuestra serie asociación con la EM, influye en el riesgo de desarrollo de enfermedad de Parkinson. En dicho estudio, Ayuso y cols(468) postularon que una mayor actividad de HO-2 conllevaría mayor movilización de hierro y depósito a nivel mitocondrial conllevando insuficiencia energética y producción de ROS y RNS, modelo propuesto ya en muchas otras entidades neurodegenerativas(353,365,379,392) (ver imagen 10).

El alelo A del SNP *rs1051308* del gen *HMOX2* está sobrerrepresentado entre los pacientes de EM respecto a los controles ( $p = 0.012$ ) aunque solo alcanza significación estadística tras un análisis de comparaciones múltiples entre hombres ( $p = 0.002$ , y tras correcciones múltiples  $p = 0.008$ ) pese a que casi lo mantiene en la muestra completa ( $p = 0.06$  tras correcciones múltiples). Aunque probablemente un mayor tamaño muestral hubiera mostrado diferencias en el conjunto de la muestra pudiera ser que el efecto de dicho polimorfismo fuera más significativo en el género masculino. De hecho la EM es una enfermedad con un profundo dimorfismo sexual: la frecuencia de enfermedad o el pronóstico muestran diferencias entre sexos por lo que probablemente factores fisiopatogénicos puedan verse afectados también por dicho dimorfismo(509,510). En relación al estrés oxidativo, se ha documentado que las mujeres poseen una menor actividad de iNOS y menor frecuencia de marcadores de estrés oxidativo(508) por lo que es probable que los mecanismos antioxidantes, como la vía HO-2, puedan ser más relevantes en hombres. De este modo, polimorfismos que afecten a estos genes cobrarían más importancia y pudieran justificar que estén sobrerrepresentados en dicho género.

No obstante desconocemos en la actualidad si la asociación que evidenciamos del alelo A del SNP *rs1051308* con la EM está vinculada a una sobreactividad de la enzima HO-2 con un consecuente depósito de hierro a nivel mitocondrial o a una pérdida de función de HO-2 y, en consecuencia, menor producción de bilirrubina/biliverdina y de CO.



#### 4.4. ASOCIACION *HMOX1* rs 2071746 Y RIESGO DESARROLLO EM

En modelos experimentales de EAE la interacción de los linfocitos T (LT) *naïve* con las neuronas condiciona la diferenciación local del LT en un fenotipo CD15+TFGβ1+Foxp3+ que consigue suprimir la proliferación del LT CD4+ encefalitogénico y de este modo la progresión de la EAE (511). Este hecho, aparte de implicar a la neurona en funciones inmunorreguladoras, tradicionalmente excluidas por la ausencia de expresión de MHC-II, requiere de la presencia de factor de crecimiento transformante β tipo1 (TFGβ1) y la ausencia de interleucina 6 (IL-6). Sin embargo la presencia conjunta de TFGβ1 e IL-6 induce la diferenciación hacia LT Th17 implicado en la patogénesis de la enfermedad (293,511). Se conoce que los portadores de alelos con menor número de repeticiones GT (GT<sub>n</sub>) en la región promotora de *HMOX1* expresan menores concentraciones de IL-6 en modelos de enfermedad inflamatoria endotelial(446), por lo que es consecuente pensar que la longitud del polimorfismo GT<sub>n</sub> en la región promotora de *HMOX1* pueda conducir a modificaciones en la respuesta inmunológica a través de las concentraciones de IL-6 u otros factores.

De hecho, la longitud de GT<sub>n</sub> incide en la evolución de enfermedades autoinmunes y neurodegenerativas. Se ha constatado que sujetos afectados de artritis reumatoide con alelos con menor número de repeticiones (<25) poseen mejor evolución clínica y radiológica de la enfermedad en contra de aquellos con alelos con mayor número de repeticiones(447,452). Del mismo modo alelos con mayor número de repeticiones se asocian significativamente al riesgo de desarrollo de enfermedad de Parkinson(455). No se conoce con certeza si el grado de expresión de *HMOX1* es el único mecanismo que explica estos hallazgos(365,379,394,425).

Este polimorfismo GT<sub>n</sub> se encuentra en un potente desequilibrio de ligamiento con el SNP de *HMOX1* rs2071746A/T(457) conllevando el alelo A una mayor actividad transcripcional(466). Algunas observaciones apuntan que probablemente incida más el polimorfismo rs2071746 que el (GT)<sub>n</sub> en el grado

de expresión de *HMOX1* al menos cuando éste se mide por la cantidad de RNA mensajero producido(458). Sin embargo la asociación de estos polimorfismos de modo combinado con las enfermedades inflamatorias o neurodegenerativas es ambigua y en ocasiones contrapuesta. En el caso de la enfermedad de Parkinson se han asociado tanto el alelo A como un mayor de repeticiones GT<sub>n</sub> al riesgo de desarrollo y curso clínico(455) implicando ambos hechos efectos contrarios, al menos desde el punto de vista de la transcripción del gen. Igualmente la relación entre los niveles de IL-6 y el grado de expresión *HMOX1* presenta datos contradictorios con estudios que no constatan la relación entre ellos(447) frente a otros que confirman como el incremento de producción de HO-1 conlleva la reducción de IL-6(445,446).

No obstante, la IL-6 guarda un papel en la patogénesis de la EM. Inicialmente conocida como factor de diferenciación de células B, la IL-6 es una citoquina con una actividad redundante y pleiotrópica que principalmente participa en la activación precoz del sistema inmune siendo secretada por monocitos y macrófagos tras la activación de los receptores “*Toll-like*”(407,512). La IL-6 condiciona el paso del LT *naïve* a Th17 (293,511,513), cuyo desequilibrio con los T reguladores Foxp3+ (o Treg) está implicado en la patogénesis de la EM(321–324). Otras posibles implicaciones de la producción persistente y no regulada de IL-6 en la EM emanan de su papel favorecedor de dos fenómenos plenamente implicados en la enfermedad: IL-6 induce la expresión de VCAM-1 a nivel del endotelio de SNC y favorece la producción de ROS/RNS a nivel de astrocitos(513). De hecho su inhibición se ha demostrado como una estrategia terapéutica eficaz en el modelo de EAE(514) y en otras enfermedades autoinmunes como la enfermedad de Devic(515).

En nuestra serie los sujetos que portaban el alelo A en el SNP *rs2071746* de *HMOX1* estaban sobrerrepresentados en el grupo de EM ( $p = 0.025$ ) aunque al límite de alcanzar la significación tras análisis de comparaciones múltiples ( $p = 0.067$ ) por lo que cabe pensar que la asociación, aunque débil, con la EM guarda relación con una activación excesiva de la vía de HO-1 más que con la IL-6 (cuyas concentraciones deberían ser menores y no fueron medidas en nuestro estudio). El otro polimorfismo de *HMOX1* estudiado, el *rs2071747*, no mostró asociación con el riesgo de desarrollo o evolución de EM. Además dichos SNPs,

*HMOX1* rs2071746 y 2071747, no han demostrado desequilibrio de ligamiento en otros estudios(455). Al no estudiarse los polimorfismos GT<sub>n</sub> no se ha podido comprobar la asociación de éstos con la EM.

Se sabe que la inducción de *HMOX1* protege a la célula de la muerte en diferentes modelos de isquemia/reperfusión, inflamación o daño tóxico por radicales libres gracias a la prolífica inducibilidad de su promotor(379,394,402,414,448) y a la acción antiinflamatoria de los metabolitos del grupo hemo biliverdina y CO(385,414).

Se postulan otros mecanismos neuroprotectores no vinculados a la actividad enzimática de HO-1(385). Se conoce que en condiciones de estrés oxidativo existe una regulación proteolítica(425) que favorece que HO-1 se trasloque al núcleo donde promueve la transcripción de genes de enzimas antioxidantes ARE a través de la unión con Nfr2(224,429) y reprime las vías pro-oxidantes de NF-κB y STAT-3(428,429). También se ha evidenciado la presencia de HO-1 a nivel de mitocondria y caveola sin que se haya esclarecido su función a este nivel(432). Probablemente el CO liberado pueda inhibir al TLR4 y a la NADPH oxidasa modulando así la respuesta proinflamatoria de células como la microglía(365) (ver imagen 13). Junto con esta función inmunomoduladora, HO-1 también participa en el núcleo en la reparación del DNA y mantenimiento de las regiones teloméricas(427). Finalmente la sobreexpresión de la vía *HMOX1*/HO-1 se ha relacionado con el incremento de la expresión de factores neurotróficos derivados de cerebro y derivados de células de la glía(379).

Aunque los efectos beneficiosos de la regulación al alza de *HMOX1* se han documentado para una gran variedad de células y tejidos, la evidencia experimental sugiere que el efecto protector puede quedar restringido a un umbral estrecho y probablemente autolimitado de sobreexpresión (345,379,380,403,448) (ver imagen 12). La regulación al alza de HO-1 a nivel astrocitario puede propiciar un depósito aberrante de hierro a nivel mitocondrial, génesis de radicales libres intracelulares y defectos en la cadena respiratoria mitocondrial, generando una insuficiencia energética que conduce a la pérdida de las funciones de sostén neuronal(345,379,403). Este mecanismo

ha sido implicado para explicar el papel deletéreo del astrocito en numerosas enfermedades neurodegenerativas(335). Este mismo fenómeno de regulación al alza mantenida del eje *HMOX1*/HO-1 a nivel de OG, con su riqueza en hierro y relativa carencia de GST, o a nivel neuronal puede perpetuar una disfunción celular que jugaría un papel en condiciones crónicas inflamatorias y/o neurodegenerativas incluso tras la desaparición del estímulo que condicionó su inducción(379). En modelos animales de EAE puede apreciarse depósito de hierro no vinculado a lesiones desmielinizantes a nivel perivenular aunque colocalizado a regiones de activación de la microglía lo que confirmaría esta hipótesis(423).

Dado que la homeostasis del hierro se encuentra invariablemente comprometida en casi cualquier enfermedad neurodegenerativa y/o que pueda alterar la función mitocondrial, es planteable que la supresión dirigida del eje *HMOX1*/HO-1 pueda paliar la toxicidad mediada por el depósito de hierro y el déficit bioenergético que se observa en las enfermedades como la enfermedad de Alzheimer o, probablemente, la EM(362,379,391).

En nuestra serie la asociación del alelo A con la EM podría estar más en relación con el depósito de hierro a nivel mitocondrial y a la insuficiencia energética secundaria, hecho muy constatado en numerosos estudios de los orígenes de los mecanismos de neurodegeneración(49,327,338,339) y que ha sido apuntado también por otros investigadores en estudios de asociación entre HO1 y enfermedades neurodegenerativas como la enfermedad de Parkinson(414,439,455,463).

Así la hemo-oxigenasa, y la inducción de *HMOX1*, muestran un comportamiento como las caras del dios romano Jano pudiendo, en una enfermedad como la esclerosis múltiple, atenuar algunos aspectos de la enfermedad al mismo tiempo que agrava otros(379,392).

## 5. LIMITACIONES DE NUESTRO ESTUDIO

Nuestro estudio presenta algunas limitaciones que comentamos y analizamos a continuación:

1. Solo se han analizado 2 SNPs del gen *HMOX1* y 2 SNPs del gen *HMOX2*, por lo que no puede demostrar categóricamente que dicha variabilidad genética sostenga la posible participación de ambos genes de la hemo-oxigenasa en la EM. Existen otros factores como asociaciones epigenéticas, modificaciones del punto de inicio de la transcripción o modificaciones postranccripcionales que pueden participar del resultado discreto evidenciado.
2. No se han analizado la influencia de los polimorfismos de *HMOX1* y *HMOX2* en el curso evolutivo y progresión de la EM. Varios motivos convergen en esta limitación:
  - Se trata de un estudio transversal que engloba en la cohorte de casos pacientes con diferentes fenotipos clínicos, grados de severidad, duración de la enfermedad o accesos a los tratamientos. Este diseño limita sustancialmente la posibilidad de obtener conclusiones sobre la posible relación de los genotipos o variantes alélicas con la severidad.
  - La frecuencia de alguno de los genotipos o variantes alélicas ha mostrado ser insuficiente para poder garantizar la significación del análisis.
  - Para demostrar dicha asociación se precisaría de un diseño prospectivo tras el diagnóstico o retrospectivo con tiempo de evolución uniforme y en ambos supuestos con criterios más restrictivos de inclusión y mayor número de casos.

3. Aunque se ha evidenciado una tenue asociación entre la variante alélica A del SNP *rs1051308* del gen *HMOX2* y la EM no se ha podido explicar categóricamente el hecho de que solo sea significativa entre varones ni dilucidar la naturaleza de la relación, ya que no se conocen con exactitud las consecuencias de dicho polimorfismo ni se han analizado las concentraciones de marcadores de actividad de la HO-2 como sus metabolitos.
4. La ausencia de asociación del SNP *rs2071746* del gen *HMOX1* probablemente pudiera dilucidarse con una población de mayor tamaño ya que casi alcanza la significación estadística en el análisis de comparaciones múltiples y existe un cuerpo de evidencia en otras entidades que orientan hacia su confirmación.
5. De los SNP analizados, el SNP *rs2071747* de *HMOX1* no posee un adecuado poder estadístico, ya que posee una frecuencia de expresión muy baja en todas las poblaciones analizadas (en torno a 0,05 %). Este hecho limitaría el hallazgo de un posible papel del mismo en el riesgo de EM salvo en estudios con un elevado número de casos y controles.

<h1>CONCLUSIONES</h1>	

1. La vía de la hemo-oxigenasa participa de la susceptibilidad genética asociada con la esclerosis múltiple, además de la asociación ya conocida desde un punto de vista fisiopatológico.
2. La asociación genética con la esclerosis múltiple es sutil y solo confirmada para la variante alélica A del SNP *rs1051308* del gen *HMOX2* en hombres.
3. La variante alélica A del SNP *rs2071746* del gen *HMOX1* muestra una tendencia casi significativa con el riesgo de desarrollo de esclerosis múltiple.
4. No se ha demostrado que los SNP *rs2071747* de *HMOX1* y *rs2270363* de *HMOX2* guarden relación con el riesgo de padecer esclerosis múltiple en la población caucasiana española.
5. Los diferentes genotipos y variantes alélicas de los genes *HMOX1* y *HMOX2* estudiados no guardaron relación con la edad de debut de la esclerosis múltiple o con los fenotipos clínicos de la enfermedad.



<p><b>ANEXOS</b></p>	

**1. ANEXO I. MODELO DE CONSENTIMIENTO INFORMADO**  
**ESTUDIO HEMO-OXIGENASA**

**FORMULARIO DEL CONSENTIMIENTO INFORMADO**  
**DEL PACIENTE O DE SU REPRESENTANTE LEGAL**  
**AUTORIZADO**

**TÍTULO DEL ESTUDIO:** Polimorfismo genético de los genes hemo-oxigenasa 1 y 2 en pacientes con esclerosis múltiple (en colaboración con Departamento de Farmacología y Psiquiatría-Universidad de Extremadura)

**OBJETIVOS DEL ESTUDIO:**

El estudio en el que se le propone participar de forma voluntaria es un estudio de Investigación a partir del cuál se intentará determinar, en los leucocitos de la sangre, el estado del gen que codifica la síntesis de las enzima hemo-oxigenasa 1 y 2, las cuales podrían estar implicado en el riesgo para desarrollar esclerosis múltiple. En esta enfermedad se ha descrito aumento de la expresión de dicha enzima en el líquido cefalorraquídeo (que baña el cerebro y la médula espinal) así como influencia de la misma por determinados tratamientos.

Dicho estudio se le ha propuesto, bien por padecer esclerosis múltiple, o bien como paciente control sano. En estudios de investigación como el que se le propone es preciso comparar los resultados obtenidos en el grupo de pacientes con los de personas sanas de edades y sexos similares.

El objetivo del estudio es exclusivamente de investigación, y es probable que los resultados obtenidos no significarán un beneficio directo para usted, si bien posiblemente puedan servir para conocer algunos de los mecanismos que contribuyen al desarrollo de la esclerosis múltiple. Los datos personales obtenidos a partir del estudio serán tratados con absoluta confidencialidad (al recoger sus datos clínicos y su muestra se les asignará un código numérico aleatorio que no podrá volver a ser identificado). Por si existiera en un futuro la posibilidad de estudiar otros genes que pudieran estar implicados en el desarrollo de esclerosis múltiple, las muestras obtenidas serían

almacenadas, manteniendo la mencionada confidencialidad por el mismo procedimiento.

## **INFORMACIÓN SOBRE LA VENOPUNCIÓN**

Si usted es un paciente que padece esclerosis múltiple o un paciente control sano voluntario, se le realizará una única extracción de 10 cc.

La extracción de sangre que se la va a realizar puede producir un ligero dolor en el punto de punción venosa, y raramente puede producir algunas complicaciones como un pequeño hematoma o una ligera inflamación local.

## **CONSENTIMIENTO INFORMADO**

Yo, el abajo firmante,  
He leído la hoja de información que se me ha entregado.  
He podido hacer las preguntas sobre el estudio.  
He recibido respuestas satisfactorias a mis preguntas.  
He recibido suficiente información sobre el estudio.  
He hablado con el médico responsable del estudio en este centro.  
Comprendo que la participación en el estudio es voluntaria.  
Comprendo que puedo retirarme del estudio:

1. Cuando quiera.
2. Sin tener que dar explicaciones.
3. Sin que esto repercuta en mis cuidados médicos.

Presto libremente mi conformidad con que D/D<sup>a</sup> \_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_ participe en el estudio

\_\_\_\_\_  
Paciente o Representante legal autorizado                      Firma                      Fecha

\_\_\_\_\_  
Nombre del Investigador                      Firma                      Fecha

## **2. ANEXO II. MODELO DE CONSENTIMIENTO INFORMADO** **ESTUDIO N-HISTAMIN-METIL TRANSFERASA**

### **FORMULARIO DEL CONSENTIMIENTO INFORMADO** **DEL PACIENTE O DE SU REPRESENTANTE LEGAL** **AUTORIZADO**

**TÍTULO DEL ESTUDIO:** Polimorfismo genético de la N-histamín transferasa en pacientes con esclerosis múltiple (en colaboración con Departamento de Farmacología y Psiquiatría-Universidad de Extremadura)

#### **OBJETIVOS DEL ESTUDIO:**

El estudio en el que se le propone participar de forma voluntaria es un estudio de Investigación a partir del cuál se intentará determinar, en los leucocitos de la sangre, el estado del gen que codifica la síntesis de la enzima N-histamin-transferasa, el cual podría estar implicado en el riesgo para desarrollar esclerosis múltiple. En esta enfermedad se ha descrito disminución de la actividad de dicha enzima en el líquido cefalorraquídeo (que baña el cerebro y la médula espinal) y aumento de la concentración de histamina en dicho líquido.

