



Universidad
de Alcalá

FACULTAD DE MEDICINA

Departamento de Medicina

Programa de Doctorado de Medicina Clínica D234

**POLIMORFISMOS *LINGO1* rs9652490 Y
rs11856808 Y RIESGO PARA EL DESARROLLO DE
ESCLEROSIS MÚLTIPLE**

Directores de la Tesis Doctoral

Esteban García-Albea Ristol

Félix Javier Jiménez Jiménez

José Augusto García-Agúndez Pérez-Coca

Tesis Doctoral presentada por María Díaz Sánchez

Alcalá de Henares, 2014

ESPACIO RESERVADO PARA EL CERTIFICADO DEL DEPARTAMENTO DE
MEDICINA DE LA UNIVERSIDAD ALCALÁ.

ESPACIO RESERVADO PARA EL CERTIFICADO DEL 1º DIRECTOR DE LA
TESIS (DR. ESTEBAN GARCÍA-ALBEA RISTOL).

ESPACIO RESERVADO PARA EL CERTIFICADO DEL 2º DIRECTOR DE LA
TESIS (DR. FÉLIX JAVIER JIMÉNEZ JIMÉNEZ).

ESPACIO RESERVADO PARA EL CERTIFICADO DEL 3º DIRECTOR DE LA
TESIS (DR. JOSÉ AUGUSTO GARCÍA-AGÚNDEZ PÉREZ-COCA).

*A mis tres soles,
Guillermo, Paula y Guille*

AGRADECIMIENTOS

Son muchas las personas que han hecho posible que esta tesis se llevará a cabo, y a todos ellos quiero mostrar mi agradecimiento.

A mis tres directores de tesis, Esteban García-Albea Ristol, Félix Javier Jiménez Jiménez y José Augusto García-Agúndez Pérez-Coca, por haberme ofrecido la posibilidad de realizar esta tesis doctoral y por haberme brindado todo el apoyo necesario para poder llevarla a cabo. Gracias por su dedicación, docencia, asesoramiento constante así como su inquietud investigadora que me empujó a embarcarme en este interesante proyecto.

A Elena García-Martín, por su inestimable colaboración en la gestión y procesamiento de muestras. A Pau Pastor y Oswaldo Lorenzo-Betancor, piezas clave para la realización de esta tesis, dada su inestimable colaboración en la realización de los análisis genéticos. Gracias, además, por sus consejos sobre Genética.

A mis compañeros de Neurología, por sus consejos, por su ayuda y colaboración trabajando codo con codo, en especial a Patricia Calleja y Julián Benito-León.

A todos los pacientes que desinteresadamente participaron en este proyecto sin los cuales no podríamos avanzar en el campo de la investigación.

A mis padres, quienes me pusieron en contacto con la Medicina desde tan pequeña, y que despertaron en mí la ilusión por dedicarme a esta magnífica profesión. Gracias por su entusiasmo, consejos, palabras de ánimo y apoyo constantes.

A Guillermo, por su amor incondicional, apoyo diario y paciencia durante la elaboración de este proyecto.

ÍNDICE

ÍNDICE

ABREVIATURAS.....	13
RESUMEN.....	18
INTRODUCCIÓN.....	22
1. Generalidades de la Esclerosis Múltiple.....	23
1.1- Aspectos históricos.....	24
1.2- Epidemiología.....	28
1.3- Anatomía patológica.....	31
1.4- Cuadro clínico.....	35
1.4.1- Formas clínicas de evolución.....	36
1.4.2- Síntomas y signos.....	38
1.4.3- Progresión de la discapacidad.....	44
1.5- Diagnóstico.....	45
1.5.1- Criterios diagnósticos.....	45
1.5.2- Pruebas complementarias.....	52
1.6- Tratamiento.....	61
1.6.1- Tratamientos con base inmunológica.....	61
1.6.2- Tratamientos sintomáticos.....	73
1.6.3- Tratamiento rehabilitador.....	75
2. Fisiopatogenia de la EM.....	76

2.1- Etiología de la EM.....	76
2.1.1- Factores genéticos.....	76
2.1.2- Factores ambientales.....	78
2.2- Mecanismo patogénico.....	82
2.2.1- Desmielinización.....	88
2.2.2- Remielinización.....	91
2.2.3- Daño axonal.....	93
3. LINGO1.....	96
3.1- Generalidades.....	96
3.2- Estructura y función de LINGO1.....	97
3.3- Papel del polimorfismo genético de <i>LINGO1</i> en la fisiopatogénia de la EM.....	100
HIPÓTESIS Y OBJETIVOS.....	106
4. Hipótesis.....	107
5. Objetivos.....	111
5.1- Objetivo primario.....	111
5.2- Objetivos secundarios.....	111
PACIENTES, MATERIAL Y MÉTODOS.....	112
6. Diseño del estudio.....	113
7. Pacientes y ámbito de estudio.....	114

7.1- Casos.....	115
7.2- Controles.....	116
8. Recogida de variables.....	117
9. Metodología del análisis genético de las muestras.....	119
9.1- Extracción y purificación de DNA a partir de sangre periférica	119
9.1.1- Soluciones utilizadas en la extracción y purificación de DNA	121
9.2- Cuantificación de DNA y estimación de su pureza.....	123
9.3- Genotipado de SNPs rs9652490 y rs11856808 del gen <i>LINGO1</i>	124
10. Análisis estadístico.....	131
11. Consideraciones éticas.....	133
RESULTADOS.....	134
12. Análisis de las variables demográficas.....	135
12.1- Grupo de pacientes con EM.....	135
12.2- Grupo control.....	138
12.3- Comparación entre pacientes con EM y grupo control.....	141
13. Análisis de la variable forma clínica de EM.....	142
14. Análisis de la variable edad de inicio de la EM.....	145
15. Análisis de los SNPs rs9652490 y rs1185808 del gen <i>LINGO1</i>	148
15.1- Genotipos y variantes alélicas de <i>LINGO1</i> rs9652490 y rs11856806 de pacientes con EM y controles sanos.....	148

15.2- Genotipos y variantes alélicas de <i>LINGO1</i> rs9652490 y rs11856808 de mujeres con EM y voluntarias sanas.....	151
15.3- Genotipos y variantes alélicas de <i>LINGO1</i> rs9652490 y rs11856808 de hombres con EM y voluntarios sanos.....	154
15.4- Genotipos y variantes alélicas de <i>LINGO1</i> rs9652490 y rs11856808 de pacientes con EM y controles, según la forma clínica de EM.....	157
15.5- Genotipos y variantes alélicas de <i>LINGO1</i> rs9652490 y rs11856808 de pacientes con EM. Comparación según edad de inicio de la enfermedad	162
DISCUSIÓN	164
16. Composición y representatividad de la muestra.....	165
17. <i>LINGO1</i> y EM.....	168
18. Polimorfismos <i>LINGO1</i> rs9652490 y rs11856808 y riesgo para el desarrollo de EM.....	174
19. Limitaciones del estudio.....	179
CONCLUSIONES	180
BIBLIOGRAFÍA	183
ANEXOS	220

ABREVIATURAS

ABREVIATURAS

ADEMM	Asociación de Esclerosis Múltiple de Madrid ADEMM
AG	Acetato de glatiramero
Akt	Proteína kinasa B
BHE	Barrera hemato-encefálica
BOC	Bandas oligoclonales
CIMA	Centro de Investigaciones Médicas Aplicadas
CIS*	Síndrome clínico aislado
CMH	Complejo Mayor de Histocompatibilidad
DE	Desviación estándar
DNA*	Ácido desoxirribonucleico
dNTP	Nucleótidos
DO	Densidad óptica
EAE	Encefalitis alérgica experimental
EDSS*	Escala expandida del estado de discapacidad
EDTA	Etilén-diamino-tetraacético
EGFR*	Receptor del factor de crecimiento epidérmico
EM	Esclerosis Múltiple
EMCD	Esclerosis Múltiple Clínicamente Definida
EMPP	Esclerosis Múltiple Primaria Progresiva

EMRR	Esclerosis Múltiple Recurrente Remitente
FAMS*	<i>Functional Assessment of Multiple Sclerosis</i>
PI3K-Akt	Vía de señalización de la fosfatidilinositol-3-kinasa
GPTasa	Guanosina trifosfatasa
Ig	Inmunoglobulina
IL	Interleucina
INF	Interferón
IM	Intramuscular
IV	Intravenoso
LCR	Líquido cefalorraquídeo
LFA-1*	Antígeno asociado a la función linfocitaria 1
LINGO*	<i>Leucine rich repeat and immunoglobulin domain containing Nogo receptor interacting protein-1</i>
LMP	Leucoencefalopatía multifocal progresiva
LRR*	<i>Leucine rich repeat</i>
MAG*	Glicoproteína asociada a la mielina
MBP*	Proteína básica de la mielina
MOG*	Glicoproteína mielínica de los oligodendrocitos
MMP	Metaloproteinasas de la matriz
MSFC*	<i>Multiple Sclerosis Functional Composite</i>
MSQLI*	<i>Multiple Sclerosis Quality of Life Inventory</i>
MSQOL-54*	<i>Multiple Sclerosis Quality Of Life-54</i>

NgR*	Receptor Nogo
OMgp*	Glicoproteína de mielina oligodendroglial
OPC*	Célula precursora del oligodendrocito
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
PE	Potenciales evocados
PEAT	Potenciales evocados auditivos de tronco
PEM	Potenciales evocados motores
PES	Potenciales evocados somatosensitivos
PEV	Potenciales evocados visuales
PLP	Proteína proteolipídica
PKB	Proteína kinasa B
RFLP*	Polimorfismos de longitud de fragmentos de restricción
RhoA*	<i>Ras homolog family member A</i>
RM	Resonancia Magnética
SC	Subcutáneo
SNC	Sistema Nervioso Central
SNP*	<i>Single nucleotide polymorphism</i>
Taq	<i>Thermus aquaticus polimerasa</i>
Th*	Células T <i>helper</i>
TNF*	Factor de necrosis tumoral
Treg	Células T reguladoras
TrKB*	Receptor de neurotrofina tirosina kinasa B

VEB	Virus Epstein-Barr
VHS-6	Virus herpes simple 6
VLA-4*	Antígeno muy tardío 4
VO	Vía oral
VVZ	Virus varicela zóster

*: las abreviaturas con asterisco conservan las siglas de la terminología anglosajona.

RESUMEN

RESUMEN

Introducción

La esclerosis múltiple (EM) es la enfermedad desmielinizante del sistema nervioso central (SNC) más frecuente. A pesar del notable progreso científico de los últimos años, su etiología sigue siendo desconocida. La hipótesis patogénica más aceptada considera que la EM es fruto de la interacción de múltiples factores tanto genéticos como ambientales que desencadenarían una respuesta inmunológica anómala contra el SNC. Los múltiples estudios genéticos llevados a cabo en los últimos años han permitido identificar más de 50 *loci* diferentes relacionados con el riesgo de padecer EM.

La proteína LINGO1 es una glicoproteína 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. Estudios realizados en la última década han sugerido su probable implicación en la patogenia de la EM. En este contexto, y en un intento por identificar marcadores genéticos de susceptibilidad para el desarrollo de EM, decidimos estudiar dos polimorfismos de un solo nucleótido (SNP) comunes del gen *LINGO1* (rs9652490 y rs11856808), que se habían asociado con otras enfermedades neurológicas. Además,

evaluamos su posible influencia sobre la forma clínica y la edad de inicio de la enfermedad.

Pacientes y método

Incluimos un total de 293 pacientes con EM (159 pacientes con EM recurrente-remitente, 91 con EM secundaria progresiva, 43 con EM primaria progresiva) y 318 individuos sanos. Ambos grupos de sujetos mostraban prácticamente la misma proporción de mujeres y varones (69.3% y 69.5% de mujeres, respectivamente), y una distribución de la edad en el momento de inclusión en el estudio muy similar (media de 43.9 y 43.8 años, respectivamente). La media de edad de inicio de la enfermedad, en el grupo de pacientes con EM, fue de 32.8 años.

En este estudio procedimos a analizar la frecuencia de los genotipos y las variantes alélicas de los SNPs *LINGO1* rs9652490 y *LINGO1* rs11856808 empleando la tecnología KASPar.

Resultados

Las frecuencias de los genotipos de *LINGO1* rs9652490 y *LINGO1* rs11856808, así como de sus variantes alélicas, no difirieron significativamente entre los pacientes diagnosticados de EM y los sujetos control. La frecuencia del alelo

menor del SNP *LINGO1* rs9652490 fue 0.171 y 0.167 en el grupo de pacientes con EM y de voluntarios sanos respectivamente ($p= 0.853$). En el caso del SNP *LINGO1* rs11856808, la frecuencia del alelo menor fue 0.317 y 0.310 en los casos y los controles respectivamente ($p= 0.773$). Tampoco detectamos diferencias al realizar este mismo análisis por subgrupos en función del género, la forma evolutiva de EM ni la edad de comienzo de la enfermedad.

Conclusión

Los resultados de esta tesis sugieren que los genotipos y las variantes alélicas de *LINGO1* rs9652490 y *LINGO1* rs11856808 no presentan relación con el riesgo de padecer EM en la población caucasiana española, y tampoco influyen en la edad de comienzo de la enfermedad ni en la forma evolutiva de la misma.

INTRODUCCIÓN

1.- GENERALIDADES DE LA ESCLEROSIS MÚLTIPLE

La esclerosis múltiple (EM) es la enfermedad desmielinizante, crónica y multifocal del sistema nervioso central (SNC) más frecuente¹. Esta enfermedad se caracteriza por un curso en brotes y menos frecuentemente progresivo que afecta a personas generalmente jóvenes, con un pronóstico variable pero, en la que cerca de un 50% de los mismos tendrán dificultad para caminar tras 15 años de evolución². Es, por tanto, una de las enfermedades que más impactan sobre la calidad de vida, no sólo de los pacientes sino también de sus cuidadores³. La característica fundamental de la EM es la aparición sucesiva, en cualquier región del SNC, de lesiones inflamatorias que causan desmielinización y daño axonal, expresándose clínicamente de forma muy variada dependiendo de la topografía donde asienten dichas lesiones².

El diagnóstico de la EM es fundamentalmente clínico y recibe cada día más ayuda de las pruebas complementarias, y en especial, de las técnicas de resonancia magnética (RM), que permiten realizar el diagnóstico de forma más temprana. Los

requisitos de diseminación en espacio y tiempo, junto con la exclusión de otras enfermedades siguen siendo el eje principal del diagnóstico.

Por primera vez disponemos de fármacos que han demostrado ser eficaces en la disminución de la tasa de brotes y en alterar el curso natural de la EM, especialmente cuando son utilizados desde fases precoces de la enfermedad⁴⁻⁷.

Sin embargo, han pasado más de cien años desde que Carswell, Cruveilhier y Charcot⁸⁻¹² hiciesen las primeras descripciones de las características clínicas y patológicas de la EM, y a pesar del progresivo conocimiento que va adquiriéndose, la EM continúa siendo una enfermedad enigmática de la que se desconoce su etiología, en la que se intenta comprender su etiopatogenia y prevenir su progresión.

1.1- Aspectos históricos

La EM se conoce como entidad clinicopatológica desde hace más de 150 años. El primer caso descrito en la literatura es el de Santa Lidwina de Schiedam, que vivió en Holanda entre 1380 y 1433. Se cree que esta Santa padeció la enfermedad, ya que sufrió diferentes síntomas neurológicos de distinta localización que comenzaron en su adolescencia, con agravamientos y remisiones, y que persistieron hasta su muerte a la edad de 53 años¹³. Pero tal vez, el primer caso mejor documentado, sea el de

Augustus Frederic D'Este (1794-1848), 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. Su caso fue publicado por Douglas Frith (1948). Otro caso menos documentado es el del poeta del siglo XIX Heinrich Heine. Parece ser que tuvo una clínica parecida a la relatada actualmente por los pacientes con EM, con una fase inicial de recidivas y remisiones, hasta que 20 años después de los primeros síntomas, pasó a una forma de deterioro neurológico progresivo¹⁴.

Las primeras descripciones patológicas de la EM se deben a Robert Carswell (1793-1857) y a Jean Cruveilhier (1791-1874). El primero de los autores encontró unas extrañas lesiones a nivel de la médula espinal en la necropsia de un paciente. Carswell no logró saber cuál era la causa que las había originado, ni las asoció con los síntomas de la enfermedad, pero sí realizó una descripción patológica minuciosa de las mismas⁸. Por su parte, 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)⁹.

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 de la EM y dio una primera descripción clínica de un vínculo entre la EM y ciertos trastornos mentales.

Sin embargo, el primero que reconoce la EM como enfermedad, caracterizada por la presencia de lesiones diseminadas en el espacio y el tiempo, con fases de agudización y de remisión de los síntomas, es Jean-Martin Charcot (1825-1893)¹⁰. Este autor realizó la primera descripción clínica completa en un paciente vivo con EM¹¹ y fue también el primero en correlacionar las observaciones clínicas con los cambios patológicos, acuñando el concepto de esclerosis en placas¹². Charcot reconoció el nistagmus, el habla escandida y el temblor intencional como elementos patognomónicos de la enfermedad dando lugar a lo que luego se reconoció como “la tríada de Charcot”, un concepto que hoy se reconoce como erróneo pero que conserva el mérito de haber sido probablemente el primero de los criterios diagnósticos para la EM.

Sería un discípulo de Charcot, Pierre Marie (1853-1940), el primero en intentar esclarecer cuáles podrían ser las causas de la enfermedad, proponiendo una posible etiología infecciosa. Por otro lado, Eduard Rindfleisch (1836-1908) aportó nueva información sobre la fisiopatología de la EM describiendo, en 1893, el componente inflamatorio de la enfermedad. El siguiente gran avance sobre la patogenia de la EM fue la demostración en Edimburgo, por parte de James Walker Dawson (1870-1927)¹⁵ en 1916, de una íntima relación entre las placas de EM y los pequeños vasos sanguíneos cerebrales. Años más tarde, Elvin Kabat (1914-2000)¹⁶ observó que el líquido cefalorraquídeo (LCR) de los pacientes con EM contenía una

superior cantidad de gammaglobulinas. Este hallazgo confirmaba 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.

Desde el punto de vista clínico dos hechos merecen especial relevancia en la segunda mitad del siglo XX. El primero fue la introducción en 1955, por parte de Kurtzke¹⁷, de una escala que permitía medir el grado de afectación de cada paciente. El segundo hecho fue el establecimiento en 1965 de los primeros criterios diagnósticos propuestos por Schumacher y cols.¹⁸.

Las primeras imágenes de tomografía computada en individuos con EM fueron obtenidas en 1978. Sin embargo, el diagnóstico por imagen se enriqueció de manera sustancial a partir del advenimiento de la RM en 1981, que amplió enormemente la comprensión de la enfermedad así como las posibilidades de efectuar un diagnóstico más preciso y precoz¹⁹. Pronto pudo comprobarse en estudios postmortem, que las alteraciones encontradas en RM se correspondían con placas de desmielinización y que esta técnica era muy sensible en la detección de dichas lesiones (más del 95% de pacientes con EM clínicamente definida (EMCD) tenían una RM patológica)²⁰⁻²². La introducción del contraste paramagnético (gadolinio) permitió averiguar que aquellas placas con captación del mismo eran placas con actividad inflamatoria aguda^{23,24}.

1.2- Epidemiología

Los estudios epidemiológicos han permitido saber que la EM es la enfermedad neurológica crónica más frecuente en adultos jóvenes en Europa y Norteamérica². Estos estudios sugieren que la enfermedad se desarrolla en sujetos genéticamente predispuestos sobre los que actuaría un factor ambiental en la infancia, antes de los 15 años. Aunque se ha tratado de identificar el potencial agente ambiental, esto aún no ha sido posible. Así, se ha estudiado la relación de la EM con diferentes enfermedades infecciosas, sin que por el momento se hayan encontrado resultados concluyentes. En los últimos años, diversos agentes infecciosos se han examinado como el virus herpes simple 6 (VHS-6), el virus de Epstein-Barr (VEB), el virus varicela zóster (VVZ), diferentes especies de *Candida*²⁵ o la *Chlamydia pneumoniae*²⁶⁻³⁰.

La edad de inicio de la EM suele establecerse entre los 20 y los 40 años, situándose la edad de máxima incidencia alrededor de los 30 años³¹. Es una enfermedad más frecuente en mujeres en una proporción aproximada de 2:1^{32,33}. Esta mayor susceptibilidad del sexo femenino podría estar en relación con factores hormonales³².

Los estudios de prevalencia muestran una distribución irregular de la EM en el mundo, aumentando a medida que nos alejamos del ecuador, tanto en dirección

norte como en dirección sur³⁴. Kurtzke³⁵ clasificó las regiones del mundo según su alta (más de 30 casos/100.000 habitantes), media (5-25 casos/100.000 habitantes) o baja prevalencia (menos de 5 casos/100.000 habitantes). Estudios posteriores han elevado estas cifras de prevalencia, de forma que estas regiones se han reclassificado quedando de la siguiente manera³⁶: prevalencia alta (más de 100 casos/100.000 habitantes), prevalencia media (entre 50-100 casos/100.000 habitantes) y prevalencia baja (menos de 50 casos/100.000 habitantes). Las regiones con mayor prevalencia son el Norte de Europa, el Sur de Australia y Norte América. En África y Asia es infrecuente y presenta unas características clínicas específicas, probablemente debido a factores raciales. En las últimas décadas se ha detectado un aumento de la incidencia de esta enfermedad en algunas regiones, como en el Sur de Europa³⁷⁻³⁹. En España, se han completado diversos estudios de prevalencia que demuestran que nos encontramos en una zona de riesgo medio (prevalencia de 43-79 casos/100.000)^{37,40-49}.

Es conocido que la tasa de incidencia de la EM puede variar a lo largo del tiempo, lo que apoyaría la existencia de un factor ambiental³⁵. Se han apreciado aumentos de incidencia y también disminuciones. Además, se han descrito focos y epidemias. Éstas últimas tuvieron lugar en Islandia y las Islas Faroe, después de la Segunda Guerra Mundial, y fueron investigadas por Kurtzke^{33,35}. Él postuló que este aumento de frecuencia era debido a la presencia de tropas británicas en la zona, dos años antes, y a un posible factor infeccioso transmitido por estos soldados.

Los estudios en emigrantes desde regiones de alta a baja prevalencia indican que la edad de la adolescencia es crucial para la conservación del riesgo a padecer la enfermedad^{33,35,36}. Aquellos que emigraban a edades tempranas adquirirían el riesgo bajo de su país de destino, mientras que aquellos que lo hacían a edades superiores a los 15 años conservaban el elevado riesgo de padecer EM de su país de origen³³. Globalmente, los estudios de migración apoyan la hipótesis del factor ambiental cuya influencia en el desarrollo de la EM sería determinante desde los primeros años de vida hasta la pubertad.

Los estudios familiares, étnicos y genéticos han permitido constatar la influencia de distintos factores genéticos en la etiopatogenia de la EM. Mientras el riesgo de padecer la enfermedad en la población general es de 0.1-0.2%, en los familiares de primer grado esta tasa aumenta al 3-5%^{36,50}. Cuando ambos padres están afectados la tasa sube al 30%. La concordancia entre gemelos monocigóticos es del 40% y del 3-5% en gemelos dicigóticos, similar al riesgo de los familiares de primer grado^{51,52}. También se ha podido comprobar que los hijos adoptados por sujetos con EM no tienen mayor riesgo de padecer la enfermedad que el esperado en la población general, así como que esta patología no aumenta en los esposos de los individuos afectos. Los estudios étnicos han permitido establecer que existen ciertas razas con una mayor tasa de incidencia y prevalencia de la enfermedad como la población escandinava, mientras que otras poblaciones como los lapones, los indios de Norteamérica, los gitanos o los maoríes de Nueva Zelanda tienen una incidencia y

prevalencia muy bajas³⁴⁻³⁶. En este sentido, Poser en 1995, propuso una hipótesis, según la cual, la EM se produciría en las poblaciones con antecedentes escandinavos, a través de las invasiones vikingas⁵³.

Por otra parte, los estudios genéticos han identificado como principal determinante genético para la EM al complejo mayor de histocompatibilidad (CMH), localizado en el brazo corto del cromosoma 6. Así, sabíamos desde hace años que ciertos alelos de la región II del CMH, como el DR2, se asociaban fuertemente con la enfermedad^{54,55}. No obstante, no ha sido hasta el advenimiento de los estudios de asociación de genoma completo (*Genome Wide Association Study*, GWAS) cuando se ha podido identificar más de 50 *loci* diferentes relacionados con el riesgo a padecer EM⁵⁶⁻⁶⁷. Muchas de las variantes alélicas detectadas se localizan en genes con funciones inmunológicas importantes (receptores de IL 2 y 7, CD58, CD6, CD40 y otros), y la mayoría se asocian con otras enfermedades autoinmunes.

1.3- Anatomía patológica

La EM se caracteriza por la presencia de múltiples lesiones focales en la sustancia blanca del SNC, denominadas placas, en las que el hallazgo más llamativo es la pérdida de mielina (desmielinización) con grado variable de destrucción axonal^{68,69}. Estas lesiones se encuentran en distintos estadios evolutivos, y se localizan

más frecuentemente en la sustancia blanca periventricular, en los nervios ópticos, el tronco cerebral, el cerebelo y la médula espinal. También pueden aparecer placas en la sustancia gris, en general subpiales, aunque en menor número⁷⁰.

Las placas tienen un tamaño variable, en general no mayor de 1.5cm de diámetro, con tendencia a coalescer, resultando en placas de mayor tamaño. Suele existir una relación entre las placas de desmielinización y las estructuras vasculares: casi todas las de pequeño o mediano tamaño están centradas por una vena, y en las mayores, esta relación es evidente en sus márgenes, que se extienden a lo largo de venas que atraviesan y salen de la placa⁷¹⁻⁷³.

En función del estado evolutivo, las placas de desmielinización pueden dividirse en agudas, en las que el fenómeno patológico esencial es la inflamación, y crónicas, en las que predomina la desmielinización, la degeneración axonal y la gliosis cicatricial^{72,74,75}.

Sin embargo, recientes estudios patológicos han revelado distintas alteraciones estructurales e inmunológicas en las placas, lo que sugiere distintos mecanismos patogénicos. Lucchinetti y cols.^{76,77} han definido mejor estas alteraciones en una amplia serie de biopsias y necropsias. Por un lado, observaron que las placas en actividad tenían en común una disminución de la densidad de fibras mielinizadas, un irregular recubrimiento de los axones, así como la presencia de infiltrados de

macrófagos y células microgliales activadas con gránulos intracitoplasmáticos con restos de mielina. Pero, también observaron una importante heterogeneidad en el aspecto inmunopatológico. Así, distinguieron cuatro patrones de desmielinización dependiendo de:

- La distribución de la pérdida de la mielina.
- La morfología y extensión de la placa.
- El patrón de destrucción del oligodendrocito.
- La evidencia inmunopatológica de depósitos de inmunoglobulinas y complemento activado.

- **Patrones 1 y 2:** estos dos patrones comparten diversas características y son los que aparecen mayoritariamente. Existe una desmielinización activa caracterizada por una inflamación mediada por linfocitos T y macrófagos que típicamente se sitúan alrededor de vénulas y venas pequeñas. Se observa remielinización concomitante. Los márgenes de la lesión están muy bien delimitados. Las proteínas de la mielina están todas afectadas por igual. En los bordes de las placas activas, hay una disminución variable de oligodendrocitos; en cambio, en las placas crónicas hay un incremento del número de estas células. Los dos patrones se diferencian porque en el segundo hay un acentuado depósito de inmunoglobulinas, preferentemente IgG y de complemento activado en las lesiones.

- **Patrón 3:** también existe un infiltrado inflamatorio de linfocitos T, macrófagos y microglía activada. En cambio, el patrón de desmielinización no está centrado alrededor de vénulas y los márgenes de la placa están mal definidos. Existe una pérdida preferente de la glicoproteína asociada a la mielina (MAG) con conservación del resto de proteínas de la mielina. Además, pueden verse oligodendrocitos apoptóticos y no hay depósitos de inmunoglobulinas o complemento. En los bordes de la placa existe una importante pérdida de oligodendrocitos con ausencia prácticamente completa de los mismos en el centro inactivo de la placa. No se ven placas de remielinización.

- **Patrón 4:** existe un infiltrado inflamatorio perivenoso con macrófagos y linfocitos T, con ausencia de depósito de inmunoglobulinas y complemento. La desmielinización está asociada a la muerte de los oligodendrocitos advertida por la fragmentación del ADN, sin que estas células muestren los signos típicos apoptóticos. Todas las proteínas de la mielina están afectadas por igual. No se observan fenómenos de remielinización.

Estos cuatro patrones pueden indicar distintos mecanismos patogénicos. Así, los dos primeros se asemejan a los patrones conocidos de la encefalomielitis alérgica experimental (EAE), mientras que los patrones 3 y 4 sugieren más una patología del oligodendrocito⁷⁷. En el patrón 2, el depósito de inmunoglobulinas y del antígeno C9 del complemento sugiere un importante papel de los anticuerpos en la

desmielinización. En cambio, en el patrón 1 la desmielinización parece mediada por productos segregados por los macrófagos activados, como el factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α). En las lesiones con el patrón 3, la presencia de apoptosis de los oligodendrocitos y la pérdida de la MAG hacen pensar en una alteración funcional del oligodendrocito. Las placas que presentan el patrón 4 comparten con los dos primeros patrones la distribución perivenular, el crecimiento radial de la lesión y la pérdida simultánea de todas las proteínas. Sin embargo, la fragmentación del ADN en los oligodendrocitos, la importante pérdida de estas células y la falta de remielinización sugieren la existencia de una patología primaria del oligodendrocito. Este último patrón, sólo se ha descrito en los pacientes con EM primaria progresiva (EMPP).

1.4- Cuadro clínico

La característica clínica más llamativa de la EM es su gran variabilidad, 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 complejos de síntomas y signos más o menos característicos que permiten su fácil reconocimiento.

1.4.1- Formas clínicas de evolución

El curso clínico de la EM varía mucho de paciente a paciente. 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. Esta forma clínica es conocida con el nombre de EM remitente-recurrente (EMRR)⁷⁸ (figura 1). 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 nuevo⁷⁹⁻⁸⁰. Se conoce como síndrome clínico aislado (CIS) el primer episodio de disfunción neurológica altamente sugestivo de enfermedad desmielinizante. Los CIS que más típicamente sugieren la existencia de una EM son la neuritis óptica unilateral, la mielitis incompleta y un síndrome de tronco cerebral. 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^{81,82}. La tasa de brotes en las fases iniciales de la enfermedad varía según las series entre 0.8 a 1.3 brotes/año⁸¹⁻⁸². La frecuencia de los ataques tiende a disminuir con el paso del

tiempo⁸², así como el grado de recuperación de los mismos, produciéndose la aparición de secuelas neurológicas.

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)⁷⁸ (figura 1).

Tan sólo un 10-15% del total de los pacientes muestran un curso progresivo de la enfermedad, desde el comienzo de la enfermedad, recibiendo esta forma el nombre de EMPP. Finalmente, existe un número reducido de estos enfermos que pueden presentar, tras un curso progresivo, ocasionales exacerbaciones. Esta forma se conoce con el nombre de forma de EM progresiva recurrente (EMPR)⁷⁸ (figura 1).

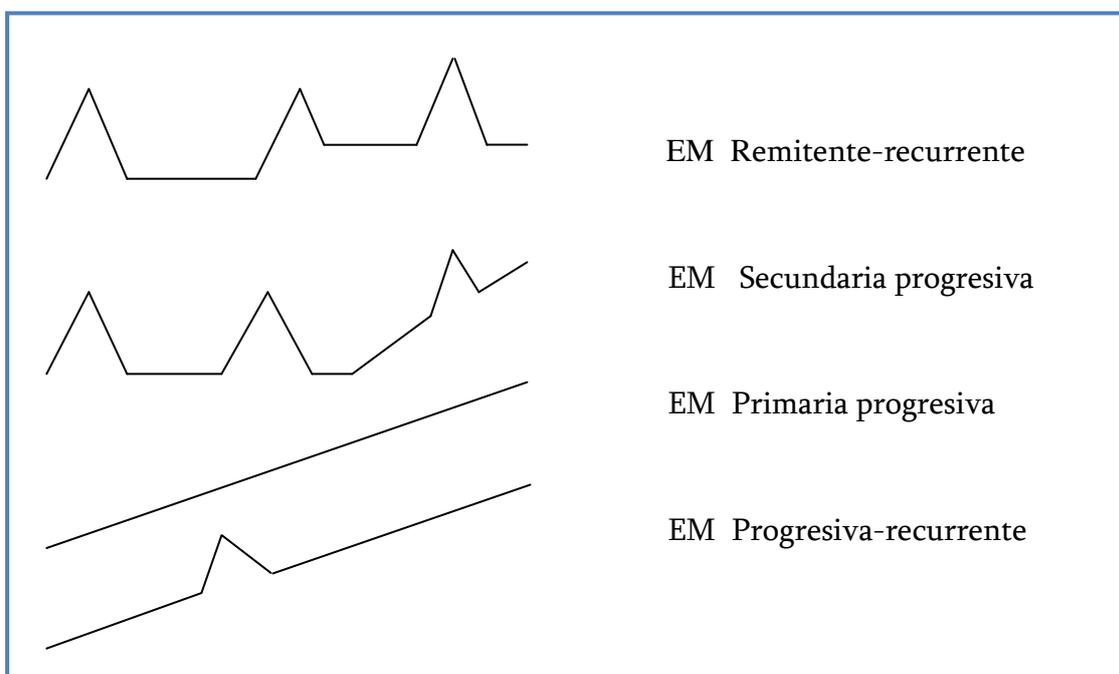


Figura 1. Formas clínicas de EM⁷⁸.

1.4.2- Síntomas y signos

La EM puede provocar cualquier síntoma de disfunción del SNC. A pesar de esta posible multiplicidad clínica, dado que las lesiones desmielinizantes muestran predilección por ciertas áreas del SNC, existen complejos de síntomas y signos más o menos típicos de la enfermedad como son la neuritis óptica, la mielitis parcial o los síndromes de tronco cerebral.

A continuación se analizarán las distintas manifestaciones clínicas que pueden aparecer en el curso de la EM, que pueden suponer el primer síntoma de la enfermedad o presentarse durante su evolución.

Síntomas sensitivos

Se presenta en aproximadamente el 90% de los pacientes a lo largo de la enfermedad, siendo la manifestación clínica inicial más frecuente (alrededor del 40%)⁸³. Son muy variados e incluyen síntomas deficitarios o negativos como son la hipoestesia y la anestesia, y síntomas irritativos o positivos como son las parestesias, disestesias y el dolor. Puede encontrarse alterada tanto la sensibilidad superficial como la profunda. En función de la localización de la lesión, los síntomas sensitivos pueden afectar a uno o dos miembros, el tronco, la cara, etc.

Síntomas motores

Las manifestaciones motoras son también habituales en el curso de la enfermedad, pero aparecen con menor frecuencia al comienzo de la misma (alrededor del 8%)⁸³. Incluyen debilidad y espasticidad, debido a la afectación de las vías motoras centrales, acompañándose de hiperreflexia y respuesta plantar extensora. Raras veces la debilidad se acompaña de atrofia, debido a la presencia de lesiones medulares que afectan al asta anterior de la médula. El patrón de la debilidad se suele manifestar en forma de monoparesia, paraparesia, hemiparesia, y, menos frecuentemente, como una tetraparesia.

Un elevado porcentaje de pacientes tienen una espasticidad moderada o grave, sobre todo en miembros inferiores. La espasticidad, aunque en ocasiones ayuda a mantener la bipedestación al bloquear las rodillas, puede llegar a ser dolorosa y muy invalidante.

En un 85% de los pacientes con EMPP la enfermedad se manifiesta en forma de paraparesia o hemiparesia espástica progresiva^{83,84}.

Neuritis óptica

Se presenta como síntoma inicial de la EM en aproximadamente un 16% de los pacientes⁸³. 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. Los síntomas visuales suelen ser unilaterales, pero pueden ser bilaterales. A la exploración, el fondo de ojo suele ser normal (neuritis óptica retrobulbar) o, menos frecuentemente, puede mostrar edema de papila (papilitis). Además, puede observarse un defecto pupilar aferente (pupila de Marcus Gunn). Tras varias semanas de evolución, puede existir palidez de papila como expresión de una atrofia óptica.

El fenómeno de Uthoff se observa en pacientes con EM y compromiso del nervio óptico, y consiste en episodios transitorios de visión borrosa en el ojo afecto coincidiendo con periodos de incremento de la temperatura corporal (fiebre, exposición solar, ejercicio físico intenso, etc.)⁸⁵.

Afectación del tronco cerebral

Supone la primera manifestación clínica en aproximadamente el 15-20% de los enfermos⁸³. Las lesiones desmielinizantes que afectan al tronco cerebral pueden producir una gran variedad de síntomas y signos, en función de las estructuras lesionadas (núcleos de pares craneales y vías nerviosas). 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. Habitualmente suele deberse a una oftalmoplejía internuclear o a una paresia del VI par craneal.

Síntomas cerebelosos

La EM afecta al cerebelo en un porcentaje elevado de pacientes, produciendo principalmente temblor, incoordinación y ataxia. Al igual que ocurre con las manifestaciones motoras, suele ser menos frecuente al inicio de la enfermedad (alrededor del 10%) y asociarse a un peor pronóstico⁸³. Después de la afectación de la vía piramidal, representa la segunda forma de presentación más frecuente en los pacientes con EMPP⁸⁴.

Disfunción urinaria, intestinal y sexual

Frecuentemente coexisten estos distintos tipos de disfunción. Las alteraciones esfinterianas y/o sexuales, como manifestaciones iniciales aisladas, son raras. Sin embargo, son una afección frecuente en el curso clínico de la enfermedad^{86,87}.

La alteración vesical puede presentar tres patrones de afectación: 1) urgencia e incontinencia miccional, como manifestación de fallo en la retención urinaria; 2) dificultad en el inicio y mantenimiento de la micción, secundaria a un fallo en el vaciado urinario; y 3) fallo mixto. La retención urinaria puede complicarse con infecciones urinarias de repetición. El estreñimiento aparece en más del 35% de los enfermos⁸⁸. La incontinencia fecal es infrecuente pero puede ser socialmente muy invalidante.

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 recibidos⁸⁷. 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.

Alteraciones neuropsiquiátricas

Varios estudios han demostrado recientemente la elevada frecuencia de los problemas cognitivos en la EM (40-60%)⁸⁹. Aunque las alteraciones cognitivas suelen ser leves o moderadas, éstas se han visto relacionadas con la pérdida de la capacidad funcional de los pacientes. Comúnmente se afectan uno o dos dominios cognitivos, siendo la memoria de evocación, la atención mantenida y el procesamiento de información acelerada, los más frecuentemente afectados⁸⁹⁻⁹². Las funciones ejecutivas y visuoespaciales también se afectan significativamente, pero en un grado menor. Las áreas menos frecuentemente alteradas son la memoria inmediata y remota, y el lenguaje. Además, los pacientes presentan fatiga cognitiva, que se refiere a la peor ejecución de las pruebas psicológicas repetidas en una misma sesión, lo que parece relacionarse con los déficits que estos enfermos presentan en la velocidad de procesamiento mental⁹¹.

Los problemas psiquiátricos son comunes entre los pacientes y están caracterizados por irritabilidad, depresión y ansiedad.

Fatiga

La fatiga es un síntoma frecuente en la EM caracterizado por la falta de energía física o mental que empeora a lo largo del día. Puede observarse en el 80% de los enfermos y es una importante causa de discapacidad⁹³. Su etiología continúa siendo desconocida. La depresión, los trastornos del sueño y el calor pueden empeorarla, al igual que otros posibles problemas médicos intercurrentes (anemia, hipotiroidismo, etc.).

