

**ESTUDIO DEL EFECTO DEL INTERFERÓN BETA 1 a SOBRE
LA ACTIVIDAD DE OXIDO RREDUCCIÓN EN EL
TRATAMIENTO DE LA ESCLEROSIS MÚLTIPLE REMITENTE
RECIDIVANTE.**

BIOMARCADORES DE RESPUESTA TERAPEUTICA.

Tesis defendida por

JUAN LUIS RUIZ PEÑA

Para optar al grado de doctor en Medicina y Cirugía.

DIRECTORES DE TESIS: Miguel Lucas Lucas y Guillermo Izquierdo Ayuso

UNIVERSIDAD DE SEVILLA.

DEPARTAMENTO DE BIOQUIMICA, BIOLOGIA MOLECULAR E
INMUNOLOGIA.

AÑO 2013.

A MIS PADRES, MI MEMORIA.

a. Índice

a. Índice

b. Acrónimos

c. Resumen

I. Esclerosis Múltiple

1. INTRODUCCIÓN

2. IMPORTANCIA SOCIOECONÓMICA DE LA ESCLEROSIS MÚLTIPLE

3. INTERÉS EPIDEMIOLÓGICO DE LA ESCLEROSIS MÚLTIPLE

4. GENÉTICA DE LA ESCLEROSIS MÚLTIPLE

5. CARACTERÍSTICAS ANATOMO PATOLÓGICAS DE LA EM.

5.1. Inflamación

5.2. Desmielinización

5.3. Daño tisular difuso

5.4. Remielinización

6. EVOLUCIÓN Y TRATAMIENTO DE LA ESCLEROSIS MÚLTIPLE

6.1. Historia natural

6.2. Modificadores de la historia natural

7. RESONANCIA MAGNÉTICA EN LA ESCLEROSIS MÚLTIPLE.

7.1. Relevancia de la resonancia magnética convencional.

7.2. Espectroscopia por resonancia magnética de protón (ERM-H1).

7.2.1. Aplicación de ERM a EM: Lesiones

7.2.2. Aplicación de ERM a EM: Sustancia blanca de apariencia

normal

7.2.3. Aplicación de ERM a EM: Sustancia Gris

7.2.4. Conclusiones.

II. Mecanismos de neurodegeneración

1. INTRODUCCIÓN.

2. DEGENERACIÓN AXONAL EN LAS LESIONES INFLAMATORIAS AGUDAS.

2.1. Activación microglial

2.2. Linfocitos T CD8 +

2.3. Linfocitos T CD4 +

2.4. Folículos de células B meníngeos.

2.5. Paradigma para la patogénesis de células Th17.

2.6. Hipótesis del Daño por estrés oxidativo

2.7. Hipótesis del Daño por Glutamato.

2.8. Vía de convergencia: daño mitocondrial.

3. DEGENERACIÓN AXONAL DURANTE LAS ETAPAS PROGRESIVAS INDEPENDIENTES DE INFLAMACIÓN AGUDA.

3.1. La desmielinización crónica produce la sobrerregulación y la reorganización de los canales iónicos

3.2. Efecto de la elevación de los niveles intracelulares de Ca^{2+} en la función mitocondrial

3.3. Transporte axonal en la EM.

3.4. Acumulación de hierro

4. CONCLUSIONES

III. Medición clínica de respuesta terapéutica

1. INTRODUCCIÓN.

2. EL INTERFERÓN β EN EL TRATAMIENTO DE LA EM

3. DEFINICIONES DE RESPUESTA A IFN B.

4. CUANTIFICANDO LA RESPUESTA AL TRATAMIENTO CON IFN-B

5. DESARROLLO DE SISTEMAS DE PUNTUACIÓN

6. CONCLUSIÓN.

IV. Farmacogenómica de los inmunomoduladores.

1. INTRODUCCIÓN.

2. FARMACOGENÓMICA.

3. CONCLUSIÓN

V. Identificación de los objetivos de estudio en esta tesis.

1. OBJETIVOS

1.1. OBJETIVOS PRIMARIOS

1.2. OBJETIVOS SECUNDARIOS

2. TRABAJOS REALIZADOS PARA CONTESTAR A LOS OBJETIVOS

VI. Metodología.

1. METODOLOGIA UTILIZADA EN EL ESTUDIO DEL EFECTO DEL INTERFERÓN β 1 a IM SOBRE MARCADORES DE DEGENERACIÓN AXONAL Y DE OXIDO RREDUCCIÓN.

1.1. Diseño

1.2. Población estudiada

1.3. Evaluacion clínica de la discapacidad.

1.4. Mediciones de Resonancia Magnética

1.5. Seguimiento.

1.6. Análisis estadístico

2. METODOLOGÍA UTILIZADA EN EL ESTUDIO DE VALIDACIÓN DE LOS CRITERIOS DE OPTIMIZACIÓN DEL TRATAMIENTO DE LA CMSWG.

2.1. Diseño

2.2. Población estudiada

2.3. Optem

2.4. Evaluacion y seguimiento clínico.

2.5. Análisis estadístico

3. METODOLOGÍA UTILIZADA EN EL ESTUDIO DE FARMACOGENÓMICA.

3.1. Diseño.

3.2. Población estudiada.

3.2.1. Tamaño muestral.

3.2.2. Criterios de inclusión.

3.3. Evaluacion y seguimiento clínico

3.4. Extracción y crio-preservación de ADN

3.5. Estudios moleculares.

3.6. Análisis estadístico de la respuesta al tratamiento.

3.7. Etapas.

VII. Resultados.

1. RESULTADOS OBTENIDOS EN EL ESTUDIO DEL EFECTO DEL INTERFERÓN β 1 a IM SOBRE MARCADORES DE DEGENERACIÓN AXONAL Y DE OXIDO RREDUCCIÓN.

1.1. Demografía de los sujetos y características clínicas

1.2. Concentración de metabolitos.

1.3. Concentración de grupos sulfidrilos en suero.

1.4. Correlación entre la concentración basal de metabolitos y los parámetros clínicos basales.

1.5. Correlaciones del n^o de brotes.

1.6. Correlaciones de la progresión.

1.6.1. Con N Acetil Aspartato (NAA).

1.6.2. Con colina.

1.6.3. Con Mio inositol.

1.6.4. Oxido reducción.

1.7. Implicación práctica de estos resultados.

2. RESULTADOS OBTENIDOS EN EL ESTUDIO DE VALIDACIÓN DE LOS CRITERIOS DE OPTIMIZACIÓN DEL TRATAMIENTO DE LA CMSWG.

2.1. Demografía de los sujetos y características clínicas

2.2. Sensibilidad y Especificidad

2.3. Tasa de brotes durante los años 2-5

2.4. Progresión durante años 2-5

2.5. Implicación práctica de estos resultados.

3. RESULTADOS OBTENIDOS EN EL ESTUDIO DE FARMACOGENÓMICA.

3.1. Demografía de los sujetos y características clínicas

3.2. Correlación entre los marcadores genéticos y la respuesta terapéutica.

3.3 Implicación práctica de estos resultados.

VIII. Discusión.

Disminución del N Acetil Aspartato en pacientes con EM.

N Acetil Aspartato como marcador de daño axonal.

Brotos como marcador subrogado de discapacidad

Evaluación de la eficacia del tratamiento.

Correlación entre la concentración de los distintos metabolitos en los tejidos y los parametros clínicos.

N Acetil Aspartato.

Colina.

Mio Inositol (mI).

El daño oxidativo como marcador subrogado de discapacidad.

Validez de la utilización del grupo no respondedor como modelo de progresión.

Resumen clínico patológico.

Validación de las ROT de la CMSWG.

Utilidad medios de cuantificación.

Resumen de la validación del método de respuesta terapéutica.

Utilidad de los Estudios Farmaco genómico.

Direcciones futuras

IX. Conclusiones.

X. Bibliografía.

b. Acrónimos

AI: Ambulation Index

AMPA: Acido propiónico amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazol

ATP: Adenosina Tri Fosfato

BHE: barrera hemato encefálica

BOC: bandas oligoclonales

Cho: Colina

CNVs: estudio de marcadores de copia variable

Cr: Creatinina

CMSWG: Canadian Multiple Sclerosis Working Group

CPK-BB: Creatinina Fosfo Kinasa

DME: Droga Modificadora de la Enfermedad

EAE: encefalitis alérgica experimental

EBV: Virus Epstein Barr

EDSS: Expanded Disability Scale Score

EMA: Agencia Europea del Medicamento

EMRR: Esclerosis Múltiple Remitente Recidivante

EMSP: Esclerosis Múltiple Secundaria Progresiva

EMPP: Esclerosis Múltiple Primariamente Progresiva

ERM: espectroscopia por resonancia magnética

EM: esclerosis múltiple

Glu: Glutamato

Gln: Glutamina

GWAS: Genome Wide Association Studies

HLA: antígeno leucocitario humano

9 HPT: prueba nueve agujeros

IFN- β : Interferón Beta

IL: Inter Leucina

Ig G: Inmuno globulina G

Lac: Lactato

LCR: Líquido cefalorraquídeo

LSB: lesión sustancia blanca

MSFC: Multiple Sclerosis Functional Composite scale

MHC: Complejo Mayor de Histocompatibilidad.

mI: Mio inositol

NAA: N-acetil-aspartato

Nabs: anticuerpos neutralizantes anti-IFN- β

NMDA: N-metil-D-aspartato

NO: óxido nítrico

NOS2: óxido nítrico sintetasa

NRS: Neurological Rating Scale

OPC: células progenitoras de oligodendrocitos adultos

ONOO-: peroxinitrito

PTP: poro de transición de permeabilidad

PARP: poli-ADP-ribosa polimerasa

PASAT: Paced Auditory Serial Addition Test

PR: progresiva recurrente

RM: Resonancia Magnética

ROT: Recomendaciones de Optimización de Tratamiento

SBAN: sustancia blanca aparentemente normal

SGC: Sustancia Gris Cortical

SNC: sistema nervioso central

SNP: single nucleotide polymorphism, polimorfismo de un solo nucleótido

TNF: factor de necrosis tumoral

Th: células T colaboradoras (*helper*)

TWT: test de 25 pies

VOI: volumen espectroscópico de interés

c. Resumen.

Introducción.-

El Interferón β (IFN) es la Droga Modificadora de la Enfermedad (DME) más ampliamente usada en la actualidad para el tratamiento de la esclerosis múltiple.

Los principales beneficios de esta solo son vistos en aproximadamente del 30 al 50% de los pacientes. La determinación de la respuesta al tratamiento requiere una evaluación clínica del paciente durante un periodo de tiempo relativamente largo lo que puede significar la acumulación de discapacidad antes de que el paciente sea clasificado como no respondedor.

Es por lo tanto importante que los no respondedores sean identificados de manera precoz y reciban una terapia alternativa tan pronto como sea posible. Un indicador precoz de la respuesta permitiría un uso racional de los fármacos y mejorarían el cuidado de los pacientes.

Hipótesis.-

Tenemos necesidad de métodos sencillos y fiables que nos indiquen, usando solo datos clínicos, si un paciente dudoso es buen respondedor o no.

Desconocemos que influencia podrían tener tanto las variaciones en el ambiente de oxidorreducción como la variación de los niveles intra cerebrales in vivo de ciertas sustancias como el N Acetil Aspartato, la colina o el mioinositol tras el inicio de un tratamiento en la respuesta a largo plazo de este tratamiento así.

También desconocemos la influencia de los polimorfismos genéticos en las diferentes respuestas al interferón beta que podrían suponer un instrumento de gran utilidad en la decisión de tratamiento de estos pacientes.

Objetivos.-

1. Medir el efecto a largo plazo del tratamiento con interferón β 1a IM en la acumulación del daño axonal en pacientes con Esclerosis Múltiple Remitente Recidivante (EMRR) usando marcadores de oxidorreducción y Espectroscopia por Resonancia Magnética (ERM)
2. Validar los criterios clínicos de optimización de tratamiento de la Canadian Multiple Sclerosis Working Group (CMSWG) aplicándolos a una población española de pacientes con EMRR tratados inicialmente con interferón β 1a IM
3. Identificar un conjunto de genes ligados a las diferencias interindividuales en la eficacia a la terapia con Interferón Beta.

Metodología.-

Para responder a estas preguntas se han planteado tres estudios diferentes:

1. Estudio del efecto del interferón β 1 a IM sobre marcadores de degeneración axonal y de oxido reducción.
2. Estudio de validación de los criterios de optimización del tratamiento de la CMSWG
3. Estudio de farmacogenómica de respuesta al Interferón β .

Conclusiones.-

1. Desde los primeros estadios de la enfermedad, los ratios NAA: Cr en SBAN determinados por ERM fueron menores en los pacientes con EM, es decir, el daño axonal es un fenomeno precoz.
2. La discapacidad de los pacientes (medida por la EDSS) se correlaciona con los niveles de NAA, un marcador de la pérdida axonal.
3. No hay correlación entre la discapacidad, cuando se utiliza el MSFC, y el NAA.
4. El hecho de que los brotes pudieran ser buenos marcadores subrogados de la discapacidad clínica en EM sugiere que los pacientes con EM tienen probabilidades de obtener beneficio usando IFN- β en lo que se refiere a la progresión de la discapacidad y apoya el uso de los cambios en estos marcadores como predictores de la evolución clínica durante los años siguientes.

5. El IFN beta 1 a IM no disminuyó el daño axonal en pacientes con EMRR. El ratio NAA / Cr en SBAN ha seguido disminuyendo durante el período de observación

6. Existe un grupo de pacientes que podríamos considerar buenos respondedores ya que, aunque globalmente los pacientes pierden NAA, el 30% no lo pierden o incluso lo recuperan. Este porcentaje es similar al que se comenta en estudios clínicos respecto a la respuesta del interferón.

7. Los niveles de oxidorreducción inmediatos a la introducción de la medicación inmuno moduladora pueden jugar un papel importante en la discapacidad desarrollada durante los primeros años de enfermedad y con su monitorización se podría pronosticar la respuesta al tratamiento

8. Los paciente que responden al tratamiento en las primeras etapas de la enfermedad disminuirán el estrés oxidativo con lo que dará tiempo a disminuir tanto el daño energético como el daño axonal y con la energía exedente se pondrían en marcha la remielinización y se evitaría la gliosis tardía. El fracaso de los tratamientos en la fase progresiva sería por el papel menos importante de la inflamación sino el mas preminente del daño difuso

9. Nuestros datos muestran que ROT, utilizando sólo la información clínica, son capaces de predecir si los pacientes tendran un alto nivel de actividad tanto por la tasa de brotes como en aumento de la discapacidad medida por la EDSS, con una alta sensibilidad y especificidad. Es decir, las ROT son una buena herramienta para el seguimiento de la respuesta a la DMD en pacientes con EM.

10. El programa desarrollado por nosotros es intuitivo, no requiere mucho tiempo y puede ayudar a los neurólogos a evaluar a los pacientes de manera objetiva y fácilmente.

11. Este estudio nos sugiere un grupo de marcadores que podrían estar relacionados con la respuesta al tratamiento con interferón beta en pacientes con esclerosis múltiple.

I. Esclerosis Múltiple

INTRODUCCIÓN

La esclerosis múltiple (EM) es una enfermedad inflamatoria y auto inmune del sistema nervioso central (SNC), que se manifiesta en el 90% de los casos con brotes agudos que provocan defectos neurológicos, generalmente regresivos.

La edad de inicio de la enfermedad se sitúa entre los 20 y 40 años. La prevalencia de la EM en España fluctúa entre 40 y 70 casos por cada 100000 habitantes, con una incidencia de 3-4 nuevos casos por 100000 habitantes y año (Fernández y cols., 1994; Bufill y cols., 1995; Uría y cols., 1997; Modrego y cols., 1997; Benito-León y cols., 1998; Pina y cols., 1998; Tola y cols., 1999; Mallada- Frenchin y cols., 2000; Casquero y cols., 2001; Hernández y cols., 2002). Estos datos sitúan a nuestro país en una franja de prevalencia de EM moderada-alta.

Es primariamente desmielinizante pero se sigue de degeneración axonal, que es la causa de la discapacidad progresiva que se produce en las fases más avanzadas de la enfermedad. Esta degeneración axonal se pone ya en marcha desde el comienzo de la enfermedad (Trapp y cols., 1998).

El origen de la EM sigue en estudio. La teoría más aceptada defiende la combinación de factores ambientales y genéticos. No obstante, pese a la enorme cantidad de trabajos realizados, aún no se ha identificado con exactitud la sucesión de fenómenos que intervienen en el desarrollo y perpetuación de la enfermedad.

2. IMPORTANCIA SOCIOECONÓMICA DE LA ESCLEROSIS MÚLTIPLE

La EM es una de las primeras causas de discapacidad de origen no traumático en adultos jóvenes y supone un coste económico y social importantísimo, en los países desarrollados.

En una población cada vez más longeva, el impacto económico que representa la invalidez temporal o permanente de personas en edad biológica de trabajar es inmenso. Si esto se suma a la necesidad de ayudas socio-sanitarias desde edades tempranas y a los gastos de atención hospitalaria y tratamiento crónico, el gasto generado es cada vez mayor.

En España el coste económico medio por cada paciente oscila entre los 27.000 y 45.000 euros anuales (Orlewska y cols., 2005, Casado y cols., 2006, Kobelt y cols., 2006). Según datos del Instituto Nacional de Estadística, la población española en enero de 2012 era de 47.190.493 habitantes. Considerando la prevalencia de 40-70 casos por 100000 habitantes, estimamos un gasto medio superior a los 1000 millones de euros anuales.

3. INTERÉS EPIDEMIOLOGICO DE LA ESCLEROSIS MÚLTIPLE

Estudios en emigrantes observaron que la adolescencia era la edad crítica para retener el riesgo de la región de procedencia. Este conocimiento, junto al viejo concepto de *gradiente norte-sur*, que resume la idea de una mayor prevalencia de la enfermedad en las regiones más norteñas, sirvió en su momento para defender la teoría de un factor ambiental como el causante de la enfermedad. Sin embargo, la repetición de algunos estudios epidemiológicos nos ha hecho modificar la visión de la distribución de la EM en el mundo. Así, aunque seguimos aceptando parcialmente el concepto de un gradiente norte-sur, se ha visto que existen enormes diferencias entre regiones muy próximas, por ejemplo en Enna (Sicilia) la prevalencia es de 120/100000 habitantes (Grimaldi y cols., 2001) y en Malta es de 13/100000 (Dean y cols., 1999). Estas diferencias serían inexplicables desde un enfoque puramente ambiental, y es en este punto donde cobra importancia el factor genético. Hay datos suficientes para afirmar que existe una predisposición genética para desarrollar la EM.

4. GENETICA DE LA ESCLEROSIS MÚLTIPLE

Diferentes estudios de agregación familiar han confirmado y cuantificado el aumento del riesgo a padecer la enfermedad en parientes de individuos afectados (Sadovnick y cols., 1998; Robertson y cols., 1996; y Carton y cols., 1997).

Estos estudios ponen de manifiesto la influencia de los factores genéticos en la etiología de la enfermedad. El 20% de los afectos tienen antecedentes familiares de la enfermedad (Compston y cols., 2002). El riesgo de padecer la enfermedad aumenta con la proximidad genética de forma clara, a 1 de cada 500 en las formas familiares, 1 de cada 25 si es un hermano y uno de cada 3 si se trata de gemelos monocigóticos (Willer y cols., 2003). Por el contrario, el riesgo para hermanos adoptados de padecer la EM, es el mismo que el de la población general (Ebers y cols., 1994).

El hecho de que existan pacientes que padecen la enfermedad pero no presentan síntomas, ha dificultado la valoración real de la carga genética en la transmisión de la enfermedad o su susceptibilidad (Barakat Shrem y cols., 2003).

La dificultad de saber si individuos asintomáticos con lesiones en Resonancia Magnética (RM) típicas de la EM deben o no incluirse como afectados, puede contaminar los estudios genéticos. La presencia de secreción intratecal de bandas oligoclonales (BOC) de Inmuno globulina G (Ig G), que es un marcador de alta sensibilidad y especificidad, puede aportar una mayor seguridad diagnóstica (Villar y cols., 2005).

Aunque los datos de agregación familiar y los estudios de concordancia pueden utilizarse para inferir la proporción de factores genéticos involucrados en cualquier patología compleja, el verdadero reto de la genómica estructural moderna es el aislamiento específico y caracterización molecular de todos y cada uno de estos factores. Esta tarea, sin duda formidable, ocupará buena parte de la investigación genética en los próximos decenios.

Los primeros esfuerzos en identificar factores genéticos de susceptibilidad a EM establecieron la asociación de esta patología a los genes del complejo mayor de susceptibilidad HLA-A3 (Naito y cols., 1972), -B7 (Jersild y cols., 1972) y -DR7 (Jersild e y cols., 1973). Actualmente estos genes son conocidos como HLA-A3, -A7 y LD-7a respectivamente estando todos en desequilibrio de unión dentro del complejo mayor de histocompatibilidad. Estudios más detallados en esta región han identificado el alelo HLA-DRB1*1501 como causativo de la asociación observada (Oksenberg y cols., 2004; Yeo y cols., 2007).

El modesto riesgo de padecer la enfermedad que confiere este alelo hace suponer la existencia de otros factores genéticos adicionales de susceptibilidad a EM. El modo de herencia en las enfermedades complejas como la EM, si existe, no es apreciable y además, se espera que desde un punto de vista genético sea un subconjunto de alelos (de baja penetrancia) combinados entre sí (epistasis) y/o con factores medioambientales (interacciones gen - medio ambiente) los que confieran el riesgo a padecer la patología (modelo multifactorial o complejo).

Aunque se ha especulado mucho entorno al modelo complejo de enfermedades comunes, la hipótesis genética más aceptada y extendida para explicar el papel de los genes en las enfermedades comunes es la hipótesis “enfermedades comunes, genes comunes” emitida por Eric Lander en 1996. Esta hipótesis sugiere que los alelos de riesgo de estas enfermedades deben ser polimorfismos relativamente frecuentes ($MAF > 1\%$) con una penetrancia baja. Otros autores han denominado poligenes a estos alelos vinculados a enfermedades comunes (Altshuler y cols., 2001). Una extensión de esta idea añade además, que estos alelos de baja penetrancia deben ser inespecíficos, es decir, que pueden conferir protección o riesgo a enfermedades clínicamente relacionadas (Becker y cols., 2004). Becker sugiere también que la aparición de los distintos cuadros clínicos puede deberse a fenómenos de exposición diferencial a agentes externos o incluso a diferentes combinaciones de los mismos poligenes comunes. Llegados a este punto es tentador sugerir la existencia de 1) factores de susceptibilidad comunes en las patologías autoinmunes del adulto. 2) unos mecanismos fisiopatológicos comunes para todas las enfermedades neurodegenerativas que se caractericen por un daño axonal progresivo (Enfermedad de Alzheimer, Enfermedad de Parkinson, la Esclerosis Lateral Amiotrófica...).

Para la investigación sistemática de estos supuestos es necesario plantear un abordaje libre de hipótesis mediante rastreo completo del genoma empleando microarrays de SNPs y estudios de validación cruzada de los resultados en diferentes series de pacientes. Gracias al avance en la nanotecnología de paralelización de los microchips y el incremento de densidad de los arrays de SNPs, se han conseguido coberturas del genoma cercanas al 80% empleando el

rastreo de 500.000 – 1.000.000 SNPs simultáneamente en un solo ensayo Este logro reciente, ha permitido el lanzamiento de proyectos de genotipación masiva en las enfermedades más prevalentes. El empleo de la tecnología de arrays de SNPs en la investigación de EM se ha extendido en los últimos años, permitiendo aumentar considerablemente el número de variantes genéticas que confieren susceptibilidad a la EM o que influyen en la progresión de la enfermedad (Baranzini y cols., 2012).

Esta abundante información genética generada en los últimos años, continúa originando nuevos descubrimientos en el campo de la susceptibilidad genética a la EM mediante nuevos enfoques analíticos que incluyen, además de los meta-análisis, (Patsopoulos y cols. (2012), análisis de polimorfismos de número de copias (*Copy Number Variations*, CNVs) (Cronin y cols., 2008), análisis de rutas biológicas (Song y cols., 2013) o análisis de interacciones (Bush y cols., 2011). Estos estudios están aún poco extendidos en el campo de la EM, y con frecuencia se limitan a genes o poblaciones muy seleccionadas. De especial interés es el análisis multilocus, que permite investigar la naturaleza poligénica de las enfermedades comunes (Hoh y cols., 2003), y el análisis de rutas biológicas empleando datos de genoma completo. Estos enfoques analíticos se caracterizan por su elevado potencial para identificar nuevos mecanismos etiopatogénicos de la enfermedad hasta ahora desconocidos, algunos de los cuales serán comunes a otras enfermedades autoinmunes y/o degenerativas (Hoh y cols., 2003; De Castro y cols., 2004; Morón y cols., 2006)

5. CARACTERÍSTICAS ANATOMO PATOLÓGICAS DE LA EM.

Las características anatómo patológicas más destacadas de la EM son la inflamación, desmielinización, remielinización y la neurodegeneración, que se producen ya sea de manera focal o difusa en la sustancia blanca y sustancia gris del cerebro y la médula espinal (Lassmann y cols., 2007). Estas características anatómo patológicas están presentes en tanto la EMRR como en la Esclerosis Múltiple Secundaria Progresiva (EMSP), así como en Esclerosis Múltiple Primariamente Progresiva (EMPP), aunque estas varían con el tiempo, tanto cuantitativa como cualitativamente entre estas tres formas de EM y entre los individuos con la misma forma.

5.1. Inflamación.

La inflamación esta invariablemente presente en todas las etapas de la EM (Frischer, 2009). Las lesiones inflamatorias en los pacientes con EM contienen infiltrados perivasculares y parenquimatosos de linfocitos y macrófagos (Prineas y cols., 1978). Las Células T CD8 + están presentes en mayor número que otros subconjuntos de células T, células B o células plasmáticas. (Frischer y cols., 2009, Babbe y cols., 2000). En las lesiones activas, que dominan en la fase remitentes recidivantes de la esclerosis múltiple, un número bajo de células T están presentes en los sitios de daño tisular inicial durante la etapa de pre fagocítica de la formación de la lesión (Barnett y cols., 2004) y el daño tisular en curso está asociado con la infiltración de macrófagos y / o activación de las microglías residentes (Prineas y cols., 1978). La invasión del tejido por la mayoría de estas

células inflamatorias se produce después de la destrucción inicial de la mielina (Marik y cols., 2007, Henderson y cols., 2009).

Esta observación sugiere que ocurren dos tipos diferentes de inflamación dentro de las placas activas: la respuesta inicial, consistente principalmente de células T CD8 + y abundante la activación microglial y una secundaria con más reclutamiento de células T, células B y macrófagos como consecuencia de la destrucción de la mielina.

La inflamación en la fase remitente recidivante de la EM se caracteriza por la infiltración de células inflamatorias en el SNC, provocando un profundo daño de la barrera hemato encefálica (BHE), que ha sido demostrado con la captación de gadolinio de las lesiones (Grossman y cols., 1988, Miller y cols., 1988, Gaitan y cols., 2011)

En las EMPP y EMSP, la desmielinización activa y la neurodegeneración están también invariablemente asociadas con la inflamación (Frischer y cols., 2009). Sin embargo, la relación entre la inflamación y el daño de la BHE es menos evidente que en EMRR (Hochmeister y cols., 2006). En primer lugar, un deterioro leve de la BHE, indicado patológicamente por la fuga de proteína del suero (Hochmeister y cols., 2006, Kwon y cols., 1994), puede ocurrir en conjunción con lesiones crónicas, independientemente de la presencia o ausencia de infiltrado inflamatorio (Kwon y cols., 1994, Kirk y cols., 2003). Sin embargo, la extensión del daño de la BHE es demasiado limitado para ser detectados por resonancia magnética con gadolinio. El proceso inflamatorio en el cerebro de pacientes con EMPP o EMSP es pues un

proceso, al menos en parte, disociado del daño de la BHE, con el resultado de que los infiltrados inflamatorios se encuentran con frecuencia alrededor de venas pequeñas y vénulas sin evidencia de una pérdida de la integridad de la BHE (Hochmeister y cols., 2006). En los espacios del tejido conectivo del cerebro, tales como las meninges y los espacios de Virchow-Robin, se han observado grandes agregados de células inflamatorias, que muestran las características estructurales de los folículos linfáticos, tales como áreas germinales de células T y de células B y la presencia de células dendríticas foliculares (Serafini y cols., 2004, Magliozzi y cols., 2010, Howell y cols., 2011). Esta observación demuestra que a medida que la enfermedad progresa, la inflamación está parcialmente compartimentada detrás de una BHE intacta.

5.2. Desmielinización.

Las placas focales de desmielinización son el sello más característico de la patología de la esclerosis múltiple (Lassmann y cols., 2007). En el cerebro, dichas placas están presentes en la Sustancia Gris y en la Sustancia Blanca en todas las etapas de la enfermedad. En la EM progresiva, sin embargo, la anatomía patológica cambia en términos cuantitativos desde lesiones nuevas y activas a una lenta expansión de las lesiones pre-existentes, lo que conduce a una desmielinización cortical pronunciada y esta está asociada con un daño difuso extenso a la sustancia blanca y gris de aspecto normal. Como consecuencia de este cambio, los pacientes pueden presentar una mezcla de tipos de lesiones - lesiones activas clásicas, lesiones expansivas lentas, lesiones inactivas y placas remielinizadas. Los tipos de

lesiones que están presentes dependen de la etapa de la esclerosis múltiple, de la velocidad de desarrollo de la placa, y el alcance de la remielinización.

Las placas de desmielinización focal no se limitan a la sustancia blanca, sino que también están presentes en la corteza y en los núcleos de la sustancia gris profunda (Peterson y cols., 2001, Cifelli y cols., 2002). En los primeros estadios de la enfermedad están asociadas con una inflamación profunda, consistente en infiltrados inflamatorios perivasculares, dispersión de linfocitos a través del tejido, y activación de macrófagos y microglia (Lucchinetti y cols., 2011). Sin embargo estas lesiones corticales son más abundantes en la etapa progresiva de la EM, en la que son más prominentes en la corteza subpial (Kutzelnigg y cols., 2005) y, cuando se activan, están vinculados a inflamación local (infiltrados de células T y de células B) en las meninges (Howell y cols., 2011). Tanto la desmielinización activa como la neurodegeneración se asocian con la activación de las microglia (Bo y cols., 2003, Magliozzi y cols., 2010).

Este patrón anatómico patológico, junto con la acumulación característica de las lesiones en los surcos corticales, sugieren que el daño tisular activo es impulsado por un factor soluble producido por los agregados inflamatorios meníngeos (Kutzelnigg y cols., 2005, Howell y cols., 2011). Este factor difunde dentro de la corteza e induce la desmielinización y neurodegeneración ya sea directamente o indirectamente a través de la activación microglial (Kutzelnigg y cols., 2005, Howell y cols., 2011). Y es que muchos de los componentes de la inmunidad adaptativa e innata producen desmielinización, la muerte de oligodendrocitos y daño axonal o neuronal en los pacientes con EM, incluyendo los linfocitos T

citotóxicos antígeno específicas (Saxena y cols., 2008, Na y cols., 2008), y autoanticuerpos dirigidos contra antígenos neuronales o gliales (Lington y cols., 1988, Mathey y cols., 2007). Por otra parte, las vainas de mielina son particularmente vulnerables a productos liberados por los macrófagos activados y microglías como las citocinas citotóxicas, excitotoxinas o productos derivados del oxígeno y del óxido nítrico. En las lesiones altamente inflamatorias observadas en la EMRR, distintos procesos inmunes podrían contribuir a la desmielinización y la neurodegeneración en diferentes tipos de pacientes o diferentes subgrupos de enfermedad, como se refleja en distintos patrones de desmielinización y de daño lesional (Lucchinetti y cols., 2000). Los patrones de desmielinización observados con mayor frecuencia son los asociados a anticuerpos y complemento (patron II), y el daño tisular similar a la hipoxia (patron III). En el patron III, la desmielinización se inicia por la degeneración de las espículas más distales de los oligodendrocitos y la apoptosis de los oligodendrocitos, como también se ve en las etapas iniciales de las lesiones ictales de la sustancia blanca (Lucchinetti y cols., 2000, Barnett y cols., 2004), y los astrocitos muestran una pérdida de la polaridad, lo que produce una alteración de la organización estructural de la limitante glial perivascular (Sharma y cols., 2010, Matsuoka y cols., 2011). En los pacientes con EMRR, la desmielinización activa se asocia sólo con las células T y microglías activadas (patron I) (Lucchinetti y cols., 2000).

5.3. Daño tisular difuso.

Además de las lesiones focales, los cerebros de los pacientes con EM también mostraron cambios difusos, como una inflamación generalizada, una activación

microglial, una gliosis astrocitica y una leve desmielinización y daño axonal en la sustancia blanca de apariencia normal (Kutzelnigg y cols., 2005, Allen y cols., 2001). Una pérdida generalizada de volumen tisular también se ve en la corteza de aspecto normal (Wegner y cols., 2006). Estos cambios conjuntamente producen una extensa atrofia cerebral con dilatación de los ventrículos.

La extensión y severidad del daño difuso de la sustancia blanca aumenta con duración de la enfermedad y es más pronunciada en la fase progresiva de la EM. Sin embargo, axones en parte conservados se encuentran en todas las lesiones de la EM y, cuando se destruyen los axones, las fibras de pequeño calibre son las predominantemente afectadas (Evangelou y cols., 2001, Stys 2005). El daño difuso de la sustancia blanca muestra una correlación moderada (pero significativa) con la extensión de la desmielinización cortical (Kutzelnigg y cols., 2005).

5.4. Remielinización.

La restauración de la mielina, o la remielinización, es un proceso regenerativo espontáneo que puede ocurrir con notable eficacia, no sólo después de la desmielinización experimental en roedores de laboratorio, sino también en los seres humanos. (Franklin 2002, Patani y cols., 2007, Patrikios y cols., 2006). Ocurre tanto en la sustancia blanca como en la sustancia gris y a las áreas totalmente remielinizadas se les denomina "placas fantasmas" (Patrikios et al, 2006.; Patani et al, 2007; Albert et al, 2007). Curiosamente la remielinización se ha observado no sólo en la fase temprana de la EM, sino también en pacientes con enfermedad de larga evolución (Patrikios et al., 2006).

La remielinización se produce cuando las células progenitoras de oligodendrocitos adultos (OPC), una población amplia de progenitores multipotentes, responden a una lesión, se dividen y emigran, y, finalmente, se diferencian en oligodendrocitos que recubren el axón desmielinizado con una cubierta de mielina nueva (Franklin y cols., 2008, Zawadzka y cols., 2010). Hay al menos dos fuentes conocidas de estos oligodendrocitos: la primera es la gran reserva de OPC que expresan el proteoglicano NG2 y / o el receptor alfa de la PDGF; la segunda proviene de los precursores en la zona subventricular (adultos SVZ) (Menn et al, 2006; Zhao et al, 2008). Las OPC también se han aislado también de la sustancia blanca aparentemente normal, obtenida en el curso de la cirugía para la epilepsia.

Las vainas de mielina recién hechas son más delgada de lo normal, tienen unos internodos más cortos y la variabilidad en la longitud nodal (Perier y Gregoire, 1965). Estas variaciones en el espesor de la mielina y la distancia internodal en estas placas podrían disminuir la eficacia de la conducción saltatoria en los axones mielinizados. Sin embargo, en modelos animales, la velocidad de conducción aumenta durante la remielinización.

La restauración de las vainas de mielina no sólo ayuda a proteger los axones, sino que también restablece la conducción saltatoria y las funciones perdidas. Por lo tanto, la remielinización puede ser considerado como un proceso beneficioso. (Smith y cols., 1979, Jeffery y cols., 1997, Duncan y cols., 2009) Sin embargo, una advertencia potencial es que el proceso de remielinización podría hacer a los axones, temporalmente, más vulnerables a la degeneración antes de que se consiga

una protección mas duradera (Smith 2006). El problema potencial radica en el hecho de que la remielinización restaura rápidamente la capacidad de los axones para conducir los impulsos a altas frecuencias (Smith y cols., 1979), pero esta capacidad avanza más rápidamente que la capacidad del axón para hacer frente a las demandas de energía asociadas con la eliminación de la alta carga de sodio. Este problema puede verse agravado por el aumento de canales de sodio, que se produce durante la maduración nodal y provoca que muchos nodos puedan ser particularmente propensos a la acumulación de sodio (Patrikios et al., 2006, Coman y cols., 2006). Además, en contraste con los modelos experimentales en los que los nodos pueden estar bien organizados en una o dos semanas, en las lesiones de EM los nodos inmaduros parecen persistir durante períodos prolongados. En consecuencia, el aumento del riesgo de degeneración durante la remielinización en los pacientes con la enfermedad no puede ser tan temporal como en modelos experimentales.

La eficiencia de la remielinización disminuye con el aumento de la edad (Rist y cols., 2008). Esta característica de la remielinización tiene un profundo efecto en la EM, pues a menudo la enfermedad dura varias décadas y se refleja tanto en los hallazgos histopatológicos con una disminución en la remielinización con el aumento de la duración de la enfermedad (Goldschmidt y cols., 2009), como en las evidencias clínicas pues la progresión de la enfermedad es edad dependiente y no se ve influenciada por el curso inicial o por los síntomas de la enfermedad (Confavreux y cols., 2006). Por consiguiente, a medida que los pacientes envejecen, sus axones desmielinizados permanecerán sin nuevas vainas de mielina por períodos más largos y serán más susceptibles a la degeneración -una situación

agravada por el probable incremento de la vulnerabilidad axonal asociado a la edad (Irvine y cols., 2006).