Dicho estudio se le ha propuesto, bien por padecer esclerosis múltiple, o bien como paciente control sano. En estudios de investigación como el que se le propone es preciso comparar los resultados obtenidos en el grupo de pacientes con los de personas sanas de edades y sexos similares.

El objetivo del estudio es exclusivamente de investigación, y es probable que los resultados obtenidos no significarán un beneficio directo para usted, si bien posiblemente puedan servir para conocer algunos de los mecanismos que contribuyen al desarrollo de la esclerosis múltiple. Los datos personales obtenidos a partir del estudio serán tratados con absoluta confidencialidad (al recoger sus datos clínicos y su muestra se les asignará un código numérico aleatorio que no podrá volver a ser identificado). Por si existiera en un futuro la posibilidad de estudiar otros genes que pudieran estar implicados en el desarrollo de esclerosis múltiple, las muestras obtenidas serían almacenadas, manteniendo la mencionada confidencialidad por el mismo procedimiento.

## INFORMACIÓN SOBRE LA VENOPUNCIÓN

Si usted es un paciente que padece esclerosis múltiple o un paciente control sano voluntario, se le realizará una única extracción de 10 cc.

La extracción de sangre que se la va a realizar puede producir un ligero dolor en el punto de punción venosa, y raramente puede producir algunas complicaciones como un pequeño hematoma o una ligera inflamación local.

## CONSENTIMIENTO INFORMADO

Yo, el abajo firmante,

He leído la hoja de información que se me ha entregado.

He podido hacer las preguntas sobre el estudio.

He recibido respuestas satisfactorias a mis preguntas.

He recibido suficiente información sobre el estudio.

He hablado con el médico responsable del estudio en este centro.

Comprendo que la participación en el estudio es voluntaria.

Comprendo que puedo retirarme del estudio:

4. Cuando quiera.
5. Sin tener que dar explicaciones.
6. Sin que esto repercuta en mis cuidados médicos.

Presto libremente mi conformidad con que D/D<sup>a</sup> \_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_ participe en el estudio

\_\_\_\_\_  
Paciente o Representante legal autorizado          Firma          Fecha

\_\_\_\_\_  
Nombre del Investigador          Firma          Fecha

### **3. ANEXO III. ACEPTACION DEL CEIC DEL HOSPITAL “PRÍNCIPE DE ASTURIAS” DEL PROYECTO DE N-HISTAMIN-METIL TRANSFERASA**

AUTORIZACIÓN DEL COMITÉ DE  
ENSAYOS CLÍNICOS

#### **INFORME DEL COMITÉ ÉTICO DE INVESTIGACIÓN CLÍNICA**

En relación con el proyecto de investigación 2/2005 Título del Estudio: Polimorfismo genético de la N-histamin transferasa en pacientes con esclerosis múltiple (en colaboración con Departamento de Farmacología y Psiquiatría-Universidad de Extremadura), una vez evaluados los aspectos éticos del mismo, este Comité considera que: *no hay inconveniente alguno para su realización.*

Alcalá de Henares, 27 de abril de 2005

  
Fdo. Dr. Castilla  
Presidente del C.E.I.C.

<h1>BIBLIOGRAFIA</h1>	

1. Compston A, Confavreux C, Lassmann H, Mc Donald I, Miller DH, Noseworthy J, et al. *McAlpine's Multiple Sclerosis*. Fourth Edi. Churchill-Livingstone/Elvisier; 2006.
2. Compston A, Coles A. Multiple sclerosis. *Lancet*. 2008. p. 1502–17.
3. Fernández Ó, Martín R, Rovira À, Llufríu S, Vidal-Jordana Á, Fernández-Sánchez VE, et al. Biomarcadores en la esclerosis múltiple: Puesta al día 2014. *Rev Neurol*. 2014;58(12):553–70.
4. Kurtzke JF. A reassessment of the distribution of multiple sclerosis. *Acta Neurol Scand*. 1975;51(2):137–57.
5. Sá MJ. Physiopathology of symptoms and signs in multiple sclerosis. *Arq Neuropsiquiatr*. 2012;70(9):733–40.
6. Casado V, Martínez-Yélamos S, Martínez-Yélamos A, Carmona O, Alonso L, Romero L, et al. Direct and indirect costs of Multiple Sclerosis in Baix Llobregat (Catalonia, Spain), according to disability. *BMC Health Serv Res*. 2006;6:143.
7. Kobelt G, Berg J, Lindgren P, Izquierdo G, Sánchez-Soliño O, Pérez-Miranda J, et al. Costs and quality of life of multiple sclerosis in Spain. *Eur J Health Econ*. 2006;7 Suppl 2:S65–74.
8. Pflieger CCH, Flachs EM, Koch-Henriksen N. Social consequences of multiple sclerosis (1): early pension and temporary unemployment--a historical prospective cohort study. *Mult Scler*. 2010;16(1):121–6.
9. Schumacker GA, Beebe G, Kibler RF, Kurland L, Kurtzke J, McDowell F, et al. Problems of experimental trials of therapy in multiple sclerosis: report by the panel on the evaluation of experimental trials of therapy in multiple sclerosis. *Ann N Y Acad Sci*. 1965;122:552–68.
10. Cree B a C. 2014 Multiple Sclerosis Therapeutic Update. *The Neurohospitalist* [Internet]. 2014;4(2):63–5. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3975801&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
11. Bergamaschi R, Quaglini S, Tavazzi E, Amato MP, Paolicelli D, Zipoli V, et al. Immunomodulatory therapies delay disease progression in multiple sclerosis. *Mult Scler* [Internet]. 2012; Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22653657>
12. Medaer R. Does the history of multiple sclerosis go back as far as the 14th century? *Acta neurologica Scandinavica*. 1979. p. 189–92.
13. Butler MA, Bennett TL. In Search of a Conceptualization of Multiple Sclerosis: A Historical Perspective. *Neuropsychology Review*. 2003. p. 93–112.
14. Robins AH, Holland M. The enigmatic illness and death of Constance, wife of Oscar Wilde. *Lancet* [Internet]. Elsevier Ltd; 2015;385(9962):21–2. Available from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0140673614624685>
15. Clanet M. Jean-Martin Charcot. 1825 to 1893. *Int MS J*. 2008;15(2):59–61.
16. Bogousslavsky J, Walusinski O, Moulin T. Alfred Vulpian and Jean-Martin Charcot in each other's shadow? from Castor and Pollux at la Salpêtrière to neurology forever. *Eur Neurol*. 2011;65(4):215–22.



17. Rascol A, Clanet M. Multiple sclerosis From Charcot and Vulpian to the present time. *Rev Neurol (Paris)*. 1982;138(12):921–30.
18. Murray TJ. The history of multiple sclerosis: the changing frame of the disease over the centuries. *J Neurol Sci*. 2009;277(SUPPL. 1).
19. Kurtzke JF. On the evaluation of disability in multiple sclerosis. *Neurology*. 1961;11:686–94.
20. Kurtzke JF. Neurologic impairment in multiple sclerosis and the disability status scale. *Acta Neurol Scand*. 1970;46(4):493–512.
21. Kurtzke JF. Rating neurologic impairment in multiple sclerosis: an expanded disability status scale (EDSS). *Neurology*. 1983;33(11):1444–52.
22. Poser CM, Paty DW, Scheinberg L, McDonald WI, Davis FA, Ebers GC, et al. New diagnostic criteria for multiple sclerosis: guidelines for research protocols. *Ann Neurol*. 1983;13(3):227–31.
23. McDonald WI, Compston A, Edan G, Goodkin D, Hartung HP, Lublin FD, et al. Recommended diagnostic criteria for multiple sclerosis: Guidelines from the International Panel on the Diagnosis of Multiple Sclerosis. *Ann Neurol*. 2001;50(1):121–7.
24. Polman CH, Reingold SC, Edan G, Filippi M, Hartung HP, Kappos L, et al. Diagnostic criteria for multiple sclerosis: 2005 Revisions to the “McDonald Criteria.” *Ann Neurol*. 2005;58(6):840–6.
25. Polman CH, Reingold SC, Banwell B, Clanet M, Cohen JA, Filippi M, et al. Diagnostic criteria for multiple sclerosis: 2010 Revisions to the McDonald criteria. *Ann Neurol*. 2011;69(2):292–302.
26. Milo R, Kahana E. Multiple sclerosis: Geoepidemiology, genetics and the environment. *Autoimmun Rev [Internet]*. Elsevier B.V.; 2010;9(5):A387–94. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.autrev.2009.11.010>
27. Federation MSI. Atlas of MS 2013. 2013.
28. Koutsouraki E, Costa V, Baloyannis S. Epidemiology of multiple sclerosis in Europe: a review. *Int Rev Psychiatry*. 2010;22(1):2–13.
29. Granieri E, Economou NT, De Gennaro R, Tola MR, Caniatti L, Govoni V, et al. Multiple sclerosis in the province of Ferrara: Evidence for an increasing trend. *J Neurol*. 2007;254(12):1642–8.
30. Benito-León J, Bermejo-Pareja F. Is the epidemiology of multiple sclerosis changing? *Revista de neurologia*. 2010. p. 385–6.
31. Ascherio A, Munger KL. Environmental risk factors for multiple sclerosis. Part II: Noninfectious factors. *Annals of Neurology*. 2007. p. 504–13.
32. Koch-Henriksen N, Sørensen PS. The changing demographic pattern of multiple sclerosis epidemiology. *Lancet Neurol [Internet]*. Elsevier Ltd; 2010;9(5):520–32. Available from: [http://dx.doi.org/10.1016/S1474-4422\(10\)70064-8](http://dx.doi.org/10.1016/S1474-4422(10)70064-8)
33. Koch-Henriksen N, Sorensen PS. Why does the north-south gradient of incidence of multiple sclerosis seem to have disappeared on the Northern hemisphere? *J Neurol Sci*

- [Internet]. Elsevier B.V.; 2011;311(1-2):58–63. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jns.2011.09.003>
34. Bufill E, Blesa R, Galan I, Dean G. Prevalence of multiple sclerosis in the region of Osona, Catalonia, northern Spain. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. 1995;58(5):577–81.
  35. Fernández O, Luque G, San Román C, Bravo M, Dean G. The prevalence of multiple sclerosis in the Sanitary District of Vélez-Málaga, southern Spain. *Neurology*. 1994;44(3 Pt 1):425–9.
  36. Kingwell E, Marriott J, Jetté N, Pringsheim T, Makhani N, Morrow S, et al. Incidence and prevalence of multiple sclerosis in Europe: A systematic review. *BMC Neurol*. 2013;13(3):128–39.
  37. Izquierdo G, Venegas A, Sanabria C, Navarro G. Long-term epidemiology of multiple sclerosis in the Northern Seville District. *Acta Neurol Scand* [Internet]. 2015;132(2):111–7. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1111/ane.12363>
  38. Sagnes-Raffy C, Gourraud P-A, Hannon V, Bourrel R, Laffontan M-A, Gaulene M-C, et al. Multiple sclerosis in Haute-Garonne: an important underestimation of case numbers. *Rev Epidemiol Sante Publique*. 2010;58(1):23–31.
  39. Boström I, Landtblom a.-M. Does the changing sex ratio of multiple sclerosis give opportunities for intervention? *Acta Neurol Scand* [Internet]. 2015;132(December 2002):42–5. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1111/ane.12430>
  40. Llorca J, Prieto D, Delgado Rodríguez M. [Mortality due to multiple sclerosis in Spain, 1951-1992]. *Neurología*. 1999;14(8):377–82.
  41. Kingwell E, van der Kop M, Zhao Y, Shirani a., Zhu F, Oger J, et al. Relative mortality and survival in multiple sclerosis: findings from British Columbia, Canada. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. 2012;83:61–6.
  42. Hirst C, Swingler R, Compston D a S, Ben-Shlomo Y, Robertson NP. Survival and cause of death in multiple sclerosis: a prospective population-based study. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. 2008;79:1016–21.
  43. Redelings MD, McCoy L, Sorvillo F. Multiple sclerosis mortality and patterns of comorbidity in the United States from 1990 to 2001. *Neuroepidemiology*. 2006;26:102–7.
  44. Ragonese P, Aridon P, Salemi G, D'Amelio M, Savettieri G. Mortality in multiple sclerosis: A review. *Eur J Neurol*. 2008;15:123–7.
  45. Scalfari A, Knappertz V, Cutter G, Goodin DS, Ashton R, Ebers GC. Mortality in patients with multiple sclerosis. *Neurology*. 2013;81(2):184–92.
  46. Jick SS, Li L, Falcone GJ, Vassilev ZP, Wallander M -a. Epidemiology of multiple sclerosis: results from a large observational study in the UK. *J Neurol* [Internet]. 2015;262:2033–41. Available from: <http://link.springer.com/10.1007/s00415-015-7796-2>
  47. Popescu BFG, Pirko I, Lucchinetti CF. Pathology of multiple sclerosis: Where do we stand? *Contin Lifelong Learn Neurol*. 2013;19:901–21.
  48. Lucchinetti CF, Parisi J, Bruck W. The pathology of multiple sclerosis. *Neurol Clin*. 2005;23:77–105.

49. Bradl M, Lassmann H. Progressive multiple sclerosis. *Semin Immunopathol.* 2009;31:455–65.
50. Barnett MH, Prineas JW. Relapsing and Remitting Multiple Sclerosis: Pathology of the Newly Forming Lesion. *Ann Neurol.* 2004;55:458–68.
51. Trapp BD, Peterson J, Ransohoff RM, Rudick R, Mörk S, Bö L. Axonal transection in the lesions of multiple sclerosis. *N Engl J Med.* 1998;338:278–85.
52. Prineas JW, Barnard RO, Revesz T, Kwon EE, Sharer L, Cho ES. Multiple sclerosis. Pathology of recurrent lesions. *Brain.* 1993;116 ( Pt 3:681–93.
53. Lucchinetti C, Brück W, Parisi J, Scheithauer B, Rodriguez M, Lassmann H. Heterogeneity of multiple sclerosis lesions: Implications for the pathogenesis of demyelination. *Ann Neurol.* 2000;47:707–17.
54. Metz I, Weigand SD, Popescu BFG, Frischer JM, Parisi JE, Guo Y, et al. Pathologic heterogeneity persists in early active multiple sclerosis lesions. *Ann Neurol.* 2014;75:728–38.
55. Aboul-Enein F, Lassmann H. Mitochondrial damage and histotoxic hypoxia: A pathway of tissue injury in inflammatory brain disease? *Acta Neuropathologica.* 2005. p. 49–55.
56. Frischer JM, Bramow S, Dal-Bianco A, Lucchinetti CF, Rauschka H, Schmidbauer M, et al. The relation between inflammation and neurodegeneration in multiple sclerosis brains. *Brain.* 2009;132(5):1175–89.
57. Lassmann H. Pathology and disease mechanisms in different stages of multiple sclerosis. *J Neurol Sci [Internet]. Elsevier B.V.;* 2013;333(1-2):1–4. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jns.2013.05.010>
58. Bø L. The histopathology of grey matter demyelination in multiple sclerosis. *Acta Neurol Scand.* 2009;120(28):51–7.
59. Lucchinetti CF, Popescu BFG, Bunyan RF, Moll NM, Roemer SF, Lassmann H, et al. Inflammatory Cortical Demyelination in Early Multiple Sclerosis. *N Engl J Med.* 2011;365:2188–97.
60. Kutzelnigg A, Lucchinetti CF, Stadelmann C, Brück W, Rauschka H, Bergmann M, et al. Cortical demyelination and diffuse white matter injury in multiple sclerosis. *Brain.* 2005;(128):2705–12.
61. Kutzelnigg A, Lassmann H. Cortical lesions and brain atrophy in MS. *J Neurol Sci.* 2005;233:55–9.
62. Rudick RA, Trapp BD. Gray-matter Injury in Multiple Sclerosis. *N Engl J Med.* 2009;(361):1505–6.
63. Klaver R, De Vries HE, Schenk GJ, Geurts JJG. Grey matter damage in multiple sclerosis: a pathology perspective. *Prion [Internet].* 2013;7(February):66–75. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3609053&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
64. Magliozzi R, Howell O, Vora A, Serafini B, Nicholas R, Puopolo M, et al. Meningeal B-cell follicles in secondary progressive multiple sclerosis associate with early onset of disease and severe cortical pathology. *Brain.* 2007;130(4):1089–104.