Síntomas paroxísticos

Algunos pacientes con EM refieren la presencia de síntomas transitorios, de escasa duración y repetitivos. En ocasiones pueden constituir el síntoma de inicio de la enfermedad⁹⁴. 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 neurálgico en extremidades y el fenómeno de Lhermitte. Según los criterios diagnósticos de McDonald⁸⁰, si estos episodios duran más de 24 horas deben ser considerados como un brote.

1.4.3- Progresión de la discapacidad

La EM es la causa más frecuente de discapacidad no traumática entre los adultos jóvenes. La progresión de esta discapacidad es muy variable, pero en la mayoría de los pacientes es lenta. El curso primariamente progresivo se asocia con una mayor rapidez de la progresión de la discapacidad que en las formas recurrente-remitente^{83,84,95,96}. En éstas, al cabo de varios años y cuando los pacientes entran en la fase secundariamente progresiva, es cuando se acumulan la mayoría de los déficits neurológicos que los incapacitan⁹⁷. Los enfermos que debutan con más edad suelen tener un peor pronóstico y desarrollar discapacidad de forma más precoz. Estudios recientes no han confirmado los hallazgos iniciales que predecían una evolución más agresiva en los varones, en los enfermos con elevada frecuencia de brotes y en relación con determinados síntomas de inicio⁹⁸.

Con el objetivo de poder valorar la evolución clínica de los pacientes, se han desarrollado diferentes escalas cuantitativas. La más comúnmente empleada es la escala expandida del estado de discapacidad (*Expanded Disability Status Scale*, EDSS)¹⁷. Es una escala no lineal, de 20 grados del 0 al 10 con incrementos de 0.5 puntos (Anexo 1). Una puntuación de 0 se considera normal, mientras que una puntuación de 10 corresponde al fallecimiento debido a la EM. La puntuación se basa en los hallazgos exploratorios de siete sistemas funcionales (piramidal, sensibilidad, tronco cerebral, cerebelo, visual, vesical e intestinal, y mental), y en el índice de deambulación (autónoma, con apoyo uni/bilateral, limitado a silla de ruedas/cama)

(Anexo 2). En respuesta a las carencias de la EDSS, la *National Multiple Sclerosis Society Clinical Outcomes Assessment Task Force* desarrolló el *Multiple Sclerosis Functional Composite* (MSFC)⁹⁹. Este instrumento incluye, además de la valoración de la deambulación y la destreza de los miembros superiores, un test cognitivo. Para evaluar el impacto global de la enfermedad en los pacientes se han desarrollado diferentes escalas de calidad de vida, entre las más empleadas en la EM figuran: la MSQOL-54 (del inglés *Multiple Sclerosis Quality Of Life-54*)¹⁰⁰, la FAMS (del inglés *Functional Assessment of Multiple Sclerosis*)¹⁰¹ y la MSQLI (del inglés *Multiple Sclerosis Quality of Life Inventory*)¹⁰².

1.5- Diagnóstico

La EM es una enfermedad que carece de un marcador biológico específico, por lo que su diagnóstico requiere la demostración de la diseminación temporal y espacial de las lesiones desmielinizantes en el SNC, junto con la exclusión de otras patologías que pudieran justificar la clínica del enfermo.

1.5.1- Criterios diagnósticos

A lo largo del tiempo se han propuesto diferentes criterios diagnósticos en un intento por homogeneizar el diagnóstico. Inicialmente los criterios diagnósticos eran

fundamentalmente clínicos. Posteriormente se han aceptado otros en los que las exploraciones complementarias han ido cobrando cada vez un mayor peso.

Los criterios más empleados en los últimos 25 años han sido los de Poser y cols.⁷⁹. Éstos establecían tres niveles de certeza diagnóstica (EM definida, probable y posible) y se basaban en los hallazgos clínicos, exploratorios, y los resultados del análisis del LCR, y de las pruebas paraclínicas (neuroimagen y potenciales evocados (PE) fundamentalmente). Estos criterios diagnósticos exigían, para establecer el diagnóstico de EMCD, que los signos o síntomas estuvieran separados por uno o más meses, y que se atribuyeran a diferentes regiones del SNC. Si todos los síntomas y signos podían asociarse a una misma topografía, podían utilizarse las pruebas paraclínicas para demostrar la presencia de lesiones en otras áreas diferentes del SNC. La presencia de un índice de IgG elevado o bandas oligoclonales (BOC) de IgG en el LCR establecían el diagnóstico de EM definida con ayuda de laboratorio, en presencia de un solo brote. Los criterios de Poser, no obstante, no definían unas condiciones específicas para el diagnóstico de los casos de EMPP.

En el año 2001 se publicaron unos nuevos criterios diagnósticos propuestos por un grupo de expertos liderados por McDonald⁸⁰. Como ocurría con los previos, estos criterios se fundamentaban en la demostración de la diseminación de las lesiones en tiempo y espacio junto con la exclusión de otras patologías alternativas. Sin embargo, en estos nuevos criterios, se le otorgaba una gran relevancia a los

hallazgos de la RM, ya que por primera vez se admitía la posibilidad de establecer el diagnóstico de EM en pacientes con un único episodio clínico, cuando se demostraba por RM la presencia de lesiones demielinizantes en el SNC diseminadas espacial y temporalmente. Así, los criterios de McDonald permitían obtener el diagnóstico de la enfermedad en fases más tempranas. Por otro lado, estos criterios establecían unos criterios específicos para el diagnóstico de la EMPP. Posteriormente se han publicado dos revisiones de estos criterios, manteniéndose el esquema diagnóstico (tablas 1 y 2), pero modificándose las definiciones de diseminación espacial y temporal basadas en las pruebas complementarias (tablas 3 y 4)^{103,104}.

CRITERIOS DIAGNÓSTICOS DE EMRR	
PRESENTACIÓN CLÍNICA	DATOS ADICIONALES NECESARIOS
≥ 2 brotes y ≥ 2 áreas afectadas en la exploración (diseminación temporo-espacial demostrada).	Ninguno.
≥ 2 brotes y un área afectada en la exploración (diseminación temporal demostrada).	Diseminación en espacio: - Un brote en otra topografía. - Mediante pruebas complementarias.
Un brote y ≥ 2 áreas afectadas en la exploración (diseminación espacial demostrada).	Diseminación en tiempo: - Un nuevo brote. - Mediante pruebas complementarias
Un brote y un área afectada en la exploración.	Diseminación en espacio y tiempo: - Un brote en otra topografía. - Mediante pruebas complementarias.

Tabla 1. Esquema diagnóstico de EMRR recogido en los criterios de McDonald y cols. (2001)⁸⁰ y en sus sucesivas revisiones^{103,104}.

CRITERIOS DIAGNÓSTICOS DE EMPP

McDonald y cols. (2001)⁸⁰

- Deterioro neurológico progresivo sugestivo de EM

y

- LCR positivo (índice de IgG elevado y/o BOC de IgG positivas en LCR)

y

- Diseminación espacial demostrada por:

- Al menos 9 lesiones desmielinizantes en T2 en RM craneal, o
- Al menos 2 lesiones desmielinizantes en RM medular, o
- Retraso de los PEV y 4-8 lesiones desmielinizantes craneales, o menos de 4 lesiones craneales y una lesión medular demostradas mediante RM

y

- Diseminación temporal demostrada por:

- Deterioro neurológico progresivo durante 1 año, o
- Diseminación temporal demostrada por RM (nueva lesión captante de gadolinio, sin relación con la clínica del episodio inicial, en una RM craneal realizada al menos 3 meses después del 1º brote; o nueva lesión en T2 en una RM comparada con otra efectuada al menos 3 meses antes)

Polman y cols. (2005)¹⁰³

- Deterioro neurológico progresivo durante al menos 1 año

y

- Dos de los siguientes requisitos:

- RM craneal positiva (al menos 9 lesiones desmielinizantes en T2, o al menos 4 lesiones en T2 y un retraso de los PEV)
- RM medular positiva (al menos 2 lesiones desmielinizantes)
- LCR positivo (índice de IgG elevado y/o BOC de IgG positivas en LCR)

Polman y cols. (2011)¹⁰⁴

- Deterioro neurológico progresivo durante al menos 1 año

y

- Dos de los siguientes requisitos:

- Diseminación espacial a nivel cerebral demostrada por la presencia de al menos 1 lesión desmielinizante en T2 en una zona típicamente afectada en la EM (periventricular, yuxtacortical, o infratentorial)
- Diseminación espacial a nivel medular demostrada por la presencia de al menos 2 lesiones desmielinizantes en T2
- LCR positivo (índice de IgG elevado y/o BOC de IgG positivas en LCR)

Tabla 2. Diagnóstico de EMPP según los criterios de McDonald y cols. (2001)⁸⁰ y sus sucesivas revisiones^{103,104}.

En el año 2005 se publicó una primera revisión de los criterios de McDonald¹⁰³, con objeto de incorporar datos y avances obtenidos desde el 2001, clarificar algunas cuestiones y adaptarse a la práctica clínica neurológica. Los cambios principales respecto a los criterios de McDonald originales afectaban a (tablas 2-4):

- La demostración de la diseminación temporal de las lesiones
- La clarificación del uso de las lesiones medulares
- La simplificación del diagnóstico de la EMPP

Finalmente, en el año 2011, se ha publicado una última revisión de los criterios de McDonald, en la que se han simplificado los requerimientos radiológicos de diseminación temporo-espacial¹⁰⁴. Estos criterios permiten establecer el diagnóstico de EM, por primera vez, empleando un solo estudio de RM, lo que a su vez permite identificar más precozmente a los individuos afectados de esta enfermedad. Los criterios diagnósticos de EMPP también se han simplificado (tablas 2-4).

Un punto importante en el diagnóstico de esta enfermedad es la exclusión de otros procesos que puedan simular una EM, como pueden ser: la neurolúes, la neuroborreliosis, el lupus eritematoso sistémico, el síndrome de Sjögren, la sarcoidosis, ciertas enfermedades mitocondriales como la enfermedad de Leigh o la neuropatía óptica de Leber, las leucodistrofias o las enfermedades vasculares, entre otras^{2,105}.

DISEMINACIÓN ESPACIAL MEDIANTE PRUEBAS COMPLEMENTARIAS

McDonald y cols. (2001)⁸⁰

Cumplimiento de 1 de estas 2 condiciones:

- Criterios radiológicos de Barkhof y Tintoré: cumplimiento de al menos 3 de estas 4 premisas:

- Al menos 9 lesiones en T2 o al menos 1 lesión captante de gadolinio
- Al menos 1 lesión infratentorial
- Al menos 1 lesión yuxtacortical
- Al menos 3 lesiones periventriculares

- Detección de al menos 2 lesiones desmielinizantes en RM y LCR positivo (índice de IgG elevado y/o BOC de IgG positivas en LCR)

Polman y cols. (2005)¹⁰³

Cumplimiento de 1 de estas 2 condiciones:

- Criterios radiológicos de Barkhof y Tintoré: cumplimiento de al menos 3 de estas 4 premisas:

- Al menos 9 lesiones en T2 o al menos 1 lesión captante de gadolinio
- Al menos 1 lesión infratentorial
- Al menos 1 lesión yuxtacortical
- Al menos 3 lesiones periventriculares

Nota: una lesión medular contabiliza como una lesión craneal en el cómputo total de lesiones, tiene el mismo valor que una lesión infratentorial y si capta gadolinio tiene el mismo valor que una lesión craneal captante.

- Detección de al menos 2 lesiones desmielinizantes en RM y LCR positivo (índice de IgG elevado y/o BOC de IgG positivas en LCR)

Polman y cols. (2011)¹⁰⁴

Cumplimiento de los criterios radiológicos de Swanton y cols.:

- Al menos una lesión desmielinizante en al menos dos áreas del SNC que se afectan típicamente en la EM (periventricular, yuxtacortical, infratentorial y medular)

Nota: las lesiones medulares e infratentoriales sintomáticas se excluyen del cómputo de lesiones.

Tabla 3. Demostración de la diseminación espacial de las lesiones basadas en pruebas complementarias, según los criterios diagnósticos de McDonald y cols. (2001)⁸⁰ y sus sucesivas revisiones^{103,104}.

DISEMINACIÓN TEMPORAL MEDIANTE PRUEBAS COMPLEMENTARIAS

McDonald y cols. (2001)⁸⁰

Cumplimiento de 1 de estas 2 condiciones:

- Demostración de una nueva lesión captante de gadolinio, sin relación con la clínica del episodio inicial, en una RM craneal realizada al menos 3 meses después del 1º brote.
- Demostración de nueva lesión en T2 en una RM de control comparada con otra efectuada al menos 3 meses antes.

Polman y cols. (2005)¹⁰³

Cumplimiento de 1 de estas 2 condiciones:

- Demostración de una nueva lesión captante de gadolinio, sin relación con la clínica del episodio inicial, en una RM craneal realizada al menos 3 meses después del 1º brote.
- Demostración de una nueva lesión en T2 en una RM de control, realizada en cualquier momento, con respecto a otra RM de referencia realizada al menos 30 días después del 1º brote.

Polman y cols (2011)¹⁰⁴

Cumplimiento de 1 de estas 2 condiciones:

- Demostración de una nueva lesión en T2 o captante de gadolinio con respecto a una RM de referencia independientemente del momento de realización de ésta.
- Demostración de lesiones asintomáticas captantes y no captantes de gadolinio en un estudio de RM, independientemente de su momento de realización.

Tabla 4. Demostración de la diseminación temporal de las lesiones basadas en RM, según los criterios diagnósticos de McDonald y cols. (2001)⁸⁰ y sus sucesivas revisiones^{103,104}.

1.5.2- Pruebas complementarias

Disponemos de diversas pruebas complementarias que nos ayudan de un modo definitivo en el diagnóstico de la EM. Éstas son la RM, el estudio inmunológico del LCR y el análisis de los PE multimodales.

Resonancia magnética

Hoy en día, la RM es la técnica más sensible en la detección de las lesiones de la EM, ya que permite observar lesiones desmielinizantes en al menos el 95% de los pacientes con esta enfermedad¹⁰⁶. Como consecuencia de esta elevada sensibilidad, y aunque la especificidad de las lesiones detectadas no es perfecta, la RM se ha convertido en una herramienta esencial en el diagnóstico de la EM ya que, además, permite descartar otras enfermedades y evidenciar la existencia de lesiones desmielinizantes silentes, no sospechadas clínicamente.

Las placas desmielinizantes en RM generalmente son de pequeño tamaño (aproximadamente 3-6mm de diámetro) y tienen una morfología ovoidea con su eje mayor perpendicular al eje anteroposterior de los hemisferios cerebrales. Sin embargo, en ocasiones alcanzan gran tamaño debido a la confluencia de varias lesiones o a la existencia de lesiones grandes denominadas pseudotumorales. Independientemente de su estadio evolutivo, las placas desmielinizantes aparecen hiperintensas en secuencias potenciadas en T2, densidad protónica y FLAIR. Este hallazgo es, sin embargo, poco específico y sólo refleja un aumento en la

concentración tisular de agua libre, no siendo capaz de discernir si la hiperintensidad es secundaria a edema, inflamación, desmielinización, pérdida axonal, remielinización y/o gliosis. Esto explica, parcialmente, la débil correlación existente entre el volumen lesional medido en las secuencias potenciadas en T2 y el grado de discapacidad neurológica que presentan los pacientes con EM^{107,108}.

Las placas demielinizantes aparecen hipointensas en las secuencias potenciadas en T1 y son menos visibles que las detectadas en T2. Comúnmente se las denomina “agujeros negros”. Su substrato patológico varía según el tiempo evolutivo. Las placas agudas se ven hipointensas por reflejar edema y cierto grado de destrucción celular. Tras la fase aguda, la hiposeñal puede desaparecer o disminuir de tamaño. Las placas crónicas con hiposeñal en T1 son persistentes y reflejan destrucción tisular irreversible¹⁰⁹⁻¹¹⁰.

Las lesiones desmielinizantes tienen predilección a situarse en determinadas áreas del SNC como la sustancia blanca periventricular, el cuerpo caloso, la sustancia blanca yuxtacortical, los nervios ópticos, el tronco cerebral y la médula espinal. En esta última, las lesiones adoptan una morfología ovoidea con su eje mayor orientado craneocaudalmente, habitualmente sin sobrepasar dos cuerpos vertebrales en su longitud, y con una predisposición a situarse de forma periférica afectando a los cordones posteriores. La médula cervical y la dorsal alta son las más frecuentemente afectas¹¹¹.

La utilización del contraste paramagnético (gadolinio) intravenoso (IV) permite detectar aquellas placas con actividad inflamatoria. El gadolinio puede verse debido a que en esa zona hay una ruptura de la BHE produciéndose una extravasación del contraste al parénquima¹¹². La captación de contraste IV suele durar 1 ó 2 meses, aunque en un reducido porcentaje de casos su duración es superior (generalmente inferior a 4 meses)¹¹³.

Se han propuesto diversos criterios radiológicos de diseminación espacial de las lesiones para el diagnóstico de la EMRR (tabla 3). La última revisión de los criterios de McDonald¹⁰⁴ ha incluido los criterios radiológicos descritos por Swanton y cols.¹¹⁴ debido a su elevada sensibilidad y moderada especificidad¹¹⁴⁻¹¹⁷, siendo más sencillos y menos restrictivos que los propuestos por Barkhof y Tintoré^{118,119}. Estos criterios exigen la existencia de al menos una lesión desmielinizante en al menos dos áreas del SNC que se afectan típicamente en esta enfermedad (periventricular, yuxtacortical, infratentorial y medular)¹¹⁴.

También se han propuesto diversos criterios radiológicos de diseminación temporal de las lesiones para el diagnóstico de la EMRR (tabla 4). Los nuevos criterios diagnósticos también permiten establecer el concepto de diseminación temporal por RM de forma más sencilla¹⁰⁴. La gran novedad con respecto a los criterios previos, se basa en la posibilidad de establecer la diseminación temporal con

un sólo estudio de RM, en el que se identifiquen simultáneamente lesiones desmielinizantes asintomáticas captantes y no captantes de gadolinio. Igualmente, la diseminación temporal puede apoyarse en la detección de una nueva lesión hiperintensa en secuencias T2 o de una nueva lesión captante en una RM de control, independientemente del tiempo transcurrido con respecto a la RM de referencia.

Examen de líquido cefalorraquídeo

El análisis del LCR proporciona una importante información en la EM. El LCR puede considerarse como una laguna del espacio extracelular dentro del SNC. Los solutos, tales como la IgG y la albúmina, que se hallan en el espacio extracelular del SNC, penetran en los 150cc de LCR y se recambian unas tres veces al día. 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 del LCR en la EM es que pone de manifiesto el carácter inflamatorio de esta enfermedad. Por otro lado, su análisis también es de gran ayuda en el diagnóstico diferencial, descartando otras patologías.

El perfil del LCR de los pacientes con EM se caracteriza por presentar como rasgos generales¹²⁰:

- Aspecto transparente y presión normal.
- Pobre celularidad (0-5 células/mm³). 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/mm³. Recuentos superiores a 50 células/mm³ son excepcionales y deberían hacer dudar del diagnóstico. Las células son de predominio linfocitario, principalmente linfocitos T.

- Proteínas totales normales. En torno al 20% de los enfermos la cifra de proteínas totales está aumentada, siendo excepcional alcanzar niveles superiores a los 100 mg/dl. La glucosa del LCR de los pacientes con EM no se encuentra alterada.

Estudio inmunológico del LCR

El examen inmunológico del LCR es un estudio de gran valor en la EM ya que nos permite comprobar cómo las alteraciones del SNC, presentes en esta enfermedad, tienen un origen inflamatorio. De las diversas técnicas existentes, las más importantes son aquellas que detectan una respuesta humoral inmune dentro del SNC. Esto es debido a que la mayoría de los pacientes con EM tienen un incremento de la síntesis intratecal de IgG. Para su detección, se utilizan tanto métodos cuantitativos como cualitativos:

- Métodos cuantitativos: estos métodos calculan la producción local de IgG en el SNC a través de diversas fórmulas con las que se separa el componente producido dentro del SNC (síntesis intratecal) del procedente del suero¹²¹⁻¹²⁴. Uno de los índices más empleados es el de Tibbling y Link o índice de IgG. Éste se calcula dividiendo el cociente de IgG LCR/suero por el cociente de albúmina

LCR/suero¹²¹. Un valor superior a 0.78 es anormal y se observa en aproximadamente un 85% de los pacientes con EMCD¹²⁵.

- Método cualitativo: tiene una sensibilidad mayor que los anteriores^{120,126-128}.

Este método permite detectar la presencia de BOC de IgG en el LCR y el suero de los pacientes. El isoelectroenfoque es la técnica más sensible para la detección de estas bandas^{129,130}, separando las inmunoglobulinas en función de sus diferentes puntos isoeléctricos. Se pueden encontrar varios tipos de patrones de BOC (figura 2)¹²⁰:

- Patrón policlonal en el suero y el LCR: no se identifican BOC. Este patrón es el que aparece en personas sanas.
- Patrón de BOC idéntico en el suero y el LCR (patrón “en espejo”): se detectan algunas BOC que se distinguen del fondo policlonal, iguales en el suero y el LCR. Traduce una respuesta humoral sistémica con paso de inmunoglobulinas del suero al LCR. No hay respuesta intratecal.
- Patrón de BOC en el suero y el LCR con bandas adicionales en este último: denota la existencia de una respuesta sistémica y, además, intratecal. Este patrón está presente en casos de EM y de infecciones del SNC.
- Patrón de BOC exclusivamente en el LCR: existe una respuesta intratecal aislada. Este es el patrón típico de la EM.

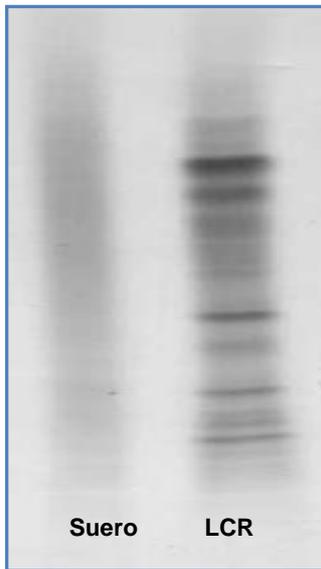


Figura 2. Bandas oligoclonales presentes en el LCR y ausentes en suero

- Patrón monoclonal en el suero y el LCR: se aprecian en el suero y en el LCR de 3 a 5 bandas espaciadas regularmente. No existe síntesis intratecal. Este patrón es típico de las paraproteinemias.

Potenciales evocados

Aunque en los últimos años han perdido protagonismo por el auge de la RM, son una técnica útil para el diagnóstico de la EM. Son sensibles, objetivos, fácilmente reproducibles y capaces de detectar lesiones clínicamente silentes, confirmando la multifocalidad lesional. Son exploraciones que miden la velocidad de conducción de distintas vías nerviosas tras la aplicación de un estímulo sensorial. Tienen una morfología, latencia y amplitud características para cada modalidad.

La anomalía más frecuente de los PE de pacientes con EM es el enlentecimiento de la conducción nerviosa, con prolongación de las latencias e interlatencias de las ondas, hallazgos que reflejan la desmielinización característica de esta enfermedad. En ocasiones, además, se añaden alteraciones en la amplitud y anomalías morfológicas de las ondas, con distorsión e incluso abolición de las mismas. Sin embargo, estas alteraciones no son específicas de la EM, por lo que deben ser valoradas junto con la clínica del paciente y el resto de las pruebas complementarias.

En función del estímulo empleado, existen diferentes modalidades de PE: visuales (PEV), auditivos de tronco (PEAT), somatosensitivos (PESS) y motores (PEM).

- PEV: traducen 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. 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 afectación¹³¹.

- PEAT: reflejan la conducción a lo largo de las vías auditivas en respuesta a un estímulo sonoro. Se pueden distinguir cinco ondas:

- Onda I: corresponde al potencial generado por el nervio acústico.
- Onda II: corresponde al núcleo coclear.
- Onda III: corresponde al núcleo olivar superior.
- Onda IV: corresponde al lemnisco lateral.
- Onda V: corresponde al colículo inferior.

Las ondas II-V, al originarse en diferentes estructuras del tronco del encéfalo, pueden alterarse en la EM. Estos potenciales son menos sensibles que los PEV, resultando normales hasta en el 50-60% de los pacientes con sintomatología de tronco cerebral¹³².

- PESS: son útiles para explorar las vías que discurren por los cordones posteriores medulares hasta el cortex sensitivo, empleando una estimulación eléctrica transcutánea. La estimulación puede realizarse en los miembros superiores o inferiores. Sin embargo, al igual que ocurre con los PEAT, su sensibilidad es modesta, siendo normales hasta en el 20-30% de los pacientes sintomáticos¹³².

- PEM: permiten evaluar la situación de la vía piramidal, utilizando una estimulación magnética transcraneal capaz de generar una diferencia de potencial que despolarice las neuronas de la corteza motora. La sensibilidad de estos potenciales asimismo es reducida (55%)¹³³.

1.6- Tratamiento

El tratamiento de la EM se puede dividir fundamentalmente en tres grandes apartados:

- Tratamientos con base inmunológica
- Tratamientos sintomáticos
- Tratamiento rehabilitador

1.6.1- Tratamientos con base inmunológica

En los últimos 15 años se han experimentado cambios importantes en el tratamiento de la EM, gracias a los estudios sobre la patogenia de la enfermedad. La mejor comprensión de los mecanismos inmunológicos implicados en la EM ha suscitado el importante papel de las terapias con base inmunológica. Dentro de este grupo de tratamientos se distinguen:

- Tratamiento de los brotes
- Tratamientos modificadores de la enfermedad

Tratamiento de los brotes

Se recomienda tratar aquellos brotes que cursan con síntomas discapacitantes o muy molestos para el paciente, con el objetivo de acelerar la recuperación. 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 oral¹³⁴⁻¹³⁶. Estas dosis de metilprednisolona también se han empleado por vía oral, aunque con resultados dispares¹³⁷⁻¹³⁸. 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. Se ha observado una mejoría moderada o importante en el 42% de los tratados comparados con el 6% observado en el grupo placebo¹³⁹.

Tratamientos modificadores de la enfermedad

En los últimos años, diversos fármacos han demostrado importantes efectos beneficiosos en los pacientes con EM, modificando la historia natural de la enfermedad:

- Disminución de la tasa de brotes
- Reducción de la progresión de la discapacidad
- Reducción del acúmulo de lesiones en la RM

Los fármacos de primera línea para el tratamiento de la EMRR son los interferones- β (INF- β) y el acetato de glatiramero (AG). También puede utilizarse el natalizumab y el fingolimod como tratamiento inicial en pacientes con EMRR de comienzo agresivo. Ante un fracaso terapéutico con los tratamientos de primera línea, se pueden emplear también estos dos últimos fármacos, y la mitoxantrona cuando han fallado todos los anteriores. Otra alternativa terapéutica, reservada para pacientes que no han respondido a estos tratamientos, la constituyen otros fármacos inmunosupresores (azatioprina, metotrexate, ciclofosfamida), las inmunoglobulinas IV, los corticoides y la asociación de medicamentos (figura 3).

Varios INF- β (Avonex[®], Betaferon[®], Extavia[®])^{4,6} y el AG⁷ han demostrado retrasar la tasa de conversión a EMCD en pacientes tratados desde el primer brote, por lo que actualmente está aprobada su utilización en pacientes que hayan sufrido un CIS en los que el diagnóstico de EM puede realizarse mediante las pruebas paraclínicas.

En las formas de EMSP con brotes se utilizan de primera línea el INF- β 1b (Betaferon[®], Extavia[®]) y el INF- β 1a de administración subcutánea (SC) (Rebif[®]). Si no se obtiene respuesta con estos INF- β , se puede intentar el tratamiento con fármacos inmunosupresores (mitoxantrona, azatioprina, metotrexate y ciclofosfamida).

Desgraciadamente, en la actualidad no se dispone de ningún tratamiento que haya demostrado eficacia en las formas EMPP.

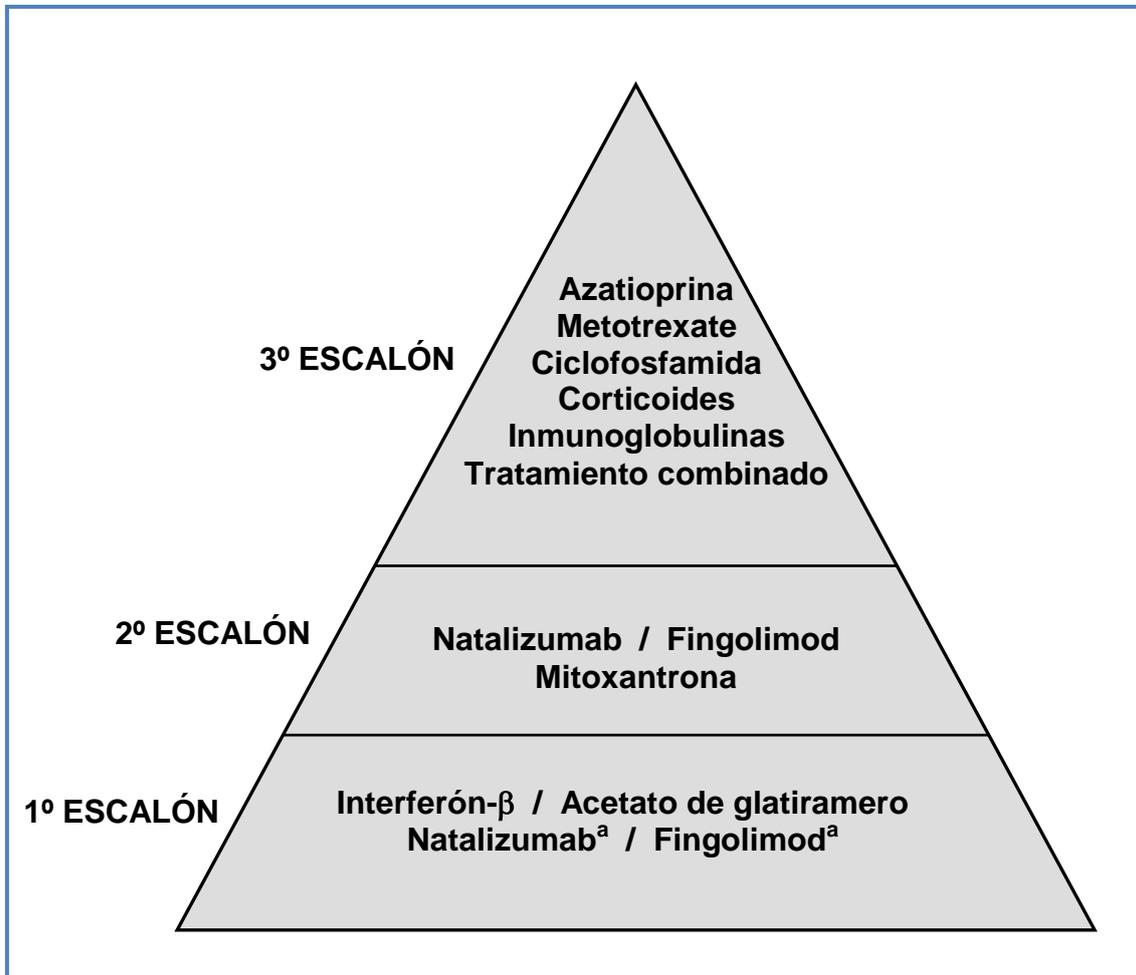


Figura 3. Escalado terapéutico en el tratamiento de la EMRR (a: fármacos de 1ª línea en el caso de EMRR de comienzo agresivo).

Interferones

El INF-β es el primer agente que ha demostrado eficacia para modificar la historia natural de la EM en diversos ensayos clínicos, aleatorizados y doble ciego. Ha demostrado ser útil en las formas EMRR y en las formas EMSP con actividad

inflamatoria clínica (brotes), así como en retrasar la conversión a EMCD cuando se emplea precozmente tras un primer episodio desmielinizante. Sin embargo, no se han obtenido resultados beneficiosos en pacientes con EMPP.

Se trata de un fármaco desarrollado mediante ingeniería genética. El mecanismo de acción del INF- β es pleotrópico con un amplio rango de efectos. Si bien, su acción principal es antiinflamatoria reduciendo a nivel de la sangre periférica la expresión de las moléculas del CMH de clase II, disminuyendo la liberación de citoquinas proinflamatorias (Th1), aumentando la de antiinflamatorias (Th2), y preservando la integridad de la BHE¹⁴⁰.

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

- INF- β 1b (Betaferon[®], Extavia[®]): 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 SC cada 48 horas¹⁴¹⁻¹⁴³. En pacientes con EMSP ha mostrado un retraso en la progresión de la enfermedad entre 9 y 12 meses¹⁴⁴. Además, un reciente estudio ha revelado como su utilización precoz, después del primer episodio, retrasa la aparición del segundo brote⁶.

- INF- β 1a (Avonex[®]): este INF- β 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 RM¹⁴⁵⁻¹⁴⁷. Es el primer tratamiento que demostró retrasar la conversión a EMCD cuando era empleado precozmente en pacientes que habían sufrido un CIS⁴.

- INF- β 1a (Rebif[®] 22-44): es un fármaco igual que el anterior. La vía de administración es SC y se pueden utilizar dos dosis: 22 y 44 μ g, 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. Los resultados de RM también fueron muy favorables¹⁴⁸. Se realizó una ampliación del estudio anterior hasta un seguimiento de 4 años demostrando que el beneficio clínico y radiológico se mantenía durante ese periodo de seguimiento, con unos mejores resultados en el grupo que recibía la dosis de 44 μ g¹⁴⁹. Rebif[®] también parece ser capaz de retrasar la tasa de conversión a EMCD en pacientes tratados desde el primer brote⁵.

A excepción de casos puntuales el tratamiento con INF- β es seguro y en general bien tolerado. Los efectos secundarios suelen ser leves o moderados¹⁵⁰. Las

reacciones locales en el punto de inyección son frecuentes, pudiendo producir necrosis cutánea¹⁵¹. Un elevado porcentaje de pacientes padecen un síndrome pseudogripal que suele desaparecer en los primeros meses de tratamiento¹⁵². Sus síntomas se pueden minimizar con la escalada de dosis, añadiendo paracetamol, antiinflamatorios no esteroideos o dosis bajas de esteroides. Otros efectos adversos menos frecuentes incluyen: aumento de la espasticidad, trastornos menstruales y depresión, entre otros¹⁵⁰. Las alteraciones de laboratorio habituales son leucopenia e hipertransaminemia, y menos frecuentemente la presencia de anticuerpos antitiroideos¹⁵⁰. La hepatotoxicidad severa es rara, aunque se han descrito casos de lesión hepática grave¹⁵³.

Acetato de galtiramero (Copaxone®)

Se trata de un oligopéptico 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^{154,155}. Se administra diariamente, por vía SC, una dosis única de 20mg.

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 ¹⁵⁶⁻¹⁵⁸. Recientemente, el estudio PRECISE ha demostrado como Copaxone® también es

capaz de retrasar la conversión a EMCD en pacientes tratados desde el primer brote⁷. Por el contrario, no ha demostrado eficacia en las formas EMSP ni EMPP.

Habitualmente este fármaco es bien tolerado^{157,159}. Sus principales efectos secundarios son alteraciones cutáneas leves en el punto de inyección, y una reacción sistémica postinyección, transitoria e impredecible, consistente en enrojecimiento facial, disnea, dolor torácico, palpitaciones y ansiedad presente en un 15% de los pacientes¹⁵⁶⁻¹⁵⁷.

Natalizumab (Tysabri®)

Es un anticuerpo monoclonal recombinante dirigido contra la subunidad $\alpha 4$ de las integrinas, moléculas de adhesión expresadas en la superficie de todos los leucocitos, a excepción de los neutrófilos. Este fármaco, al unirse a la integrina $\alpha 4\beta 1$, imposibilita la interacción con su receptor en la superficie del endotelio vascular, lo que dificulta la migración de los linfocitos activados a través de la BHE¹⁶⁰. Se administra una dosis de 300mg por infusión IV, cada 4 semanas.

Dos ensayos clínicos han demostrado su eficacia en pacientes con EMRR. El estudio AFFIRM comparó natalizumab frente a placebo, y observó una reducción de la tasa de brotes del 68%, de la posibilidad de progresión, así como de la carga lesional en T2 y del número de lesiones activas en RM¹⁶¹. Posteriormente, el estudio SENTINEL comparó natalizumab frente a placebo en pacientes que tomaban

Avonex® y que siguieron tomándolo durante el estudio. Se detectó una reducción de la tasa de brotes del 54%, así como de la posibilidad de progresión a 2 años¹⁶².

Se han descrito varios casos de leucoencefalopatía multifocal progresiva (LMP) asociados al tratamiento con natalizumab. En una revisión de 3.000 pacientes que habían recibido el fármaco, el riesgo de desarrollar una LMP tras una exposición media de 17.9 meses se estimó en 1/1.000¹⁶³. Es, por tanto, esencial la monitorización exhaustiva de los pacientes con EM que reciben este tratamiento. Otros efectos adversos observados durante la utilización de natalizumab son reacciones alérgicas, edema periférico, fatiga y ansiedad^{161,162}.

Fingolimod (Gylenia®)

Es un análogo de la esfingosina que altera la migración linfocitaria provocando un secuestro de los linfocitos en los ganglios linfáticos. Se administra diariamente, por vía VO, una dosis única de 0.5mg.

Ha demostrado ser eficaz en pacientes con EMRR disminuyendo la tasa de brotes, la progresión de la discapacidad, así como la carga lesional en T2 y la aparición de lesiones captantes de gadolinio¹⁶⁴. Recientemente, un estudio ha revelado la superioridad de este fármaco frente a Avonex® en la reducción de la tasa de brotes y la actividad en RM en pacientes con EMRR¹⁶⁵.

Entre sus efectos secundarios se han descrito casos de nasofaringitis, infecciones por virus herpes, alteraciones en la frecuencia cardiaca, disfunción hepática y edema macular.

Otros agentes

- 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^{166,167}. Se ha aprobado su uso para formas agresivas de EMRR o de EMSP en las que hayan fracasado otras terapias¹⁶⁸. No obstante, debe tenerse en cuenta su potencial efecto cardiotóxico que limita su uso crónico, así como la posibilidad de desarrollar neoplasias hematológicas¹⁶⁸. Se administra por vía IV trimestralmente.

- Azatioprina: 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 paciente. Se dispone de una revisión de la Cochrane que concluye que azatioprina podría

emplearse como una alternativa al tratamiento con INF- β al reducir la tasa de brotes en pacientes con EM¹⁶⁹. Entre sus efectos adversos más frecuentes figuran la leucopenia y la hepatotoxicidad reversibles, y los efectos sistémicos (náuseas, vómitos, fiebre). Sin embargo, su efecto secundario más temido es un aumento teórico del riesgo de cáncer tras 10 años de tratamiento continuo¹⁷⁰.

- Metotrexate: es un inmunosupresor análogo del ácido fólico con efectos inhibitorios sobre la generación de mediadores de la inflamación. Se administra una dosis semanal por VO. Existe un ensayo aleatorizado, doble ciego, controlado con placebo que sugería que este inmunosupresor parecía reducir la progresión en las formas EMSP y EMPP¹⁷¹. Sin embargo, no ha demostrado un beneficio claro en el EDSS y arroja los mejores resultados en las medidas de la función de las extremidades superiores. Existe, además, una revisión de la Cochrane que aprecia una tendencia no significativa de este agente para la reducción del número de brotes y la progresión¹⁷². Sus efectos adversos incluyen: diarrea, estomatitis ulcerosa, disfunción hepática, alopecia, pancitopenia y neumonitis intersticial, entre otros.