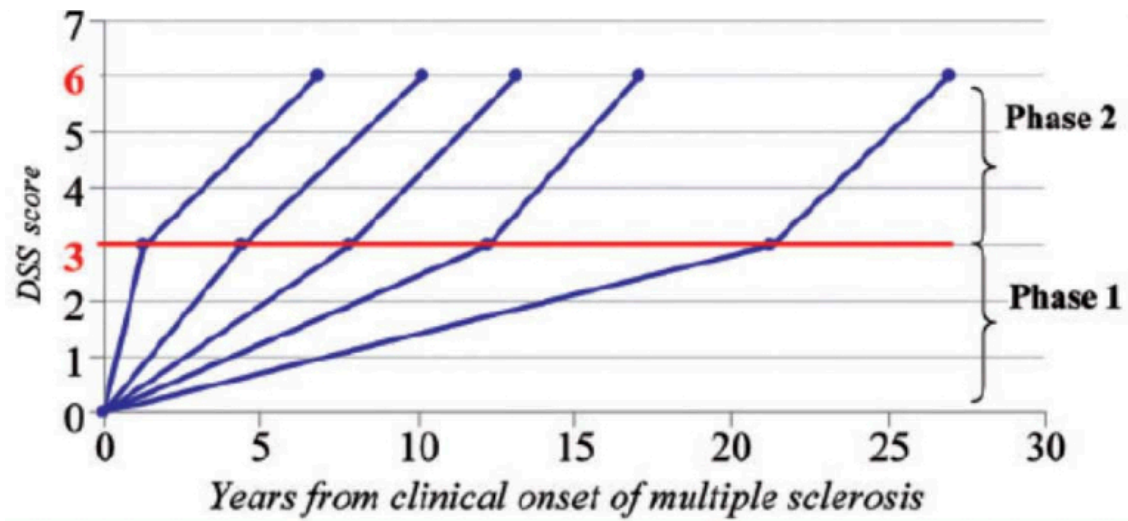
6. EVOLUCIÓN Y TRATAMIENTO DE LA ESCLEROSIS MÚLTIPLE

6.1. Historia natural

La interacción entre discapacidad y brotes define el curso clínico de la EM. En un 90% de los pacientes con EM el comienzo de la enfermedad se caracteriza por la presencia de brotes, con o sin secuela posterior, pero sin progresión de la discapacidad en los periodos libres de recurrencias (EM remitente - recidivante). Tras un número variable de años (15-20 años de evolución) el 50 - 60% de los pacientes que debutaron con brotes presentan una progresión de la discapacidad de forma independiente a la presencia o ausencia de brotes (EM secundariamente progresiva). Un 10% de los pacientes presenta desde el inicio un incremento progresivo e irreversible de la discapacidad, intercalando o no brotes (primariamente progresiva (PP) o progresiva recurrente (PR) respectivamente) (Lublin y Reingold, 1996).

El tiempo medio que transcurre desde el inicio de la EM hasta la pérdida de la autonomía para deambular se sitúa sobre los 20 años de evolución en las formas RR y sobre los 7 años en las formas PP (Pittock y cols., 2004; Tremlett y cols., 2005; Tremlett y cols., 2006). No obstante, una vez se inicia la progresión, ésta parece que avanza a velocidad semejante en los dos grupos de pacientes (Confavreux y Vukusic, 2006) con un pobre pronóstico en ambos grupos. La acumulación de la discapacidad en la EM es un proceso de dos etapas, que comprende una fase precoz de acumulación de discapacidad hasta un nivel de discapacidad moderada (Kurtzke 1983) (EDSS 3,0-4,0, dependiendo del estudio), en el que la secuela tras

un brote podría participar del grado de discapacidad y una fase tardía más allá de este punto de referencia en el que la velocidad de progresión podría ser independiente de la presencia de brotes superimpuestos (Confavreux y cols., 2000, Leray y cols., 2010, Scalfari y cols., 2010, Confavreux y cols., 2003)



De entre todos los factores que en algún momento se han relacionado de forma negativa con el pronóstico a medio-largo plazo de la EM, parece que una mayor edad al inicio, la ausencia de recuperación completa tras un primer brote y un mayor número de brotes durante los dos primeros años de la enfermedad son los más claros (Riise y cols., 1992; Runmarker y Andersen, 1993, Amato y Ponziani, 2000, Ebers, 2005; Rovaris y cols., 2006). Estudios recientes defienden la importancia de la edad en el inicio de la progresión de la discapacidad. Así, parece que la edad en la que formas RR se tornan en SP se asemejaría a la edad de inicio de las formas PP (Confavreux y cols., 2000).

Los criterios diagnósticos actuales permiten establecer o aproximar el diagnóstico

de EM de forma precoz, tras un único brote de la enfermedad (McDonald y cols., 2001; Polman y cols., 2005, Polman y cols., 2011). Esto nos ha permitido estudiar por un lado el riesgo de desarrollar un segundo brote (O’Riordan y cols. 1998; Tintoré y cols., 2001; Swanton y cols., 2006; Miller y cols., 2005a ; Miller y cols., 2005b; Masjuan y cols., 2006; Korteweg y cols., 2006) y adicionalmente predecir el grado de discapacidad futura (Brex y cols., 2002, Tintoré y cols., 2006)

6.2. Modificadores de la historia natural

Hasta la fecha existen varios tratamientos aprobados por la Agencia Europea del Medicamento (EMA) que han demostrado su eficacia en la EM: El IFN- β 1-b (Interferon Beta 1-b Study Group, 1995), IFN- β 1-a subcutáneo (PRISMS study, 1998), IFN- β 1-a intramuscular (Jacobs y cols., 1996) y acetato de glatirámero (Johnson y cols., 1995) como tratamientos de primera línea, y la mitoxantrona (Edan y cols., 1997; Hartung y cols., 2002) como fármaco de rescate. La experiencia a largo plazo con estos fármacos habla de su seguridad, combinado con una eficacia, en términos de reducción de los brotes, de alrededor de 30% (Paty y cols., 1993, IFNB Multiple Sclerosis Study Group., 1993, Jacobs y cols., 1996, PRISMS study, 1998). Estos beneficios han de ser sopesados, sin embargo, frente a la necesidad de inyecciones regulares.

En junio del 2006 la EMA autorizó el uso del natalizumab en monoterapia, un anticuerpo monoclonal anti VLA-4 (Polman y cols., 2006) como fármaco de 2ª línea en pacientes con EM RR refractarios a inmunomoduladores o con formas agresivas de la enfermedad y posteriormente en Marzo del 2011 se autoriza al agonista de

los receptores de esfingosina Fingolimod (Gilenya) con las mismas indicaciones. El Natalizumab, un anticuerpo monoclonal dirigido contra α 4-integrina, impide la invasión del SNC por las células inmunes y reduce la frecuencia de los brotes y la formación de lesiones en RM en pacientes con EMRR. Sin embargo, el riesgo de leucoencefalopatía multifocal progresiva limita su uso. El fingolimod, un modulador del receptor de esfingosina-1-fosfato oral (Kappos y cols., 2006) , ha demostrado una eficacia superior en comparación con el placebo y con dosis baja de IFN- β 1a en los estudios de fase III, con una profunda supresión de la actividad inflamatoria (tanto en términos de lesiones de RM y brotes) y los efectos sobre la atrofia cerebral y la progresión de la discapacidad (Kappos y cols., 2010, Cohen y cols., 2010). Debido a su perfil de seguridad, sin embargo, los pacientes que reciben la primera dosis de fingolimod requieren supervisión y también durante el curso del tratamiento (Visser y cols., 2012, Bourdette y cols., 2012). Dos nuevos fármacos orales, la teriflunomida (O'Connor y cols., 2006, . O'Connor y cols., 2011) y el dimetil fumarato (Gold y cols., 2012, Fox y cols., 2012) han sido recientemente aprobado en los EE.UU (FDA) para el tratamiento de pacientes con EMRR.

Aún ignoramos el efecto de estos tratamientos sobre la discapacidad a largo plazo, pero su utilidad en la fase más activa de la enfermedad está refrendada por numerosos trabajos. En los próximos años dispondremos de una gran cantidad de moléculas, con mecanismos de acción más dirigidos, actualmente en ensayo (fase de seguimiento). En este grupo destacan los anticuerpos monoclonales que actúan en la sinapsis inmunológica contra moléculas específicas. Aquí destacan entre otros, el anticuerpo anti CD 25 (Bielekova y cols., 2004), anticuerpo anti CD52 (Paolillo y cols., 1999).

Se encuentran en experimentación otros con enfoques terapéuticos completamente diferentes, como el trasplante de progenitores hematopoyéticos (Saccardi y cols., 2005), trasplante de células madres mesenquimales (Izquierdo y Fernández, 2012). Estos fármacos actúan en puntos muy dispares, pero con un objetivo común: frenar los mecanismos inflamatorios que conducen parcial o totalmente a la desmielinización y daño axonal.

La neuroprotección es también un área en investigación. Aunque los propios inmunomoduladores podrían estar provistos de esta capacidad (Biernacki y cols., 2005; Ziemssen y cols., 2005), cada vez se proponen moléculas más específicas neutralizantes de las sustancias capaces de ocasionar directamente lesión axonal, como los inhibidores del óxido nítrico (Encinas y cols., 2005) bloqueadores de los canales de calcio (Brand-Schieber y Werner, 2004) y diversos antioxidantes como las metalotioneínas (Penkowa y cols., 2003) y las estatinas (Endres, 2006).

Aunque como se ha comentado previamente, la remielinización es un hecho que puede suceder espontáneamente, también se investiga en este campo con la intención de poder potenciarla. Existen diferentes ensayos clínicos en marcha sobre este aspecto.

7. RESONANCIA MAGNÉTICA EN LA ESCLEROSIS MÚLTIPLE.

Desde la década de los 80 la RM ha desempeñado un papel incuestionable en el diagnóstico de la EM. Hoy día es la exploración paraclínica por excelencia que, de forma sencilla y reproducible, mejor nos informa sobre el dinamismo de la enfermedad.

7.1. Relevancia de la resonancia magnética convencional.

En los últimos años hemos asistido a la rápida evolución conceptual que ha sufrido la RM. Esto nos ha permitido establecer el diagnóstico de la EM tras un único brote (McDonald y cols., 2001; Polman y cols., 2005, Polman y cols., 2011), conocer mejor el sustrato patológico de las lesiones (Pike y cols., 1999; Barkhof y van Walderveen, 1999) y de la sustancia blanca y gris de apariencia normal (Chard y cols., 2002; Dehmeshki y cols., 2003; Miller y cols., 2003), aproximar un pronóstico en los momentos iniciales de la enfermedad (Dalton y cols., 2002; Tintoré y cols., 2003, Korteweg y col., 2006; Tintoré y cols., 2006) y monitorizar la eficacia de terapias (Bakshi y cols., 2005).

El enfoque más pragmático de la RM se centra en el uso de técnicas convencionales (secuencias potenciadas en T2/Densidad protónica y T1 con y sin gadolinio), útiles para el diagnóstico y para caracterizar sólo parcialmente la naturaleza y grado de la lesión.

Sin embargo, la enorme heterogeneidad del sustrato patológico de las lesiones, con

diferentes grados de desestructuración tisular y la coexistencia de distintos procesos neuropatológicos, como la inflamación-desmielinización y el daño axonal-gliosis, podría ser la responsable de la escasa correlación entre los parámetros radiológicos y las medidas clínicas utilizadas en la práctica diaria (Filippi y cols., 1998; Zivadinov y Leist, 2005). Esto ha llevado a usar cada vez más técnicas no convencionales como la transferencia de magnetización y espectroscopia por RM, para suplir las deficiencias de las primeras (Barkhof y cols., 1999; Filippi y cols., 2002).

7.2. Espectroscopia por resonancia magnética de protón (ERM-H1)

La espectroscopia por resonancia magnética (ERM) es una técnica que aprovecha el comportamiento de sustancias endógenas en un campo magnético para medir los procesos biológicos subyacentes extendiendo el campo de la imagen por RM al análisis bioquímico de los tejidos *in vivo*.

Permite estudiar las variaciones de la frecuencia de resonancia en función del núcleo, básicamente hidrógeno-1 o fósforo-31, y para un mismo núcleo en función de la molécula de la que forme parte. El núcleo de hidrógeno-1 (H1) es el más sensible y más ampliamente distribuido en todos los tejidos, y actualmente es el más estudiado, sobre todo en neurología. Los núcleos de un número de átomos determinado son excitados por el campo magnético. Cuando la energía de esos núcleos vuelve al estado de la línea basal se puede medir una rúbrica de frecuencia particular para cada núcleo. Esquemáticamente podemos decir que la magnitud de

cada pico en esta rúbrica de frecuencia corresponde a la concentración de un átomo en particular en la región encefálica bajo evaluación.

Los diferentes metabolitos nos aportan información específica estructural del tejido y nos ofrecen información del tipo de alteración que subyace. En nuestro campo los de mayor utilidad son los grupos N- acetil, la creatina y fosfocreatina, la colina y el lactato:

- **Grupo N-Acetil.** Es la resonancia más intensa en personas sanas, principalmente compuesta por N-acetil-aspartato (NAA) y en menor proporción por el N-acetilaspargilglutamato. El NAA es una sustancia derivada de un aminoácido, sintetizado en las neuronas, principalmente en las mitocondrias (Bates et al, 1996; Moffett et al, 2007; Patel y Clark, 1979), y es transportado hacia los axones y resuena principalmente a 2,02 ppm. Se piensa que es un marcador específico de neuronas, axones y dendritas al estar presente prácticamente de manera específica en neuronas de cerebros adultos (Simmons y cols., 1991; Trapp y cols., 1998). Sobre esta base, una concentración reducida de NAA se interpreta generalmente como la disfunción y / o pérdida neuronal / axonal. Esto ha sido confirmado por 1H-MRS y por estudios histológicos (Bitsch y cols., 1999). Además, el NAA es un muy buen marcador de la función / disfunción mitocondrial, y por lo tanto las fluctuaciones de sus valores podrían ser secundarios a fallos de esta organela.

- **Derivados de la colina (Cho).** Es la segunda resonancia más intensa en personas sanas. Las señales de Cho en 3,2 ppm tienen contribuciones de múltiples moléculas que incluyen fosforilcolina, glicerofosforilcolina y plasmalógeno colina y una

contribución muy pequeña de la acetilcolina y colina (Frahm y cols., 1997). El pico de Cho parece reflejar el metabolismo celular de la membrana (Narayana y cols., 2005). También, la concentración elevada de Cho representa una renovación de la membrana de las células aumentada como se ve en la desmielinización, la remielinización, la inflamación y gliosis en los pacientes con EM (Narayana y cols., 2005).

- **Creatina y fosfocreatina (Cr).** Es uno de los compuestos básicos en el metabolismo del cerebro, y su concentración suele ser constante o poco variable (De Stefano y col., 1995; Cucurrella y cols., 2002). Su descenso puede relacionarse con una disminución del metabolismo energético y su incremento con la presencia de gliosis.

- **Lactato (Lac).** El Lac es visto como un doblete que resuena a 1.33 ppm. Es el producto final de la glicólisis anaeróbica y no se observa comúnmente en el cerebro normal. Esta aumentado en las lesiones agudas y se relaciona con la activación de macrófagos después de la ruptura de membrana.

- **Mio inositol (mI).** El mI exhibe dos resonancias, a 3,5 ppm y 4,06 ppm. Debido a su proximidad a la resonancia del agua de los tejidos, la amplitud del pico de 4,06 ppm se ve afectada por el grado de supresión de agua y no se considera que es un indicador fiable de la concentración de mI. El mI parece ser específico de la glía y no se encuentra en neuronas (Brand y cols., 1993). También el mI es un precursor de los constituyentes de la membrana de fosfolípidos, y su concentración se ve afectada por la formación y descomposición de la mielina.

- **Otros.** En general, el Glutamato (Glu) y la Glutamina (Gln) no han sido resueltos bien, incluso con un RM de 3,0 T y la combinación de las resonancias de estos dos se conoce comúnmente como GLX. Las resonancias de Glx aparecen entre 2,1 y 2,4 ppm. Mientras que algunos estudios se han centrado en la evaluación de los niveles totales de Glu y Gln en condiciones patológicas, otros estudios han empleado métodos de edición espectral para resolver la resonancia Glu. Srinivasan et al (Srinivasan y cols., 2005) han demostrado concentraciones elevadas de Glu en lesiones agudas y en la Sustancia Blanca Aparentemente Normal (SBAN) sin elevación significativa en las lesiones crónicas en los pacientes con EM. Estos hallazgos sugieren que la excitotoxicidad mediada por glutamato juega un papel más importante en aguda que en estadios crónicos de la EM. Un análisis de asociación de todo el genoma reciente en pacientes con EM encontró una asociación significativa entre los genes con alta relevancia en la biología del glutamato y los niveles de glutamato en el cerebro y el grado de neurodegeneración tras 1 año de seguimiento (Baranzini et al, 2010).

Los lípidos junto con otras macromoléculas (referido como lípidos por brevedad) aparecen como picos anchos y resuenan entre 0,8 y 1,5 ppm. En los tejidos sanos, debería haber unos picos de lípidos muy débiles en el espectro a no ser que estuviera contaminado por la grasa subcutánea de los tejidos no neurales. Estos picos se han reportado en la EM y se cree que representa la desmielinización / remielinización (Narayana y cols., 1998).

7.2.1. Aplicación de ERM a EM: Lesiones

Las lesiones crónicas presentan una reducción de los niveles de NAA, que indica pérdida neuronal / axonal. Esto es particularmente cierto en aquellas lesiones que también aparecen hipointensa en las imágenes potenciadas en T1 (también conocidas comúnmente como "agujeros negros" (Adams y cols., 1999)). También, se observaron en estas lesiones mayores niveles de Cr y Cho, lo que sugiere (a) gliosis en curso y la remielinización en las lesiones isointensas en imágenes de RM ponderadas en T1 y (b) recambio de membrana (de y re mielinización) (He y cols., 2005).

Las lesiones agudas muestran una amplia gama de anormalidades en ERM. Entre las que se incluyen la reducción de NAA, lo cual podría ser el resultado de la pérdida axonal o reflejar disfunción axonal reversible debido a deterioro funcional, aumento de Cho y la presencia de lípidos colina y del lactato, que reflejan la liberación de fosfolípidos de la membrana y el metabolismo de las células inflamatorias (Narayana y cols., 1998, Arnold y cols., 2000, Wolinsky y cols., 1990, Larsson y cols., 1991, Davie y cols., 1994).

7.2.2. Aplicación de ERM a EM: Sustancia blanca de apariencia normal

Ahora se acepta que en pacientes con EM " la sustancia blanca aparentemente normal ", que parece normal tanto macroscópicamente como con RM convencional en realidad no es normal. En efecto, en la SBAN se han visto anormalidades histopatológicas tales como la pérdida axonal (Ganter et al, 1999;. Evangelou et al, 2000, 2001; Lovas et al, 2000; Bjartmar et al, 2001) y la proliferación de los

astrocitos (Allen y McKeown, 1979; Allen et al, 1981). Por otra parte, a pesar de que no son normalmente visibles en la RM convencional (Kidd et al, 1999; Geurts et al, 2005a, b; Peterson y Trapp, 2005), las lesiones corticales son en realidad muy comunes y se ha demostrado que la demielinización y la pérdida axonal se producen en la sustancia gris de los pacientes con EM (Peterson et al, 2001; Bo et al, 2003; Geurts et al, 2005a; Peterson y Trapp, 2005.).

Los resultados de una variedad de técnicas de resonancia magnética no convencionales han apoyado la idea de que el SBAN de los pacientes con EM es, de hecho, anormal (Filippi et al, 1999;. Wolinsky y Narayana, 2002 ; Caramanos et al, 2003). Por ejemplo, los estudios utilizando espectroscopia de resonancia magnética de protones (ERM) han proporcionado pruebas de cambios en la SBAN estos pacientes (Matthews et al, 1998;. Arnold, 1999; Wolinsky y Narayana, 2002).

7.2.3. Aplicación de ERM a EM: Sustancia Gris Cortical (SGC)

En pacientes con EMRR precoces (Chard y cols., 2002) se ha descrito una reducción estadísticamente significativa de la NAA, Cho y GLX. La reducción de NAA en SGC sugirió una disfunción o pérdida neuronal leve pero generalizada, desde el principio de la enfermedad (Kapeller y cols., 2001). Los déficits de NAA en la SGC fueron encontrados en la forma progresiva de la enfermedad, la cual, sin embargo, no se correlacionó significativamente con EDSS lo que sugiere que el proceso patológico en la EM se extiende hacia la SGC, en particular en la forma progresiva de la enfermedad (Adalsteinsson y cols., 2003).

7.2.4. Conclusiones.

La ERM ha demostrado poder suplir parte de las deficiencias de la RM habitual gracias básicamente a dos particularidades: permite demostrar una alteración tisular del parénquima cerebral en regiones de apariencia normal (Davie y cols., 1997, Fu y cols., 1998; Leary y cols., 1999; Sarchielli y cols.,1999; Casanova y cols., 2003) y nos informa cualitativamente del sustrato patológico que acontece en la región (Barkhof y van Walderveen, 1999; Rovaris y Filippi, 2002).

En la actualidad, la ERM- H1 es una técnica limitada a la investigación, y aún no se incluye como herramienta en la práctica diaria. Sin embargo, hoy día que parte del esfuerzo se centra en la elaboración de tratamientos neuroprotectores, es probable que estas técnicas sean necesarias en la monitorización de la eficacia de los nuevos fármacos (Schubert y cols., 2002).

II. Mecanismos de neurodegeneración

1. INTRODUCCIÓN.

Se han propuesto varios mecanismos para explicar la neurodegeneración en la EM progresiva. Diversos estudios no han podido demostrar una correlación entre las lesiones en la sustancia blanca y la atrofia cerebral (Evangelou y cols., 2006, Kutzelnigg y cols., 2005) lo que sugiere que estas lesiones no son los únicos elementos que tiene una función en la pérdida del volumen tisular que se produce con la progresión de la enfermedad.

Sin embargo, una vez que se alcanza un cierto umbral de daño axonal en las placas o en la sustancia blanca y gris de aspecto normal, incluso un daño axonal leve dará lugar al deterioro de los síntomas neurológicos del paciente, debido al agotamiento de los mecanismos compensatorios (Bjartmar y cols., 2003).

Esto se agrava con el fallo progresivo de los mecanismos de remielinización que, como hemos visto, ocurre con el paso del tiempo en los pacientes con EM. En la mayoría de las lesiones de la EM, en particular las surgidas en los estadios progresivos, la remielinización es escasa, a pesar de la presencia de axones y células progenitoras de oligodendrocitos en al menos un subgrupo de placas.

2. DEGENERACIÓN AXONAL EN LAS LESIONES INFLAMATORIAS AGUDAS.

Existen dos tipos diferentes de inflamación dentro de las placas activas: la respuesta inicial, consistente principalmente de células T CD8 + y abundante la activación microglial y una secundaria con más reclutamiento de células T, células B y macrófagos como consecuencia de la destrucción de la mielina.

2.1. Activación microglial

Las microglia del sistema nervioso central son vigilantes dinámicas de la integridad del parénquima cerebral y reaccionan rápidamente a las amenazas potenciales mediante la encapsulación de los focos peligrosos, la eliminación de las células apoptóticas y ayuda con la regeneración de tejidos en la desmielinización inducida por toxinas [Nimmerjahn y cols., 2005, Remington y cols., 2007]. En el contexto de una inflamación no autoinmune asociado a patógenos, la microglía protege el compartimento neuronal [Trapp y cols., 2007].

En la EMRR, así como en la EM progresiva, el daño tisular activo se asocia con la activación de la microglia (Prineas y cols., 2001). La microglia activada y los nódulos microgliales se ven invariablemente en la sustancia blanca de apariencia normal de los pacientes con EM progresiva (De Groot, y cols., 2001). Sin embargo, la activación microglial también se observa en muchas otras enfermedades neuroinflamatorias o neurodegenerativas, en ausencia de cambios patológicos que se asemejen a los de la EM, tales como demielinización selectiva primaria (Czeh y cols., 2011). Por lo tanto, la activación microglial podría contribuir a la

neurodegeneración en la EM, pero se requieren mecanismos adicionales para desencadenar los patrones de daño tisular que son específicos de la EM. En la EM, la microglía y los macrófagos se convierten en un fenotipo celular fuertemente pro-inflamatorio y pueden potenciar el daño neuronal mediante la liberación de citoquinas proinflamatorias (es decir, el TNF- α , IL-1 β , IL-6) y moléculas proinflamatorias tales como el óxido nítrico, proteolítica enzimas y los radicales libres [Ransohoff y cols., 2009, Vogt y cols., 2009, Hohlfeld y cols., 1997]. Este estallido oxidativo de la microglia activada parece tener un papel importante en la inducción de desmielinización y daño axonal progresivo en las lesiones de EM. Por otra parte, la microglia también podría tener funciones neuroprotectores en función de los factores desencadenantes de la activación, y podría estimular la remielinización través de la eliminación del tejido dañado y la secreción de moléculas neurotróficas (Czeh y cols., 2011).

2.2. Linfocitos T CD8 +

Se han encontrado Linfocitos T CD8 + clonalmente expandidos dentro de las lesiones de EM, así como en el líquido cefalorraquídeo de los pacientes con esclerosis múltiple [Babbe y cols., 2000, Jacobseny cols., 2002]. Sin embargo, la importancia de estas células T CD8 + en la patogénesis de la EM es controvertida ya que existe la evidencia de que por una parte tienen una función supresora que inhibe a los linfocitos T CD4 + autorreactivos patológicos [Hu y cols., 2004, Lu y cols., 2007, Jiang y cols., 2003] y por otra juegan un papel en el daño axonal pues se ha visto una correlación significativa entre el grado de daño axonal y el número de linfocitos T CD8 + [Kuhlmann y cols., 2002, Bitsch y cols., 2000]. De acuerdo con

esto último, se encontraron Linfocitos T CD8 + que inducían la muerte neuronal en cultivos de neuronas y en cortes de hipocampo [Meuth y cols., 2009, Medana y cols., 2000]. Además, se han descrito la transección de neuritas por células T CD8 + [Medana y cols., 2001], un proceso que también puede contribuir a la patología en la enfermedad humana.

2.3. Linfocitos T CD4 +

Las evidencias actuales siguen favoreciendo a los linfocitos T CD4 + reactivas como el componente más importante en la inducción de una respuesta autoinmune contra la vaina de mielina. Sin embargo, la contribución de los linfocitos T CD4 + a la neurodegeneración es cuestión de debate. Surgen dudas derivadas del hecho de que los linfocitos T CD4 + parecen ser bastante raros en las lesiones de pacientes con EM - al menos en las etapas tardías de la enfermedad - y que los tratamientos con anticuerpos dirigidos contra las células T y su diferenciación no mostraron eficacia terapéutica en los pacientes con EM [Segal y cols., 2008]. Sin embargo, el riesgo genético de la EM y la EAE es conferido por alelos de MHC clase II y por otros genes implicados en la expresión fenotípica de linfocitos T, tanto en humanos como en el modelo murino de la enfermedad [Oksenberg y cols., 2004, Mangalam y cols., 2009]. Recientes avances en la visualización de tejidos, han permitido investigar in vivo y en microambientes organotípicos las interacciones entre las neuronas y las células inmunes. Estos han revelado que los linfocitos T CD4 + encefalitogénicos poseen marcadas capacidades migratorias dentro del parénquima del SNC e interactúan directamente con el soma y las dendritas de las neuronas, lo que conduce parcialmente a la muerte celular [Nitsch y cols., 2004].

2.4. Folículos de células B meníngeos.

Teniendo en cuenta la presencia de bandas oligoclonales y el aumento de IgG que caracteriza el LCR de los pacientes con esclerosis múltiple (Kabat y cols., 1948) y la eficacia de los anticuerpos anti-CD20, tales como rituximab, en la disminución de la tasa de brotes (Hauser y cols., 2008), se reconoce que los linfocitos B y las células plasmáticas podrían desempeñar un importante papel en la patología de la EM. Estructuras similares a folículo linfoides ectópicos se han descrito en las meninges de los pacientes EMSP (Serafini y cols., 2004). Estas estructuras contienen células B sugestivas de centros germinales, así como células plasmáticas, células T y células dendríticas. Curiosamente, en la corteza subpial cerca de los folículos meníngeos hay un gradiente de empeoramiento neuronal y de pérdida axonal, sugiriendo que puede haber un elemento citotóxico humoral parcialmente responsable de la desmielinización cortical observado en la patología de la sustancia gris (Magliozzi y cols., 2007, Androdias y cols., 2010, Magliozzi y cols., 2010).

Mientras que la formación y la persistencia de los folículos linfoides sugieren la presencia de antígenos para producir la inflamación existente y la respuesta humoral, la identidad del antígeno o agente infeccioso que está impulsando este proceso nos es desconocida. Los datos epidemiológicos y una mayor reactividad inmune específica al EBV en pacientes con EM sugieren que este virus podría jugar un papel en el estímulo del sistema inmune (Willis y cols., 2009, Thacker y cols., 2006, Lassmann y cols., 2011, Lunemann y cols., 2006, Lunemann y cols., 2008).

Además, parece que hay una conectividad significativa entre las poblaciones de células inmunes presentes en el LCR y en el SNC – específicamente, ciertas células B expandidas clonalmente han sido identificados en el parénquima cerebral, folículos meníngeos y LCR (Lovato y cols., 2011) y además, estas células B son las responsables de la producción intratecal de inmunoglobulinas (Obermeier y cols., 2011). Sin embargo, las bandas oligoclonales persisten con tratamiento con los anticuerpos monoclonal anti-CD20 a pesar del agotamiento de las células B en el suero y en el LCR, lo que indica que las células plasmáticas maduras no se ven afectados por estos tratamientos anti-células B (Piccio y cols., 2010).

2.5. Paradigma para la patogénesis de células Th17.

En la actualidad se tiene la hipótesis de que las células Th17 pro-inflamatorias están también involucrados en la iniciación de la patogénesis de la enfermedad, pues las células Th17 acceden precozmente en el SNC (Steinman y cols., 2007).

Las células inmunes podrían entrar en el sistema nervioso central, para vigilar, a través del plexo coroideo. Investigaciones utilizando un modelo de encefalitis alérgica experimental (EAE) describen una entrada de células Th17 a través del plexo coroideo en el inicio de la enfermedad a través del eje CCR6 - CCL20 (con CCR6 expresado en células Th17 y CCL20 expresadas en el epitelio del plexo coroideo) (Reboldi y cols., 2009). Si este modelo fuera aplicable a la enfermedad humana, podríamos especular que en el contexto de una regulación inmune defectuosa las células Th17 autorreactivas activadas periféricamente se podrían

unir a moléculas de adhesión y receptores de quimioquinas expresadas en el plexo coroideo y migrar a través de la BHE al LCR de los ventrículos.

Una vez dentro de los ventrículos, las células podrían penetrar en el parénquima periventricular o continuar circulando hasta que acceden a la corteza pia y subpial. Las citocinas IL-17 e IL-22 liberadas por las células Th17 aumentan la permeabilidad de la BHE e inician una cascada de penetración de células inmunes por las células Th17 auto-reactivos (Kebir y cols., 2007), así como Th1 (IFN- γ secretora), células T $\gamma\delta$, células CD8 + citotóxica, células B y células plasmáticas secretoras de inmunoglobulina, que luego podrían formar infiltrados perivasculares.

Por lo tanto, podemos plantear un modelo de dos etapas de la enfermedad para la EM, que puede ser similar a la diabetes en ratones NOD, en el que periinsulitis precede a la invasión inflamatoria de la ínsula (Toyoda y cols., 1998). En primer lugar, las células Th17 autorreactivas podría ser atraídas y migrar a través del plexo coroideo para acceder al LCR y el SNC periventriculares y sub-pial. En segundo lugar, las células Th17, que han invadido el SNC, aumentan permeabilidad de la BHE por la liberación de citoquinas y inician una cascada patológica de inflamación que se correlaciona con una exacerbación clínica.

2.6. Hipótesis del Daño por estrés oxidativo

Durante el ataque inflamatorio agudo en la EM, las células T activadas inician la cascada pro-inflamatoria en respuesta a encontrarse con un antígeno. Esta

respuesta produce interferón gamma, que induce a los macrófagos a producir niveles elevados de óxido nítrico (NO) por la regulación al alza de la óxido nítrico sintetasa (NOS2) (Bogdan y cols., 2001) que esta elevada tanto en las lesiones activas como en la sustancia blanca de apariencia normal (Broholm et al, 2004). En la inmunotinción, las células NOS2-positivas parecen ser en su mayor parte los astrocitos.

El aumento de NO inhibe la respiración mitocondrial y reduce la síntesis de Adenosina Tri Fosfato (ATP) (Brown y cols., 2001). El mecanismo por el que NO inhibe la respiración mitocondrial implica a la citocromo C oxidasa, el miembro terminal de la cadena de transporte de electrones situado en la membrana mitocondrial interna (complejo IV de la cadena respiratoria mitocondrial). La Citocromo C oxidasa tiene un dominio de unión para el O₂ y cataliza la oxidación del citocromo C y la reducción de O₂ al agua. A niveles elevados, NO puede sustituir al O₂ en su sitio de unión, bloqueando el flujo de electrones, y alterando la respiración mitocondrial (Cletter y cols., 1994). Debido a que el bombeo de protones desde la matriz mitocondrial al espacio intermembrana está acoplado al flujo de electrones, la síntesis de ATP se ve obstaculizada (Brown y cols., 2001). Una producción de ATP inadecuada impide a la bomba de ATPasa trabajar correctamente y los efectos posteriores son perjudiciales para la supervivencia celular. El aumento de la expresión y la actividad de la citocromo C oxidasa, observado en las lesiones crónicas y de aspecto normal materia blanca de sujetos con EM, pueden representar un mecanismo de compensación para superar la ocupación por parte del NO de la enzima (Mahad et al, 2009; Witte et al, 2009).

Además de la inhibición de la fosforilación oxidativa, el NO también puede afectar a la función mitocondrial, aumentando la producción de radicales libres. Por un lado, la interrupción de la transferencia de electrones en la Citocromo C Oxidasa por el NO aumenta de manera significativa las fugas de electrones desde el sistema respiratorio lo que provoca unos niveles elevados de superóxido. Los niveles de superóxido están generalmente regulados por los sistemas antioxidantes, que convierten al superóxido en peróxido de hidrógeno, y posteriormente, oxígeno y agua. Los Superóxidos que evaden esta conversión puede causar un daño celular importante. También se pueden combinar con el NO para formar peroxinitrito altamente tóxico (ONOO⁻), que puede reaccionar con lípidos, proteínas, ADN, e hidratos de carbono e inactivarlos. El peroxinitrito también tiene un profundo efecto sobre la función mitocondrial, incrementando la peroxidación de los lípidos de la membrana mitocondrial, lo que altera casi todos los componentes de la cadena de transporte de electrones, abriendo el poro de transición de permeabilidad, e induciendo la liberación de citocromo C desde el espacio intermembrana lo que conduce a la apoptosis. Curiosamente, el peroxinitrito esta presente en las lesiones inflamatorias agudas, pero esta ausente en las lesiones crónicas no inflamatorias [Cross y cols., 1998]. Esto sugiere que el peroxinitrito juega un papel más importante en el daño axonal durante los ataques de EM inflamatorios agudos. Los radicales libres también interfieren con la síntesis de novo de componentes de la cadena respiratoria y pueden inducir directamente el daño del ADN mitocondrial.

En la EM hay un aumento de la producción radicales libres, no sólo en las lesiones (Langemann et al, 1992), sino también en la sustancia blanca de apariencia normal

(Graumann et al, 2003). Los radicales libres podría causar también la modificación postraduccional de la Creatinina Fosfo Kinasa (CPK-BB), especialmente por la oxidación de los grupos tiol de su estructura (Wolosker et al, 1996). La CPK-BB, que en la sustancia blanca parece estar presente exclusivamente en astrocitos en tanto la rata y como en el cerebro humano, cataliza la transferencia reversible de un grupo de fósforo desde la Fosfo creatina (Pcr) al ADP, generando ATP a un ritmo mucho más rápido que la glucólisis y la fosforilación oxidativa (Brosnan y Brosnan, 2007). La modificación oxidativa de la enzima podría contribuir a la disminución de actividad de la CPK-BB en la corteza cerebral en varias enfermedades neurodegenerativas, incluyendo la enfermedad de Alzheimer (Aksenov y col, 2000; Aksenov y col, 1999). La evidencia mostrada por tres estudios independientes indican que los niveles de Fosfo creatina (PCr) en la sustancia blanca aparentemente normal de los pacientes con EM están elevados, lo que sugiere que esta fuente de energía no se utiliza correctamente por la disfunción de la creatina quinasa mitocondrial.

El ADN y los lípidos oxidados, así como la nitrotirosina, un marcador de daño tisular inducida por peroxinitrito, están presente de manera abundante en las lesiones activas (Van Horssen y cols., 2008, Van Horssen y cols., 2011) y la presencia de ADN y lípidos oxidados en oligodendrocitos apoptóticos y axones distróficos apoya firmemente su contribución a desmielinización y la neurodegeneración (Haider y cols., 2011). La presencia de estos signos de estrés oxidativo en las lesiones de EM coincide con la regulación al alza de las proteínas implicadas en los mecanismos de defensa antioxidantes (van Horssen y cols., 2010). El estrés oxidativo también podría promover la fosforilación de la proteína

tau axonal, que ha sido detectado en los axones en degeneración (Anderson y cols., 2008) y podría explicar los altos niveles de expresión de las moléculas asociadas con el estrés del retículo endoplásmico, tales como CHOP o BiP (Cunnea y cols., 2011).

El daño oxidativo está claramente asociada con la inflamación en las lesiones de EMRR, pero también se manifiesta en las lesiones de EM progresiva, a pesar de los bajos niveles de inflamación. Estos hallazgos sugieren que el estrés oxidativo, además, podría ser impulsado por otros factores que el proceso inflamatorio en la etapa progresiva de la EM (Haider y cols., 2011).

2.7. Hipótesis del Daño por Glutamato.

La excitotoxicidad debido a una elevada liberación de glutamato también puede alterar la función mitocondrial. El glutamato es un neurotransmisor excitador esencial que actúa sobre los receptores Acido propiónico amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazol (AMPA) y N-metil-D-aspartato (NMDA) situados en la membrana post-sináptica de las neuronas. Tras la unión y la activación de estos receptores, unos canales iónicos se abren permitiendo que diversos cationes tales como Na⁺, K⁺ y Ca²⁺ entren en la célula. Los niveles sinápticos de glutamato están reguladas por transportadores de glutamato presentes en los astrocitos, los oligodendrocitos y microglia, que captan el glutamato liberado y lo convierten en glutamina. La glutamina es transportada de nuevo a las neuronas y se regenera a glutamato por la glutaminasa (Groom y cols., 2003).

En comparación con los controles sanos, los pacientes con EM tienen aumentado los niveles de glutamato en toda la sustancia blanca de apariencia normal (Srinivasan et al, 2005), y en el líquido cefalorraquídeo (Sarchielli et al, 2003). La excitotoxicidad por glutamato se produce cuando, en las sinapsis, existe una liberación elevada de glutamato, y / o una inadecuada recaptación de este por los transportadores en las células de apoyo.

Por una parte durante un brote de EM, se producen grandes cantidades de glutamato por las células inmunes activadas, como los macrófagos y la microglia (Groom y cols., 2003). También en los axones existe liberación de glutamato. Se cree que la liberación de glutamato axonal representa un mecanismo generalizado para señalización de la actividad en el axón, en el interfaz axon - glia de la sustancia blanca. El Glutamato en los axones de la sustancia blanca se almacena en vesículas, y la propagación del potencial de acción a lo largo de estos axones produce una rápida liberación del glutamato de las vesículas en el líquido extracelular por exocitosis (Kukley et al, 2007; Ziskin et al, 2007). Los axones de la sustancia blanca contienen canales de Ca^{2+} voltaje-dependientes y la maquinaria necesaria para la exocitosis mediada por actividad de este tipo de vesículas (Alix y Domingues, 2011). La importancia de esta liberación de glutamato no está clara. Tras la estimulación de los axones, se han registrado mediante técnicas de patch clamp potenciales parecidos a los sinápticos en la glía NG2 + mediados estos por receptores AMPA, (Kukley y col , 2007).