65. Fischer MT, Wimmer I, Höftberger R, Gerlach S, Haider L, Zrzavy T, et al. Disease-specific molecular events in cortical multiple sclerosis lesions. *Brain*. 2013;136(6):1799–815.
66. Barkhof F, Geurts JJG. Laminar cortical damage in multiple sclerosis. *Brain* [Internet]. 2015;138(Pt 4):828–9. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25802316>
67. Derfuss T, Parikh K, Velhin S, Braun M, Mathey E, Krumbholz M, et al. Contactin-2/TAG-1-directed autoimmunity is identified in multiple sclerosis patients and mediates gray matter pathology in animals. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2009;106(20):8302–7.
68. Geurts JJ, Barkhof F. Grey matter pathology in multiple sclerosis. *Lancet Neurol*. 2008;7:841–51.
69. Schutzer SE, Angel TE, Liu T, Schepmoes A a., Xie F, Bergquist J, et al. Gray Matter Is Targeted in First-Attack Multiple Sclerosis. *PLoS One*. 2013;8(9).
70. Stys PK, Zamponi GW, van Minnen J, Geurts JJG. Will the real multiple sclerosis please stand up? *Nat Rev Neurosci*. 2012;13(7):507–14.
71. Lublin FD, Reingold SC. Defining the clinical course of multiple sclerosis: results of an international survey. National Multiple Sclerosis Society (USA) Advisory Committee on Clinical Trials of New Agents in Multiple Sclerosis. *Neurology*. 1996;46(4):907–11.
72. Kantarci OH, Weinshenker BG. Natural history of multiple sclerosis. *Neurol Clin*. 2005;23(1):17–38.
73. Confavreux C, Vukusic S. Natural history of multiple sclerosis: A unifying concept. *Brain*. 2006;129(3):606–16.
74. Scalfari A, Neuhaus A, Degenhardt A, Rice GP, Muraro P a., Daumer M, et al. The natural history of multiple sclerosis, a geographically based study 10: Relapses and long-term disability. *Brain*. 2010;133(7):1914–29.
75. Confavreux C, Vukusic S, Moreau T, Adeleine P. Relapses and Progression of Disability in Multiple Sclerosis. *N Engl J Med*. 2000;343(20):1430–8.
76. Scalfari A, Neuhaus A, Daumer M, Deluca GC, Muraro P a, Ebers GC. Early relapses, onset of progression, and late outcome in multiple sclerosis. *JAMA Neurol* [Internet]. 2013;70(2):214–22. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23407713>
77. Vukusic S, Confavreux C. Natural history of multiple sclerosis: risk factors and prognostic indicators. *Curr Opin Neurol*. 2007;20(3):269–74.
78. Renoux C. Natural History of Multiple Sclerosis: Long-Term Prognostic Factors. *Neurol Clin* [Internet]. Elsevier Ltd; 2011;29(2):293–308. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ncl.2011.01.006>
79. Ribbons KA, McElduff P, Boz C, Trojano M, Izquierdo G, Duquette P, et al. Male Sex Is Independently Associated with Faster Disability Accumulation in Relapse-Onset MS but Not in Primary Progressive MS. *PLoS One* [Internet]. 2015;10(6):e0122686. Available from: <http://dx.plos.org/10.1371/journal.pone.0122686>
80. Miller DH, Chard DT, Ciccarelli O. Clinically isolated syndromes. *Lancet Neurol* [Internet]. Elsevier Ltd; 2012;11(2):157–69. Available from: [http://dx.doi.org/10.1016/S1474-4422\(11\)70274-5](http://dx.doi.org/10.1016/S1474-4422(11)70274-5)

81. Toosy AT, Mason DF, Miller DH. Optic neuritis. *Lancet Neurol* [Internet]. Elsevier Ltd; 2014;13(1):83–99. Available from: [http://dx.doi.org/10.1016/S1474-4422\(13\)70259-X](http://dx.doi.org/10.1016/S1474-4422(13)70259-X)
82. Eriksson M, Andersen O, Runmarker B. Long-term follow up of patients with clinically isolated syndromes, relapsing-remitting and secondary progressive multiple sclerosis. *Mult Scler*. 2003;9(3):260–74.
83. Tintore M, Rovira À, Río J, Otero-Romero S, Arrambide G, Tur C, et al. Defining high, medium and low impact prognostic factors for developing multiple sclerosis. *Brain* [Internet]. 2015;138(Pt 7):1863–74. Available from: <http://www.brain.oxfordjournals.org/cgi/doi/10.1093/brain/awv105>
84. Tintoré M, Rovira a., Río J, Tur C, Pelayo R, Nos C, et al. Do oligoclonal bands add information to MRI in first attacks of multiple sclerosis? *Neurology*. 2008;70:1079–83.
85. Kuhle J, Disanto G, Dobson R, Adiatori R, Bianchi L, Topping J, et al. Conversion from clinically isolated syndrome to multiple sclerosis: A large multicentre study. *Mult Scler J* [Internet]. 2015; Available from: <http://msj.sagepub.com/cgi/doi/10.1177/1352458514568827>
86. Multiple sclerosis risk after optic neuritis: final optic neuritis treatment trial follow-up. *Arch Neurol*. 2008;65(6):727–32.
87. Okuda DT, Mowry EM, Beheshtian a., Waubant E, Baranzini SE, Goodin DS, et al. Incidental MRI anomalies suggestive of multiple sclerosis: The radiologically isolated syndrome. *Neurology*. 2009;72:800–5.
88. Gabelic T, Ramasamy DP, Weinstock-Guttman B, Hagemeyer J, Kennedy C, Melia R, et al. Prevalence of radiologically isolated syndrome and white matter signal abnormalities in healthy relatives of patients with multiple sclerosis. *Am J Neuroradiol*. 2014;35(1):106–12.
89. Okuda DT, Siva A, Kantarci O, Inglese M, Katz I, Tutuncu M, et al. Radiologically isolated syndrome: 5-year risk for an initial clinical event. *PLoS One*. 2014;9(3).
90. Lublin FD, Reingold SC, Cohen J a., Cutter GR, Sørensen PS, Thompson AJ, et al. Defining the clinical course of multiple sclerosis: The 2013 revisions. *Neurology*. 2014;83(3):278–86.
91. Lublin FD. New Multiple Sclerosis Phenotypic Classification. *Eur Neurol* [Internet]. 2014;72(s1):1–5. Available from: <http://www.karger.com?doi=10.1159/000367614>
92. Weinshenker BG, Bass B, Rice GP, Noseworthy J, Carriere W, Baskerville J, et al. The natural history of multiple sclerosis: a geographically based study. I. Clinical course and disability. *Brain*. 1989;112 ( Pt 1):133–46.
93. Kanchandani R, Howe JG. Lhermitte's sign in multiple sclerosis: a clinical survey and review of the literature. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. 1982;45(4):308–12.
94. García-Moreno JM, Izquierdo G. Lhermitte's sign. *Neurologia*. 2002;17(3):143–50.
95. Miller DH, Leary SM. Primary-progressive multiple sclerosis. *Lancet Neurology*. 2007. p. 903–12.
96. Sastre-Garriga J, Tintoré M, Nos C, Tur C, Río J, Téllez N, et al. Clinical features of CIS of the brainstem/cerebellum of the kind seen in MS. *J Neurol*. 2010;257(5):742–6.

97. Mowry EM. Natural History of Multiple Sclerosis: Early Prognostic Factors. *Neurol Clin* [Internet]. Elsevier Ltd; 2011;29(2):279–92. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ncl.2011.01.001>
98. Minneboo A, Barkhof F, Polman CH, Uitdehaag BMJ, Knol DL, Castelijns J a. Infratentorial lesions predict long-term disability in patients with initial findings suggestive of multiple sclerosis. *Arch Neurol*. 2004;61(2):217–21.
99. Hennessey A, Robertson NP, Swingler R, Compston DA. Urinary, faecal and sexual dysfunction in patients with multiple sclerosis. *J Neurol*. 1999;246(11):1027–32.
100. Zorzon M, Zivadinov R, Bosco A, Bragadin LM, Moretti R, Bonfigli L, et al. Sexual dysfunction in multiple sclerosis: a case-control study. I. Frequency and comparison of groups. *Mult Scler*. 1999;5(6):418–27.
101. Chiaravalloti ND, DeLuca J. Cognitive impairment in multiple sclerosis. *The Lancet Neurology*. 2008. p. 1139–51.
102. Amato MP, Zipoli V, Portaccio E. Multiple sclerosis-related cognitive changes: A review of cross-sectional and longitudinal studies. *J Neurol Sci*. 2006;245(1-2):41–6.
103. Sumowski JF, Rocca M a., Leavitt VM, Dackovic J, Mesaros S, Drulovic J, et al. Brain reserve and cognitive reserve protect against cognitive decline over 4.5 years in MS. *Neurology*. 2014;82(20):1776–83.
104. Gonsette RE. Neurodegeneration in multiple sclerosis: The role of oxidative stress and excitotoxicity. *J Neurol Sci*. 2008;274(1-2):48–53.
105. Park K, Tanaka K, Tanaka M. Uhthoff's phenomenon in multiple sclerosis and neuromyelitis optica. *Eur Neurol* [Internet]. 2014;72(3-4):153–6. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25195501>
106. Leavitt VM, Sumowski JF. Warmer outdoor temperature is associated with worse cognitive status in multiple sclerosis Article Warmer outdoor temperature is associated with worse cognitive status in multiple sclerosis. *Neurology*. 2012;(78):964–8.
107. Braley TJ, Chervin RD. Fatigue in multiple sclerosis: mechanisms, evaluation, and treatment. *Sleep*. 2010;33(8):1061–7.
108. Fisniku LK, Brex P a., Altmann DR, Miszkief K a., Benton CE, Lanyon R, et al. Disability and T2 MRI lesions: A 20-year follow-up of patients with relapse onset of multiple sclerosis. *Brain*. 2008;131(3):808–17.
109. Villar LM, Casanova B, Ouamara N, Comabella M, Jalili F, Leppert D, et al. Immunoglobulin M oligoclonal bands: Biomarker of targetable inflammation in primary progressive multiple sclerosis. *Ann Neurol*. 2014;1–10.
110. Mandrioli J, Sola P, Bedin R, Gambini M, Merelli E. A multifactorial prognostic index in multiple sclerosis: Cerebrospinal fluid IgM oligoclonal bands and clinical features to predict the evolution of the disease. *J Neurol*. 2008;255:1023–31.
111. Leray E, Yaouanq J, Le Page E, Coustans M, Laplaud D, Oger J, et al. Evidence for a two-stage disability progression in multiple sclerosis. *Brain*. 2010;133(7):1900–13.
112. Shirani A, Kop ML Van Der. Association between Use of Interferon Beta and Progression of Disability in Patients. *Jama*. 2012;308:247–56.



113. Tremlett H, Zhao Y, Rieckmann P, Hutchinson M. New perspectives in the natural history of multiple sclerosis. *Neurology*. 2010;74(24):2004–15.
114. Shirani a., Zhao Y, Kingwell E, Rieckmann P, Tremlett H. Temporal trends of disability progression in multiple sclerosis: findings from British Columbia, Canada (1975–2009). *Mult Scler J*. 2012;18(4):442–50.
115. Meyer-Moock S, Feng Y-S, Maeurer M, Dippel F-W, Kohlmann T. Systematic literature review and validity evaluation of the Expanded Disability Status Scale (EDSS) and the Multiple Sclerosis Functional Composite (MSFC) in patients with multiple sclerosis. *BMC Neurol [Internet]*. *BMC Neurology*; 2014;14(1):58. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24666846>
116. Noseworthy JH, Vandervoort MK, Wong CJ, Ebers GC. Interrater variability with the Expanded Disability Status Scale (EDSS) and Functional Systems (FS) in a multiple sclerosis clinical trial. The Canadian Cooperation MS Study Group. *Neurology*. 1990.
117. Goodkin DE, Cookfair D, Wende K, Bourdette D, Pullicino P, Scherokman B, et al. Inter- and intrarater scoring agreement using grades 1.0 to 3.5 of the Kurtzke Expanded Disability Status Scale (EDSS). Multiple Sclerosis Collaborative Research Group. *Neurology*. 1992;42(4):859–63.
118. Roxburgh RHR, Seaman SR, Masterman T, Hensiek AE, Sawcer SJ, Vukusic S, et al. Multiple Sclerosis Severity Score: using disability and disease duration to rate disease severity. *Neurology*. 2005;64(7):1144–51.
119. Pachner AR, Steiner I. The multiple sclerosis severity score (MSSS) predicts disease severity over time. *J Neurol Sci*. 2009;278(1-2):66–70.
120. Izquierdo G, Peña JLR. Evaluación clínica de la esclerosis múltiple: cuantificación mediante la utilización de escalas. 2003;36(2):145–52.
121. Fischer JS, Rudick RA, Cutter GR, Reingold SC. The Multiple Sclerosis Functional Composite Measure (MSFC): an integrated approach to MS clinical outcome assessment. National MS Society Clinical Outcomes Assessment Task Force. *Mult Scler*. 1999;5(4):244–50.
122. Miller DH, Weinshenker BG, Filippi M, Banwell BL, Cohen J a, Freedman MS, et al. Differential diagnosis of suspected multiple sclerosis: a consensus approach. *Mult Scler*. 2008;14(9):1157–74.
123. Barkhof F, Miller DH, Scheltens P, Campi A, Polman CH FM. Comparison of MRI criteria at first presentation to predict conversion to clinically definite multiple sclerosis. *Brain*. 1997;120:2059–69.
124. Tintoré M, Rovira A, Martínez MJ, Rio J, Díaz-Villoslada P, Brieva L, et al. Isolated demyelinating syndromes: Comparison of different MR imaging criteria to predict conversion to clinically definite multiple sclerosis. *Am J Neuroradiol*. 2000;21(4):702–6.
125. Swanton JK, Rovira A, Tintore M, Altmann DR, Barkhof F, Filippi M, et al. MRI criteria for multiple sclerosis in patients presenting with clinically isolated syndromes: a multicentre retrospective study. *Lancet Neurol*. 2007;6(8):677–86.
126. Montalban X, Tintoré M, Swanton J, Barkhof F, Fazekas F, Filippi M, et al. MRI criteria for MS in patients with clinically isolated syndromes. *Neurology*. 2010. p. 427–34.

127. Pia Sormani M. The Will Rogers phenomenon: the effect of different diagnostic criteria. *J Neurol Sci* [Internet]. Elsevier Ltd; 2009;287(SUPPL. 1):S46–9. Available from: [http://dx.doi.org/10.1016/S0022-510X\(09\)71300-0](http://dx.doi.org/10.1016/S0022-510X(09)71300-0)
128. Sormani MP, Tintorè M, Rovaris M, Rovira A, Vidal X, Bruzzi P, et al. Will Rogers phenomenon in multiple sclerosis. *Ann Neurol*. 2008;64(4):428–33.
129. Andersson M, Alvarez-Cermeño J, Bernardi G, Cogato I, Fredman P, Frederiksen J, et al. Cerebrospinal fluid in the diagnosis of multiple sclerosis: a consensus report. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. 1994;57(8):897–902.
130. Thompson EJ, Freedman MS. Cerebrospinal fluid analysis in the diagnosis of multiple sclerosis. *Adv Neurol*. 2006;98:147–60.
131. Link H, Tibbling G. Principles of albumin and IgG analyses in neurological disorders. III. Evaluation of IgG synthesis within the central nervous system in multiple sclerosis. *Scandinavian journal of clinical and laboratory investigation*. 1977.
132. Link H, Huang YM. Oligoclonal bands in multiple sclerosis cerebrospinal fluid: An update on methodology and clinical usefulness. *Journal of Neuroimmunology*. 2006. p. 17–28.
133. Petzold A. Intrathecal oligoclonal IgG synthesis in multiple sclerosis. *J Neuroimmunol* [Internet]. Elsevier B.V.; 2013;262(1-2):1–10. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jneuroim.2013.06.014>
134. Awad A, Hemmer B, Hartung H, Kieseier B, Bennett JL, Stuve O. Analyses of cerebrospinal fluid in the diagnosis and monitoring of multiple sclerosis. *J Neuroimmunol* [Internet]. Elsevier B.V.; 2010;219(1-2):1–7. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jneuroim.2009.09.002>
135. Dobson R, Ramagopalan S, Davis A, Giovannoni G. Cerebrospinal fluid oligoclonal bands in multiple sclerosis and clinically isolated syndromes: a meta-analysis of prevalence, prognosis and effect of latitude. [Internet]. *Journal of neurology, neurosurgery, and psychiatry*. 2013. p. 909–14. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23431079>
136. Álvarez-Cermeño JC, Villar LM. Multiple sclerosis: Oligoclonal bands—a useful tool to avoid MS misdiagnosis. *Nat Publ Gr* [Internet]. Nature Publishing Group; 2013;9(6):303–4. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/nrneurol.2013.74> \nfile:///Users/Renesito1/Documents/Library.papers3/Articles/2013/%C3%81varez-Cerme%C3%B1o/Nature Publishing Group 2013 %C3%81varez-Cerme%C3%B1o.pdf\npapers3://publication/doi/10.1038/nrneurol.2013.74
137. Confavreux C, Chapuis-cellier C, Arnaud P, Robert O, Aimard G, Devic M. Oligoclonal “fingerprint.” *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. 1986;49(January):1308–12.
138. Villar LM, Garcia-Sanchez MI, Costa-Frossard L, Espino M, Roldan E, Paramo D, et al. Immunological Markers of Optimal Response to Natalizumab in Multiple Sclerosis. *Archives of Neurology*. 2012. p. 191–7.
139. Ferraro D, Simone AM, Bedin R, Galli V, Vitetta F, Federzoni L, et al. Cerebrospinal fluid oligoclonal IgM bands predict early conversion to clinically definite multiple sclerosis in patients with Clinically Isolated Syndrome. *J Neuroimmunol* [Internet]. Elsevier B.V.; 2013;257(1-2):76–81. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jneuroim.2013.01.011>