- Ciclofosfamida: es un agente alquilante con propiedades antimetabólicas e inmunosupresoras. Los resultados de los ensayos clínicos reflejan que el régimen de inducción única no produce remisiones duraderas, mientras que la terapia IV intermitente parece disminuir la actividad de la enfermedad en las

formas con actividad inflamatoria clínica (brotes) o radiológica (lesiones captantes de gadolinio)¹⁷³. Posibles efectos secundarios son: náuseas, vómitos, alopecia, alteraciones menstruales e infertilidad, cistitis hemorrágica y aumento del riesgo de neoplasias (leucemia, cáncer vesical). Debido a su potencial toxicidad, este fármaco se reserva para pacientes con EM rápidamente progresiva que no han respondido a otros tratamientos.

- Cladribina: es un inmunosupresor análogo de la adenosina autorizado, en la actualidad, para la leucemia de células peludas. En el estudio CLARITY se evaluó la eficacia de una pauta de dosis acumulada de cladribina VO frente a placebo en pacientes con EMRR. Como resultados se observó una disminución del 58% en la tasa de brotes, junto con una reducción de la progresión de la discapacidad y de la actividad en RM¹⁷⁴. Entre los efectos secundarios más comunes figuran: linfopenia, cefalea y nasofaringitis. Actualmente este fármaco está pendiente de aprobación para su uso en pacientes con EM.

- Otros muchos tratamientos se encuentran en fase de ensayo clínico, entre los que destacan: laquinimod, teriflunomida, daclizumab, alentuzumab, terapia con células madre, etc.

1.6.2- Tratamientos sintomáticos

Muchos pacientes con EM van a ir desarrollando a lo largo de su enfermedad síntomas y secuelas que pueden mejorar o aliviarse con diversos tratamientos.

Espasticidad

Existen diversos fármacos que han demostrado ser útiles en disminuir la espasticidad de estos enfermos. Entre ellos tenemos el baclofén, la tiazinidina o el dantroleno¹⁷⁵. En ocasiones puede ser necesaria la infiltración con toxina botulínica en aquellos músculos más afectados¹⁷⁶. Recientemente se ha demostrado la eficacia de los cannabinoides en el tratamiento de la espasticidad en pacientes con EM¹⁷⁷. En los casos severos la bomba de liberación intratecal de baclofén ha mostrado una eficacia sustancial.

Fatiga crónica

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

Dolor neuropático

Síntoma que produce una importante disminución en la calidad de vida. Se trata con fármacos anticomociales como la carbamacepina, la gabapentina, o la pregabalina, así como con antidepresivos tricíclicos.

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. En casos seleccionados puede administrarse toxina botulínica intravesical. La hipofunción del detrusor puede tratarse con cateterismos intermitentes y si no es posible, sondaje permanente¹⁷⁸.

Estreñimiento

Su tratamiento incluye una dieta rica en fibra y abundante ingesta de líquidos. Se pueden utilizar, además, laxantes, supositorios de glicerina o enemas ocasionales.

Disfunción sexual

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

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.

1.6.3- Tratamiento rehabilitador

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.¹⁷⁹. Si la discapacidad evoluciona se pueden introducir progresivamente ayudas técnicas o adaptaciones para las actividades de la vida diaria. Un buen programa de rehabilitación proporciona beneficios tanto físicos como psicológicos. Este tipo de tratamientos son especialmente útiles en mejorar la calidad de vida de los pacientes con EM¹⁸⁰.

2.- FISIOPATOGENIA DE LA EM

2.1- Etiología de la EM

Los numerosos estudios realizados sobre la EM sugieren que esta enfermedad estaría desencadenada por un factor ambiental, probablemente un agente infeccioso, que actuando sobre un individuo con una determinada susceptibilidad genética, desencadenaría una respuesta autoinmune responsable de la lesión del SNC^{181,182}. Sin embargo, los intentos por aislar un gen único o un microorganismo han fracasado.

2.1.1- Factores genéticos

Los estudios epidemiológicos han establecido que la susceptibilidad a la EM se debe en parte a factores genéticos. Al compararse con la población general, los familiares de primer grado de pacientes con EM muestran un aumento de 20-40 veces el riesgo de padecer esta enfermedad (tasa del 3-5%)^{36,50}. Los estudios en gemelos han demostrado de forma consistente que la tasa de concordancia entre gemelos monocigóticos es mayor que entre gemelos dicigóticos (40% y 3-5% respectivamente), lo que proporciona una evidencia adicional de la predisposición genética a padecer esta enfermedad. Por otro lado, la elevada tasa de discordancia

incluso entre gemelos monocigóticos (en torno al 60%), hace más probable que la EM tenga una herencia poligénica¹⁸³ e indica la presencia de un factor ambiental.

Los estudios genéticos de ligamiento y asociación alélica han identificado como principal determinante genético para la EM a la región II del CMH, localizado en el brazo corto del cromosoma 6¹⁸⁴⁻¹⁸⁷. Los primeros trabajos realizados en pacientes caucasianos de descendencia noreuropea, ya mostraban la asociación entre la EM y el alelo HLA-DR2, y su correspondiente haplotipo DRB1*1501-DQA1*0102-DQB1*0602^{54,55}. No se conoce con certeza el mecanismo subyacente a esta asociación, pero se cree que puede guardar relación con la capacidad de estas moléculas para presentar antígenos a las células T reactivas. También existían algunas descripciones de asociación de la EM con el HLA-DR3 en Cerdeña¹⁸⁸, y con el HLA-DR4 en áreas del Mediterráneo y las Islas Canarias¹⁸⁸⁻¹⁹⁰. Estudios realizados en la última década sugieren, además, que regiones del HLA de clase I (HLA-A*02, HLA-A*03) también tendrían un papel primario en modificar la susceptibilidad a padecer EM^{191,192}.

No obstante, no ha sido posible hasta el advenimiento de los GWAS, la identificación de un mayor número de genes de susceptibilidad de la EM. Hasta la fecha se han realizado once GWAS para detectar aquellos posibles genes implicados en la génesis de la EM, identificándose más de 50 *loci* diferentes⁵⁶⁻⁶⁷. Muchas de las variantes alélicas identificadas se localizan en genes con funciones inmunológicas importantes: 1) implicados en la actividad de citocinas (*CXCR5*, *IL2RA*, *IL7R*,

IL12RB1, IL12A, IL12B, IRF8, TNFRSF1A, TNFRSF14, entre otros); 2) implicados en la actividad de moléculas co-estimuladoras (*CD37, CD40, CD58, CD80, CD86, entre otros*); y 3) implicados en la actividad de moléculas de transducción de señal (*CBLB, GPR65, MALT1, RGS1, STAT3, TAGAP*, entre otros). Además, la mayoría de estas variantes alélicas se asocian con otras enfermedades autoinmunes. Asimismo, algunos de los *loci* identificados codifican moléculas relacionadas con alguno de los posibles factores ambientales asociados a la EM. Este es el caso de la vitamina D y los genes *CYP27B1, CYP24A1*⁶². Por otro lado, se ha observado que se identifican nuevos genes de susceptibilidad de la enfermedad, conforme se amplía el número de sujetos analizados en los GWAS. Esto es especialmente aplicable para aquellos genes no localizados en el CMH, cuyo efecto sobre el riesgo a padecer EM parece más modesto¹⁹³. Por tanto, es de esperar que en el futuro, conforme se examinen mayores cohortes de individuos, continúen identificándose nuevas variantes alélicas de riesgo para el desarrollo de EM^{67,193}. Finalmente, también se ha subrayado la importancia de realizar análisis específicos posteriores que confirmen que las variantes alélicas de susceptibilidad identificadas en estos estudios GWAS no son simplemente marcadores en un desequilibrio de ligamiento con la variante alélica causal real¹⁹⁴.

2.1.2- Factores ambientales

Aunque queda demostrado que los factores genéticos juegan un papel importante en la determinación del riesgo de padecer EM, su contribución parece no

exceder el 30-40%^{51,52}, lo que refuerza la necesidad de considerar la participación de un factor ambiental en el desarrollo de la EM. Los estudios epidemiológicos han aportado diversas evidencias que apoyan la hipótesis ambiental en la génesis de esta enfermedad:

- La prevalencia varía alrededor del mundo.
- La incidencia ha cambiado en periodos cortos de tiempo, lo que se explica mejor por un factor ambiental que genético.
- Se han descritos focos y epidemias.
- La susceptibilidad a la EM puede modificarse por la emigración en edades críticas (desde los primeros años de vida hasta la pubertad).

Los factores ambientales que, con mayor evidencia parecen participar en el riesgo a padecer EM son: la vitamina D, el tabaquismo y distintos agentes infecciosos.

La exposición solar y la vitamina D se han propuesto como los mecanismos por los que la latitud incide en el riesgo de EM. Diversos estudios observacionales han demostrado una asociación inversa entre las concentraciones de vitamina D y el riesgo de EM^{195,196}. Sin embargo, los estudios de intervención (ensayos clínicos aleatorizados doble ciego controlados con placebo) presentan datos no concluyentes¹⁹⁷⁻¹⁹⁸. Existen datos que sugieren que la vitamina D tiene un papel importante en el SNC mediante la respuesta de los linfocitos Th1¹⁹⁹.

Diversos estudios han puesto de manifiesto como el consumo de tabaco se asocia a un mayor riesgo a padecer EM^{200,201} y una forma más agresiva de la enfermedad con el desarrollo de mayor discapacidad²⁰².

La exposición a agentes infecciosos, durante la infancia y/o adolescencia, parece la hipótesis ambiental más plausible. Esta hipótesis parte de muy antiguo. Pierre Marie en 1884, fue el primero en proponer que un agente infeccioso era el responsable de causar la enfermedad. Se cree que la exposición a determinados microorganismos durante edades tempranas constituye un factor de riesgo importante para el desarrollo de la EM²⁰³. Durante las últimas décadas se han identificado como potenciales agentes patógenos a diversos virus como los coronavirus, los retrovirus, los virus del grupo herpes (en especial el VHS-6, VEB, VVZ), hongos como diferentes especies de *Candida*²⁵ y bacterias como la *Chlamydia pneumoniae*²⁰⁴⁻²⁰⁵. Las evidencias de un agente infeccioso en la etiología de la EM proceden de diversas fuentes:

- Estudios epidemiológicos: por el patrón geográfico de su distribución y la existencia de focos y epidemias.
- Estudios serológicos: incremento del título de anticuerpos en suero y LCR contra diferentes microorganismos en pacientes con EM en comparación con individuos sanos.
- Estudios patológicos: detección de secuencias víricas en células del SNC y del LCR de sujetos enfermos.

-Estudios en modelos animales: desmielinización inducida en el SNC tras la inoculación intracerebral del virus de Theiler.

Los principales mecanismos que explicarían como las infecciones pueden desencadenar la EM son el mimetismo molecular y la estimulación a través de superantígenos virales o bacterianos:

-**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 determinados péptidos antigénicos o 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, y los linfocitos T activados que atravesaran la BHE, reconocerían también los autoantígenos homólogos de la mielina del SNC, dando lugar a un ataque inmunomediado contra éstos²⁰⁶⁻²⁰⁷.

-**Superantígenos:** son proteínas virales o 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^{207,208}.

2.2- Mecanismo patogénico

La patogenia de la EM se desconoce, aunque parece ser de índole inmunológica. La EM se caracteriza por ser una enfermedad inflamatoria desmielinizante del SNC que produce secuelas neurológicas permanentes debido a la destrucción de la mielina y de los axones². Se desconoce todavía si los fenómenos inmunológicos se inician en la periferia o en el SNC, si son un evento primario o secundario del SNC. No obstante, aunque la causa principal de la enfermedad no se ha identificado, se están empezando a comprender bastantes aspectos de su etiopatogenia. El estudio de los modelos animales de enfermedades neuroinflamatorias autoinmunes, y en especial de la EAE, ha sido de gran utilidad para estudiar los mecanismos patogénicos implicados²⁰⁹.

La teoría más ampliamente aceptada actualmente postula que los pacientes con una susceptibilidad genética para la EM poseen células T CD4⁺ autorreactivas en sangre con especificidad para determinados antígenos presentes en el SNC. Entre los antígenos candidatos que se han implicado destaca la proteína básica de la mielina (MBP), la proteína proteolipídica (PLP) y la glicoproteína mielínica de los

oligodendrocitos (MOG)²¹⁰⁻²¹¹. También se han descrito otros antígenos no relacionados con la mielina como la proteína astroglial S100 β y las proteínas de *shock* térmico de 65 y 70 Kda^{212,213}. En algún momento, estas células T autorreactivas son activadas en la periferia por un factor sistémico o local, a través de un mecanismo de mimetismo molecular (epítomos compartidos por el autoantígeno del SNC y los posibles agentes infecciosos)²¹⁴, o por una estimulación a través de superantígenos virales o bacterianos²⁰⁸.

Posteriormente se produce el paso de los linfocitos T CD4⁺ activados al SNC (figura 4). Para ello, se precisa la interacción de las moléculas de adhesión expresadas en la superficie de estas células con las del endotelio vascular. Las células T activadas segregan citocinas proinflamatorias tales como la IL-1, el TNF- α y el INF- γ , que provocan un aumento en la expresión de las moléculas de adhesión endotelial: E-selectinas, molécula de adhesión intracelular 1 (ICAM-1) y molécula de adhesión vascular 1 (VCAM-1). Las selectinas endoteliales establecen enlaces débiles con los ligandos linfocitarios y, junto con las quimioquinas CCL19 y CCL21, producen la ralentización y el rodamiento de los linfocitos sobre la pared vascular en la dirección del flujo sanguíneo. Este deslizamiento permite el cambio conformacional 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 estables²¹⁵. Esta unión permitirá el paso de las células inmunitarias a través

del endotelio, principalmente a nivel de las vénulas postcapilares. Las células T tendrán que atravesar dos membranas basales, lo que llevan a cabo por dos mecanismos: la unión a diversos subtipos de 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)²¹⁶.

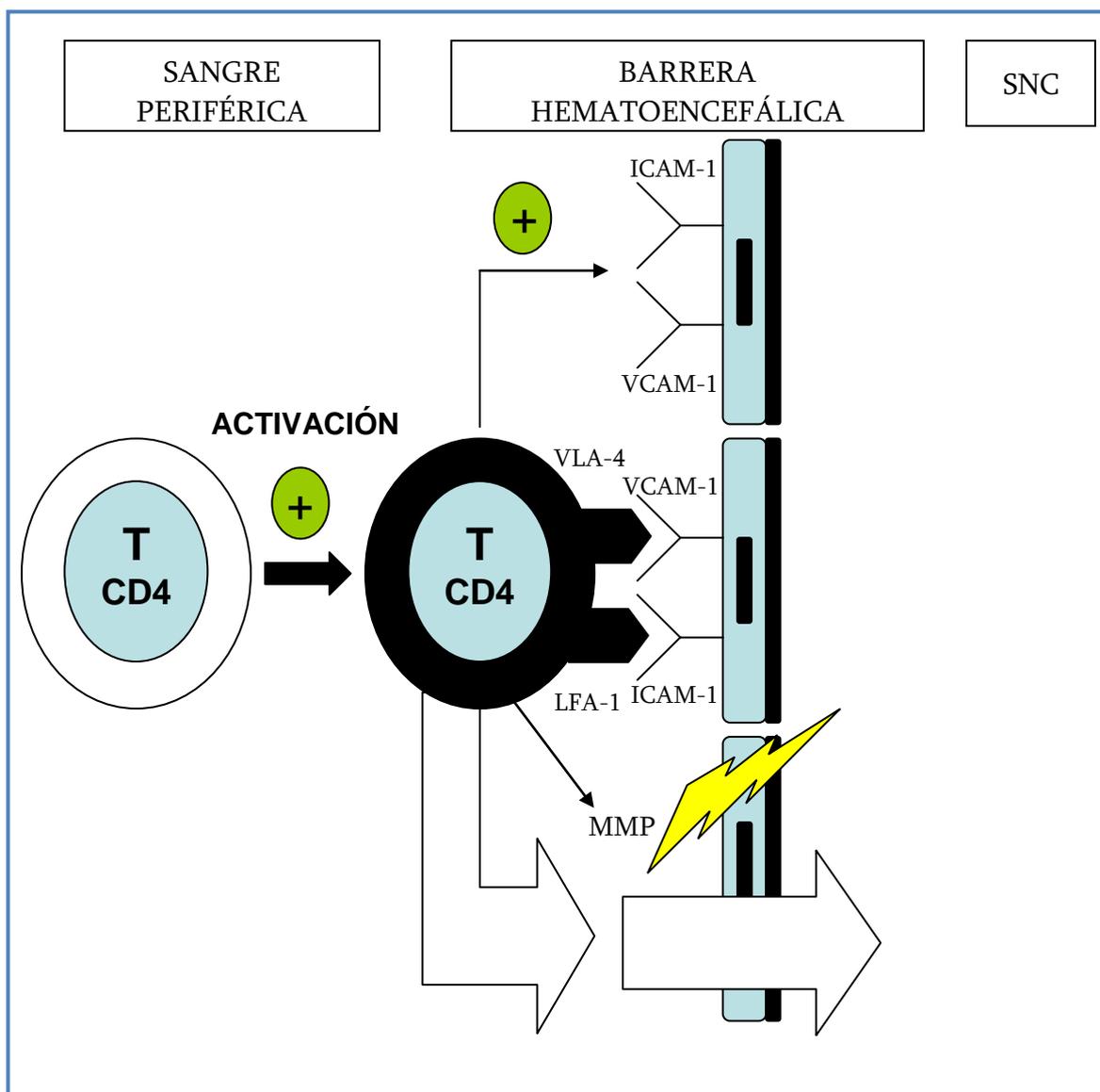


Figura 4. Paso de linfocitos TCD4⁺ activados a través de la barrera hematoencefálica hacia el SNC.

Una vez que los linfocitos T activados entran en el SNC, se dirigen al lugar de la inflamación a través de un gradiente de concentración de moléculas quimiotácticas, llamadas quimiocinas, producidas de forma abundante en las lesiones inflamatorias²¹⁷. La fuente de quimiocinas en las lesiones inflamatorias del SNC son los macrófagos, la microglía y los astrocitos²¹⁸.

En el SNC, los linfocitos T CD4⁺ autorreactivos tienen que ser reestimulados o, en caso contrario, mueren o abandonan el SNC. Así, el linfocito activado encontrará a una célula presentadora de antígeno (célula dendrítica, macrófago o microglía) que expresa en su superficie el antígeno causante de la EM presentado por el CMH de clase II (figura 5). Al ser reestimulados, aquellos linfocitos T que son de fenotipo colaborador CD4⁺ tipo 1 (Th1) producen citocinas proinflamatorias (TNF- α , INF- γ , IL-1, IL-2, IL-12) y quimioquinas, que inducen la proliferación clonal de las células T, activan los macrófagos y la microglía, y producen un incremento de la expresión de moléculas de adhesión endoteliales, aumentando la permeabilidad de la BHE y permitiendo un mayor paso de linfocitos y monocitos (figura 5). Los macrófagos y la microglía secretan mediadores neurotóxicos, como el TNF- α , el óxido nítrico, MMPs y radicales libres de oxígeno que contribuyen a dañar la mielina y el axón²⁰⁷. De forma paralela, existen linfocitos T CD4⁺ colaboradores tipo 2 (Th2) que liberan citocinas antiinflamatorias (IL-4, IL-5, IL-10 e IL-13) que tienden a disminuir el estado proinflamatorio del sistema inmune²⁰⁷, pero que además inducen

la activación y proliferación de células B (figura 5). Las células B se diferencian a células plasmáticas y secretan anticuerpos, que a su vez activan el sistema del complemento y estimulan la opsonización por parte de los macrófagos^{206,219} (figura 5). En este sentido, existen evidencias de una respuesta inmunológica humoral anormal en el LCR de los pacientes con EM, con activación de linfocitos B, expansión de un grupo seleccionado de células plasmáticas y síntesis intratecal de IgG, demostrada por la presencia de las características bandas oligoclonales de IgG detectadas en el LCR de la mayoría de los pacientes.

La participación de las células CD8⁺ en la patogenia de la EM, y en especial en la lesión de la mielina, el axón y el oligodendrocito es cada vez más evidente. Las células dendríticas que expresan CMH de clase I, presentarían el antígeno a los linfocitos CD8⁺ activándolos. La importancia de las células T CD8⁺ se pone de manifiesto por diversos hallazgos: los pacientes con EM tienen una expansión clonal de células CD8⁺ en sangre, LCR y parénquima cerebral, independientemente del estadio de la enfermedad, aunque se desconocen los epítomos que reconocen estas células²²⁰⁻²²¹; en los infiltrados de las lesiones de EM existe un claro predominio de células CD8⁺²²²; la lesión axonal se correlaciona mejor con el número de linfocitos T CD8⁺ que con el número de linfocitos T CD4⁺²²³; en ratones con deficiencia de moléculas del CMH de tipo I no se produce lesión axonal tras la inducción de la EAE

²²⁴.

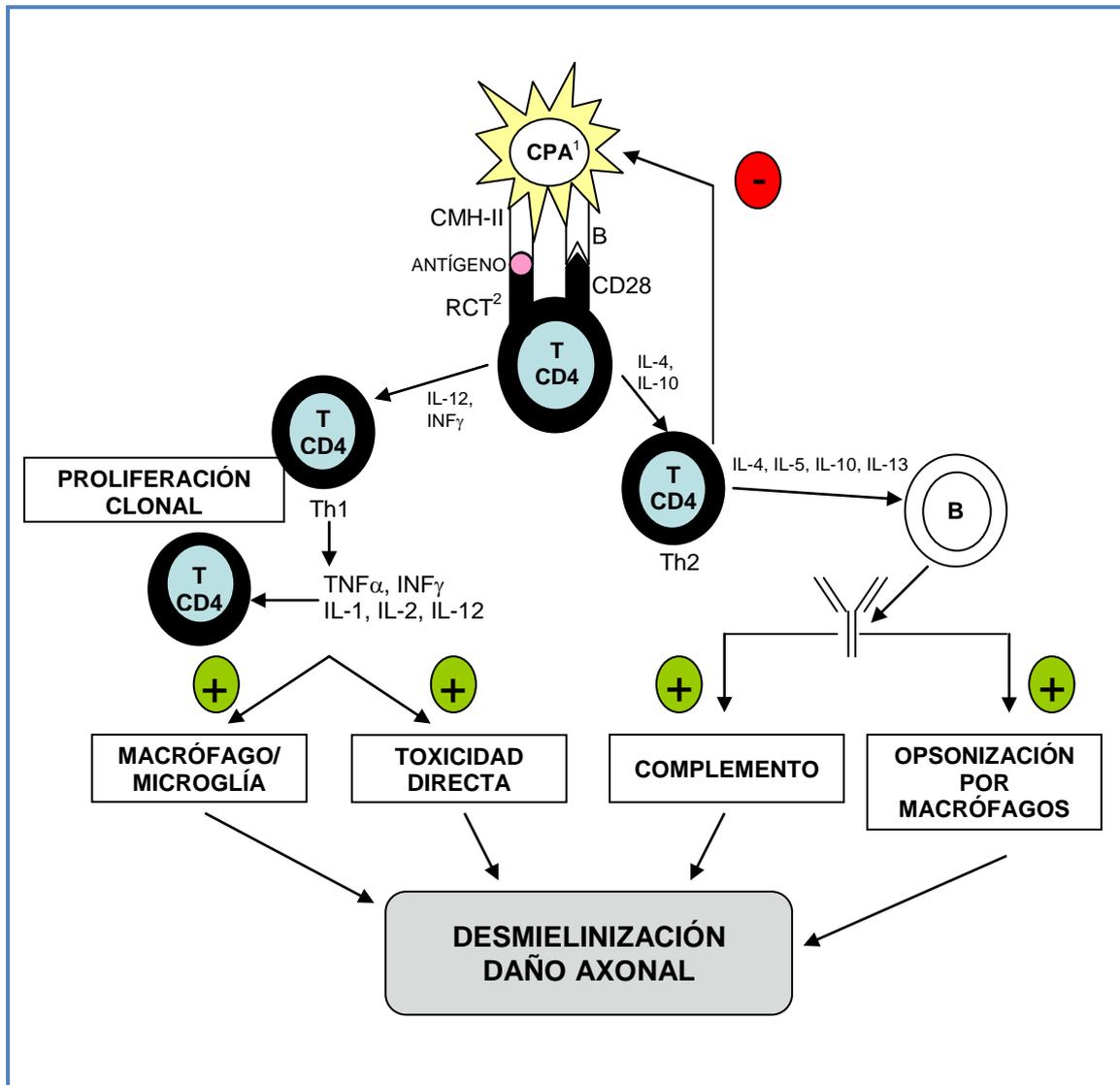


Figura 5. Activación de la célula T en el SNC inducida por autoantígeno. Desarrollo del proceso que conduce a la desmielinización y daño axonal (1: célula presentadora de antígeno; 2: receptor de célula T).

Recientemente se ha descrito la implicación de las células T CD4⁺ colaboradoras tipo 17 (Th-17) en la fisiopatología de la EM. Estas células, una vez activadas, secretan IL-17 promoviendo, entre otras, la movilización de neutrófilos.

Diversos hallazgos como el incremento de las células Th-17 en el LCR de pacientes con EMRR durante el brote, su presencia en porcentajes relativamente altos en las lesiones desmielinizantes, la alta capacidad de estas células para activarse y proliferar en comparación con las células extraídas de individuos sanos, así como su gran capacidad para atravesar la BHE y promover una potente respuesta inflamatoria con el reclutamiento de monocitos y neutrófilos a los focos lesionales, apoyan el papel patogénico de las células Th-17 en la EM, a pesar de no estar todavía clara su relevancia en este proceso^{225,226}.

Además de los mecanismos que inducen la activación de los linfocitos T en la inflamación, existen otros que tratan de frenar su activación excesiva, como el que desarrollan las células CD4⁺CD25⁺Fox3 reguladoras o células Treg. 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 Treg en sangre periférica en comparación con individuos sanos²²⁷.

2.2.1- Desmielinización

Los oligodendrocitos son los responsables de la formación y mantenimiento de la mielina en el SNC. En el sistema nervioso periférico esta función la desarrolla la célula de Schwann. En la sustancia blanca normal del SNC, la mielina es el

componente principal. Cada capa de mielina es elaborada alrededor de un segmento del axón por arrastre en espiral desde una única prolongación del oligodendrocito. Esto da lugar a un internodo de mielina con cada terminación delimitada por un nódulo de Ranvier. Como los oligodendrocitos tienen varias prolongaciones, a diferencia de la célula de Schwann, cada uno puede formar varios segmentos internodales de mielina en el mismo axón o en axones diferentes.

Se postulan diferentes hipótesis sobre cómo se produce la destrucción de las vainas de mielina y de los oligodendrocitos, que incluirían la inflamación celular y humoral, así como una patología primaria de los mismos.

Mecanismos celulares

Entre los mecanismos celulares se postula que podrían existir mecanismos de citotoxicidad directa mediados por los linfocitos T CD8⁺ y las células T $\gamma\delta$ que no tienen restricción CMH. Estas células están presentes en las lesiones de EM y podrían ser responsables de la lisis directa de la mielina y los oligodendrocitos^{222,228}.

La desmielinización puede ocurrir también como un efecto secundario del daño inducido por factores solubles como, por ejemplo, el TNF- α liberado por las células T activadas, los macrófagos y la microglía, que se encuentra en elevadas concentraciones en las placas de pacientes con EM²²⁹⁻²³¹. La concentración de TNF- α en el LCR de enfermos con EM se ha correlacionado con la progresión y severidad de

la enfermedad²³¹. Los linfocitos T activados también producen TNF- β que induce apoptosis en cultivos de oligodendrocitos y nuevamente se ha encontrado en altas concentraciones en las lesiones de EM²³¹⁻²³². Otro grupo de factores solubles liberados por los linfocitos T citotóxicos son las perforinas que mediante la formación de poros en la membrana del oligodendrocito inducen un aumento del calcio intracelular y apoptosis de las células²³³. Por otro lado, la microglía y los macrófagos estimulados también producen sustancias potencialmente tóxicas como MMPs, óxido nítrico y radicales libres de oxígeno, además del TNF- α , que podrían desempeñar un papel en la desmielinización, actuando directamente contra la mielina o los oligodendrocitos²³⁴.

Mecanismos humorales

Los linfocitos B penetran en el SNC a través de la BHE dañada en estadios tempranos de la enfermedad y sintetizan anticuerpos intratecalmente. En este sentido, la desmielinización la producirían los anticuerpos mediante la activación del complemento que pondría en marcha el complejo ataque de membrana, la atracción de los macrófagos y microglía que liberarían sustancias mielotóxicas, y la opsonización de la mielina que favorecería su fagocitosis por estas células²³⁵⁻²³⁶.

Patología primaria del oligodendrocito

La desmielinización puede ser consecuencia de defectos primarios de los oligodendrocitos. Se han propuesto diferentes mecanismos para tratar de explicar la

inestabilidad metabólica de los oligodendrocitos inducida por una infección viral o por defectos en la regulación de los genes responsables de la síntesis de la mielina que originarían una oligodendropatía presente en el patrón 3 de las lesiones de EM^{76,77}.

2.2.2- Remielinización

En las lesiones de EM se produce remielinización a través de las células progenitoras de los oligodendrocitos (OPCs) que aparecen en elevado número rodeando las lesiones desmielinizantes. Los oligodendrocitos maduros son células con poca capacidad para proliferar²³⁷.

En la remielinización sólo se llegan a producir finas vainas de mielina, dando lugar a las llamadas *shadow plaques* o placas sombreadas. Este término se acuñó para definir un área, habitualmente perivascular, formada por delgadas láminas de mielina que se tiñen de manera pálida y que se sitúa en la sustancia blanca intacta o rodeando el borde externo de una placa de desmielinización²³⁸.

La remielinización no es homogénea, variando en función de diversos factores. Algunas placas se remielinizan en su totalidad, mientras que otras lo hacen de forma reducida. El grado de remielinización depende del momento de formación de la placa y de su localización. Si ésta se forma en fases iniciales de la enfermedad, la remielinización será mayor que si lo hace en estadios avanzados^{239,240}.

La remielinización puede resultar incompleta por diferentes motivos. La depleción de OPCs debida a los episodios repetidos de desmielinización²⁴¹, así como el bloqueo en la diferenciación de estas células progenitoras parecen estar implicados en este hecho^{242,243}. Ciertos factores microambientales pueden inhibir la migración de las OPCs a la lesión, bloquear su maduración y producción de mielina dificultando la remielinización. También, la hiperplasia astrocitaria, presente en las lesiones de EM, podría provocar una barrera física que impediría la migración de las células progenitoras o la llegada de factores tróficos favorecedores de la remielinización, lo que favorecería la remielinización incompleta. Sin embargo, recientes estudios han demostrado como los astrocitos reactivos pueden producir factores favorecedores de la remielinización que promueven la migración de las OPCs, su proliferación y diferenciación en las áreas de inflamación y desmielinización aguda^{244,245}.

Además, existe una gran variabilidad interindividual en el grado de remielinización. Al comienzo de la enfermedad algunos pacientes tienen las OPCs preservadas mayoritariamente, mientras que otros las han perdido de manera pronunciada. En los primeros se puede esperar una remielinización rápida y completa, no así en los segundos. Estas diferencias interindividuales podrían justificarse, entre otros, por factores genéticos²⁴⁶.

2.2.3- Daño axonal

Además de la desmielinización, en la EM también se produce daño axonal. Diversos estudios han demostrado que la pérdida axonal constituye un aspecto clave en la patogenia de esta enfermedad y sugieren que es el principal determinante de la discapacidad neurológica progresiva que desarrollan los pacientes.

El interrogante sobre si el fenómeno de la neurodegeneración es primario o secundario a la inflamación, o si se trata de dos fenómenos independientes aún no está aclarado²⁴⁷. La presencia de células B y T CD8⁺ apoya la naturaleza primariamente inflamatoria de la EM ya que, aunque en otras enfermedades consideradas como puramente degenerativas del SNC, como la enfermedad de Alzheimer, se han encontrado linfocitos T ligados al fenómeno de degeneración neuronal, no se ha detectado una respuesta inflamatoria asociada a células B ni una infiltración persistente de linfocitos T CD8⁺ ²⁴⁸. 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 desmielinización²⁴⁹. Sin embargo, recientemente un estudio ha mostrado una pobre correlación entre la pérdida axonal

y la carga de lesiones desmielinizantes, lo que sugiere que la transección axonal en las placas desmielinizantes no es el mecanismo exclusivo de daño axonal²⁵⁰.

Lo que sí sabemos es que la pérdida axonal se produce desde fases tempranas de la enfermedad. Esto ha sido ampliamente demostrado a través de estudios anatomopatológicos y mediante la aplicación de las modernas técnicas de RM, en especial de la transferencia de magnetización y la espectroscopia por RM. En cuanto a los estudios patológicos, en las lesiones activas que aparecen en estadios iniciales de la EM, se han observado depósitos de la proteína precursora del amiloide (proteína marcadora de lesión axonal), así como la presencia de los ovoides característicos de los axones que han sufrido recientemente una transección^{69,251}. Respecto a las nuevas técnicas de RM, los estudios mediante transferencia de magnetización han mostrado una reducción de su ratio en lesiones desmielinizantes y en la sustancia blanca aparentemente normal de pacientes con EM, desde fases tempranas de la enfermedad²⁵². Este ratio ofrece una valoración indirecta de la concentración de mielina y axones en el parénquima cerebral, y se reduce ligeramente con el edema, pero de forma más intensa con la desmielinización y especialmente con la pérdida axonal²⁵³. Por su parte, la espectroscopia por RM ha puesto de manifiesto la existencia de una reducción de la concentración global de N-Acetil-aspartato (metabolito casi exclusivo de neuronas y axones) en el parénquima cerebral de pacientes en estadios iniciales de la enfermedad, lo que avala la presencia de lesión axonal precoz^{254,255}.

Sin embargo, los mecanismos patogénicos de la destrucción axonal y los defectos en su regeneración en la EM son complejos y no se conocen bien. Las hipótesis más plausibles apuntan a una confluencia de diversos mecanismos entre los que figuran^{249,256-258} :

- el ataque inmunológico directo sobre el axón por linfocitos T CD8⁺ o por macrófagos y microglía.

- el ambiente inflamatorio acompañante, implicándose factores solubles como citocinas, anticuerpos, el óxido nítrico, enzimas proteolíticas, y radicales libres producidos por la células inflamatorias activadas y por las células gliales.

- la falta de soporte trófico del axón por parte de la mielina.

- la acumulación de astrocitos que dificulta la regeneración axonal.

- la expresión individual de determinados genes relacionados con la respuesta del axón a la inflamación y la desmielinización que condicionen una determinada susceptibilidad a la pérdida axonal y un defecto en su regeneración en determinados pacientes.

3.- LINGO1

3.1- Generalidades

LINGO1 (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 axonal²⁵⁹⁻²⁶⁸. Estos efectos han despertado un creciente interés en el estudio de su posible implicación en la patogenia de distintas enfermedades neurológicas, y en concreto en las enfermedades desmielinizantes del SNC, cuyo paradigma es la EM, debido a su posible acción sobre los fallos en la remielinización y regeneración axonal. De igual manera, el bloqueo de su actividad podría representar una posible opción terapéutica en la EM al favorecer la remielinización completa de las lesiones²⁶⁸⁻²⁷², previniendo además el desarrollo de la degeneración axonal derivada de la falta del soporte trófico ejercido por parte de la mielina y promoviendo la regeneración de los axones dañados^{268,269,273}.

3.2- Estructura y función de LINGO1

LINGO1 es una glicoproteína transmembrana específica del SNC identificada en la superficie celular de neuronas, oligodendrocitos y OPCs^{263,264,267}. La glicoproteína LINGO1 está compuesta por 614 aminoácidos y pertenece a la familia de proteínas con unidades ricas en repeticiones de leucina (LRR) ya que contiene un gran dominio extracelular con unidades LRR junto con un dominio tipo inmunoglobulina, y una pequeña región intracelular citoplasmática (figura 6)²⁶³. LINGO1 es codificada por el gen *LINGO1* (OMIM 609791, Gene Identity 84894) localizado en el cromosoma 15q24.3²⁷⁴.

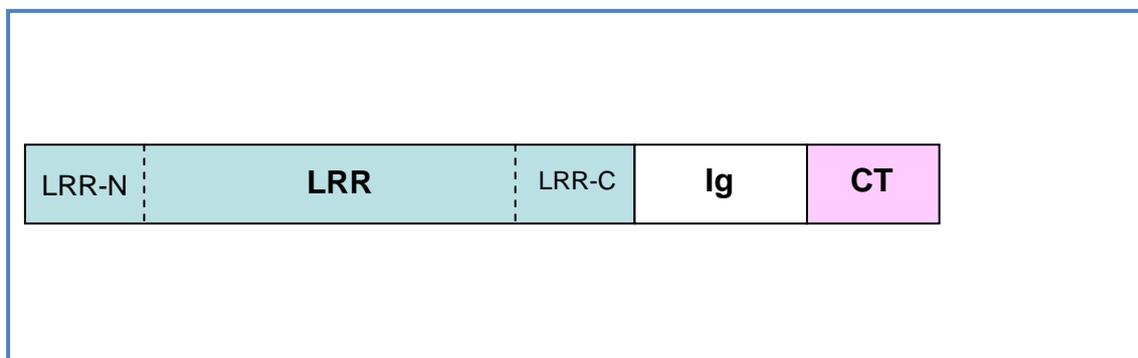


Figura 6. Estructura de LINGO1 (LRR: región rica en repeticiones de leucina con sus correspondientes zonas N-terminal y C-terminal; Ig: dominio inmunoglobulina; y CT: región celular citoplasmática con C-terminal).

A nivel de la superficie neuronal, LINGO1 interacciona simultáneamente con otras proteínas, a través de su dominio extracelular con unidades LRR, formando

parte del complejo del receptor Nogo (NgR)²⁵⁹. Inicialmente se identificaron como proteínas correceptoras, el receptor de unión del ligando Nogo-66 y el receptor de baja afinidad de neurotrofinas (p75)²⁵⁹. Sin embargo, la limitada expresión de p75, sólo en determinadas poblaciones de neuronas, así como su temporal expresión durante el desarrollo, sugirió la existencia de otras proteínas correceptoras integrantes del NgR. Así se identificó a la proteína TROY, también conocida como TAJ^{260,261}. Dicha proteína pertenece a la misma familia que los receptores de proteína TNF, como el p75. El NgR se encuentra implicado en la inhibición del crecimiento y regeneración axonal mediado por proteínas asociadas a la mielina²⁵⁹⁻²⁶¹. Hasta la fecha se han identificado tres proteínas inhibitorias localizadas en la membrana más exterior de la mielina, en estrecho contacto con el axón mielinizado, capaces de interactuar con NgR para evitar el crecimiento axonal: Nogo A, MAG y la glicoproteína de mielina oligodendroglial (OMgp). La principal vía de señalización que se activa tras la unión de estas proteínas inhibitorias a NgR es la de la guanosina trifosfatasa (GTPasa) RhoA (del inglés *Ras homolog family member A*), teniendo como efecto final una estabilización del citoesqueleto, colapso del cono de crecimiento y bloqueo del crecimiento axonal. En ausencia de LINGO1, la sola presencia del receptor de unión del ligando Nogo-66 y de p75 es insuficiente para inducir este efecto, requiriendo la presencia de LINGO1²⁵⁹. Este hecho pone de manifiesto el papel central desempeñado por LINGO1 en la inhibición de la regeneración axonal. Se ha observado una recuperación funcional y aumento en la

integridad de los axones en la EAE inducida por MOG con el uso de antagonistas de LINGO1²⁶⁹.