Por otra parte, también puede haber una disminución en la expresión de los recaptadores de glutamato en los oligodendrocitos y astrocitos de los alrededores,

incrementando aún más la gravedad de la excitotoxicidad. La actividad que más ATP consume en la parte final de los astrocitos durante electrogénesis axonal es la bomba $\text{Na}^+ / \text{K}^+ \text{-ATP}$. Se encarga de captar el K^+ liberado por los axones al espacio extracelular después de cada despolarización, y reestablece el gradiente de Na^+ necesario para la captación de glutamato por el transportador astrocítico de glutamato dependiente de Na^+ (Anderson y Swanson, 2000; Danbolt, 2001). En la sustancia blanca humana, el Transportador de amino ácido Excitatorio 1 se expresa en los oligodendrocitos y astrocitos, mientras que el Transportador de aminoácidos excitatorios 2, que tiene un papel más importante en la regulación de la concentración del glutamato extracelular, se encuentra localizado esencialmente en los procesos de los astrocitos (Domercq y Matute, 1999; Vallejo-Illarramendi et al, 2006). Estos transportadores mueven el glutamato a los astrocitos y los oligodendrocitos en contra de un gradiente de concentración acoplado al transporte del glutamato al gradiente transmembrana de Na^+ , K^+ . Estos gradientes se mantienen por la membrana de bomba $\text{Na}^+ / \text{K}^+ \text{ATP}$, de tal manera que la captación de glutamato depende en última instancia de ATP. La reducción de la actividad de la bomba $\text{Na}^+ / \text{K}^+ \text{-ATP}$ astrocitaria producirá unas altas concentraciones extracelulares de K^+ y a la reversión de la captación de glutamato por los transportadores de glutamato (Rose et al, 2009).

Este incremento en las concentraciones de Glutamato produce la sobreestimulación de receptores de glutamato a diversos niveles. Así los axones mielinizados centrales expresan receptores AMPA / kainato y los oligodendrocitos expresan receptores AMPA / kainato y receptores N-metil-D-aspartate. El primer tipo de receptores son permeables al Ca^{2+} , que sobreestimulados por el glutamato

puede conducir a daños de los axones, causada por un aumento de la afluencia de Ca^{2+} (Ouardouz et al, 2009a, b). El aumento en el Ca^{2+} intracelular activa varias enzimas, incluyendo las fosfolipasas, endonucleasas y proteasas, que dañan el ADN, alteran el citoesqueleto, y alteran los lípidos de membrana [Gunter y cols., 2004]. Los niveles elevados de Ca^{2+} intracelulares también alteran la dinámica mitocondrial, promoviendo la entrada de Ca^{2+} a la matriz, abriendo los poro de transición de permeabilidad, y liberando citocromo C en el citosol. En el segundo tipo de receptores se asocian con la activación de la caspasa-3, fragmentación de ADN, la muerte celular apoptótica, y la desmielinización (Domercq y col, 2005; Karadottir y Attwell, 2007, Salter y Fern, 2005; Xu et al, 2008).

2.8. Vía de convergencia: daño mitocondrial.

Es importante tener en cuenta que, si bien los mecanismos propuestos de daño axonal del NO y del glutamato son vías separadas y distintas, ambas convergen en una vía común que es la disfunción mitocondrial.

Esta convergencia no es exclusiva de los ataques inflamatorios agudos de la EM, sino que está presente en las etapas progresivas independientes de la inflamación aguda, haciendo hincapié en la importancia de las mitocondrias en el mantenimiento de la integridad axonal y la supervivencia.

La evidencia de daño mitocondrial en las lesiones de EM se identificó originalmente a partir de los análisis bioquímicos de la deteriorada actividad de la NADH deshidrogenasa y aumento de la actividad del complejo IV en las

mitocondrias de las lesiones (Lu y cols., 2000) y de perfiles de expresión génica de tejido de la corteza motora (Dutta y cols., 2006). Posteriores estudios inmunohistoquímicos de las proteínas de la cadena respiratoria revelaron un profundo daño mitocondrial, posiblemente reflejando mayor daño oxidativo en las áreas de daño tisular precoz dentro de las lesiones activas de EM (Mahad y cols., 2008). Además se ven dentro de los axones en las placas inactivas un aumento en el contenido mitocondrial - que podría ser atribuible al incremento en el número de mitocondrias o al volumen de una mitocondria en particular - y en la actividad de las enzimas (Mahad y cols., 2009, Witte y cols., 2009). Este aumento de la actividad mitocondrial se normaliza en parte en las fibras remielinizadas (Zambonin y cols., 2011). Así, cuando las lesiones están inactivas, el aumento de la demanda de energía de los axones desmielinizados produce un aumento compensatorio en el contenido mitocondrial y en la función respiratoria de los axones; sin embargo, este aumento de la demanda de energía es en parte invertido cuando se produce la remielinización. Estos datos indican que el daño tisular activo en la EM está asociada con la lesión mitocondrial.

3. DEGENERACIÓN AXONAL DURANTE LAS ETAPAS PROGRESIVAS INDEPENDIENTES DE INFLAMACIÓN AGUDA.

3.1. La desmielinización crónica produce la sobrerregulación y la reorganización de los canales iónicos

En las etapas progresivas de la EM, hay menos ataques inflamatorios agudos en el SNC, lo que sugiere que otros mecanismos están implicados en la degeneración axonal. En esta etapa de la enfermedad, los medicamentos anti-inflamatorios comúnmente utilizados, tales como el interferón beta y acetato de glatiramero, tener un efecto mínimo en el retraso o la inhibición de los síntomas neurodegenerativos de la EM.

Uno de los principales cambios estructurales durante la fase progresiva de la EM es la pérdida de la mielina. En un axón normal mielinizado, los canales de sodio dependientes de voltaje están concentrados en los nodos de Ranvier, y la vaina de mielina aísla el axón internodal de modo que la corriente "salta" de nodo a nodo. La pérdida de la mielina afecta en gran medida la eficacia de la propagación del acción potencial. En respuesta a la desmielinización, los canales de sodio se redistribuyen a lo largo del axón y su síntesis esta aumentada, incluyendo tanto los subtipos Nav1.6 y Nav1.2 [Craner y cols., 2004]. El subtipo Nav1.6, que normalmente se expresa en los nodos de Ranvier, tiende a producir corrientes más grandes y más persistentes en comparación con el subtipo de Nav1.2, que se expresa predominantemente en los axones premielinizados.

La reorganización de los canales de sodio voltaje dependientes y la regulación positiva de la expresión de los canales en los axones de mielina produce unas necesidades de energía alteradas. La demanda de ATP excede la capacidad de producción de las mitocondrias existentes y las ATPasa Na⁺ / K⁺ cruciales para el mantenimiento de los gradientes iónicos comienzan a fallar. Un exceso de iones Na⁺ se acumula intracelularmente, y, finalmente, se invierte el intercambiador Na⁺ / Ca²⁺ de que normalmente introduce Na⁺ y saca Ca²⁺ de la célula [Dutta y cols., 2006, Stys y cols., 1992]. Una prolongada elevación de los niveles de Ca²⁺ en el axoplasma puede provocar posteriormente una multitud de eventos que finalmente ocasiona la disfunción mitocondrial y daño axonal.

3.2. Efecto de la elevación de los niveles intracelulares de Ca²⁺ en la función mitocondrial

La mitocondria es la planta de energía de la célula, el sitio en el que se llevan a cabo la respiración aeróbica y la síntesis de ATP. Tiene una doble membrana que la divide en dos compartimentos principales, la matriz y el espacio intermembrana. La membrana mitocondrial externa que encierra el orgánulo contiene un gran número de canales (porinas), que permiten la libre difusión de las moléculas 5.000 Daltons o menos. Las proteínas más grandes pueden entrar en la mitocondria a través de translocasas de la membrana externa, lo que las introduce en el espacio intermembrana. El espacio intermembrana se encuentra entre las membranas mitocondriales externa e interna; el citocromo C, una proteína pro-apoptótica, se encuentra aquí. La membrana mitocondrial interna separa el espacio intermembrana de la matriz, y contiene una amplia gama de proteínas, incluyendo

la cadena de transporte de electrones, la ATP sintetasa, la translocasa de la membrana interna, y el poro de transición de permeabilidad (PTP). La cadena de transporte de electrones y la ATP sintetasa están involucrados en la fosforilación oxidativa, que genera el potencial de membrana mitocondrial, el gradiente de protones, y por supuesto, el ATP que es necesario para la supervivencia celular.

Durante la fosforilación oxidativa y la síntesis de ATP, los electrones son transferidos a lo largo de la cadena transportadora de electrones localizada en la membrana mitocondrial interna, que está acoplado con el movimiento de iones H^+ desde la matriz a través de la membrana hasta el espacio intermembrana. Este movimiento iónico genera un potencial transmembrana a través de la membrana interna (~ -200 mV), y es este gradiente de voltaje que se utiliza posteriormente para sintetizar ATP.

Más allá de la síntesis de ATP, este potencial transmembrana también impulsa los iones cargados positivamente, tales como Ca^{2+} a la matriz (mediante la apertura de canales Ca^{2+} voltaje dependientes). En consecuencia, las mitocondrias acumulan Ca^{2+} cada vez que los niveles citoplásmico locales se elevan por encima de un punto de ajuste crítico, y luego lo liberan lentamente cuando se restauran los niveles citoplasmáticos [Krieger y cols., 2002].

La acumulación de iones Ca^{2+} dentro de la matriz mitocondrial depende de la concentración citoplasmática de Ca^{2+} , así como la afinidad de dos transportadores mitocondriales uno que introduce y otro que extrae iones Ca^{2+} de la matriz. Como los iones Ca^{2+} tienen una mayor afinidad por el que los

introduce hacia el interior, el Ca^{2+} tiende a ser transportados a la matriz mitocondrial cuando sus niveles citoplásmicos son elevados [Gunter y cols., 2012].

La acumulación de Ca^{2+} en la matriz mitocondrial es fisiológicamente importante en la estimulación de la fosforilación oxidativa. Tres importantes enzimas metabólicas se activan por el Ca^{2+} , incluyendo la piruvato deshidrogenasa, alfa-cetoglutarato, y la isocitrato deshidrogenasa [Gunter y cols., 2012]. Sin embargo, unos niveles elevados de Ca^{2+} prolongados también pueden inducir la apertura del PTP, que conduce a una cascada de eventos, incluyendo la hinchazón de la matriz, la ruptura de la membrana mitocondrial externa, y la liberación del citocromo C, lo que provoca la vía de pro-apoptótica.

Las características claves de la patología de las lesiones de EM se pueden explicar como resultado de esta lesión mitocondrial.

En los axones desmielinizados, donde están alteradas la expresión y la actividad de varios tipos de canales de Na^{+} y Ca^{2+} (Bechtold y cols., 2006, Black y cols., 2006, Friese y cols., 2007), la reducción de la producción local de energía debido al daño mitocondrial podría precipitar la desaparición axonal. Los axones de calibre fino se afectan más que los gruesos, ya que contienen, en comparación a los axones gruesos, menor número de mitocondrias en relación con la superficie del axolema (Trapp y cols., 2009).

En los oligodendrocitos, el daño mitocondrial produce la liberación del factor inductor de apoptosis, su translocación en el núcleo, y la activación de la poli-ADP-

ribosa polimerasa (PARP), un mecanismo demostrado in vivo en un modelo experimental de destrucción de oligodendrocitos y desmielinización inducida por cuprizone (Veto y cols., 2010). Además, in vitro (es decir, en ausencia de astrocitos), las células progenitoras de oligodendrocitos son más resistentes al daño mitocondrial que los oligodendrocitos maduros, pero su capacidad de diferenciarse y formar vainas de mielina está disminuida (Ziabreva y cols., 2010). Esta observación podría explicar el fracaso de la remielinización en las placas crónicas, a pesar de la presencia de células progenitoras de oligodendrocitos (Chang y cols., 2002).

Se han encontrado en pacientes con EM progresiva neuronas corticales con deficiencia en la respiración, y tales neuronas presentan altos niveles de deleciones del ADN mitocondrial (Campbell y cols., 2011). La acumulación de deleciones del ADN mitocondrial en la EM progresiva podría explicar en parte el aumento de la susceptibilidad del tejido cerebral a la neurodegeneración en pacientes con EMPP o EMSP

3.3. Transporte axonal en la EM.

El transporte axonal es necesario para la función normal y la supervivencia de las neuronas, transmitiendo las proteínas recién sintetizadas desde el cuerpo celular a los sitios a lo largo del axón, y la entrega de complejos de señalización trófico desde los terminales sinápticos al cuerpo de la célula de nuevo. Parece probable que la disfunción mitocondrial en la EM (y por lo tanto el déficit en la producción

de ATP) dé lugar a anomalías en el transporte axonal, lo que a su vez podría contribuir a la degeneración axonal.

3.4. Acumulación de hierro

El hierro se acumula en el cerebro humano envejecido (Hallgren y cols., 1958), donde se almacena en su mayor parte en los oligodendrocitos y es detoxificado mediante su unión a ferritina (Hulet y cols., 1999). La carga de hierro en el cerebro aumenta durante la edad adulta y alcanza una meseta entre 40 y 50 años de edad (Hallgren y cols., 1958). La acumulación intracitoplasmática de Fe^{2+} en los oligodendrocitos podría explicar en parte la alta susceptibilidad de estas células a la degeneración bajo las condiciones de estrés oxidativo inducido por la inflamación y la disfunción mitocondrial (Zhang y cols., 2005). Es importante destacar que la destrucción de oligodendrocitos libera este Fe^{2+} acumulado al espacio extracelular, donde podría amplificar aún más el daño oxidativo en los axones y otras células. En las lesiones de EM, el Fe^{2+} es absorbido por los macrófagos activados y microglia (Craelius y cols., 1982, Bagnato y cols., 2011). Sin embargo, el Fe^{2+} que contiene la microglia en el cerebro humano finalmente, produce fragmentación y degeneración celular (Lopes y cols., 2008), que conduce a una segunda oleada de liberación de Fe^{2+} .

La acumulación de Fe^{2+} en el espacio extracelular y su absorción por las células de las lesiones podría aumentar la susceptibilidad de los tejidos circundantes a la desmielinización y la neurodegeneración producida por los radicales libres. Debido a que esta acumulación es un proceso dependiente de la edad, es probable

que sea más pronunciada en los pacientes con EM progresiva que en los que están en la fase de brotes.

4. CONCLUSIONES

Ninguno de los mecanismos patogénicos proporciona una explicación consistente para todo el espectro de la patología de la EM y para todas las alteraciones patológicas asociadas con la conversión de EMRR a EMSP.

En la ausencia de un mecanismo definitivo de la enfermedad, las evidencias actuales indican que diversas vías interconectadas contribuyen a la patogénesis de la EM. En todas las formas y etapas de la enfermedad, la inflamación parece llevar a la desmielinización y neurodegeneración. En la etapa progresiva, la inflamación se queda, al menos en parte, atrapada dentro del SNC detrás de la BHE. El daño tisular puede ser efectuada por la activación microglial y la actividad de los macrófagos, junto con el daño oxidativo y del glutamato y lesión mitocondrial posterior. En las etapas progresivas de la EM, el daño oxidativo ya existente podría ser amplificado por la liberación del hierro intracelular, que se ha acumulado en los oligodendrocitos con la edad. Posiblemente el daño oxidativo crónico y la desmielinización crónica pueden conducir a un desequilibrio iónico en los axones y las neuronas, lo que puede amplificar la neurodegeneración. Por último, la acumulación de daños en los tejidos dará lugar a un agotamiento de la capacidad de reserva funcional del cerebro, lo que podría acelerar el deterioro clínico a pesar del lento daño tisular en la fase progresiva.

Por lo tanto, se precisan de nuevas evidencias que demuestren el papel del daño oxidativo en la acumulación de discapacidad, relacionandolo con el sustrato anatomo patológico.

III. Medición clínica de respuesta terapéutica

1. INTRODUCCIÓN.

A pesar de los efectos terapéuticos positivos observados en los ensayos clínicos, muchos pacientes con EMRR continúan presentando actividad de la enfermedad. En la práctica clínica diaria del 20-50% de los pacientes que reciben agentes modificadores de la enfermedad experimentan un aumento de la discapacidad o un alto número de brotes dentro de un corto período de tiempo después del inicio del tratamiento (Río y cols., 2002). Estos pacientes se define como no respondedores, respuestas subóptimas. Aunque las evidencias apoyan claramente la eficacia del interferón β , los factores que determinan la respuesta a este fármaco en los pacientes por separado no han sido completamente aclarados.

A medida que más opciones de tratamiento esten disponibles, el disponer de los instrumentos adecuados para la toma de decisiones y la identificación precoz de los factores que predicen la eficacia de los fármacos es cada vez mas importante, porque este conocimiento facilitará el cambio precoz del tratamiento. A pesar de los años de investigación y los numerosos articulos sobre prometedores marcadores terapeuticos para la EM, han emergido pocos marcadores realmente utiles posiblemente debido, al menos en parte, a la complejidad inherente de la definición de la respuesta y la falta de respuesta a la terapia en esta enfermedad crónica.

Hasta que esto no se solvente no podremos cambiar de manera precoz los tratamientos en los pacientes con EM, un paso importante hacia el tratamiento

individualizado, algo necesario tanto desde el punto de vista médico como económico pues nos podría conducir a una reducción en el coste del tratamiento.

2. EL INTERFERÓN β EN EL TRATAMIENTO DE LA EM

Los tratamientos de primera línea que están autorizados para el tratamiento de la EMRR son: Avonex[®] (Biogen Idec, Cambridge, MA, EE.UU.) y Rebif[®] (Merck Serono, de Ginebra, Suiza), que son formulaciones de interferón (IFN β 1a), Betaferon[®] (Bayer Schering Pharma, Berlín, Alemania; comercializado en los EE.UU. como Betaseron[®]), una formulación de IFN β -1b, y Copaxone[®] (Teva Pharmaceuticals, Petah Tikva, Israel), una formulación de acetato de glatiramer. IFN β -1a, IFN β -1b y el acetato de glatiramer son inmuno moduladores y, en los ensayos clínicos aleatorios que dieron lugar a la aprobación para los pacientes EMRR, mostraron poder reducir la gravedad y frecuencia de los brotes en aproximadamente el 30% de los pacientes (IFNB Multiple Sclerosis Study Group., 1993, Jacobs y cols., 1996, PRISMS study, 1998, Johnson y cols., 1995). Los efectos del tratamiento observados en los ensayos clínicos fueron apoyados por unos convincentes resultados en RM, que mostró que el IFN redujo tanto el número de lesiones activas como la carga lesional en el cerebro (Paty y cols., 1993, Simon y cols., 1998, Li y cols., 1999).

Las principales diferencias entre las tres formulaciones de IFN registradas son la dosis, la ruta y la frecuencia de administración. Avonex[®] se administra a una dosis de 6 millones de unidades (30 μ g) por inyección intramuscular una vez a la semana, Betaferon[®] se administra en 8 millones de unidades (250 μ g) por inyección subcutánea cada dos días, y Rebif[®] se administra a una dosis de 6 – 12 millones de unidades (22 – 44 μ g) por inyección subcutánea tres veces a la

semana. Copaxone ® se administra por inyección subcutánea diaria. El tratamiento con alguno de estos medicamentos es generalmente bien tolerado.

Se han realizado numerosos estudios comparativos entre las formulaciones de IFN y Copaxone ®. Los resultados de los ensayos INCOMIN y EVIDENCE fueron que Rebif ® (a una dosis de 44 µg) y Betaferon ® tenían una eficacia clínica mayor que el Avonex ®. Los resultados de estos estudios sugieren que el IFN es más eficaz cuando se administra a dosis altas y frecuentes (Panitch y cols., 2002, Durelli y cols., 2002). Estudios abiertos, sin embargo, han mostrado que no existen diferencias sustanciales entre las eficacias clínicas de los tres IFN (Troyano y cols., 2003, Waubant y cols., 2003, Río y cols., 2005). Además, en el estudio BEYOND, no se encontró que dosis altas de IFNβ-1b fueran más eficaces que los dosis habituales. No se encontraron, en lo que a eficacia se refiere, diferencias entre las formulaciones de IFN y Copaxone ® en los ensayos REGARD y BECOME (Wiendl y cols., 2008).

Las actuales directrices estipulan que el tratamiento deberá ser detenido a raíz de la aparición de ciertos efectos adversos (por ejemplo, anormalidades hematológicas o hepáticas), si la paciente desea quedarse embarazada, o si el medicamento se percibe como ineficaz (después de la aparición de frecuentes brotes o progresión de la discapacidad.)

3. DEFINICIONES DE RESPUESTA A IFN B.

Se considera que una respuesta a una terapia se ha producido cuando el tratamiento induce un beneficio que no habría ocurrido en su ausencia. Este tipo de eventos son difíciles de identificar en la EM, por varias razones. En primer lugar, la EM tiene un curso clínico impredecible, que puede variar en gran medida entre los pacientes, independientemente de si son tratados con terapias modificadoras de la enfermedad. En segundo lugar, los pacientes a menudo presentan una remisión espontánea casi completa después de los brotes agudas (sobre todo en la fase remitente recidivante), lo cual hace difícil atribuir exclusivamente al tratamiento incluso un cambio drástico en la actividad de la enfermedad. En tercer lugar, las terapias disponibles son sólo parcialmente eficaces, aumentando la posibilidad de pacientes respondedores con actividad residual. Por último, carecemos de una definición estandarizada de los resultados clínicos que indican mejoría o el empeoramiento de la evolución de la enfermedad.

Actualmente la evolución de la enfermedad se evalúa en gran medida sobre la base de tres elementos considerados individualmente o en combinación.- progresión de la discapacidad, brotes y la presencia de lesiones en la RM. La progresión de la discapacidad se mide mediante la escala EDSS de Kurtzke (Kurtzke 1983) y se define como el aumento de 1 punto de la EDSS (o 0,5 puntos si EDSS basal es > 5,5), confirmado en visitas posteriores, para excluir cambios transitorios asociados a brotes. Los brotes clínicos se definen como nuevos síntomas o empeoramiento de los síntomas neurológicos antiguos en ausencia de fiebre, que duren más de 24 h, precedidos por un mínimo de 30 días de estabilidad clínica o mejoría y confirmado

por los hallazgos objetivos en un examen neurológico (Poser y cols., 1983). Los cambios en los patrones de las lesiones cerebrales visibles en la RM reflejan los cambios en la patología subyacente de la enfermedad, lo que proporciona la justificación del uso de las lesiones (generalmente cuantificada como el número de lesiones que captan gadolinio [Gd] en las imágenes potenciadas en T1 o nuevas lesiones en en T2) como medidas de actividad de la enfermedad (Barkhof y cols., 1997).

Una revisión de estudios confirma la amplia heterogeneidad en la definición de "respondedor" y "no respondedor", y en los marcos de tiempo durante el cual se evalúan estas eventualidades. En muchos estudios, la definición de la falta de respuesta al tratamiento con IFN- β se ha basado en un aumento de 1 punto en la EDSS confirmada a los 6 meses. (Durelli y cols., 2008, Cadavid y cols., 2011, Río y cols., 2008, Prosperini y cols., 2009, Sormani y cols., 2013, Tomassini y cols., 2006). Sin embargo, este cambio en el estatus de discapacidad se mide a menudo independientemente de la duración del seguimiento clínico, que varía mucho entre los estudios (entre 1 - 6 años) (Durelli y cols., 2008, Cadavid y cols., 2011, Río y cols., 2008, Prosperini y cols., 2009, Sormani y cols., 2013, Tomassini y cols., 2006). El tiempo de seguimiento es un componente crucial en la definición de falta de respuesta, ya que 1 punto de progresión de EDSS tiene significados muy diferentes clínicos, si es en un periodo de 1 o de 2 años. Los parámetros que se han utilizado para definir los no respondedores en los estudios a largo plazo (15 a 16 años de seguimiento) incluyen el cambio neto en la EDSS, (Bermel y cols., 2013) así como el tiempo en llegar a una puntuación de EDSS ≥ 6 o la conversión a EM secundaria progresiva (Goodin y cols., 2012). En otros estudios, la falta de

respuesta ha sido definida como la combinación de la progresión de EDSS y / o brotes (Durelli y cols., 2008, Río y cols., 2008, Tomassini y cols., 2006) o como el cambio en la tasa de brotes en comparación con la frecuencia de brotes antes del tratamiento (Romeo y cols., 2013, Mezei y cols., 2012, Waubant y cols., 2003, Portaccio y cols., 2006, Fromont y cols., 2008). Por otra parte, la ausencia o presencia de lesiones activas en la RM durante el tratamiento se ha incluido en las definiciones de la respuesta y la falta de respuesta al tratamiento, debido a la interpretación común de la actividad en RM como expresión de la progresión de la enfermedad (Romeo y cols., 2013). Por último, incluso cambiar una droga por otra se ha considerado como criterio de falta de respuesta (Sormani y cols., 2013, Romeo y cols., 2012). Un estudio reciente, que se centró en estudios de cambio de tratamiento en malos respondedores a los tratamientos de la EM (Freedman y cols., 2009), destacó la variedad de definiciones de la respuesta al tratamiento subóptimo en base a resultados de la RM, recaídas y la progresión de la discapacidad.

Resumiendo, las definiciones de respuesta a IFN- β se basan esencialmente en medidas de progresión de la discapacidad, los brotes y la actividad de resonancia magnética, aunque aún falta una definición común. Una definición normalizada de la respuesta al tratamiento es de suma importancia para permitir la comparación de diferentes estudios y validación de los marcadores de la respuesta. Hasta la fecha, dos han sido los intentos para diseñar una definición homogénea y basada en la evidencia de la respuesta a la terapia con IFN- β : Una por parte del Grupo de Trabajo Canadiense de Esclerosis Múltiple (CMSWG) y otra por parte de Río y cols.

4. CUANTIFICANDO LA RESPUESTA AL TRATAMIENTO CON IFN-B

Se ha demostrado que tanto los brotes como las lesiones activas en RM representan buenos marcadores subrogados de la discapacidad clínica en la EM. De hecho, un análisis publicado en 2011 (Sormani y cols., 2011) demostró que, de acuerdo con los criterios Prentice para la validación de marcadores subrogados (Prentice, 1989), tanto las lesiones activas en la resonancia magnética al año como los brotes representaron de forma independiente más del 60% del efectos del IFN- β en el empeoramiento de la EDSS a los 2 años. Y lo que es más importante, cuando se utilizaron en combinación las lesiones activas al año y los brotes como marcadores, el efecto del IFN- β en la progresión a los 2 años parecían estar completamente mediado por la reducción del número de lesiones activas en resonancia magnética y los brotes durante el primer año de tratamiento. En general, la dificultad de encontrar resultados homogéneos cuando se utilizan diferentes marcadores de la respuesta de manera aislada junto con la observación de que se pueden predecir los efectos de IFN- β a nivel individual combinando los efectos de la actividad lesional al año y los brotes, sugiere que los beneficios inducidos por el IFN- β en la progresión de la discapacidad en pacientes con EM pueden ser identificados mejor (y más rápidamente) por el uso de las cuantificaciones compuestas tanto clínicas como de RM.

5. DESARROLLO DE SISTEMAS DE PUNTUACIÓN

El uso combinado de los parámetros de actividad de la enfermedad para predecir la respuesta al tratamiento fueron la base de las Recomendaciones de Optimización de Tratamiento (ROT) publicados por el Grupo de Trabajo canadiense EM (CMSWG) (Freedman y cols., 2009, Freedman y cols., 2013) y posteriormente probado en los pacientes del ensayo PRIMs (Freedman y cols., 2008). El CMSWG describe un modelo, derivado de un consenso de expertos, que se basa en los diferentes niveles de progresión de la discapacidad, los brotes y la actividad en RM durante el tratamiento, que se pueden clasificar como "notable", "preocupante" y "acciones concretas". En una revisión posterior de las recomendaciones (Freedman y cols., 2013), el CMSWG propone que un cambio en el tratamiento puede ser considerada en cualquier paciente con EMRR si hay un alto nivel de preocupación en todo un dominio (brotes, la progresión o la RM), un nivel medio de preocupación en cualquiera de los dos dominios, o un bajo nivel de preocupación en los tres ámbitos. Cuando se aplicó a los datos del estudio PRIMs (usando sólo brotes y progresión de la discapacidad) demostró ser capaz de identificar un grupo de malos respondedores, el 89% de los cuales tenía un continuo avance en términos de brotes y de progresión.

Table 2: Recommendations for determining the level of concern with regards to considering treatment modification based on relapse outcomes.

	Low	Medium	High
Rate	Moderate reduction (>75%, <100%) vs baseline	Modest reduction (35-75%) vs baseline	Minimal reduction (<35%) vs baseline*
Severity	Mild • Steroids not required • Minimal effect on ADL • 1 functional domain affected • No or mild motor/cerebellar involvement	Moderate • Steroids required • Moderate effect on ADL • >1 functional domain affected • Moderate motor/cerebellar involvement	Severe • Steroids/hospitalization required • Severe effect on ADL • >1 functional domain affected • Severe motor/cerebellar involvement
Recovery	Prompt recovery	Incomplete recovery at 3 months	Incomplete recovery at 6 months

Note: Reference time frame ≥ 2 years prior to treatment initiation. Ideally, prospective and objective relapse data should be obtained during the reference period. ADL = activities of daily living

*Suggests treatment is no better than placebo.

Table 3: Recommendations for determining the level of concern with regards to considering treatment modification based on disease progression.

	Low	Medium	High
EDSS ≤3.5	< 2 points	2 points confirmed at 6 months	>2 points confirmed at 6 months 2 points confirmed at 12 months
EDSS 4 to 5	<1 point	1 point confirmed at 6 months	>1 point confirmed at 6 months 1 point confirmed at 12 months
EDSS ≥5.5		0.5 point confirmed at 6 months	>0.5 point confirmed at 6 months
Clinically documented progression	No motor, minor sensory	Some motor, cerebellar or cognitive; multiple domains affected	Pronounced motor, cerebellar, or cognitive; multiple domains affected

Table 4: Recommendations for determining the level of concern with regards to considering treatment modification based on MRI outcomes.*

Change in MRI categories	Low	Medium
New Gd-enhancing lesions	Any new lesion	Increase in >2 MRI categories
New T2 lesions		
Enlarging T2 (burden of disease)		
New T1 hypointense lesions		
Enlarging T1 hypointense lesions		
Atrophy		

*Note: Routine follow-up MRI is not recommended in established MS; MRI must have been performed according to a standardized protocol; treatment modification should not be considered based on MRI outcomes alone. Gd = gadolinium

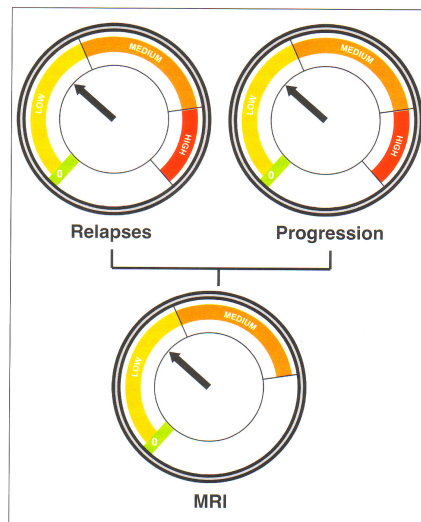


Figure 2: Revised analog model for assessing the level of concern with regards to considering treatment modification.

Basandose en un estudio publicado en 2008 (Río y cols., 2008), Río y cols, propusieron una versión cuantitativa de medición de la respuesta terapéutica. El sistema de puntuación implicaba la evaluación del paciente al año del inicio del tratamiento de la presencia de brotes, progresión de la discapacidad (entendido como el aumento de 1 punto de la EDSS confirmado a los 6 meses) y las lesiones de MRI activos (es decir, más de dos lesiones nuevas en T2 o lesiones captantes de Gd). Encontró que los pacientes que fueron positivos para al menos dos de los tres criterios analizados después del primer año de tratamiento con IFN- β tenían una mayor probabilidad de experimentar progresión de la discapacidad o de tener brotes durante el seguimiento, siendo firmes candidatos a cambiar el tratamiento. La presencia aislada de brotes, aumento de la discapacidad o actividad en resonancia magnética después de 1 año de tratamiento no predijo significativamente el riesgo de nueva actividad clínica o progresión de la enfermedad en los siguientes 2 años. Se ha propuesto una versión simplificada de la Río Score (llamado Río Score Modificado). La Río Score Modificada agrupa a los pacientes en tres grupos de riesgo. El ejercicio de validación establecía una probabilidad de progresión de la discapacidad del 24% en el grupo de bajo riesgo, el 33% en el grupo de riesgo medio y 65% en el grupo de alto riesgo. Los pacientes clasificados como de riesgo medio por la Río Score Modificada son los más difíciles de clasificar en cuanto a la respuesta al tratamiento y la planificación. Un estudio ha demostrado que la evaluación adicional con resonancia magnética y la visita clínica a los 6 meses tras el primer año del tratamiento podría permitir una mejor clasificación de los pacientes (Freedman y cols., 2008).

Rio Score		Modified Rio Score	
Criterion	Change over the first year	Criterion	Change over the first year
MRI criterion = 0 MRI criterion = 1	≤2 active* T2 lesions >2 active T2 lesions	MRI criterion = 0 MRI criterion = 1	≤4 (5) [‡] new T2 lesions >4 (5) [‡] new T2 lesions
Relapse criterion = 0 Relapse criterion = 1	No relapses ≥1 relapse	Relapse criterion = 0 Relapse criterion = 1 Relapse criterion = 2	No relapses 1 relapse ≥2 relapses
EDSS criterion = 0 EDSS criterion = 1	Increase in EDSS score of <1 point Increase in EDSS score of ≥1 point, sustained over at least 6 months	Not included	Not included
Rio Score = MRI criterion + relapse criterion + EDSS criterion		Modified Rio Score = MRI criterion + relapse criterion	
* Active lesions defined as new or enlarging T2-weighted lesions plus gadolinium-enhancing lesions over the first year.			
[‡] The cut-off of four lesions was in the validation set; the cut-off of five lesions was in the training set.			
Abbreviation: EDSS, Expanded Disability Status Scale.			

6. CONCLUSIÓN.

El uso de los sistemas de puntuación en EM - aunque susceptibles de mejora a través de la integración de nuevos y más específicos componentes de la enfermedad -nos proporcionan una buena discriminación entre los respondedores y no respondedores al tratamiento con IFN- β .

Sin embargo, los sistemas de calificación propuestos, requieren mayor validación en cohortes de pacientes con EMRR en tratamiento IFN- β , obtenidos preferiblemente de bases de datos de la práctica clínica diaria, ya que la estrecha vigilancia realizado en los ensayos clínicos puede sobreestimar la sensibilidad de los resultados cuando se traduce en la práctica clínica.

IV. Farmacogenómica de los inmunomoduladores.

1. INTRODUCCIÓN

Los mecanismos que subyacen a la heterogeneidad en la respuesta al tratamiento no se conocen aunque los factores genéticos probablemente jueguen un papel importante. Dada la naturaleza compleja de la Esclerosis Múltiple, la influencia genética es casi seguro el resultado de la contribución de múltiples genes. El aumento en el número de terapias disponibles, combinado con el riesgo potencial de fracaso del tratamiento y / o reacciones adversas graves, hace de las terapias individualizada una necesidad para la EM. La identificación de los pacientes que pueden beneficiarse de una terapia en particular es, por lo tanto, de gran importancia.

Un enfoque farmacogenómico implica la aplicación de tecnología genómica, tales como perfiles de expresión génica, polimorfismo de un solo nucleótido (SNP), y proteómica, en la predicción de la respuesta al tratamiento de un paciente y las posibles reacciones adversas a los fármacos individuales. El objetivo general de la farmacogenómica, por lo tanto, es facilitar la individualización del tratamiento del paciente (Wolf y cols., 2000).

La mayoría de estudios de perfiles de transcripción relacionados con el tratamiento de la EM han investigado los cambios inducidos por el IFN in vitro o ex vivo (Comabella y cols., 2007). Sólo un número limitado de estudios han investigado los cambios en los perfiles de expresión génica de pacientes que muestran una respuesta al tratamiento diferente. (Baranzini y cols., 2005, Stürzebecher y cols., 2003, Singh y cols., 2007, van Baarsen y cols., 2008, Villoslada

y cols., 2002). Los resultados de estos estudios indican que existen diferencias transcripcionales entre los respondedores y no respondedores a IFN. Los cambios en la expresión de genes candidatos, sin embargo, deben ser validados en cohortes de pacientes tratados seguido a lo largo de largos períodos de tiempo por medio de la evaluación clínica y / o radiológica antes de que tales genes se puedan utilizar como biomarcadores para predecir la respuesta a IFN en la práctica clínica.

2. FARMACO GENOMICA

Los polimorfismos genéticos podrían ser unos de los factores determinantes de las diferencias individuales en la respuesta al interferón beta. El IFN- β se une a los receptores de IFNAR1 y IFNAR2 y desencadena la vía de señalización de JAK-STAT. Posteriormente, se estimula la expresión de varios genes que influyen en la proliferación celular, la apoptosis, la traducción de proteínas, y la replicación viral. Los polimorfismos en los genes que regulan IFN β podrían afectar a la transcripción, estabilidad mRNA y el splicing y así la secuencia proteica final y su comportamiento biológico final. La expresión de estos genes por consiguiente, tiene un gran potencial para su uso como marcador biológico de la respuesta al tratamiento con IFN- β (Pappas y cols., 2010).

El análisis fármaco genómico del tratamiento con interferón beta en la EM esta en la actualidad en su infancia. En comparación con el volumen de publicaciones que examinan la susceptibilidad genética a la EM solo uno relativamente pequeño se han centrado en la respuesta al interferón beta.

La mayoría de los estudios de farmacogenética en la EM se han centrado en la respuesta a IFN.(van Baarsen y cols., 2008, Villoslada y cols., 2002, Sriram y cols., 2003, Fernández y cols., 2005, Cunningham y cols., 2005, Leyva y cols., 2005, Martínez y cols., 2006, Weinstock-Guttman y cols., 2007, Comabella y cols., 2009). El primer estudio que estudio la fármaco genómica del interferón beta en pacientes con EM formuló la hipótesis de que el locus de susceptibilidad en la región del MHC clase II podría alterar la respuesta al tratamiento pero ni este

estudio ni en otros sucesivos se halló ninguna relación entre respuesta y los alelos en el HLA clase II.

Otros estudios han examinado principalmente los polimorfismos en genes que codifican cualquiera de los componentes de la vía de señalización del IFN β tipo I, como el IFNAR1 y IFNAR2 (que codifican receptores de IFN 1 y 2, respectivamente). La relevancia de la expresión del IFNAR1 a la respuesta clínica de los pacientes sigue siendo controvertida (Pappas y cols., 2010). La importancia de IFNAR1 fue sugerido por primera vez en un estudio de farmacogenómica de Irlanda en pacientes con EM tratados con IFN- β (Cunningham y cols., 2005). Sin embargo, las correlaciones entre las variantes del gen IFNAR1 y la respuesta al tratamiento no han sido confirmada ya sea mediante el uso de polimorfismos de nucleótido único (Leyva y cols., 2005, Sriram y cols., 2003) o en un estudio GWAS en pacientes con EM (Byun y cols., 2008).