140. Villar L, García-Barragán N, Espiño M, Roldán E, Sádaba M, Gómez-Rial J, et al. Influence of oligoclonal IgM specificity in multiple sclerosis disease course. *Mult Scler.* 2008;14:183–7.
141. Thangarajh M, Gomez-Rial J, Hedström a K, Hillert J, Alvarez-Cermeño JC, Masterman T, et al. Lipid-specific immunoglobulin M in CSF predicts adverse long-term outcome in multiple sclerosis. *Mult Scler.* 2008;14:1208–13.
142. Magraner MJ, Bosca I, Simó-Castelló M, García-Martí G, Alberich-Bayarri A, Coret F, et al. Brain atrophy and lesion load are related to CSF lipid-specific IgM oligoclonal bands in clinically isolated syndromes. *Neuroradiology.* 2012;54(1):5–12.
143. Comabella M, Montalban X. Body fluid biomarkers in multiple sclerosis. *Lancet Neurol.* 2014;13(January):113–26.
144. Rovira a., Tintoré M, Álvarez-Cermeño JC, Izquierdo G, Prieto JM. Recomendaciones para la utilización e interpretación de los estudios de resonancia magnética en la esclerosis múltiple. *Neurología.* 2010;25(4):248–65.
145. Rovira À, Wattjes MP, Tintoré M, Tur C, Yousry T a., Sormani MP, et al. Evidence-based guidelines: MAGNIMS consensus guidelines on the use of MRI in multiple sclerosis—clinical implementation in the diagnostic process. *Nat Rev Neurol [Internet].* Nature Publishing Group; 2015;1–12. Available from: <http://www.nature.com/doi/10.1038/nrneurol.2015.106>
146. Kearney H, Miller DH, Ciccarelli O. Spinal cord MRI in multiple sclerosis—diagnostic, prognostic and clinical value. *Nat Rev Neurol [Internet].* Nature Publishing Group; 2015;11(6):327–38. Available from: <http://www.nature.com/doi/10.1038/nrneurol.2015.80>
147. Filippi M, Horsfield MA, Tofts PS, Barkhof F, Thompson AJ, Miller DH. Quantitative assessment of MRI lesion load in monitoring the evolution of multiple sclerosis. *Brain.* 1995;118 ( Pt 6):1601–12.
148. Rovira A, Swanton J, Tintoré M, Huerga E, Barkhof F, Filippi M, et al. A single, early magnetic resonance imaging study in the diagnosis of multiple sclerosis. *Arch Neurol.* 2009;66(5):587–92.
149. Montalban X, Tintore M, Swanton J, Barkhof F, Fazekas F, Filippi M, et al. MRI criteria for MS in patients with clinically isolated syndromes. *Neurology.* 2010;74(5):427–34.
150. De Stefano N, Giorgio a., Battaglini M, Rovaris M, Sormani MP, Barkhof F, et al. Assessing brain atrophy rates in a large population of untreated multiple sclerosis subtypes. *Neurology.* 2010;74(23):1868–76.
151. Popescu V, Agosta F, Hulst HE, Sluimer IC, Knol DL, Sormani MP, et al. Brain atrophy and lesion load predict long term disability in multiple sclerosis. *J Neurol Neurosurg Psychiatry [Internet].* 2013;84(10):1082–91. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23524331>
152. Calabrese M, Rinaldi F, Mattisi I, Bernardi V, Favaretto a., Perini P, et al. The predictive value of gray matter atrophy in clinically isolated syndromes. *Neurology.* 2011;77(3):257–63.
153. Río J, Comabella M, Montalban X. Predicting responders to therapies for multiple sclerosis. *Nat Rev Neurol [Internet].* Nature Publishing Group; 2009;5(10):553–60. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/nrneurol.2009.139>

154. Martí G, Río J, Rovira À, Auger C, Tintoré M, Sastre-Garriga J, et al. [Progressive multifocal leukoencephalopathy associated to natalizumab: the importance of magnetic resonance imaging in its early diagnosis]. *Rev Neurol* [Internet]. 2015;60(4):164–8. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25670046>
155. Schlaeger R, D'Souza M, Schindler C, Grize L, Kappos L, Fuhr P. Combined evoked potentials as markers and predictors of disability in early multiple sclerosis. *Clin Neurophysiol* [Internet]. International Federation of Clinical Neurophysiology; 2012;123(2):406–10. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.clinph.2011.06.021>
156. Fernández V, Valls-Sole J, Relova JL, Raguer N, Miralles F, Dinca L, et al. Recomendaciones para la utilización clínica del estudio de potenciales evocados motores en la esclerosis múltiple. *Neurología*. 2012;28(7):408–16.
157. Jacob A, Matiello M, Wingerchuk DM, Lucchinetti CF, Pittock SJ, Weinshenker BG. Neuromyelitis optica: Changing concepts. *J Neuroimmunol*. 2007;187:126–38.
158. Jarius S, Ruprecht K, Wildemann B, Kuempfel T, Ringelstein M, Geis C, et al. Contrasting disease patterns in seropositive and seronegative neuromyelitis optica: A multicentre study of 175 patients. *J Neuroinflammation* [Internet]. BioMed Central Ltd; 2012;9(1):14. Available from: <http://www.jneuroinflammation.com/content/9/1/14>
159. Karussis D. The diagnosis of multiple sclerosis and the various related demyelinating syndromes: A critical review. *J Autoimmun* [Internet]. Elsevier Ltd; 2014;48-49:134–42. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jaut.2014.01.022>
160. Vosoughi R, Freedman MS. Therapy of MS. *Clin Neurol Neurosurg*. 2010;112:365–85.
161. Río J, Comabella M, Montalban X. Multiple sclerosis: current treatment algorithms. *Curr Opin Neurol*. 2011;24(3):230–7.
162. Bates D. Treatment effects of immunomodulatory therapies at different stages of multiple sclerosis in short-term trials. *Neurology*. 2011;76((1 Supple 1)):S14–25.
163. Lugaresi A, di Ioia M, Travaglini D, Pietrolongo E, Pucci E, Onofri M. Risk-benefit considerations in the treatment of relapsing-remitting multiple sclerosis. *Neuropsychiatr Dis Treat*. 2013;9:893–914.
164. Kappos L, Freedman MS, Polman CH, Edan G, Hartung HP, Miller DH, et al. Effect of early versus delayed interferon beta-1b treatment on disability after a first clinical event suggestive of multiple sclerosis: a 3-year follow-up analysis of the BENEFIT study. *Lancet*. 2007;370(9585):389–97.
165. Sormani MP, De Stefano N. Defining and scoring response to IFN- $\beta$  in multiple sclerosis. *Nat Rev Neurol* [Internet]. Nature Publishing Group; 2013;9(9):504–12. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23897407>
166. Sormani MP, Bonzano L, Roccatagliata L, Cutter GR, Mancardi GL, Bruzzi P. Magnetic Resonance Imaging as a Potential Surrogate for Relapses in Multiple Sclerosis: A Meta-analytic Approach. *Ann Neurol*. 2009;65:268–75.
167. Sormani MP, Arnold DL, De Stefano N. Treatment effect on brain atrophy correlates with treatment effect on disability in multiple sclerosis. *Ann Neurol*. 2014;75(1):43–9.
168. Burton JM, O'Connor PW, Hohol M, Beyene J. Oral versus intravenous steroids for treatment of relapses in multiple sclerosis. *Cochrane Database of Systematic Reviews*. 2009. p. CDO06921.

169. Le Page E, Veillard D, Laplaud DA, Hamonic S, Wardi R, Lebrun C, et al. Oral versus intravenous high-dose methylprednisolone for treatment of relapses in patients with multiple sclerosis (COPOUSEP): a randomised, controlled, double-blind, non-inferiority trial. *Lancet (London, England)* [Internet]. 2015;386(9997):974–81. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26135706>
170. Bevan C, Gelfand JM. Therapeutic management of severe relapses in multiple sclerosis. *Curr Treat Options Neurol* [Internet]. 2015;17(4):345. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25794777>
171. Interferon beta-1b is effective in relapsing-remitting multiple sclerosis. I. Clinical results of a multicenter, randomized, double-blind, placebo-controlled trial. The IFNB Multiple Sclerosis Study Group. *Neurology*. 1993.
172. Jacobs LD, Beck RW, Simon JH, Kinkel RP, Brownscheidle CM, Murray TJ, et al. Intramuscular interferon beta-1a therapy initiated during a first demyelinating event in multiple sclerosis. CHAMPS Study Group. *New Engl J Med*. 2000.
173. Kieseier BC, Stüve O. A critical appraisal of treatment decisions in multiple sclerosis--old versus new. *Nat Rev Neurol* [Internet]. Nature Publishing Group; 2011;7(5):255–62. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/nrneurol.2011.41>
174. Koch-Henriksen N, Sorensen PS, Bendtzen K, Flachs EM. The clinical effect of neutralizing antibodies against interferon-beta is independent of the type of interferon-beta used for patients with relapsing-remitting multiple sclerosis. *Mult Scler*. 2009;15:601–5.
175. Bertolotto A, Capobianco M, Amato MP, Capello E, Capra R, Centonze D, et al. Guidelines on the clinical use for the detection of neutralizing antibodies (NAbs) to IFN beta in multiple sclerosis therapy: Report from the Italian Multiple Sclerosis Study group. *Neurol Sci*. 2014;35:307–16.
176. Hartung H-P, Kappos L, Goodin DS, O'Connor P, Filippi M, Arnason B, et al. Predictors of disease activity in 857 patients with MS treated with interferon beta-1b. *J Neurol* [Internet]. Springer Berlin Heidelberg; 2015;Epub ahead of print. Available from: <http://link.springer.com/10.1007/s00415-015-7862-9>
177. Panitch HS. Interferons in multiple sclerosis. A review of the evidence. *Drugs*. 1992;44:946–62.
178. Dhib-Jalbut S, Marks S. Mechanisms of interferon beta action in multiple sclerosis. *Neurology*. 2010;74 (Suppl:S17–24.
179. Placebo-controlled multicentre randomised trial of interferon beta-1b in treatment of secondary progressive multiple sclerosis. European Study Group on interferon beta-1b in secondary progressive MS. *Lancet*. 1998.
180. Goodin DS, Reder AT, Ebers GC, Cutter G, Kremenchutzky M, Oger J, et al. Survival in MS: A randomized cohort study 21 years after the start of the pivotal IFNβ-1b study. *Neurology* [Internet]. 2012;78:1315–22. Available from: <http://bmjopen.bmj.com/content/2/6/e001972>
181. Jacobs LD, Cookfair DL, Rudick RA, Herndon RM, Richert JR, Salazar AM, et al. Intramuscular interferon beta-1a for disease progression in relapsing multiple sclerosis. The Multiple Sclerosis Collaborative Research Group (MSCRG). *Annals of Neurology*. 1996.

182. Randomised double-blind placebo-controlled study of interferon beta-1a in relapsing/remitting multiple sclerosis. PRISMS (Prevention of Relapses and Disability by Interferon beta-1a Subcutaneously in Multiple Sclerosis) Study Group. *Lancet*. 1998.
183. PRISMS-4: Long-term efficacy of interferon-beta-1a in relapsing MS. *Neurology*. 2001.
184. Comi G, Filippi M, Barkhof F, Durelli L, Edan G, Fernández O, et al. Effect of early interferon treatment on conversion to definite multiple sclerosis: A randomised study. *Lancet*. 2001;357(9268):1576–82.
185. Comi G, De Stefano N, Freedman MS, Barkhof F, Polman CH, Uitdehaag BMJ, et al. Comparison of two dosing frequencies of subcutaneous interferon beta-1a in patients with a first clinical demyelinating event suggestive of multiple sclerosis (REFLEX): A phase 3 randomised controlled trial. *Lancet Neurol*. 2012;11(1):33–41.
186. Freedman MS, De Stefano N, Barkhof F, Polman CH, Comi G, Uitdehaag BMJ, et al. Patient subgroup analyses of the treatment effect of subcutaneous interferon beta-1a on development of multiple sclerosis in the randomized controlled REFLEX study. *J Neurol*. 2014;261(3):490–9.
187. Millán-Pascual J, Turpín-Fenoll L, Del Saz-Saucedo P, Rueda-Medina I, Navarro-Muñoz S. Psoriasis during natalizumab treatment for multiple sclerosis. *Journal of Neurology*. 2012. p. 2758–60.
188. Hunt D, Kavanagh D, Drummond I, Weller B, Bellamy C, Overell J, et al. Thrombotic Microangiopathy Associated with Interferon Beta. *N Engl J Med* [Internet]. 2014;370(13):1270–1. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24670185>
189. Tremlett H, Oger J. Hepatic injury, liver monitoring and the beta-interferons for multiple sclerosis. *Journal of Neurology*. 2004. p. 1297–303.
190. Cocco E, Marrosu MG. Profile of PEGylated interferon beta in the treatment of relapsing-remitting multiple sclerosis. *Ther Clin Risk Manag*. 2015;8:759–66.
191. Kieseier BC, Arnold DL, Balcer LJ, Boyko AA, Pelletier J, Liu S, et al. Peginterferon beta-1a in multiple sclerosis: 2-year results from ADVANCE. *Mult Scler* [Internet]. 2015;21:1025–35. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25432952>
192. Racke MK, Lovett-Racke a. E, Karandikar NJ. The mechanism of action of glatiramer acetate treatment in multiple sclerosis. *Neurology*. 2010;74:S25–30.
193. Wolinsky JS, Borresen TE, Dietrich DW, Wynn D, Sidi Y, Steinerman JR, et al. GLACIER: An open-label, randomized, multicenter study to assess the safety and tolerability of glatiramer acetate 40mg three-times weekly versus 20mg daily in patients with relapsing-remitting multiple sclerosis. *Mult Scler Relat Disord* [Internet]. Elsevier; 2015;4(4):370–6. Available from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S2211034815000760>
194. Johnson KP, Brooks BR, Cohen JA, Ford CC, Goldstein J, Lisak RP, et al. Copolymer 1 reduces relapse rate and improves disability in relapsing-remitting multiple sclerosis: results of a phase III multicenter, double-blind placebo-controlled trial. The Copolymer 1 Multiple Sclerosis Study Group. *Neurology*. 1995.
195. Comi G, Filippi M, Wolinsky JS. European/Canadian multicenter, double-blind, randomized, placebo-controlled study of the effects of glatiramer acetate on magnetic resonance imaging--measured disease activity and burden in patients with relapsing multiple sclerosis. *European/Canadian Gla. Annals of Neurology*. 2001.

196. Carter N, Keating G. Glatiramer acetate: a review of its use in relapsing-remitting multiple sclerosis and in delaying the onset of clinically definite multiple sclerosis. *Drugs*. 2010. p. 1545–77.
197. Comi G, Martinelli V, Rodegher M, Muiola L, Bajenaru O, Carra A, et al. Effect of glatiramer acetate on conversion to clinically definite multiple sclerosis in patients with clinically isolated syndrome (PreCISe study): a randomised, double-blind, placebo-controlled trial. *Lancet*. 2009;374(9700):1503–11.
198. La Mantia L, Di Pietrantonj C, Rovaris M, Rigon G, Frau S, Berardo F, et al. Interferon-beta versus glatiramer acetate for relapsing-remitting multiple sclerosis. *Cochrane database Syst Rev [Internet]*. 2014;7:CD009333. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25062935>
199. Arruti M, Castillo-Trivino T, de la Riva P, Marti-Masso JF, Lopez de Munain A, Olascoaga J. [Autoimmune hepatitis in a patient with multiple sclerosis under treatment with glatiramer acetate]. *Rev Neurol [Internet]*. 2012;55(3):190–2. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22825980>
200. Lee S, Benveniste E. Adhesion molecule expression and regulation on cells of the nervous system. *J Neuroimmunol*. 1999;98:77–88.
201. Bielekova B, Becker B. Monoclonal antibodies in MS. *Neurology [Internet]*. 2010;74:S31–40. Available from: [http://www.neurology.org/content/74/1\\_Supplement\\_1/S31.abstract](http://www.neurology.org/content/74/1_Supplement_1/S31.abstract)
202. Polman CH, O'Connor PW, Havrdova E, Hutchinson M, Kappos L, Miller DH, et al. A Randomized, Placebo-Controlled Trial of Natalizumab for Relapsing Multiple Sclerosis. *N Engl J Med*. 2006;354(9):899–910.
203. Havrdova E, Galetta S, Hutchinson M, Stefoski D, Bates D, Polman CH, et al. Effect of natalizumab on clinical and radiological disease activity in multiple sclerosis: a retrospective analysis of the Natalizumab Safety and Efficacy in Relapsing-Remitting Multiple Sclerosis (AFFIRM) study. *Lancet Neurol*. 2009;8(3):254–60.
204. Rudick RA, Miller D, Hass S, Hutchinson M, Calabresi PA, Confavreux C, et al. Health-related quality of life in multiple sclerosis: Effects of natalizumab. *Ann Neurol*. 2007;62(4):335–46.
205. Goodman AD, Rossman H, Bar-Or A, Miller A, Miller DH, Schmierer K, et al. GLANCE: results of a phase 2, randomized, double-blind, placebo-controlled study. *Neurology [Internet]*. 2009;72(9):806–12. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2821836&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
206. Rudick R a, Stuart WH, Calabresi P a, Confavreux C, Galetta SL, Radue E-W, et al. Natalizumab plus interferon beta-1a for relapsing multiple sclerosis. *N Engl J Med*. 2006;354(9):911–23.
207. Tan CS, Koralnik IJ. Progressive multifocal leukoencephalopathy and other disorders caused by JC virus: clinical features and pathogenesis. *Lancet Neurol [Internet]*. Elsevier Ltd; 2010;9(4):425–37. Available from: [http://dx.doi.org/10.1016/S1474-4422\(10\)70040-5](http://dx.doi.org/10.1016/S1474-4422(10)70040-5)
208. Bloomgren G, Richman S, Hotermans C, Subramanyam M, Goelz S, Natarajan A, et al. Risk of Natalizumab-Associated Progressive Multifocal Leukoencephalopathy. *N Engl J Med*. 2012;366(20):1870–80.

209. Villar LM, Costa-Frossard L, Masterman T, Fernandez O, Montalban X, Casanova B, et al. Lipid-specific immunoglobulin M bands in cerebrospinal fluid are associated with a reduced risk of developing progressive multifocal leukoencephalopathy during treatment with natalizumab. *Ann Neurol* [Internet]. 2015;77(3):447–57. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25581547>
210. Kappos L, Bates D, Edan G, Eraksoy M, Garcia-Merino A, Grigoriadis N, et al. Natalizumab treatment for multiple sclerosis: Updated recommendations for patient selection and monitoring. *Lancet Neurol*. 2011;10:745–58.
211. Fernández O. Best practice in the use of natalizumab in multiple sclerosis. *Ther Adv Neurol Disord* [Internet]. 2013;6(2):69–79. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3582310&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
212. García-Merino JA, Sánchez AJ. Mecanismos básicos de acción del fingolimod en relación con la esclerosis múltiple. *Rev Neurol*. 2012;55(1):31–7.
213. Kappos L, Radue EW, O'Connor PW, Polman CH, Hohlfeld R, Calabresi P, et al. A Placebo-Controlled Trial of Oral Fingolimod in Relapsing Multiple Sclerosis. *N Engl J Med*. 2010;362(5):387–401.
214. Cohen J, Barkhof F, Comi G, Hartung H-P, Khatri BO, Montalban X, et al. Oral fingolimod or intramuscular interferon for relapsing multiple sclerosis. *N Engl J Med*. 2010;362(5):402–15.
215. Barkhof F, de Jong R, Sfikas N, de Vera A, Francis G, Cohen J. The influence of patient demographics, disease characteristics and treatment on brain volume loss in Trial Assessing Injectable Interferon vs FTY720 Oral in Relapsing-Remitting Multiple Sclerosis (TRANSFORMS), a phase 3 study of fingolimod in multiple scl. *Mult Scler* [Internet]. 2014;20(13):1704–13. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24812043>
216. Cohen J a, Khatri B, Barkhof F, Comi G, Hartung H-P, Montalban X, et al. Long-term (up to 4.5 years) treatment with fingolimod in multiple sclerosis: results from the extension of the randomised TRANSFORMS study. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* [Internet]. 2015;jnnp – 2015–310597. Available from: <http://jnnp.bmj.com/lookup/doi/10.1136/jnnp-2015-310597>
217. Ziemssen T, Kern R, Cornelissen C. The PANGAEA study design – a prospective, multicenter, non-interventional, long-term study on fingolimod for the treatment of multiple sclerosis in daily practice. *BMC Neurol* [Internet]. *BMC Neurology*; 2015;15(1):93. Available from: <http://www.biomedcentral.com/1471-2377/15/93>
218. Jain N, Bhatti MT. Fingolimod-associated macular edema. *Neurology*. 2012;78:672–80.
219. Ontaneda D, Hara-Cleaver C, Rudick R a., Cohen J a., Bermel R a. Early tolerability and safety of fingolimod in clinical practice. *J Neurol Sci* [Internet]. Elsevier B.V.; 2012;323(1-2):167–72. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jns.2012.09.009>
220. Peaureaux D, Pignolet B, Biotti D, Bucciarelli F, Gaina J, Bucur C, et al. Fingolimod treatment after natalizumab-related progressive multifocal leukoencephalopathy: three new cases. *Mult Scler* [Internet]. 2015;21(5):671–2. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25305251>
221. Ghoreschi K, Bruck J, Kellerer C, Deng C, Peng H, Rothfuss O, et al. Fumarates improve psoriasis and multiple sclerosis by inducing type II dendritic cells. *J Exp Med*. 2011;208(11):2291–303.