LINGO1 también se encuentra presente en la superficie de oligodendrocitos y OPCs, donde ha demostrado tener un efecto inhibitorio sobre su maduración y la formación de mielina a través de una activación de la GTPasa RhoA^{262,267,268}. Hasta la fecha no se conoce la proteína que se une a LINGO1 en la superficie oligodendroglial y que inicia este proceso. Recientemente se ha demostrado que, al igual que ocurre en las neuronas, LINGO1 se expresa en la superficie de los oligodendrocitos junto a p75, proteína que modula su actividad inhibitoria²⁷⁵. Se ha descrito la existencia de un incremento en la expresión de LINGO1 en las OPCs presentes en las lesiones desmielinizantes de necropsias de pacientes con EM²⁶⁸. Por otro lado, estudios en ratones *knockout* para LINGO1 han puesto de manifiesto un comienzo más precoz de la mielinización de los axones del SNC y una mayor resistencia al desarrollo de la EAE inducida por MOG^{264,269}. Además, varios trabajos en modelos experimentales de desmielinización y remielinización han demostrado una inducción de la diferenciación de OPCs y de la remielinización mediante antagonistas de LINGO1²⁶⁹⁻²⁷².

Estudios recientes han demostrado como LINGO1, a través de su pequeña región citoplasmática, puede unirse al receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR) y modular la vía de señalización de la fosfatidilinositol-3- kinasa (FI3K-Akt),

involucrada en los procesos de crecimiento y supervivencia celular^{265,268,276,277}. En este contexto, se ha observado en neuronas dopaminérgicas de modelos animales de enfermedad de Parkinson como LINGO1 presenta un efecto regulador a la baja sobre la fosforilación de la proteína kinasa B (PKB/Akt), lo que conduce a una menor supervivencia neuronal²⁶⁵.

Finalmente, Fu y cols. han demostrado, en células ganglionares de retina de modelos animales de glaucoma, la interacción de LINGO1 con el receptor de neurotrofina tirosina kinasa B (TrkB) regulando negativamente esta vía de señalización celular lo que conduce también a una disminución en la supervivencia de este grupo de neuronas^{266,278,279}.

3.3- Papel del polimorfismo genético de *LINGO1* en la fisiopatogenia de la EM

En el genoma humano existen un gran número de genes polimórficos. El polimorfismo genético se define como la presencia de diferentes variantes de un mismo gen (alelos) en una población, de las cuales la más rara tiene una frecuencia mayor del 1%. En algunas últimas descripciones, no se tiene en cuenta este porcentaje de frecuencia mínima exigida para el alelo más raro. Los polimorfismos genéticos más frecuentes son los polimorfismos de una sola base o polimorfismos de

un solo nucleótido (*single nucleotide polymorphisms*, SNPs), que pueden aparecer en un gen de forma aislada o combinada. Los SNPs constituyen hasta el 90% de todas las variaciones genómicas humanas, y aparecen aproximadamente cada 100 a 300 bases a lo largo del genoma humano. Los SNPs que se localizan dentro de una secuencia codificante pueden modificar o no la cadena de aminoácidos que producen, se llaman SNPs no-sinónimos a los primeros y SNP sinónimos a los segundos (o mutación silente). Los SNPs que se encuentran en regiones no codificantes pueden tener consecuencias en el proceso de traducción, sobre todo en procesos como el *splicing*, la unión a factores de transcripción o modificando la secuencia de ácido ribonucleico (RNA) no codificante. En este sentido, estos SNPs pueden influir significativamente en la expresión de un gen. La existencia de estos polimorfismos genéticos tiene varias implicaciones clínicas. En los últimos años se han realizado múltiples estudios intentando encontrar la relación entre tales polimorfismos y el riesgo para desarrollar diversas enfermedades, determinar el diferente grado de respuesta a un tratamiento, etc. Los métodos para determinar los distintos genotipos se basan en las técnicas de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) o más recientemente PCR en tiempo real, los polimorfismos en la longitud de fragmentos de restricción (RFLP) y secuenciación. Estas técnicas permiten clasificar a un sujeto como homo o heterocigoto para los distintos alelos del gen analizado. Últimamente en epidemiología genética los GWAS, los análisis del exoma y los estudios de secuenciación de nueva generación mediante la secuenciación completa de los genes o incluso de los genomas de diferentes individuos, permiten examinar la

asociación de los SNPs a enfermedades o caracteres concretos. Estos análisis resultan de especial interés en el estudio de enfermedades multigénicas, como es el caso de la EM.

Se han descrito hasta la fecha 517 SNPs diferentes dentro del gen *LINGO1* (OMIM 609791, Gene Identity 84894; coordenadas: 77905369-77988490) (www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/SNP). En la mayoría de ellos, la variante alélica más rara presenta una frecuencia inferior al 1%, tratándose por tanto de variantes raras. En otros casos, todavía las frecuencias alélicas de determinados SNPs están pendientes de estudio. En el caso de los SNPs rs9652490 (coordenada: 77963887) y SNPs rs11856808 (coordenada: 77972770), localizados ambos en el intrón 3, la frecuencia de sus distintos alelos es superior al 1%, variando según la etnia estudiada (tabla 5). Así, en Europa la variante alélica rs9652490 A aparece en el 80% de la

rs11856808

Posición: 77972770

ACCTTGCTGCATATGTTGTTAGAACA [C/T] GTTTGGGTGACTTTCTGAGTGAGAG

rs9652490

Posición: 77963887

TGCCCCGGGGCAGAGTGAAGCTAGGC [A/G] GGGAGGAAGCCCCTTGGGAGAGAG

Tabla 5. Características de los SNPs *rs1185808* y *rs9652490* del gen *LINGO-1*.

población y la variante alélica G en el 20% (figura 7). Respecto al SNP rs11856808, la frecuencia de aparición de sus variantes alélicas en la población europea son: rs11856808 C: 63%; y rs11856808 T: 37% (figura 8) (www.1000genomes.org).

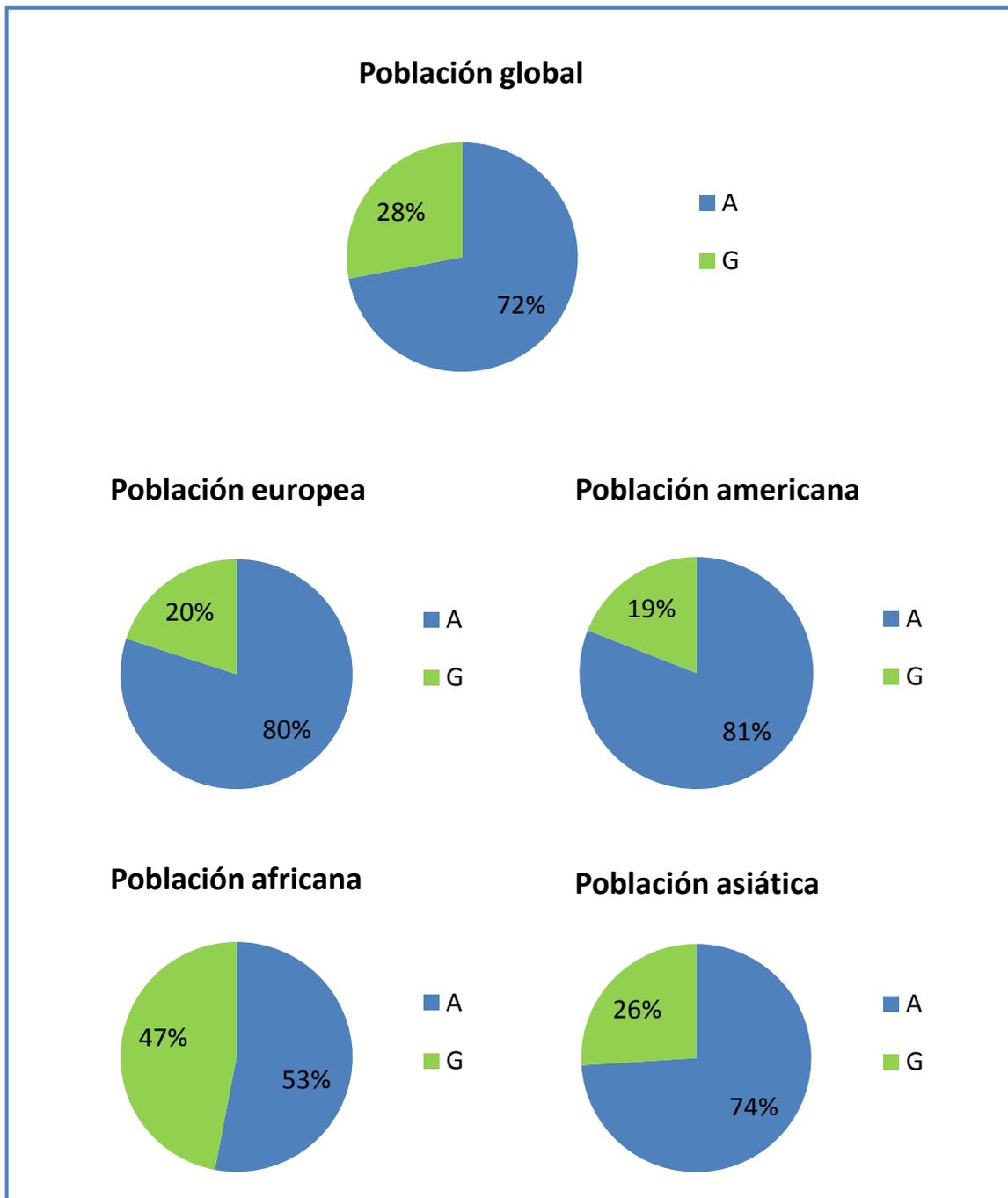


Figura 7. Frecuencia de las variantes alélicas de *LINGO1* rs9652490 (A/G).

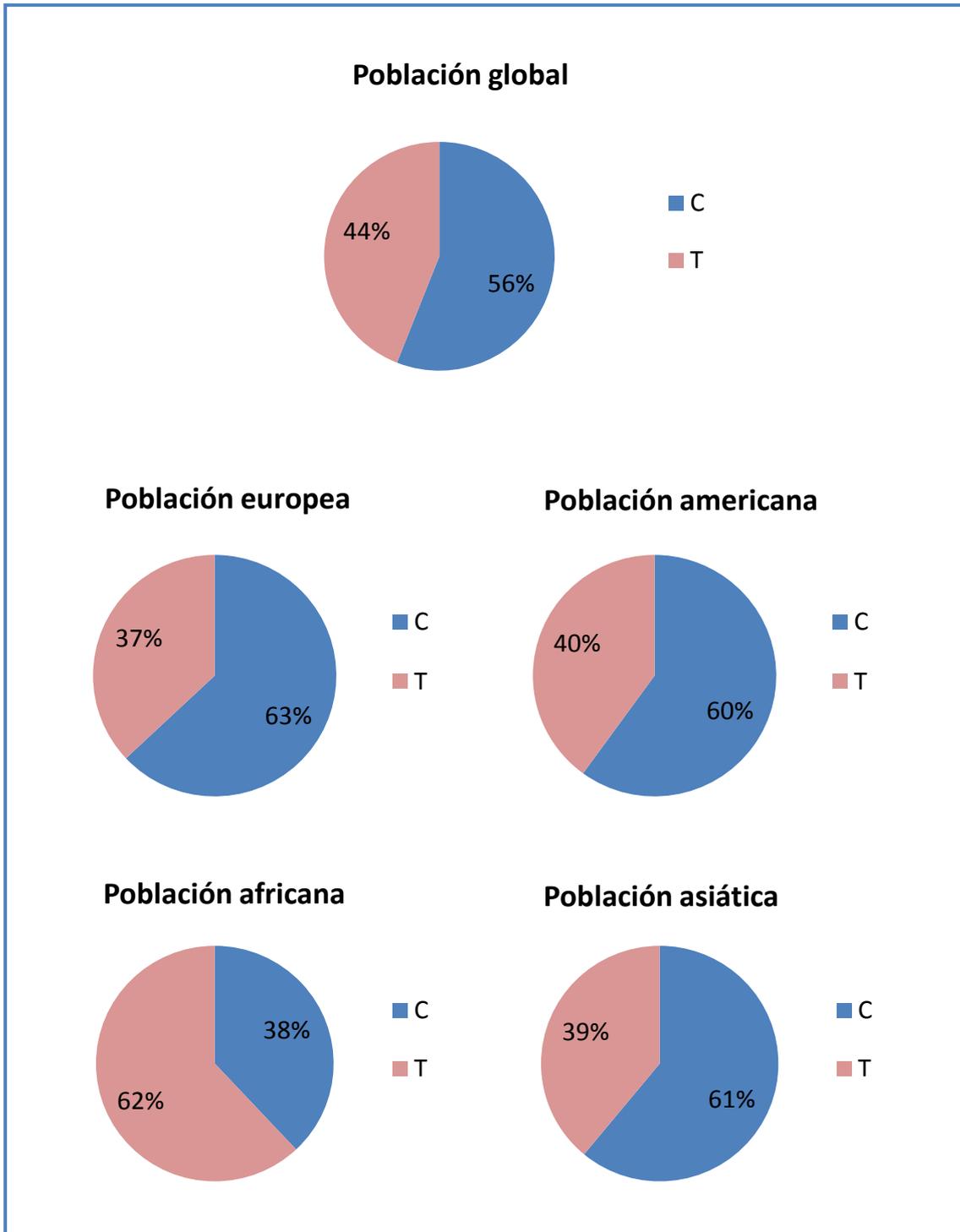


Figura 8. Frecuencia de las variantes alélicas de *LINGO-1* rs11856808 (C/T).

En los últimos años se han desarrollado varios trabajos que han encontrado una asociación entre la proteína LINGO1 y algunas enfermedades neurológicas, al margen de la EM. Así, se ha observado un incremento de la expresión de LINGO1 en las neuronas de la sustancia negra de pacientes con enfermedad de Parkinson comparada con controles²⁶⁵. En ratones *knock-out* para LINGO1 se ha detectado un efecto protector sobre la degeneración de neuronas dopaminérgicas²⁶⁵ y, en modelos animales con defectos de mielina se ha objetivado como éstos presentaban temblor²⁸⁰. También se ha comprobado recientemente una sobreexpresión de LINGO1 en la corteza cerebelosa de pacientes con temblor esencial frente a la de individuos sanos²⁸¹. En este contexto se ha estudiado y demostrado de forma consistente una asociación entre los genotipos de *LINGO1* rs9652490 y *LINGO1* rs11856808 y el temblor esencial²⁸²⁻²⁸⁸. Sin embargo, este análisis también se ha realizado en pacientes con enfermedad de Parkinson pero los resultados no han sido reproducibles en las diferentes poblaciones examinadas^{286,289-294}.

Dado que LINGO1 es una proteína transmembrana exclusiva del SNC presente en neuronas, OPCs y oligodendrocitos, implicada en la inhibición de la maduración de las OPCs, la síntesis de mielina, así como de la supervivencia y regeneración neuronal, parece razonable pensar que pudiera estar implicada en la patogenia de la EM, y por lo tanto, el gen *LINGO1* podría ser un gen candidato para la modificación del riesgo para el desarrollo de esta enfermedad.

HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

4.- HIPÓTESIS

- La EM es la enfermedad inflamatoria desmielinizante, crónica y multifocal del SNC, con degeneración axonal más frecuente¹. Esta enfermedad se caracteriza por un curso en brotes y menos frecuentemente progresivo que afecta a personas generalmente jóvenes, con un pronóstico variable, pero llegando a producir una severa discapacidad en algunos casos².
- Su etiología se desconoce. Los numerosos estudios realizados sobre la EM sugieren que esta enfermedad estaría desencadenada por un factor ambiental, probablemente un agente infeccioso, que actuando sobre un individuo con una determinada susceptibilidad genética, desencadenaría una respuesta autoinmune responsable de la lesión del SNC^{181,182}. Se cree que la EM tiene una herencia poligénica¹⁸³. Recientemente se han realizado varios GWAS que han identificado más de 50 diferentes *loci* asociados a riesgo para desarrollo de EM⁵⁶⁻⁶⁷. Muchas de las variantes alélicas identificadas se localizan en genes con funciones inmunológicas importantes (receptores de IL 2 y 7, CD58, CD6, CD40 y otros), y la mayoría se asocian con otras enfermedades autoinmunes.

- La patogenia de la EM tampoco está aclarada, aunque parece ser de índole inmunológica. En esta enfermedad se forman lesiones inflamatorias en el SNC que causan desmielinización, probablemente mediante mecanismos celulares^{222,228-231} y humorales^{235,236}. La remielinización de estas lesiones, llevada a cabo por las OPCs, suele ser incompleta. Además, también se produce pérdida de axones en grado variable en probable relación con un daño directo de los mismos por mediadores inflamatorios, junto con fallos en su regeneración por la presencia de áreas de gliosis y de inhibidores del crecimiento de las neuritas que crearían un medio que no permitiría el crecimiento de los axones dañados²⁵⁶⁻²⁵⁸.

- LINGO1 es una proteína transmembrana que se expresa en la superficie de oligodendrocitos y OPCs, donde ha demostrado tener un efecto inhibitorio sobre su maduración y la formación de mielina²⁶². También se ha identificado en la superficie de las neuronas donde interactúa simultáneamente con el receptor Nogo-66 y con p75 o TROY para formar un receptor complejo (NgR). El NgR se encuentra implicado en la inhibición del crecimiento y regeneración axonal mediado por proteínas asociadas a la mielina²⁵⁹. Además, en modelos animales de enfermedad de Parkinson y de glaucoma ha demostrado su acción reduciendo la supervivencia de las neuronas dopaminérgicas y ganglionares de la retina al inducir una disminución de la

actividad de la vía de señalización de la PI3K-Akt y TrkB, respectivamente^{265,266,268,276-278}.

- Se ha descrito la existencia de un incremento de la expresión de LINGO1 en las OPCs presentes en las lesiones desmielinizantes de necropsias de pacientes con EM²⁶⁸.
- Se ha detectado un aumento en la expresión de la proteína Nogo-A en los oligodendrocitos supervivientes presentes en el borde de las lesiones desmielinizantes crónicas activas de pacientes con EM²⁹⁵.
- Trabajos recientes han puesto de manifiesto un comienzo más precoz de la mielinización de los axones del SNC y mayor resistencia al desarrollo de la EAE inducida por MOG en ratones *knockout* para LINGO1^{264,269}.
- Varios estudios han demostrado una inducción de la diferenciación de OPCs y de la remielinización en diferentes modelos experimentales de desmielinización y remielinización por antagonistas de LINGO1²⁶⁹⁻²⁷².
- Se ha observado una recuperación funcional y aumento de la integridad de los axones en la EAE inducida por MOG con el uso de antagonistas de LINGO1²⁶⁹.

- Teniendo en cuenta estos hallazgos, parece razonable pensar que en la patogenia de la EM pudiera participar de forma activa la proteína LINGO1, y por lo tanto, polimorfismos genéticos comunes para el gen *LINGO1* como los SNPs rs9652490 y rs11856808, además implicados en el riesgo de desarrollo de otras enfermedades neurodegenerativas²⁸²⁻²⁸⁸, pudieran influir en el riesgo para desarrollar esta enfermedad.

5.- OBJETIVOS

5.1- Objetivo Primario

Determinar si los SNPs rs9652490 y rs11856808 del gen *LINGO1* se asocian a una modificación del riesgo para desarrollar EM.

5.2- Objetivos Secundarios

- Determinar si los SNPs rs9652490 y rs11856808 del gen *LINGO1* influyen en el riesgo para desarrollar EM, según sexos.
- Determinar si los SNPs rs9652490 y rs11856808 del gen *LINGO1* se asocian al riesgo de desarrollo de las distintas formas evolutivas de EM.
- Determinar si los SNPs rs9652490 y rs11856808 del gen *LINGO1* influyen en la edad de comienzo de la EM.

PACIENTES, MATERIAL Y MÉTODOS

6.- DISEÑO DEL ESTUDIO

Para poder alcanzar los objetivos descritos de este proyecto, el diseño del estudio ha sido el siguiente:

Estudio observacional analítico de casos y controles en el que se comparan pacientes con EM esporádica versus controles en cuanto a los genotipos y variantes alélicas de los SNPs rs9652490 y rs11856808 del gen *LINGO1* (análisis de asociación genética). Además, se ha realizado un análisis descriptivo en el que se ha examinado las características demográficas y clínicas de la serie de casos de EM incluida en el proyecto. Asimismo, se ha procedido a estudiar las características demográficas de la serie de controles, comparándolas con la serie de pacientes con EM.

7.- PACIENTES Y ÁMBITO DEL ESTUDIO

El grupo de casos está constituido por un total de 293 pacientes caucasianos, no seleccionados ni relacionados entre sí, diagnosticados de EM de acuerdo a los criterios diagnósticos de McDonald et al. de 2001⁸⁰ procedentes de la Asociación de Esclerosis Múltiple de Madrid (ADEMM; 165 pacientes) y las áreas sanitarias de los Hospitales Universitarios Doce de Octubre (Madrid; 32 pacientes), La Mancha-Centro (Alcázar de San Juan, Ciudad Real; 65 pacientes) y Príncipe de Asturias (Alcalá de Henares, Madrid; 31 pacientes). Como grupo control dispusimos de 318 sujetos caucasianos sanos, no relacionados entre sí y pareados por edad y sexo con el grupo de casos, constituido por alumnos y profesores de la Universidad de Extremadura (Badajoz; 150 individuos), y acompañantes de pacientes afectos de una enfermedad neurológica distinta a la EM atendidos en el departamento de neurología de la Clínica Universitaria de Navarra (Pamplona; 168 individuos). El ratio de casos y controles fue de 1:1.08.

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 rs9652490 y rs11856808 del gen *LINGO1* en la Unidad de Neurogenética del Centro de Investigaciones Médicas Aplicadas (CIMA) de la Universidad de Navarra.

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

7.1- Casos

Criterios de inclusión

1. Pacientes caucasianos diagnosticados de EM de acuerdo a los criterios diagnósticos de McDonald et al. de 2001⁸⁰, 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.
2. Pacientes de ambos sexos y sin límite de edad.
3. Firma de consentimiento informado aprobado por el Comité Ético del Hospital Universitario Príncipe de Asturias de Alcalá de Henares (Anexo 3).

Criterios de exclusión

1. Sólo se incluyó un miembro afecto de EM por familia.
2. Padecimiento, además, de otra enfermedad neurológica.

7.2 Controles

Criterios de inclusión

1. Sujetos caucasianos sanos no diagnosticados de EM.
2. Sujetos de ambos sexos y sin límite de edad.
3. Firma de consentimiento informado aprobado por el Comité Ético del Hospital Universitario Príncipe de Asturias de Alcalá de Henares (Anexo 3).

Criterios de exclusión

1. Tener un familiar diagnosticado de EM⁸⁰.

8.- RECOGIDA DE VARIABLES

Se captaron pacientes que cumplían los criterios del estudio en las áreas sanitarias y centros reseñados. 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 EM⁷⁸:

- **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.

Se definió como **brote** la presencia de un síntoma neurológico nuevo o un aumento de alguno de los síntomas neurológicos previos que dura más de 24 horas en ausencia de fiebre o infección. Para poder hablar de un nuevo brote debía haber transcurrido un periodo de, al menos, un mes entre cada uno de ellos⁸⁰.

3) Edad de inicio de la enfermedad.

Con la recogida de estas variables se ha podido describir las características demográficas y clínicas de nuestros grupos de análisis, así como estudiar el papel de los SNPs rs9652490 y rs11856808 del gen *LINGO1* en:

1) Riesgo para desarrollar EM.

Para investigar si los SNPs rs9652490 y rs11856808 del gen *LINGO1* influyen en el riesgo para desarrollar EM.

2) Riesgo para desarrollar EM, según sexos.

Para investigar si los SNPs rs9652490 y rs11856808 del gen *LINGO1* influyen en el riesgo para desarrollar EM, según el sexo del paciente.

3) Forma clínica de EM

Para investigar si los SNPs rs9652490 y rs11856808 del gen *LINGO1* determinan la forma clínica de EM que desarrollará el paciente.

4) Edad de inicio de la EM

Para estudiar si los SNPs rs9652490 y rs11856808 del gen *LINGO1* influyen en la edad de aparición de los primeros síntomas de la enfermedad.

9.- METODOLOGÍA DEL ANÁLISIS GENÉTICO DE LAS MUESTRAS

9.1- Extracción y purificación de DNA a partir de sangre periférica

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 $1000 \times g$ 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 250µl de **SDS al 20%**. Se deja incubar toda la noche con agitación constante a temperatura ambiente.

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 *xg* y a 4°C.

7. Se añade a la solución que contiene el DNA la misma cantidad de **fenol** a 4°C. Se agita y centrifuga.
8. 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.
9. 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.
10. 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.
11. 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.
12. 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.

13. 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.

14. Se almacena el DNA a 4°C hasta su uso en un plazo breve.

9.1.1- Soluciones utilizadas en la extracción y purificación de DNA

A) Tampón de hemólisis

155mM NH₄Cl

10mM KHCO₃

0.1mM EDTA

Ajustar a pH 7.4 con NaOH. Autoclavar y almacenar a 4°C.

B) Solución SE

115 mM NaCl

385 mM EDTA pH 8

Autoclavar.

C) Proteínasa K

10 mg/ml en agua MilliQ estéril

Se prepara la cantidad a emplear. Almacenar a 4°C durante 2 días máximo.

D) SDS (dodecil sulfato sódico)

Solución al 20% en agua MilliQ estéril.

E) 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.

-Se añade 500 ml de Tris 0.5M sin ajustar el pH.

-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.

F) Solución TE

10mM de Tris pH 8

1mM de EDTA pH 8

Autoclavar.

9.2- Cuantificación de DNA y estimación de su pureza

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

- Se ponen 700 μ l 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 μ l de **solución TE** se le añaden 5 μ l 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 μ l 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/ 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 μ g/ml de DNA de cadena doble. Empleando esta constante puede cuantificarse el DNA de una muestra según la fórmula:

$$[\text{DNA}] = 50 * \text{absorbancia a 260 nm.}$$

9.3- Genotipado de los SNPs rs9652490 y rs11856808 del gen *LINGO1*

Los dos SNPs objeto de estudio, rs9652490 y rs11856808 del gen *LINGO1*, fueron genotipados mediante la tecnología KASPar (www.kbioscience.co.uk). Éste es un nuevo 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. Esta tecnología utiliza *primers* 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 ambos alelos en un único tubo de reacción con tres *primers* específicos para el SNP sin marcar, y dos *primers* universales marcados con fluorescencia. Así, el genotipado mediante este método consta de:

- Dos *primers* alelo-específicos sin marcar (uno para cada alelo del SNP examinado). Cada uno de ellos contiene una secuencia única en el extremo 5'.
- Un *primer* común reverso (hay un segundo *primer* común, por si no funciona la PCR con el primero).
- Dos oligonucleótidos marcados con un fluorocromo en el extremo 5' que emiten fluorescencia al ser excitados (uno con el fluorocromo FAM y el otro con el fluorocromo VIC). Las secuencias de estos dos oligonucleótidos están diseñadas para

interactuar selectivamente con las secuencias únicas de las colas de los *primers* alelo-específicos.

- Dos oligonucleótidos con el *quencher* unido al extremo 3'. Las secuencias de estos oligonucleótidos son complementarias a las de los oligonucleótidos marcados con los fluorocromos y cuando ambos están hibridados el *quencher* absorbe la fluorescencia del fluorocromo al encontrarse en su proximidad.

En la tabla 6, se detallan las características de la composición de la mezcla de la reacción de amplificación. La tabla 7 muestra la composición de la denominada *Mezcla de Primers (Primer Mix)*. La denominada *Mezcla de Reacción (Reaction Mix)* es aportada por el laboratorio KBioscience 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 MgCl₂. Los *primers* alelo-específicos para el estudio de los SNPs rs9652490 y rs11856808 del gen *LINGO1* fueron diseñados por Kbioscience (Anexos 4 y 5).

H ₂ 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 ₂	0.064 µl	x1	0.064 µl
			4 µl
DNA	1 µl	por pocillo	

Tabla 6. Composición de la mezcla de la reacción de amplificación (x1: volumen por muestra).

Composición de la <i>Primer Mix</i>:	
<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 ₂ O	46 µl

Tabla 7. Composición de la *Primer Mix*.

El proceso de genotipado mediante tecnología KASPar consta de varias fases (figuras 9a-b). 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 *primer* a su secuencia complementaria en el DNA molde (el extremo 3' del *primer* se posiciona sobre el nucleótido del SNP analizado). El *primer* 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. Conforme continúa la 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.

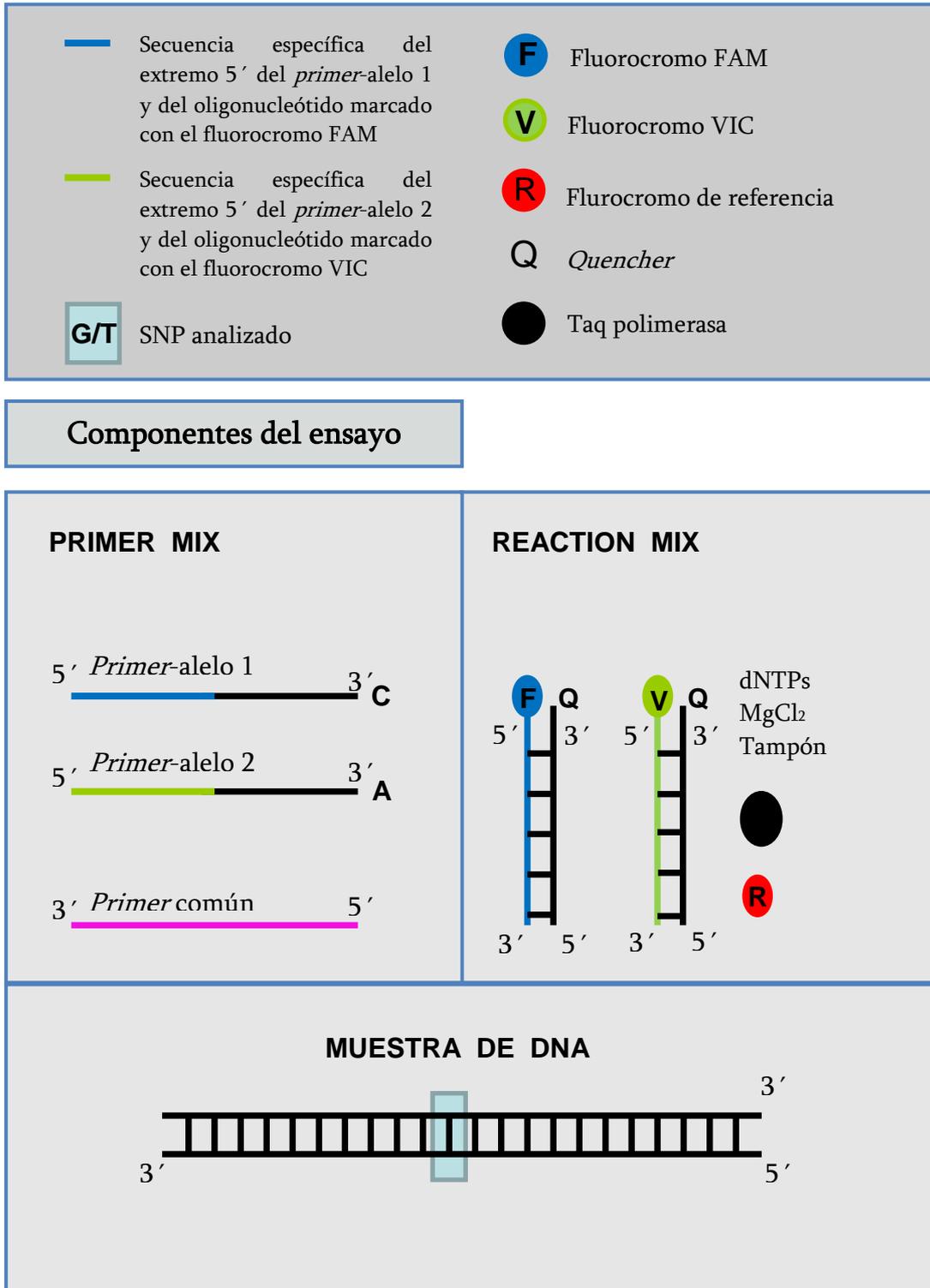


Figura 9a. Genotipado según tecnología KASPar (Kbioeciencia): leyenda y componentes del ensayo.

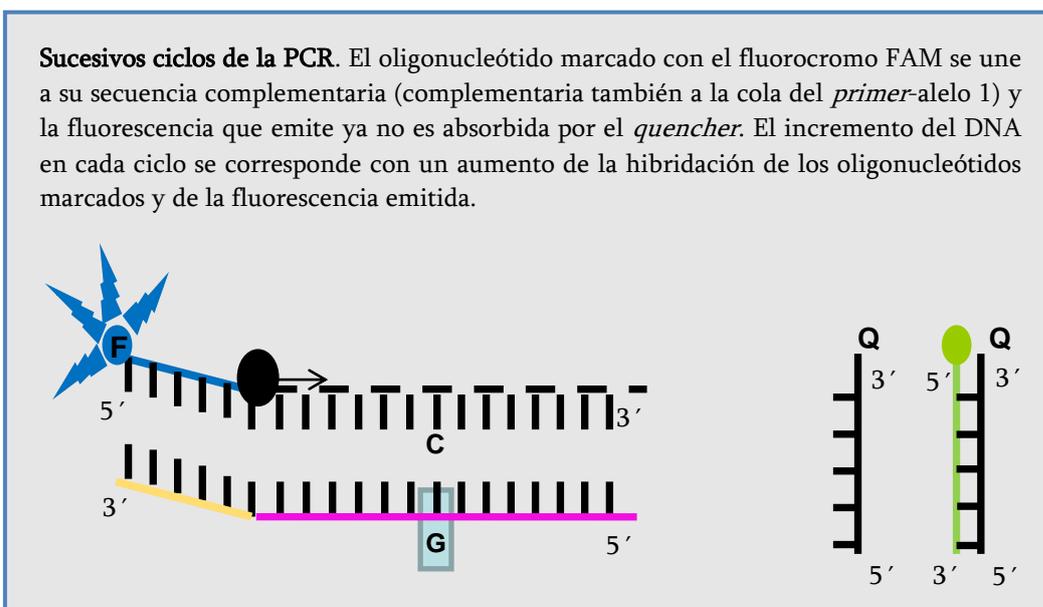
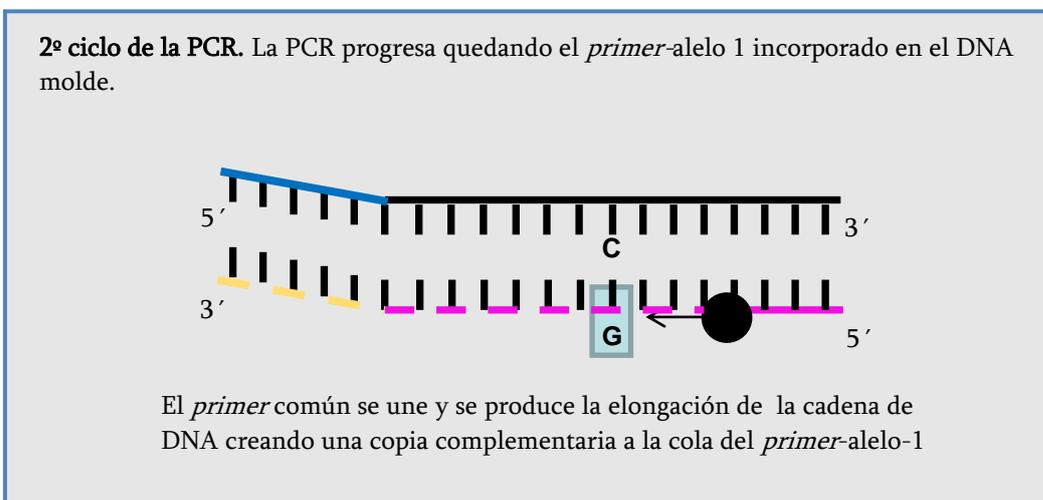
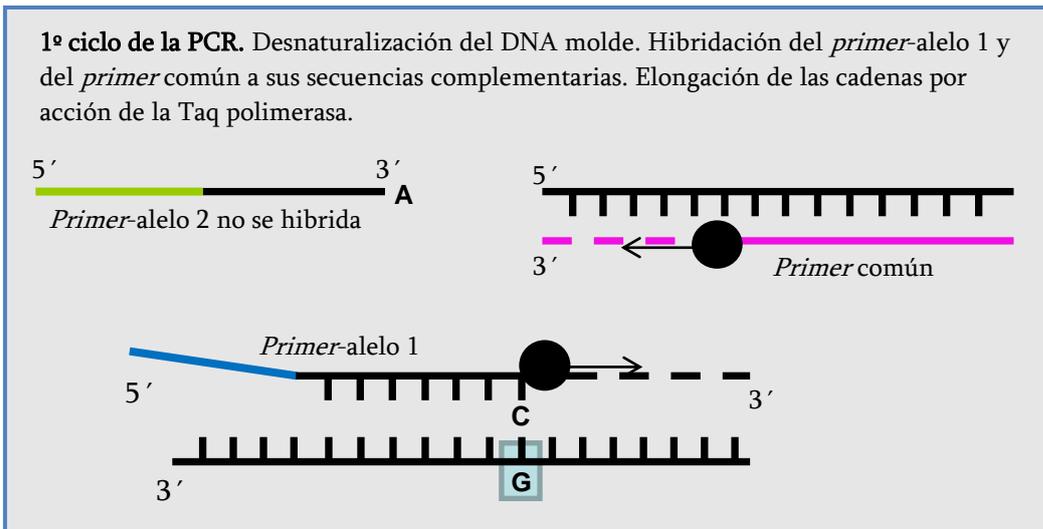


Figura 9b. Genotipado según tecnología KASPar (Kbioecience): descripción del proceso.

La PCR ha sido llevada a cabo en un termociclador Peletier Tetrad®2 de 96 pocillos (BIO-RAD, Hercules, CA) con las siguientes condiciones:

- 1) Una desnaturalización inicial a 94°C durante 10 minutos.
- 2) Veintiocho ciclos con 3 etapas cada ciclo de:
 - 15 segundos a 94°C (desnaturalización).
 - 20 segundos a 57°C (hibridación).
 - 30 segundos a 72°C (elongación).
- 3) Finalizados los ciclos se hace una fase de extensión de 5 minutos a 72°C para conseguir una total polimerización de todas las cadenas de DNA.

La fluorescencia observada ha sido analizada utilizando el ABI7300HT (identificación del producto específico de alelo) (ABI 7300 Sequence Detection Software v.1.2.3, Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) (figura 10).

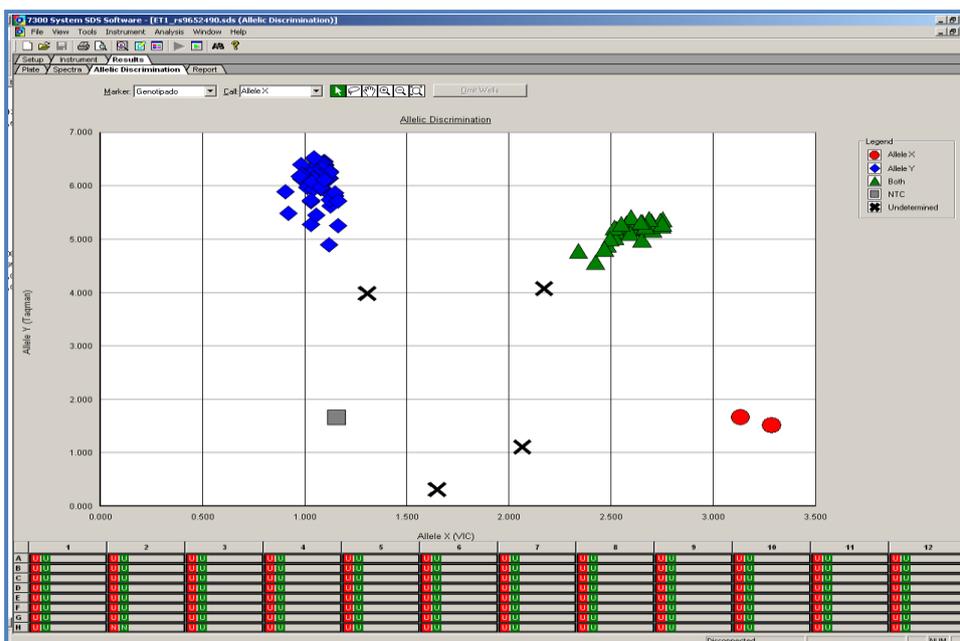


Figura 10. Imagen de lectura de fluorescencia en el sistema ABI 7300 Sequence Detection Software v.1.2.3, Applied Biosystems, Foster City, CA, USA.