También se han examinados genes que son inducidos por el IFN β . Se han identificado numerosos de ellos que potencialmente podría ser utilizados en estudios de farmacogenómica de la EM (Pappas y cols., 2010). Sin embargo las conclusiones de estos estudios han variado sustancialmente, probablemente debido a la heterogeneidad de la enfermedad, a las diferencias asociadas con el diseño experimental, a la tecnología de microarrays, a los pequeños tamaños de muestra, y al análisis e interpretación de datos (Rudick y cols., 2009).

Otros estudios han continuado analizando la influencia de antígeno leucocitario humano (HLA) de clase I alelos (A, B, C) y los alelos de clase II (DRB1, DQA1 y

DQB1) o el haplotipos del HLA-DR2 en la respuesta al tratamiento con IFN β . En general, los estudios de farmacogenética han mostrado debiles asociaciones o falta de asociación entre genes y la respuesta a IFN que no han sido replicados en otros estudios.

Dos estudios de microarrays sugieren que la expresión del gen de la interleucina - 8 disminuye en los pacientes con EM que tuvieron una respuesta favorable al tratamiento con IFN- β (Stürzebecher y cols., 2003, Weinstock-Guttman, y cols., 2008). Otro estudio reveló una marcada variación entre pacientes en la respuesta al tratamiento con IFN- β (van Baarsen y cols., 2008). 126 genes que se sobre expresaban en un subgrupo de pacientes disminuyeron su expresión o no cambió después de 1 mes de tratamiento. La respuesta al tratamiento con IFN- β se correlacionó negativamente con el nivel basal de expresión de un conjunto específico de 15 genes inducibles por IFN ($r = -0.7,208, p = 0,0016$). Los resultados de estos estudios fueron confirmados en un grupo independiente de pacientes (van Baarsen y cols., 2008). Los perfiles de expresión de genes en las células sanguíneas de 23 pacientes con EMRR en tratamiento IFN- β demostró un marcado cambio en los perfiles de expresión génica en respuesta al IFN- β , pero las respuestas biológicas no fueron diferentes entre los respondedores y no respondedores (Hesse y cols., 2010). Los investigadores mostraron, sin embargo, que el empeoramiento precoz de la enfermedad se asoció con la expresión reducida del gen que codifica la citoquina IL-10 inmunorreguladora antes del tratamiento.

Una hipótesis interesante sobre el mecanismo de acción del tratamiento con IFN- β es que podría disminuir la actividad de la enfermedad mediante la reducción de la diferenciación de los linfocitos T helper 17 (Th17). Los datos experimentales sugieren que el IFN- β inhibe la expresión de la IL-17F in vitro y en ratones con EAE inducida por Th1. Los beneficios del tratamiento con IFN- β en la EAE producida por Th1 incluyen aumento de la expresión de la citoquina antiinflamatoria IL-10. Por el contrario, el IFN- β parecía ser ineficaces en el tratamiento de EAE inducida por Th17 e incluso agravó sus signos y síntomas. Curiosamente, los pacientes con EM que no responden al IFN- β tenían niveles más altos de IL-17F, una citoquina producida por células Th17-antes del inicio de la terapia con IFN- β , que los pacientes que respondieron a este tratamiento (Axtell y cols., 2010).

Los perfiles de expresión de todo el genoma de células mononucleares sanguíneas sugirió un panel de 47 genes que podría distinguir entre respondedores y no respondedores al tratamiento con IFN- β (Comabella y cols., 2009). Este panel estuvo conformado por una preponderancia de genes de la vía de señalización del IFN tipo I y otros ocho genes del panel (IFIT3, IFIT1, OASL, IFI44, IFIT2 y RASGEF1B, FADS1 y MARCKS) que también se correlacionaron con la respuesta en un cohorte de validación independiente (con una precisión media del 78% para predecir la respuesta). Los investigadores también identificaron diferencias basales en los niveles de expresión en monocitos del STAT1 fosforilados y IFNAR1. Ellos sugieren que los pacientes que no responden al tratamiento con IFN- β tienen un fenotipo de la EM mas grave y patogenéticamente distinta, caracterizado por variaciones en la señalización de IFN- β y una función de monocitos anormal (Comabella y cols., 2009).

La EM es una enfermedad genéticamente compleja y el IFN β un agente pleiotrópico cuya respuesta se cree es del tipo poligénico por lo que es posible que la variación alélicas de varios genes contribuyan a explicar la respuesta al tratamiento. La aproximación de los Genome Wide Association Studies (GWAS) en vez de los genes candidatos aislados permite la detección de variaciones del ADN asociados con la respuesta al tratamiento o no. Existen 2 GWAS realizado en la actualidad sobre fármaco genómica:

En un estudio de asociación en todo el genoma realizado en el año 2008 en 206 pacientes con EM el objetivo fue identificar los genes relacionados con la respuesta al el tratamiento con IFN (Byun y cols., 2008). Anteriores asociaciones farmacogenética publicada (Filippi y cols., 2010, Frank y cols., 2004, Malucchi y cols., 2004) no fueron confirmadas en el estudio y sin embargo reveló varios otros SNP que variaban entre los respondedores y no respondedores; estas variantes se asociaron con genes de canales iónicos y las vías de transducción de señales (Byun y cols., 2008). Estos datos también sugieren una asociación entre dos SNPs en el gen de glipicano 5 (GPC5)-a saber, rs10492503 y rs9301789-y la respuesta al IFN- β . En el caso del rs10492503, se ha confirmado esta asociación (Cénit y cols., 2009).

Otro estudio de asociación de genoma completo publicado en 2009 identificó 18 SNPs (siete de los cuales fueron intragénica, incluyendo algunos dentro IFNAR2) que se correlaciona con una respuesta al tratamiento con IFN- β (Comabella y cols.,

2009). Curiosamente, los SNPs intragenico incluyó algunos que implican la participación del sistema glutamatérgico en la respuesta al tratamiento con IFN- β .

3. CONCLUSIÓN.

La farmacogenómica tienen un gran potencial para facilitar el desarrollo de terapias adaptadas individualmente, y ha demostrado ser una herramienta útil en diferentes tipos de enfermedades. En la EM, la farmacogenómica está todavía en las primeras etapas de desarrollo, y numerosos desafíos deben ser superados antes de disponer tratamientos individualizados para los pacientes. En particular, los criterios para definir respondedor al tratamiento que deben ser sólidamente establecidos.

También habrá que considerar el probable aumento de los efectos adversos no previstos en tanto que surgen nuevos tratamientos y se usan terapias combinadas durante largos períodos de tiempo. La identificación de los polimorfismos genéticos asociados con estos efectos adversos ayudará a predecir qué pacientes tienen un alto riesgo de sufrir este tipo de reacciones.

V. Identificación de los objetivos de estudio en esta tesis.

Existen ciertos puntos de interés pendientes de resolver y cuya profundización podría contribuir en la mejora que tenemos hoy día de la EM. Como hemos dicho anteriormente no existen marcadores clínicos o biológicos fiables que nos pronostiquen la eficacia o no de un tratamiento y hay una necesidad imperante de identificarlos.

Así mismo, tenemos necesidad de métodos sencillos y fiables que nos indiquen, usando solo datos clínicos, si un paciente dudoso es buen respondedor o no.

Desconocemos que influencia podrían tener tanto las variaciones en el ambiente de oxidorreducción como la variación de los niveles intra cerebrales in vivo de ciertas sustancias como el N Acetil Aspartato, la colina o el mioinositol tras el inicio de un tratamiento en la respuesta a largo plazo de este tratamiento así.

Desconocemos la influencia de los polimorfismos genéticos en las diferentes respuestas al interferón beta.

1. OBJETIVOS

1.1. OBJETIVOS PRIMARIOS

1. Medir el efecto a largo plazo del tratamiento con interferón β 1a IM en la acumulación del daño axonal en pacientes con EMRR usando marcadores de oxidorreducción y ERM
2. Validar los criterios clínicos de optimización de tratamiento de la Canadian Multiple Sclerosis Working Group aplicándolos a una población española de pacientes con EMRR tratados inicialmente con interferón β 1a IM
3. Identificar un conjunto de genes ligados a las diferencias interindividuales en la eficacia a la terapia con Interferón Beta.

1.2. OBJETIVOS SECUNDARIOS

1. Determinar la correlación existente entre el daño axonal en la sustancia blanca aparentemente normal y las escalas de discapacidad medidas por la Escala Funcional Compuesta (Multiple Sclerosis Functional Composite scale, MSFC) y Expanded Disability Scale Score (EDSS).
2. Desarrollar un programa informático que nos permita aplicar de manera sencilla y automática los criterios de optimización de tratamiento de la CMSWG.
3. Evaluar si los criterios de optimización de tratamiento de la CMSWG (basados en la progresión de la discapacidad y tasa de brotes) tras un año de tratamiento con Interferón β 1a IM pueden predecir la situación clínica tras varios años de tratamiento.
4. Genotipado masivo. Rastreo completo del genoma empleando el microarray 250K NspI de Affymetrix en 150 pacientes con Esclerosis Múltiple Remitente Recidivante tratados con inmuno moduladores (250.000.000 genotipos)
5. Filtrado, depuración y construcción de los mapas genotípicos y haplotípicos de la población en estudio para el desarrollo de estudios univariantes.

2. TRABAJOS REALIZADOS PARA CONTESTAR A LOS OBJETIVOS

1. *Magnetic Resonance Spectroscopy of normal appearing white matter in early relapsing-remitting MS. Disability-spectroscopy correlations.* Ruiz -Peña JL, Piñero P, Sellers G, Argente J, Casado A, Foronda J, Uclés A, Izquierdo G. BMC Neurology 2004 Jun 10; 4 (1): 8.

2. *Axonal degeneration in ms: early magnetic resonance spectroscopy could be a long-term disability biomarker.* Ruiz - Peña JL MD, Piñero P MD, Izquierdo G. ECTRIMS Meeting. Copenhagen, 2 al 5 de Octubre del 2013.

3. *Optimization of treatment with interferon beta in multiple sclerosis. Usefulness of automatic system application criteria.* Ruiz-Peña JL, Duque P, Izquierdo G. BMC Neurology 2008 Mar 6;8:3.

4. *Análisis farmacogenómico de la respuesta a interferón beta en el tratamiento de la esclerosis múltiple.* Juan Luis Ruiz-Peña, Antonio González-Pérez, María Isabel García-Sánchez, María Eugenia Sáez, Macarena Rus, Miguel Lucas, Antonio Alcina, Fuencisla Matesanz y Guillermo Izquierdo. SEN, Barcelona 19 al 23 de Noviembre del 2013.

VI. Metodología.

1. METODOLOGIA UTILIZADA EN EL ESTUDIO DEL EFECTO DEL INTERFERÓN β 1 a IM SOBRE MARCADORES DE DEGENERACIÓN AXONAL Y DE OXIDO RREDUCCIÓN.

1.1. Diseño

Estudio multicéntrico, con un primer analisis transversal y con un seguimiento prospectivo a 12 años, realizando un analisis longitudinal en el segundo. La metodologia es similar en ambos.

1.2. Población estudiada

Un total de 31 pacientes (9 varones y 22 mujeres) con diagnóstico de EM según los criterios de Poser y que habían tenido al menos dos brotes en los dos años anteriores, se incluyeron en el estudio. Los pacientes procedían de cuatro hospitales en Andalucía (Hospital Universitario Virgen Macarena, Sevilla, Hospital Puerta del Mar, Cádiz, Hospital San Cecilio, de Granada, y el Hospital Ciudad de Jaén, Jaén).

Estos pacientes habían sido recientemente diagnosticados de EMRR según criterios de Lublin y tenía una EDSS entre 0 a 5,5 como criterio de inclusión. Ninguno de los pacientes había sido tratado previamente con un agente inmunosupresor o un agente inmunomodulador o corticosteroides en el mes anterior.

El estudio fue aprobado por los comités de ética de los hospitales participantes y el consentimiento informado se obtuvo en todos los pacientes.

Al comienzo del estudio se llevaron a cabo RM y ERM también en 10 sujetos sanos, emparejados por edad de control sin enfermedad sistémica o neurológica conocida por el mismo neuroradiólogo utilizando el mismo equipo de resonancia magnética y siguiendo el mismo protocolo también.

1.3. Evaluación clínica de la discapacidad.

Antes de realizarse las RM los pacientes fueron examinados para determinar su discapacidad en las escalas EDSS, Neurological Rating Scale (NRS), Ambulation Index (AI), test de 25 pies (TWT), prueba nueve agujeros (9 HPT) y PASAT a intervalo de 3 s. El promedio de los dos ensayos del TWT y la media de los cuatro ensayos de la 9HPT se calcularon y, junto con PASAT se obtuvo la Escala Funcional Compuesta (MSFC) cuyas puntuaciones fueron utilizados en los análisis posteriores. Todos los neurólogos estaban capacitados para utilizar la escala de Kurtzke, escala AI, NRS, y la escala MSFC, pero fueron re-entrenados para utilizar estas escalas por la misma persona y en el mismo día.

1.4. Mediciones de Resonancia Magnética

La ERM y los exámenes convencionales de resonancia magnética del cerebro fueron obtenidas en una sola sesión para cada paciente con el mismo escáner 1.5T (Signa Horizon, GE, Mass).

En los exámenes de RM convencionales se realizó una secuencia ponderada T2 sagital (TR = 4,000, TE = 109, grosor de corte = 4 mm, gap = 1 mm, 13 cortes). Estos cortes se usaron para obtener las imágenes ponderadas en densidad protonica y en T2 transversales y coronales (TR = 3,420; TE = 13.5/121, grosor de corte = 5 mm; gap = 2 mm; 30 cortes) y una secuencia ponderada T1 coronal (TR = 400, TE = 15, grosor de corte = 5 mm; gap = 2 mm; 15 cortes).

Estas imágenes de RM convencionales se utilizaron para colocar un volumen espectroscópico de interés (VOI) en una o dos áreas con lesiones desmielinizantes y en un área de sustancia blanca aparentemente normal en pacientes con EM y en un área de sustancia blanca normal en el grupo de control sano.

La selección del volumen Espectroscopia se realizó con una secuencia de la sonda-P (PROBE / SV: protón cerebro Examen / Volumen individual), una versión de la secuencia PRESS (Point Resolved Spectroscopy), que es un eco de espín doble que utiliza una secuencia de pulsos a $90^\circ - 180^\circ - 180^\circ$ para adquirir los espectros de protones (TR = 2,000; TE = 37; campo de visión = 22x 16 cm). Cada VOI mide 20 mm anteroposterior x 20 mm craneocaudal x 20 mm izquierda-derecha, obteniéndose un volumen de tejido cerebral de 8 cc. Los VOI se seleccionaron manualmente por el único neuroradiólogo del estudio y que se mantuvieron constantes en tamaño y posición en los exámenes de seguimiento. La homogeneidad del campo magnético se ha optimizado para un ancho de línea de alrededor de 5 Hz sobre el VOI utilizando la señal de protón de agua. La supresión del agua se logró por una inversión selectiva de la resonancia del agua antes de la

selección de volumen usando pulso de inversión adiabática y el ajuste del tiempo de espera tal que el espectro se adquirió cuando la señal de agua pasa a través del cero.

La fidelidad en la selección de las mismas áreas en los pacientes al inicio, a los 24 y a los 48 meses se garantizó colocando un marcador facial que aseguraba la colocación exacta de la cabeza del paciente en las sucesivas exploraciones. Posteriormente se utilizaron referencias anatómicas intracraneales (plano esfenoidal, línea cervical posterior) para el planteamiento exacto de los cortes.

1.5. Seguimiento.

Se administró Interferon Beta 1 a (Avonex ®, Biogen, EE.UU.) por vía intramuscular a una dosis de 6 millones de unidades (30 mcg) semanales.

Todos los pacientes fueron seguidos durante un período mínimo de 24 meses. Trimestralmente se evaluó la discapacidad mediante la EDSS, el NRS, el AI y el MSFC. Se les extrajo sangre cada tres meses siendo analizadas todas las muestras en el mismo laboratorio, por las mismas personas, utilizando el mismo equipo y siguiendo el mismo protocolo. La ERM se realizó tres veces: al inicio del estudio, a los 12 meses y a los 24 meses. La ERM se llevó a cabo el mismo día que el examen neurológico, por el mismo neuroradiólogo, en el mismo centro, utilizando el mismo equipo de resonancia magnética y siguiendo el mismo protocolo. El neuroradiólogo fue ciego a los resultados de los exámenes neurológicos y todos los neurólogos fueron ciegos a los resultados de la RM.

Los Pacientes pertenecientes al Hospital Virgen Macarena (n = 13) han sido seguidos por un mínimo de 12 años más, con revisiones trimestrales y siempre que hayan avisado por brote, estimando su discapacidad en este tiempo utilizando la escala EDSS y almacenándola en una base de datos informatizada (iMED).

1.6. Análisis estadístico

Los datos se introdujeron en el programa SAS y se llevó a cabo un análisis estadístico descriptivo y analítico.

Las Frecuencias absolutas y los porcentajes se utilizaron para la descripción de las variables categóricas utilizando el programa SAS PROC TABULATE / BASE (software SAS versión 6,12, Cary, Carolina del Norte de 1989 a 1996).

La media, la desviación estándar (DE), mediana, rango intercuartil y los cuartiles superior e inferior se utilizaron para la descripción de las variables numéricas, utilizando el programa SAS PROC TABULATE / BASE.

La correlación entre las diferentes variables se determinó mediante el coeficiente de Spearman (teniendo en cuenta las variables como ordinal) y el coeficiente de Pearson (teniendo en cuenta las variables como cuantitativa). Se realizó una comparación entre el área de la SBAN en pacientes con EM y los controles y entre lesión sustancia blanca (LSB) y SBAN dentro del grupo de pacientes.

Para calcular el grado de asociación y el acuerdo entre los principales índices de la capacidad funcional y la resonancia magnética, las variables se dividieron y la mediana fue tomada como referencia. A continuación, se aplicó la prueba de Chi-cuadrado.

Para garantizar la coherencia internas de las mediciones se dividió la muestra total de pacientes en dos sub-muestras, cada una con la mitad de los pacientes y la estabilidad de los parámetros que determinan las mediciones se verificó. Así por ejemplo los valores promedio y la mediana de ERM fueron muy similares, lo que nos lleva a pensar que se trata de una medida estable.

2. METODOLOGÍA UTILIZADA EN EL ESTUDIO DE VALIDACIÓN DE LOS CRITERIOS DE OPTIMIZACIÓN DEL TRATAMIENTO DE LA CMSWG.

2.1. Diseño

Estudio Ad Hoc: Analisis retrospectivo de un estudio longitudinal de 5 años de duracion con seguimiento trimestral.

2.2. Población estudiada

Se revisaron 55 pacientes de nuestra base de datos que fueron diagnosticados de EMRR según los criterios de Poser, y que habian sido tratados con interferón β 1a IM 30 mg / semana. Estos pacientes comenzaron el tratamiento entre enero de 1998 y mayo de 2004 y fueron objeto de seguimiento prospectivo. Los pacientes fueron evaluados al menos cuatro veces al año para determinar su discapacidad y el número y gravedad de los brotes. La discapacidad de los pacientes se midió usando la escala EDSS de Kurtzke por neurólogos capacitados

2.3. Optem

Optem es una herramienta informatica desarrollada por nuestro grupo, que permite la optimización de la respuesta terapeutica basadas en criterios de la CMSWG de manera objetiva, fácil y automática.

2.4. Evaluacion y seguimiento clínico.

Las Recomendaciones de Optimización de Tratamiento (ROT) se aplicaron de forma retroactiva a nuestros pacientes. Los criterios utilizados se basaron en el modelo analógico modificado CMSWG, pero los datos de imagen no se consideraron porque la RM no se realizó en todos los casos.

Los pacientes fueron evaluados durante 1 año obteniéndose datos de la actividad de la enfermedad por brotes y la tasa de progresión y los sujetos fueron asignados a dos grupos de acuerdo con las ROT. Los niveles de preocupación eran "cambio el tratamiento" (C) y "no cambio" (N). De acuerdo con el modelo analógico, si todos los tres elementos eran bajos, dos de ellos eran medio o cualquiera era alta, entonces era probable que la respuesta al tratamiento fuera subóptima y el tratamiento debería haber sido cambiado.

Estas evaluaciones se compararon con los resultados clínicos observados de actividad de la enfermedad en los años siguientes. Los pacientes fueron evaluados hasta que el neurólogo decidió cambiar o suprimir el tratamiento inmunomodulador. Para evaluar la evolución de los pacientes en cada grupo, se calculó el número de ataques por año y EDSS para cada año (2^º, 3^º, 4^º y 5^º) para cada paciente, y se contrastaron las medias de cada grupo de decisión (C o N). También se usó la tasa de ataques, y la tasa de cambio de la progresión de EDSS, para el intervalo de 4 años (segundo-quinto) para comparar los dos grupos.

2.5. Análisis estadístico

Los datos fueron procesados utilizando la versión 11.0.0 del paquete estadístico SPSS, y se llevó a cabo un análisis estadístico descriptivo y analítico.

La media, la desviación estándar, la mediana y los cuartiles superiores e inferiores fueron utilizados para la descripción de las variables numéricas. Se llevó a cabo una comparación entre el grupo de " cambio de tratamiento " y el grupo "no cambio de tratamiento" en relación a la recaída y los datos de progresión, utilizando el análisis univariante de la varianza.

La sensibilidad del algoritmo se calculó como el número de pacientes considerados como C (necesidad de cambio) en el programa del total de los pacientes considerados como no respondedores después de considerar la evolución real. La especificidad del algoritmo se calculó como el número de pacientes que responden al tratamiento en relación con los pacientes considerados como N (sin necesidad de un cambio según el algoritmo).

3. METODOLOGÍA UTILIZADA EN EL ESTUDIO DE FARMACOGENÓMICA.

3.1. Diseño.

Se usó una aproximación tipo GWAS para identificar diferentes single nucleotide polymorphism ligados a la diferente respuesta de los pacientes frente a interferón beta.

3.2. Población estudiada.

Se llevó a cabo la recolección de casos no relacionados de pacientes afectados de EM. Igualmente se diseñó una base datos que integró los datos clínicos disponibles de cada paciente con sus genotipos en cada locus.

3.2.1. Tamaño muestral.

Se recogió información de respuesta al tratamiento con interferón de un total de 149 individuos de los 286 pacientes incluidos previamente en un GWAS de esclerosis múltiple. Esto es así pues era necesaria la recogida de número suficiente de pacientes EM, con objeto de efectuar ensayos intra cohorte y correlaciones fenotipo-genotipo.

3.2.2. Criterios de inclusión.

Los pacientes cumplían criterios de EM clínicamente definida por criterios de Poser, 1983 y/o Mc Donald, 2010 y estaban como primer tratamiento con algunos de los interferones actualmente aprobados por el SAS desde hacía al menos 12

meses.

Se obtuvo un consentimiento informado de cada paciente incluido en la cohorte de acuerdo con la hoja de información y los modelos establecidos.

3.3. Evaluación y seguimiento clínico.

Estos pacientes fueron objeto de un seguimiento prospectivo, siendo evaluados cuatro veces al año durante al menos 12 meses obteniéndose datos de la actividad de la enfermedad, determinando el número y gravedad de los brotes y su discapacidad usando la escala EDSS de Kurtzke. Las Recomendaciones de Optimización de Tratamiento, recogidas en el software Optem®, se aplicaron de forma retroactiva a nuestros pacientes. Los pacientes fueron evaluados según los brotes, la tasa de progresión y RM, en caso de tenerla, y fueron asignados a dos grupos de acuerdo con las ROT. Los niveles de preocupación fueron " no respondedores " y " respondedores".

3.4. Extracción y crio-preservación de ADN

Detalles sobre las intervenciones en los pacientes:

1. Información al paciente seleccionado acerca de las características del proyecto y sus riesgos y beneficios.
2. Obtención de consentimiento informado escrito de todos los pacientes incluidos en el estudio. El consentimiento informado contiene el código de barras correspondiente al paciente y sus datos personales. Este documento fue retenido y

archivado en el centro de investigación clínica.

3. Una vez que el paciente otorgó su consentimiento informado, se obtuvieron 15 ml de sangre periférica mediante venopunción periférica. Esta intervención la realizó personal cualificado del Hospital Universitario Virgen Macarena. Los viales para esta extracción eran pre-codificados. Es decir, incluían un código de barras coincidente con el código de la hoja de recogida de datos de cada paciente. Mediante este sistema de pre-codificación el personal del laboratorio nunca tenía acceso a los datos personales de los pacientes incluidos en el estudio. Por tanto, se garantizaba que las muestras obtenidas estaban anonimizadas antes de su envío al laboratorio.
4. Las muestras sanguíneas de los pacientes se almacenaron a -20°C hasta un máximo de 30 días. Se efectuaron envíos periódicos del material sanguíneo a las instalaciones de los laboratorios para su procesado.
5. Se efectuó una recogida de los datos clínicos y epidemiológicos más relevantes de cada paciente.
6. Las muestras sanguíneas obtenidas fueron procesadas en los laboratorios para la obtención de ADN de alto peso molecular empleando la tecnología magnapure y fueron criopreservadas a -20°C . Los datos clínicos adscritos de cada muestra fueron procesados y organizados en bases de datos relacionales para su utilización en el rastreo de genes candidatos de la patología en estudio.
7. Tras la finalización del estudio, todas las muestras excedentes pasaron a ser custodiadas por el Biobanco Hospitalario Virgen Macarena. El Biobanco Hospitalario Virgen Macarena está integrado dentro de la Red Nacional de Biobancos (Subprograma RETICS, RED DE BIOBANCOS-ISCIH) y es miembro activo del grupo de trabajo para el desarrollo del Biobanco del Sistema Sanitario Público

de Andalucía.

3.5. Estudios moleculares.

Tecnologías de investigación de genómica estructural empleadas: Ensayos de DNA arrays empleando la nanotecnología Affymetrix.

El uso de esta plataforma tecnológica permite el rastreo de 264,000 marcadores genéticos de un solo polimorfismo (SNPs) en un paciente determinado. Dichos marcadores se encuentran distribuidos de forma aleatoria a lo largo de genoma con una distancia intermedia de 16 Kb, optimizando así su uso para estudios genéticos caso-control y estudios de ligamiento genético. Por otro lado, dado que la tecnología de genotipado es perfectamente cuantitativa, permite el estudio de dosis génica de una forma locus- específica. Esto se ha revelado de especial interés en dos ámbitos distintos, por un lado al posibilitar el estudio de amplificaciones génicas en tejidos tumorales, y desde el punto de vista puramente estructural, al posibilitar el estudio de marcadores de copia variable (CNVs). El protocolo que se siguió requirió de un total de 4 días por paciente, y fue necesario partir de una muestra de ADN de alto peso molecular y gran pureza, con un cociente OD260//OD280 de 1,8-1,9. Se tomaron 250 ng de cada muestra de ADN y se digirieron parcialmente con una enzima de restricción denominada Nsp I. Ésta cortó específicamente en los sitios "Purina-CATG-Pirimidina", con lo que se redujo inicialmente la complejidad del genoma y dejando un extremo de cadena simple colgante en cada extremo. Una vez terminado el tiempo de digestión, se realizó una reacción de ligación con un adaptador universal que es compatible con los

extremos de cadena simple del paso anterior. Hecho esto, se realizó una reacción de PCR, usando un oligonucleótido compatible con dicho adaptador. Así, obtuvimos una amplificación de los fragmentos que se hibridaron en el microarray. Previo a éste paso, los fragmentos de PCR se purificaron y se redujeron de tamaño usando la enzima DNAsa I. Además, se les incorporó una molécula de biotina en su extremo. Así, se hibridaron los productos digeridos y marcados durante toda la noche. Posteriormente, se lavaron de forma automática los chips y se procedió al revelado de los mismos. Durante el escaneado de los microarrays, el software detecta y cuantifica la intensidad de luz en cada punto del microchip e interpreta si para cada SNP que se interroga, el paciente es homocigoto para cada uno de los alelos, o heterocigoto.

3.6. Análisis estadístico de la respuesta al tratamiento.

Todos los análisis se efectuaron en el paquete estadístico SPSS. Se evaluó la asociación entre los marcadores y la respuesta mediante modelos de regresión logística usando el comando “logistic” de plink y asumiendo un modelo aditivo. Se utilizaron modelos sin ajustar y también modelos ajustados en los que se introducen como covariables la edad de aparición de los primeros síntomas, el sexo, y el tipo de EM (Remitente Recurrente, Progresiva Secundaria, y de síntomas aislados).

Se decidió hacer uso de la información obtenida en un análisis univariante de asociación previamente realizado en el que se compararon 286 casos de esclerosis múltiple con 767 controles poblacionales. Para ello se seleccionaron como

candidatos para un primer análisis aquellos marcadores que resultaron estar asociados a la enfermedad con un valor de p por debajo de 0.001. En un segundo análisis se utilizaron todos los marcadores (con independencia de que estén o no asociados a la enfermedad) con idéntica metodología.

Se realizó un “Manhattan plot” con los resultados no ajustados del test de respuesta a interferón para todos los marcadores por cromosomas.

3.7. Etapas.

El proyecto se dividió en 3 fases:

Fase I: reclutamiento de casos

Fase II: Genotipación de casos empleando Affymetrix

Fase III: Análisis de datos: estudios univariantes (Plink)

VII. Resultados.

1. RESULTADOS OBTENIDOS EN EL ESTUDIO DEL EFECTO DEL INTERFERÓN β 1 a IM SOBRE MARCADORES DE DEGENERACIÓN AXONAL Y DE OXIDORREDUCCIÓN.

1.1. Demografía de los sujetos y características clínicas

El grupo en estudio estaba formado por 31 pacientes (9 varones y 22 mujeres) con el diagnóstico de esclerosis múltiple clínicamente definida remitente recurrente.

Las características clínicas se pueden apreciar en la tabla.

	Media	SD	Mediana	min.	Max
Edad (años)	38.6	8.4	32	18	48
Tpo. hasta TTO (años)	6.5	6	4	1	19
Tpo. Evolución (años)	18.4	5.2	16	14	31
Brotos 1 año antes tto	1.9	0.61	2	1	4
Brotos 1 años tras tto.	0.6	0.9	0	0	4
EDSS 0 m	2.2	0.9	2	1	5.5
EDSS 12 m	2.3	1.2	2	0	5.5
EDSS 24 m	2.4	1.3	2	1	6.5
EDSS 60 m	4.07	1.6	4	1	6.5
EDSS 120 m	5.4	2.5	5	1.5	10
EDSS 144 m	5.6	2.5	5	2	10
MSFC 0 m	0.22	0.6	0.18	-1.3	1.48
MSFC 12 m	0.38	0.7	0.38	-1.85	1.9
MSFC 24 m	0.26	0.5	0.26	-0.48	1.09

El grupo de control sano se componía de 10 pacientes (5 hombres y 5 mujeres) con una edad media de 42,5 años \pm 24 años (mediana 42, rango 14-74).

1.2. Concentración de metabolitos.

Como dijimos anteriormente, RM y ERM se obtuvieron para cada paciente en intervalos de 12 meses durante dos años. Hubo una variación estadísticamente significativa en la variación de los valores de las ratios NAA / Cr en los pacientes con esclerosis múltiple. A pesar de ello los valores medios fueron casi idénticos, lo que indica una clara distribución Gaussiana.

Metabolitos	Media	SD	Min	Max
NAA / Cr 0 m	1.67	0.18	1.38	2.01
NAA / Cr 12 m	1.58	0.19	1.28	2.02
NAA / Cr 24 m	1.61	0.26	1.26	2.33
Ch / Cr 0 m	0.89	0.18	0.61	1.39
Ch / Cr 12 m	0.86	0.19	0.64	1.38
Ch / Cr 24 m	0.85	0.18	0.49	1.35
mI / Cr 0 m	0.64	0.1	0.44	0.88
mI / Cr 12 m	0.67	0.1	0.32	0.85
mI / Cr 24 m	0.64	0.1	0.44	0.85

La media de la ratio NAA / Cr en 10 controles sanos fue de 1,73 con una desviación estándar de 0,24, los valores variaron desde 1,47 hasta 2,1. La ratio Ch / Cr fue de

0.86 con una desviación estandar de 0.11 y la del mI / Cr fue de 0.61 con una desviacion estandar de 0.11. No se detectaron lesiones T2 en estas personas.

1.3. Concentración de grupos sulfidrilo en suero.

Se extrajo sangre de manera trimestral durante los dos años que duro el estudio.

La variacion de los grupos sulfidrilo se puede ver en la tabla que hay acontinuación.

Sulfidrilo	Media	SD	Min	Max
Basal	293.67	65.2	172	408
3 m	265.6	80.1	163	490
12 m	228.2	83.7	66	333
24 m	220.9	111	72	532

1.4. Correlación entre la concentración basal de metabolitos y los parámetros clínicos basales.

La correlación entre la EDSS y el ratio NAA / Cr en SBAN fue - 0,38 (p <0,03) que es estadísticamente significativa.

No se encontró correlación entre el valor de NAA / Cr en SBAN con las otras escalas de discapacidad (MSFC, AI y NRS).

1.5. Correlaciones del nº de brotes.

El número total de brotes durante el primer año de tratamiento, es decir, la actividad inflamatoria existente en los pacientes a pesar del tratamiento, se correlaciona de manera significativa con la **discapacidad** a corto y medio plazo, tanto con la EDSS a los 12 meses ($r = 0.7$, $p = 0.005$), 24 m ($r = 0.6$, $p = 0.027$), 72 m ($r = 0.6$, $p = 0.03$), 84 m ($r = 0.7$, $p = 0.009$), 96 m ($r = 0.6$, $p = 0.013$), 108 m ($r = 0.6$, $p = 0.022$), 120 m ($r = 0.6$, $p = 0.016$), 144 m ($r = 0.7$, $p = 0.013$) y con el Índice de progresión de estos 12 años de tratamiento ($r = 0.6$, $p = 0.045$). En todos los casos la relación es directamente proporcional, es decir, a mayor número de brotes mayor discapacidad.

Así mismo, el número total de brotes durante el primer año de tratamiento, se correlaciona con los **niveles de mioinositol** de manera dual:

En relación a la pérdida de inositol durante el primer año la relación es inversamente proporcional, es decir, los pacientes que más brotes tienen durante el primer año son los que más mioinositol pierden ($r = -0.6$, $p = 0.036$).

Durante el segundo año la relación es directamente proporcional, es decir, los que más brotes tuvieron durante el primer año son los que más mioinositol van a acumular a partir del segundo año ($r = 0.8$, $p = 0.013$).

No hemos obtenido **correlaciones** significativas entre este valor y los valores del LCR, los linfocitos B, Linfocitos CD56, células NK (excepto con la variación de las células NK en el primer año de tratamiento, $r = -0.5$, $p = 0.04$), ni con los valores de

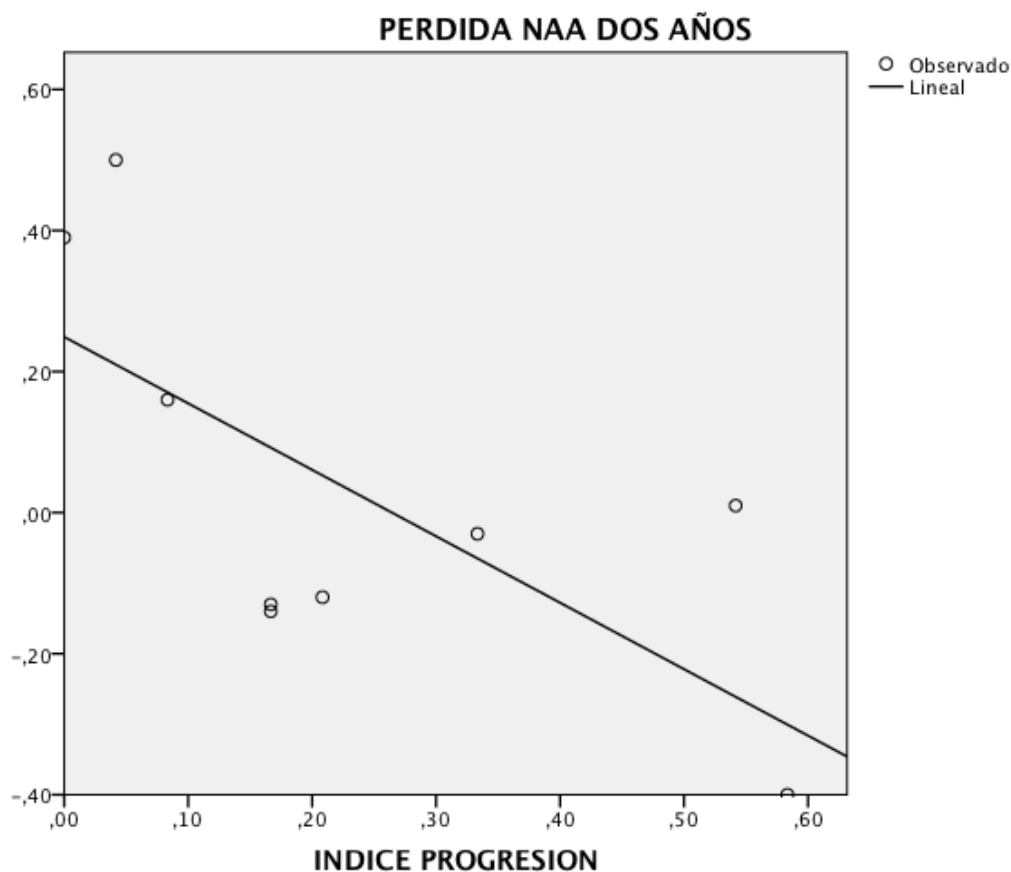
oxidorreducción (con excepción de variación de los grupos sulfidrilos en el primer semestre y el número de brotes el 2º año, $r = 0.6$, $p = 0.03$).