222. Nioi P, McMahon M, Itoh K, Yamamoto M, Hayes JD. Identification of a novel Nrf2-regulated antioxidant response element (ARE) in the mouse NAD(P)H:quinone oxidoreductase 1 gene: reassessment of the ARE consensus sequence. *Biochem J.* 2003;374(Pt 2):337–48.
223. Fox RJ, Kita M, Cohan SL, Henson LJ, Zambrano J, Scannevin RH, et al. BG-12 (dimethyl fumarate): a review of mechanism of action, efficacy, and safety. *Curr Med Res Opin [Internet].* 2014;30(2):251–62. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24131282>
224. Linker R a., Lee DH, Ryan S, Van Dam AM, Conrad R, Bista P, et al. Fumaric acid esters exert neuroprotective effects in neuroinflammation via activation of the Nrf2 antioxidant pathway. *Brain.* 2011;134(3):678–92.
225. Gold R, Kappos L, Arnold DL, Bar-or A, Giovannoni G, Selmaj K, et al. Placebo-Controlled Phase 3 Study of Oral BG-12 for Relapsing Multiple Sclerosis. *N Engl J Med.* 2012;367:1098–107.
226. Fox RJ, Miller DH, Phillips JT, Hutchinson M, Havrdova E, Kita M, et al. Placebo-Controlled Phase 3 Study of Oral BG-12 or Glatiramer in Multiple Sclerosis. *N Engl J Med.* 2012;367(12):1087–97.
227. Bompreszi R. Dimethyl fumarate in the treatment of relapsing-remitting multiple sclerosis: an overview. *Ther Adv Neurol Disord [Internet].* 2015;8(1):20–30. Available from: <http://tan.sagepub.com/cgi/doi/10.1177/1756285614564152>
228. Ermis U, Weis J, Schulz JB. PML in a Patient Treated with Fumaric Acid. *N Engl J Med.* 2013;368(17):1657–8.
229. Garnock-Jones KP. Teriflunomide: A review of its use in relapsing multiple sclerosis. *CNS Drugs.* 2013;27(12):1103–23.
230. O'Connor P, Wolinsky JS, Confavreux C, Comi G, Kappos L, Olsson TP, et al. Randomized Trial of Oral Teriflunomide for Relapsing Multiple Sclerosis. *N Engl J Med.* 2011;365:1293–303.
231. Confavreux C, O'Connor P, Comi G, Freedman MS, Miller AE, Olsson TP, et al. Oral teriflunomide for patients with relapsing multiple sclerosis (TOWER): A randomised, double-blind, placebo-controlled, phase 3 trial. *Lancet Neurol.* 2014;13(3):247–56.
232. Vermersch P, Czlonkowska A, Grimaldi LME, Confavreux C, Comi G, Kappos L, et al. Teriflunomide versus subcutaneous interferon beta-1a in patients with relapsing multiple sclerosis: a randomised, controlled phase 3 trial. *Mult Scler [Internet].* 2014;20(6):705–16. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24126064>
233. Coles A. Alemtuzumab Treatment of Multiple Sclerosis. *Semin Immunopathol.* 2013;33(1):66–73.
234. Freedman MS, Kaplan JM, Markovic-Plese S. Insights into the Mechanisms of the Therapeutic Efficacy of Alemtuzumab in Multiple Sclerosis. *J Clin Cell Immunol.* 2013;4(4).
235. Cohen J a., Coles AJ, Arnold DL, Confavreux C, Fox EJ, Hartung HP, et al. Alemtuzumab versus interferon beta 1a as first-line treatment for patients with relapsing-remitting multiple sclerosis: A randomised controlled phase 3 trial. *Lancet.* 2012;380(9856):1819–28.

236. Coles AJ, Twyman CL, Arnold DL, Cohen J a., Confavreux C, Fox EJ, et al. Alemtuzumab for patients with relapsing multiple sclerosis after disease-modifying therapy: A randomised controlled phase 3 trial. *Lancet*. 2012;380(9856):1829–39.
237. McCarthy CL, Tuohy O, Compston DAS, Kumararatne DS, Coles AJ, Jones JL. Immune competence after alemtuzumab treatment of multiple sclerosis. *Neurology*. 2013;81(10):872–6.
238. Havrdova E, Arnold DL, Coles AJ, Hartung HP, Selmaj KW, Weiner HL, et al. Infeccion risk with Alemtuzumab in patients with relapsing-remitting multiple sclerosis: Pooled results from the CARE-MS I and II Trials. The 29th Congress of the European Committee for Treatment and Research in Multiple Sclerosis. 2013. p. p603.
239. Cossburn MD, Harding K, Ingram G, El-Shanawany T, Heaps A, Pickersgill TP, et al. Clinical relevance of differential lymphocyte recovery after alemtuzumab therapy for multiple sclerosis. *Neurology*. 2013;80(1):55–61.
240. Coles AJ, Compston DAS, Selmaj KW, Lake SL, Moran S, Margolin DH, et al. Alemtuzumab vs. interferon beta-1a in early multiple sclerosis. *N Engl J Med*. 2008;359(17):1786–801.
241. Ontaneda D, Cohn S, Fox RJ. Risk stratification and mitigation in multiple sclerosis. *Mult Scler Relat Disord*. 2014;3:639–49.
242. Martinelli Boneschi F, Rovaris M, Capra R, Comi G. Mitoxantrone for multiple sclerosis. *Cochrane Database Syst Rev*. 2005;(4):CD002127.
243. Goodin DS, Arnason BG, Coyle PK, Frohman EM, Paty DW. The use of mitoxantrone (Novantrone) for the treatment of multiple sclerosis: report of the Therapeutics and Technology Assessment Subcommittee of the American Academy of Neurology. *Neurology*. 2003;61(10):1332–8.
244. Casetta I, Iuliano G, Filippini G. Azathioprine for multiple sclerosis (Review). *Cochrane Database Syst Rev* 2007,. 2009;(4):CD003982.
245. Confavreux C, Saddier P, Grimaud J, Moreau T, Adeleine P, Aimard G. Risk of cancer from azathioprine therapy in multiple sclerosis: a case-control study. *Neurology*. 1996;46(6):1607–12.
246. Giovannoni G, Comi G, Cook S, Rammohan K, Rieckmann P, Soelberg Sørensen P, et al. A placebo-controlled trial of oral cladribine for relapsing multiple sclerosis. *N Engl J Med*. 2010;362(5):416–26.
247. Leist TP, Comi G, Cree BAC, Coyle PK, Freedman MS, Hartung HP, et al. Effect of oral cladribine on time to conversion to clinically definite multiple sclerosis in patients with a first demyelinating event (ORACLE MS): A phase 3 randomised trial. *Lancet Neurol*. 2014;13(3):257–67.
248. Kappos L, Li D, Calabresi PA, O'Connor P, Bar-Or A, Barkhof F, et al. Ocrelizumab in relapsing-remitting multiple sclerosis: A phase 2, randomised, placebo-controlled, multicentre trial. *Lancet*. 2011;378(9805):1779–87.
249. Comi G, Jeffery D, Kappos L, Montalban X, Boyko A, Rocca M a, et al. Placebo-controlled trial of oral laquinimod for multiple sclerosis. *N Engl J Med* [Internet]. 2012;366(11):1000–9. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22417253>



250. García Merino a, Fernández O, Montalbán X, de Andrés C, Arbizu T. Spanish Neurology Society consensus document on the use of drugs in multiple sclerosis: escalating therapy. *Neurología*. 2010;25(6):378–90.
251. García-Merino A, Fernández O, Montalbán X, de Andrés C, Oreja-Guevara C, Rodríguez-Antigüedad A, et al. Documento del Grupo de Consenso de la Sociedad Española de Neurología sobre el uso de medicamentos en esclerosis múltiple. *Neurología*. 2013;28(6):375–8.
252. Broadley S a., Barnett MH, Boggild M, Brew BJ, Butzkueven H, Heard R, et al. Therapeutic approaches to disease modifying therapy for multiple sclerosis in adults: An Australian and New Zealand perspective Part 3 Treatment practicalities and recommendations. *J Clin Neurosci* [Internet]. Elsevier Ltd; 2014;21(11):1857–65. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jocn.2014.01.017>
253. Edan G, Comi G, Le Page E, Leray E, Rocca MA, Filippi M. Mitoxantrone prior to interferon beta-1b in aggressive relapsing multiple sclerosis: a 3-year randomised trial. *Journal of Neurology, Neurosurgery & Psychiatry*. 2011. p. 1344–50.
254. Edan G, Le Page E. Induction therapy for patients with multiple sclerosis: Why? When? How? *CNS Drugs*. 2013;27(6):403–9.
255. Shakespeare DT, Boggild M, Young C. Anti-spasticity agents for multiple sclerosis. *Cochrane Database Syst Rev*. 2003;(4):CD001332.
256. Toosy A, Ciccarelli O, Thompson A. Symptomatic treatment and management of multiple sclerosis. *Handb Clin Neurol*. 2014;122:513–62.
257. Smith PF. Symptomatic treatment of multiple sclerosis using cannabinoids: recent advances. *Expert Rev Neurother*. 2007;7:1157–63.
258. Gold R, Oreja-Guevara C. Advances in the management of multiple sclerosis spasticity: multiple sclerosis spasticity guidelines. *Expert Rev Neurother* [Internet]. 2013;13(12 Suppl):49–54. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24289844>
259. Thompson AJ, Toosy AT, Ciccarelli O. Pharmacological management of symptoms in multiple sclerosis: Current approaches and future directions. *The Lancet Neurology*. 2010.
260. Fowler CJ, Panicker JN, Drake M, Harris C, Harrison SCW, Kirby M, et al. A UK consensus on the management of the bladder in multiple sclerosis. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. 2009;80:470–7.
261. Borody T, Leis S, Campbell J, Torres M, Nowak A. Fecal microbiota transplantation (FMT) in multiple sclerosis. *Am J Gastroenterol*. 2011;106:S352.
262. Orasanu B, Frasure H, Wyman A, Mahajan ST. Sexual dysfunction in patients with multiple sclerosis. *Mult Scler Relat Disord* [Internet]. Elsevier; 2013;2(2):117–23. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.msard.2012.10.005>
263. Amato MP, Langdon D, Montalbán X, Benedict RHB, Deluca J, Krupp LB, et al. Treatment of cognitive impairment in multiple sclerosis: Position paper. *Journal of Neurology*. 2013. p. 1452–68.
264. He D, Zhang Y, Dong S, Wang D, Gao X, Zhou H. Pharmacological treatment for memory disorder in multiple sclerosis. *Cochrane database Syst Rev* [Internet]. 2013;12:CD008876. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24343792>

265. Rosti-Otajärvi EM, Hämäläinen PI. Neuropsychological rehabilitation for multiple sclerosis. *Cochrane database Syst Rev* [Internet]. 2014;2:CD009131. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24515630>
266. Chiaravalloti ND, Genova HM, DeLuca J. Cognitive Rehabilitation in Multiple Sclerosis: The Role of Plasticity. *Front Neurol* [Internet]. 2015;6(April):1–10. Available from: <http://journal.frontiersin.org/article/10.3389/fneur.2015.00067>
267. Chwieduk CM, Keating GM. Dalfampridine extended release: In multiple sclerosis. *CNS Drugs*. 2010. p. 883–91.
268. Goodman AD, Brown TR, Krupp LB, Schapiro RT, Schwid SR, Cohen R, et al. Sustained-release oral fampridine in multiple sclerosis: a randomised, double-blind, controlled trial. *Lancet*. 2009;373(9665):732–8.
269. Chisari C, Venturi M, Bertolucci F, Fanciullacci C, Rossi B. Benefits of an intensive task-oriented circuit training in Multiple Sclerosis patients with mild disability. *NeuroRehabilitation* [Internet]. 2014;35(3):509–18. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25248447>
270. Donzé C. Update on rehabilitation in multiple sclerosis. *Presse Med* [Internet]. 2015;44(4 Pt 2):e169–76. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25746432>
271. Sundström P, Salzer J. Vitamin D and multiple sclerosis — from epidemiology to prevention. *Acta Neurol Scand*. 2015;132(9):56–61.
272. Munger KL, Zhang SM, O'Reilly E, Hernán MA, Olek MJ, Willett WC, et al. Vitamin D intake and incidence of multiple sclerosis. *Neurology*. 2004;62(1):60–5.
273. Ascherio A, Munger KL, Simon KC. Vitamin D and multiple sclerosis. *Lancet Neurol* [Internet]. Elsevier Ltd; 2010;9(6):599–612. Available from: [http://dx.doi.org/10.1016/S1474-4422\(10\)70086-7](http://dx.doi.org/10.1016/S1474-4422(10)70086-7)
274. Ascherio A, Munger KL, Lünemann JD. The initiation and prevention of multiple sclerosis. *Nat Rev Neurol* [Internet]. Nature Publishing Group; 2012;8(11):602–12. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/nrneurol.2012.198>
275. Peelen E, Knippenberg S, Muris AH, Thewissen M, Smolders J, Tervaert JWC, et al. Effects of vitamin D on the peripheral adaptive immune system: A review. *Autoimmunity Reviews*. 2011. p. 733–43.
276. Ramagopalan S V., Dymment DA, Cader MZ, Morrison KM, Disanto G, Morahan JM, et al. Rare variants in the CYP27B1 gene are associated with multiple sclerosis. *Ann Neurol*. 2011;70(6):881–6.
277. Belbasis L, Bellou V, Evangelou E, Ioannidis JP a, Tzoulaki I. Environmental risk factors and multiple sclerosis: an umbrella review of systematic reviews and meta-analyses. *Lancet Neurol* [Internet]. Elsevier Ltd; 2015;14(3):263–73. Available from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1474442214702674>
278. Bach J-F. The effect of infections on susceptibility to autoimmune and allergic diseases. *N Engl J Med*. 2002;347(12):911–20.
279. Kim W, Kim S, Kim HJ. New Insights into Neuromyelitis Optica. *J Clin Neurol*. 2011;4:115–27.

280. Fleming JO, Cook TD. Multiple sclerosis and the hygiene hypothesis. *Neurology*. 2006;67(11):2085–6.
281. Correale J, Gaitán MI. Multiple sclerosis and environmental factors: the role of vitamin D, parasites, and Epstein – Barr virus infection. *Acta Neurol Scand*. 2015;132 (Suppl(4):46–55.
282. Lidegaard Ø, Svendsen AL. Sexual habits before multiple sclerosis: a national case-control study. *Mult Scler*. 2008;14(1):67–72.
283. Ascherio A, Munger KL. Environmental risk factors for multiple sclerosis. Part I: The role of infection. *Annals of Neurology*. 2007. p. 288–99.
284. Agrawal SM, Yong VW. Immunopathogenesis of multiple sclerosis. *Int Rev Neurobiol* [Internet]. 2007;79:99–126. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17531839>
285. Munger K, Levin L, O'Reilly E. Anti-Epstein-Barr virus antibodies as serological markers of multiple sclerosis: a prospective study among United States military personnel. *Mult Scler ...* [Internet]. 2011;17(10):1185–93. Available from: <http://msj.sagepub.com/content/17/10/1185.short>
286. Cepok S, Zhou D, Srivastava R, Nessler S, Stei S, Büssow K, et al. Identification of Epstein-Barr virus proteins as putative targets of the immune response in multiple sclerosis. *J Clin Invest*. 2005;115(5):1352–60.
287. Serafini B, Rosicarelli B, Franciotta D, Magliozzi R, Reynolds R, Cinque P, et al. Dysregulated Epstein-Barr virus infection in the multiple sclerosis brain. *J Exp Med*. 2007;204(12):2899–912.
288. Lünemann JD, Edwards N, Muraro P a., Hayashi S, Cohen JI, Münz C, et al. Increased frequency and broadened specificity of latent EBV nuclear antigen-1-specific T cells in multiple sclerosis. *Brain*. 2006;129(6):1493–506.
289. Lünemann JD, Jelčić I, Roberts S, Lutterotti A, Tackenberg B, Martin R, et al. EBNA1-specific T cells from patients with multiple sclerosis cross react with myelin antigens and co-produce IFN-gamma and IL-2. *J Exp Med*. 2008;205(8):1763–73.
290. Fagnani C, Neale M, Nisticó L, Stazi M, Ricigliano V, Buscarinu M, et al. Twin studies in multiple sclerosis: a meta-estimation of heritability and environmentality. *Mult Scler*. 2015;Epub ahead of print.
291. Oksenberg JR. Decoding multiple sclerosis: an update on genomics and future directions. *Expert Rev Neurother*. 2013;13(12(s)):11–9.
292. Willer CJ, Dyment DA, Sadovnick AD, Rothwell PM, Murray TJ, Ebers GC. Timing of birth and risk of multiple sclerosis: population based study. *BMJ*. 2005;330(7483):120.
293. Hauser SL, Oksenberg JR. The Neurobiology of Multiple Sclerosis: Genes, Inflammation, and Neurodegeneration. *Neuron*. 2006;52:61–76.
294. Oksenberg JR, Baranzini SE, Sawcer S, Hauser SL. The genetics of multiple sclerosis: SNPs to pathways to pathogenesis. *Nat Rev Genet*. 2008;9(7):516–26.
295. Haines JL, Terwedow H a, Burgess K, Pericak-Vance M a, Rimmler JB, Martin ER, et al. Linkage of the MHC to familial multiple sclerosis suggests genetic heterogeneity. The Multiple Sclerosis Genetics Group. *Hum Mol Genet*. 1998;7(8):1229–34.