10.- ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Los datos referentes a las variables cuantitativas (fecha de nacimiento, edad durante 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 15.0 para Windows (SPSS Inc., Chicago, Illinois, USA). Los datos descriptivos son presentados mediante valores de media y su desviación estándar (DE).

Para el análisis de las frecuencias de los distintos genotipos y variantes alélicas de *LINGO1* rs9652490 y LINGO-1 rs11856808 se utilizó el software PLINK v.1.07 (Shaun Purcell; <http://pngu.mgh.harvard.edu/purcell/plink/>)²⁹⁶ y el programa SPSS 15.0. El software PLINK v.1.07 se empleó para analizar posibles desviaciones del equilibrio de Hardy y Weinberg en los grupos de pacientes y controles, y en cada uno de los subgrupos analizados en esta tesis. En el caso de las variables cualitativas, la comparación entre los grupos de las frecuencias genotípicas y alélicas de los dos 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%. Se utilizó el método de *Stepdown* para corrección de múltiples comparaciones.

El poder estadístico calculado para el tamaño de nuestra muestra (determinado a partir de las frecuencias alélicas empleando un modelo genético de análisis de frecuencia de portadores del gen enfermo con un $OR=1.5$; $p=0.05$) para asociaciones bilaterales y unilaterales de riesgo en relación a la variante alélica es el siguiente: rs9652490 G=80.1% y 87.7%, y rs11856808 T=91.9% y 96.7%, respectivamente²⁹⁷.

11.- CONSIDERACIONES ÉTICAS

El protocolo de estudio de este trabajo fue aprobado por el Comité Ético de Investigación Clínica del Hospital Universitario Príncipe de Asturias de Alcalá de Henares en el año 2005.

Al tratarse de un estudio observacional el único requerimiento ético fue el mantenimiento de la confidencialidad respecto a la información de los pacientes. Para ello, se mantuvo en todo momento su anonimato mediante la adecuada codificación de su identidad en la base de datos y en los tubos de las muestras extraídas.

Dado que en el desarrollo del estudio ha precisado de la extracción de una muestra sanguínea, se elaboró un consentimiento informado que fue aprobado por el Comité de Ética y Ensayos Clínicos del Hospital Universitario Príncipe de Asturias de Alcalá de Henares para la autorización a tal efecto (Anexo 3).

RESULTADOS

12.- ANÁLISIS DE LAS VARIABLES DEMOGRÁFICAS

12.1- Grupo de pacientes con EM

Se estudió un grupo de 293 pacientes diagnosticados de EM⁸⁰, procedentes de la Asociación de Esclerosis Múltiple de Madrid (ADEMM; 165 pacientes) y las áreas sanitarias de los Hospitales Universitarios Doce de Octubre (Madrid; 32 pacientes), La Mancha-Centro (Alcázar de San Juan, Ciudad Real; 65 pacientes) y Príncipe de Asturias (Alcalá de Henares, Madrid; 31 pacientes) (figura 11). El tiempo medio de duración de la enfermedad fue de 11.1 años (DE=7.9).

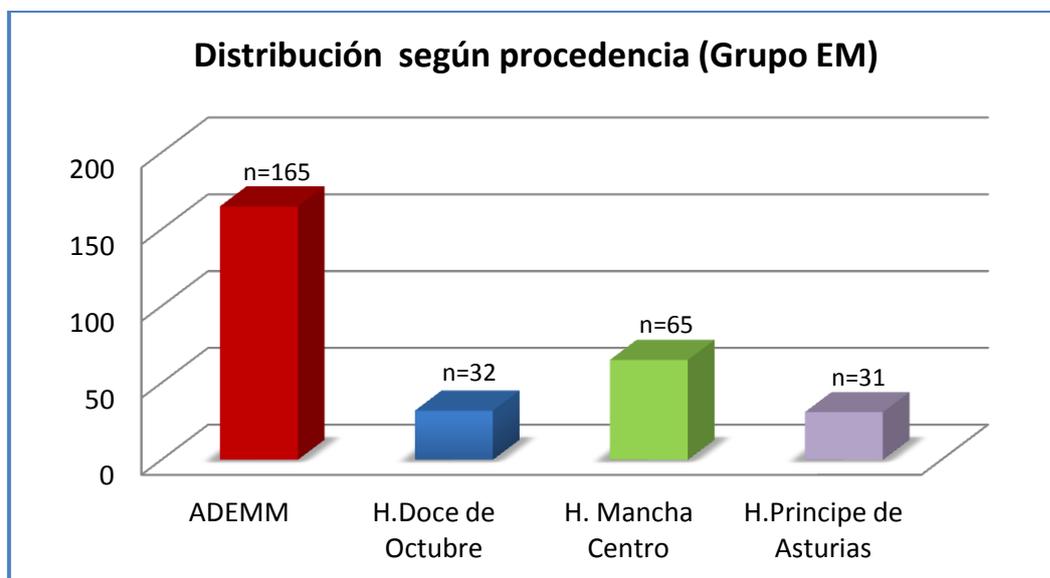


Figura 11 . Histograma de distribución según la procedencia en el grupo de pacientes con EM.

El grupo de pacientes con EM estaba constituido por 203 mujeres y 90 hombres, lo que representó el 69.3% y 30.7% respectivamente (figura 12).

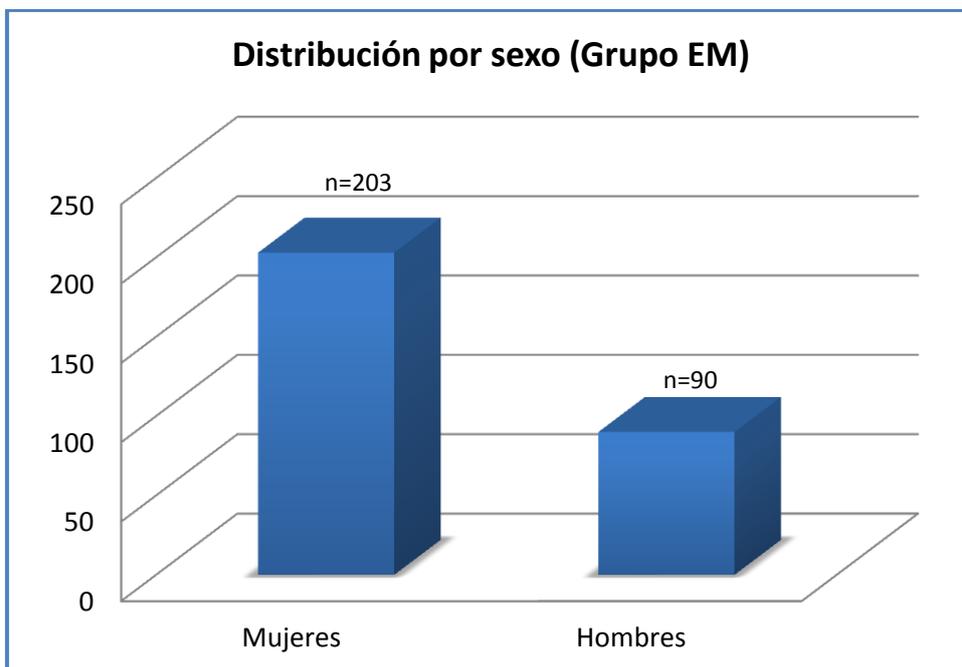


Figura 12. Histograma de distribución por sexo en el grupo de pacientes con EM.

La media de edad de los pacientes en el momento de inclusión en el estudio fue de 43.9 años (DE=11.4), con una distribución de mayor prevalencia entre 41 y 50 años (n=98) (figura 13).

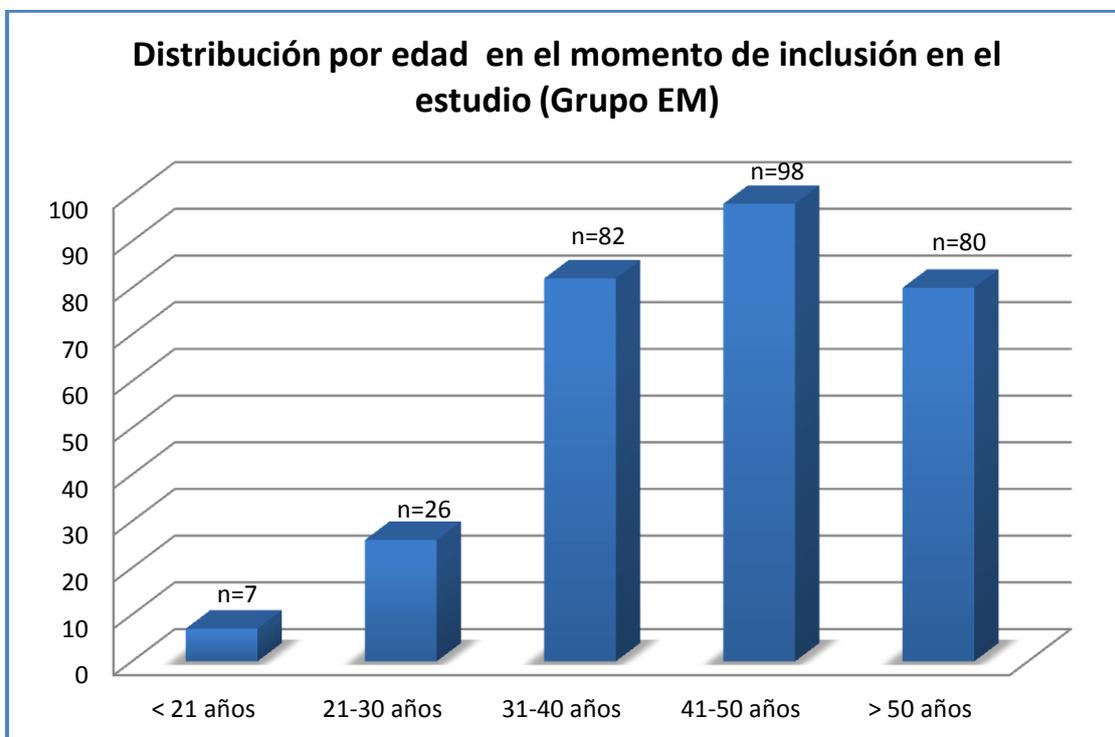


Figura 13. Histograma de distribución por edad en el momento de inclusión en el estudio en el grupo de pacientes con EM.

La media de edad de los hombres con EM en el momento de participación en el estudio fue de 42.4 años (DE=10.3) con un mínimo de 15 años y un máximo de 61 años, y la de las mujeres de 44.6 años (DE=11.9) con un mínimo de 20 años y un máximo de 78 años (figura 14). No se detectaron diferencias estadísticamente significativas al comparar la edad entre ambos grupos.

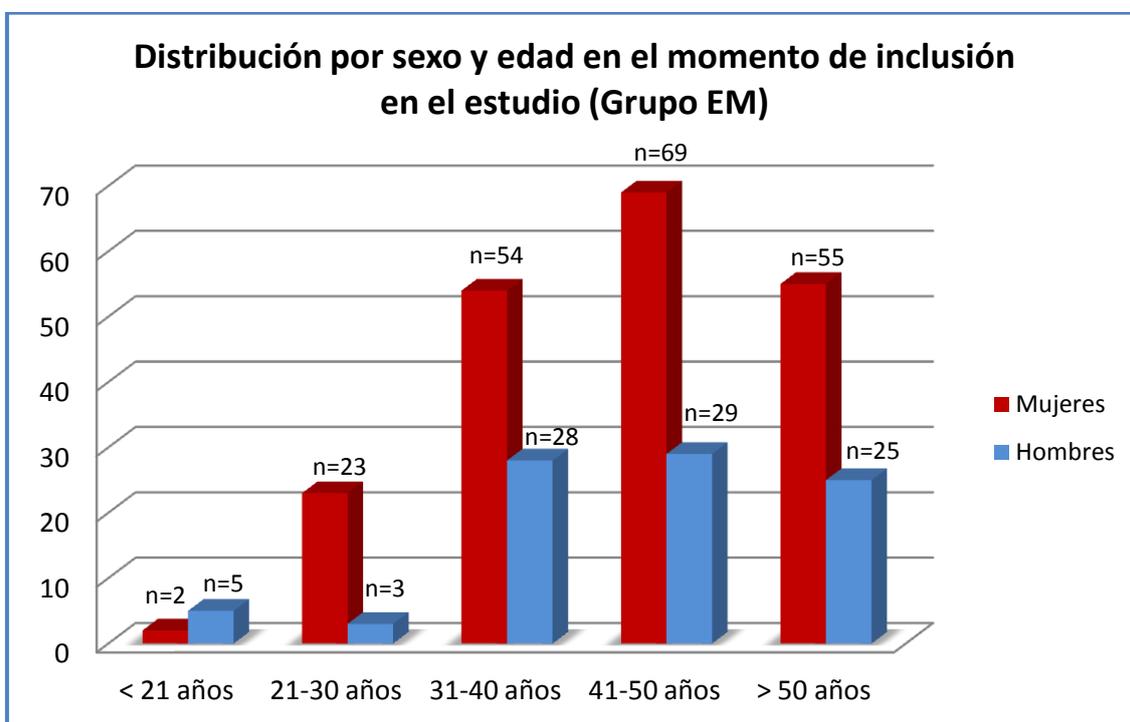


Figura 14. Histograma de distribución por sexo y edad en el momento de inclusión en el estudio en el grupo de pacientes con EM.

12.2- Grupo control

Se incluyeron 318 sujetos sanos como grupo control constituido por alumnos y profesores de la Universidad de Extremadura (Badajoz; 150 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; 168 sujetos) (figura 15).

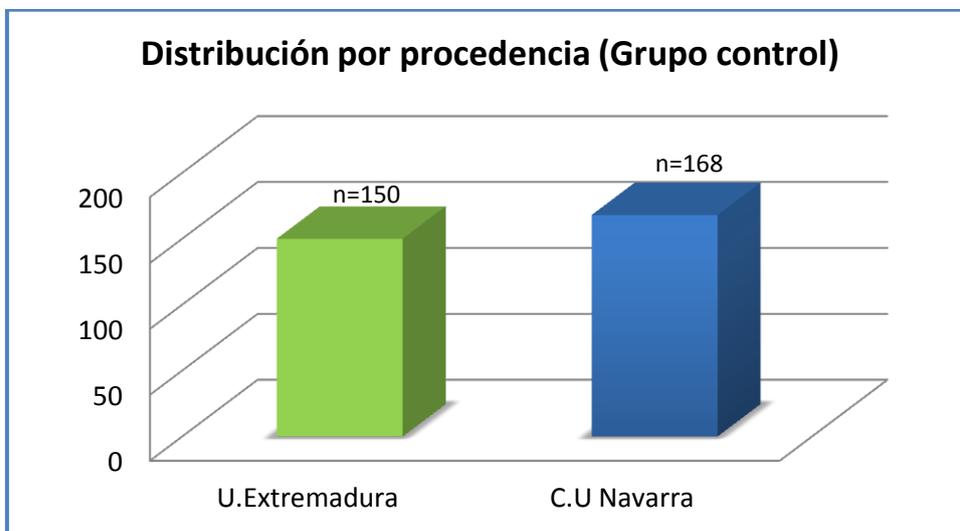


Figura 15. Histograma de distribución por procedencia en el grupo control.

El grupo control estaba formado por 221 mujeres y 97 hombres, lo que representó el 69.5% y 30.5% respectivamente (figura 16).

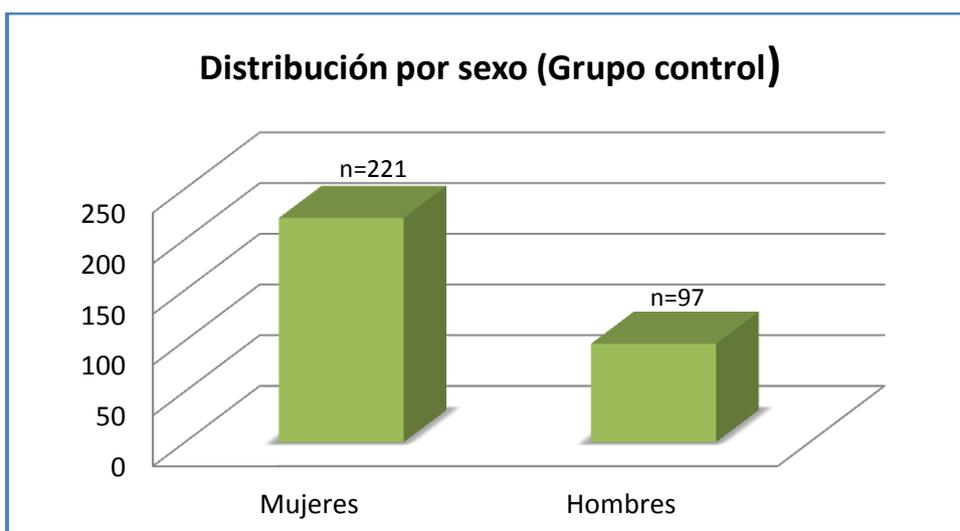


Figura 16. Histograma de distribución por sexo en el grupo control.

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 una distribución de mayor prevalencia entre 41 y 50 años (n=106) (figura 17).

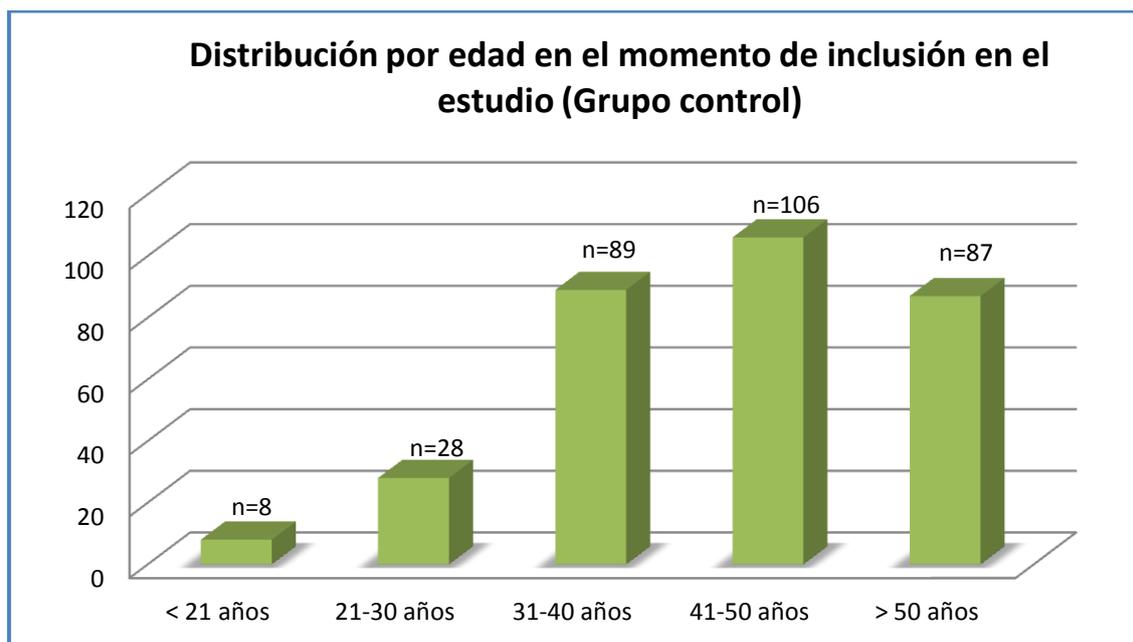


Figura 17. Histograma de distribución por edad en el momento de inclusión en el estudio en el grupo control.

La media de edad en el subgrupo control de hombres sanos en el momento de ser incluidos en el trabajo fue de 45.2 años (DE=10.4), con un mínimo de 19 años y un máximo de 87 años. En el subgrupo de mujeres, la media de edad fue de 42.3 años (DE=13.2), con un mínimo de 18 años y un máximo de 85 años (figura 18). No se detectaron diferencias estadísticamente significativas al comparar la edad entre ambos grupos.

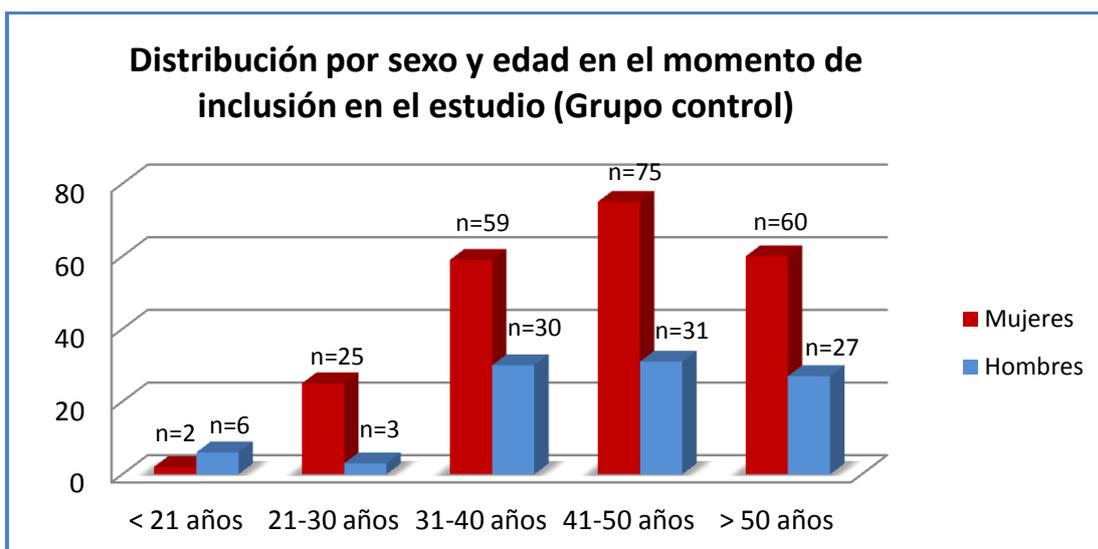


Figura 18. Histograma de distribución por sexo y edad en el momento de inclusión en el estudio en el grupo control.

12.3- Comparación entre pacientes con EM y grupo control

Todos 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 (tabla 8).

	Pacientes con EM (n=293)	Grupo control (n=318)	P
Edad actual (media ± DE)	43.9 ± 11.4	43.8 ± 12.4	0.757
Sexo (M: H)	203 : 90	221 : 97	0.954

Tabla 8. 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).

13.- ANÁLISIS DE LA VARIABLE FORMA CLÍNICA DE EM

La clasificación, según la forma evolutiva de la enfermedad⁷⁸, en nuestro grupo de pacientes con EM fue la siguiente (figura 19):

- EMRR: 159 pacientes (54.3%).
- EMSP: 91 pacientes (31%).
- EMPP: 43 pacientes (14.7%).

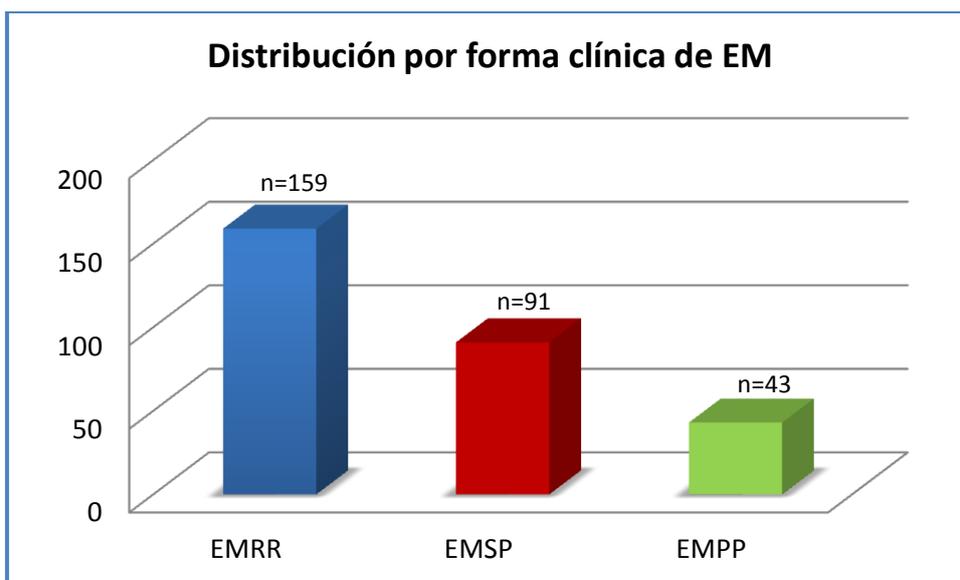


Figura 19. Histograma de distribución por forma clínica en pacientes con EM.

El tiempo medio de duración de la enfermedad fue de 10.5 años (DE=8.2) en el grupo de pacientes con EMRR, 12.3 años (DE=9.3) en el de EMSP y 11.0 años (DE=7.7) en el de EMPP.

Tanto en el subgrupo de hombres como en el de mujeres, la forma evolutiva predominante fue la EMRR (figura 20). Las formas progresivas (EMSP y EMPP) mostraron una predilección no estadísticamente significativa por el sexo masculino.

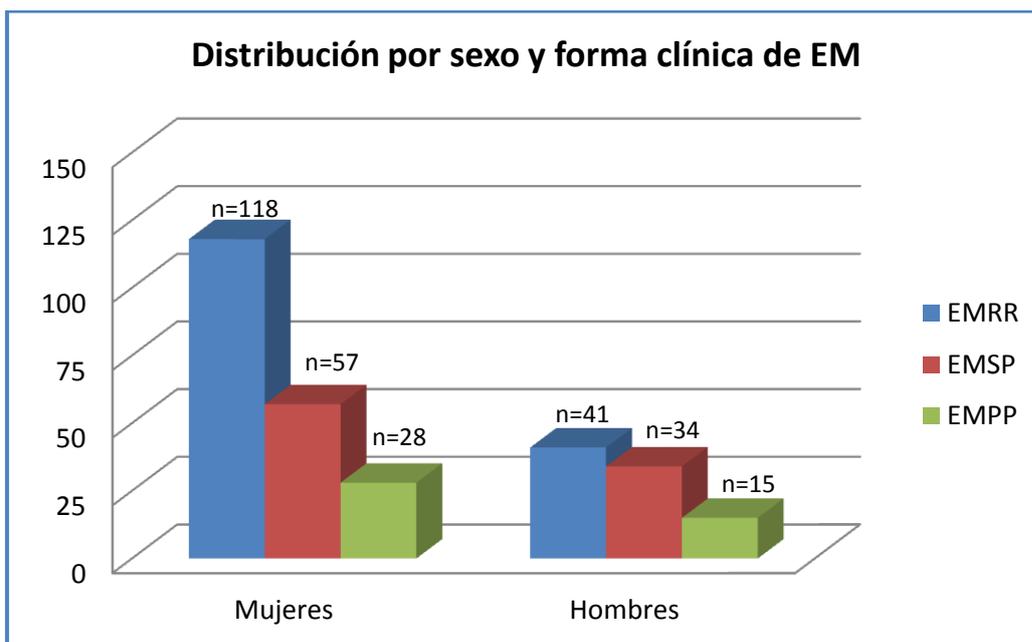


Figura 20. Histograma de distribución por sexo y forma clínica en pacientes con EM.

La media de edad 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 21). 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 ($p=0.009$).

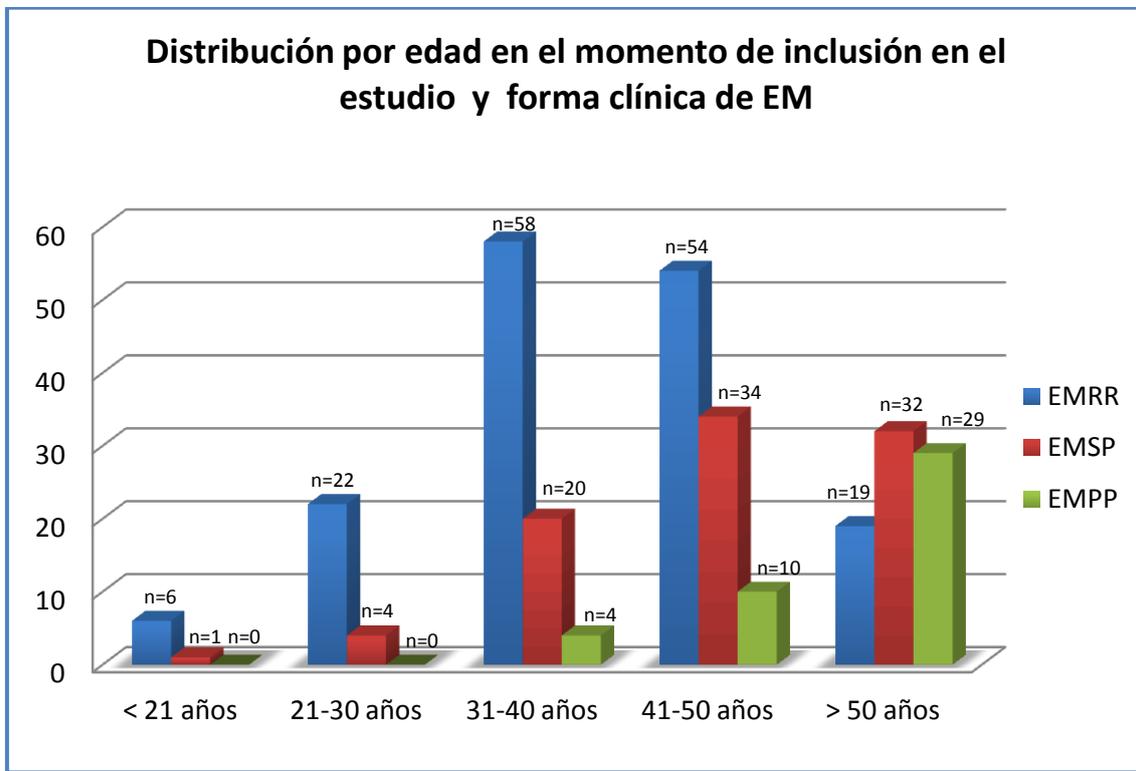


Figura 21. Histograma de distribución por edad en el momento de inclusión en el estudio y forma clínica en pacientes con EM.

14.- ANÁLISIS DE LA VARIABLE EDAD DE INICIO DE LA EM

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 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) (figura 22).

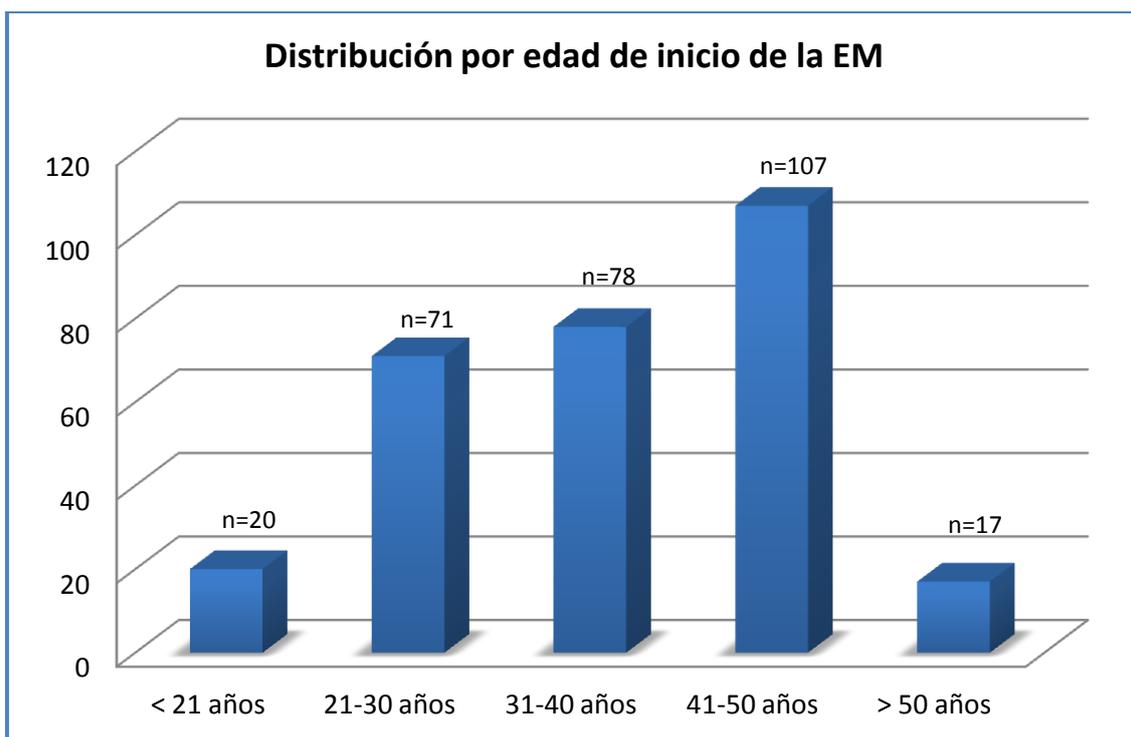


Figura 22. Histograma de distribución por edad de inicio de la EM.

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 (figura 23). 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 23). No se detectaron diferencias estadísticamente significativas al comparar la edad de inicio en ambos subgrupos.

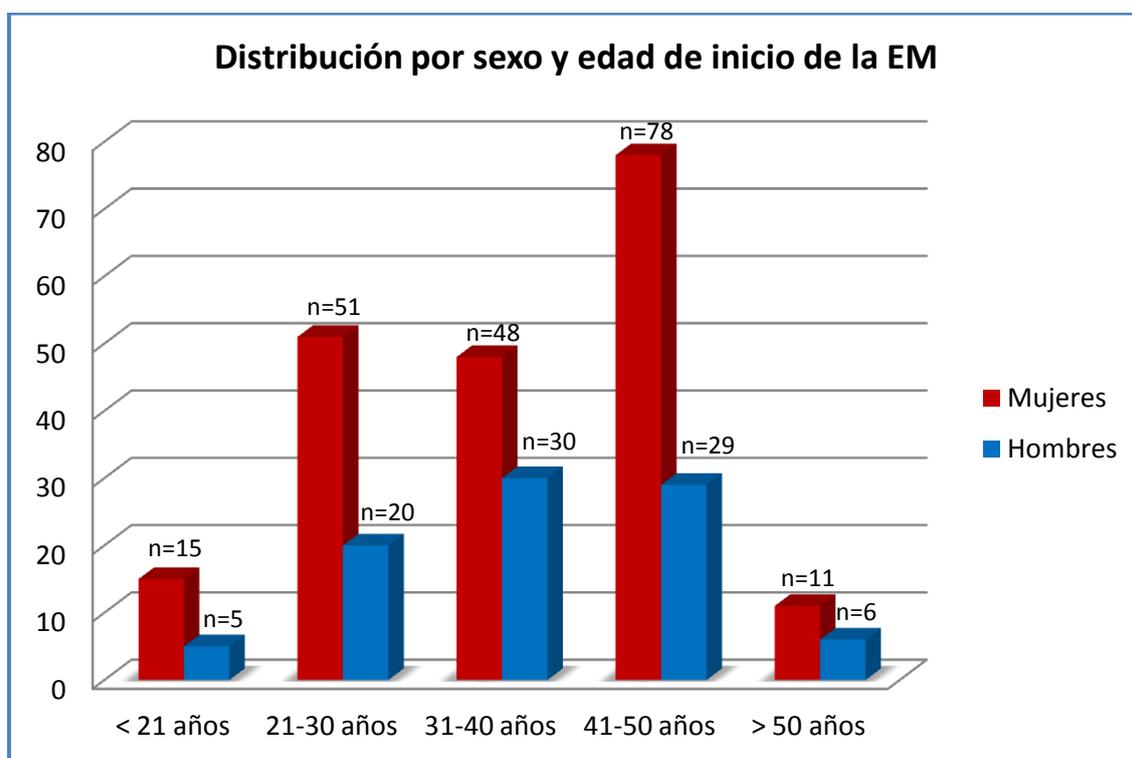


Figura 23. Histograma de distribución por sexo y edad de inicio de la EM.

Al analizar la edad de inicio de la enfermedad según las formas evolutivas de EM, se observó como ésta fue mayor en los pacientes con EMPP (media= 43.4 años;

DE= 11.6) que en los pacientes con EMRR (media= 29.5 años; DE= 8.5) y EMSP (media= 34.9 años; DE= 11.8) (figura 24). 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 ($p = 0.005$).

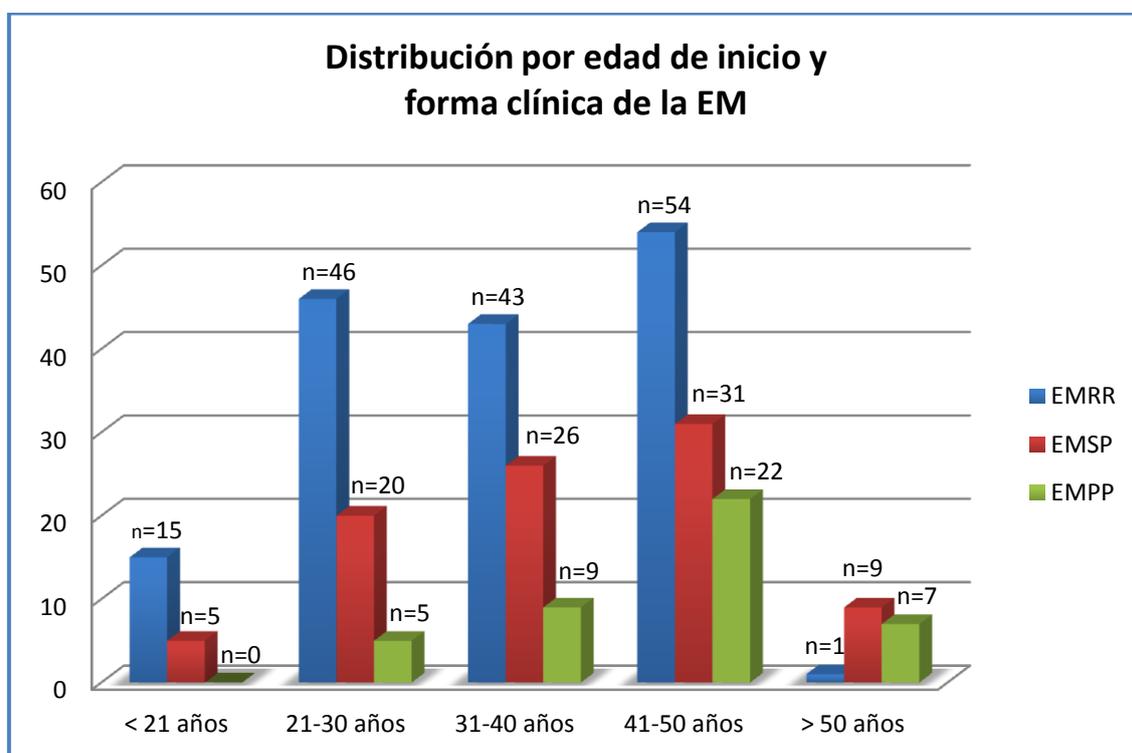


Figura 24. Histograma de distribución por edad de inicio y forma clínica de EM.

15.- ANÁLISIS DE LOS SNPs rs9652490 y rs11856808 DEL GEN *LINGO1*

15.1- Genotipos y variantes alélicas de *LINGO1* rs9652490 y rs11856808 de pacientes con EM y controles sanos

Las frecuencias de los genotipos de *LINGO1* rs9652490 y *LINGO1* rs11856808, así como de sus variantes alélicas no difirieron significativamente entre pacientes diagnosticados de EM y voluntarios sanos (tablas 9 y 10).