1.6. Correlaciones de la progresión.

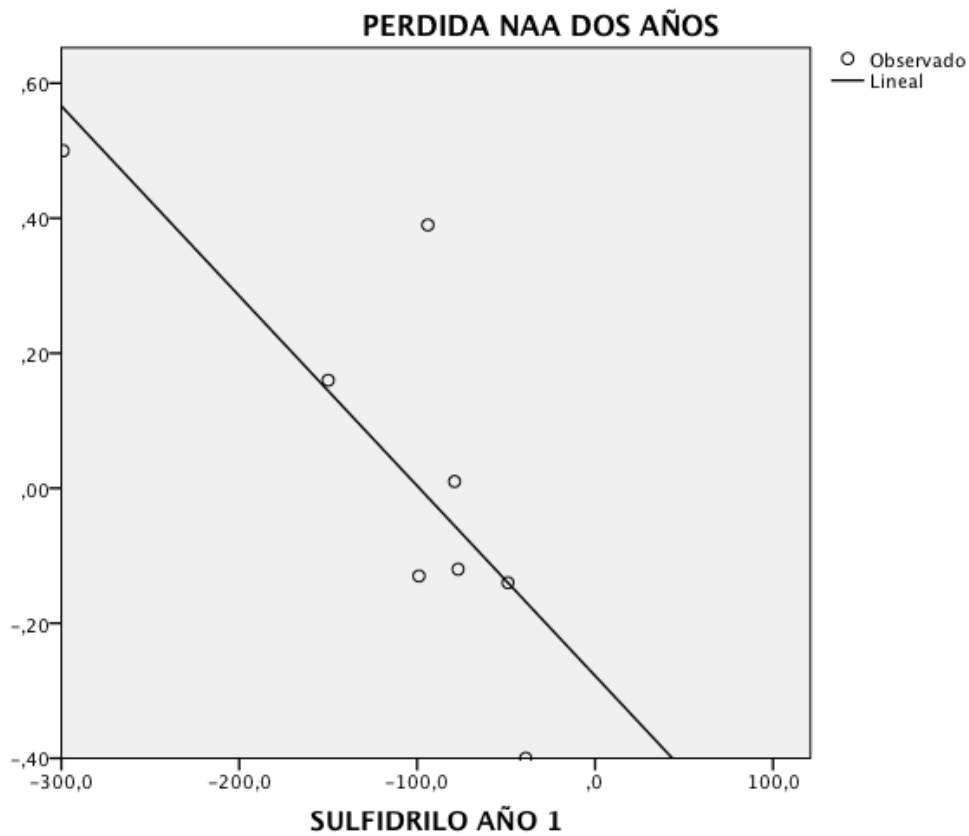
No hemos encontrado **correlación** entre los distintos niveles de discapacidad y los valores de LCR, ni con los linfocitos B, linfocitos CD 56 ni células NK. Si lo hemos encontrado con el número de brotes durante el primer año de tratamiento tal y como hemos dicho anteriormente.

1.6.1. Con N Acetil Aspartato (NAA).

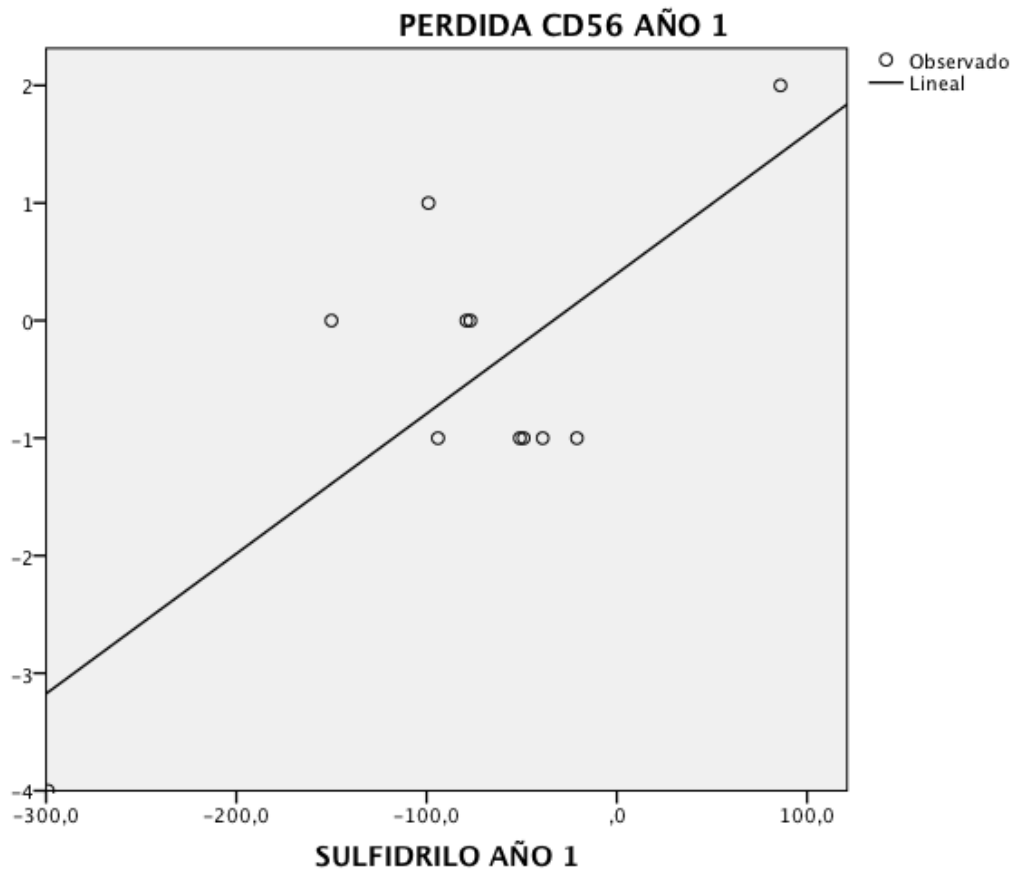
El **índice de progresión** (así como los distintos niveles de discapacidad según la escala EDSS desde los 36 meses hasta los 144 meses) se correlaciona de manera significativa con la **perdida de NAA durante los dos primeros años de tratamiento** ($r = - 0.7$, $p= 0.035$), es decir, los pacientes que aumentan los niveles de NAA durante los dos primeros años de tratamiento progresarán menos o no progresarán en comparación con aquellos que lo pierden.



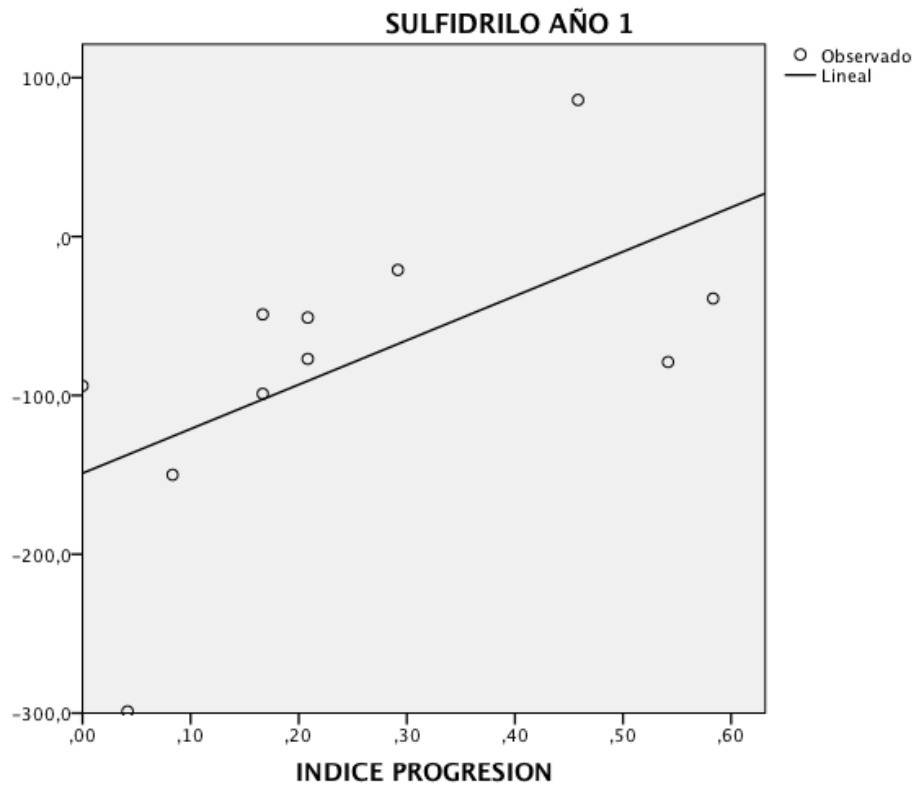
A su vez esta **perdida de NAA** se relaciona de manera inversamente proporcional con la **perdida de grupos sulfidrilos en los primeros 12 meses** tras la introducción del tratamiento ($r = - 0.8$, $p = 0.02$), es decir, los pacientes que incrementan los niveles de NAA (y por lo tanto progresaran menos) corresponde a los que el tratamiento disminuye más los grupos sulfidrilos durante estos 12 meses.



Existe así mismo una relación entre la **disminución de los linfocitos CD 56 durante el primer año** y estos **grupos sulfidrilos**, es decir, estos grupos disminuirán mas en aquellos pacientes que mas disminuya los niveles de CD 56 en el primer año ($r = 0.7$ y $p = 0.009$).

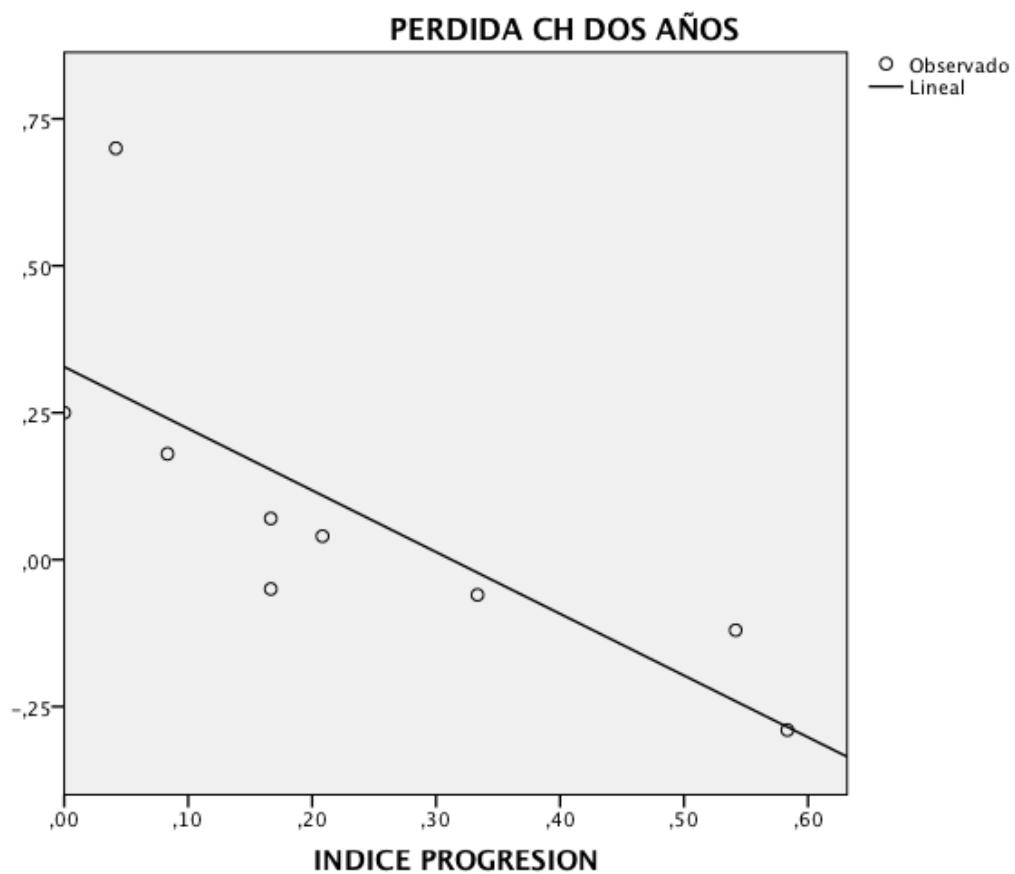


Hay una tendencia entre la **perdida de sulfidrilos durante el primer año** y el índice de progresión de estos 12 años ($r = 0.6$, $p = 0.056$).

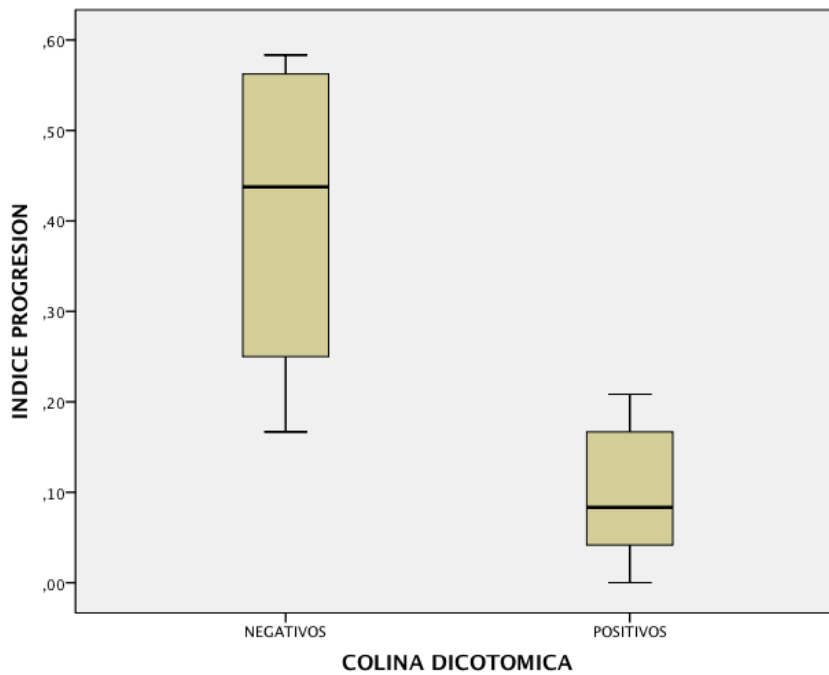


1.6.2. Con colina.

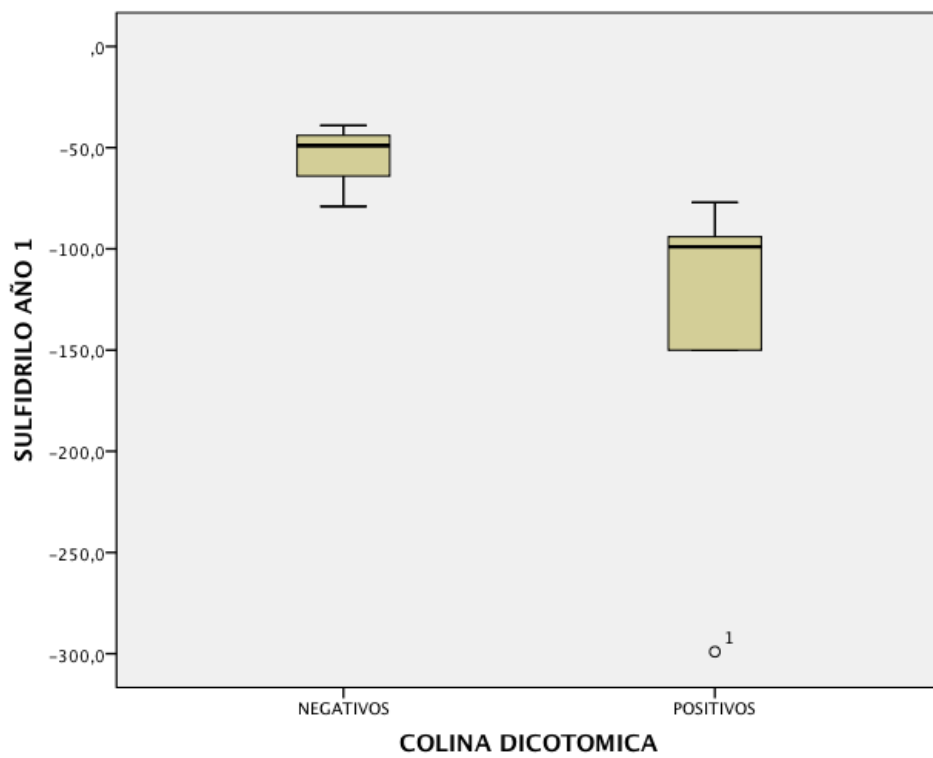
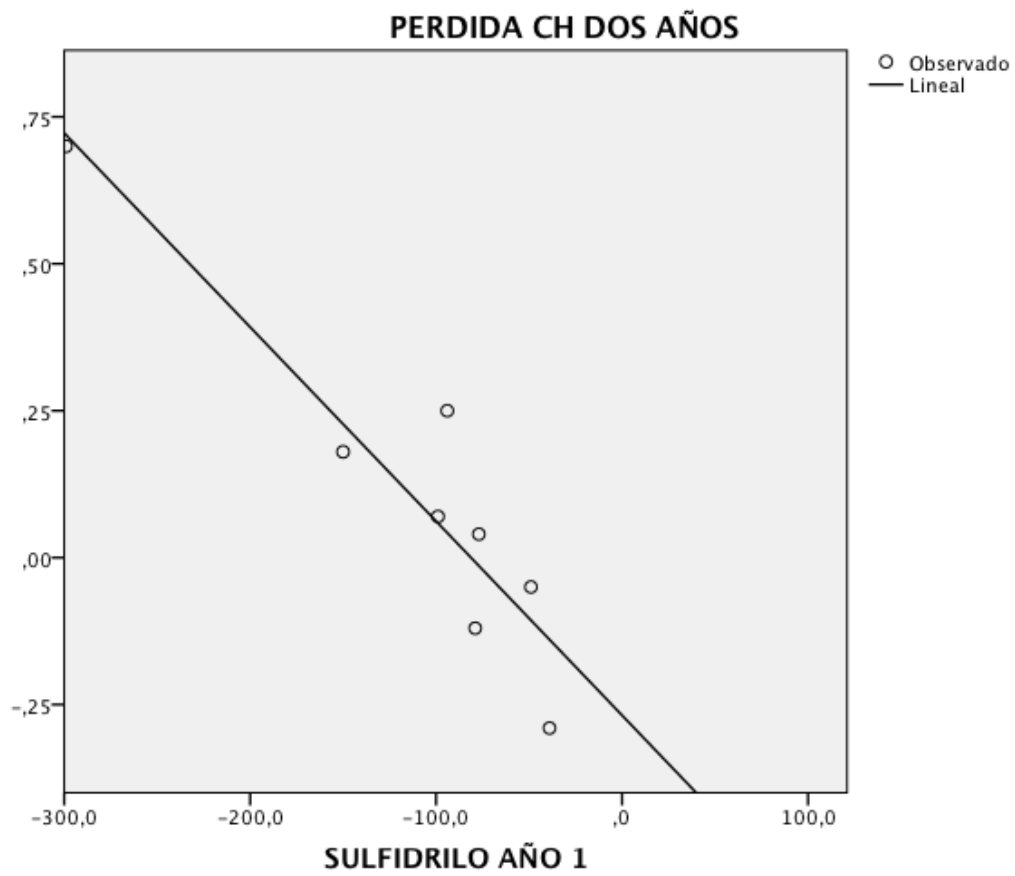
Se obtuvo una correlación estadísticamente significativa entre el **índice de progresión** (y entre cada EDSS desde el mes 72 hasta los 144 meses) y la **perdida de colina tras los dos años iniciales de tratamiento** ($r = - 0.77$, $p = 0.013$).



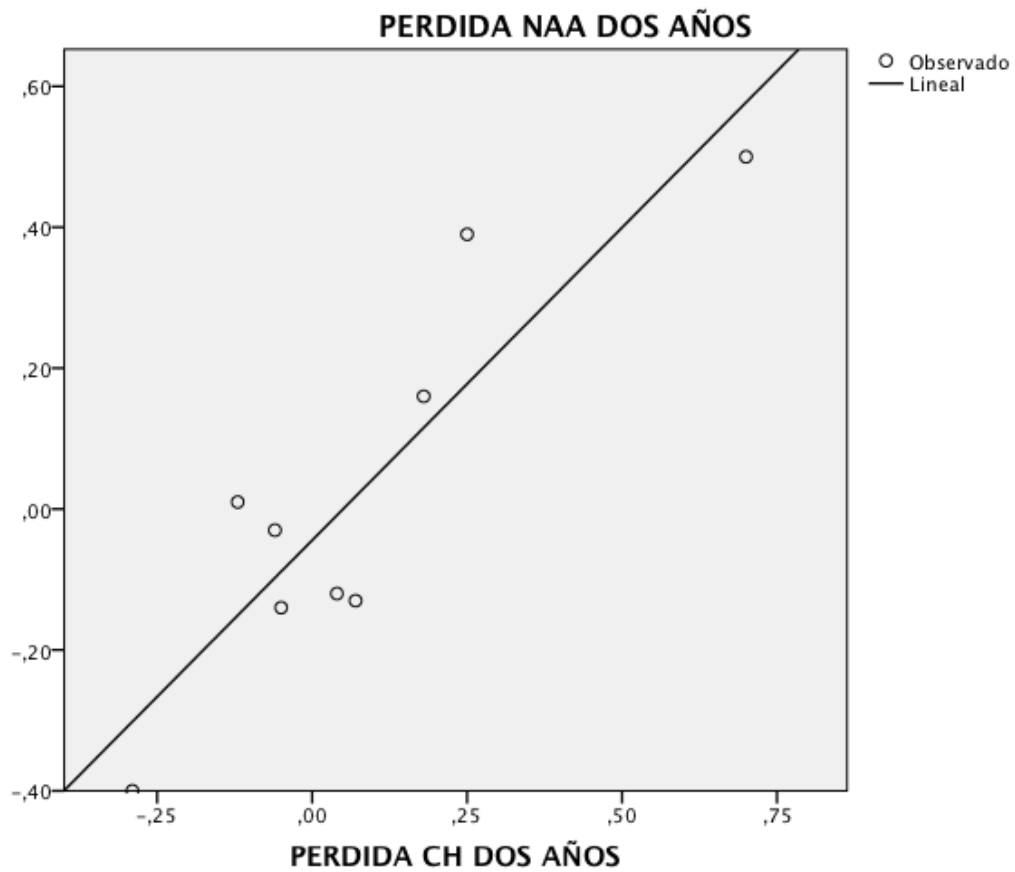
Esta es inversamente proporcional, es decir, a más colina se gana en los dos años menos índice de progresión tienen los pacientes. Otra forma de ver esto es un box Plot en la cual al aplicar la prueba de la T student es estadísticamente significativa.

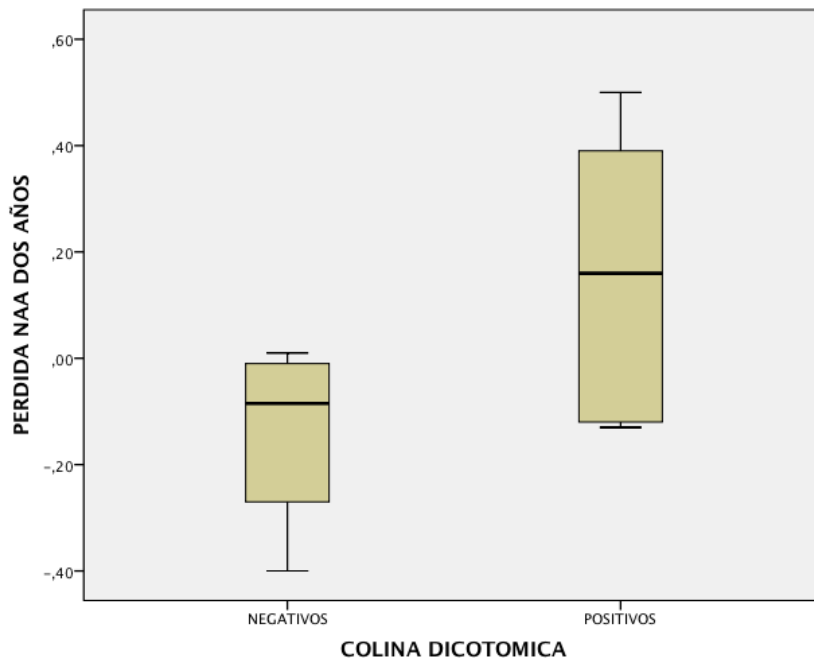


Al igual que ocurría con el NAA, esta **perdida de colina** se relaciona de manera inversamente proporcional con la **perdida de grupos sulfidrilo en los primeros 12 meses** tras la introducción del tratamiento ($r = - 0.9$, $p = 0.001$), es decir, los pacientes que incrementen los niveles de colina (y por lo tanto progresaran menos, según acabamos de ver) son los que más disminuya los grupos sulfidrilo el tratamiento durante estos 12 meses, cosa que también se ve con un Box Plot.

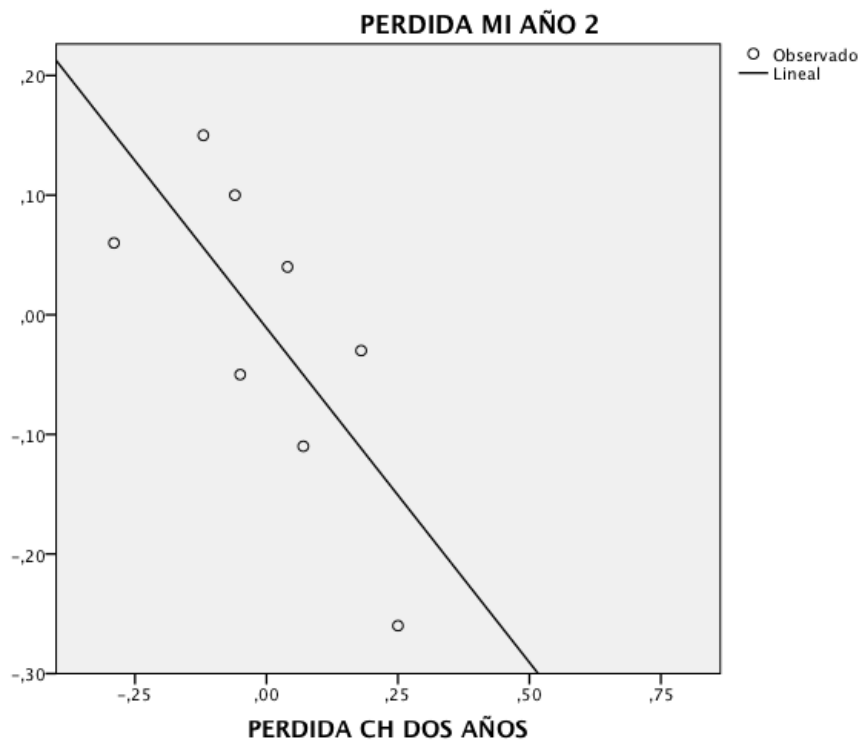


Es evidente que tanto los resultados del NAA como de la colina son homogéneos y es que ambos están relacionados estadísticamente ($r = 0.9$, $p = 0.001$). Los pacientes que aumentan el NAA en los dos años post tratamiento también son los que incrementan los niveles de colina.

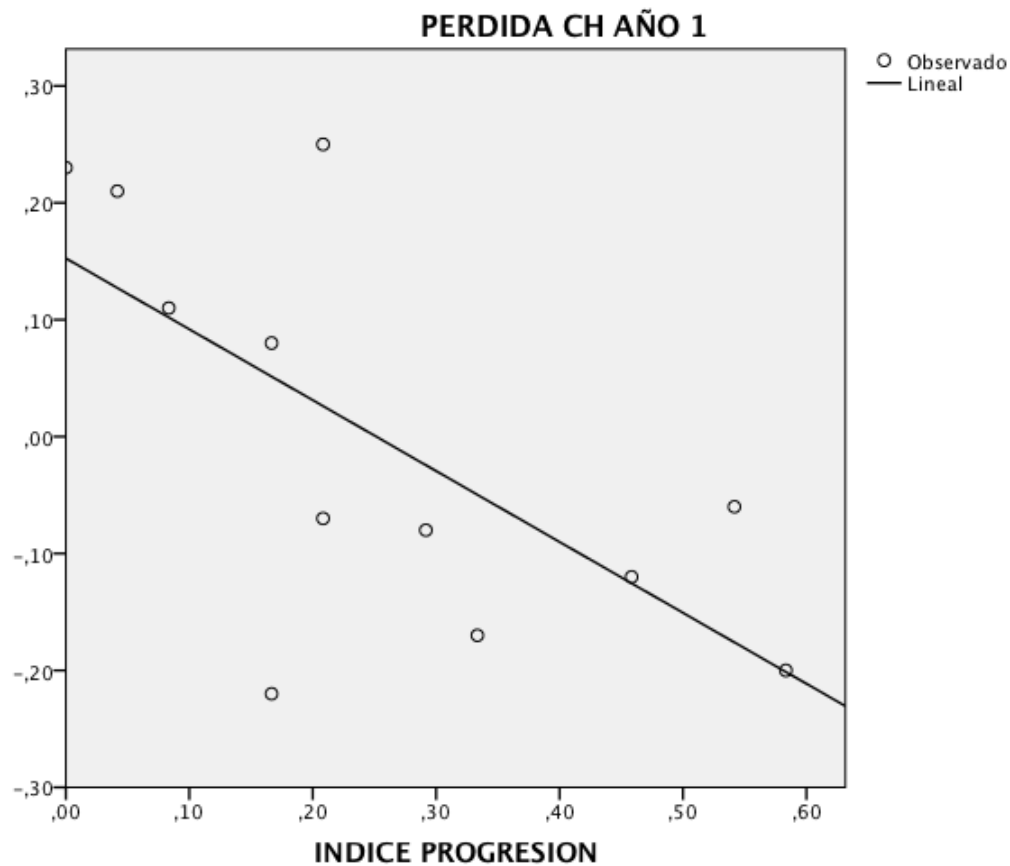




Por el contrario existe una relación inversa entre la pérdida de colina en los dos años de tratamiento y la pérdida de inositol durante el segundo año ($r = -0.7$, $p = 0.038$). Los pacientes que pierden mas colina son los que mas inositol van a ganar en el segundo año.



La pérdida de colina durante el primer año de tratamiento también se correlaciona de manera significativa con el índice de progresión ($r = -0.67$, $p = 0.017$) y con las EDSS desde los meses 48 al 144.

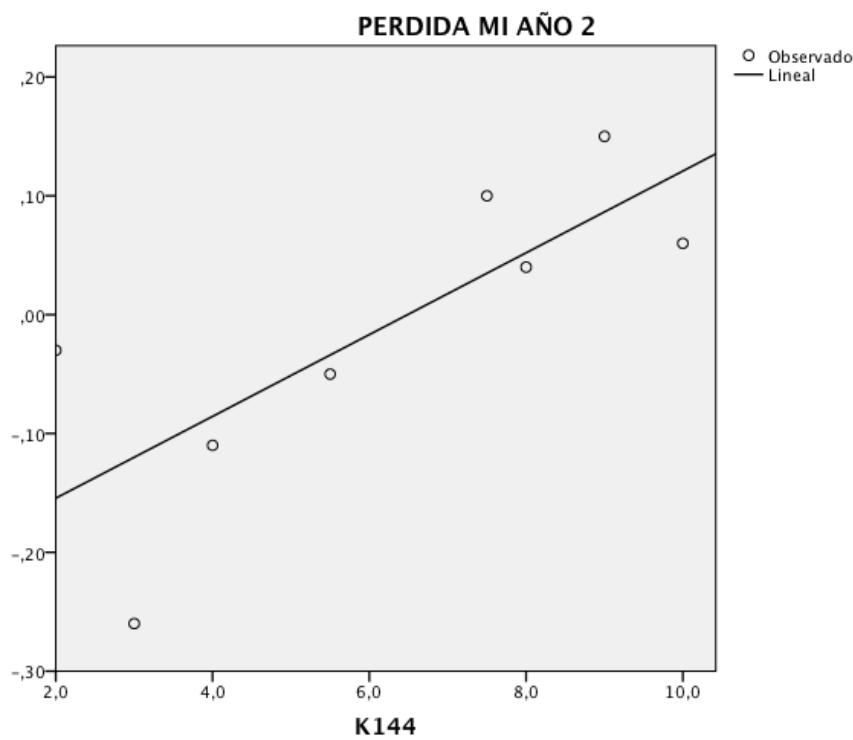


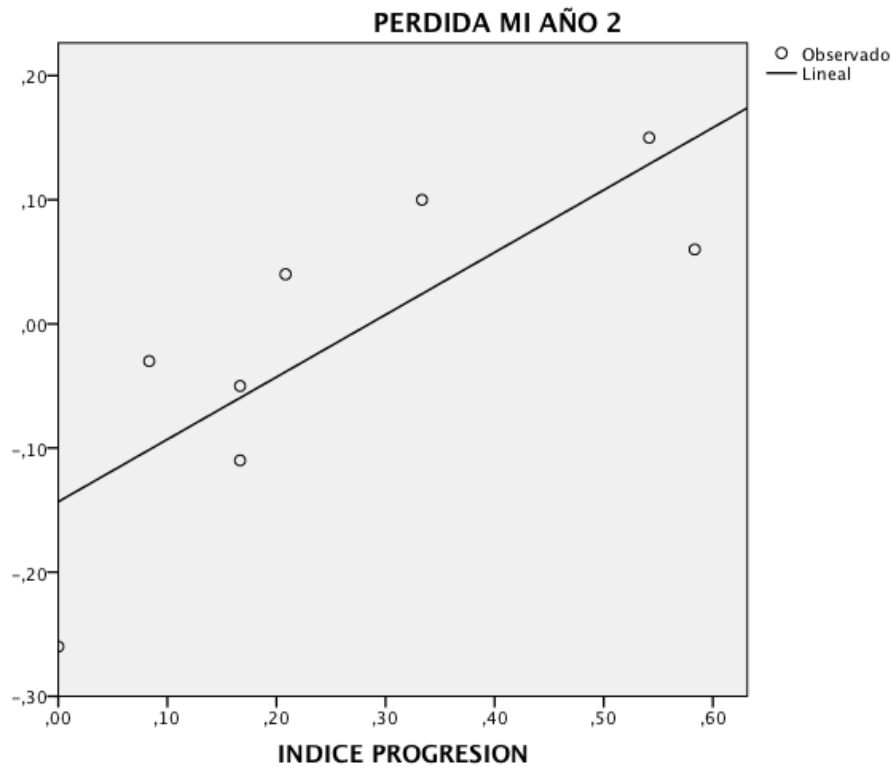
Al igual que sucedió con la pérdida de colina en los dos años de tratamiento esta también se relaciona con la pérdida de NAA en los dos años de tratamiento ($r = 0.8$, $p = 0.005$).

1.6.3. Con Mio inositol.

De la pérdida de inositol durante el segundo año ya hemos visto ciertos aspectos importantes: se relaciona de manera directa con el número de brotes durante el primer año de tratamiento y de manera inversa con la pérdida de colina durante los dos años de tratamiento.

Desde el punto de vista de la progresión se relaciona con el índice de progresión ($r = 0.8$, $p = 0.016$) en base a relacionarse con las EDSS en los últimos estadios observados (EDSS 84 m, EDSS 108 m, EDSS 132 m y EDSS 144 m) aumentando su significación a medida que incrementamos el tiempo de observación.



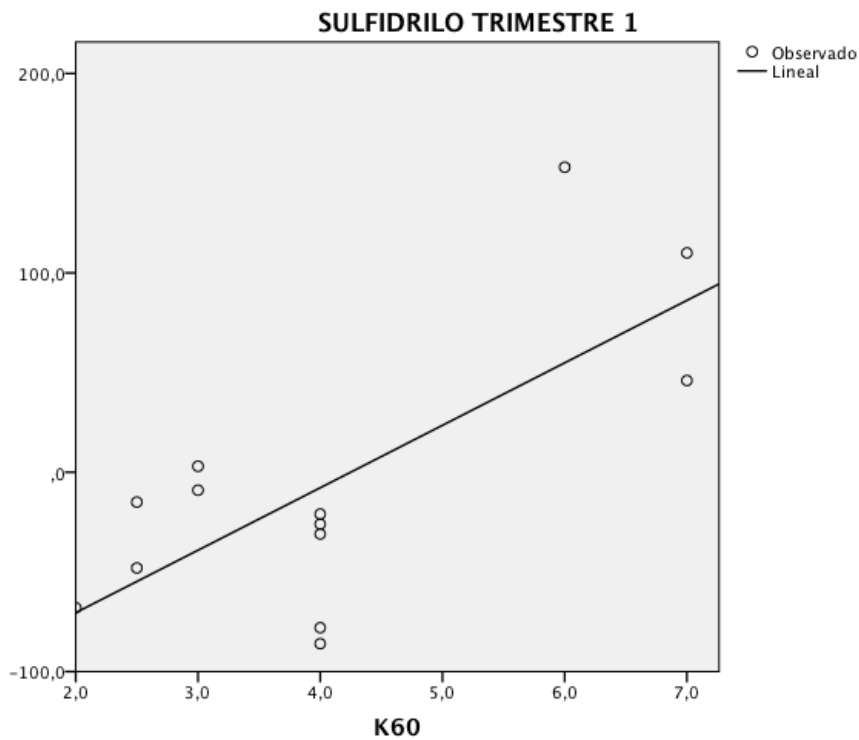
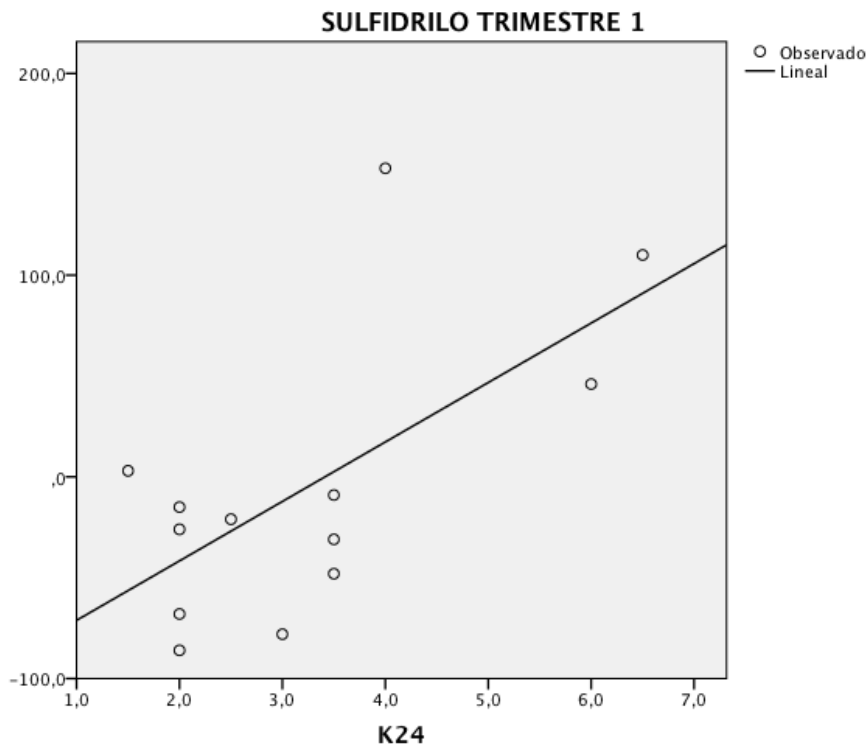


Es decir, los pacientes que incrementen los niveles de inositol durante el segundo año de tratamiento son los que mas progresarán y mayores niveles de discapacidad alcanzarán.