296. Baranzini SE, Wang J, Gibson R a., Galwey N, Naegelin Y, Barkhof F, et al. Genome-wide association analysis of susceptibility and clinical phenotype in multiple sclerosis. *Hum Mol Genet.* 2009;18(4):767–78.
297. Lill C, Zipp F. The genetic profile of multiple sclerosis: risk genes and the “dark matter.” *Nervenartz.* 2012;83(6):705–13.
298. Miretti MM, Walsh EC, Ke X, Delgado M, Griffiths M, Hunt S, et al. A high-resolution linkage-disequilibrium map of the human major histocompatibility complex and first generation of tag single-nucleotide polymorphisms. *Am J Hum Genet.* 2005;76(4):634–46.
299. Smith BKJ, Pyrdol J, Gauthier L, Wiley DC, Wucherpfennig KW. Crystal Structure of HLA-DR2 (DRA\*0101, DRB1\*1501) Complexed with a Peptide from Human Myelin Basic Protein. *J Exp Med.* 1998;188(8):1511–20.
300. Goris a., Pauwels I, Gustavsen MW, van Son B, Hilven K, Bos SD, et al. Genetic variants are major determinants of CSF antibody levels in multiple sclerosis. *Brain [Internet].* 2015;138:632–43. Available from: <http://www.brain.oxfordjournals.org/cgi/doi/10.1093/brain/awu405>
301. International Multiple Sclerosis Genetics Consortium. Risk alleles for multiple sclerosis identified by a genomewide study. *N Engl J Med.* 2007;357:851–62.
302. Lill CM, Schjeide BMM, Graetz C, Ban M, Alcina A, Ortiz M a., et al. MANBA, CXCR5, SOX8, RPS6KB1 and ZBTB46 are genetic risk loci for multiple sclerosis. *Brain.* 2013;136(6):1778–82.
303. Patsopoulos NA, Group BMG working, de Bakker P. Genomewide meta-analysis identifies novel multiple sclerosis susceptibility loci. *Ann Neurol.* 2011;70(6):897–912.
304. Patsopoulos N a, Xifara DK, Davis MF, Kempainen A, Cotsapas C, Shahi TS, et al. Analysis of immune-related loci identifies 48 new susceptibility variants for multiple sclerosis. *Nat Genet.* 2013;45(11).
305. Sawcer S, Hellenthal G, Pirinen M, Spencer CC a, Patsopoulos N a, Moutsianas L, et al. Genetic risk and a primary role for cell-mediated immune mechanisms in multiple sclerosis. *Nature.* 2012;476(7359):214–9.
306. Briggs FBS, Shao X, Goldstein B a, Oksenberg JR, Barcellos LF, De Jager PL. Genome-wide association study of severity in multiple sclerosis. *Genes Immun.* 2011;12(8):615–25.
307. Australia and New Zealand Multiple Sclerosis Genetics Consortium. Genome-wide association study identifies new multiple sclerosis susceptibility loci on chromosomes 12 and 20. *Nat Genet.* 2009;41(7):824–8.
308. Zipp F, Ivinson AJ, Haines JL, Sawcer S, Dejager P, Hauser SL, et al. Network-based multiple sclerosis pathway analysis with GWAS data from 15,000 cases and 30,000 controls. *Am J Hum Genet.* 2013;92(6):854–65.
309. Maier LM, Hafler DA. The developing mosaic of autoimmune disease risk. *Nature Genetics.* 2008. p. 131–2.
310. Gregory SG, Schmidt S, Seth P, Oksenberg JR, Hart J, Prokop A, et al. Interleukin 7 receptor alpha chain (IL7R) shows allelic and functional association with multiple sclerosis. *Nat Genet.* 2007;39(9):1083–91.

311. Lindberg RLP, De Groot CJA, Certa U, Ravid R, Hoffmann F, Kappos L, et al. Multiple sclerosis as a generalized CNS disease--comparative microarray analysis of normal appearing white matter and lesions in secondary progressive MS. *J Neuroimmunol.* 2004;152(1-2):154-67.
312. Chakrabarty A, Emerson MR, LeVine SM. Heme oxygenase-1 in SJL mice with experimental allergic encephalomyelitis. *Mult Scler.* 2003;9(4):372-81.
313. Tajouri L, Mellick AS, Ashton KJ, Tannenberg AEG, Nagra RM, Tourtellotte WW, et al. Quantitative and qualitative changes in gene expression patterns characterize the activity of plaques in multiple sclerosis. *Brain Res Mol Brain Res.* 2003;119(2):170-83.
314. Archelos JJ, Previtali SC, Hartung HP. The role of integrins in immune-mediated diseases of the nervous system. *Trends in Neurosciences.* 1999. p. 30-8.
315. Rivera-Nieves J, Gorfu G, Ley K. Leukocyte adhesion molecules in animal models of inflammatory bowel disease. *Inflamm Bowel Dis.* 2008;14:1715-35.
316. Haider L, Fischer MT, Frischer JM, Bauer J, Höftberger R, Botond G, et al. Oxidative damage in multiple sclerosis lesions. *Brain.* 2011;134:1914-24.
317. Saxena A, Martin-Blondel G, Mars LT, Liblau RS. Role of CD8 T cell subsets in the pathogenesis of multiple sclerosis. *FEBS Letters.* 2011. p. 3758-63.
318. Van Horssen J, Schreibelt G, Drexhage J, Hazes T, Dijkstra CD, van der Valk P, et al. Severe oxidative damage in multiple sclerosis lesions coincides with enhanced antioxidant enzyme expression. *Free Radic Biol Med [Internet]. Elsevier Inc.;* 2008;45(12):1729-37. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2008.09.023>
319. Krumbholz M, Meinl E. B cells in MS and NMO: pathogenesis and therapy. *Semin Immunopathol.* 2014;36:339-50.
320. Huber JP, David J. Regulation of effector and memory T-cell functions by type I interferon. *Immunology.* 2011;132:466-74.
321. Brucklacher-Waldert V, Stuerner K, Kolster M, Wolthausen J, Tolosa E. Phenotypical and functional characterization of T helper 17 cells in multiple sclerosis. *Brain.* 2009;132(12):3329-41.
322. Rostami A, Ciric B. Role of Th17 cells in the pathogenesis of CNS inflammatory demyelination. *J Neurol Sci.* 2013;333:76-87.
323. Kleinewietfeld M, Hafler DA. The plasticity of human Treg and Th17 cells and its role in autoimmunity. *Semin Immunol.* 2013;25(4):305-12.
324. Huan J, Culbertson N, Spencer L, Bartholomew R, Burrows GG, Chou YK, et al. Decreased FOXP3 levels in multiple sclerosis patients. *J Neurosci Res.* 2005;81(1):45-52.
325. Keirstead HS, Blakemore WF. The role of oligodendrocytes and oligodendrocyte progenitors in CNS remyelination. *Adv Exp Med Biol.* 1999;468:183-97.
326. Goldschmidt T, Antel J, König FB, Brück W, Kuhlmann T. Remyelination capacity of the MS brain decreases with disease chronicity. *Neurology.* 2009;72(22):1914-21.

327. Ciccarelli O, Barkhof F, Bodini B, Stefano N De, Golay X, Nicolay K, et al. Pathogenesis of multiple sclerosis: insights from molecular and metabolic imaging. *Lancet Neurol* [Internet]. Elsevier Ltd; 2014;13(8):807–22. Available from: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1474442214701012>
328. Cui QL, Kuhlmann T, Miron VE, Leong SY, Fang J, Gris P, et al. Oligodendrocyte progenitor cell susceptibility to injury in multiple sclerosis. *Am J Pathol* [Internet]. American Society for Investigative Pathology; 2013;183(2):516–25. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ajpath.2013.04.016>
329. Moore CS, Cui Q-L, Warsi NM, Durafourt BA, Zorko N, Owen DR, et al. Direct and indirect effects of immune and central nervous system-resident cells on human oligodendrocyte progenitor cell differentiation. *J Immunol* [Internet]. 2015;194(2):761–72. Available from: <http://www.jimmunol.org/content/194/2/761.full>
330. Pepinsky RB, Arndt JW, Quan C, Gao Y, Quintero-Monzon O, Lee X, et al. Structure of the LINGO-1-Anti-LINGO-1 Li81 Antibody Complex Provides Insights into the Biology of LINGO-1 and the Mechanism of Action of the Antibody Therapy. *J Pharmacol Exp Ther* [Internet]. 2014;350(1):110–23. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24756303>
331. Petratos S, Ozturk E, Azari MF, Kenny R, Young Lee J, Magee K a., et al. Limiting multiple sclerosis related axonopathy by blocking Nogo receptor and CRMP-2 phosphorylation. *Brain*. 2012;135(6):1794–818.
332. Inoue H, Lin L, Lee X, Shao Z, Mendes S, Snodgrass-Belt P, et al. Inhibition of the leucine-rich repeat protein LINGO-1 enhances survival, structure, and function of dopaminergic neurons in Parkinson's disease models. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2007;104(36):14430–5.
333. Rudick RA, Mi S, Sandrock AW. LINGO-1 antagonists as therapy for multiple sclerosis: in vitro and in vivo evidence. *Expert Opin Biol Ther*. 2008;8(10):1561–70.
334. Agúndez JA, Jiménez-Jimenez FJ, Alonso-Navarro H, García-Martín E. The potential of LINGO-1 as a therapeutic target for essential tremor. *Expert Opin Ther Targets* [Internet]. 2015;19(8):1139–48. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25862159>
335. Lassmann H. Mechanisms of neurodegeneration shared between multiple sclerosis and Alzheimer's disease. *J Neural Transm*. 2011;118(5):747–52.
336. Hemmer B, Nessler S, Zhou D, Kieseier B, Hartung H-P. Immunopathogenesis and immunotherapy of multiple sclerosis. *Nat Clin Pract Neurol*. 2006;2(4):201–11.
337. Dzedzic T, Metz I, Dallenga T, König FB, Müller S, Stadelmann C, et al. Wallerian degeneration: A major component of early axonal pathology in multiple sclerosis. *Brain Pathol*. 2010;20(5):976–85.
338. Criste G, Trapp B, Dutta R. Axonal loss in multiple sclerosis. Causes and mechanisms. *Handb Clin Neurol*. 2014;122:101–13.
339. Rovaris M, Confavreux C, Furlan R, Kappos L, Comi G, Filippi M, et al. Secondary progressive multiple sclerosis □: current knowledge. *Lancet Neurol*. 2006;5(April):343–54.
340. Correale J. The role of microglial activation in disease progression. *Mult Scler J*. 2014;20(10):1288–95.



341. Pérez-Cerdá F, Sánchez-Gómez MV, Matute C. Pío del Río Hortega and the discovery of the oligodendrocytes. *Front Neuroanat* [Internet]. 2015;9(July):7–12. Available from: <http://journal.frontiersin.org/article/10.3389/fnana.2015.00092>
342. Perry VH, Nicoll JAR, Holmes C. Microglia in neurodegenerative disease. *Nat Rev Neurol*. 2010;6(4):193–201.
343. Benarroch EE. Microglia: Multiple roles in surveillance, circuit shaping, and response to injury. *Neurology*. 2013. p. 1079–88.
344. Zhang X, Surguladze N, Slagle-Webb B, Cozzi A, Connor JR. Cellular iron status influences the functional relationship between microglia and oligodendrocytes. *Glia*. 2006;54(8):795–804.
345. Williams R, Buchheit CL, Berman NEJ, Levine SM. Pathogenic implications of iron accumulation in multiple sclerosis. *J Neurochem*. 2012;120(1):7–25.
346. Kettenmann H, Kirchhoff F, Verkhratsky A. Microglia: New Roles for the Synaptic Stripper. *Neuron*. 2013. p. 10–8.
347. Parfenova H, Basuroy S, Bhattacharya S, Tcheranova D, Qu Y, Regan RF, et al. Glutamate induces oxidative stress and apoptosis in cerebral vascular endothelial cells: contributions of HO-1 and HO-2 to cytoprotection. *Am J Physiol Cell Physiol*. 2006;290(5):C1399–410.
348. Matute C, Domercq M, Sánchez-Gómez M-V. Glutamate-mediated glial injury: mechanisms and clinical importance. *Glia*. 2006;53(August 2005):212–24.
349. Poon HF, Calabrese V, Scapagnini G, Butterfield DA. Free radicals: key to brain aging and heme oxygenase as a cellular response to oxidative stress. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci*. 2004;59(5):478–93.
350. Carvalho AN, Lim JL, Nijland PG, Witte ME, Van Horssen J. Glutathione in multiple sclerosis: More than just an antioxidant? *Mult Scler* [Internet]. 2014;20(11):1425–31. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24842957>
351. Gonsette RE. Endogenous neuroprotection in multiple sclerosis. *Acta Neurol Belg*. 2010;110(1):26–35.
352. Fischer MT, Sharma R, Lim JL, Haider L, Frischer JM, Drexhage J, et al. NADPH oxidase expression in active multiple sclerosis lesions in relation to oxidative tissue damage and mitochondrial injury. *Brain*. 2012;135:886–99.
353. Gonsette RE. Oxidative stress and excitotoxicity: a therapeutic issue in multiple sclerosis? *Mult Scler*. 2008;14(August 2006):22–34.
354. Hill KE, Zollinger L V., Watt HE, Carlson NG, Rose JW. Inducible nitric oxide synthase in chronic active multiple sclerosis plaques: Distribution, cellular expression and association with myelin damage. *J Neuroimmunol*. 2004;
355. Szabó C, Ischiropoulos H, Radi R. Peroxynitrite: biochemistry, pathophysiology and development of therapeutics. *Nat Rev Drug Discov*. 2007;
356. Rejdak K, Eikelenboom MJ, Petzold A, Thompson EJ, Stelmasiak Z, Lazeron RHC, et al. CSF nitric oxide metabolites are associated with activity and progression of multiple sclerosis. *Neurology*. 2004;

357. Matute C, Alberdi E, Domercq M, Sánchez-Gómez MV, Pérez-Samartín A, Rodríguez-Antigüedad A, et al. Excitotoxic damage to white matter. *J Anat.* 2007;210(6):693–702.
358. Werner P, Pitt D, Raine CS. Multiple sclerosis: Altered glutamate homeostasis in lesions correlates with oligodendrocyte and axonal damage. *Ann Neurol.* 2001;50(2):169–80.
359. Pitt D, Nagelmeier IE, Wilson HC, Raine CS. Glutamate uptake by oligodendrocytes: Implications for excitotoxicity in multiple sclerosis. *Neurology.* 2003;61(8):1113–20.
360. Stojanovic IR, Kostic M, Ljubisavljevic S. The role of glutamate and its receptors in multiple sclerosis. *J Neural Transm [Internet].* 2014;121:945–55. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24633998>
361. Lee DH, Gold R, Linker R a. Mechanisms of oxidative damage in multiple sclerosis and neurodegenerative diseases: Therapeutic modulation via fumaric acid esters. *Int J Mol Sci.* 2012;13(9):11783–803.
362. Haider L. Inflammation, Iron, Energy Failure, and Oxidative Stress in the Pathogenesis of Multiple Sclerosis. *Oxid Med Cell Longev [Internet].* Hindawi Publishing Corporation; 2015;2015(iii):1–10. Available from: <http://www.hindawi.com/journals/omcl/2015/725370/>
363. Azevedo CJ, Kornak J, Chu P, Sampat M, Okuda DT, Cree B a., et al. In vivo evidence of glutamate toxicity in multiple sclerosis. *Ann Neurol.* 2014;76:269–78.
364. Tasset I, Agüera E, Sánchez-López F, Feijóo M, Giraldo AI, Cruz AH, et al. Peripheral oxidative stress in relapsing-remitting multiple sclerosis. *Clin Biochem [Internet].* The Canadian Society of Clinical Chemists; 2012;45(6):440–4. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.clinbiochem.2012.01.023>
365. Cuadrado A, Rojo AI. Heme oxygenase-1 as a therapeutic target in neurodegenerative diseases and brain infections. *Curr Pharm Des.* 2008;14:429–42.
366. Gruber RC, LaRocca D, Minchenberg SB, Christophi GP, Hudson C a., Ray AK, et al. The control of reactive oxygen species production by SHP-1 in oligodendrocytes. *Glia [Internet].* 2015;n/a – n/a. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1002/glia.22842>
367. Arosio P, Ingrassia R, Cavadini P. Ferritins: A family of molecules for iron storage, antioxidation and more. *Biochimica et Biophysica Acta - General Subjects.* 2009. p. 589–99.
368. Choi I, Lee S, Denney D, Lynch S. Lower levels of Glutathione (GSH) in the Brains of Secondary Progressive Multiple Sclerosis Patients measured by 1H Magnetic Resonance Chemical Shift Imaging at 3 T. *Mult Scler ... [Internet].* 2011;17(3):289–96. Available from: <http://msj.sagepub.com/content/17/3/289.short>
369. Agúndez JA, García-Martín E, Martínez C, Benito-León J, Millán-Pascual J, Díaz-Sánchez M, et al. The GSTP1 gene variant rs1695 is not associated with an increased risk of multiple sclerosis. *Cell Mol Immunol [Internet].* 2014;(November):1–3. Available from: <http://www.nature.com/doi/10.1038/cmi.2014.121>
370. Landtblom AM, Wastenson M, Ahmadi A, Söderkvist P. Multiple sclerosis and exposure to organic solvents, investigated by genetic polymorphisms of the GSTM1 and CYP2D6 enzyme systems. *Neurol Sci.* 2003;24(4):248–51.
371. Stavropoulou C, Korakaki D, Rigana H, Voutsinas G, Polyzoi M, Georgakakos VN, et al. Glutathione-S-transferase T1 and M1 gene polymorphisms in Greek patients with multiple sclerosis: A pilot study. *Eur J Neurol.* 2007;14(5):572–4.