El genotipo *LINGO1* rs9652490 A/A fue el más frecuentemente identificado tanto en pacientes con EM como en individuos sanos (67.2% y 69.8%, respectivamente) (tabla 9). Los enfermos con EM presentaron en un 31.4% el genotipo *LINGO1* rs9652490 A/G frente a un 27% de los controles. Por último, el 1.4% de los casos presentó el genotipo *LINGO1* rs9652490 G/G frente al 3.1% de los controles. En cuanto al examen de las variantes alélicas *LINGO1* rs9652490 A y *LINGO1* rs9652490 G, se evidenció que el 82,9% y el 17,1% de los casos respectivamente las presentaban, frente al 83.3% y el 16.7% de los controles (tabla 9).

Por otro lado, el análisis del genotipo *LINGO1* rs11856808 (tabla 10) mostró como el 46.8% de los pacientes con EM y el 45.6% de los sujetos control presentaban el genotipo *LINGO1* rs11856808 C/C. Los enfermos con EM presentaron en un 43% el genotipo *LINGO1* rs11856808 C/T frente a un 46.9% de los controles. Finalmente, en el 10.2% de los casos se identificó el genotipo *LINGO1* rs11856808 T/T frente al 7.5% de los controles. Al realizar el análisis de la variantes alélicas *LINGO1* rs11856808 C y *LINGO1* rs11856808 T, se puede observar en la tabla 10 que el 68.3% y el 31.7% de los enfermos con EM las presentaban respectivamente, mientras que en los controles se detectaban en un 69% y 31% respectivamente.

Las frecuencias de genotipos y alelos entre pacientes con EM e individuos sanos estaban en equilibrio de Hardy-Weinberg.

	PACIENTES CON EM (n=293; 586 alelos)		GRUPO CONTROL (n=318; 636 alelos)		p
	n	%	n	%	
GENOTIPOS					
<i>LINGO1</i> rs9652490 A/A	197	67.2	222	69.8	0.197
<i>LINGO1</i> rs9652490 A/G	92	31.4	86	27.0	
<i>LINGO1</i> rs9652490 G/G	4	1.4	10	3.1	
ALELOS	n	%	n	%	OR (IC 95%) p
<i>LINGO1</i> rs9652490 A	486	82.9	530	83.3	1.03 (0.76-1.39)
<i>LINGO1</i> rs9652490 G	100	17.1	106	16.7	0.853

Tabla 9. Genotipos y variantes alélicas de *LINGO1* rs9652490 en pacientes con EM y controles (OR: odds ratio; IC: intervalo de confianza).

	PACIENTES CON EM (n=293; 586 alelos)		GRUPO CONTROL (n=318; 636 alelos)		p
	n	%	n	%	
GENOTIPOS					
<i>LINGO1</i> rs11856808 C/C	137	46.8	145	45.6	0.407
<i>LINGO1</i> rs11856808 C/T	126	43.0	149	46.9	
<i>LINGO1</i> rs11856808 T/T	30	10.2	24	7.5	
ALELOS	n	%	n	%	OR (IC 95%) p
<i>LINGO1</i> rs11856808 C	400	68.3	439	69.0	1.04 (0.81-1.32)
<i>LINGO1</i> rs11856808 T	186	31.7	197	31.0	0.773

Tabla 10. Genotipos y variantes alélicas de *LINGO1* rs11856808 en pacientes con EM y controles (OR: odds ratio; IC: intervalo de confianza).

15.2- Genotipos y variantes alélicas de *LINGO1* rs9652490 y rs11856808 de mujeres con EM y voluntarias sanas

En el examen por subgrupos de mujeres con EM y sanas, de los genotipos de *LINGO1* rs9652490 y *LINGO1* rs11856808, así como de sus correspondientes variantes alélicas, tampoco se objetivaron diferencias estadísticamente significativas (tablas 11 y 12).

Como ocurría en el análisis de la población global, el genotipo *LINGO1* rs9652490 A/A fue el más frecuentemente detectado entre las mujeres diagnosticadas de EM (68.5%), seguido del genotipo *LINGO1* rs9652490 A/G (30.5%). Finalmente, el genotipo *LINGO1* rs9652490 G/G sólo se identificó en 2 pacientes (1%). En el caso de las mujeres control, también se mantuvo esta distribución de frecuencias (*LINGO1* rs9652490 A/A: 69.2%; *LINGO1* rs9652490 A/G: 27.1%; *LINGO1* rs9652490 GG: 3.6%) (tabla 11). Al realizar el estudio de las variantes alélicas *LINGO1* rs9652490 A y *LINGO1* rs9652490 G, se puede observar en la tabla 11, que el 83.7% y el 16.3% de las pacientes los presentaban respectivamente. En el caso de las mujeres control, las frecuencias detectadas para cada variante alélica fueron 82.8% y 17.2% respectivamente.

Como demuestra la tabla 12, las mujeres con EM presentaron en el análisis de los genotipos *LINGO1* rs11856808 C/C, *LINGO1* rs11856808 C/T y *LINGO1* rs11856808 T/T un porcentaje de casos del 46.8%, 44.3% y 8.9% respectivamente. En las mujeres control, el porcentaje de cada genotipo fue menor, excepto para el genotipo *LINGO1* rs11856808 C/T (46.6%). En el examen de las variantes alélicas, se encontraron frecuencias de aparición idénticas en ambos grupos de mujeres evaluadas en este estudio (*LINGO1* rs11856808 C: 69%; *LINGO1* rs11856808 T: 31%) (tabla 12).

Las frecuencias de genotipos y alelos entre mujeres con EM y mujeres sanas estaban en equilibrio de Hardy-Weinberg.

	MUJERES CON EM (n=203; 406 alelos)		MUJERES CONTROL (n=221; 442 alelos)		p
	n	%	n	%	
GENOTIPOS					
<i>LINGO1</i> rs9652490 A/A	139	68.5	153	69.2	0.170
<i>LINGO1</i> rs9652490 A/G	62	30.5	60	27.1	
<i>LINGO1</i> rs9652490 G/G	2	1.0	8	3.6	
ALELOS	n	%	n	%	OR (IC 95%) p
<i>LINGO1</i> rs9652490 A	340	83.7	366	82.8	0.95 (0.65-1.34)
<i>LINGO1</i> rs9652490 G	66	16.3	76	17.2	0.715

Tabla 11. Genotipos y variantes alélicas de *LINGO1* rs9652490 en mujeres con EM y controles (OR: odds ratio; IC: intervalo de confianza).

	MUJERES CON EM (n=203; 406 alelos)		MUJERES CONTROL (n=221; 442 alelos)		p
	n	%	n	%	
GENOTIPOS					
<i>LINGO1</i> rs11856808 C/C	95	46.8	101	45.7	0.852
<i>LINGO1</i> rs11856808 C/T	90	44.3	103	46.6	
<i>LINGO1</i> rs11856808 T/T	18	8.9	17	7.7	
ALELOS	n	%	n	%	OR (IC 95%) p
<i>LINGO1</i> rs11856808 C	280	69.0	305	69.0	1.00 (0.75-1.34)
<i>LINGO1</i> rs11856808 T	126	31.0	137	31.0	0.990

Tabla 12. Genotipos y variantes alélicas de *LINGO1* rs11856808 en mujeres con EM y controles (OR: odds ratio; IC: intervalo de confianza).

15.3- Genotipos y variantes alélicas de *LINGO1* rs9652490 y rs11856808 de hombres con EM y voluntarios sanos

Las frecuencias de genotipos y variantes alélicas de *LINGO1* rs9652490 y *LINGO1* rs11856808 no difirieron significativamente entre hombres con EM y voluntarios sanos (tablas 13 y 14).

Como ocurría en el análisis de la población global y en el del subgrupo de mujeres, el genotipo *LINGO1* rs9652490 A/A fue el más frecuentemente detectado tanto en varones con EM (64.4%) como en controles (71.1%), seguido del genotipo *LINGO1* rs9652490 A/G (hombres con EM: 33.3%; hombres control: 26.8%). Finalmente, el genotipo *LINGO1* rs9652490 G/G sólo se identificó en 2 sujetos de cada subgrupo (hombres con EM: 2.2%; hombres control: 2.1%) (tabla 13). Al realizar el estudio de las variantes alélicas *LINGO1* rs9652490 A y *LINGO1* rs9652490 G, se puede observar en la tabla 13, como el 81.1.7% y el 18.9% de los varones afectos de la enfermedad presentaban dichos alelos respectivamente. Cuando realizamos este mismo análisis, en el grupo de voluntarios sanos, las frecuencias detectadas para cada variante alélica fueron 84.5% y 15.5% respectivamente (tabla 13).

Los hombres con EM presentaron en el análisis de frecuencia de los genotipos de *LINGO1* rs11856808 los siguientes porcentajes: *LINGO1* rs11856808 C/C: 46.7%; *LINGO1* rs11856808 C/T: 40%; y *LINGO1* rs11856808 T/T: 13.3% (tabla 14). Entre los voluntarios sanos, como ocurría en el grupo de mujeres control, el porcentaje de aparición de cada uno de los genotipos fue menor, excepto para el genotipo *LINGO1* rs11856808 C/T (47.4%). En el examen de las variantes alélicas, como puede observarse en la tabla 14, el alelo *LINGO1* rs11856808 C fue el más frecuentemente detectado en los dos grupos de individuos analizados (hombres con EM: 66.7%; hombres sanos: 69.1%).

Las frecuencias de genotipos y alelos entre hombres con EM y voluntarios sanos estaban en equilibrio de Hardy-Weinberg.

	HOMBRES CON EM (n=90; 180 alelos)		HOMBRES CONTROL (n=97; 194 alelos)		p
	n	%	n	%	
GENOTIPOS					
<i>LINGO1</i> rs9652490 A/A	58	64.4	69	71.1	0.651
<i>LINGO1</i> rs9652490 A/G	30	33.3	26	26.8	
<i>LINGO1</i> rs9652490 G/G	2	2.2	2	2.1	
ALELOS	n	%	n	%	OR (IC 95%) p
<i>LINGO1</i> rs9652490 A	146	81.1	164	84.5	1.27 (0.74-2.18)
<i>LINGO1</i> rs9652490 G	34	18.9	30	15.5	0.380

Tabla 13. Genotipos y variantes alélicas de *LINGO1* rs9652490 en hombres con EM y controles (OR: odds ratio; IC: intervalo de confianza).

	HOMBRES CON EM (n=90; 180 alelos)		HOMBRES CONTROL (n=97; 194 alelos)		p
	n	%	n	%	
GENOTIPOS					
<i>LINGO1</i> rs11856808 C/C	42	46.7	44	45.4	0.313
<i>LINGO1</i> rs11856808 C/T	36	40.0	46	47.4	
<i>LINGO1</i> rs11856808 T/T	12	13.3	7	7.2	
ALELOS	n	%	n	%	OR (IC 95%) p
<i>LINGO1</i> rs11856808 C	120	66.7	134	69.1	1.08 (0.60-1.43)
<i>LINGO1</i> rs11856808 T	60	33.3	60	30.9	0.725

Tabla 14. Genotipos y variantes alélicas de *LINGO1* rs11856808 en hombres con EM y controles (OR: odds ratio; IC: intervalo de confianza).

15.4- Genotipos y variantes alélicas de *LINGO1* rs9652490 y rs1185680 de pacientes con EM y controles, según la forma clínica de EM

En el examen de los genotipos de *LINGO1* rs9652490 y *LINGO1* rs11856808 y de sus correspondientes variantes alélicas en pacientes con EM y controles, según la forma evolutiva de la enfermedad (EMRR, EMSP, EMPP), no se identificaron diferencias estadísticamente significativas (tablas 15-20).

En efecto, al analizar el genotipo *LINGO1* rs9652490 y, como puede observarse en las tablas 15, 17 y 19, el genotipo *LINGO1* rs9652490 A/A fue el más frecuentemente identificado en las distintas formas evolutivas de EM (EMRR: 64.2%; EMSP: 68.1%; EMPP: 76.7%), así como en los controles (69.8%). Por el contrario, el genotipo más infrecuente en las 3 formas clínicas de EM y en el grupo de voluntarios sanos fue *LINGO1* rs9652490 G/G (EMRR: 0.6%; EMSP: 3.3%; EMPP: 0.0%; grupo control: 3.1%). En cuanto al examen de las variantes alélicas *LINGO1* rs9652490 A y *LINGO1* rs9652490 G, se evidenció un claro predominio de la primera en las 3 formas evolutivas de EM (EMRR: 81.8%; EMSP: 82.4%; EMPP: 88.4%), así como en el grupo control (83.3%) (tablas 15, 17 y 19).

Por otro lado, el análisis del genotipo *LINGO1* rs11856808 (tablas 16, 18 y 20) mostró como el genotipo *LINGO1* rs11856808 T/T fue el menos frecuente en las

distintas subpoblaciones examinadas (EMRR: 9.4%; EMSP: 14.3%; EMPP: 4.7%; y grupo control: 7.5%). No se identificaron diferencias estadísticamente significativas al comparar la distribución de los otros dos genotipos estudiados de *LINGO1* rs11856808, si bien, el genotipo *LINGO1* rs11856808 C/C mostró una tendencia a identificarse más frecuentemente en pacientes con EMPP al compararlo con el grupo control, sin alcanzar significación estadística (EMPP: 62.8%; grupo control: 45.6%). Al realizar el estudio de los alelos *LINGO1* rs11856808 C y *LINGO1* rs11856808 T, observamos que la frecuencia de la forma alélica *LINGO1* rs11856808 C era claramente mayor en las 3 formas clínicas de EM (EMRR: 66.4%; EMSP: 66.5%; EMPP: 79.1%), así como en el grupo de sujetos control (69%) (tablas 16, 18 y 20). Como era de esperar, se identificó una tendencia no estadísticamente significativa a favor de una presencia más frecuente del alelo *LINGO1* rs11856808 C entre pacientes con EMPP frente a voluntarios sanos ($p=0.056$).

Las frecuencias de genotipos y alelos entre pacientes con EMRR, EMSP y EMPP, y los sujetos sanos estaban en equilibrio de Hardy-Weinberg.

GENOTIPOS	PACIENTES CON EMRR (n=159; 318 alelos)		GRUPO CONTROL (n=318; 636 alelos)		P
	n	%	n	%	
<i>LINGO1</i> rs9652490 A/A	102	64.2	222	69.8	0.055
<i>LINGO1</i> rs9652490 A/G	56	35.2	86	27.0	
<i>LINGO1</i> rs9652490 G/G	1	0.6	10	3.1	
ALELOS	n	%	n	%	OR (IC 95%) P
<i>LINGO1</i> rs9652490 A	260	81.1	530	83.3	1.12 (0.78-1.59)
<i>LINGO1</i> rs9652490 G	58	18.2	106	16.7	0.544

Tabla 15. Genotipos y variantes alélicas de *LINGO1* rs9652490 en pacientes con EMRR y controles (OR: odds ratio; IC: intervalo de confianza).

GENOTIPOS	PACIENTES CON EMRR (n=159; 318 alelos)		GRUPO CONTROL (n=318; 636 alelos)		P
	n	%	n	%	
<i>LINGO1</i> rs11856808 C/C	67	42.1	145	45.6	0.670
<i>LINGO1</i> rs11856808 C/T	77	48.4	149	46.9	
<i>LINGO1</i> rs11856808 T/T	15	9.4	24	7.5	
ALELOS	n	%	n	%	OR (IC 95%) P
<i>LINGO1</i> rs11856808 C	211	66.4	439	69.0	1.13 (0.85-1.51)
<i>LINGO1</i> rs11856808 T	107	33.6	197	31.0	0.404

Tabla 16. Genotipos y variantes alélicas de *LINGO1* rs11856808 en pacientes con EMRR y controles (OR: odds ratio; IC: intervalo de confianza).

GENOTIPOS	PACIENTES CON EMSP (n=91; 182 alelos)		GRUPO CONTROL (n=318; 636 alelos)		P
	n	%	n	%	
<i>LINGO1</i> rs9652490 A/A	62	68.1	222	69.8	0.956
<i>LINGO1</i> rs9652490 A/G	26	28.6	86	27.0	
<i>LINGO1</i> rs9652490 G/G	3	3.3	10	3.1	
ALELOS	n	%	n	%	OR (IC 95%) P
<i>LINGO1</i> rs9652490 A	150	82.4	530	83.3	1.07 (0.69-1.65)
<i>LINGO1</i> rs9652490 G	32	17.6	106	16.7	0.771

Tabla 17. Genotipos y variantes alélicas de *LINGO1* rs9652490 en pacientes con EMSP y controles (OR: odds ratio; IC: intervalo de confianza).

GENOTIPOS	PACIENTES CON EMSP (n=91; 182 alelos)		GRUPO CONTROL (n=318; 636 alelos)		P
	n	%	n	%	
<i>LINGO1</i> rs11856808 C/C	43	47.3	145	45.6	0.095
<i>LINGO1</i> rs11856808 C/T	35	38.5	149	46.9	
<i>LINGO1</i> rs11856808 T/T	13	14.3	24	7.5	
ALELOS	n	%	n	%	OR (IC 95%) P
<i>LINGO1</i> rs11856808 C	121	66.5	439	69.0	1.12 (0.79-1.60)
<i>LINGO1</i> rs11856808 T	61	33.5	197	31.0	0.515

Tabla 18. Genotipos y variantes alélicas de *LINGO1* rs11856808 en pacientes con EMSP y controles (OR: odds ratio; IC: intervalo de confianza).

GENOTIPOS	PACIENTES CON EMPP (n=43; 86 alelos)		GRUPO CONTROL (n=318; 636 alelos)		P
	n	%	n	%	
<i>LINGO1</i> rs9652490 A/A	33	76.7	222	69.8	0.405
<i>LINGO1</i> rs9652490 A/G	10	23.3	86	27.0	
<i>LINGO1</i> rs9652490 G/G	0	0.0	10	3.1	
ALELOS	n	%	n	%	OR (IC 95%) P
<i>LINGO1</i> rs9652490 A	76	88.4	530	83.3	0.66 (0.33-1.31)
<i>LINGO1</i> rs9652490 G	10	11.6	106	16.7	0.232

Tabla 19. Genotipos y variantes alélicas de *LINGO1* rs9652490 en pacientes con EMPP y controles (OR: odds ratio; IC: intervalo de confianza).

GENOTIPOS	PACIENTES CON EMPP (n=43; 86 alelos)		GRUPO CONTROL (n=318; 636 alelos)		P
	n	%	n	%	
<i>LINGO1</i> rs11856808 C/C	27	62.8	145	45.6	0.112
<i>LINGO1</i> rs11856808 C/T	14	32.6	149	46.9	
<i>LINGO1</i> rs11856808 T/T	2	4.7	24	7.5	
ALELOS	n	%	n	%	OR (IC 95%) P
<i>LINGO1</i> rs11856808 C	68	79.1	439	69.0	0.59 (0.34-1.02)
<i>LINGO1</i> rs11856808 T	18	20.9	197	31.0	0.056

Tabla 20. Genotipos y variantes alélicas de *LINGO1* rs11856808 en pacientes con EMPP y controles (OR: odds ratio; IC: intervalo de confianza).

15.5- Genotipos y variantes alélicas de *LINGO1* rs9652490 y rs11856808 de pacientes con EM. Comparación según edad de inicio de la enfermedad

En el examen de los genotipos de *LINGO1* rs9652490 y *LINGO1* rs11856808 y de sus correspondientes variantes alélicas en pacientes con EM, en relación con la edad de inicio de la enfermedad, no se identificaron diferencias estadísticamente significativas (tablas 21 y 22).

GENOTIPOS	EDAD DE INICIO DE LA EM (media ± DE)	P
<i>LINGO1</i> rs9652490 A/A	33.0 ± 11.5	0.374
<i>LINGO1</i> rs9652490 A/G	32.4 ± 9.8	
<i>LINGO1</i> rs9652490 G/G	38.5 ± 24.7	
ALELOS		
<i>LINGO1</i> rs9652490 A	32.6 ± 10.2	0.825
<i>LINGO1</i> rs9652490 G	33.0 ± 11.4	

Tabla 21. Genotipos y variantes alélicas de *LINGO1* rs9652490 en pacientes con EM: edad media de inicio de la enfermedad.

GENOTIPOS	EDAD DE INICIO DE LA EM (media \pm DE)	P
<i>LINGO1</i> rs11856808 C/C	32.5 \pm 11.5	0.100
<i>LINGO1</i> rs11856808 C/T	32.6 \pm 10.6	
<i>LINGO1</i> rs11856808 T/T	35.6 \pm 10.9	
ALELOS		
<i>LINGO1</i> rs11856808 C	33.2 \pm 10.7	0.268
<i>LINGO1</i> rs11856808 T	32.5 \pm 11.5	

Tabla 22. Genotipos y variantes alélicas de *LINGO1* rs11856808 en pacientes con EM: edad media de inicio de la enfermedad.

DISCUSIÓN

16.- COMPOSICIÓN Y REPRESENTATIVIDAD DE LA MUESTRA

Se ha realizado un estudio observacional descriptivo junto con otro observacional analítico de casos y controles, donde se incluyeron 293 casos y 318 controles de ambos sexos y sin límites de edad. Los casos estaban diagnosticados de EM de acuerdo a los criterios diagnósticos de McDonald et al. de 2001⁸⁰. Los pacientes fueron incluidos independientemente del tiempo de evolución de su enfermedad, la forma evolutiva, actividad de la misma y el tratamiento actual o previo utilizado, no debiendo asociar otra enfermedad neurológica. Tanto los casos como los individuos control seleccionados no debían tener un familiar diagnosticado de EM para evitar posibles sesgos.

Las variables recogidas con el fin de determinar la posible relación existente entre el desarrollo de EM y los SNPs rs9652490 y rs11856808 del gen *LINGO1* fueron dos cualitativas (sexo, forma clínica de EM) y una cuantitativa (edad de inicio de la EM).

Debido al diseño emparejado del estudio, el grupo de pacientes con EM y el formado por sujetos control mostraban prácticamente la misma proporción de

varones y mujeres, y una distribución de la edad en el momento de inclusión muy homogénea. Así, el grupo de casos estaba compuesto por 203 mujeres (69.3%) y 90 varones (30.7%), y el grupo de controles por 221 mujeres (69.5%) y 97 varones (30.5%), siendo las edades medias en el momento de inclusión de 43.9 y 43.8 años, respectivamente.

Nuestra serie de pacientes con EM muestra una relación mujer/varón de 2.2:1 y una media de edad de aparición de los primeros síntomas de 32.8 años. Estos datos son concordantes con las descripciones de la historia natural de la enfermedad (relación mujer/varón de 2:1; edad de máxima incidencia alrededor de los 30 años)³¹⁻³³. Si bien en algunos estudios se ha identificado un comienzo más tardío de la EM en el sexo masculino²⁹⁸, en nuestra población no hemos encontrado diferencias significativas al comparar ambos subgrupos (mujeres: 32.7 años; varones: 33.2 años).

En este estudio se han incluido pacientes con diferentes formas evolutivas de EM, siendo la predominante la forma remitente-recurrente, como ocurre en esta patología⁷⁸ (159 pacientes con EMRR, 91 pacientes con EMSP, 43 pacientes con EMPP). No identificamos ningún caso de EMPR. Al analizar la edad de comienzo de la EM, según la forma evolutiva de la enfermedad, se observó un inicio significativamente más tardío entre los pacientes que padecían formas progresivas, especialmente EMPP (EMRR: 29.5 años; EMSP: 34.9 años; y EMPP: 43.4 años). También se detectó una predilección no estadísticamente significativa por el sexo

masculino en el grupo de pacientes con formas progresivas (EMSP y EMPP). Estas dos particularidades de las formas progresivas están ampliamente descritas en la literatura científica^{299,300}.

La mayoría de los sujetos incluidos en este proyecto (tanto casos como controles) han participado en otros estudios de asociación genética llevados a cabo por nuestro grupo y publicados en los últimos años. Hemos evaluado, como posibles marcadores genéticos modificadores del riesgo para desarrollar EM, los siguientes genes: de la Histamina-N-metil transferasa, la paraoxonasa 1, el receptor de la vitamina D₃ y la proteína tau asociada a microtúbulos³⁰¹⁻³⁰⁴. Actualmente, estamos pendientes de finalizar dos nuevos trabajos en los que hemos examinado los genes de la Glutación-S-transferasa y de la NAD(H): quinona oxirreductasa.

17.- LINGO1 Y EM

La EM se caracteriza por ser una enfermedad inflamatoria desmielinizante del SNC en la que se produce, además, pérdida axonal. La remielinización de las lesiones no es siempre completa debido a varias causas. Entre ellas se considera la posible existencia de factores genéticos y/o microambientales que pudieran bloquear la diferenciación de las OPCs a oligodendrocitos y la producción de mielina^{242,243}. De igual manera, los mecanismos patogénicos del daño axonal y los defectos de su regeneración en la EM tampoco son bien conocidos. Las hipótesis más plausibles apuntan a una confluencia de diversos mecanismos entre los que figuran la falta de soporte trófico del axón por parte de la mielina en las lesiones desmielinizantes, la propia gliosis reactiva que dificulta su regeneración, la presencia de factores solubles que favorezcan su degeneración y/o bloqueen su regeneración, y la posible existencia de genes que condicionen una mayor susceptibilidad a la pérdida axonal y/o a un defecto en su regeneración en los pacientes con EM²⁵⁶⁻²⁵⁸.

LINGO1 es una glicoproteína transmembrana específica del SNC implicada en fenómenos inhibitorios tanto sobre la maduración de los OPCs y la formación de mielina, como sobre la regeneración axonal^{259-264,267,268}. Recientes estudios apuntan, además, a un posible efecto deletéreo sobre el crecimiento y la supervivencia neuronal^{265,266,268,276-279}.

LINGO1 tiene una expresión importante a nivel del hipotálamo, tálamo y neocortex, y una menor expresión en cerebelo y médula espinal³⁰⁵. Esta glicoproteína es codificada por el gen *LINGO1* (OMIM 609791, Gene Identity 84894) localizado en el cromosoma 15q24.3²⁷⁴.

A nivel de la superficie neuronal, LINGO1 interacciona simultáneamente, a través de su dominio extracelular LRR, con otras proteínas (Nogo-66, p75 y TROY/TAJ) formando parte del receptor NgR. La activación de este complejo receptor por proteínas asociadas a la mielina (Nogo-A, MAG, OMgp) desencadena una señalización intracelular, con activación de la GTPasa RhoA, que conduce a la inhibición del crecimiento y regeneración axonal tras la lesión neuronal²⁵⁹⁻²⁶¹. También, a través de su pequeña región citoplasmática, LINGO1 puede unirse al EGFR y modular la vía de señalización de la F13K-Akt, involucrada en los procesos de crecimiento y supervivencia celular^{265,268,276,277}. En este contexto, Inoue y cols. han observado, en neuronas dopaminérgicas de modelos animales de enfermedad de Parkinson, como LINGO1 presenta un efecto regulador a la baja sobre la fosforilación de la proteína Akt, lo que conduce a una menor supervivencia neuronal²⁶⁵. Por otro lado, Fu y cols. han demostrado, en células ganglionares de retina de modelos animales de glaucoma, la interacción de LINGO1 con el receptor TrKB regulando negativamente esta vía de señalización celular lo que conduce también a una disminución en la supervivencia de este grupo de neuronas^{266,278,279}.

LINGO1 también se expresa junto a la proteína p75 en la superficie de oligodendrocitos y OPCs, donde ha demostrado tener un efecto inhibitorio sobre su maduración y la formación de mielina, a través de una activación de la GTPasa RhoA^{262,267,268,275}. Hasta la fecha no se ha identificado la proteína que interacciona con LINGO1 e inicia este proceso.

Teniendo en cuenta las funciones de esta proteína, parece razonable evaluar la posible implicación de LINGO1 en la patogénesis de la EM. Así lo han hecho distintos grupos de investigadores cuyos trabajos sugieren la participación de LINGO1 en la patogenia de esta enfermedad. Mediante estudios anatomopatológicos, se ha observado la existencia de un incremento en la expresión de LINGO1 en las OPCs presentes en las lesiones desmielinizantes de necropsias de pacientes con EM²⁶⁸, así como de la proteína Nogo-A en los oligodendrocitos supervivientes que aparecen en el borde de las lesiones desmielinizantes crónicas activas²⁹⁵. También se ha evidenciado como Nogo-A y el complejo NgR se expresan en lesiones de EM lo que sugiere que la interacción entre ambos pudiera jugar un papel importante en la progresión de la enfermedad³⁰⁶.

Del mismo modo, los datos que nos proporcionan diferentes estudios *in vitro* y en modelos animales de EM, centrados en bloquear la actividad de LINGO1, avalan el papel que juega esta proteína en los procesos de bloqueo en la remielinización y

regeneración axonal que se produce en la EM. Así, se ha comprobado como la inhibición de la actividad de LINGO1 promueve los procesos de diferenciación de las OPCs y la formación de mielina por parte de los oligodendrocitos, lo que conduce al desarrollo de axones mielinizados^{264,269-272}. La maduración de los oligodendrocitos ha demostrado ser vital para la correcta mielinización de los axones a los que la mielina aporta un soporte trófico esencial para su supervivencia. En este contexto, estudios en ratones *knockout* para LINGO1 han puesto de manifiesto un comienzo más precoz de la mielinización de los axones del SNC y una mayor resistencia al desarrollo de la EAE inducida por MOG^{264,269}. Además, varios trabajos en modelos experimentales de desmielinización y remielinización han demostrado una inducción de la diferenciación de las OPCs y de la remielinización mediante antagonistas de LINGO1²⁶⁹⁻²⁷². Por otro lado, se ha observado una recuperación funcional y aumento de la integridad de los axones en la EAE inducida por MOG con el uso de antagonistas de LINGO1²⁶⁹.

LINGO1 también se ha implicado en la patogénia de otras enfermedades neurodegenerativas en las que la supervivencia de determinados grupos neuronales se ve comprometida. Inoue y cols.²⁶⁵ detectaron un aumento de la expresión de LINGO1 en las neuronas de la sustancia negra de pacientes con enfermedad de Parkinson en comparación con individuos sanos de la misma edad, así como en distintos modelos animales de esta enfermedad. También, comprobaron en modelos animales de enfermedad de Parkinson, tanto en ratones *knockout* para LINGO1

como mediante el uso de antagonistas de LINGO1, una mayor supervivencia de las neuronas dopaminérgicas que se acompañaba de un aumento en los niveles de Akt fosforilada²⁶⁵. Según Inoue y cols. este efecto neuroprotector resultante del bloqueo de la actividad de LINGO1 se deriva de su falta de unión al receptor EGFR y consecuentemente su imposibilidad para disminuir la actividad de la vía de señalización EGFR-PI3K-Akt, lo que se traduce en un aumento de los niveles de Akt fosforilada y una mayor supervivencia neuronal²⁶⁵.

Recientemente, también se ha comprobado una sobreexpresión de LINGO1 en la corteza cerebelosa de pacientes con temblor esencial frente a la de individuos sanos²⁸¹. Kuo y cols., mediante técnicas de inmunohistoquímica en estudios postmortem de cerebros de pacientes con temblor esencial, han detectado la sobreexpresión de LINGO1 en las regiones distales de los axones de las células en cesta del cerebelo²⁸¹. Teniendo en cuenta estos hallazgos anatomopatológicos, estos investigadores consideran que LINGO1 podría desempeñar un papel en la pérdida de las células de Purkinje y de las células en cesta observada en las necropsias de pacientes con temblor esencial. Y en este sentido, Zhou y cols.²⁷⁷ plantean un mecanismo de acción similar al descrito por Inoue y cols.²⁶⁵ en la enfermedad de Parkinson, para tratar de explicar la menor supervivencia de estos grupos neuronales en los pacientes con temblor esencial. No obstante, todavía no se disponen de estudios que confirmen esta hipótesis.

Por otra parte, Fu y cols.²⁷⁹ han observado, en modelos animales de glaucoma, como LINGO1 se co-expresaba con el receptor TrkB en las células ganglionares de la retina cuya supervivencia se veía comprometida. TrkB es el receptor de la neurotrofina BDNF (del inglés *brain derived neurotrophic factor*) y se encuentra implicado en una vía de señalización celular crucial para la supervivencia neuronal. Este grupo de investigadores comprobaron como LINGO1 interaccionaba con el receptor TrkB regulando negativamente su activación en las células ganglionares de la retina de modelos animales de glaucoma²⁶⁶. Asimismo, demostraron un aumento de la supervivencia de estos grupos de neuronas con el uso de antagonistas de LINGO1, al evitar dicha interacción²⁶⁶.

Teniendo en cuenta todos estos hallazgos parecía razonable pensar que la proteína LINGO1 participaba de forma activa en la patogenia de la EM, y por lo tanto, polimorfismos genéticos comunes del gen *LINGO1* podrían modificar el riesgo a padecer esta enfermedad.

18.- POLIMORFISMOS *LINGO1* rs9652490 Y rs11856808 Y RIESGO PARA EL DESARROLLO DE EM

En los últimos años ha habido un creciente interés por identificar los posibles genes de susceptibilidad de la EM. A lo largo de los últimos decenios se han evaluado, mediante diversos estudios de ligamiento y asociación alélica, numerosos genes candidatos según la idea de una patogenia mediada inmunológicamente contra antígenos de la mielina del SNC. Hasta la fecha los genes del sistema HLA han sido los marcadores genéticos que de manera más consistente y reiterada se han relacionado con la predisposición a padecer EM, y en concreto el haplotipo DRB1*1501-DQA1*0102-DQB1*0602^{54,55,194}.

En los últimos años, las nuevas innovaciones en tecnología han permitido realizar los llamados GWAS que, mediante la secuenciación completa de los genomas de diferentes individuos, permiten examinar la asociación de múltiples SNPs a enfermedades concretas. Los GWAS resultan de especial interés en el estudio de enfermedades multigénicas, como es el caso de la EM. Hasta la fecha se han realizado once GWAS para detectar aquellos posibles genes implicados en la génesis de la EM, identificándose más de 50 *loci* diferentes⁵⁶⁻⁶⁷. Los resultados disponibles de estos análisis confirman que los genes asociados a la EM están mayoritariamente

codificados en la región del HLA, pero no sólo en esa localización. Muchas de las variantes alélicas identificadas se localizan en genes con funciones inmunológicas (receptores de IL 2 y 7, CD58, CD6, CD40 y otros), y la mayoría se asocian con otras enfermedades autoinmunes. Por otro lado, se ha observado que se identifican nuevos genes de susceptibilidad de la enfermedad, conforme se amplía el número de sujetos analizados en los GWAS. Esto es especialmente aplicable para aquellos genes no localizados en el CMH, cuyo efecto sobre el riesgo a padecer EM parece más modesto¹⁹³. Por tanto, se considera que en el futuro, conforme se examinen mayores cohortes de individuos, se continuarán identificándose nuevas variantes alélicas de riesgo para el desarrollo de EM^{67,193}.

A pesar de que el gen *LINGO1* no se ha identificado como gen de susceptibilidad para padecer EM en los estudios GWAS realizados hasta la actualidad, el posible papel de la glicoproteína LINGO1 en la patogenia de esta enfermedad sugiere que puede ser un gen candidato para modificar el riesgo de padecer EM. No existen estudios previos sobre la posible asociación de polimorfismos genéticos de *LINGO1* y el riesgo de desarrollar EM.

En esta tesis se ha planteado el análisis de polimorfismos genéticos comunes para *LINGO1* (rs9652490 y rs11856808) con el fin de evaluar la hipótesis de que éstos podrían influir en la variabilidad individual en la remielinización y la degeneración y regeneración axonal, como papel en la fisiopatogenia de la EM.

Se han descrito hasta la fecha 517 SNPs diferentes dentro del gen *LINGO1* (OMIM 609791, Gene Identity 84894; coordenadas: 77905369-77988490) (www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/SNP). En la mayoría de ellos, la variante alélica más rara presenta una frecuencia inferior al 1%, tratándose por tanto de variantes raras. En otros casos, todavía las frecuencias alélicas de determinados SNPs están pendientes de estudio. En el caso de los SNPs rs11856808 (coordenada: 77972770) y rs9652490 (coordenada: 77963887), localizados ambos en el intrón 3, la frecuencia de sus distintas variantes alélicas es superior al 1%. Teniendo en cuenta que ambos SNPs se localizan en una región intrónica del gen *LINGO1*, se valoró la posibilidad de que determinadas variantes de los mismos pudieran tener como efecto un aumento en la expresión de los niveles de *LINGO1*, potenciándose el efecto de sus funciones en los pacientes con EM.

Los SNPs examinados en esta tesis han sido estudiados como posibles polimorfismos genéticos de susceptibilidad para el desarrollo de otras enfermedades neurodegenerativas en cuya patogenia la proteína *LINGO1* parece estar implicada, y que han sido comentadas en el apartado anterior. Así, existen diferentes estudios realizados en poblaciones europeas, norteamericanas y asiáticas en los que se ha demostrado de forma consistente una asociación entre los genotipos y las variantes alélicas de *LINGO1* rs9652490 y *LINGO1* rs11856808 y el temblor esencial²⁸²⁻²⁸⁷. Recientemente, Jiménez-Jiménez y cols.²⁸⁸ han publicado un meta-análisis

incluyendo a 3.972 pacientes con temblor esencial y 20.714 individuos sanos para el examen del SNP *LINGO1* rs9652490, y 2.076 pacientes con temblor esencial y 18.792 controles para el análisis del SNP *LINGO1* rs11856808, en el que demostraron una asociación entre los polimorfismos de rs11856808 y el riesgo global de padecer temblor esencial así como la forma familiar, y entre los polimorfismos de rs9652490 y el riesgo de padecer temblor esencial familiar exclusivamente. Este mismo análisis se ha realizado en pacientes con enfermedad de Parkinson pero los resultados no han sido reproducibles en las diferentes poblaciones examinadas^{286,289-292}. En este contexto, en el año 2012 se han publicado dos meta-análisis de forma independiente en los que no se ha encontrado asociación entre los polimorfismos de *LINGO1* rs9652490 y *LINGO1* rs11856808 y el riesgo de padecer enfermedad de Parkinson^{293,294}.

En el presente estudio, no se han encontrado diferencias entre las frecuencias de los genotipos de *LINGO1* rs9652490 y *LINGO1* rs11856808, así como de sus variantes alélicas, entre pacientes diagnosticados de EM y voluntarios sanos. Tampoco hemos detectado diferencias al realizar este mismo análisis por subgrupos en función del género. Finalmente, no hemos observado relación entre los genotipos y variantes alélicas de estos dos SNPs del gen *LINGO1* y la edad de inicio de la enfermedad ni su forma evolutiva, en nuestra población de pacientes con EM.

En conclusión, los resultados de esta tesis sugieren que los genotipos y las variantes alélicas de *LINGO1* rs9652490 y *LINGO1* rs11856808 no presentan relación con el riesgo de padecer EM en la población caucasiana española.

19.- LIMITACIONES DEL ESTUDIO

El presente estudio presenta algunas limitaciones que se comentan a continuación:

- Aunque el tamaño de nuestras dos poblaciones de estudio es suficiente para identificar un odds ratio de hasta 1.5, una asociación inferior entre los genotipos y las variantes alélicas de *LINGO1* rs9652490 y *LINGO1* rs11856808 y el riesgo de padecer EM no sería detectada.
- Al tratarse de un estudio transversal, en la cohorte de pacientes con EM están incluidos enfermos con diferentes grados de severidad de la enfermedad, duración de la misma y tratamientos recibidos. Por este motivo, en este trabajo no es posible evaluar la posible influencia de los genotipos y las variantes alélicas de *LINGO1* rs9652490 y *LINGO1* rs11856808 sobre la severidad de la enfermedad, y en concreto, sobre la frecuencia de aparición de brotes y el desarrollo de discapacidad. Para llevar a cabo este análisis sería necesario realizar un estudio prospectivo incluyendo a pacientes con un diagnóstico reciente de EM, un tiempo de seguimiento homogéneo, y unos protocolos de tratamiento uniformes.