1.6.4. Oxido reducción.

También se obtuvo, aparte de lo ya comentado de la perdida de grupos sulfidrilos en el primer año de tratamiento, una correlación estadísticamente significativa entre la **perdida de grupos sulfidrilos durante el primer trimestre de tratamiento** y diferentes **niveles de discapacidad a corto plazo**; EDSS 24 m ($r = 0.6$, $p = 0.017$), EDSS 36 m ($r = 0.6$, $p = 0.032$), EDSS 48 m ($r = 0.7$, $p = 0.003$), EDSS 60 m ($r = 0.7$, $p = 0.005$), EDSS 72 m ($r = 0.6$, $p = 0.024$), EDSS 84 m ($r = 0.6$, $p = 0.014$), EDSS 96 m ($r = 0.6$, $p = 0.014$). A partir de ahí la significación disminuye solo siendo significativa a los 120 meses ($r = 0.6$, $p = 0.047$) posiblemente de

manera anecdótica y con tendencias a los 132 m ($r = 0.5$, $p = 0.057$) y 144 m ($r = 0.5$, $p = 0.051$), por lo que el índice de progresión no es significativo desde el punto de vista estadístico.



1.7. Implicación práctica de estos resultados.

La Espectroscopia de Resonancia Magnética es una herramienta que puede desempeñar un papel importante en los estudios sobre la historia natural de la enfermedad y la evaluación del tratamiento inmunosupresor o inmunomodulador en los ensayos clínicos.

EDSS parece reflejar la existencia de discapacidad irreversible probablemente relacionado con la degeneración axonal, mientras que el MSFC no parece hacerlo. MSFC es probablemente una medida más sensible de tanto la carga global de la enfermedad y la carga lesional que a la pérdida axonal.

2. RESULTADOS OBTENIDOS EN EL ESTUDIO DE VALIDACIÓN DE LOS CRITERIOS DE OPTIMIZACIÓN DEL TRATAMIENTO DE LA CMSWG.

2.1. Demografía de los sujetos y características clínicas

Obtuvimos datos de 55 pacientes (10 varones, 45 mujeres) en tratamiento con IFN B1a IM durante 51 meses (18-84 m). El número medio de brotes en los dos años anteriores fue de 2,5 (rango 2-7) y la EDSS basal fue de 1,8. El status "cambio de tratamiento " estado fue asignado al 22/55 pacientes (40%) y el de "no cambio de tratamiento " a 33 pacientes (60%). La Tabla 1 presenta los datos demográficos y las características clínicas de los dos grupos de pacientes, no hubo diferencia en las características basales de ser observados.

	CAMBIAR	NO CAMBIAR
Pob.	22	33
Tiempo. TTO (meses)	52,5	51,18
EDSS 0	1,86	1,87
Brotos 2 a antes Tto	2,72	2,3
Brotos 1a antes Tto	1,91	1,94
Edad en debut	27,3	27
duracion enfermedad	13,7	12,6

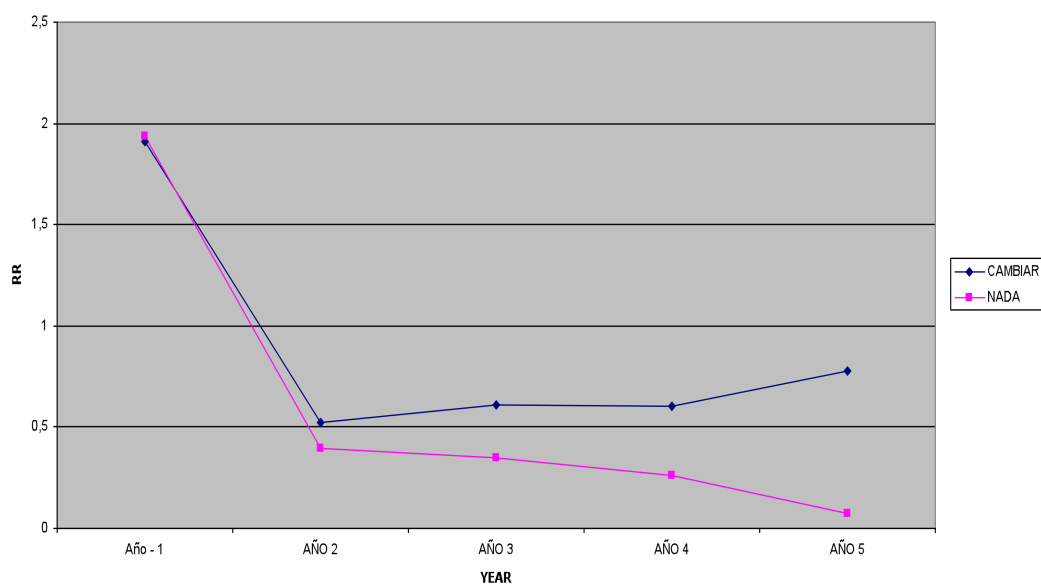
Durante los dos primeros años de tratamiento (un año antes y un año después de la optimización), todos los pacientes continuaron con el mismo tratamiento, dosis y vía de administración. Durante el tercer año, 10 pacientes cambiaron el tratamiento, frente a 12 en el cuarto año y 9 más durante el transcurso del quinto año. Al final del seguimiento, 9 de 22 (41%) del grupo de no cambiar tratamiento y 14 de 32 (44%) del grupo Cambiar tratamiento continuó con el mismo tratamiento, dosis y vía de administración. Estas diferencias no fueron estadísticamente significativas.

2.2. Sensibilidad y Especificidad

La sensibilidad, estimada según el estado de los pacientes durante la última visita, fue 73.9%, la especificidad fue del 84,4% y el VPP fue del 77,3%.

2.3. Tasa de brotes durante los años 2-5

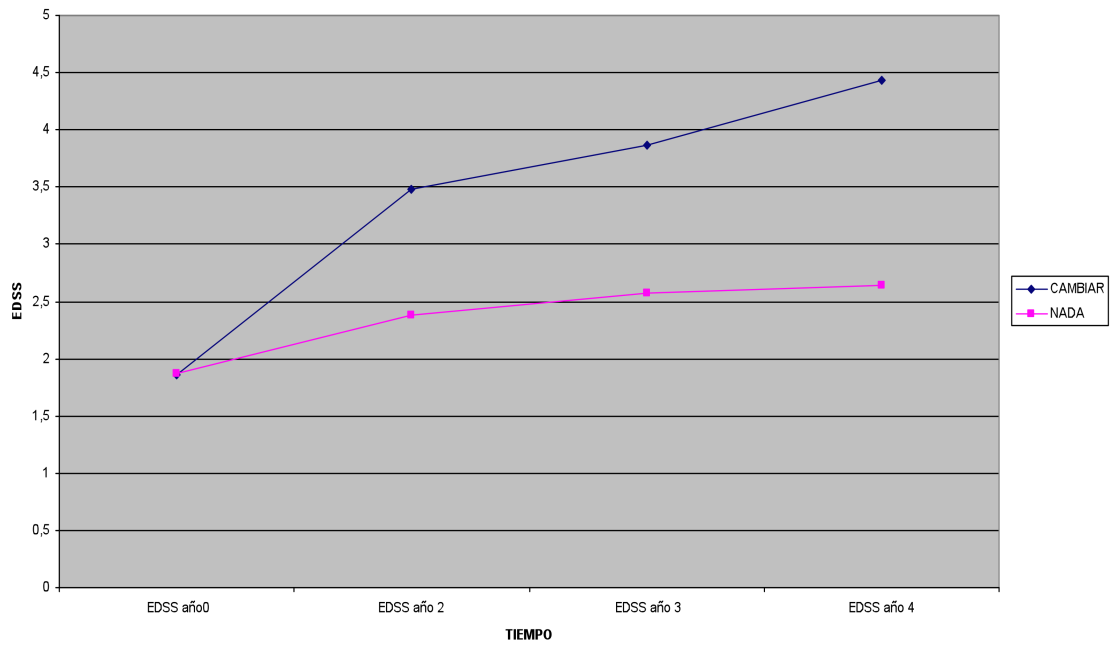
La Figura 1 muestra la tasa de brotes durante cada año del período de seguimiento (segundo-quinto año). Las diferencias entre los grupos cambiar (C) y no cambiar (NC) se manifiestan desde el segundo año ($0,52 \pm 0,67$ vs $0,39 \pm 0,7$, $p = 0,5$, C vs NC, respectivamente), aumentan a partir del tercer año ($0,61 \pm 0,77$ vs $0,34 \pm 0,68$, $p = 0,24$ C vs NC, respectivamente) y en el cuarto año ($0,60 \pm 0,51$ vs $0,26 \pm 0,56$, $p = 0,07$ C vs NC, respectivamente), pero no fueron estadísticamente significativas hasta el quinto año ($0,7 \pm 0,66$ vs $0,07 \pm 0,26$, $p = 0,001$ C vs NC, respectivamente).



Al considerar la tasa de brotes del total del período de seguimiento (el período que abarca el segundo a quinto año) de los pacientes que completaron el seguimiento sin cambios en el tratamiento y los que si lo cambiaron se observaron que las diferencias eran claramente significativa (C: $1,72 \pm 1,58$; NC: $0,85 \pm 1,20$, $p = 0,02$).

2.4. Progresión durante años 2-5

Al analizar la progresión de la EDSS (Figura 2), se observó una diferencia estadísticamente significativa a partir del segundo año ($3,47 \pm 1,45$ en el grupo C vs $2,37 \pm 1,17$ en el grupo N, $p = 0,003$). Esta diferencia se mantuvo después del tercer año ($3,86 \pm 1,67$ en el grupo C vs $2,57 \pm 1,54$ en el grupo N, $p = 0,01$), cuarto ($4,42 \pm 1,69$ en el grupo C vs $2,63 \pm 1,54$ en el grupo N, $p = 0,003$) y quinto año de seguimiento ($4,28 \pm 1,6$ en el grupo C vs $2,68 \pm 1,7$ en el grupo N, $p = 0,04$). El Índice de progresión del periodo de seguimiento (desde la visita de los 12 meses hasta la última visita) fue mayor en el grupo que se consideraba que debiera haber cambiado en comparación con el grupo que se consideraba no debiera haber cambiado (C: $0,29 \pm 0,34$, N: $0,13 \pm p = 0,03$).



2.5. Implicación práctica de estos resultados.

El Optem® es un software desarrollado por nuestro grupo, que permite una optimización de los cambios de tratamiento basadas en criterios CMSWG objetiva, fácil y automática.

3. RESULTADOS OBTENIDOS EN EL ESTUDIO DE FARMACOGENÓMICA.

3.1. Demografía de los sujetos y características clínicas

Se seleccionaron a 149 pacientes con Esclerosis Múltiple Clínicamente Definida en tratamiento con Interferón como fármaco de primera elección. Sus características demográficas se exponen a continuación.

	No Respondedor		Respondedor		Todos	
	No.	%	No.	%	No.	%
Sexo						
Femenino	62	72.9%	41	64.1%	103	69.1%
Masculino	23	27.1%	23	35.9%	46	30.9%
Tipo EM						
RR	65	76.5%	57	89.1%	122	81.9%
SP	20	23.5%	7	10.9%	27	18.1%
Hª Familiar						
No	75	88.2%	51	79.7%	126	84.6%
Si	10	11.8%	13	20.3%	23	15.4%
Interferón						
Avonex	26	30.6%	16	25%	42	28.2%
Betaferón	33	38.8%	23	36%	56	37.6%
Rebif	26	30.6%	25	39%	51	34.2%
Total	85	100.0%	64	100.0%	149	100.0%

Características de la muestra (variables categóricas)

	N	Media	SD	Min	Max
Edad debut					
respondedores	85	27,7	8,7	11	46
no respondedores	64	31,6	9,0	16	56
Edad					
respondedores	85	41,0	9,4	25	64
no respondedores	64	42,8	11,1	23	72
Índice de Link					
respondedores	63	1,16	0,65	0,39	3,00
no respondedores	45	1,08	0,72	0,35	4,06

Características de la muestra (variables continuas)

3.2. Correlación entre los marcadores genéticos y la respuesta terapéutica.

Dentro de los 367 marcadores seleccionados tan solo 13 resultaron estar asociados a respuesta terapéutica utilizando un umbral de significación estadística de $p < 0.05$ en el análisis crudo. En el análisis ajustado solo nueve de estos marcadores conservaron la significación estadística, que también alcanzaron otros cinco marcadores no asociados en el análisis crudo. La tabla 1 muestra los marcadores asociados en alguno de los dos análisis.

Si ampliamos el análisis a cualquier marcador sin exigir que este asociado con EM el número de marcadores seleccionables aumenta significativamente. Por este motivo elevamos el umbral de significación estadística hasta 0.0005 y aun así detectamos un total de 34 marcadores asociados en el análisis crudo y 27 en el ajustado (15 de ellos comunes). La tabla 2 muestra estos resultados.

La figura 1 muestra en un “Manhattan Plot” los resultados no ajustados del test de respuesta a IFN para todos los marcadores por cromosomas.

Tabla 1. Marcadores asociados con respuesta a IFN y asociados a esclerosis múltiple

Chr	SNPs	MA F	Freq.	Crude Analysis			Adjusted Analysis			Gen	Posición
				N	OR	P	N	OR	P		
1	rs11205331	A	0.13	149	1.79	0.086	147	2.13	0.033	VPS45	intron
5	rs3923169	A	0.16	149	2.42	0.006	147	2.73	0.005	MAT2B WWC1 ODZ2	downstream upstream upstream
6	rs9275765	A	0.25	147	0.41	0.003	145	0.40	0.004	HLA-DQB1 HLA-DQA2	upstream upstream
6	rs9275772	T	0.25	149	0.43	0.004	147	0.42	0.005	HLA-DQB1 HLA-DQA2	upstream upstream
6	rs9275793	G	0.25	149	0.43	0.004	147	0.42	0.005	HLA-DQB1 HLA-DQA2	upstream upstream
6	rs3130534	A	0.43	148	1.80	0.028	146	1.75	0.052	POU5F1 HLA-C HCG27	upstream downstream downstream
6	rs6903273	G	0.12	149	0.42	0.033	147	0.47	0.075	C6orf195 MYLK4	upstream downstream
7	rs2168589	A	0.25	149	1.51	0.112	147	1.78	0.041	ZBPB IKZF1 C7orf72	upstream upstream downstream
7	rs11185603	G	0.23	149	1.44	0.182	147	1.83	0.042	ZBPB IKZF1 C7orf72 IKZF1	upstream upstream downstream upstream
8	rs7821033	C	0.07	147	5.57	0.002	145	6.04	0.002	IDO1 C8orf4 IDO2	downstream upstream downstream
11	rs208681	T	0.22	148	1.84	0.044	146	1.92	0.039	ABTB2 CAT	upstream upstream
11	rs11221580	A	0.16	149	1.91	0.046	147	1.91	0.056	CNTN5	intron
12	rs722248	A	0.17	147	0.56	0.080	145	0.48	0.040	ST8SIA1	intron
13	rs2763416	A	0.31	149	1.67	0.046	147	1.94	0.016	EDNRB POU4F1	upstream downstream
13	rs2585564	T	0.31	149	1.67	0.046	147	1.94	0.016	EDNRB POU4F1	upstream downstream
14	rs17123869	T	0.14	149	2.01	0.040	147	2.04	0.054	TMX1 FRMD6	downstream upstream
17	rs11080230	C	0.07	149	0.27	0.023	147	0.21	0.012	ACCN1	intron
18	rs17079178	C	0.14	144	1.74	0.090	142	2.23	0.028	DSEL TMX3	upstream downstream

Nota: Los resultados en rojo indican significación estadística usando 0.05 como punto de corte

Tabla 2. Marcadores asociados con respuesta a IFN ($p < 0.0005$)

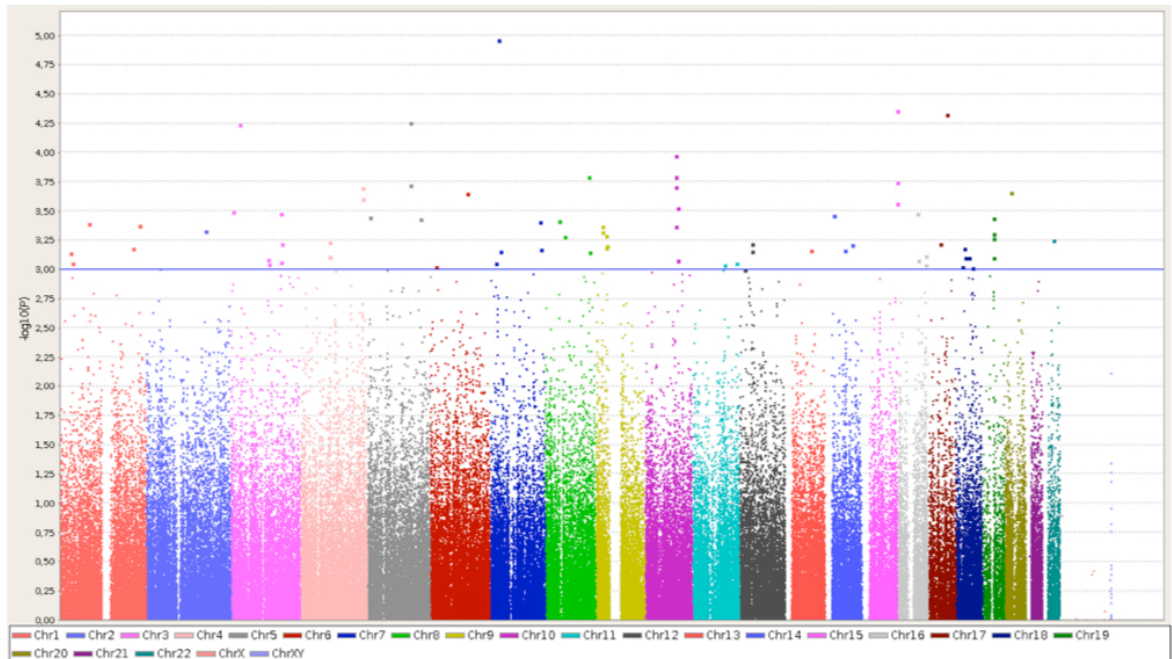
Chr	SNPs	A	Freq.	Crude Analysis			Adjusted Analysis			Gen	Posición
				N	OR	P	N	OR	P		
1	rs12057961	C	0.08	149	6.54	0.0004056	147	5.13	0.002423	LPHN2 TTLL7	downstream downstream
1	rs6426525	T	0.47	148	0.37	0.0004205	146	0.43	0.003807	RAB4A RHOU	upstream downstream
2	rs17653822	C	0.41	148	2.15	0.002333	146	2.72	0.0003887	PUM2 RHOB	upstream upstream
2	rs1990842	C	0.31	148	2.61	0.0004702	146	3.06	0.0001957	LRP2	intron
3	rs6772373	G	0.37	149	2.66	0.0003205	147	2.90	0.0002619	EDEM1 GRM7	downstream upstream
3	rs4516558	G	0.28	147	3.27	5.72e-05	145	3.80	3.555e-05	UBE2E2 UBE2E1	downstream upstream
3	rs10433346	C	0.31	149	2.73	0.0003313	147	3.27	0.0001237	RASA2 RNF7	downstream upstream
4	rs10805288	A	0.39	149	2.00	0.004993	147	2.78	0.0003475	PCDH7 STIM2	upstream downstream
4	rs6827298	A	0.46	148	2.32	0.0005851	146	2.58	0.0004159	RASGEF1B HNRNPD	upstream downstream
4	rs3749480	A	0.24	147	3.20	0.0002009	145	3.16	0.0005059	NEIL3 AGA	downstream downstream
4	rs3805167	G	0.24	149	3.11	0.0002484	147	3.07	0.0006339	AGA	intron
5	rs4392595	A	0.49	148	0.41	0.0003601	146	0.46	0.003555	MTRR SEMA5A	downstream downstream
5	rs6897261	G	0.24	149	0.35	0.001027	147	0.29	0.0004178	RAB3C PDE4D	downstream downstream
5	rs17488000	A	0.29	148	0.28	5.554e-05	146	0.19	1.243e-05	CSNK1G3 ZNF608	downstream downstream
5	rs7708319	A	0.31	149	0.34	0.0001898	147	0.23	3.59e-05	CSNK1G3 ZNF608	downstream downstream
5	rs4457062	C	0.33	147	0.36	0.0003712	145	0.35	0.0005698	NMUR2 GRIA1	upstream upstream
6	rs667924	C	0.28	149	0.43	0.004418	147	0.30	0.0004926	TFAP2A GCNT2	upstream upstream
6	rs9449067	C	0.45	146	0.46	0.002772	144	0.35	0.0003614	BCKDHB	downstream

										FAM46A	downstream
6	rs4945768	C	0.27	149	2.91	0.0002254	147	2.83	0.0007555	C6orf203 BEND3	downstream downstream
7	rs2717912	T	0.13	148	6.28	1.093e-05	146	5.62	7.315e-05	NPVF NFE2L3 MIR148A	upstream upstream downstream
7	rs7811933	C	0.25	149	2.63	0.0003952	147	2.63	0.0007373	CNTNAP2 TPK1	upstream upstream
8	rs7838116	A	0.07	149	7.92	0.0003827	147	7.50	0.0008351	IDO1 C8orf4	downstream upstream
8	rs2981079	C	0.40	147	2.62	0.000161	145	2.50	0.0005671	HAS2 ZHX2 HAS2AS	upstream upstream downstream
9	rs6475240	G	0.49	149	2.67	0.0004299	147	2.74	0.0006771	ADAMTSL1	intron
9	rs10429480	A	0.43	149	2.44	0.0004795	147	2.36	0.001531	ADAMTSL1	intron
9	rs7855848	A	0.23	146	2.91	0.0006559	144	3.62	0.0002543	TEK	intron
10	rs17422189	C	0.12	148	5.01	0.0001623	146	5.38	0.0001625	WAPAL	intron
10	rs12265661	G	0.12	149	5.22	0.0001068	147	5.59	0.0001028	WAPAL	intron
10	rs17422850	G	0.12	149	4.89	0.0001968	147	5.13	0.0002087	WAPAL	intron
10	rs7917841	C	0.12	147	4.31	0.00043	145	4.66	0.0003877	WAPAL	intron
10	rs17526697	A	0.08	146	4.74	0.002277	144	8.00	0.0003656	KIF20B HTR7	downstream downstream
10	rs10509622	A	0.23	148	0.29	0.0002986	146	0.30	0.0009564	ANKRD1 PCGF5 NUDT9P1	upstream upstream downstream
14	rs11627573	A	0.19	147	3.18	0.000347	145	3.56	0.0002625	HMG2 NOVA1 STXBP6	upstream downstream upstream
15	rs735504	A	0.50	149	2.60	0.0001802	147	2.65	0.0003652	PCSK6 TM2D3	upstream downstream
15	rs746428	G	0.50	149	0.40	0.0002738	147	0.40	0.0005986	TM2D3 PCSK6	downstream upstream
15	rs1992728	G	0.42	149	2.84	4.367e-05	147	2.89	9.824e-05	PCSK6 TM2D3	upstream downstream
16	rs12921587	G	0.39	149	2.53	0.0003331	147	2.50	0.001063	GOT2 CDH8	upstream downstream

										LOC644649	downstream
17	rs8066255	G	0.20	148	2.95	0.0006041	146	3.52	0.0002599	HNF1B MRPL45 TBC1D3G	upstream upstream upstream
17	rs9913816	G	0.40	147	0.31	4.692e-05	145	0.34	0.0003206	AKAP1 MSI2	downstream upstream
18	rs10502438	G	0.10	149	0.15	0.0009451	147	0.11	0.0002262	C18orf45	intron
19	rs2159074	C	0.20	148	3.21	0.0004995	146	3.09	0.001322	ZNF254 UQCRFS1 LOC100101266 LOC148145	downstream downstream upstream upstream
19	rs720922	G	0.12	149	4.26	0.0003636	147	3.85	0.001719	ZNF254 UQCRFS1 LOC100101266 LOC148145	downstream downstream upstream upstream
19	rs720923	A	0.20	147	3.34	0.000365	145	3.20	0.001035	ZNF254 UQCRFS1 LOC100101266 LOC148145	downstream downstream upstream upstream
20	rs12481484	A	0.18	145	0.23	0.0002215	143	0.27	0.001297	SLC24A3 RPL12	downstream downstream
22	rs5762870	T	0.27	149	2.10	0.005326	147	2.86	0.0004616	XBP1 ZNRF3	upstream upstream
22	rs2064261	T	0.27	149	2.10	0.005326	147	2.86	0.0004616	ZNRF3	intron

Nota: Los resultados en rojo indican significación estadística usando 0.0005 como punto de corte

Figura 1. “Manhattan plot” con tests de asociación de marcadores y respuesta a IFN



3.3 Implicación práctica de estos resultados.

El análisis y caracterización de biomarcadores permitirá la elaboración de herramientas predictoras más sofisticadas y más precisas y programas de prevención específicos para los individuos en riesgo.

VIII. Discusión.

En un futuro nos enfrentaremos a una serie de desafíos para conseguir un enfoque personalizado del tratamiento basándose en métodos cuantitativos. En primer lugar precisaremos de un conocimiento exacto de la fisiopatología de la enfermedad, sobre todo de la progresión, origen de la discapacidad permanente de esta enfermedad. En segundo lugar necesitaremos definiciones estandarizadas y validadas de la respuesta a los tratamientos, que deberán ser reconocidas y aceptadas por la comunidad internacional. En tercer lugar, se necesitarán nuevos estudios para aclarar el valor de los nuevos biomarcadores y que puedan ser integrados junto con otras variables paraclínicas y clínicas en un método cuantitativo de predicción. Finalmente se deberá tener en cuenta la aplicabilidad a la práctica clínica, a fin de generar sistemas de puntuación que sean lo suficientemente simple para ser implementado en cualquier entorno clínico. A lo largo de este trabajo hemos intentado dar algo de luz en estos aspectos.

Disminución del N Acetil Aspartato en pacientes con EM.

En nuestro estudio hemos observado, que desde estadios muy precoces, el coeficiente NAA : Cr medido mediante espectroscopia por resonancia magnética en la sustancia blanca de apariencia normal es inferior en el grupo de pacientes con EM que en los sujetos sanos. Muchos estudios han mostrado ya la disminución de los niveles de NAA en comparación con los controles sanos (Aboul-Enein et al, 2010; Chard et al, 2002; De Stefano et al, 1998, 2001, 2002; Fu et al, 1998; Leary et al, 1999; Lee et al, 2000). Los niveles reducidos de NAA en la ERM ya han sido confirmados también por histopatología como secundaria a la pérdida axonal (Bitsch y cols., 1999, Bjartmar y cols., 2001). La disminución de los niveles de NAA

en la sustancia blanca de apariencia normal ya están presentes en las primeras etapas de la enfermedad y progresa con el tiempo (De Stefano et al, 2001).

N Acetil Aspartato como marcador de daño axonal.

En nuestro estudio hemos obtenido una relación estadísticamente significativa, si bien inversa, entre el NAA : Cr en la SBAN y la discapacidad medida en la escala EDSS. ($r = -0,38$, $p < 0,03$). Ya desde los primeros estudios realizados con ERM en lesiones crónicas (hipointensas en T1) se observó una correlación inversa significativa entre el NAA de las lesiones y la discapacidad ($r = -0.364$, $0.05 > P > 0,02$), siendo confirmado posteriormente por otros grupos (De Stefano et al. 1998, Davie et al. 1997,...)

Curiosamente los niveles de NAA encontrados en la sustancia gris cortical en las formas progresivas de la enfermedad no se correlacionó significativamente con EDSS (Adalsteinsson y cols., 2003) y además los niveles de metabolitos en la etapa muy precoces de la enfermedad parecen depender de la actividad lesional. Todo esto sería porque las alteraciones de los metabolitos observadas en la SGC en las fases precoces de la enfermedad pueden ser secundarios al proceso inflamatorio, en lugar de a la disfunción neuronal "primaria", es decir, que el proceso patológico en la EM se extiende desde la sustancia Blanca a la SGC, en particular en la forma progresiva de la enfermedad (Au Duong y cols., 2007).

También se han encontrado correlaciones significativas entre la disminución de NAA en las regiones frontal y el rendimiento de la función ejecutiva (Staffen y cols.,

2005), así como entre la disminución de NAA en el locus caeruleus pontino y medidas de atención (Gadea y cols., 2004).

No se encontró correlación entre el valor del NAA : Cr en la SBAN con otras escalas de discapacidad (MSFC sobre todo) en pacientes en estadios precoces de la enfermedad. Probablemente es debido a que esta escala está más ligada a actividad inflamatoria que a pérdida axonal, aunque coincidimos con Kalkers y cols., que gran parte de la variabilidad en esta escala permanece aún desconocida (Kalkers y cols., 2001).

Brotos como marcador subrogado de discapacidad

En nuestro caso el número total de brotes durante el primer año de tratamiento se correlaciona de manera significativa con la discapacidad a corto y medio plazo. La literatura ha proporcionado resultados muy heterogéneos sobre este tema. Cuando se evaluó el impacto de los brotes en la respuesta a IFN- β durante el tratamiento, algunos estudios encontraron que los brotes no estaban relacionados significativamente con la respuesta al IFN- β , (Río y cols., 2008, Tomassini y cols., 2006), mientras que otros mostraron una estrecha correlación entre las recaídas a corto plazo y la progresión de la discapacidad a largo plazo durante el tratamiento con IFN- β (Prosperini y cols., 2009, Sormani y cols., 2013, Bermel y cols., 2013, Goodin y cols., 2012).

El hecho de que los brotes pudieran ser buenos marcadores subrogados de la discapacidad clínica en EM sugiere que los pacientes con EM tienen probabilidades

de obtener beneficio usando IFN- β en lo que se refiere a la progresión de la discapacidad y apoya el uso de los cambios en estos marcadores como predictores de la evolución clínica durante los años siguientes. (Durelli y cols., 2008, Río y cols., 2008, Prosperini y cols., 2009, Sormani y cols., 2013, Tomassini y cols., 2006)

Al correlacionar los brotes con el mioinositol (mI : Cr), marcador de gliosis cerebral, vimos que durante el primer año los pacientes que más brotes tienen durante el primer año son los que más mioinositol pierden mientras que durante el segundo año los que más brotes tuvieron durante el primer año son los que más mioinositol van a acumular a partir del segundo año. Narayana (Narayana y cols., 1998) observó que los niveles de los metabolitos alcanzan su valor mínimo cuando el volumen lesional alcanza su máximo pudiendo atribuirse, al menos parcialmente, al edema en las lesiones y no al compromiso del metabolismo tisular y su incremento durante el segundo año sería la gliosis reactiva a la inflamación y aquellos pacientes en que aquella fuera mayor serían los que más discapacidad acumularan años después

Evaluación de la eficacia del tratamiento.

Todos los tratamientos modificadores de la enfermedad actualmente disponibles para la EM han demostrado tener efectos significativos en la reducción de la inflamación de la sustancia blanca medido con resonancia magnética. Las nuevas terapias también han mostrado efectos importantes sobre la actividad inflamatoria y una disminución significativa en las tasas de brotes. Debido a su naturaleza cuantitativa inherente, la ERM es un método ideal para evaluar la eficacia del

tratamiento. Hemos estudiado el efecto de los tratamientos inmunomoduladores en los metabolitos cerebrales para evaluar la eficacia del tratamiento en un grupo de pacientes.

Desde el punto de vista clínico el tratamiento con IFN se asoció a una disminución de la tasa de brotes entre el primer y el segundo año de un 68%, con un incremento progresivo de la discapacidad, medida en la escala EDSS, a pesar del tratamiento. En nuestro caso hubo una variación estadísticamente significativa en la variación de los valores de las ratios NAA : Cr, permaneciendo el resto de metabolitos sin variación estadística si el grupo es estudiado de manera global. El NAA : Cr disminuyó durante el primer año un 5.8% para después aumentar durante el segundo año aunque manteniéndose siempre por debajo de los valores basales.

Este hecho no es algo exclusivo del NAA sino que cuando estimamos el daño axonal utilizando la atrofia cerebral los diferentes interferones han demostrado reducir la tasa de atrofia también a partir del segundo año de tratamiento en la EMRR [Rudick y cols., 2000, Frank y cols., 2004, Hardmeier y cols., 2005], aunque no en la EMSP [Molyneux y cols., 2000]. Podemos medir distintos tipos de atrofia: la de la sustancia gris frente a la de la sustancia blanca cerebral y mientras que la sustancia blanca muestran una disminución constante, la atrofia en la sustancia gris es un predictor más sensible de la discapacidad futura [Fisher y cols., 2008, Fisniku y cols., 2008]. Hay pruebas de que la aparición de lesiones de sustancia blanca está ligado a cambios posteriores en la sustancia gris cortical, aunque la ubicación específica de las lesiones puede influir en el grado de cambio de la sustancia gris

detectado [Bendfeldt y cols., 2010]. Esto concuerda con los efectos del tratamiento sobre la atrofia cerebral comentado anteriormente y sobre la evolución del NAA, el cual encontró una disminución de la atrofia cerebral después de varios meses de tratamiento, lo que refleja el efecto retardado de los cambios inflamatorios en la sustancia blanca supresión. Un estudio sugiere un beneficio del interferón beta-1a (Avonex) para frenar la tasa de atrofia de la materia gris, detectable a los 2 y 3 años después de iniciar el tratamiento [Zivadinov y cols., 2007].

El volumen de literatura sobre el efecto del interferón medido con ERM no es muy elevado. Se han llevado a cabo estudios longitudinales con ERM en 10 pacientes con EMRR que, después de un examen inicial, recibieron interferón β -1b. Los espectros se adquirieron hasta en 34 meses en diferentes momentos, y se determinaron las concentraciones absolutas de NAA, Cr, y Cho en una gran lesión no realizada y en la SBAN contralateral (Schubert y cols., 2002). En este estudio, excepto en uno de los 10 pacientes, no hubo ningún efecto de interferón β -1b en los niveles metabólicos.

La ERM también se ha utilizado para investigar las modificaciones de las concentraciones de los metabolitos cerebrales, en la fase inicial del tratamiento con interferón β -1a (Sarchielli y cols., 1998). Se realizó un estudio en 5 pacientes con EMRR tratados con IFN intramuscular β -1a durante seis meses y 5 pacientes no tratados. Los pacientes fueron evaluados al inicio del estudio y en el primer, tercer y sexto mes de tratamiento. En las lesiones, los picos de NAA no variaron significativamente durante todo el período de estudio en el grupo no tratado. En el grupo tratado, hubo un aumento significativo del pico de Cho en las lesiones y uno

no significativo de la Cho en la SBAN. Otro estudio Parry y cols., tampoco encontraron ningún efecto del tratamiento con interferón β durante 1 año en los niveles de NAA de materia blanca en la EM remitente recidivante (Parry et al, 2003).

En un pequeño estudio piloto, se realizó ERM en 10 pacientes con EMRR antes y después de un año de tratamiento con interferón subcutáneo β -1b. NAA / Cr se midió en un gran volume cerebral central (Narayanan y cols., 2001). Estas mediciones se compararon con los de seis pacientes no tratados pareados en EDSS y la media de NAA / Cr en la visita basal. El NAA : Cr en el grupo tratado mostró un aumento de 5,5% a los 12 meses de tratamiento, mientras que esta proporción se redujo en el grupo no tratado, pero no significativamente, lo que sugiere un efecto de interferón β -1b en la restauración de la integridad neuronal. Narayanan y cols., 2001 reportaron un aumento en los niveles de NAA en la sustancia blanca de apariencia normal de sujetos con EM remitente-recurrente después de 1 años de tratamiento con interferón beta. Sin embargo, el número de pacientes en estos estudios eran bajos, y mejorías espontáneas como se observan en los estadios precoces de la EM no se podrían excluir.

Correlación entre la concentración de los distintos metabolitos en los tejidos y los parametros clínicos.

N Acetil Aspartato.

Si examinamos la progresión de este coeficiente observaremos que hay un grupo de pacientes (1/3) que, si bien globalmente los pacientes pierden NAA, ellos no lo

pierden o incluso lo recuperan. Este porcentaje es similar al que se comenta en estudios clínicos respecto a la respuesta del interferón.

Al correlacionar la pérdida de NAA durante los dos años de tratamiento con el índice de progresión se observa que este grupo de paciente que gana NAA presenta un índice de progresión menor que el grupo que lo pierde, es decir, los pacientes que aumentan los niveles de NAA durante los dos primeros años de tratamiento progresarán menos o no progresarán en comparación con aquellos que lo pierden.

Para intentar encontrar una explicación fisiopatológica a este fenómeno se estudió la pérdida de los grupos sulfidrilos durante el primer año. Se vio que los pacientes que incrementan los niveles de NAA (y por lo tanto progresarán menos) corresponde a los que el tratamiento disminuye más los grupos sulfidrilos durante estos 12 meses.

Es decir, el tratamiento va a disminuir el estrés oxidativo de manera precoz en un grupo de pacientes que secundariamente mejoraran del daño axonal y tendrán a largo plazo un mejor pronóstico. En aquel grupo de pacientes en el que el tratamiento no logra disminuir el ambiente oxidativo, el daño axonal continuará y la discapacidad progresará de manera constante.

Los pacientes con un curso relativamente benigno de la EM, representan un subgrupo interesante para comprender mejor los mecanismos de compensación de la energía del metabolismo astrocítico y axonal. Entendemos como "EM benigna" a pacientes con EM que presentan un mínimo o ningún aumento de la

discapacidad después de por lo menos 10 años de observación; (Ramsar-Ansing y De Keyser, 2006). El proceso degenerativo es menos axonal en este subconjunto de pacientes (Gauthier et al, 2009). En comparación con los controles, los pacientes con EM benigna mostró unos ratios de NAA en la sustancia blanca de apariencia normal relativamente preservados (Benedetti et al, 2009 ; Davie et al, 1997; Steen et al, 2010).

Dos son las hipótesis por el que el tratamiento disminuye el ambiente oxidativo: por una parte por los efectos antiinflamatorios del tratamiento, que son evidentes al correlacionar la evolución de los grupos sulfidrilos y la evolución de los linfocitos CD 56; la disminución de estos linfocitos (entre otros) conllevaría a una disminución del ambiente oxidativo. Por otra parte es atractivo considerar al NAA como un marcador de la función mitocondrial.

El metabolismo del ATP de las mitocondrias axonales y la síntesis de NAA están indirectamente vinculadas. Por una parte la Aspartato Aminotransferasa facilita la conversión de glutamato a alfa-cetoglutarato y del oxaloacetato en aspartato. Por otra parte la acetilación de aspartato por la enzima neuronal aspartato N-acetiltransferasa produce la formación de NAA que se exporta desde la mitocondria. La formación de NAA favorece la conversión de glutamato a alfa-cetoglutarato, que es un mecanismo neuronal que puentea la reacción de la citrato sintasa más lenta en el ciclo del ácido tricarbóxico (Yudkoff et al, 1994). Los niveles de NAA en la sustancia blanca de apariencia normal, según lo medido por la espectroscopia de resonancia magnética ^1H , son a la vez un marcador de la función mitocondrial axonal y de la integridad axonal.

Un trabajo realizado en pacientes con EM estudió las contribuciones estructurales del NAA, según imágenes de difusión y de volumétrica en la sección transversal de la médula espinal (Cicarelli et al, 2010 a y b). Se asoció una disminución del NAA, que refleja información del metabolismo mitocondrial axonal, con una mayor discapacidad clínica independiente del daño estructural. Estos resultados apoyan la idea de que la disfunción metabólica mitocondrial en los axones, y no sólo la pérdida axonal, es un determinante importante de la reducción de la concentración de NAA que aparece en la sustancia blanca normal de los pacientes con EM.