372. Živković M, Životić I, Dinčić E, Stojković L, Vojinović S, Stanković A. The glutathione S-transferase T1 deletion is associated with susceptibility to multiple sclerosis. *J Neurol Sci.* 2013;334(1-2):6–9.
373. Mann CL, Davies MB, Boggild MD, Alldersea J, Fryer AA, Jones PW, et al. Glutathione S-transferase polymorphisms in MS: their relationship to disability. *Neurology.* 2000;54(3):552–7.
374. Alexoudi A, Zachaki S, Stavropoulou C, Chatzi I, Koumbi D, Stavropoulou K, et al. Combined GSTP1 and NQO1 germline polymorphisms in the susceptibility to Multiple Sclerosis. *Int J Neurosci* [Internet]. 2015;125(1):32–7. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24588223>
375. Van Horssen J, Schreibelt G, Bö L, Montagne L, Drukarch B, van Muiswinkel FL, et al. NAD(P)H:quinone oxidoreductase 1 expression in multiple sclerosis lesions. *Free Radic Biol Med.* 2006;41(2):311–7.
376. Stavropoulou C, Zachaki S, Alexoudi A, Chatzi I, Georgakakos VN, Terzoudi GI, et al. The C609T inborn polymorphism in NAD(P)H: Quinone oxidoreductase 1 is associated with susceptibility to multiple sclerosis and affects the risk of development of the primary progressive form of the disease. *Free Radic Biol Med.* 2011;51(3):713–8.
377. Agúndez JAG, García-Martín E, Martínez C, Benito-León J, Millán-Pascual J, Calleja P, et al. NQO1 gene rs1800566 variant is not associated with the risk for multiple sclerosis. *BMC Neurol.* 2014;14:87.
378. Gozzelino R, Jeney V, Soares MP. Mechanisms of Cell Protection by Heme Oxygenase-1. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* [Internet]. 2010;50(1):323–54. Available from: <http://www.annualreviews.org/doi/abs/10.1146/annurev.pharmtox.010909.105600>
379. Schipper HM, Song W, Zukor H, Hascalovici JR, Zeligman D. Heme oxygenase-1 and neurodegeneration: Expanding frontiers of engagement. *J Neurochem.* 2009;110:469–85.
380. Ryter SW, Tyrrell RM. The heme synthesis and degradation pathways: Role in oxidant sensitivity Heme oxygenase has both pro- and antioxidant properties. *Free Radic Biol Med.* 2000;28(2):289–309.
381. Shibahara S, Müller R, Taguchi H, Yoshida T. Cloning and expression of cDNA for rat heme oxygenase. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1985;82(23):7865–9.
382. Braggins PE, Trakshel GM, Kutty RK, Maines MD. Characterization of two heme oxygenase isoforms in rat spleen: comparison with the hematin-induced and constitutive isoforms of the liver. *Biochem Biophys Res Commun.* 1986;141(2):528–33.
383. McCoubrey WK, Huang TJ, Maines MD. Isolation and characterization of a cDNA from the rat brain that encodes hemoprotein heme oxygenase-3. *Eur J Biochem.* 1997;247(2):725–32.
384. Scapagnini G, D'Agata V, Calabrese V, Pascale A, Colombrita C, Alkon D, et al. Gene expression profiles of heme oxygenase isoforms in the rat brain. *Brain Res.* 2002;954(1):51–9.
385. Dennery P a. Signaling function of heme oxygenase proteins. *Antioxid Redox Signal* [Internet]. 2014;20(11):1743–53. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24180238>

386. Williams SEJ, Wootton P, Mason HS, Bould J, Iles DE, Riccardi D, et al. Hemoxygenase-2 is an oxygen sensor for a calcium-sensitive potassium channel. *Science*. 2004;306(5704):2093–7.
387. Verma A, Hirsch DJ, Glatt CE, Ronnett G V, Snyder SH. Carbon monoxide: a putative neural messenger. *Science*. 1993;259(5093):381–4.
388. Raju VS, McCoubrey WK, Maines MD. Regulation of heme oxygenase-2 by glucocorticoids in neonatal rat brain: Characterization of a functional glucocorticoid response element. *Biochim Biophys Acta - Gene Struct Expr*. 1997;1351(1-2):89–104.
389. Hirose W, Ikematsu K, Tsuda R. Age-associated increases in heme oxygenase-1 and ferritin immunoreactivity in the autopsied brain. *Leg Med*. 2003;5(SUPPL. 1):S360–6.
390. Ryter SW, Choi AMK. Heme oxygenase-1: molecular mechanisms of gene expression in oxygen-related stress. *Antioxid Redox Signal*. 2002;4(4):625–32.
391. Schipper HM. Heme oxygenase expression in human central nervous system disorders. *Free Radic Biol Med*. 2004;37(12):1995–2011.
392. Schipper H, Song W. A Heme Oxygenase-1 Transducer Model of Degenerative and Developmental Brain Disorders. *Int J Mol Sci [Internet]*. 2015;16(3):5400–19. Available from: <http://www.mdpi.com/1422-0067/16/3/5400/>
393. Businaro R, Fabrizi C, Caronti B, Calderaro C, Fumagalli L, Lauro GM. Myelin basic protein induces heme oxygenase-1 in human astroglial cells. *Glia*. 2002;37(1):83–8.
394. Exner M, Minar E, Wagner O, Schillinger M. The role of heme oxygenase-1 promoter polymorphisms in human disease. *Free Radical Biology and Medicine*. 2004. p. 1097–104.
395. Dulak J, Jozkowicz A. Novel Faces of Heme Oxygenase-1: Mechanisms and Therapeutic Potentials. *Antioxid Redox Signal [Internet]*. 2014;20(11):1673–6. Available from: <http://online.liebertpub.com/doi/abs/10.1089/ars.2013.5761>
396. Jozkowicz A, Was H, Dulak J. Heme oxygenase-1 in tumors: is it a false friend? *Antioxid Redox Signal*. 2007;9(12):2099–117.
397. Lad L, Friedman J, Li H, Bhaskar B, Ortiz De Montellano PR, Poulos TL. Crystal Structure of Human Heme Oxygenase-1 in a Complex with Biliverdin. *Biochemistry*. 2004;43(13):3793–801.
398. Sun J, Loehr TM, Wilks A, Ortiz de Montellano PR. Identification of histidine 25 as the heme ligand in human liver heme oxygenase. *Biochemistry*. 1994;33(46):13734–40.
399. Satoh T, Okamoto S, Cui J, Watanabe Y, Furuta K, Suzuki M, et al. Activation of the Keap1/Nrf2 pathway for neuroprotection by electrophilic [correction of electrophilic] phase II inducers. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2006;103(3):768–73.
400. Baranano DE, Rao M, Ferris CD, Snyder SH. Biliverdin reductase: a major physiologic cytoprotectant. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2002;99(25):16093–8.
401. Dutra FF, Bozza MT. Heme on innate immunity and inflammation. *Front Pharmacol*. 2014;5(May):1–20.

402. Pamplona A, Ferreira A, Balla J, Jeney V, Balla G, Epiphany S, et al. Heme oxygenase-1 and carbon monoxide suppress the pathogenesis of experimental cerebral malaria. *Nat Med.* 2007;13(6):703–10.
403. Mehindate K, Sahlas DJ, Frankel D, Mawal Y, Liberman A, Corcos J, et al. Proinflammatory cytokines promote glial heme oxygenase-1 expression and mitochondrial iron deposition: Implications for multiple sclerosis. *J Neurochem.* 2001;77(5):1386–95.
404. Graça-Souza A V., Arruda MAB, De Freitas MS, Barja-Fidalgo C, Oliveira PL. Neutrophil activation by heme: Implications for inflammatory processes. *Blood.* 2002;99(11):4160–5.
405. Monteiro APT, Pinheiro CS, Luna-Gomes T, Alves LR, Maya-Monteiro CM, Porto BN, et al. Leukotriene B<sub>4</sub> mediates neutrophil migration induced by heme. *J Immunol.* 2011;186:6562–7.
406. Figueiredo RT, Fernandez PL, Mourao-Sa DS, Porto BN, Dutra FF, Alves LS, et al. Characterization of heme as activator of toll-like receptor 4. *J Biol Chem.* 2007;282(28):20221–9.
407. Porto BN, Alves LS, Fernández PL, Dutra TP, Figueiredo RT, Graça-Souza A V., et al. Heme induces neutrophil migration and reactive oxygen species generation through signaling pathways characteristic of chemotactic receptors. *J Biol Chem.* 2007;282(33):24430–6.
408. Lin S, Zhong Q, Lv F-L, Zhou Y, Li J-Q, Wang J-Z, et al. Heme activates TLR4-mediated inflammatory injury via MyD88/TRIF signaling pathway in intracerebral hemorrhage. *Journal of Neuroinflammation.* 2012. p. 46.
409. Fortes GB, Alves LS, De Oliveira R, Dutra FF, Rodrigues D, Fernandez PL, et al. Heme induces programmed necrosis on macrophages through autocrine TNF and ROS production. *Blood.* 2012;119(10):2368–75.
410. Cai Y, Cho G-S, Ju C, Wang S-L, Ryu JH, Shin CY, et al. Activated microglia are less vulnerable to hemin toxicity due to nitric oxide-dependent inhibition of JNK and p38 MAPK activation. *J Immunol.* 2011;187:1314–21.
411. Fagone P, Mangano K, Coco M, Perciavalle V, Garotta G, Romao CC, et al. Therapeutic potential of carbon monoxide in multiple sclerosis. *Clin Exp Immunol.* 2012;167:179–87.
412. Barañano DE, Snyder SH. Neural roles for heme oxygenase: contrasts to nitric oxide synthase. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2001;98(20):10996–1002.
413. Chora Â a, Fontoura P, Cunha A, Pais TF, Cardoso S, Ho PP, et al. Heme oxygenase-1 and carbon monoxide suppress autoimmune neuroinflammation. *J Clin Invest.* 2007;117(2):438–47.
414. Jazwa A, Cuadrado A. Targeting heme oxygenase-1 for neuroprotection and neuroinflammation in neurodegenerative diseases. *Curr Drug Targets.* 2010;11:1517–31.
415. Chen C, Wang Y, Zhang Z, Wang C, Peng M. Toll-like receptor 4 regulates heme oxygenase-1 expression after hemorrhagic shock induced acute lung injury in mice: requirement of p38 mitogen-activated protein kinase activation. *Shock.* 2009;31:486–92.

416. Pineda J, Kogan JH, Aghajanian GK. Nitric oxide and carbon monoxide activate locus coeruleus neurons through a cGMP-dependent protein kinase: involvement of a nonselective cationic channel. *J Neurosci.* 1996;16(4):1389–99.
417. Zhuo M, Small SA, Kandel ER, Hawkins RD. Nitric oxide and carbon monoxide produce activity-dependent long-term synaptic enhancement in hippocampus. *Science.* 1993;260(5116):1946–50.
418. Wegiel B, Baty CJ, Gallo D, Csizmadia E, Scott JR, Akhavan A, et al. Cell surface biliverdin reductase mediates biliverdin-induced anti-inflammatory effects via phosphatidylinositol 3-kinase and Akt. *J Biol Chem.* 2009;284(32):21369–78.
419. Wegiel B, Gallo D, Csizmadia E, Roger T, Kaczmarek E, Harris C, et al. Biliverdin inhibits Toll-like receptor-4 (TLR4) expression through nitric oxide-dependent nuclear translocation of biliverdin reductase. *Proc Natl Acad Sci.* 2011;108(46):18849–54.
420. Wegiel B, Otterbein LE. Go green: The anti-inflammatory effects of biliverdin reductase. *Front Pharmacol.* 2012;3 MAR(March):1–8.
421. Kapitulnik J. Bilirubin: an endogenous product of heme degradation with both cytotoxic and cytoprotective properties. *Mol Pharmacol.* 2004;66(4):773–9.
422. Bagnato F, Hametner S, Welch EB. Visualizing iron in multiple sclerosis. *Magn Reson Imaging [Internet]. Elsevier B.V.;* 2013;31(3):376–84. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.mri.2012.11.011>
423. Williams R, Rohr AM, Wang W-T, Choi I-Y, Lee P, Berman NEJ, et al. Iron deposition is independent of cellular inflammation in a cerebral model of multiple sclerosis. *BMC Neurosci [Internet]. BioMed Central Ltd;* 2011;12(1):59. Available from: <http://www.biomedcentral.com/1471-2202/12/59>
424. Weng YH, Yang G, Weiss S, Dennery P a. Interaction between Heme Oxygenase-1 and -2 Proteins. *J Biol Chem.* 2003;278(51):50999–1005.
425. Linnenbaum M, Busker M, Kraehling JR, Behrends S. Heme oxygenase isoforms differ in their subcellular trafficking during hypoxia and are differentially modulated by cytochrome P450 reductase. *PLoS One.* 2012;7(4).
426. Hori R, Kashiba M, Toma T, Yachie A, Goda N, Makino N, et al. Gene transfection of H25A mutant heme oxygenase-1 protects cells against hydroperoxide-induced cytotoxicity. *J Biol Chem.* 2002;277(12):10712–8.
427. Wyrsh P, Blenn C, Bader J, Althaus FR. Cell Death and Autophagy under Oxidative Stress: Roles of Poly(ADP-Ribose) Polymerases and Ca<sup>2+</sup>. *Mol Cell Biol.* 2012;32(17):3541–53.
428. Elguero B, Gueron G, Giudice J, Toscani M a, De Luca P, Zalazar F, et al. Unveiling the association of STAT3 and HO-1 in prostate cancer: role beyond heme degradation. *Neoplasia [Internet].* 2012;14(11):1043–56. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3514752&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
429. Lin QS, Weis S, Yang G, Zhuang T, Abate A, Dennery P a. Catalytic inactive heme oxygenase-1 protein regulates its own expression in oxidative stress. *Free Radic Biol Med.* 2008;44:847–55.
430. Gandini N a, Fermento ME, Salomón DG, Obiol DJ, Andrés NC, Zenklusen JC, et al. Heme oxygenase-1 expression in human gliomas and its correlation with poor prognosis

- in patients with astrocytoma. *Tumour Biol* [Internet]. 2013;35(3):2803–15. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24234335>
431. Gueron G, De Siervi A, Ferrando M, Salierno M, De Luca P, Elguero B, et al. Critical role of endogenous heme oxygenase 1 as a tuner of the invasive potential of prostate cancer cells. *Mol Cancer Res*. 2009;7(November):1745–55.
  432. Taira J, Sugishima M, Kida Y, Oda E, Noguchi M, Higashimoto Y. Caveolin-1 is a competitive inhibitor of heme oxygenase-1 (HO-1) with heme: Identification of a minimum sequence in caveolin-1 for binding to HO-1. *Biochemistry*. 2011;50:6824–31.
  433. Chen K, Gunter K, Maines MD. Neurons overexpressing heme oxygenase-1 resist oxidative stress-mediated cell death. *J Neurochem*. 2000;75(1):304–13.
  434. Maines MD. The heme oxygenase system and its functions in the brain. *Cellular and Molecular Biology*. 2000. p. 573–85.
  435. Barone E, Di Domenico F, Sultana R, Coccia R, Mancuso C, Perluigi M, et al. Heme oxygenase-1 posttranslational modifications in the brain of subjects with Alzheimer disease and mild cognitive impairment. *Free Radic Biol Med* [Internet]. Elsevier; 2012;52(11-12):2292–301. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2012.03.020>
  436. Schipper HM, Liberman A, Stopa EG. Neural heme oxygenase-1 expression in idiopathic Parkinson's disease. *Exp Neurol*. 1998;150(1):60–8.
  437. Dexter DT, Carter CJ, Wells FR, Javoy-Agid F, Agid Y, Lees A, et al. Basal lipid peroxidation in substantia nigra is increased in Parkinson's disease. *J Neurochem*. 1989;52(2):381–9.
  438. Pedersen WA, Fu W, Keller JN, Markesbery WR, Appel S, Smith RG, et al. Protein modification by the lipid peroxidation product 4-hydroxynonenal in the spinal cords of amyotrophic lateral sclerosis patients. *Ann Neurol*. 1998;44(5):819–24.
  439. Schipper HM, Bennett DA, Liberman A, Bienias JL, Schneider JA, Kelly J, et al. Glial heme oxygenase-1 expression in Alzheimer disease and mild cognitive impairment. *Neurobiol Aging*. 2006;27(2):252–61.
  440. Jiménez-Jiménez FJ, Alonso-Navarro H, Ayuso-Peralta L, Jabbour-Wadiah T. Estrés oxidativo y enfermedad de Alzheimer. *Rev Neurol*. 2006;42(7):419–27.
  441. Fernandez-Gonzalez A, Pérez-Otaño I, Morgan JI. MPTP selectively induces haem oxygenase-1 expression in striatal astrocytes. *Eur J Neurosci*. 2000;12(5):1573–83.
  442. Syapin PJ. Regulation of haeme oxygenase-1 for treatment of neuroinflammation and brain disorders. *Br J Pharmacol*. 2008;155(5):623–40.
  443. Stahnke T, Stadelmann C, Netzler A, Brück W, Richter-Landsberg C. Differential upregulation of heme oxygenase-1 (HSP32) in glial cells after oxidative stress and in demyelinating disorders. *J Mol Neurosci*. 2007;32(1):25–37.
  444. Lin SX, Lisi L, Russo C Dello, Polak PE, Sharp A, Weinberg G, et al. The anti-inflammatory effects of dimethyl fumarate in astrocytes involve glutathione and haem oxygenase-1. *ASN Neuro*. 2011;3(2):75–84.
  445. Hinkel R, Lange P, Petersen B, Gottlieb E, Ng JKM, Finger S, et al. Heme Oxygenase-1 Gene Therapy Provides Cardioprotection Via Control of Post-Ischemic Inflammation: An