CONCLUSIONES

CONCLUSIONES

- 1.- La prevalencia de EM en nuestro estudio es mayor en las mujeres que en los hombres como ocurre en otras poblaciones estudiadas.
- 2.- La edad de inicio de aparición de los primeros síntomas de EM se presentó con mayor prevalencia antes de los 40 años sin diferencias respecto al sexo.
- 3.- Existe una predilección por el sexo masculino y el inicio tardío de la enfermedad en el subgrupo de pacientes con formas progresivas de EM, especialmente con EMPP.
- 4.- Los genotipos y las variantes alélicas de *LINGO1* rs9652490 y *LINGO1* rs11856808 no presentan relación con el riesgo de padecer EM en la población caucasiana española.
- 5.- Los genotipos y las variantes alélicas de *LINGO1* rs9652490 y *LINGO1* rs11856808 no presentan relación con el riesgo de padecer EM, en función del sexo, en la población caucasiana española.

6.- Los genotipos y las variantes alélicas de *LINGO1* rs9652490 y *LINGO1* rs11856808 no influyen en la forma evolutiva de EM que presentan los pacientes, en la población caucasiana española.

7.- Los genotipos y las variantes alélicas de *LINGO1* rs9652490 y *LINGO-1* rs11856808 no influyen en la edad de aparición de los primeros síntomas de la EM, en la población caucasiana española.

BIBLIOGRAFÍA

BIBLIOGRAFÍA

- 1.- Sadovnick AD, Ebers GC. Epidemiology of multiple sclerosis: a critical overview. *Can J Neurol Sci* 1993;20:17-29.
- 2.- Noseworthy JH, Lucchinetti C, Rodríguez M, Weinshenker BG. Multiple sclerosis. *N Engl J Med* 2000;343:938-52.
- 3.- Benito-León J, Morales JM, Rivera-Navarro J, Mitchell AJ. A review about the impact of multiple sclerosis on health-related quality of life. *Disabil Rehabil* 2003;25:1291-303.
- 4.- Jacobs LD, Beck RW, Simon JH, Phillip Kinkel R, Brownscheidle CM, Murray TJ et al. Intramuscular interferon beta-1a therapy initiated during a first demyelinating event in multiple sclerosis. *N Engl J Med* 2000;343:898-904.
- 5.- Comi G, Filippi M, Barkhof F, Durelli L, Edam G, Fernández O et al. Effect of early interferon treatment on conversion to definite multiple sclerosis. *Lancet* 2001;357:1576-82.
- 6.- Kappos L, Polman CH, Freedman MS, Edan G, Hartung HP, Miller DH et al. Treatment with interferon beta-1b delays conversion to clinically definite MS in patients with clinically isolated syndromes. *Neurology* 2006;67:1242-49.
- 7.- Comi G, Martinelli V, Rodegher M, Moiola L, Bajenaru O, Carra A et al. Effect of glatiramer acetate on conversion to clinically definite multiple sclerosis in patients with clinically isolated syndromes (PreCISe): a randomised, double-blind, placebo-controlled trial. *Lancet* 2009;374:1503-1511.

- 8.- Carswell R. Pathological Anatomy: Illustrations of the elementary forms of disease. London: Orne, Brown, Green and Longman. 1838.
- 9.- Cruveilhier J. Anatomie pathologique du corps humain; descriptions avec figures lithographiées et coloriées: des diverses alterations morbides dont le corps humain est susceptible. Paris: JB Bailliere, 40 livraisons. 1841.
- 10.-Charcot JM. Sclerose du cordons lateraux de la moelle epiniere chez une femme hysterique atteinte de contracture permanente des quatres membres. L'Union Medicale 1868;25:451-457.
- 11.-Charcot JM. Sclerose du cordons lateraux de la moelle epiniere chez une femme hysterique atteinte de contracture permanente des quatres membres. L'Union Medicale 1868;25:467-472.
- 12.-Charcot JM. Histologie de la sclerose en plaque. Gazette Hospital (Paris) 1868;41:554-566.
- 13.-Meader R. Does the history of multiple sclerosis go back as far as the 4th century? Acta Neurol Scand 1979;60:189-192.
- 14.-Butler MA, Bennett TL. In search of a conceptualization of multiple sclerosis: a historical perspective. Neuropsychology review 2003;13:93-112.
- 15.-Dawson J. The histology of disseminated sclerosis. Transactions of the Royal Society of Edinburgh 1916;50:517-740.
- 16.-Kabat EA, Moore DH, Landow H. An electrophoretic study of the protein components in cerebrospinal fluid and their relationship to the serum proteins. J Clin Invest 1942;21:571-577.
- 17.-Kurtzke JF. A new scale for evaluating disability in multiple sclerosis. Neurology 1955;5:580-583.

-
- 18.-Schumacher GA, Beebe G, Kibler RF, Kurland LT, 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 NY Acad Sci* 1965;122:552-568.
- 19.-Young IR, Hall AS, Pallis CA, Legg NJ, Bydder GM, Steiner RE. Nuclear magnetic resonance imaging of the brain in multiple sclerosis. *Lancet* 1981;2:1063-1066.
- 20.-Lukes SA, Crooks LE, Aminoff MJ, Kaufmann L, Panitch HS, Mills C, et al. Nuclear magnetic resonance imaging of the brain in multiple sclerosis. *Ann Neurol* 1983;13:592-601.
- 21.-Stewart WA, Hall LD, Berry K, Paty DW. Correlation between NMR scan and brain slice data in multiple sclerosis. *Lancet* 1984;2:412-415.
- 22.-Ormerod IEC, Miller DH, McDonald WI, du Boulay EPGH, Rudge P, Kendall BE, et al. The role of NMR imaging in the assessment of multiple sclerosis and isolated neurological lesions: a quantitative study. *Brain* 1987;110:1579-1616.
- 23.-Grossman RE, Gonzalez-Scarano F, Atlas SW, Galletta SW, Silberberg DH. Multiple sclerosis: gadolinium enhancement in MR imaging. *Radiology* 1986;161:721-725.
- 24.-Miller DH, Rudge P, Johnson G, Kendall BE, MacManamus DG, Moseley IF, et al. Serial gadolinium enhanced magnetic resonance imaging in multiple sclerosis. *Brain* 1988;111:927-939.
- 25.-Benito-León J, Pisa D, Alonso R, Calleja P, Díaz-Sánchez M, Carrasco L. Association between multiple sclerosis and *Candida* species: evidence from a case-control study. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2010;29:1139-1145.

-
- 26.-Sumaya CV, Myers LW, Ellison GW, Ench Y. Increased prevalence and titers of Epstein-Barr virus antibodies in patients with multiple sclerosis. *Ann neurol* 1985;17:371-377.
- 27.-Kimberling DW, Whitley RJ. Human herpesvirus 6: neurologic implications of a newly described viral pathogen. *J Neurovirol* 1998;45:474-485.
- 28.-Ross RT. The varicella-zoster virus and multiple sclerosis. *J Clin Epidemiol* 1998;51:533-553.
- 29.-Layh-Schmitt G, Bendl C, Hildt U. Evidence for infection with *Chlamydia pneumoniae* in a subgroup of patients with multiple sclerosis. *Ann Neurol* 2000;47:652-655.
- 30.-Borman J, Roblin PM, Sundstrom P. Failure to detect *Chlamydia pneumoniae* in the central nervous system of patients with multiple sclerosis. *Neurology* 2000;54:265.
- 31.-Miller A. Clinical features. En: Cook SD (Ed). *Handbook of Multiple Sclerosis*. New York: Marcel Dekker, 1990:169-186.
- 32.-Duquette P, Pleines J, Girard M, Charest L, Senecal-Quevillon M, Masse C. The increased susceptibility of women to multiple sclerosis. *Can J Neurol Sci* 1992;19:466-471.
- 33.-Kurtzke JF. Epidemiologic evidence of multiple sclerosis as an infection. *Clin Microbiol Rev* 1993;6:382-427.
- 34.-Pugliatti M, Sotgiu S, Rosati G. The worldwide prevalence of multiple sclerosis. *Clin Neurol Neurosurg* 2002;104:182-91.
- 35.-Kurtzke JF. Multiple sclerosis: changing times. *Neuroepidemiology* 1991;10:1-8.
- 36.-Weinshenker BG. Epidemiology of multiple sclerosis. *Neurol Clin* 1996;14:291-308.

-
- 37.-Bufill E, Blesa R, Galán I, Dean G. Prevalence of multiple sclerosis in the region of Osona, Catalonia, Northern Spain. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 1995;58:577-581.
- 38.-Rosati G, Aiello I, Pirastru MI, Mannu L, Sanna G, Sau GF, et al. Epidemiology in multiple sclerosis in northwestern Sardinia compared to other Italians. *Neuroepidemiology* 1996;15:10-19.
- 39.-Otero S, Batlle J, Bonaventura I, Brieva L, Bufill E, Cano A, et al. Situación epidemiológica actual de la esclerosis múltiple: pertinencia y puesta en marcha de un registro poblacional de nuevos casos en Cataluña. *Rev Neurol* 2010;50:623-633.
- 40.-Fernández O. Epidemiología de la esclerosis múltiple en España. En Alfaro A, Palao A, Sancho J eds. *Neuroepidemiología*. Barcelona. MCR;1990:115-122.
- 41.-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;44:425-429.
- 42.-Sempere AP, Clavería LE, Duarte J, Coria F, Cabezas C. Multiple sclerosis in Spain. *Neurology* 1995;45:202.
- 43.-Uría DF, Abad P, Calatayud MT, Virgala P, Diaz A, Chamizo C, et al. Multiple sclerosis in Gijon health district, Asturias, northern Spain. *Acta Neurol Scand* 1997;96:375-379.
- 44.-Benito-León J, Martín J, Vela L, Villar ME, Felgueroso B, Marrero C, et al. Multiple sclerosis in Móstoles, central Spain. *Acta Neurol Scand* 1998;98:238-242.
- 45.-Tola MA, Yugueros MI, Fernández-Buey N, Fernández-Herranz R. Prevalence of Multiple Sclerosis in Valladolid, northern Spain. *J Neurol* 1999;246:170-174.
- 46.-Casquero P, Villoslada P, Montalbán X, Torrent M. Frequency of multiple sclerosis in Menorca, Balearic islands, Spain. *Neuroepidemiology* 2001;20:129-133.

-
- 47.-Modrego PJ, Pina MA. Trends in prevalence and incidence of multiple sclerosis in Bajo Aragón, Spain. *J Neurol Sci* 2003;216:89-93.
- 48.-Aladro Y, Alemany MJ, Pérez-Vieitez MC, Amela R, Conde M, Reyes MP, et al. Prevalence and incidence of multiple sclerosis in Las Palmas, Canary Islands, Spain. *Neuroepidemiology* 2005;24:70-75.
- 49.-Ares B, Prieto JM, Lema M, Dapena D, Arias M, Noya M. Prevalence of multiple sclerosis in Santiago de Compostela (Galicia, Spain). *Mult Scler* 2007;13:262-264.
- 50.-Sadovnick AD, Baird PA, Ward RH. Multiple Sclerosis: update risks for relatives. *Am J Med Genet* 1988;29:533-541.
- 51.-Sadovnick AD, Armstrong H, Rice GP, Bulman D, Hashimoto L, Paty DW, et al. A population-based study of multiple sclerosis in twins: update. *Ann Neurol* 1993;33:281-285.
- 52.-Sadovnick AD, Dircks A, Ebers GC. Genetic counselling in multiple sclerosis: risks to sibs and children of affected individuals. *Clin Genet* 1999;56:118-122.
- 53.-Poser CM. Viking voyages: the origin of multiple sclerosis? An essay in medical history. *Acta Neurol Scand* 1995;161:11-22.
- 54.-Olerup O, Hillert J. HLA class II-associated genetic susceptibility in multiple sclerosis: a critical evaluation. *Tissue Antigens* 1991;38:1-15.
- 55.-Farral M. Mapping genetic susceptibility to multiple sclerosis. *Lancet* 1996;348:1674-1675.
- 56.-International Multiple Sclerosis Genetics Consortium, Hafler DA, Compston A, Sawcer S, et al. Risk alleles for multiple sclerosis identified by a genome-wide study. *N Engl J Med* 2007;357:851-862.

-
- 57.-Comabella M, Craig DW, Camiña-Tato M, Morcillo M, Lopez C, Navarro A, et al. Identification of a novel risk locus for multiple sclerosis at 13q31.3 by a pooled genome-wide scan of 500.000 single nucleotide polymorphisms. *PLoS One* 2008;3(10):e3490.
- 58.-Aulchenko YS, Hoppenbrouwers IA, Ramagopalan SV, Broer L, Jafari N, Hillert J, et al. Genetic variation in the KIF1B influences susceptibility to multiple sclerosis. *Nat Genet* 2008;40:1402-1403.
- 59.-Baranzini SE, Wnag J, Gibson RA, Galwey N, Naegelin Y, Barkhof T, et al. Genome-wide association analysis of susceptibility and clinical phenotype in multiple sclerosis. *Hum Mol genet* 2009;18:767-778.
- 60.-Baranzini SE, Galwey NW, Wang J, Kahnkhanian P, Lindnerg R, Pelletir R, et al. Pathway and network-based analysis of genome-wide association studies in multiple sclerosis. *Hum Mol Genet* 2009;18:2078-2090.
- 61.-De Jager PL, Jia X, Wang J, de Bakker PI, Ottoboni I, Aggarwal NT, et al. Meta-analysis of genome loci scans and replication identify CD6, IRF8, TNFRSF1A as new multiple sclerosis susceptibility loci. *Nat Genet* 2009;41:776-782.
- 62.-Australian and New Zealand Multiple Sclerosis Genetics Consortium (ANZgene). Genome-wide association study identifies new multiple sclerosis susceptibility loci on chromosomes 12 and 20. *Nat Genet* 2009;41:824-828.
- 63.-International Multiple Sclerosis Genetics Consortium, Bush WS, Sawcer SJ, De Jager PL, Oksenberg JR, McCauley JL, et al. Evidence for polygenic susceptibility to multiple sclerosis- the shape of things to come. *Am J Hum Genet* 2010;86:621-625.

-
- 64.-International Multiple Sclerosis Genetics Consortium. Comprehensive follow-up of the first genome-wide association study of multiple sclerosis identifies KIF21B and TMEM39A as susceptibility loci. *Hum Mol Genet* 2010;19:953-962.
- 65.-Jakkula E, Leppä V, Sulonen AM, Varilo T, Kallio S, Kemppinen A, et al. Genome-wide associations study in a high-risk isolate for multiple sclerosis reveals associated variants in STAT3 gene. *Am J Hum Genet* 2010;86:285-291.
- 66.-Sanna S, Pitzalis M, Zoledziewska M, Zara I, Sidore C, Murru R, et al. Variants within immunoregulatory CBLB gene are associated with multiple sclerosis. *Nat Gene* 2010;43:495-497.
- 67.-International Multiple Sclerosis Genetics Consortium, Wellcome Trust Case Control 2, Sawcer S, Hellenthal G, Prinen M, Spencer CC, et al. Genetic risk and a primary role for cell-mediated immune mechanisms in multiple sclerosis. *Nature* 2011;476:214-219.
- 68.-Raine CS, Cross AH. Axonal dystrophy as a consequence of long-term demyelination. *Lab Invest* 1989;60:714-725.
- 69.-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;338:278-285.
- 70.-Bö L, Vedeler CA, Nyland HI, Trapp BD, Mörk SJ. Subpial demyelination in the cerebral cortex of multiple sclerosis patients. *J Neuropathol Exp Neurol* 2003;62:723-732.
- 71.-Tanaka R, Iwasaki Y, Koprowski H. Ultrastructural studies of perivascular cuffing cells in multiple sclerosis brain. *Am J Pathol* 1975;81:467-478.
- 72.-Prineas JW, Raine CS. Electron microscopy and immunoperoxidase studies of early multiple sclerosis. *Neurology* 1976;26:29-32.

- 73.-Adams CW, Abdulla YH, Torres EM, Poston NR. Periventricular lesions in multiple sclerosis: their perivenous origin and relationship to granular ependymitis. *Neuropathol Appl Neurobiol* 1987;13:141-152.
- 74.-Prineas JW, Wright RG. Macrophages, lymphocytes, and plasma cells in the perivascular compartment of chronic multiple sclerosis. *Lab Invest* 1978;39:409-421.
- 75.-Adams CW, Poston RN, Buck SJ. Pathology, histochemistry and immunocytochemistry of lesions in acute multiple sclerosis. *J Neurol Sci* 1989;92:291-306.
- 76.-Lucchinetti C, Bruck W, Rodríguez M, Lassmann H. Distinct patterns of multiple sclerosis pathology indicates heterogeneity in pathogenesis. *Brain Pathology* 1996;259-274.
- 77.-Lucchinetti C, Bruck W, Parisi J, Scheithauer B, Rodríguez M, Lassmann H. Heterogeneity of multiple sclerosis lesions: Implications for the pathogenesis of demyelination. *Ann Neurol* 2000;47:707-717.
- 78.-Lublin FD, Reingold SC. Defining the clinical course of multiple sclerosis: results of an international survey. *Neurology* 1996;46:907-911.
- 79.-Poser CM, Paty DW, Scheinberg L, McDonald I, Davis FA, Ebers GC, et al. New diagnostic criteria for multiple sclerosis: guidelines for research protocols. *Ann Neurol* 1983; 13:227-231.
- 80.-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;50:121-127.

-
- 81.-Confavreux C, Aimard D, Devic M. Course and prognosis of multiple sclerosis assessed by the computerised data processing of 349 patients. *Brain* 1980;103:281-300.
- 82.-Weinshenker BG, Bass B, Rice GPA, Noseworthy J, Carriere W, Baskerville J, Ebers C. The natural history of multiple sclerosis: a geographically based study.2. Predictive value of the early clinical course. *Brain* 1989;112:1419-1428.
- 83.-Weinshenker BG, Bass B, Rice GPA, Noseworthy J, Carriere W, Baskerville J, Ebers C. The natural history of multiple sclerosis: a geographically based study.1. Clinical course and disability. *Brain* 1989;112:133-146.
- 84.-Weinshenker BG. Natural history of multiple sclerosis. *Ann Neurol* 1994;36:S6-S11.
- 85.-Rasminsky M. The effects of temperature on conduction in demyelinated single nerve fibers. *Arch Neurol* 1973;28:287-292.
- 86.-Hennessey A, Robertson NP, Swingler R, Compston DA. Urinary, faecal and sexual dysfunction in patients with multiple sclerosis. *J Neurol* 1999;246:1027-1032.
- 87.-Zorzon M, Zivadinov R, Bosco A, Bragadin LM, Moretti P, Iona LG, Cazzato G. Sexual dysfunction in multiple sclerosis: a case-control study. I. Frequency and comparison groups. *Mult Scler* 1999;5:418-427.
- 88.-Chia YW, Fowler CJ, Kamm MA, Henry MM, Lemieux MC, Swash M. Prevalence of bowel dysfunction in patients with multiple sclerosis and bladder dysfunction. *J Neurol* 1995;242:105-108.
- 89.-Rao SM, Callanan MM, Warrington EK. Cognitive dysfunction in multiple sclerosis: frequency, patterns, and prediction. *Neurology* 1991;41:685-691.

-
- 90.-Rovaris M, Filippi M, Falautano M, Minicucci L, Rocca MA, Martinelli V et al. Relation between MR abnormalities and patterns of cognitive impairment in multiple sclerosis. *Neurology* 1998;50:1601-1608.
- 91.-Demaree HA, De Luca J, Grandiro EA, Diamond BJ. Speed of information processing as a key deficit in multiple sclerosis: implications for rehabilitation. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 1999;67:661-663.
- 92.-Piras MR, Magnano I, Canu ED, Paulus KS, Satta WM, Soddu A, et al. Longitudinal study of cognitive dysfunction in multiple sclerosis: neuropsychological, neuroradiological, and neurophysiological findings. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 2003;74:878-885.
- 93.-Braley TJ, Chervin RD. Fatigue in multiple sclerosis: mechanisms, evaluation, and treatment. *Sleep* 2010;33:1061-1067.
- 94.-Twomey JA, Espir ML. Paroxysmal symptoms as the first manifestations of multiple sclerosis. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 1980;43:296-304.
- 95.-Runmaker B, Andersen O. Prognostic factors in a multiple sclerosis incidence cohort with twenty-five years of follow-up. *Brain* 1993;116:117-134.
- 96.-Confavreux C, Vukusic S, Moreau T, Adeleine P. Relapses and progression of disability in multiple sclerosis. *N Engl J Med* 2000;343:1430-1438.
- 97.-Weinshenker BG, Rice GP, Noseworthy JH, carrier W, Baskerville J, Ebers GC. The natural history of multiple sclerosis: a geographically based study 3. Multivariate analysis of predictive factors and models of outcome. *Brain* 1991;114:1045-1056.
- 98.-Confavreux C, Vukusic S, Adeleine P. Early clinical predictors and progression of irreversible disability in multiple sclerosis: an amnesic process. *Brain* 2003;126:770-782.

-
- 99.-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;5:244-250.
- 100.- Vickrey BG, Hays RD, Harooni R, Myers LW, Ellison GW. A health-related quality of life measure for multiple sclerosis. *Qual Life Res* 1995;4:187-206.
- 101.- Cella DF, Dineen K, Amason B, Reder A, Webster KA, Karabatsos G, et al. Validation of the functional assessment of multiple sclerosis quality of life instrument. *Neurology* 1996;47:129-139.
- 102.- Fischer JS, LaRocca NG, Miller DM, Ritvo PG, Andrews H, Paty D. Recent developments in the assessment of quality of live in multiple sclerosis. *Mult Scler* 1999;5:251-259.
- 103.- Polman CH, Reingold SC, Edan G, Filippi M, Hartung HP, Kappos L, et al. Diagnostic criteria for multiple sclerosis: 2005 revisions to the “McDonad criteria”. *Ann Neurol* 2005;58:840-846.
- 104.- Polman CH, Reingold S, Banwell B, Clanet M, Cohen JA, Filippi M, et al. Diagnostic criteria for multiple sclerosis: 2010 revisions to the McDonald criteria. *Ann Neurol* 2011;69:292-302.
- 105.- Miller DH, Weinshenker BG, Filippi M, Banwell BL, Cohen JA, Freedman MS, et al. Differential diagnosis of suspected multiple sclerosis: a consensus approach. *Mult Scler* 2008;14:1157-1174.
- 106.- Paty DW, Oger JJ, Kastrukoff LF, Hashimoto SA, Hooge JP, Eisen AA, et al. MRI in the diagnosis of MS: a prospective study with comparison of clinical evaluation, evoked potentials, oligoclonal banding, and CT. *Neurology* 1988;38:180-185.

-
- 107.- Filippi M, Paty DW, Kappos L, Barkhof F, Compston DA, Thompson AI, et al. Correlations between changes in disability and T2-weighted brain MRI activity in multiple sclerosis: a follow-up study. *Neurology* 1995;45:255- 260.
- 108.- Van Walderveen MAA, Barkhof F, Hommes OR, Polman CH, Tobi H. Frequin STFM, et al. Correlating MRI and clinical disease activity in multiple sclerosis: relevance of hypointense lesions on short- TR/short- TE (T1-weighted) spin-echo images. *Neurology* 1995;45:1684-1690.
- 109.- Brück W, Bitsch A, Kolenda H, Brück Y, Stiefel M, Lassmann H. Inflammatory central nervous system demyelination: correlation of magnetic resonance imaging findings with lesion pathology. *Ann Neurol* 1997;42:783-793.
- 110.- Van Walderveen MA, Kamphorst W, Scheltens P, van Waesberghe JH, Ravid R, Valk J, et al. Histopathologic correlates of hypointense lesions on T1-weighted spin-echo MRI in multiple sclerosis. *Neurology* 1998;50:1282-1288.
- 111.- Tartaglino LM, Friedman DP, Flanders AE, Lublin FD, Knobler RL, Liem M. Multiple sclerosis in the spinal cord: MR appearance and correlation with clinical parameters. *Radiology* 1995;195:725-732.
- 112.- Thompson AJ, Miller DH, Youl B, MacManus D, Moore S, Kingsley D, et al. Serial gadolinium-enhanced MRI in relapsing/remitting multiple of varying disease duration. *Neurology* 1992;42:60-63.
- 113.- Guttmann CR, Ahn SS, Hsu L, Kikinis R, Jolesz FA. The evolution of multiple sclerosis lesions on serial MR. *Am J Neuroradiol* 1995;16:1481-1491.
- 114.- Swanton JK, Fernando K, Dalton CM, Miskiel KA, Thompson AJ, Plant GT, Miller DH. Modification of MRI criteria for multiple sclerosis in patients with clinically isolated syndromes. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 2006;77:830-33.

- 115.- Swanton JK, Rovira A, Tintoré 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;6:677-86.
- 116.- Díaz-Sánchez M, Gómez-Moreno SM, Morales-Otal MA, Ramos-González A, Benito-León J. Accuracy of MRI criteria for dissemination in space for the diagnosis of multiple sclerosis in patients with clinically isolated syndromes. *Mult Scler* 2010;16:576-580.
- 117.- Gómez-Moreno M, Díaz-Sánchez M, Ramos-González A. Application of the 2010 McDonald criteria for the diagnosis of multiple sclerosis in a Spanish cohort of patients with clinically isolated syndromes. *Mult Scler* 2012;10:39-44.
- 118.- Barkhof F, Filippi M, Miller DH, Scheltens P, Campi A, Polman CH, et al. Comparison of MR imaging criteria at first presentation to predict conversion to clinically definite multiple sclerosis. *Brain* 1997;20:2059-2069.
- 119.- Tintoré M, Rovira A, Martínez MJ, Rio J, Diaz-Villoslada P, Brieva L, et al. Isolated demyelinating syndromes: comparison of different MR imaging criteria to predict conversion to definite clinically multiple sclerosis. *Am J Neuroradiol* 2000;21:702-706.
- 120.- Andersson M, Alvarez-Cermeño JC, 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;57:897-902.
- 121.- Tibbling G, Link H, Öhman S. Principles of albumin and IgG analyses in neurological disorders. I. Establishment of reference values. *Scand J Clin Lab Invest* 1977;37:385-390.

-
- 122.- Tourtellotte WW, Potvin AR, Flemming JO, Murthy KN, Levy J, Syndulko K, et al. Multiple sclerosis: measurements and validation of central nervous system IgG synthesis rate. *Neurology* 1980;30:240-244.
- 123.- Schuller E, Sagar HJ. Local synthesis of cerebrospinal fluid immunoglobulins. *J Neurol Sci* 1981;51:361-370.
- 124.- Reiber H, Felgenhauer K. Protein transfer at the blood cerebrospinal fluid barrier and the quantification of the humoral immune response within the central nervous system. *Clin Chim Acta* 1987;163:319-328.
- 125.- 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. *Scand J Lab Invest* 1977;37:397-401.
- 126.- Luxton RW, McLean BN, Thompson EJ. Isoelectric focusing versus quantitative measurements in the detection of intrathecal local synthesis of IgG. *Clin Chim Acta* 1990;187:297-308.
- 127.- Souverijn JHM, Serrée HMP, Peet R, Grenzebach Smit W, Bruyn GW. Intrathecal immunoglobulin synthesis. Comparison of various formulae with the "gold standard" of isoelectric focussing. *J Neurol Sci* 1991; 102:11-16.
- 128.- Freedman MS, Thompson EJ, Deisenhammer F, Giovannomi G, Grimsley G, Keir G, et al. Recommended standard of cerebrospinal fluid analysis in the diagnosis of multiple sclerosis: a consensus statement. *Arch Neurol* 2005;62:865-870.
- 129.- Walker RWH, Keir G, Johnson MH, Thompson EJ. A rapid method for detecting oligoclonal IgG in unconcentrated CSF by agarose isoelectric focusing, transfer to cellulose nitrate and immunoperoxidase staining. *J Neuroimmunol* 1983;4: 141-148.

-
- 130.- Wikkelsö C, Andersson M, Andersson R, Blomstrand C. Isoelectric focusing followed by silver staining: a suitable method for routine investigation of cerebrospinal fluid proteins. *Eur Neurol* 1984;23:306-312.
- 131.- Martinelli V, Comi G, Filippi M, Poggi A, Colombo B, Rodegher M, et al. Paraclinical test in acute onset neuritis: basal data and results of a short follow-up. *Acta Neurol Scand* 1991;84:231-236.
- 132.- Comi G, Filippi M, Rovaris M, Leocani L, Medaglini S, Locatelli T. Clinical, neurophysiological, and magnetic resonance imaging correlations in multiple sclerosis. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 1998;64 (Suppl):S21-S25.
- 133.- Di Lazzaro V, Olivieri A, Profice P, Ferrara L, Saturno E, Pilato F, et al. The diagnostic value of motor evoked potentials. *Clin Neurophysiol* 1999;110:1297-1307.
- 134.- Durelli L, Cocito D, Riccio AA. High dose intravenous methylprednisolone in the treatment of multiple sclerosis: clinical and immunologic correlations. *Neurology* 1986;36:238-243.
- 135.- Oliveri RL, Valentino P, Russo C, Sibilgia G, Aguglia U, Bono F, et al. Randomized trial comparing two different high doses of methylprednisolone in MS: a clinical and MRI study. *Neurology* 1998;50:1833-1836.
- 136.- Brusafferri F, Candelise L. Steroids for multiple sclerosis and optic neuritis: a meta-analysis of randomized controlled clinical trials. *J Neurol* 2000;247:435-442.
- 137.- Barnes D, Hughes RA, Morris RW, Wade-Jones O, Brown P Britton T, et al. Randomised trial of oral and intravenous methylprednisolone in acute relapses of multiple sclerosis. *Lancet* 1997;349:902-906.

-
- 138.- Sellebjerg F, Frederiksen JL, Nielsen PM, Olesen J. Doble-blind, randomized, placebo-controlled study of oral, high-dose methylprednisolone in attacks of MS. *Neurology* 1998;51:529-534.
- 139.- Weinshenker BG, O'Brien PC, Petterson TM, Moseworthy JH, Lucchinetti CF, Dodick DW, et al. A randomized trial of plasma exchange in acute central nervous system inflammatory demyelinating disease. *Ann Neurol* 1999;46:878-886.
- 140.- Weinstock-Guttman B, Ransohoff RM, Kinkel RP, Rudick RA. The interferons: biological effects, mechanism of action, and use in multiple sclerosis. *Ann Neurol* 1995;37:7-15.
- 141.- The INF-beta Multiple Sclerosis Study Group. Interferon beta-1b is effective in relapsing-remitting multiple sclerosis. I. Clinical results of a multicenter, randomized, double-blind, placebo-controlled trial. *Neurology* 1993;43:655-661.
- 142.- Paty DW, Li DK. Interferon beta-1b is effective in relapsing-remitting multiple sclerosis, II: MRI analysis results of a multicenter, randomized, double-blind, placebo-controlled trial. *Neurology* 1993;43:662-667.
- 143.- The INF-beta Multiple Sclerosis Study Group and the UBC MS/MRI analysis group. Interferon beta-1b in the treatment of multiple sclerosis: final outcome of the randomized controlled trial. *Neurology* 1995;45:1277-1285.
- 144.- European Study Group on interferon beta-1b in secondary progressive MS. Placebo-controlled multicenter randomized trial or interferon beta-1b in treatment of secondary progressive multiple sclerosis. *Lancet* 1998;352:1491-1497.
- 145.- Jacobs LD, Cookfair DL, Rudick RA, Herndon RA, Richert JR, Salazar AM, et al. Intramuscular Interferon beta-1a for disease progression in relapsing multiple sclerosis. *Ann Neurol* 1996;39:285-294.

-
- 146.- Rudick RA, Goodkin DE, Jacobs LD, Cookfair DL, Herndon RM, Richert JR, et al. The impact of interferon beta-1a on neurologic disability in multiple sclerosis. *Neurology* 1997;49:358-363.
- 147.- Simon JH, Jacobs LD, Campion M, Wende K, Simonian N, Cookfair DL, et al. Magnetic resonance studies of intramuscular interferon beta-1a for relapsing multiple sclerosis. *Ann Neurol* 1998;43:79-87.
- 148.- PRISMS (Prevention of relapses and disability by interferon beta-1a subcutaneously in multiple sclerosis) Study Group. Randomized double blind placebo-controlled study of interferon beta-1a in relapsing/remitting multiple sclerosis. *Lancet* 1998;352:1498-1504.
- 149.- PRISMS (Prevention of relapses and disability by interferon beta-1a subcutaneously in multiple sclerosis) Study Group and the UBC MS/MRI analysis group. PRISMS-4: Long term efficacy of interferon beta-1a in relapsing multiple sclerosis. *Neurology* 2001;56:1628-1636.
- 150.- Walther EU, Hohlfeld R. Multiple Sclerosis: side effects of interferon beta therapy and their management. *Neurology* 1999;53:1622-1627.
- 151.- Sheremata WA, Taylor JR, Elgart GW. Severe necrotizing cutaneous lesions complicating treatment with interferon beta-1b. *N Engl Med* 1995;332:1584.
- 152.- Lublin FD, Whitaker JN, Eidelman BH, Miller AE, Arnason BG, Burks JS. Management of patients receiving interferon beta-1b for multiple sclerosis: a report of a consensus conference. *Neurology* 1996;46:12-18.
- 153.- Tremlett HL, Yoshida EM, Oger J. Liver injury associated with the beta-interferons for MS: a comparison between the three products. *Neurology* 2004;62:628-631.

-
- 154.- Racke MK, Martin R, McFarland H, Fritz RB. Copolymer-1 induced inhibition of antigen-specific T cell activation: interference with antigen presentation. *J Neuroimmunol* 1992;37:75-84.
- 155.- Arnon R, Sela M, Teitelbaum D. New insights into the mechanism of action of copolymer-1 in experimental allergic encephalomyelitis and multiple sclerosis. *J Neurol* 1996;243(Suppl 1):S8-S13.
- 156.- 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;45:1268-1276.
- 157.- Johnson KP, Brooks BR, Cohen JA, Ford CC, Goldstein J, Lisak RP, et al. Extended use of glatiramer acetate (Copaxone) is well tolerated and maintains its clinical effect on multiple sclerosis relapse rate and degree of disability. *Neurology* 1998;50:701-708.
- 158.- 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 Glatiramer acetate Study Group. *Ann Neurol* 2001;49:290-297.
- 159.- Ziemssen T, Neuhaus O, Hohlfeld R. Risk-benefit assessment of glatiramer acetate in multiple sclerosis. *Drug Saf* 2001;24:979-990.
- 160.- Rice GP, Hartung HP, Calabresi PA. Anti-alpha4 integrin therapy for multiple sclerosis: mechanism and rationale. *Neurology* 2005;64: 1336-1342.

-
- 161.- 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 Med* 2006;354:899-910.
- 162.- Rudick GA, Stuart WH, Calabresi PA, Confavreux C, Galetta SL, Radue EW, et al. Natalizumab plus interferon beta-1^a for relapsing multiple sclerosis. *N Engl Med* 2006;354:911-923.
- 163.- Yousry TA, Major Eo, Ryschkewitsch C, Fahle G, Fischer S, Hou J, et al. Evaluation of patients treated with natalizumab for progressive multifocal leukoencephalopathy. *N Engl Med* 2006;354:924-933.
- 164.- Kappos L, Radue EW, O'Connor P, Polman C, Hohfeld R, Calabresi P, et al. A placebo-controlled trial of oral fingolimod in relapsing multiple sclerosis. *N Engl Med* 2010;362:387-401.
- 165.- Cohen J, Barkhof F, Comi G, Hartung HP, Khatri BO, Montalban X, et al. Oral fingolimod or intramuscular interferon for relapsing multiple sclerosis. *N Engl Med* 2010;362:402-415.
- 166.- Van der Wyngaert FA, Beguin C, D'Hooghe MB, Doms G, Lissoir F, Carton H, et al. Therapeutic effect of mitoxantrone versus methylprednisolone in relapsing, secondary progressive multiple sclerosis. *Acta Neurol Belg* 2001;101:210-216.
- 167.- Hartung HP, Gonsette R, Koing N, Kwiecinski H, Guseo A, Morrissey GP, et al. Mitoxantrone in Multiple Sclerosis Study Group. Mitoxantrone in progressive multiple sclerosis: a placebo-controlled, double-blind, randomized, multicenter trial. *Lancet* 2002;360:2018-2025.
- 168.- Goodin DS, Arnason BG, Coyle PK, Frohman EM. 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;61:1332-1338.
- 169.- Casetta I, Luliano G, Filippini G. Azathioprine for multiple sclerosis. Cochrane Database Syst Rev 2007;4:CD003982.
- 170.- Confavreux C, Sadder P, Grimaud J, Moreau T, Adeleine P, Aimard G. Risk of cancer from azathioprine therapy in multiple sclerosis: a case-control study. Neurology 1996;6:1607-1612.
- 171.- Lugesesi A, Caporale C, Farina D, Marzoli F, Bonanni L, Muraro PA, et al. Low-dose oral methotrexate treatment in chronic progressive multiple sclerosis. Neurol Sci 2001;22:209-210.
- 172.- Gray O, McDonnell GV, Forbes RB. Methotrexate for multiple sclerosis. Cochrane Database Syst Rev 2004;2:CD003208.
- 173.- Weiner HL, Cohen JA. Treatment of multiple sclerosis with cyclophosphamide: critical review of clinical and immunologic effects. Mult Scler 2002;8:142-154.
- 174.- Giovannoni G, Comi G, Cook S, Rammohan K, Rieckmann P, Sörensen PS, et al. A placebo-controlled trial of oral cladribine for relapsing multiple sclerosis. N Engl Med 2010;362:416-426.
- 175.- Chou R, Peterson K, Helfand M. Comparative efficacy and safety of skeletal relaxants for spasticity and musculoskeletal conditions: a systematic review. J Pain Symptom Manage 2004;28:140-175.
- 176.- Snow BJ, Tsui JKC, Bhatt MH, Varelas M, Hashimoto SA, Calne DB. Treatment of spasticity with botulinum toxin: a double blind study. Ann Neurol 1990;28:512-515.

-
- 177.- Leussink VI, Hussein L, Warnke C, Broussalis E, Hartung HP, Kieseier BC. Symptomatic therapy in multiple sclerosis: the role of cannabinoids in treating spasticity. *Ther Adv Neurol Disord* 2012;5:255-266.
- 178.- Fowler CJ, Panicker JN, Drake M, Harris C, Harrison SC, Kirby M, et al. A UK consensus on the management of the bladder in multiple sclerosis. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 2009;80:470-477.
- 179.- Moti RW, Pilutti LA. The benefits of exercise training in multiple sclerosis. *Nat Rev Neurol* 2012;8:487-497.
- 180.- Patti F, Giacino MR, Lopes R, Palermo F, Cacopardo C, Reggio A. The impact of outpatient rehabilitation on quality of life in multiple sclerosis. *J Neurol* 2002;249:1027-1033.
- 181.- McFarland HF, Dhib-Jalbut S. Multiple sclerosis: possible immunological mechanisms. *Clin Immunol Immunopathol* 1989;50:S96-105.
- 182.- Brosnan CF, Raine CS. Mechanism of immune injury in multiple sclerosis. *Brain Pathol* 1996;6:243-257.
- 183.- Sadovnick AD, Ebers GC, Dyment DA, Risch NJ. Evidence for genetic basis of multiple sclerosis. The Canadian Collaborative Study Group. *Lancet* 1996;347:1728-1730.
- 184.- Ebers GC, Kukay K, Bulman DE, Sandivick AD, Rice G, Anderson C, et al. A full genome search in multiple sclerosis. *Nature Genet* 1996;13:472-476.
- 185.- Kuokkanen S, Gschwend M, Rioux JD, Daly MJ, Terwilliger JD, Tienari PJ, et al. Genomewide scan of multiple sclerosis in Finnish multiplex families. *Am J Hum Genet* 1997;61:1379-1387.