El tratamiento produciría una disminución del ambiente oxidativo y un incremento de la cantidad de ATP producido; ello puede reflejar tanto una restauración de la actividad mitocondrial como un aumento compensatorio en el número de mitocondrias. Los estudios histopatológicos han encontrado un mayor número de mitocondrias y una regulación al alza de la citocromo C oxidasa mitocondrial (complejo IV) en los axones tanto en lesiones crónicas como en la sustancia blanca aparentemente normal de los pacientes con EM (Mahad y cols., 2009; Witte y cols., 2009). Secundario a esta mejoría del daño energético y disminución del estrés oxidativo el SNC se podrían poner en marcha los mecanismos de remielinización.

Para tratar de evidenciar este fenómeno de remielinización se estudió la evolución de la colina.

Colina.

Considerando el total de pacientes tratados, no existen diferencias significativas en los niveles de la Cho a lo largo de su evolución, pero existe un grupo de pacientes (1/3) que no perderán o incluso incrementarán sus niveles.

Al estudiar la relación entre la evolución de este metabolito durante el tratamiento y la progresión durante estos años observamos al igual que en el caso del NAA que los pacientes que los que aumentan los niveles de Cho durante los dos primeros años de tratamiento progresarán menos o no progresarán en comparación con aquellos que lo pierden. También se vio que los pacientes que incrementan los niveles de Cho corresponde a los que el fármaco disminuyó más el ambiente oxidativo durante los primeros 12 meses de tratamiento.

Al estudiar la correlación entre la evolución del NAA y la Cho se vio que los pacientes que incrementaban el índice de NAA, es decir, disminuía el daño axonal coinciden con los pacientes que aumentan la Cho, índice de metabolismo celular de las membranas posiblemente por remielinización. Y es que desde el punto de vista bioquímico ambas vías metabólicas están íntimamente ligadas. El N-acetil aspartato es transportado desde los axones al citoplasma de los oligodendrocitos, donde la aspartoacilasa escinde el resto de acetato para su uso en ácidos grasos y la síntesis de esteroides. Los ácidos grasos y esteroides producidos a continuación, van a ser utilizados como bloques de construcción para la síntesis de lípidos de mielina (Moffett y cols., 2007). La reducción de la formación de NAA puede afectar la rotación de la membrana de mielina y conducir a la pérdida de la mielina. Por el contrario, su aumento estimularía la formación de mielina.

Mio Inositol (mI).

Al estudiar este metabolito, indicador preferente de gliosis cerebral, solo obtuvimos correlacion con la discapacidad si se utilizaba la variación del mI ocurrida en el segundo año. Esto no es raro si recordamos lo dicho anteriormente que el nivel de los metabolitos alcanzan su valor mínimo cuando el volumen lesional alcanza su máximo siendo esto secundario al edema en las lesiones y no al compromiso del metabolismo tisular y su incremento durante el segundo año sería la gliosis tisular.

Este mI se correlacionaba con las EDSS en los últimos estadios observados (EDSS 84 m, EDSS 108 m, EDSS 132 m y EDSS 144 m) aumentando su significación a medida que incrementamos el tiempo de observación (al contrario que en los anteriores que disminuía con el transcurso del tiempo), de tal manera que los pacientes que incrementen los niveles de inositol durante el segundo año de tratamiento son los que mas progresarán a largo plazo y mayores niveles de discapacidad alcanzarán.

Ya en anteriores trabajo se encontró que un aumento en el nivel de mioinositol en SBAN a los 3 meses del debut de un síndrome clínicamente aislado predecía un mal desempeño en las funciones ejecutivas 7 años más tarde (Summers y cols., 2008).

Sin embargo al estudiar la correlación entre la perdida de inositol durante el segundo año y la perdida de colina en los dos años de tratamiento se vio que los pacientes que perdían mas colina son los que mas inositol iban a ganar en el segundo año, es decir, los paciente que no logran poner en marcha los mecanismos

de remielinización comienzan posteriormente a partir del segundo año una continuada y progresiva gliosis que será la causante de la discapacidad a largo plazo y que no se va a relacionar con ningún marcador de oxidación.

El daño oxidativo como marcador subrogado de discapacidad.

Antes de estudiar la influencia de los agentes oxidantes en la respuesta al tratamiento hubo que averiguar si estos eran diferentes en la población con EM en relación a la población sana. Para ello estudiamos la producción de agentes oxidativos en monocitos de una cohorte de individuos sanos y en otra cohorte de pacientes con EM RR que rehusaron tratamiento con interferón beta, mostrando que la producción de radicales libres en los individuos sanos era inferior que en los pacientes con EM no tratados. (Lucas y cols., 1998).

Otros estudios han obtenido similares conclusiones. Se vio que en la EM, había un aumento de la producción agentes oxidantes, no sólo en las lesiones (Langemann et al, 1992), sino también en la sustancia blanca de apariencia normal (Graumann et al, 2003). Además se vio que el peroxinitrito estaba presente en las lesiones inflamatorias agudas, pero esta ausente en las lesiones crónicas no inflamatorias, sugiriendo que el peroxinitrito juega un papel importante en el daño axonal durante los ataques de EM inflamatorios agudos.

Para estudiar el efecto del tratamiento con interferón a la producción de radicales libres y al estado de oxido reducción de las proteínas séricas se estudió la concentración de equivalentes de reducción en una cohorte de individuos sanos y

en otra de pacientes con EM tratados con Interferón Beta, comprobándose que el tratamiento disminuía la concentración plasmática de sulfidrilo reducidos tras tres meses de tratamiento, sugiriendo también que la concentración de grupos sulfidrilo reducidos es un marcador bioquímico de la reducción de oxidación en la EM (Lucas y cols., 1999, Lucas y cols., 2003).

Lo siguiente ha sido estudiar el diferente comportamiento de los agentes oxidativos en los pacientes que han progresado a pesar del tratamiento y los que no han progresado o lo han hecho en menor medida. Se advirtió una correlación entre la pérdida de grupos sulfidrilo durante el primer trimestre de tratamiento y diferentes niveles de discapacidad **a corto plazo** (EDSS 24 m, 36 m, 48 m, 60 m, 72 m, 84 m y 96 m). A partir de ese punto la significación disminuye por lo que el índice de progresión no es significativo desde el punto de vista estadístico. Así mismo hay una tendencia entre la pérdida de sulfidrilo durante el primer año y el índice de progresión de estos 12 años.

Es decir, los niveles de oxidación inmediatos a la introducción de la medicación inmuno moduladora pueden jugar un papel importante en la discapacidad desarrollada durante los primeros años de enfermedad y con su monitorización se podría pronosticar la respuesta al tratamiento en lo que se refiere a esta discapacidad a corto plazo, es decir, la discapacidad ligada a la actividad inflamatoria (que es la que los tratamientos actuales parecen controlar) pero no es capaz de pronosticar la discapacidad a largo plazo, evidenciando un segundo mecanismo de progresión ligado a un proceso no inflamatorio que continúa de manera larvada a pesar del tratamiento administrado.

Otros estudio que han estudiado el daño oxidativo - energético apoya nuestras conclusiones. La Enolasa específica de las neuronas es una enzima crítica en la glucólisis, donde convierte el 2-fosfo-D glicerato en fosfoenolpiruvato. Los pacientes con esclerosis múltiple con una progresión clínicamente relevante de discapacidad a los 5 años de seguimiento tenían menores niveles de enolasa neurona específica en el plasma que los que permanecieron clínicamente estables (Koch et al, 2007b), apoyando la hipótesis de que la reducción de la actividad metabólica axonal puede preceder degeneración axonal y la progresión de la discapacidad en la EM. Así el aumento del consumo de ATP conduce a un aumento de las oxipurinas (ácido úrico, hipoxantina, y xantina) y de los nucleósidos de purina (inosina, adenosina, y guanosina), que son productos de degradación de ATP. Se han encontrado unas concentraciones séricas y en líquido cefalorraquídeo de estos productos superior en sujetos con EM en comparación con los controles (Amorini et al, 2009; Lazzarino et al, 2010). En un estudio se asociaron unos niveles iniciales más altos de metabolitos de ATP con una progresión más grave de la discapacidad y la atrofia cerebral 3 años más tarde, lo que sugiere que un aumento de la demanda de energía precede a la degeneración axonal en la EM.

Validez de la utilización del grupo no respondedor como modelo de progresión.

Para aclarar la validez de utilizar a los no respondedores como modelos para estudiar los mecanismos fisiopatológicos la Dra Sormani estudió la progresión de la discapacidad a los 2 años en los pacientes incluidos en el ensayo PRISMS; el

grupo placebo se comparó con el grupo tratado con IFN- β , que se dividió en respondedores y no respondedores según el Río Score Modificado (Sormani y cols., 2013, Freedman y cols., 2008). La curva de progresión de la discapacidad del grupo de los no respondedores se solapó sustancialmente con la curva de progresión en el grupo placebo, mientras que el grupo de pacientes que respondieron mostró una tasa sustancialmente menor de progresión de la discapacidad en los 2 años con una reducción en la tasa de progresión de alrededor de 52% de los respondedores frente a los no tratados – no respondedores.

Resumen clínico patológico.

La acumulación de la discapacidad en la EM es un proceso de dos etapas, que tiene una fase precoz de acumulación de discapacidad hasta un nivel de discapacidad moderada (EDSS 3,0-4,0), en el que la secuela tras un brote podría participar del grado de discapacidad y una fase tardía más allá de este punto de referencia en el que la velocidad de progresión podría ser independiente de la presencia de brotes superimpuestas.

Los estudios de anatomía patológica sugieren que en la fase precoz de la EMRR los fenómenos mas destacados son la desmielinización focal y la inflamación, mientras que en la EMPP y en el curso más tardío de la enfermedad domina la degeneración axonal difusa siendo este el principal proceso que provoca el lento e irreversible empeoramiento de los síntomas.

Uno de los elementos que juega un papel en las fases precoces como causante del acúmulo de la discapacidad son los agentes oxidantes, que en estos pacientes están aumentados (incremento de los grupos sulfidrilos) y que llevarían a un daño energético al alterar el funcionamiento de la mitocondria con el daño neuronal posterior y la disminución de NAA mitocondrial (disminución coeficiente NAA : Cr). Este daño energético produciría un acúmulo de mitocondrias reactivas que al fallar el transporte axonal se acumularían incrementando el daño axonal. Secundariamente la falta de energía alteraría los mecanismos de remielinización (disminución Cho : Cr). Posteriormente se pondrían en marcha la gliosis por parte de los astrocitos, independiente del ambiente oxidativo, que produciría un daño difuso el cual de manera más tardía sería la causa del empeoramiento progresivo de la enfermedad.

Los pacientes que responden al tratamiento en las primeras etapas de la enfermedad disminuirán el estrés oxidativo con lo que dará tiempo a disminuir tanto el daño energético como el daño axonal y con la energía excedente se pondrán en marcha la remielinización y se evitará la gliosis tardía. El fracaso de los tratamientos en la fase progresiva sería por el papel menos importante de la inflamación sino el más preminente del daño difuso y por otra parte, se cree que la inflamación difusa en las formas progresivas ocurre detrás de una barrera hematoencefálica intacta, impidiendo de este modo que muchos fármacos alcancen su sitio de acción.

Validación de las recomendaciones de Optimización del Tratamiento de la CMSWG.

Con nuestros datos del segundo estudio, hemos demostrado que las ROT, usando solo información clínica, son capaces de identificar que pacientes tendrán actividad clínica en lo que se refiere a la tasa de brotes o al incremento de la discapacidad medida por la EDSS con una alta sensibilidad y especificidad. Sorprendentemente encontramos más efecto en lo que se refiere a discapacidad que en la tasa de brotes en la que no encontramos diferencias entre ambos grupos hasta el 5º año de tratamiento.

Este método al contrario que el de Rio y cols., que cuantifica la respuesta lo que hace es clasificar a los pacientes en tres grupos uno de los cuales precisará cambiar el tratamiento por tener una respuesta subóptima. Creemos que ambos métodos son útiles y no son excluyentes.

En general siempre que se tenga una definición homogénea y se utilicen de la misma manera en los distintos casos, los componentes de un sistema de puntuación no tiene por qué limitarse a las marcas "clásicas" y pueden ser perfectamente válidos.

Así por ejemplo en un estudio de 2 años, la combinación de la actividad en resonancia magnética y positividad para anticuerpos neutralizantes anti-IFN- β (NAbs), durante los primeros 6 meses de terapia con IFN- β se correlacionaron con la probabilidad de ser no respondedores mejor que lo que lo harían los dos componentes solos y mostró una buena sensibilidad en la identificación de pacientes con brotes o progresión de la discapacidad en la 2 años posteriores.

(Durelli y cols., 2008) Además, en otro estudio, los pacientes con síndrome neurológico aislados muestran que una puntuación basada en marcadores cuantitativos de RM (volumen lesional inicial en T2 y los cambios en la área del cuerpo calloso en los primeros 6 meses de tratamiento con IFN- β) podría identificar a los pacientes con alto riesgo de conversión clínica en los 2 años siguientes (Kalincik y cols., 2012).

Estos estudios sugieren que los nuevos marcadores tendrán el potencial de mejorar la predicción de la respuesta a IFN- β cuando se añada a los criterios convencionales, y requerirá validación en futuros estudios prospectivos.

Utilidad de los métodos de cuantificación.

En la práctica clínica diaria, los médicos deben decidir sobre cual es el mejor enfoque terapéutico para un paciente determinado. La principal utilidad de los sistemas de puntuación es que proporcionan reglas de decisión basadas en la evidencia que integran los diferentes parámetros de actividad de la enfermedad, a pesar de que cualquier sistema de puntuación desempeña un papel subóptimo cuando son tomados como clasificadores.

Nosotros hemos desarrollado una herramienta informática que nos ayudará a monitorizar la respuesta a los TME de manera automática, intuitiva, objetiva y sencilla.

Resumen de la validación del método de respuesta terapéutica.

La búsqueda de biomarcadores nuevos y relevantes deberá ir acompañada de la búsqueda de una definición estandarizada y validada de la respuesta al tratamiento en pacientes con EM. Sin un método de clasificación estandarizado los estudios dirigidos a determinar la base mecánica subyacente de la respuesta al tratamiento, por ejemplo farmacogenética o estudios de genómica en los que la respuesta al tratamiento es la variable dependiente, no pueden ser eficaces.

Utilidad de los Estudios Farmaco genómico.

En este estudio hemos demostrado que se pueden determinar marcadores de respuesta terapéutica para el interferón beta en EM. Este análisis nos sugiere un grupo de marcadores que podrían estar relacionados con la respuesta al tratamiento con interferón beta en pacientes con esclerosis múltiple.

Los estudios GWAS son una realidad que por una parte nos pueden dar pistas valiosas y por otra no ayuda a confirmar datos referente a la fisiopatología de la enfermedad. Así un estudio de asociación de genoma completo publicado recientemente muestra que los polimorfismos de genes inmunológicamente relevantes se asocian con EM mas que los genes que puedan intervenir en la neurodegeneración. Hay un importante enriquecimiento de genes vinculados a la función de los linfocitos, en particular los genes con un papel en la activación de células T y la proliferación, vías de las citoquinas, moléculas co-estimuladoras, y transducción de señales. Esto le da peso de nuevo a la idea de que la inflamación podría ser un factor relevante para la neurodegeneración en la EM y no una cierta

disposición del propio compartimento neuronal. Otro análisis de asociación de todo el genoma reciente en pacientes con MS encontró una asociación significativa entre los genes con alta relevancia en la biología del glutamato y los niveles de glutamato en el cerebro y el grado de neurodegeneración más de 1 año de seguimiento (Baranzini et al, 2010).

Debemos tener en cuenta que la identificación de vías metabólicas asociadas con las enfermedades autoinmunes afectará a nuestras decisiones sobre el tratamiento para la EM como enfermedad, siendo finalmente posible predecir la respuesta al fármaco basado en variantes genéticas con nuestra creciente conocimiento de las variantes alélicas individuales. El futuro neurologo será capaz de utilizar esta información para personalizar el plan de tratamiento para el paciente y elegir el tratamiento inmunomodulador más apropiada para minimizar los brotes y retrasar la progresión precoz en el curso de la enfermedad.

A pesar de que los datos farmacogenómicos son una promesa para el futuro manejo de los pacientes con EM, no se podrán utilizar en la práctica clínica diaria hasta que los marcadores hayan sido validados en grandes cohortes de pacientes respondedores y no respondedores con un seguimiento adecuado. El éxito dependerá, pues, de colaboraciones y consorcios internacionales, así como de la automatización de los sistemas de robótica para reducir la variabilidad entre sistemas, y los estudios interdisciplinarios creando mapas genotipo-fenotipo para entender mejor patogenia, pronóstico y posibles abordajes terapéuticos de la EM.

DIRECCIONES FUTURAS

La llegada de un gran número de nuevas terapias para la EM precisará del desarrollo de nuevas herramientas para seleccionar el mejor tratamiento para cada paciente y para identificar los factores que puedan predecir si el paciente va a responder a la terapia seleccionada. Estas herramientas permitirán decisiones precoces, basadas en la evidencia e individualizadas. Se requiere, pues, de un enfoque integrado en el que los biomarcadores clínicos y paraclínicos se combinen para cuantificar con precisión el riesgo individual y las estrategias de tratamiento específicas para cada paciente. En el futuro, este enfoque deberá incorporar nuevos biomarcadores de imagen y de laboratorio que hayan demostrado su potencial como predictores de respuesta al tratamiento, mejorando la discriminación entre los pacientes que responden bien y los que no responden al tratamiento elegido. Entre los ejemplos de posibles nuevos biomarcadores se incluyen técnicas de resonancia magnética avanzadas utilizando nuevos agentes de contraste y máquinas de alta intensidad de campo, que podrían ser útiles en la caracterización y cuantificación de las características heterogéneas de la enfermedad. Otro desafío importante que debe abordarse en un futuro próximo es la interpretación de la asociación entre los genes de respuesta identificadas y la respuesta clínica al IFN- β .

IX. Conclusiones.

1. Desde los primeros estadios de la enfermedad, los ratios NAA: Cr en SBAN determinados por ERM fueron menores en los pacientes con EM, es decir, el daño axonal es un fenómeno precoz.
2. La discapacidad de los pacientes (medida por la EDSS) se correlaciona con los niveles de NAA, un marcador de la pérdida axonal.
3. No hay correlación entre la discapacidad, cuando se utiliza el MSFC, y el NAA.
4. El hecho de que los brotes pudieran ser buenos marcadores subrogados de la discapacidad clínica en EM sugiere que los pacientes con EM tienen probabilidades de obtener beneficio usando IFN- β en lo que se refiere a la progresión de la discapacidad y apoya el uso de los cambios en estos marcadores como predictores de la evolución clínica durante los años siguientes.
5. El IFN beta 1 a IM no disminuyó el daño axonal en pacientes con EMRR. El ratio NAA / Cr en SBAN ha seguido disminuyendo durante el período de observación
6. Existe un grupo de pacientes que podríamos considerar buenos respondedores ya que, aunque globalmente los pacientes pierden NAA, el 30% no lo pierden o incluso lo recuperan. Este porcentaje es similar al que se comenta en estudios clínicos respecto a la respuesta del interferón.
7. Los niveles de oxidorreducción inmediatos a la introducción de la medicación inmuno moduladora pueden jugar un papel importante en la discapacidad

desarrollada durante los primeros años de enfermedad y con su monitorización se podría pronosticar la respuesta al tratamiento

8. Los paciente que responden al tratamiento en las primeras etapas de la enfermedad disminuirán el estrés oxidativo con lo que dará tiempo a disminuir tanto el daño energético como el daño axonal y con la energía exedente se pondrían en marcha la remielinización y se evitaría la gliosis tardía. El fracaso de los tratamientos en la fase progresiva sería por el papel menos importante de la inflamación sino el mas preminente del daño difuso

9. Nuestros datos muestran que ROT, utilizando sólo la información clínica, son capaces de predecir si los pacientes tendran un alto nivel de actividad tanto por la tasa de brotes como en aumento de la discapacidad medida por la EDSS, con una alta sensibilidad y especificidad. Es decir, las ROT son una buena herramienta para el seguimiento de la respuesta a la DMD en pacientes con EM.

10. El programa desarrollado por nosotros es intuitivo, no requiere mucho tiempo y puede ayudar a los neurólogos a evaluar a los pacientes de manera objetiva y fácilmente.

11. Este estudio nos sugiere un grupo de marcadores que podrían estar relacionados con la respuesta al tratamiento con interferón beta en pacientes con esclerosis múltiple.

X. Bibliografía.

Aboul-Enein F, Krssak M, Hoftberger R, Prayer D, Kristoferitsch W (2010) Reduced NAA-levels in the NAWM of patients with MS is a feature of progression. A study with quantitative magnetic resonance spectroscopy at 3 Tesla. PLoS One 5:e11625

Adalsteinsson E, Langer-Gould A, Homer RJ, et al. Gray matter N-acetyl aspartate deficits in secondary progressive but not relapsing-remitting multiple sclerosis. AJNR Am J Neuroradiol Nov- Dec;2003 24(10):1941-1945

Adams HP, Wagner S, Sobel DF, et al. Hypointense and hyperintense lesions on magnetic resonance imaging in secondary-progressive MS patients. Eur Neurol Jul;1999 42(1):52-63.

Aksenov M, Aksenova M, Butterfield DA, Markesbery WR (2000) Oxidative modification of creatine kinase BB in Alzheimer's disease brain. J Neurochem 74:2520-7

Aksenova MV, Aksenov MY, Payne RM, Trojanowski JQ, Schmidt ML, Carney JM, Butterfield DA, Markesbery WR (1999) Oxidation of cytosolic proteins and expression of creatine kinase BB in frontal lobe in different neurodegenerative disorders. Dement Geriatr Cogn Disord 10:158-65

Albert M, Antel J, Bruck W, Stadelmann C. Extensive cortical remyelination in patients with chronic multiple sclerosis. Brain Pathol. 2007; 17:129-38.

Alix JJ, Domingues AM (2011) White matter synapses: form, function, and dysfunction. *Neurology* 76:397–404

Altshuler D, Daly M, Kruglyak L., Guilt by association, *Nat Genet.* 2000 Oct;26(2):135-7

Allen, I. V., McQuaid, S. , Miradkhur, M. & Nevin, G. Pathological abnormalities in the normal-appearing white matter in multiple sclerosis. *Neurol. Sci.* 22, 141–144 (2001).

Allen IV, McKeown SR. A histological, histochemical and biochemical study of the macroscopically normal white matter in multiple sclerosis. *J Neurol Sci* 1979; 41: 81–91.

Allen IV, Glover G, Anderson R. Abnormalities in the macroscopically normal white matter in cases of mild or spinal multiple sclerosis (MS). *Acta Neuropathol Suppl (Berl)* 1981; 7: 176–8.

Amato MP, Ponziani G. A prospective study on the prognosis of multiple sclerosis. *Neurol Sci* 2000;21:S831-838

Amorini AM, Petzold A, Tavazzi B, Eikelenboom J, Keir G, Belli A, Giovannoni G, Di Pietro V, Polman C, D’Urso S, Vagnozzi R, Uitdehaag B, Lazzarino G (2009) Increase of uric acid and purine compounds in biological fluids of multiple sclerosis patients. *Clin Biochem* 42:1001–6

Anderson CM, Swanson RA (2000) Astrocyte glutamate transport: review of properties, regulation, and physiological functions. *Glia* 32:1–14

Anderson, J. M. et al. Abnormally phosphorylated tau is associated with neuronal and axonal loss in experimental autoimmune encephalomyelitis and multiple sclerosis. *Brain* 131, 1736–1748 (2008).

Androdias G, Reynolds R, Chanal M, Rittleng C, Confavreux C, Nataf S. Meningeal T cells associate with diffuse axonal loss in multiple sclerosis spinal cords. *Ann Neurol*. 2010;68(4):465–476.

Arnold DL. Magnetic resonance spectroscopy: imaging axonal damage in MS. *J Neuroimmunol* 1999; 98: 2–6.

Arnold DL, De Stefano N, Narayanan S, Matthews PM. Proton MR spectroscopy in multiple sclerosis. *Neuroimaging Clin N Am* Nov;2000 10(4):789–798. ix–x.

Axtell, R. C. et al. T helper type 1 and 17 cells determine efficacy of interferon- β in multiple sclerosis and experimental encephalomyelitis. *Nat. Med.* 16, 406–412 (2010).

Babbe H, Roers A, Waisman A et al. Clonal expansions of CD8(+) T cells dominate the T cell infiltrate in active multiple sclerosis lesions as shown by micromanipulation and single cell polymerase chain reaction. *J. Exp. Med.* 192(3),

393–404 (2000).

Bagnato, F. et al. Tracking iron in multiple sclerosis: a combined imaging and histopathological study at 7 Tesla. *Brain* 134, 3602–3615 (2011).

Bakshi R, Dmochowski J, Shaikh ZA, Jacobs L. Gray matter T2 hypointensity is related to plaques and atrophy in the brains of multiple sclerosis patients. *J Neurol Sci* 2001; 185:19-26

Barakat Shrem O, Fernández Pérez MJ, Benavente Fernández A, García Moreno JM, Ruiz Peña JL, Fajardo Galvez J, Izquierdo G. The use of magnetic resonance imaging in the study of asymptomatic familial multiple sclerosis patients]. *Rev Neurol*. 2003 37(9):811-4

Baranzini SE, Nickles D. Genetics of multiple sclerosis: swimming in an ocean of data. *Curr Opin Neurol*. 2012 Jun;25(3):239-45.

Baranzini SE, Srinivasan R, Khankhanian P, Okuda DT, Nelson SJ, Matthews PM, Hauser SL, Oksenberg JR, Pelletier D (2010) Genetic variation influences glutamate concentrations in brains of patients with multiple sclerosis. *Brain* 133:2603–11

Baranzini, S. E. et al. Transcription-based prediction of response to IFN using supervised computational methods. *PloS Biol*. 3, e2 (2005).

Barkhof F, van Walderveen M. Characterization of tissue damage in multiple

sclerosis by nuclear magnetic resonance. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 1999;354:1675-1686

Barkhof, F. et al. Strategies for optimizing MRI techniques aimed at monitoring disease activity in multiple sclerosis treatment trials. *J. Neurol.* 244, 76–84 (1997).

Barnett, M. H. & Prineas, J. W. Relapsing and remitting multiple sclerosis: pathology of the newly forming lesion. *Ann. Neurol.* 55, 458–468 (2004).

Bates TE, Strangward M, Keelan J, Davey GP, Munro PM, Clark JB (1996) Inhibition of N-acetylaspartate production: implications for 1H MRS studies in vivo. *Neuroreport* 7:1397–400

Bechtold, D. A. et al. Axonal protection achieved in a model of multiple sclerosis using lamotrigine. *J. Neurol.* 253, 1542–1551 (2006).

Becker, KG, The common variants/multiple disease hypothesis of common complex genetic disorders. *Med Hypotheses.* 2004; V. 62 (2): pp. 309-17.

Bendfeldt K, Blumhagen JO, Egger H, et al. Spatiotemporal distribution pattern of white matter lesion volumes and their association with regional grey matter volume reductions in relapsing-remitting multiple sclerosis. *Hum Brain Mapp* 2010;31:1542–55.

Benedetti B, Rovaris M, Rocca MA, Caputo D, Zaffaroni M, Capra R, Bertolotto A,

Martinelli V, Comi G, Filippi M (2009) In-vivo evidence for stable neuroaxonal damage in the brain of patients with benign multiple sclerosis. *Mult Scler* 15:789–94

Benito-Leon J, Martin E, Vela L, Villar ME, Felgueroso B, Marrero C, Guerrero A, Ruiz-Galiana J. Multiple sclerosis in Mostoles, central Spain. *Acta Neurol Scand* 1998; 98: 238-42

Bermel, R. et al. Predictors of long-term outcome in multiple sclerosis patients treated with interferon β . *Ann. Neurol.* 73, 95–103 (2013).

Bielekova B, Richert N, Howard T, Blevins G, Markovic-Plese S, McCartin J, Frank JA, Wurfel J, Ohayon J, Waldmann TA, McFarland HF, Martin R. Humanized anti-CD25 (daclizumab) inhibits disease activity in multiple sclerosis patients failing to respond to interferon beta. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2004;101:8705-8708

Biernacki K, Antel JP, Blain M, Narayanan S, Arnold DL, Prat A. Interferon beta promotes nerve growth factor secretion early in the course of multiple sclerosis. *Arch Neurol* 2005; 62: 563-568

Bitsch A, Schuchardt J, Bunkowski S, Kuhlmann T, Bruck W. Acute axonal injury in multiple sclerosis. Correlation with demyelination and inflammation. *Brain* 2000; 123:1174-1183

Bitsch A, Bruhn H, Vougioukas V, et al. Inflammatory CNS demyelination:

histopathologic correlation with in vivo quantitative proton MR spectroscopy. AJNR Am J Neuroradiol Oct;1999 20(9):1619– 1627.

Bjartmar, C., Wujek, J. R. & Trapp, B. D. Axonal loss in the pathology of MS: consequences for understanding the progressive phase of the disease. J. Neurol. Sci. 206, 165–171 (2003).

Bjartmar 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: 1248–52.

Black, J. A. , Liu, S. , Hains, B. C. , Saab, C. Y. & Waxman, S. G. Long- term protection of central axons with phenytoin in monophasic and chronic-relapsing EAE Brain 129, 3147–3149 (2006).

Bo, L., Vedeler, C. A., Nyland, H., Trapp, B. D. & Mork, S. J. Intracortical multiple sclerosis lesions are not associated with increased lymphocyte infiltration. Mult. Scler. 9, 323–331 (2003).

Bo L, Vedeler CA, Nyland HI, Trapp BD, Mork SJ. Subpial demyelination in the cerebral cortex of multiple sclerosis patients. J Neuropathol Exp Neurol 2003; 62: 723–32.

Bogdan C. Nitric oxide and the immune response. Nature Immunology 2001;2:907–916.

Bourdette, D. & Gildea, D. Fingolimod and multiple sclerosis: four cautionary tales. *Neurology* 79, 1942–1943 (2012).

Brand-Schieber E, Werner P. Calcium channel blockers ameliorate disease in a mouse model of multiple sclerosis. *Exp Neurol* 2004;189:5-9

Brand A, Richter-Landsberg C, Leibfritz D. Multinuclear NMR studies on the energy metabolism of glial and neuronal cells. *Dev Neurosci* 1993; 15 (35): 289–298.

Brex PA, Ciccarelli O, O'Riordan JI, Sailer M, Thompson AJ, Miller DH. A longitudinal study of abnormalities on MRI and disability from multiple sclerosis. *N Engl J Med* 2002; 346:158-164

Broholm H, Andersen B, Wanscher B, Frederiksen JL, Rubin I, Pakkenberg B, Larsson HB, Lauritzen M (2004) Nitric oxide synthase expression and enzymatic activity in multiple sclerosis. *Acta Neurol Scand* 109:261–9

Brosnan JT, Brosnan ME (2007) Creatine: endogenous metabolite, dietary, and therapeutic supplement. *Annu Rev Nutr* 27:241–61

Brown GC, Borutaite V. Nitric oxide, mitochondria, and cell death. *IUBMB Life* 2001;52:189–195.

Bufill E, Blesa R, Galan I, Dean G. Prevalence of multiple sclerosis in the region of Osona, Catalonia, northern Spain. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 1995;58:577-581

Bush WS, McCauley JL, DeJager PL, Dudek SM, Hafler DA, Gibson RA, Matthews PM, Kappos L, Naegelin Y, Polman CH, Hauser SL, Oksenberg J, Haines JL, Ritchie MD; International Multiple Sclerosis Genetics Consortium. A knowledge-driven interaction analysis reveals potential neurodegenerative mechanism of multiple sclerosis susceptibility. *Genes Immun.* 2011 Jul; 12(5): 335-40.

Byun, E. et al. Genome-wide pharmacogenomic analysis of the response to interferon- β therapy in multiple sclerosis. *Arch. Neurol.* 65, 337–344 (2008).

Cadavid, D. et al. Clinical consequences of MRI activity in treated multiple sclerosis. *Mult. Scler.* 17, 1113–1121 (2011).

Campbell, G. R. et al. Mitochondrial DNA deletions and neurodegeneration in multiple sclerosis. *Ann. Neurol.* 69, 481–492 (2011).

Caramanos Z, Santos AC, Arnold DL. Magnetic resonance imaging and spectroscopy: insights into the pathology and pathophysiology of multiple sclerosis. In: McDonald WI and Noseworthy JH, editors. *Multiple sclerosis 2*, Vol. 27, 2nd ed. Blue Books of Practical Neurology Series. USA: Butterworth-Heinemann; 2003. p. 139–67.

Carton H, Vlietinck R, Debruyne J, De Keyser J, D'Hooghe MB, Loos R, Medaer R, Truyen L, Yee IM, Sadovnick AD. Risks of multiple sclerosis in relatives of patients in Flanders, Belgium. *J Neurol Neurosurg Psychiatry.* 1997 Apr;62(4):329-33.

Casado V, Martinez-Yelamos S, Martinez-Yelamos A, Carmona O, Alonso L, Romero L, Moral E, Gubieras L, Arbizu T. Direct and indirect costs of Multiple Sclerosis in Baix Llobregat (Catalonia, Spain), according to disability. *BMC Health Serv Res* 2006 1;6:143

Casanova B, Martínez-Bisbal MC, Valero C, Martí-Bonmatí L, Pascual A, Landete L, Coret F. Evidence of wallerian degeneration in normal appearing white matter in the early stages of relapsing-remitting multiple sclerosis. *J Neurol* 2003; 250:22-28

Casquero P, Villoslada P, Montalban X, Torrent M. Frequency of multiple sclerosis in Menorca, Balearic islands, Spain. *Neuroepidemiology* 2001;20:129-133

Chang, A. , Tourtelotte, W. W. , Rudick, R. A. & Trapp, B. D. Premyelinating oligodendrocytes in chronic lesions of multiple sclerosis. *N. Engl. J. Med.* 346, 165–200 (2002).

Chard DT, Griffin CM, McLean MA, Kapeller P, Kapoor R, Thompson AJ, Miller DH. Brain metabolite changes in cortical grey and normal-appearing white matter in clinically early relapsing-remitting multiple sclerosis. *Brain* 2002; 125: 2342-2352

Cénit, M. D. et al. Glypican 5 is an interferon- β response gene: a replication study. *Mult. Scler.* 15, 913–917 (2009).

Ciccarelli O, Altmann DR, McLean MA, Wheeler-Kingshott CA, Wimpsey K, Miller DH,

Thompson AJ (2010a) Spinal cord repair in MS: does mitochondrial metabolism play a role? *Neurology* 74:721–7

Ciccarelli O, Toosy AT, De Stefano N, Wheeler-Kingshott CA, Miller DH, Thompson AJ (2010b) Assessing neuronal metabolism in vivo by modeling imaging measures. *J Neurosci* 30:15030–3

Cifelli, A. et al. Thalamic neurodegeneration in multiple sclerosis. *Ann. Neurol.* 52, 650–653 (2002).

Cletter MW, Cooper JM, Darley-Usmar VM, et al. Reversible inhibition of cytochrome c oxidase, the terminal enzyme of the mitochondrial respiratory chain, by nitric oxide. Implications for neurodegenerative diseases. *FEBS Lett* 1994;345:50–54.

Cohen, J. A. et al. Oral fingolimod or intramuscular interferon for relapsing multiple sclerosis. *N. Engl. J. Med.* 362, 402–415 (2010).

Comabella, M. et al. A type I interferon signature in monocytes is associated with poor response to interferon- β in multiple sclerosis. *Brain* 132, 3353–3365 (2009)

Comabella, M. et al. Genome-wide scan of 500,000 single-nucleotide polymorphisms among responders and nonresponders to interferon- β therapy in multiple sclerosis. *Arch. Neurol.* 66, 972–978 (2009).

Comabella, M. et al. HLA class I and II alleles and response to treatment with interferon in relapsing–remitting multiple sclerosis. *J. Neuroimmunol.* 210, 116–119 (2009).

Comabella, M. & Martin, R. Genomics in multiple sclerosis—current state and future directions. *J. Neuroimmunol.* 187, 1–8 (2007).

Coman, I. et al. Nodal, paranodal and juxtapanodal axonal proteins during demyelination and remyelination in multiple sclerosis. *Brain* 129, 3186–3195 (2006).

Compston A, Coles A. Multiple sclerosis. *Lancet.* 2002, 359: 1221-31.

Confavreux C, Vukusic S. Natural history of multiple sclerosis: a unifying concept. *Brain* 2006; 129:606-616

Confavreux, C. & Vukusic, S. Age at disability milestones in multiple sclerosis. *Brain* 129, 595–605 (2006).

Confavreux, C., Vukusic, S. & Adeleine, P. Early clinical predictors and progression of irreversible disability in multiple sclerosis: an amnesic process. *Brain* 126, 770–782 (2003).

Confavreux C, Vukusic S, Moreau T, Adeleine P. Relapses and progression of disability in multiple sclerosis. *N Engl J Med* 2000;343:1430-1438

Craelius, W. , Migdal, M. W. , Luessenhop, P. , Sugar, A. & Mihalakis, I. Iron deposits surrounding multiple sclerosis plaques. *Arch. Pathol. Lab. Med.* 106, 397–399 (1982).

Craner M, Newcombe J, Black JA, et al. Molecular changes in neurons in multiple sclerosis: Altered axonal expression of Nav1.2 and Nav1.6 sodium channels and Na⁺/Ca²⁺ exchanger. *Proc Natl Acad Sci USA* 2004;101:8168–8173.

Cronin S, Blauw HM, Veldink JH, van Es MA, Ophoff RA, Bradley DG, van den Berg LH, Hardiman O. Analysis of genome-wide copy number variation in Irish and Dutch ALS populations. *Hum Mol Genet.* 2008 Nov 1;17(21):3392-8.

Cross A, Manning PT, Keeling RM, et al. Peroxynitrite formation within the central nervous system in active multiple sclerosis. *J of Neuroimmunology* 1998;88:45–56.

Cucurella MG, Rovira A, Grive E, Tintore M, Montalban X, Alonso J. Serial proton spectroscopy, magnetization transfer ratio and T₂ relaxation in pseudotumoral demyelinating lesions. *NMR Biomed* 2002;15:284-292

Cunnea, P. et al. Expression profiles of endoplasmic reticulum stress- related molecules in demyelinating lesions and multiple sclerosis. *Mult. Scler.* 17, 808–818 (2011)

Cunningham, S. et al. Pharmacogenomics of responsiveness to interferon IFN- β

treatment in multiple sclerosis: a genetic screen of 100 type I interferon-inducible genes. *Clin. Pharmacol. Ther.* 78, 635–646 (2005).

Czeh, M. , Gressens, P. & Kaindl, A. M. The yin and yang of microglia. *Dev. Neurosci.* 33, 199–201 (2011).