- Experimental Study in a Pre-Clinical Pig Model. *J Am Coll Cardiol* [Internet]. 2015;66(2):154–65. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26160631>
446. Li P, Elrayess MA, Gomma AH, Palmen J, Hawe E, Fox KM, et al. The microsatellite polymorphism of heme oxygenase-1 is associated with baseline plasma IL-6 level but not with restenosis after coronary in-stenting. *Chin Med J (Engl)*. 2005;118(18):1525–32.
447. Rueda B, Oliver J, Robledo G, López-Nevot MA, Balsa A, Pascual-Salcedo D, et al. HO-1 promoter polymorphism associated with rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum*. 2007;56(12):3953–8.
448. Kramer M, Sponholz C, Slaba M, Wissuwa B, Claus R a., Menzel U, et al. Alternative 5' Untranslated Regions Are Involved in Expression Regulation of Human Heme Oxygenase-1. *PLoS One*. 2013;8(10):1–10.
449. Martínez-Hernández A, Córdova EJ, Rosillo-Salazar O, García-Ortíz H, Contreras-Cubas C, Islas-Andrade S, et al. Association of HMOX1 and NQO1 Polymorphisms with Metabolic Syndrome Components. *PLoS One* [Internet]. 2015;10(5):e0123313. Available from: <http://dx.plos.org/10.1371/journal.pone.0123313>
450. Zhang L, Song F, Huang Y, Zheng H, Song F, Chen K, et al. Association Between the (GT)n Polymorphism of the HO-1 Gene Promoter Region and Cancer Risk: a Meta-analysis. *Asian Pac J Cancer Prev*. 2014;5(11):4617–22.
451. Cummins NW, Weaver E a., May SM, Croatt a. J, Foreman O, Kennedy RB, et al. Heme oxygenase-1 regulates the immune response to influenza virus infection and vaccination in aged mice. *FASEB J*. 2012;26(7):2911–8.
452. Wagener FADTG, Toonen EJM, Wigman L, Fransen J, Creemers MCW, Radstake TRDJ, et al. HMOX1 promoter polymorphism modulates the relationship between disease activity and joint damage in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum*. 2008;58(11):3388–93.
453. Hausmann M, Paul G, Kellermeier S, Frey I, Schölmerich J, Falk W, et al. (GT)n Dinucleotide repeat polymorphism of haem oxygenase-1 promoter region is not associated with inflammatory bowel disease risk or disease course. *Clin Exp Immunol*. 2008;153(1):81–5.
454. Chang YC, Wu WM, Tsai HY, Hsu LA. Microsatellite polymorphism in the heme oxygenase-1 gene promoter and the risk of psoriasis in Taiwanese. *Arch Dermatol Res*. 2012;304(9):739–44.
455. Ayuso P, Martínez C, Pastor P, Lorenzo-Betancor O, Luengo A, Jiménez-Jiménez FJ, et al. An association study between Heme oxygenase-1 genetic variants and Parkinson's disease. *Front Cell Neurosci* [Internet]. 2014;8(September):298. Available from: <http://journal.frontiersin.org/article/10.3389/fncel.2014.00298/abstract>
456. Zborníková P, Králík L, Lelková P, Kalincík T, Havrdová E, Martásek P. Microsatellite polymorphism in haem oxygenase 1 gene promoter in multiple sclerosis. *Folia Biol*. 2012;58(2):69–74.
457. Tanaka G, Aminuddin F, Akhabir L, He J-Q, Shumansky K, Connett JE, et al. Effect of heme oxygenase-1 polymorphisms on lung function and gene expression. *BMC Med Genet*. 2011;12(1):117.
458. Buis CI, Van Der Steege G, Visser DS, Nolte IM, Hepkema BG, Nijsten M, et al. Heme oxygenase-1 genotype of the donor is associated with graft survival after liver transplantation. *Am J Transplant*. 2008;8(2):377–85.



459. Cao L, Zhang Z, Cai B, Bai W, Zhang Y, Sun W, et al. Association of heme oxygenase-1 gene rs2071746 polymorphism with vascular outcomes in patients with atherosclerotic stroke. *J Neurol Sci* [Internet]. Elsevier B.V.; 2014;344(1-2):154–7. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jns.2014.06.046>
460. Kaneda H, Ohno M, Taguchi J, Togo M, Hashimoto H, Ogasawara K, et al. Heme oxygenase-1 gene promoter polymorphism is associated with coronary artery disease in Japanese patients with coronary risk factors. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2002;22(10):1680–5.
461. Mateo I, Sánchez-Juan P, Rodríguez-Rodríguez E, Infante J, Vázquez-Higuera JL, García-Gorostiaga I, et al. Synergistic effect of heme oxygenase-1 and tau genetic variants on Alzheimer's disease risk. *Dement Geriatr Cogn Disord*. 2008;26(4):339–42.
462. Ayuso P, Agúndez JAG, Alonso-Navarro H, Martínez C, Benito-León J, Ortega-Cubero S, et al. Heme Oxygenase 1 and 2 Common Genetic Variants and Risk for Essential Tremor. *Medicine (Baltimore)* [Internet]. 2015;94(24):e968. Available from: <http://content.wkhealth.com/linkback/openurl?sid=WKPTLP:landingpage&an=00005792-201506030-00018>
463. García-Martín E, Jiménez-Jiménez FJ, Alonso-Navarro H, Martínez C, Zurdo M, Turpín-Fenoll L, et al. Heme Oxygenase-1 and 2 Common Genetic Variants and Risk for Restless Legs Syndrome. *Medicine (Baltimore)* [Internet]. 2015;94(34):e1448. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26313808>
464. Andersen V, Ernst A, Christensen J, Østergaard M, Jacobsen B a, Tjønneland A, et al. The polymorphism rs3024505 proximal to IL-10 is associated with risk of ulcerative colitis and Crohns disease in a Danish case-control study. *BMC Med Genet*. 2010;11:82.
465. Delic J, Onclercq R, Moisan-Coppey M. Inhibition and enhancement of eukaryotic gene expression by potential non-B DNA sequences. *Biochem Biophys Res Commun*. 1991;180(3):1273–83.
466. Ono K, Goto Y, Takagi S, Baba S, Tago N, Nonogi H, et al. A promoter variant of the heme oxygenase-1 gene may reduce the incidence of ischemic heart disease in Japanese. *Atherosclerosis*. 2004;173(2):315–9.
467. Synowiec E, Szaflik J, Chmielewska M, Wozniak K, Sklodowska A, Waszczyk M, et al. An association between polymorphism of the heme oxygenase-1 and -2 genes and age-related macular degeneration. *Mol Biol Rep*. 2012;39(3):2081–7.
468. Ayuso P, Martínez C, Lorenzo-Betancor O, Pastor P, Luengo A, Jiménez-Jiménez FJ, et al. A polymorphism located at an ATG transcription start site of the heme oxygenase-2 gene is associated with classical Parkinson's disease. *Pharmacogenet Genomics*. 2011;21(9):565–71.
469. Wysokinski D, Synowiec E, Chmielewska M, Wozniak K, Zaras M, Sklodowska A, et al. Lack of association between the c.544G>A polymorphism of the heme oxygenase-2 gene and age-related macular degeneration. *Med Sci Monit*. 2011;17(8):CR449–R455.
470. Agúndez JA, Arroyo R, Ledesma MC, Martínez C, Ladero JM, de Andrés C, et al. Frequency of CYP2D6 allelic variants in multiple sclerosis. *Acta Neurol Scand*. 1995;92(6):464–7.
471. Agúndez J a G, García-Martín E, Martínez C, Benito-León J, Millán-Pascual J, Calleja P, et al. MAPT gene rs1052553 variant is not associated with the risk for multiple sclerosis. *Hum Immunol*. 2013;74:1705–8.

472. Martínez C, García-Martín E, Benito-León J, Calleja P, Díaz-Sánchez M, Pisa D, et al. Paraoxonase 1 polymorphisms are not related with the risk for multiple sclerosis. *NeuroMolecular Med.* 2010;12:217–23.
473. García-Martín E, Martínez C, Benito-León J, Calleja P, Díaz-Sánchez M, Pisa D, et al. Histamine-N-methyl transferase polymorphism and risk for multiple sclerosis. *Eur J Neurol.* 2010;17:335–8.
474. García-Martín E, Agúndez JAG, Martínez C, Benito-León J, Millán-Pascual J, Calleja P, et al. Vitamin D3 Receptor (VDR) Gene rs2228570 (Fok1) and rs731236 (Taq1) Variants Are Not Associated with the Risk for Multiple Sclerosis: Results of a New Study and a Meta-Analysis. *PLoS One.* 2013;8(6).
475. García-Martín E, Lorenzo-Betancor O, Martínez C, Pastor P, Benito-León J, Millán-Pascual J, et al. LINGO1 rs9652490 and rs11856808 polymorphisms are not associated with risk for multiple sclerosis. *BMC Neurol* [Internet]. 2013;13:34. Available from: <http://www.scopus.com/inward/record.url?eid=2-s2.0-84875916248&partnerID=tZOtx3y1>
476. Benjamini Y, Y H. Controlling the false discovery rate: a practical and powerful approach to multiple testing. *J Roy Stat Soc Ser.* 1995;57:289–300.
477. Benjamini Y, Drai D, Elmer G, Kafkafi N, Golani I. Controlling the false discovery rate in behavior genetics research. *Behavioural Brain Research.* 2001. p. 279–84.
478. Altman DG, Bland JM. Diagnostic tests 2: Predictive values. *BMJ.* 1994;309(6947):102.
479. Frazer KA, Ballinger DG, Cox DR, Hinds DA, Stuve LL, Gibbs RA, et al. A second generation human haplotype map of over 3.1 million SNPs. *Nature.* 2007;449(7164):851–61.
480. Stephens M, Smith NJ, Donnelly P. A new statistical method for haplotype reconstruction from population data. *Am J Hum Genet.* 2001;68(4):978–89.
481. Octavio-Aguilar P, Ramos-Frías J. Aplicación de la genética de poblaciones en el ámbito de la medicina. *Biomedica.* 2014;34:171–9.
482. Agúndez J a G, Golka K, Martínez C, Selinski S, Blaszkewicz M, García-Martín E. Unraveling ambiguous NAT2 genotyping data. *Clin Chem.* 2008;54(8):1390–4.
483. Andrews HE, Nichols PP, Bates D, Turnbull DM. Mitochondrial dysfunction plays a key role in progressive axonal loss in Multiple Sclerosis. *Medical Hypotheses.* 2005. p. 669–77.
484. Newcombe J, Li H, Cuzner ML. Low density lipoprotein uptake by macrophages in multiple sclerosis plaques: implications for pathogenesis. *Neuropathol Appl Neurobiol.* 1994;20(2):152–62.
485. Langemann H, Kabiersch A, Newcombe J. Measurement of low-molecular-weight antioxidants, uric acid, tyrosine and tryptophan in plaques and white matter from patients with multiple sclerosis. *Eur Neurol.* 1992;32(5):248–52.
486. Bizzozero OA, DeJesus G, Callahan K, Pastuszyn A. Elevated protein carbonylation in the brain white matter and gray matter of patients with multiple sclerosis. *J Neurosci Res.* 2005;81(5):687–95.



487. Cross AH, Manning PT, Keeling RM, Schmidt RE, Misko TP. Peroxynitrite formation within the central nervous system in active multiple sclerosis. *J Neuroimmunol.* 1998;88(1-2):45–56.
488. Zheng J, Bizzozero OA. Decreased activity of the 20S proteasome in the brain white matter and gray matter of patients with multiple sclerosis. *J Neurochem.* 2011;117(1):143–53.
489. Van Horssen J, Drexhage J a R, Flor T, Gerritsen W, van der Valk P, de Vries HE. Nrf2 and DJ1 are consistently upregulated in inflammatory multiple sclerosis lesions. *Free Radic Biol Med* [Internet]. Elsevier Inc.; 2010;49(8):1283–9. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2010.07.013>
490. Wilhelmus MMM, Van Der Pol SMA, Jansen Q, Witte ME, Van Der Valk P, Rozemuller AJM, et al. Association of Parkinson disease-related protein PINK1 with Alzheimer disease and multiple sclerosis brain lesions. *Free Radic Biol Med.* 2011;50(3):469–76.
491. McMahon J, McQuaid S, Reynolds R, FitzGerald U. Increased expression of ER stress- and hypoxia-associated molecules in grey matter lesions in multiple sclerosis. *Multiple Sclerosis Journal.* 2012. p. 1437–47.
492. Zheng J, Bizzozero OA. Accumulation of protein carbonyls within cerebellar astrocytes in murine experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Neurosci Res.* 2010;88(15):3376–85.
493. Dasgupta A, Zheng J, Perrone-Bizzozero NI, Bizzozero O a. Increased carbonylation, protein aggregation and apoptosis in the spinal cord of mice with experimental autoimmune encephalomyelitis. *ASN Neuro* [Internet]. 2013;5(1):e00111. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3620690&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
494. Li S, Vana AC, Ribeiro R, Zhang Y. Distinct role of nitric oxide and peroxynitrite in mediating oligodendrocyte toxicity in culture and in experimental autoimmune encephalomyelitis. *Neuroscience.* 2011;184:107–19.
495. Toshniwal PK, Zarling EJ. Evidence for increased lipid peroxidation in multiple sclerosis. *Neurochem Res.* 1992;17(2):205–7.
496. Calabrese V, Raffaele R, Cosentino E, Rizza V. Changes in cerebrospinal fluid levels of malondialdehyde and glutathione reductase activity in multiple sclerosis. *Int J Clin Pharmacol Res.* 1994;14(4):119–23.
497. Ghabaee M, Javedari B, Al-E-Shagh N, Ghaffarpour M, Asadi F. Serum and cerebrospinal fluid antioxidant activity and lipid peroxidation in Guillain-Barre syndrome and multiple sclerosis patients. *Int J Neurosci.* 2010;120(4):301–4.
498. Greco A, Minghetti L, Puopolo M, Cannoni S, Romano S, Pozzilli C, et al. Cerebrospinal fluid isoprostanes are not related to inflammatory activity in relapsing-remitting multiple sclerosis. *J Neurol Sci.* 2004;224(1-2):23–7.
499. Pennisi G, Cornelius C, Cavallaro MM, Salinaro AT, Cambria MT, Pennisi M, et al. Redox regulation of cellular stress response in multiple sclerosis. *Biochemical Pharmacology.* 2011. p. 1490–9.
500. Sbardella E, Greco A, Stromillo ML, Prosperini L, Puopolo M, Cefaro LA, et al. Isoprostanes in clinically isolated syndrome and early multiple sclerosis as biomarkers of tissue damage and predictors of clinical course. *Mult Scler J.* 2013;19:411–7.

501. Kalousová M, Havrdová E, Mrázová K, Spacek P, Braun M, Uhrová J, et al. Advanced glycoxidation end products in patients with multiple sclerosis. *Prague Med Rep.* 2005;106(2):167–74.
502. Ljubisavljevic S, Stojanovic I, Vojinovic S, Stojanov D, Stojanovic S, Cvetkovic T, et al. The patients with clinically isolated syndrome and relapsing remitting multiple sclerosis show different levels of advanced protein oxidation products and total thiol content in plasma and CSF. *Neurochem Int* [Internet]. 2013;62(7):988–97. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23500606>
503. Jiménez-Jiménez FJ, de Bustos F, Molina JA, de Andrés C, Gasalla T, Ortí-Pareja M, et al. Cerebrospinal fluid levels of alpha-tocopherol in patients with multiple sclerosis. *Neurosci Lett.* 1998;249(1):65–7.
504. Seven A, Aslan M, Incir S, Altintas A. Evaluation of oxidative and nitrosative stress in relapsing remitting multiple sclerosis: effect of corticosteroid therapy. *Folia Neuropathol* [Internet]. 2013;51(1):58–64. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23553138>
505. Amorini AM, Petzold A, Tavazzi B, Eikelenboom J, Keir G, Belli A, et al. Increase of uric acid and purine compounds in biological fluids of multiple sclerosis patients. *Clin Biochem.* 2009;42(10-11):1001–6.
506. Kastenbauer S, Kieseier BC, Becker BF. No evidence of increased oxidative degradation of urate to allantoin in the CSF and serum of patients with multiple sclerosis. *J Neurol.* 2005;252(5):611–2.
507. Senanayake VK, Jin W, Mochizuki A, Chitou B, Goodenowe DB. Metabolic dysfunctions in multiple sclerosis: implications as to causation, early detection, and treatment, a case control study. *BMC Neurol* [Internet]. *BMC Neurology*; 2015;15(1):154. Available from: <http://www.biomedcentral.com/1471-2377/15/154>
508. Ramensky V, Bork P, Sunyaev S. Human non-synonymous SNPs: server and survey. *Nucleic Acids Res.* 2002;30(17):3894–900.
509. Bove R, Chitnis T. Sexual disparities in the incidence and course of MS. *Clinical Immunology.* 2013. p. 201–10.
510. Greer JM, McCombe P a. Role of gender in multiple sclerosis: Clinical effects and potential molecular mechanisms. *J Neuroimmunol* [Internet]. Elsevier B.V.; 2011;234(1-2):7–18. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jneuroim.2011.03.003>
511. Liu Y, Teige I, Birnir B, Issazadeh-Navikas S. Neuron-mediated generation of regulatory T cells from encephalitogenic T cells suppresses EAE. *Nat Med.* 2006;12(5):518–25.
512. Tanaka T, Kishimoto T. Targeting interleukin-6: All the way to treat autoimmune and inflammatory diseases. *Int J Biol Sci.* 2012;8(9):1227–36.
513. Erta M, Quintana A, Hidalgo J. Interleukin-6, a major cytokine in the central nervous system. *Int J Biol Sci.* 2012;8(9):1254–66.
514. Serada S, Fujimoto M, Mihara M, Koike N, Ohsugi Y, Nomura S, et al. IL-6 blockade inhibits the induction of myelin antigen-specific Th17 cells and Th1 cells in experimental autoimmune encephalomyelitis. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2008;105(26):9041–6.
515. Araki M, Matsuoka T, Miyamoto K, Kusunoki S, Okamoto T, Murata M, et al. Efficacy of the anti-IL-6 receptor antibody tocilizumab in neuromyelitis optica: A pilot study. *Neurology* [Internet]. 2014;82(15):1302–6. Available from:

<http://www.neurology.org/cgi/doi/10.1212/WNL.0000000000000317>\npapers3://publication/doi/10.1212/WNL.0000000000000317