-
- 186.- Chataway J, Feakes R, Coraddu F, Gray J, Deans J, Fraser M, et al. The genetics of multiple sclerosis: principles, background and update of results of the United Kingdom systematic genome screen. *Brain* 1998;121:1869-1887.
- 187.- Kenealy SJ, Babron MC, Bradford Y, Schnetz-Boutaud N, Haines JL, Rimmler JB, et al. A second-generation genomic screen for multiple sclerosis. *Am J Hum Genet* 2004;75:1070-1078.
- 188.- Marrosu MG, Murru MR, Costa G, Cucca F, Sotgiu S, Rosati G, Muntoni F. Multiple sclerosis in Sardinia is associated and in linkage disequilibrium with HLA-DR3 and DR4 alleles. *Am J Hum Genet* 1997;61:454-457.
- 189.- Coraddu F, Reyes-Yanez MP, Parra A, Gray J, Smith SI, Taylor CJ, Compston DA. HLA associations with multiple sclerosis in the Canarian Islands. *J Neuroimmunol* 1998;87:130-135.
- 190.- Giordano M, D'Alfonso S, Momigliano-Richiardi P. Genetics of multiple sclerosis: linkage and association studies. *Am J Pharmacogenomics* 2002;2:37-58.
- 191.- Harbo HF, Lie BA, Sawcer S, Celius EG, Dai KZ, Oturai A, et al. Genes in the HLA class I region may contribute to the HLA-II-associated genetic susceptibility to multiple sclerosis. *Tissue Antigens* 2004;63:237-247.
- 192.- Brynedal B, Duvefelt K, Jonasdottir G, Roos IM, Akesson E, Palgrem J, et al. HLA-A confers and HLA-DRB1 independent influence on the risk of Multiple Sclerosis. *PLoS One* 2007;2:e664.
- 193.- Patsopoulos NA, Bayer Pharma MS Genetics Working Group, Steering Committees of Studies Evaluating INF- β -1b and a CCR1-antagonist, ANZgene Consortium, GeneMSA, International Multiple Sclerosis Genetics Consortium, et al.

-
- Genome-wide meta-analysis identifies novel multiple sclerosis susceptibility loci. *Ann neurol* 2011;70:897-912.
- 194.- Gourraud PA, Harbo HF, Hauser SL, Baranzini SE. The genetics of multiple sclerosis: an up-to-date review. *Immunological Reviews* 2012;248:87-103.
- 195.- Soliu-Hänninen M, Arias L, Mononen L, Heikkia A, Viljanen M, Hanninen A. 25-hydroxyvitamin D levels in serum at onset of multiple sclerosis. *Mult Scler* 2005;11:266-271.
- 196.- Smolders J. Vitamin D and multiple sclerosis: correlation, causality, and controversy. *Autoimmune Dis* 2011;2011:629538.
- 197.- Jagannath VA, Fedorowicz Z, Asokan CV, Robak EW, Whamond L. Vitamin D for the management of multiple sclerosis. *Cochrane Database Syst Rev* 2010;12:CD008422.
- 198.- Pozuelo-Moyano B, Benito-Leon J, Mitchell AJ, Hernandez-Gallego J. A systematic review of randomized, double-blind, placebo-controlled trials examining the clinical efficacy of vitamin D in multiple sclerosis. *Neuroepidemiology* 2012;40:147-153.
- 199.- Pierrot-Deseilligny C. Clinical implications of a possible role of vitamin D in Multiple Sclerosis. *J Neurol* 2009;256:1460-1479.
- 200.- Sundström P, Nyström L, Hallmans G. Smoke exposure increases the risk for multiple sclerosis. *Mult Scler* 2008;15:579-583.
- 201.- Salzer J, Hallmans G, Nyström M, Stenlund H, Wadell G, Sundström P. Smoking as a risk factor for multiple sclerosis. *Mult Scler* 2013;19:1022-1027.

-
- 202.- Manouchehrinia A, Tench CR, Maxted J, Bibani RH, Britton J, Constantinescu CS. Tobacco smoking and disability progression in multiple sclerosis: United Kingdom cohort study. *Brain* 2013;136:2298-2304.
- 203.- Giovannoni G, Ebers G. Multiple sclerosis: the environment and causation. *Curr Opin Neurol* 2007;20:261-268.
- 204.- Giovannoni G, Cutter GR, Lunemann J, Martin R, Münz C, Siriam S, et al. Infectious causes of multiple sclerosis. *Lancet Neurol* 2006;5:887-894.
- 205.- Christensen T. Human herpes virus in MS. *Int MS J* 2007;14(2):41-47.
- 206.- Sospedra M, Martin R. Immunology of multiple sclerosis. *Annu Rev Immunol* 2005;23:683-747.
- 207.- Agrawal SM, Yong VW. Immunopathogenesis of multiple sclerosis. *Int Rev Neurobiol* 2007;7:99-126.
- 208.- Brocke S, Piercy C, Steinman L. Superantigens in demyelinating disease. *Springer Semin Immunopathol* 1996;18:51-56.
- 209.- Furlan R, Cuomo C, Martino G. Animal models of multiple sclerosis. *Methods Mol Biol* 2009;549:157-173.
- 210.- Stinissen P, Raus J, Zhang J. Autoimmune pathogenesis of multiple sclerosis: role of autorreactive T lymphocytes and new immunotherapeutic strategies. *Crit Rev Immunol* 1997;17:33-75.
- 211.- De Rosbo NK, Ben-Nun A. T-cell responses to myelin antigens in multiple sclerosis; relevant of the predominant reactivity to myelin oligodendrocyte glycoprotein. *J Autoimmun* 1998;4:287-299.

-
- 212.- Kojima K, Wekerle H, Lassmann H, Berger T, Linington C. Induction of experimental autoimmune encephalomyelitis by CD4+ T cells specific for an astrocyte protein, S100 beta. *J Neurol Transm Suppl* 1997;49:43-51.
- 213.- Birnbaum G, Kotilinek L. Heat shock or stress proteins and their role as autoantigens in multiple sclerosis. *Ann N Y Acad Sci* 1997;835:157-167.
- 214.- Wekerle H, Hohfeld R. Molecular mimicry in multiple sclerosis. *N Engl Med* 2003;349:185-186.
- 215.- Archelos JJ, Previtali SC, Hartung HP. The role of integrins in immunomediated diseases of the nervous system. *Trends Neurosci* 1999;22:30-38.
- 216.- Rosenberg GA. Matrix metalloproteinases and neuroinflammation in multiple sclerosis. *Neuroscientist* 2002;8:586-595.
- 217.- Szczucinski A, Losy J. Chemokines and chemokine receptors in multiple sclerosis. Potential targets for new therapies. *Acta Neuol Scand* 2007;115:137-146.
- 218.- Hayashi M, Luo Y, Laning J, Strieter RM, Dorf ME. Production and function of monocyte chemoattractant protein-1 and other beta-chemokines in murine glial cells. *J Neuroimmunol* 1995;60:143-150.
- 219.- Bar-Or A. The immunology of multiple sclerosis. *Semin Neurol* 2008;28:29-45.
- 220.- Jacobsen M, Cepok S, Quak E, Happel M, Gaber R, Ziegler A, et al. Oligoclonal expansion of memory CD8+ T cells in cerebrospinal fluid from multiple sclerosis patients. *Brain* 2002;125:538-550.
- 221.- Skulina C, Schmidt S, Dornmair K, Babbe H, Roers A, Rajewsky K, et al. Multiple sclerosis: brain-infiltrating CD8+ T cells persist as clonal expansions in the cerebrospinal fluid and blood. *Proc Natl Acad Sci USA* 2004;101:2428-2435.

-
- 222.- Friese MA, Fugger L. Pathogenic CD8+ T cells in multiple sclerosis. *Ann Neurol* 2009;66:132-141.
- 223.- Kuhlmann T, Lingfeld G, Bitsch A, Schuchardt J, Bruck W. Acute axonal damage in multiple sclerosis is most extensive in early disease stages and decreases over time. *Brain* 2002;125:2202-2212.
- 224.- Rivera-Quiñones C, McGavern D, Schmelzer JD, Hunter SF, Low PA, Rodríguez M. Absence of neurological deficits following extensive demyelination in a class I-deficient murine model of multiple sclerosis. *Nat Med* 1998;4:187-193.
- 225.- Brucklacher-Waldert V, Sttuerner K, Kolster M, Wolthausen J, Tolosa E. Phenotypical and functional characterization of T helper 17 cells in multiple sclerosis. *Brain* 2009;132:3329-3341.
- 226.- Kebir H, Kreymborg K, Ifergan I, Dodelet-Devillers A, Cayrol R, Bernard M, et al. Human T(H)17 lymphocytes promote blood-brain barrier disruption and central nervous system inflammation. *Nat Med* 2007;13:1173-1175.
- 227.- Huan J, Culberston N, Spencer L, Bartholomew R, Burrows GG, Chou YK, et al. Decreased FoxP3 levels in multiple sclerosis patients. *J Neurosci Res* 2005;81:45-52.
- 228.- Rajan AJ, Gao YL, Raine CS, Brosnan CF. A pathogenic role for gamma delta T cells in relapsing-remitting experimental allergic encephalomyelitis in the SJL mouse. *J Immunol* 1996;157:941-949.
- 229.- Hofman FM, Hinton FDR, Johnson K, Merrill JE. Tumor necrosis factor identified in multiple sclerosis brain. *J Exp Med* 1989;170:607-612.
- 230.- Selmaj K, Raine CS. Tumor necrosis factor mediates myelin and oligodendrocyte damage in vitro. *Ann Neurol* 1988;23:339-343.

-
- 231.- Selmaj K, Raine CS, Cannella B, Brosnan CF. Identification of lymphotoxin and tumor necrosis factor in MS lesions. *J Clin Invest* 1991;87:949-954.
- 232.- Selmaj K, Raine CS, Farooq M, Norton WT, Brosnan CF. Cytokine cytotoxicity against oligodendrocytes. Apoptosis induced by lymphotoxin. *J Immunol* 1991;147:1522-1529.
- 233.- Scolding NJ, Jones J, Compston DA, Morgan BP. Oligodendrocyte susceptibility to injury by T-cell perforin. *Immunology* 1990;70:6-10.
- 234.- Benveniste EN. Role of macrophages/microglia in multiple sclerosis and experimental allergic encephalomyelitis. *J Mol Med* 1997;75:165-173.
- 235.- Archelos JJ, Storch MK, Hartung HP. The role of B cells and autoantibodies in multiple sclerosis. *Ann Neurol* 2000;47:694-706.
- 236.- Racke MK. The role of B cells in multiple sclerosis: rationale for B-cell-targeted therapies. *Curr Opin Neurol* 2008;21 (Suppl 1):S9-S18.
- 237.- Keirstead HS, Blakemore WF. The role of oligodendrocytes and oligodendrocyte progenitors in CNS remyelination. *Adv Exp Med Biol* 1999;468:183-197.
- 238.- Lassmann H, Brück W, Lucchinetti C, Rodríguez M. Remyelination in multiple sclerosis. *Mult Scler* 1997;3:133-136.
- 239.- Brück W, Schimied M, Suchanek G, Brück Y, Breitschopf H, Poser S, et al. Oligodendrocytes in the early course of multiple sclerosis. *Ann Neurol* 1994;35:65-73.
- 240.- Goldschmidt T, Antel J, König FB, Brück W, Kuhlmann T. Remyelination capacity of the MS brain decreases with disease chronicity. *Neurology* 2009;72:1914-1921.
- 241.- Blakemore WF, Keirstead HS. The origin of remyelinating cells in the central nervous system. *J Neuroimmunol* 1999;98:69-76.

-
- 242.- Kuhlmann T, Miron V, Cuo Q, Wegner C, Antel J, Brück W. Differentiation block of oligodendroglial progenitor cells as a cause for remyelination failure in chronic multiple sclerosis. *Brain* 2008;131:1749-1758.
- 243.- Franklin RJ, Kotter MR. The biology of CNS remyelination: the key of therapeutic advances. *J Neurol* 2008;255 (Suppl 1):19-25.
- 244.- Williams A, Piaton G, Lubetzki C. Astrocytes—friends or foes in multiple sclerosis? *Glia* 2007;55:1300-1312.
- 245.- Moore CS, Abdullah SL, Brown A, Arulpragasam A, Crocker SJ. How factors secreted from astrocytes impact myelin repair. *J Neurosci Res* 2011;89:13-21.
- 246.- Bieber AJ. Genetic analysis of CNS remyelination. *Curr Top Microbiol Immunol* 2008;318:177-192.
- 247.- Lisak RP. Neurodegeneration in multiple sclerosis. Defining the problem. *Neurology* 2007;60 (Suppl 3):S5-S12.
- 248.- Hemmer B, Nessler S, Zhou D, Kieseier B, Hartung HP. Immunopathogenesis and immunotherapy of multiple sclerosis. *Nature Clin Practice* 2006;2:201-211.
- 249.- Bjartman C, Kinkel RP, Kidd G, Rudick RA, Trapp BD. Axonal loss in normal-appearing white matter in a patient with acute MS. *Neurology* 2001;57:1248-1252.
- 250.- De Luca GC, Williams K, Evangelou N, Ebers GC, Esiri MM. The contribution of demyelination to axonal loss in multiple sclerosis. *Brain* 2006;129:1507-1516.
- 251.- Ferguson B, Matyszak NK, Esiri MM, Perry VH. Axonal damage in acute multiple sclerosis lesions. *Brain* 1997;129:393-399.
- 252.- Davies GR, Altmann DR, Hadjiprocopis A, Rashid A, Chard DT, Griffin CM et al. Increasing normal-appearing grey and white matter magnetization transfer ratio

- abnormality in early relapsing-remitting multiple sclerosis. *J Neurol* 2005;252:1037-1044.
- 253.- Gass A, Barker GJ, Kidd D, Thorpe JW, MacManus D, Brennan A, et al. Correlation of magnetization transfer ratio with clinical disability in multiple sclerosis. *Ann Neurol* 1994;36:62-7.
- 254.- De Stefano N, Narayanan S, Francis GS, Arnaoutelis R, Tartaglia MC, Antel JP, et al. Evidence of axonal damage in the early stages of multiple sclerosis and its relevance to disability. *Arch Neurol* 2001;58:65-70.
- 255.- Chard DT, Griffin CM, McLean MA, Kapeller P, Kapoor R, Thompson A, Millar DH. Brain metabolite changes in cortical grey and normal-appearing white matter in clinically early relapsing-remitting multiple sclerosis. *Brain* 2002;125:2342-2352.
- 256.- Bistch A, Schuchardt J, Bunkowski S, Kuhlmann T, Bruck W. Acute axonal injury in multiple sclerosis. Correlations with demyelination and inflammation. *Brain* 2000;123:1174-1183.
- 257.- Bjartman C, Trapp BD. Axonal and neural degeneration in multiple sclerosis: mechanisms and functional consequences. *Curr Opin Neurol* 2001;14:271-278.
- 258.- Peterson LK, Fijiniami RS. Inflammation, demyelination, neurodegeneration and neuroprotection in the pathogenesis of multiple sclerosis. *J Neuroimmunol* 2007;184:37-44.
- 259.- Mi S, Lee X, Saho Z, Thill G, Ji B, Relton J, et al. LINGO-1 is a component of the nogo-66 receptor/p75 signaling complex. *Nat Neurosci* 2004;7:221-228.
- 260.- Park JB, Yiu G, Kaneko S, Wang J, Chang J, He XL, et al. A TNF receptor family member, TROY, is a coreceptor with Nogo receptor in mediating the inhibitory activity of myelin inhibitors. *Neuron* 2005;45:345-351.

-
- 261.- Shao Z, Browning JL, Lee XL, Scott ML, Shulga-Morskaya S, Allaire N, et al. TAJ/TROY, an orphan TNF receptor family member binds Nogo-66 receptor 1 and regulates axonal regeneration. *Neuron* 2005;45:353-359.
- 262.- Mi S, Miller RH, Lee X, Scott ML, Shulga-Morskaya S, Shao Z, et al. LINGO-1 negatively regulates myelination by oligodendrocytes. *Nat Neurosci* 2005;8:745-751.
- 263.- Mosyak L, Wood A, Dwyer B, Buddha M, Jhonson M, Aulabaugh A, et al. The structure of LINGO-1 ectodomain, a module implicated in central nervous system repair inhibition. *J Biol Chem* 2006;281:36378-36390.
- 264.- Lee X, Yang Z, Shao Z, Rosenberg SS, Levesque M, Pepinski RB, et al. NGF regulates the expression of axonal LINGO-1 to inhibit oligodendrocyte differentiation and myelination. *J Neurosci* 2007;27:220-225.
- 265.- 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 USA* 2007;104:14430-14435.
- 266.- Fu QL, Hu B, Li X, Saho Z, Shi JB, Wu W, et al. LINGO-1 negatively regulates TrkB phosphorylation after ocular hypertension. *Eur J Neurosci* 2010;31:1091-1097.
- 267.- Jepson S, Vought B, Gross CH, Gan L, Austen D, Frantz JD, et al. LINGO-1 a transmembrane signaling protein, inhibits oligodendrocyte differentiation and myelination through intercellular self-interactions. *J Biol Chem* 2012;287:22184-22195.
- 268.- Mi S, Blake Pepinsky R, Cadavid D. Blocking LINGO-1 as a therapy to promote CNS repair: from concept to the clinic. *CNS Drugs* 2013;27:493-503.

-
- 269.- Mi S, Hu B, Haham K, Luo Y, Sai KAm Hui E, Yuan Q, et al. LINGO-1 antagonist promotes spinal cord remyelination and axonal integrity in MOG-induced experimental autoimmune encephalomyelitis. *Nat Med* 2007;13:1228-1233.
- 270.- Mi S, Miller RH, Tang W, Lee X, Hu B, Wu W, et al. Promotion of central nervous system remyelination by induced differentiation of oligodendrocyte precursor cells. *Ann Neurol* 2009;65:304-315.
- 271.- Pepinsky RB, Shao Z, Ji B, Wang Q, Meng G, Walus L, et al. Exposure levels of anti-LINGO-1 Li81 antibody in the central nervous system and dose efficacy relationships in rat spinal cord remyelination models after systemic administration. *J Pharmacol Exp Ther* 2011;339:519-529.
- 272.- Pepinsky RB, Walus L, Shao Z, Ji B, Gu S, Sun Y, et al. Production of a PEGylated Fab of the LINGO-1 Li33 antibody and assessment of its biochemical and functional properties in vitro and rat model of demyelination. *Bioconjug Chem* 2011;22:200-210.
- 273.- Huang JK, Franklin RJ. Regenerative medicine in multiple sclerosis: identifying pharmacological targets of adult neural stem cell differentiation. *Neurochem Int* 2011;59:329-332.
- 274.- Carim-Todd L, Escarceller M, Estivill X, Sumoy L. LRRN6A/LERN1 (leucine-rich repeat neuronal protein 1), a novel gene with enriched expression in limbic system and neocortex. *Eur J Neurosci* 2003;18:3167-3182.
- 275.- Bourikas D, Mir A, Walmsley AR. LINGO-1-mediated inhibition of oligodendrocyte differentiation does not require de leucine-rich repeats and is reversed by p75(NRT) antagonists. *Mol Cell Neurosci* 2010;45:363-369.

-
- 276.- Kumaria A. LINGO-1, WNK1, and EGFR: an hypothesis. *J Biol Chem* 2009;284:le9.
- 277.- Zhou ZD, Sathiyamoorthy S, Tan EK. LINGO-1 and neurodegeneration: pathophysiologic clues for essential tremor. *Tremor Other Hiperkinet Mov (NY)* 2012;2. pii: tre-02-51-249-1.
- 278.- Fu QL, Hu B, Wu W, Pepinsky RB, Mi S, So KF. Blocking LINGO-1 function promotes retinal ganglion cell survival following ocular hypertension and optic nerve transection. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2008;49:975-985.
- 279.- Fu QL, Li X, Yip HK, Shao Z, Wu W, Mi S, So KF. Combined effect of brain-derived neurotrophic factor and LINGO-1 fusion protein on long-term survival of retinal ganglion cells in chronic glaucoma. *Neuroscience* 2009;162:375-382.
- 280.- Oliver PL, Davies KE. Analysis of human neurological disorders using mutagenesis in the mouse. *Clin Sci (Lond)* 2005;108:385-397.
- 281.- Kuo SH, Tang G, Louis ED, Ma K, Babji R, Balatba M, et al. Lingo-1 expression is increased in essential tremor cerebellum and is present in the basket cell pinceau. *Acta Neuropathol* 2013;125:879-889.
- 282.- Stefansson H, Steinberg S, Petursson H, Gustafsson O, Gudjonsdottir IH, Jonsdottir GA, et al. Variant in the sequence of the LINGO1 gene confers risk of essential tremor. *Nat Genet* 2009;41:277-279.
- 283.- Tan EK, Teo YY, Prakash KM, Lin R, Lim HQ, Angeles D, et al. LINGO-1 variant increases risk of familial essential tremor. *Neurology* 2009;73:1161-1162.
- 284.- Clark LN, Park N, Kisselev S, Rios E, Lee JH, Louis ED. Replication of the LINGO-1 gene association with essential tremor in a North American population. *Eur J Hum Genet* 2010;18:838-843.

-
- 285.- Thier S, Lorenz D, Nothnagel M, Stevanin G, Dürr A, Nebel A, et al. LINGO-1 polymorphisms are associated with essential tremor in Europeans. *Mov Disord* 2010;25:709-715.
- 286.- Vilariño-Göll C, Wider C, Ross OA, Jasinska-Myga B, Kachergus J, Kob SA, et al. LINGO-1 and LINGO-2 variants are associated with essential tremor and Parkinson´s disease. *Neurogenetics* 2010;11:401-408.
- 287.- Wu YW, Rong TY, Li HH, Xiao Q, Fei QZ, Tan EQ, et al. Analysis of LINGO1 variant in sporadic and familial essential tremor among Asians. *Acta Neurol Scand* 2011;124:264-268.
- 288.- Jiménez-Jiménez FJ, García-Martín E, Lorenzo- Betancor O, Pastor P, Alonso-Navarro H, Agúndez JA. LINGO1 and risk for essential tremor: result of a meta-analysis of rs9652490 and rs11856808. *J Neurol Sci* 2012;317:52-57.
- 289.- Haubenberger D, Hotzy C, Pirker W, Katzenschelager R, Brücke T, Zimprich F, et al. Role of LINGO-1 polymorphism in Parkinson´s disease. *Mov Disord* 2009;24:2404-2407.
- 290.- Klebe S, Their S, Lorenz D, Nothnagel M, Schreiber S, Klein C, et al. LINGO-1 is not associated with Parkinson´s disease in German patients. *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet* 2010;153B:1173-1178.
- 291.- Bialecha M, Kurzawski M, Tan EK, Dorzdzik M. Analysis of LINGO1 (rs9652490) polymorphism in sporadic Parkinson´s disease in a Polish population, and meta-analysis. *Neurosci Lett* 2010;472:53-55.
- 292.- Lorenzo-Betancor O, Samarach L, García-Martín E, Cervantes S, Agúndez JA, Jiménez-Jiménez FJ, et al. *LINGO1* gene analysis in Parkinson´s disease phenotypes. *Mov Disord* 2011;26:722-727.

- 293.- Agúndez JA, Lorenzo-Betancor O, Pastor P, García-Martín E, Luengo A, Alonso-Navarro H, et al. LINGO1 rs9652490 and rs11856808 are not associated with the risk of Parkinson's disease: results of a meta-analysis. *Parkinsonism Relat Disord* 2012;18:657-659.
- 294.- Wu YW, Wang X, Xu W, Liu W, Fang F, Ding J, et al. Genetic variation in LINGO-1 (rs9652490) and risk of Parkinson's disease: twelve studies and a meta-analysis. *Neurosci Lett* 2012;522:67-72.
- 295.- Satoh J, Onoue H, Arima K, Yamamura T. Nogo-A and nogo receptor expression in demyelinating lesions of multiple sclerosis. *J Neuropathol Exp Neurol* 2005;64:129-138.
- 296.- Purcell S, Neale B, Todd-Brown K, Thomas L, Ferreira MA, Bender D, et al. PLINK: a tool set for whole-genome association and population-based linkage analyses. *Am J Hum Genet* 2007;81:559-575.
- 297.- Pértega Díaz S, Pita Fernández S. Cálculo del poder estadístico de un estudio. *Cuadernos de atención primaria* 2003;10(1):59-63
- 298.- Cossburn M, Ingram G, Hirst C, Ben-Shlomo Y, Pickersqill TP, Robertson NP. Age at onset as a determinant of presenting phenotype and initial relapse recovery in multiple sclerosis. *Mult Scler* 2012;18:45-54.
- 299.- Ebers GC. Natural history of primary progressive multiple sclerosis. *Mult Scler* 2004;Suppl 1:S8-S13.
- 300.- Alonso A, Jick SS, Olek MJ, Hernán MA. Incidence of multiple sclerosis in United Kingdom: findings for a population-based cohort. *J Neurol* 2007;254:1736-1741.

- 301.- 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;17:335-338.
- 302.- 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;12:217-223.
- 303.- García-Martín E, Agúndez JA, Martínez C, Benito-León J, Millán-Pascual J, Calleja P, et al. Vitamin D receptor (VDR) gene rs2228570 (Fok1) and rs731236 (Taq1) variants are not associated with the risk for multiple sclerosis: results of a new study and meta-analysis. *PLoS One* 2013;8:e65487.
- 304.- Agúndez JA, 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;74:1705-1708.
- 305.- Llorens F, Gil V, Iraola S, Carim-Todd M, Martí E, Estivill X, et al. Development analysis of LINGO-1/LERN-1 protein expression in the mouse brain: interaction of its intracellular domain with Myt1l. *Dev Neurobiol* 2008;68:521-541.
- 306.- Lee JY, Petratos S. Multiple sclerosis: does Nogo play a role? *Neuroscientist* 2013;19:394-408.

ANEXOS

ANEXO 1. ESCALA EDSS DE DISCAPACIDAD¹⁷

- 0** Exploración neurológica normal (grado 0 en todos los SF; se acepta función cerebral grado 1).
- 1.0** Sin discapacidad, signos mínimos en un SF (grado 1 en cualquier SF que no sea la mental).
- 1.5** Sin discapacidad, signos mínimos en varios SF (grado 1 en varios SF).
- 2.0** Discapacidad mínima en un SF (grado 2 en un SF y 0 ó 1 en el resto).
- 2.5** Discapacidad mínima en 2 SF (grado 2 en 2 SF y 0 ó 1 en el resto).
- 3.0** Discapacidad moderada en un SF (grado 3 en un SF y 0 ó 1 en el resto) o discapacidad leve en 3 ó 4 SF (grado 2 en 3-4 SF y 0 ó 1 en el resto), con plena capacidad de deambulación.
- 3.5** Plena capacidad de deambulación con discapacidad moderada en un SF (un grado 3) y grado 2 en 1 ó 2 SF, o grado 3 en 2 SF o grado 2 en 5 SF (con 0 ó 1 en el resto).
- 4.0** Plena capacidad de deambulación sin ayuda durante gran parte del día con una discapacidad relativamente grave (grado 4) en un SF (0 ó 1 en el resto) o una combinación de grados menores que excedan los límites de los puntos anteriores. Capaz de caminar sin ayuda o descanso unos 500 metros.
- 4.5** Plena capacidad de deambulación sin ayuda durante gran parte del día. Puede trabajar una jornada completa pero tiene alguna limitación para tener una actividad plena o necesita una ayuda mínima; caracterizado por una discapacidad relativamente grave (grado 4) en un SF (0 ó 1 en el resto) o una combinación de grados menores que excedan los límites de los puntos anteriores. Capaz de caminar sin ayuda o descanso unos 300 metros.
- 5.0** Camina sin ayuda o descanso unos 200 metros. Tiene una discapacidad grave que dificulta sus actividades diarias (por ejemplo, para trabajar necesita condiciones especiales). Equivale a un grado 5 en un SF y 0 ó 1 en el resto o una combinación de grados menores que suelen exceder la puntuación del punto 4.0.

-
- 5.5** Camina sin ayuda o descanso 100 metros. Tiene una discapacidad grave que dificulta sus actividades diarias. Equivale a un grado 5 en un SF y 0 ó 1 en el resto o una combinación de grados menores que suelen exceder la puntuación del punto 4.0.
- 6.0** Necesita apoyo unilateral (bastón, muleta o corsé) intermitente o constante para caminar unos 100 metros con o sin descanso. Normalmente la combinación de SF tiene, al menos, más de 2 SF con grados 3.
- 6.5** Necesita apoyo bilateral (bastones, muletas o corsé) constante para caminar unos 20 metros sin descanso. Normalmente la combinación de SF tiene, al menos, más de 2 SF con grados 3.
- 7.0** No puede andar más de 5 metros incluso con ayuda y limitado a 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 en los SF; excepcionalmente en 1 grado 5 de la vía piramidal únicamente.
- 7.5** Incapaz de dar unos cuantos 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. Equivale a combinaciones de más de 1 grado 4 en los SF).
- 8.0** Limitado esencialmente a permanecer en cama o en la silla. Puede usar una silla de ruedas para desplazarse, pero no puede estar fuera de la cama la mayoría del día. Generalmente mantiene la funcionalidad de los brazos. Equivale a combinaciones de varios SF en grado 4).
- 8.5** Pasa la mayor parte del día en la cama. Conserva parte de su cuidado personal. Generalmente mantiene la funcionalidad de sus brazos. Equivale a combinaciones de varios SF en grado 4.
- 9.0** Está encamado. Es absolutamente dependiente. Puede comunicarse y comer. La mayoría de los SF supera el grado 4.
- 9.5** Está encamado. Es absolutamente dependiente. No puede comunicarse o comer/deglutir. La mayoría de los SF supera el grado 4.
- 10** Muerte debida a EM.

ANEXO 2. SISTEMAS FUNCIONALES INCLUIDOS EN LA ESACALA EDSS¹⁷

FUNCIÓN PIRAMIDAL

- 0- Normal
- 1- Signos anormales sin discapacidad
- 2- Mínima discapacidad
- 3- Paraparesia o hemiparesia leve o moderada, o monoparesia grave.
- 4- Paraparesia o hemiparesia graves, tetraparesia moderada o monoplejia
- 5- Paraplejia, hemiplejia o tetraparesia grave
- 6- Tetraplejia
- V- Desconocido

FUNCIÓN CEREBELOSA

- 0- Normal
- 1- Signos anormales sin discapacidad
- 2- Ataxia leve
- 3- Ataxia moderada de tronco o de extremidades
- 4- Ataxia grave de todas las extremidades
- 5- Discapacidad para realizar movimientos coordinados debido a la ataxia
- V- Desconocido
- X- Se añade a cada cifra si la exploración está artefactada por la presencia de paresia

FUNCIÓN DEL TRONCO CEREBRAL

- 0- Normal
- 1- Presencia de signos
- 2- Nistagmo moderado u otra discapacidad leve
- 3- Nistagmo grave, oftalmoparesia marcada o disfunciones moderadas de otros nervios craneales
- 4- Disartria marcada u otra discapacidad significativa
- 5- Discapacidad para deglutir o hablar
- V- Desconocido

FUNCIÓN SENSITIVA

- 0- Normal
- 1- Disminución leve de la sensibilidad vibratoria y del reconocimiento táctil de figuras sobre la piel en 1 ó 2 extremidades
- 2- Ligera disminución de la sensibilidad táctil, dolorosa o postural y/o disminución moderada de la sensibilidad vibratoria en 1 ó 2 extremidades, o disminución leve de la sensibilidad vibratoria exclusivamente en 3 ó 4 extremidades
- 3- Disminución moderada de la sensibilidad táctil, dolorosa o postural y/o pérdida de la sensibilidad vibratoria en 1 ó 2 extremidades, o disminución leve de la sensibilidad táctil o dolorosa y/o disminución moderada de todas las pruebas propioceptivas en 3 ó 4 extremidades
- 4- Disminución marcada de la sensibilidad táctil, dolorosa o postural y/o pérdida de la propiocepción, sola o asociadas, en 1 ó 2 extremidades o disminución moderada de la sensibilidad táctil o dolorosa y/o disminución grave de la sensibilidad propioceptiva en más de 2 extremidades
- 5- Pérdida de la sensibilidad en 1 ó 2 extremidades o disminución moderada de la sensibilidad táctil o dolorosa y/o pérdida de la propiocepción en la mayor parte del cuerpo por debajo de la cabeza
- 6- Pérdida de la sensibilidad por debajo de la cabeza como característica predominante
- V- Desconocido

FUNCIÓN INTESTINAL / VESICAL

- 0- Normal
- 1- Goteo al inicio de la micción, urgencia miccional o retención urinaria de grado leve
- 2- Goteo inicial, urgencia o retención urinaria o fecal moderada, o incontinencia urinaria ocasional
- 3- Incontinencia urinaria frecuente
- 4- Necesidad de sondaje casi permanente
- 5- Pérdida de control de esfínter vesical
- 6- Pérdida del control de esfínter vesical y rectal
- V- Desconocido

FUNCIÓN VISUAL

- 0- Normal
- 1- Escotoma con agudeza visual corregida superior a 20/30
- 2- Escotoma con agudeza visual máxima corregida entre 20/30 y 20/59 en el ojo peor
- 3- Escotoma de gran tamaño o defectos campimétricos moderados y agudeza visual

- máxima corregida entre 20/60 y 20/99 en el ojo peor
- 4- Disminución significativa del campo visual con una agudeza visual máxima corregida entre 20/100 y 20/200 en el ojo peor, o grado 3 más agudeza visual máxima del ojo mejor de 20/60 o menos
 - 5- Agudeza visual máxima corregida menor de 20/200 en el ojo peor, o grado 4 más agudeza visual máxima en el ojo mejor de 20/60 o menos
- V- Desconocido
- X. Se añade en presencia de palidez papilar temporal

FUNCIÓN CEREBRAL

- 0- Normal
 - 1- Alteración del estado de ánimo
 - 2- Deterioro cognitivo leve
 - 3- Deterioro cognitivo moderado
 - 4- Deterioro cognitivo marcado (síndrome cerebral crónico moderado)
 - 5- Demencia o síndrome cerebral crónico grave
- V- Desconocido

OTRAS FUNCIONES

- 0- Ninguna
 - 1- Otros hallazgos neurológicos atribuidos a la EM (especifíquese)
- V- Desconocido

ANEXO 3. CONSENTIMIENTO INFORMADO

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

TÍTULO DEL ESTUDIO: Polimorfismos genéticos de *LINGO1* en pacientes con esclerosis múltiple

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, las variaciones en el gen que codifica la síntesis de la proteína LINGO1, el cual podría estar implicado en el riesgo para desarrollar esclerosis múltiple. Esta proteína tiene un efecto inhibitorio sobre la maduración de los oligodendrocitos (células que forman la mielina), la síntesis de la mielina y la regeneración de los axones dañados de las neuronas. En esta enfermedad se ha descrito un aumento de la expresión de la proteína LINGO1 en las lesiones desmielinizantes de pacientes con esclerosis múltiple.

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 significaran 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 serán 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^a

_____ participe en el estudio

 Paciente o Representante legal autorizado

Firma

Fecha

 Nombre del Investigador

Firma

Fecha

ANEXO 4. DISEÑO DE LOS *PRIMERS* UTILIZADOS EN EL ESTUDIO DEL SNP rs9652490 DEL GEN *LINGO1*

rs9652490

A1= GAAGGTGACCAAGTTCATGCTCCCAAAGGGGCTTCCTCCCT

A2= GAAGGTCTGGAGTCAACGGATTCCCAAAGGGGCTTCCTCCCC

C1= ACACATGATGACACAGATGTCACAGAT

C2= GTGCCCCGGGGCAGAGTGAA

SNP1=A

SNP2=G

GAAGGTGACCAAGTTCATGC – Allele 1 tail FAM labeled oligo sequence

GAAGGTCTGGAGTCAACGGATT – Allele 2 tail VIC labeled oligo sequence

Sequence=

AGGTGCAAGGCCAGGATTGGCTGGCAGGGAAAGGGAGGGAAGAGGGGAGAA
 GAGGGAGAAGGTAGAGGGAGAGAGAAGGAGAGGGATAGGGAGGAGAGGGG
 GTGAGAAGGGAGGAAGGAGGAGAAGAAAAGAGGTGGGGCGAGATGGAGAG
 GAAGCACGGGCTGCTCTTAGCCCCAGGGTCCCAGGAAGGCTAAGCCAGAGCC
 CAACACAGTGATGACGCAGTTGGGCAGCCGTTACCTTCAGACACATGATGA
 CACAGATGTCACAGATCA GTGCCCCGGGGCAGAGTGAA GCTAGGC[A/G]GGG
 AGGAAGCCCCTTTGGGAGAGAGGCCCCAGCTTTAGACCAGCGGTCCGGTCTC
 CTTCTATTCTCCCTGCCCCCATGCAGCAGTGAGGTGGGGAGCAGCGGTGGGC
 AGGAAGGCGGTCCCCGCCTGGTACCCACCTGGGCCTCCTGCTGTGTCCCAGTT
 CAGCCTAAGGAGCTCAGCCACCCTCCTGGGTGAGACTTCAGGGTCAGACCC
 TTCTGACTGTGGTTACAGACTGAGTCTTGACCCTGGCAGGGTGGACTGGCCCC
 CAGGAAACTGGAGGAGGCCCCAGATGCCTCACT

A1: *primer* específico del alelo A1; A2: *primer* específico del alelo A2; C1: *primer* común 1; C2: *primer* común 2 (alternativa).

ANEXO 5. DISEÑO DE LOS *PRIMERS* UTILIZADOS EN EL ESTUDIO DEL SNP rs11856808 DEL GEN *LINGO1*

rs11856808

A1= GAAGGTGACCAAGTTCATGCTCACTCAGAAAGTCACCCAAACG

A2=GAAGGTCGGAGTCAACGGATTCTCACTCAGAAAGTCACCCAAACA

C1=CCTTTGGGGGCAGGTCACCTT

C2=CAGGTCACCTTGCTGCATATGTTGTT

SNP1=C

SNP2=T

GAAGGTGACCAAGTTCATGC – Allele 1 tail FAM labeled oligo sequence

GAAGGTCGGAGTCAACGGATT – Allele 2 tail VIC labeled oligo sequence

Sequence=

TCTCTGCCATGGTGACTGGAGGCCACATGTTCTGGAAGGGGCTACAAGATGA
 TGGAGCTCCTGGCAGCCTAGGTCCCTGAGTTGTTGTGTGGACCAGAGCTCCAC
 TACCCTGCCACATCCCACACCGGGCATGGAATGTGAGTTCATGTGGTAAACG
 GAGGAAGGAAGACAGCCTTTGTCACATGAAATCACTGAGAGTTCAGAGAGTA
 CCGGTTAGTGCAGCACAACCTTGCCTATCCTACAAAATCCCCACTGCC **CCTTT**
GGGGG **CAGGTCACCTTGCTGCATATGTTGTT** AGAACA [C/T] **GTTTGGGTGACT**
TTCTGAGTGAG AGAACTAAGTCCATTTGGGAGCCTCTAAGTAACTAAAATTT
 CAGTGGGGGTAGAATAATCTCACTTCCCAAATTCAAGAGTTCCTATCCACGA
 GGAAAAGGGGAGCTTCCAGGTCCTGCAATGGGCTCCACCTGCAGGACCTTC
 CCCACATGCAGAAGGGAGGTGTGAGCTGA

A1: *primer* específico del alelo A1; A2: *primer* específico del alelo A2; C1: *primer* común 1; C2: *primer* común 2 (alternativa).