Danbolt NC (2001) Glutamate uptake. *Prog Neurobiol* 65: 1–105

Davie CA, Barker GJ, Thompson AJ, Tofts PS, McDonald WI, Miller DH. 1H magnetic resonance spectroscopy of chronic cerebral white matter lesions and normal appearing white matter in multiple sclerosis. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 1997; 63:736-742

Davie CA, Hawkins CP, Barker GJ, et al. Serial proton magnetic resonance spectroscopy in acute multiple sclerosis lesions. *Brain* Feb;1994 117(Pt 1):49–58.

De Castro F, Moron FJ, Montoro L, Galan JJ, Hernandez DP, Padilla ES, Ramirez-Lorca R, Real LM, Ruiz A. Human controlled ovarian hyperstimulation outcome is a polygenic trait. *Pharmacogenetics.* 2004 May;14(5):285-93.

De Groot, C. J. et al. Post-mortem MRI-guided sampling of multiple sclerosis brain lesions: increased yield of active demyelinating and (p)reactive lesions. *Brain* 124, 1635–1645 (2001).

De Stefano N, Matthews PM, Antel JP, Preul M, Francis G, Arnold DL. Chemical

pathology of acute demyelinating lesions and its correlation with disability Ann Neurol 1995;38:901-909

De Stefano N, Matthews PM, Fu L, Narayanan S, Stanley J, Francis GS, Antel JP, Arnold DL (1998) Axonal damage correlates with disability in patients with relapsing- remitting multiple sclerosis. Results of a longitudinal magnetic resonance spectroscopy study. Brain 121 (Part 8):1469-77

De Stefano N, Narayanan S, Francis GS, Arnaoutelis R, Tartaglia MC, Antel JP, Matthews PM, Arnold DL (2001) Evidence of axonal damage in the early stages of multiple sclerosis and its relevance to disability. Arch Neurol 58:65-70

De Stefano N, Narayanan S, Francis SJ, Smith S, MortillaM, Tartaglia MC, Bartolozzi ML, Guidi L, Federico A, Arnold DL (2002) Diffuse axonal and tissue injury in patients with multiple sclerosis with low cerebral lesion load and no disability. Arch Neurol 59:1565-71

Dean G, Elian M, de Bono AG, Asciak RP, Vella N, Mifsud V, Aquilina J. Multiple sclerosis in Malta in 1999: an update. J Neurol Neurosurg Psychiatry 2002;73:256-260

Dehmeshki J, Chard DT, Leary SM, Watt HC, Silver NC, Tofts PS, Thompson AJ, Miller DH. The normal appearing grey matter in primary progressive multiple sclerosis: a magnetisation transfer imaging study. J Neurol 2003;250:67-74

Domercq M, Etxebarria E, Perez-Samartin A, Matute C (2005) Excitotoxic oligodendrocyte death and axonal damage induced by glutamate transporter inhibition. *Glia* 52:36–46

Domercq M, Matute C (1999) Expression of glutamate transporters in the adult bovine corpus callosum. *Brain Res Mol Brain Res* 67:296–302

Duncan, I. D. , Brower, A. , Kondo, Y. , Curlee, J. F. Jr & Schultz, R. D. Extensive remyelination of the CNS leads to functional recovery. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 106, 6832–6836 (2009).

Durelli, L. et al. Every-other-day interferon 1b versus once-weekly interferon 1a for multiple sclerosis: Results of a 2-year prospective randomised multicentre study (INCOMIN). *Lancet* 359, 1453–1460 (2002).

Durelli, L. et al. MRI activity and neutralizing antibody as predictors of response to interferon β treatment in multiple sclerosis. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry* 79, 646–651 (2008).

Dutta, R. et al. Mitochondrial dysfunction as a cause of axonal degeneration in multiple sclerosis patients. *Ann. Neurol.* 59, 478– 489 (2006).

Ebers GC. Genetics and multiple sclerosis: an overview. *Ann Neurol.* 1994;36 Suppl:S12-4.

Ebers GC. Prognostic factors for multiple sclerosis: the importance of natural history studies. *J Neurol* 2005;252:S15-20

Edan G, Miller D, Clanet M, Confavreux C, Lyon-Caen O, Lubetzki C, Brochet B, Berry I, Rolland Y, Froment JC, Cabanis E, Iba-Zizen MT, Gandon JM, Lai HM, Moseley I, Sabouraud O. Therapeutic effect of mitoxantrone combined with methylprednisolone in multiple sclerosis: a randomised multicentre study of active disease using MRI and clinical criteria. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 1997;62:112-118

Encinas JM, Manganas L, Enikolopov G. Nitric oxide and multiple sclerosis. *Curr Neurol Neurosci Rep* 2005;5:232-238

Endres M. Statins: Potential new indications in inflammatory conditions. *Atheroscler Suppl* 2006;7:31-35

Evangelou N, Konz D, Esiri MM, Smith S, Palace J, Matthews PM. Size-selective neuronal changes in the anterior optic pathways suggest a differential susceptibility to injury in multiple sclerosis. *Brain* 2001; 124: 1813–20.

Evangelou, N. , DeLuca, G. C. , Owens, T. & Esiri, M. M. Pathological study of spinal cord atrophy in multiple sclerosis suggests limited role of local lesions. *Brain* 128, 29–34 (2005).

Evangelou N, Esiri MM, Smith S, Palace J, Matthews PM. Quantitative pathological

evidence for axonal loss in normal appearing white matter in multiple sclerosis. *Ann Neurol* 2000a; 47: 391–5.

Evangelou N, Konz D, Esiri MM, Smith S, Palace J, Matthews PM. Regional axonal loss in the corpus callosum correlates with cerebral white matter lesion volume and distribution in multiple sclerosis. *Brain* 2000b; 123 (Pt 9): 1845-9.

Fernández, O. et al. HLA class II and response to interferon in multiple sclerosis. *Acta Neurol. Scand.* 112, 391–394 (2005).

Fernandez O, Luque G, San Roman C, Bravo M, Dean G. The prevalence of multiple sclerosis in the Sanitary District of Velez-Malaga, southern Spain. *Neurology* 1994;44:425-429

Filippi M, Horsfield MA, Ader HJ, Barkhof F, Bruzzi P, Evans A, Frank JA, Grossman RI, McFarland HF, Molyneux P, Paty DW, Simon J, Tofts PS, Wolinsky JS, Miller DH. Guidelines for using quantitative measures of brain magnetic resonance imaging abnormalities in monitoring the treatment of multiple sclerosis. *Ann Neurol* 1998;43:499-506

Filippi M, Tortorella C, Bozzali M. Normal-appearing white matter changes in multiple sclerosis: the contribution of magnetic resonance techniques. *Mult Scler* 1999; 5: 273–82.

Filippi, M. & Agosta, F. Imaging biomarkers in multiple sclerosis. *J. Magn. Reson.*

Imaging 31, 770–788 (2010).

Filippi M, Rocca MA, Rovaris M. Clinical trials and clinical practice in multiple sclerosis: conventional and emerging magnetic resonance imaging technologies. *Curr Neurol Neurosci Rep* 2002;2:267-276

Fisher E, Lee JC, Nakamura K, Rudick RA. Gray matter atrophy in multiple sclerosis: a longitudinal study. *Ann Neurol* 2008;64:255– 65.

Fisniku LK, Chard DT, Jackson JS, et al. Gray matter atrophy is related to long-term disability in multiple sclerosis. *Ann Neurol* 2008;64:247–54.

Frahm, J.; Hanefeld, F. Localized proton magnetic resonance spectroscopy of brain disorders in childhood. In: Bachelard, HS., editor. *Advances in Neurochemistry*. 18. New York: Plenum; 1997. p. 329-402.

Frank JA, Richert N, Bash C, et al. Interferon-beta-1b slows progression of atrophy in RRMS: Three-year follow-up in NAb- and NAb + patients. *Neurology* 2004;62:719–25.

Franklin, R. J. M. Why does remyelination fail in multiple sclerosis? *Nat. Rev. Neurosci.* 3, 705–714 (2002).

Franklin, R. J. M. & ffrench-Constant, C. Remyelination in the CNS: from biology to therapy. *Nat. Rev. Neurosci.* 9, 839–855 (2008).

Freedman, M. et al. Recognizing and treating suboptimally controlled multiple sclerosis, steps toward regaining command. *Curr. Med. Res. Opin.* 10, 2459–2470 (2009).

Freedman, M. S. et al. Treatment optimization in MS: Canadian MS Working Group updated recommendations. *Can. J. Neurol. Sci.* 40, 307–323 (2013).

Freedman, M. S. & Forrestal, F. G. Canadian treatment optimization recommendations (TOR) as a predictor of disease breakthrough in patients with multiple sclerosis treated with interferon β -1a: analysis of the PRISMS study. *Mult. Scler.* 14, 1234–1241 (2008).

Friese, M. A. et al. Acid-sensing ion channel-1 contributes to axonal degeneration in autoimmune inflammation of the central nervous system. *Nat. Med.* 13, 1483–1489 (2007).

Frischer, J. M. et al. The relation between inflammation and neurodegeneration in multiple sclerosis. *Brain* 132, 1175–1189 (2009).

Fromont, A. et al. Clinical parameters to predict response to interferon in relapsing multiple sclerosis. *Neuroepidemiology* 31, 150–156 (2008).

Fox, R. J. et al. Placebo-controlled phase 3 study of oral BG-12 or glatiramer in multiple sclerosis. *N. Engl. J. Med.* 367, 1087–1097 (2012).

Fu L, Matthews P, De Stefano N, Worsley KJ, Narayanan S, Francis GS, Antel JP, Wolfson C, Arnold DL. Imaging axonal damage of normal-appearing white matter in multiple sclerosis. *Brain* 1998; 121:103-113

Gadea M, Martínez-Bisbal MC, Martí- Bonmatí L, et al. Spectroscopic axonal damage of the right locus coeruleus relates to selective attention impairment in early stage relapsing-remitting multiple sclerosis. *Brain* 2004;127(Pt 1):89-98.

Gaitan, M. I. et al. Evolution of the blood brain barrier in newly forming multiple sclerosis lesions. *Ann. Neurol.* 70, 22-29 (2011).

Ganter P, Prince C, Esiri MM. Spinal cord axonal loss in multiple sclerosis: a post-mortem study. *Neuropathol Appl Neurobiol* 1999; 25: 459-67.

Gauthier SA, Berger AM, Liptak Z, Duan Y, Egorova S, Buckle GJ, Glanz BI, Khoury SJ, Bakshi R, Weiner HL, Guttmann CR (2009) Rate of brain atrophy in benign versus early multiple sclerosis. *Arch Neurol* 66:234-7

Geurts JJ, Bo L, Pouwels PJ, Castelijns JA, Polman CH, Barkhof F. Cortical lesions in multiple sclerosis: combined postmortem MR imaging and histopathology. *AJNR Am J Neuroradiol* 2005a; 26: 572-7.

Geurts JJ, Pouwels PJ, Uitdehaag BM, Polman CH, Barkhof F, Castelijns JA. Intracortical lesions in multiple sclerosis: improved detection with 3D double

inversion-recovery MR imaging. *Radiology* 2005b; 236: 254–60.

Goldschmidt, T. , Antel, J. , Konig, F. B. , Bruck, W. & Kuhlmann, T. Remyelination capacity of the MS brain decreases with disease chronicity. *Neurology* 72, 1914–1921 (2009).

Goodin, D. et al. Relationship between early clinical characteristics and long term disability outcomes: 16 year cohort study (follow-up) of the pivotal interferon β -1b trial in multiple sclerosis. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry* 83, 282–287 (2012).

Graumann U, Reynolds R, Steck AJ, Schaeren-Wiemers N (2003) Molecular changes in normal appearing white matter in multiple sclerosis are characteristic of neuroprotective mechanisms against hypoxic insult. *Brain Pathol* 13:554–73

Grimaldi LM, Salemi G, Grimaldi G, Rizzo A, Marziolo R, Lo Presti C, Maimone D, Savettieri G. High incidence and increasing prevalence of MS in Enna (Sicily), southern Italy. *Neurology* 2001; 57: 1891-1893

Gold, R. et al. Placebo-controlled phase 3 study of oral BG-12 for relapsing multiple sclerosis. *N. Engl. J. Med.* 367, 1098–1107 (2012).

Grossman, R. I. et al. Multiple sclerosis: serial study of gadolinium enhanced MR imaging. *Radiology* 169, 117–122 (1988).

Groom AJ, Smith T, Turski L. Multiple sclerosis and glutamate. *Ann NY Acad Sci*

2003;993:229– 275.

Gunter TE, Yule DL, Gunter KK, et al. Calcium and mitochondria. *FEBS Letters* 2004;567:96–102.

Gunter TE, Sheu SS. Characteristics and possible functions of mitochondrial Ca²⁺ transport mechanisms. *BBA Bioenergetics*. in press.

Haider, L. et al. Oxidative damage and neurodegeneration in multiple sclerosis lesions. *Brain* 134, 914–924 (2011).

Hallgren, B. & Sourander, P. The effect of age on the non-haemin iron in the human brain. *J. Neurochem.* 3, 41–51 (1958).

Hartung HP, Gonsette R, Konig N, Kwiecinski H, Guseo A, Morrissey SP, Krapf H, Zwingers T; Mitoxantrone in Multiple Sclerosis Study Group (MIMS). Mitoxantrone in progressive multiple sclerosis: a placebo-controlled, double-blind, randomised, multicentre trial. *Lancet.* 2002;360:2018-2025

Hauser SL, et al. B-cell depletion with rituximab in relapsing-remitting multiple sclerosis. *N Engl J Med.* 2008;358(7):676–688.

He J, Inglese M, Li BS, Babb JS, Grossman RI, Gonen O. Relapsing-remitting multiple sclerosis: metabolic abnormality in nonenhancing lesions and normal-appearing white matter at MR imaging: initial experience. *Radiology* Jan;2005 234(1):211–

217.

Henderson, A. P. , Barnett, M. H. , Parratt, J. D. & Prineas, J. W. Multiple sclerosis: distribution of inflammatory cells in newly forming lesions. *Ann. Neurol.* 66, 739–753 (2009).

Hernandez MA. Epidemiology of multiple sclerosis in the Canary Islands (Spain): a study on the island of La Palma. *J Neurol* 2002; 249:1378-1381

Hesse, D. et al. Breakthrough disease during interferon- β therapy in MS: no signs of impaired biologic response. *Neurology* 74, 1455– 1462 (2010).

Hochmeister, S. et al. Dysferlin is a new marker for leaky brain blood vessels in multiple sclerosis. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* 65, 855–865 (2006).

Hoh J y Ott J. Mathematical Multi-Locus Approaches to Localizing Complex Human Trait Genes, *Nature Reviews Genetics* 2003, V. 4, p. 701-709

Hohlfeld R. Biotechnological agents for the immunotherapy of multiple sclerosis. Principles, problems and perspectives. *Brain* 120(Pt 5), 865–916 (1997).

Howell, O. W. et al. Meningeal inflammation is widespread and linked to cortical pathology in multiple sclerosis. *Brain* 134, 2755–2771 (2011).

Hu D, Ikizawa K, Lu L, Sanchirico ME, Shinohara ML, Cantor H. Analysis of

regulatory CD8 T cells in Qa-1-deficient mice. *Nat. Immunol.* 5(5), 516–523 (2004).

Hulet, S. W. , Powers, S. & Connor, J. R. Distribution of transferrin and ferritin binding in normal and multiple sclerotic human brain. *J. Neurol. Sci.* 165, 48–55 (1999).

Interferon beta-1b is effective in relapsing- remitting multiple sclerosis. I. Clinical results of a multicenter, randomized, double-blind, placebo-controlled trial. The IFNB Multiple Sclerosis Study Group. *Neurology* 43, 655–661 (1993).

Interferon beta-1b study group. Interferon beta-1b in the treatment of multiple sclerosis: final outcome of the randomized controlled trial. The IFNB Multiple Sclerosis Study Group and The University of British Columbia MS/MRI Analysis Group. *Neurology* 1995;45:1277-1285

Irvine, K. A. & Blakemore, W. F. Age increases axon loss associated with primary demyelination in cuprizone-induced demyelination in C57BL/6 mice. *J. Neuroimmunol.* 175, 69–76 (2006).

Jacobs LD, Cookfair DL, Rudick RA, Herndon RM, Richert JR, Salazar AM, Fischer JS, Goodkin DE, Granger CV, Simon JH, Alam JJ, Bartoszak DM, Bourdette DN, Braiman J, Brownschidle CM, Coats ME, Cohan SL, Dougherty DS, Kinkel RP, Mass MK, Munschauer FE 3rd, Priore RL, Pullicino PM, Scherokman BJ, Whitham RH, et al. Intramuscular interferon beta-1a for disease progression in relapsing multiple sclerosis. The Multiple Sclerosis Collaborative Research Group (MSCRG). *Ann*

Neurol 1996;39:285-294

Jacobsen M, Cepok S, Quak E et al. Oligoclonal expansion of memory CD8+ T cells in cerebrospinal fluid from multiple sclerosis patients. *Brain* 125(Pt 3), 538–550 (2002).

Jeffery, N. D. & Blakemore, W. F. Locomotor deficits induced by experimental spinal cord demyelination are abolished by spontaneous remyelination. *Brain* 120, 27–37 (1997).

Jersild C, Svejgaard A, Fog T. HL-A antigens and multiple sclerosis. *Lancet*. 1972, 1:1240-1.

Jersild C, Fog T, Hansen GS, Thomsen M, Svejgaard A, Dupont B. Histocompatibility determinants in multiple sclerosis, with special reference to clinical course. *Lancet*. 1973, 2:1221-5.

Jiang H, Curran S, Ruiz-Vazquez E, Liang B, Winchester R, Chess L. Regulatory CD8+ T cells fine-tune the myelin basic protein-reactive T cell receptor V β repertoire during experimental autoimmune encephalomyelitis. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 100(14), 8378–8383 (2003).

Johnson KP, Brooks BR, Cohen JA, Ford CC, Goldstein J, Lisak RP, Myers LW, Panitch HS, Rose JW, Schiffer RB. 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

Kabat EA, Glusman M, Knaub V. Quantitative estimation of the albumin and gamma globulin in normal and pathologic cerebrospinal fluid by immunochemical methods. *Am J Med.* 1948; 4(5):653–662.

Kalincik, T. et al. Volumetric MRI markers and predictors of disease activity in early multiple sclerosis: a longitudinal cohort study. *PLoS ONE* 7, e50101 (2012).

Kalkers NF, Bergers E, Castelijns JA, van Walderveen MA, Bot JC, Ader HJ, Polman CH, Barkhof F: Optimizing the association between disability and biological markers in MS. *Neurology* 2001; 57: 1253 – 1258.

Kapeller P, McLean MA, Griffin CM, et al. Preliminary evidence for neuronal damage in cortical grey matter and normal appearing white matter in short duration relapsing-remitting multiple sclerosis: a quantitative MR spectroscopic imaging study. *J Neurol* Feb;2001 248(2):131–138.

Kappos L, Antel J, Comi G, Montalban X, O'Connor P, Polman CH, Haas T, Korn AA, Karlsson G, Radue EW; FTY720 D2201 Study Group. Oral fingolimod (FTY720) for relapsing multiple sclerosis. *N Engl J Med* 2006;355:1124-1140

Kappos, L. et al. A placebo-controlled trial of oral fingolimod in relapsing multiple sclerosis. *N. Engl. J. Med.* 362, 387–401 (2010).

Karadottir R, Attwell D (2007) Neurotransmitter receptors in the life and death of oligodendrocytes. *Neuroscience* 145:1426–38

Kebir H, et al. Human TH17 lymphocytes promote blood-brain barrier disruption and central nervous system inflammation. *Nat Med.* 2007; 13(10):1173–1175.

Kidd D, Barkhof F, McConnell R, Algra PR, Allen IV, Revesz T. Cortical lesions in multiple sclerosis. *Brain* 1999; 122: 17–26

Kirk, J. , Plumb, J. , Mirakhur, M. & McQuaid, S. Tight junctional abnormality in multiple sclerosis white matter affects all calibres of vessel and is associated with blood–brain barrier leakage and active demyelination. *J. Pathol.* 201, 319–327 (2003).

Kobelt G, Berg J, Lindgren P, Izquierdo G, Sánchez-Soliño O, Pérez-Miranda J, Casado MA; Asociación Española de Esclerosis Múltiple. Costs and quality of life of multiple sclerosis in Spain. *Eur J Health Econ.* 2006 Sep;7 Suppl 2:S65-74.

Koch M, Mostert J, Heersema D, Teelken A, De Keyser J (2007b) Plasma S100beta and NSE levels and progression in multiple sclerosis. *J Neurol Sci* 252:154–8

Korteweg T, Tintore M, Uitdehaag B, Rovira A, Frederiksen J, Miller D, Fernando K, Filippi M, Agosta F, Rocca M, Fazekas F, Enzinger C, Matthews P, Parry A, Polman C, Montalban X, Barkhof F. MRI criteria for dissemination in space in patients with

clinically isolated syndromes: a multicentre follow-up study. *Lancet Neurol* 2006;5:221-227

Krieger C, Duchen MR. Mitochondria, Ca²⁺ and neurodegenerative disease. *Eur J Pharmacol* 2002;447:177–188.

Kuhlmann T, Lingfeld G, Bitsch A, Schuchardt J, Brück W. Acute axonal damage in multiple sclerosis is most extensive in early disease stages and decreases over time. *Brain* 125(Pt 10), 2202–2212 (2002).

Kurtzke JF. Rating neurologic impairment in multiple sclerosis: an expanded disability status scale (EDSS). *Neurology* 1983;33:1444-1452

Kukley M, Capetillo-Zarate E, Dietrich D (2007) Vesicular glutamate release from axons in white matter. *Nat Neurosci* 10:311–20

Kutzelnigg, A. et al. Cortical demyelination and diffuse white matter injury in multiple sclerosis. *Brain* 128, 2705–2712 (2005).

Kwon, E. E. & Prineas, J. W. Blood–brain barrier abnormalities in longstanding multiple sclerosis lesions. An immunohistochemical study. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* 53, 625–636 (1994).

Lander ES. The new genomics: global views of biology. *Science* 1996;274:536–9.

Langemann H, Kabiersch A, Newcombe J (1992) Measurement of low-molecular-weight antioxidants, uric acid, tyrosine and tryptophan in plaques and white matter from patients with multiple sclerosis. *Eur Neurol* 32:248–52

Larsson HB, Christiansen P, Jensen M, et al. Localized in vivo proton spectroscopy in the brain of patients with multiple sclerosis. *Magn Reson Med* Nov;1991 22(1):23–31.

Lassmann, H. , Brück, W. & Lucchinetti, C. The immunopathology of multiple sclerosis: an overview. *Brain Pathol.* 17, 210–218 (2007).

Lassmann H, Niedobitek G, Aloisi F, Middeldorp JM. Epstein-Barr virus in the multiple sclerosis brain: a controversial issue--report on a focused workshop held in the Centre for Brain Research of the Medical University of Vienna, Austria. *Brain.* 2011; 134(pt 9):2772–2786.

Lazzarino G, Amorini AM, Eikelenboom MJ, Killestein J, Belli A, Di Pietro V, Tavazzi B, Barkhof F, Polman CH, Uitdehaag BM, Petzold A (2010) Cerebrospinal fluid ATP metabolites in multiple sclerosis. *Mult Scler* 16:549–54

Leray, E. et al. Evidence for a two-stage disability progression in multiple sclerosis. *Brain* 133, 1900–1913 (2010).

Leary SM, Davie CA, Parker GJ, Stevenson VL, Wang L, Barker GJ, Miller DH, Thompson AJ. 1H magnetic resonance spectroscopy of normal appearing white

matter in primary progressive multiple sclerosis. *J Neurol* 1999;246:1023-1026

Lee MA, Blamire AM, Pendlebury S, Ho KH, Mills KR, Styles P, Palace J, Matthews PM (2000) Axonal injury or loss in the internal capsule and motor impairment in multiple sclerosis. *Arch Neurol* 57:65–70

Leyva, L. et al. IFNAR1 and IFNAR2 polymorphisms confer susceptibility to multiple sclerosis but not to interferon treatment response. *J. Neuroimmunol.* 163, 165–171 (2005).

Li, D. K. & Paty, D. W. Magnetic resonance imaging results of the PRISMS trial: a randomized, double-blind, placebo-controlled study of interferon 1a in relapsing-remitting multiple sclerosis. *Ann. Neurol.* 46, 197–206 (1999).

Linington, C. , Bradl, M. , Lassmann, H. , Brunner, C. & Vass, K. Augmentation of demyelination in rat acute allergic encephalomyelitis by circulating mouse monoclonal antibodies directed against a myelin/oligodendrocyte glycoprotein. *Am. J. Pathol.* 130, 443–454 (1988).

Lopes, K. O. , Sparks, D. L. & Streit, W. J. Microglia dystrophy in the aged and Alzheimer's disease brain is associated with ferritin immunoreactivity. *Glia* 56, 1048–1060 (2008).

Lovas G, Szilagyi N, Majtenyi K, Palkovits M, Komoly S. Axonal changes in chronic demyelinated cervical spinal cord plaques. *Brain* 2000; 123: 308–17.

Lovato L, et al. Related B cell clones populate the meninges and parenchyma of patients with multiple sclerosis. *Brain*. 2011;134(pt 2):534–541.

Lu, F. et al. Oxidative damage to mitochondrial DNA and activity of mitochondrial enzymes in chronic active lesions of multiple sclerosis. *J. Neurol. Sci.* 177, 95–103 (2000).

Lu L, Ikizawa K, Hu D, Werneck MB, Wucherpfennig KW, Cantor H. Regulation of activated CD4+ T cells by NK cells via the Qa-1-NKG2A inhibitory pathway. *Immunity* 26(5), 593–604 (2007).

Lublin FD, Reingold SC. Defining the clinical course of multiple sclerosis: results of an international survey. *Neurology* 1996;46:907-911

Lucas M, Sanchez Soliño O, Solano F, Izquierdo G Interferon beta-1b inhibits reactive oxygen species production in peripheral blood monocytes of patients with relapsing remitting multiple sclerosis.. *Neurochem Int*, 1998 33:101-102

Lucas et al. The oxidation-reduction state of serum proteins in multiple sclerosis patients: effect of interferon beta-1b. *Neurochem Int*. 1999 34:287-9.

Lucas M, Rodríguez MC, Gata JM, Zayas MD, Solano F, Izquierdo G. Regulation by Interferon beta-1a of reactive oxygen metabolites production by lymphocytes and

monocytes and serum sulfhydryls in relapsing remitting multiple sclerosis patients. *Neurochem Int*, 2003 (42):67-71

Lucchinetti CF, Bruck W, Rodriguez M, Lassmann H. Distinct patterns of multiple sclerosis pathology indicates heterogeneity on pathogenesis. *Brain Pathol* 1996;6:259-274

Lucchinetti, C. F. et al. Inflammatory cortical demyelination in early multiple sclerosis. *N. Engl. J. Med.* 365, 2188–2197 (2011).

Lucchinetti C, Bruck W, Parisi J, Scheithauer B, Rodriguez M, Lassmann H. Heterogeneity of multiple sclerosis lesions: implications for the pathogenesis of demyelination. *Ann Neurol* 2000;47:707-717

Lunemann JD, et al. EBNA1-specific T cells from patients with multiple sclerosis cross react with myelin antigens and co-produce IFN-gamma and IL-2. *J Exp Med.* 2008;205(8):1763–1773.

Lunemann JD, et al. Increased frequency and broadened specificity of latent EBV nuclear anti- gen-1-specific T cells in multiple sclerosis. *Brain.* 2006;129(pt 6):1493–1506.

Magliozzi R, et al. A Gradient of neuronal loss and meningeal inflammation in multiple sclerosis. *Ann Neurol.* 2010;68(4):477–493.

Magliozzi R, et al. Meningeal B-cell follicles in secondary progressive multiple sclerosis associate with early onset of disease and severe cortical pathology. *Brain*. 2007;130(pt 4):1089–1104.

Marik, C., Felts, P., Bauer, J., Lassmann, H. & Smith, K. J. Lesion genesis in a subset of patients with multiple sclerosis: a role for innate immunity? *Brain* 130, 2800–2815 (2007).

Mathey, E. K. et al. Neurofascin as a novel target for autoantibody-mediated axonal injury. *J. Exp. Med.* 204, 2363–2372 (2007).

Mahad, D. , Ziabreva, I. , Lassmann, H. & Turnbull, D. Mitochondrial defects in acute multiple sclerosis lesions. *Brain* 131, 1722–1735 (2008).

Mahad, D. J. et al. Mitochondrial changes within in multiple sclerosis. *Brain* 132, 1161–1174 (2009).

Mahad DJ, Ziabreva I, Campbell G, Lax N, White K, Hanson PS, Lassmann H, Turnbull DM (2009) Mitochondrial changes within axons in multiple sclerosis. *Brain* 132:1161–74

Malucchi, S. et al. Neutralizing antibodies reduce the efficacy of β IFN during treatment of multiple sclerosis. *Neurology* 62, 2031– 2037 (2004)

Mallada-Frechin J, Matías-Guiu J, Martín R, López-Arlandis JM, Camacho-Cuarter

JM, Beltrán I, Moltó JM, Falip RR, Abellán-Miralles I. Prevalencia de la esclerosis múltiple en el área sanitaria de Alcoy. *Rev Neurol* 2000; 30:1131-1134

Mangalam A, Luckey D, Basal E et al. HLA-DQ8 (DQB1*0302)-restricted Th17 cells exacerbate experimental autoimmune encephalomyelitis in HLA-DR3-transgenic mice. *J. Immunol.* 182(8), 5131–5139 (2009).

Martínez, A. et al. An IFNG polymorphism is associated with interferon response in Spanish MS patients. *J. Neuroimmunol.* 173, 196–199 (2006).

Masjuan J, Alvarez-Cermeño JC, Garcia-Barragan N, Diaz-Sanchez M, Espino M, Sadaba MC, Gonzalez-Porque P, Martinez San Millan J, Villar LM. Clinically isolated syndromes: a new oligoclonal band test accurately predicts conversion to MS. *Neurology* 2006;66:576-578

Matthews PM, De Stefano N, Narayanan S, Francis GS, Wolinsky JS, Antel JP, et al. Putting magnetic resonance spectroscopy studies in context: axonal damage and disability in multiple sclerosis. *Semin Neurol* 1998; 18: 327–36.

Matsuoka, T. , Suzuki, S. O. , Suenaga, T. , Iwaki, T. & Kira, J. Reappraisal of aquaporin-4 astrocytopathy in Asian neuromyelitis optica and multiple sclerosis patients. *Brain Pathol.* 21, 516–532 (2011).

McDonald WI, Compston A, Edan G, Goodkin D, Hartung HP, Lublin FD, McFarland HF, Paty DW, Polman CH, Reingold SC, Sandberg-Wollheim M, Sibley W, Thompson

A, van den Noort S, Weinshenker BY, Wolinsky JS. Recommended diagnostic criteria for multiple sclerosis: guidelines from the International Panel on the diagnosis of multiple sclerosis. *Ann Neurol* 2001; 50:121-127

Medana IM, Gallimore A, Oxenius A, Martinic MM, Wekerle H, Neumann H. MHC class I-restricted killing of neurons by virus-specific CD8⁺ T lymphocytes is effected through the Fas/FasL, but not the perforin pathway. *Eur. J. Immunol.* 30(12), 3623–3633 (2000).

Medana I, Martinic MA, Wekerle H, Neumann H. Transection of major histocompatibility complex class I-induced neurites by cytotoxic T lymphocytes. *Am. J. Pathol.* 159(3), 809–815 (2001).

Menn B, Garcia-Verdugo JM, Yaschine C, Gonzalez-Perez O, Rowitch D, Alvarez-Buylla A. Origin of oligodendrocytes in the subventricular zone of the adult brain. *J Neurosci.* 2006; 26:7907–18.

Meuth SG, Herrmann AM, Simon OJ et al. Cytotoxic CD8⁺ T cell–neuron interactions: perforin-dependent electrical silencing precedes but is not causally linked to neuronal cell death. *J. Neurosci.* 29(49), 15397–15409 (2009).

Mezei, Z. et al. Can a physician predict the clinical response to first- line immunomodulatory treatment in relapsing–remitting multiple sclerosis? *Neuropsychiatr. Dis. Treat.* 8, 465–473 (2012).

Miller D, Barkhof F, Montalban X, Thompson A, Filippi M. Clinically isolated syndromes suggestive of multiple sclerosis, part I: natural history, pathogenesis, diagnosis, and prognosis. *Lancet Neurol* 2005a; 4:281-288

Miller D, Barkhof F, Montalban X, Thompson A, Filippi M. Clinically isolated syndromes suggestive of multiple sclerosis, part 2: non-conventional MRI, recovery processes, and management. *Lancet Neurol* 2005b;4:341-348

Miller DH, Thompson AJ, Filippi M. Magnetic resonance studies of abnormalities in the normal appearing white matter and grey matter in multiple sclerosis. *J Neurol* 2003;250:1407-1419

Miller, D. H. et al. Serial gadolinium enhanced magnetic resonance imaging in multiple sclerosis. *Brain* 111, 927–939 (1988).

Modrego Pardo PJ, Latorre MA, Lopez A, Errea JM. Prevalence of multiple sclerosis in the province of Teruel, Spain. *J Neurol* 1997; 244:182-185

Moffett JR, Ross B, Arun P, Madhavarao CN, Namboodiri AM (2007) N-Acetylaspartate in the CNS: from neurodiagnostics to neurobiology. *Prog Neurobiol* 81: 89–131

Molyneux PD, Kappos L, Polman C, et al. The effect of interferon beta-1b treatment on MRI measures of cerebral atrophy in secondary progressive multiple sclerosis. *Brain* 2000:2256–63.

Moron FJ, Mendoza N, Vazquez F, Molero E, Quereda F, Salinas A, Fontes J, Martinez-Astorquiza T, Sanchez-Borrego R, Ruiz A. Multilocus analysis of estrogen-related genes in Spanish postmenopausal women suggests an interactive role of ESR1, ESR2 and NRIP1 genes in the pathogenesis of osteoporosis. *Bone*. 2006 Jul;39(1):213-21.

Na, S. Y. et al. Naive CD8 T-cells initiate spontaneous autoimmunity to a sequestered model antigen of the central nervous system. *Brain* 131, 2353–2365 (2008).

Naito S, Namerow N, Mickey MR, Terasaki PI. Multiple sclerosis: association with HL-A3. *Tissue Antigens*. 1972;2(1):1-4.

Narayanan S, De Stefano N, Francis GS, et al. Axonal metabolic recovery in multiple sclerosis patients treated with interferon beta-1b. *J Neurol* Nov;2001 248(11):979–986.

Narayana PA, Doyle TJ, Lai D, Wolinsky JS. Serial proton magnetic resonance spectroscopic imaging, contrast-enhanced magnetic resonance imaging, and quantitative lesion volumetry in multiple sclerosis. *Ann Neurol* Jan;1998 43(1):56–71.

Narayana PA. Magnetic resonance spectroscopy in the monitoring of multiple sclerosis. *J Neuroimaging* 2005;15(4 Suppl):46S–57S.

Nimmerjahn A, Kirchhoff F, Helmchen F. Resting microglial cells are highly dynamic surveillants of brain parenchyma in vivo. *Science* 308(5726), 1314–1318 (2005).

Nitsch R, Pohl EE, Smorodchenko A, Infante-Duarte C, Aktas O, Zipp F. Direct impact of T cells on neurons revealed by two-photon microscopy in living brain tissue. *J. Neurosci.* 24(10), 2458–2464 (2004).

Obermeier B, et al. Related B cell clones that populate the CSF and CNS of patients with multiple sclerosis produce CSF immunoglobulin. *J Neuro-immunol.* 2011;233(1–2):245–248.

O'Connor, P. W. et al. A Phase II study of the safety and efficacy of teriflunomide in multiple sclerosis with relapses. *Neurology* 66, 894 –900 (2006).

O'Connor, P. et al. Randomized trial of oral teriflunomide for relapsing multiple sclerosis. *N. Engl. J. Med.* 365, 1293–1303 (2011).

Oksenberg JR, Barcellos LF, Cree BA, Baranzini SE, Bugawan TL, Khan O, Lincoln RR, Swerdlin A, Mignot E, Lin L, Goodin D, Erlich HA, Schmidt S, Thomson G, Reich DE, Pericak-Vance MA, Haines JL, Hauser SL. Mapping multiple sclerosis susceptibility to the HLA-DR locus in African Americans. *Am J Hum Genet.* 2004 Jan;74(1):160-7

O’Riordan JI, Thompson AJ, Kingsley DP, MacManus DG, Kendall BE, Rudge P, McDonald WI, Miller DH The prognostic value of brain MRI in clinically isolated syndromes of the CNS. A 10-year follow-up. *Brain* 1998;121:495-503

Orlewska E, Mierzejewski P, Zaborski J, Kruszewska J, Wicha W, Fryze W, Drozdowski W, Skibicka I, Mirowska-Guzel D, Czlonkowski A, Czlonkowska A. A prospective study of the financial costs of multiple sclerosis at different stages of the disease. *Eur J Neurol* 2005;12:31-39

Ouardouz M, Coderre E, Basak A, Chen A, Zamponi GW, Hameed S, Rehak R, Yin X, Trapp BD, Stys PK (2009a) Glutamate receptors on myelinated spinal cord axons: I. GluR6 kainate receptors. *Ann Neurol* 65:151–9

Ouardouz M, Coderre E, Zamponi GW, Hameed S, Yin X, Trapp BD, Stys PK (2009b) Glutamate receptors on myelinated spinal cord axons: II. AMPA and GluR5 receptors. *Ann Neurol* 65:160–6

Panitch, H. et al. Randomized, comparative study of interferon 1a treatment regimens in MS: The EVIDENCE Trial. *Neurology* 59, 1496–1506 (2002).

Paolillo A, Coles AJ, Molyneux PD, Gawne-Cain M, MacManus D, Barker GJ, Compston DA, Miller DH. Quantitative MRI in patients with secondary progressive MS treated with monoclonal antibody Campath 1H. *Neurology* 1999;53:751-757

Pappas, D. J. & Oksenberg, J. R. Multiple sclerosis pharmacogenomics: maximizing efficacy of therapy. *Neurology* 74 (Suppl. 1), S62–S69 (2010).

Parry A, Corkill R, Blamire AM, Palace J, Narayanan S, Arnold D, Styles P, Matthews PM (2003) Beta-Interferon treatment does not always slow the progression of axonal injury in multiple sclerosis. *J Neurol* 250:171–8

Patani, R. , Balaratnam, M. , Vora, A. & Reynolds, R. Remyelination can be extensive in multiple sclerosis despite a long disease course. *Neuropathol. Appl. Neurobiol.* 33, 277–287 (2007).

Patel TB, Clark JB (1979) Synthesis of N-acetyl-L-aspartate by rat brain mitochondria and its involvement in mitochondrial/cytosolic carbon transport. *Biochem J* 184:539–46

Patsopoulos NA; Bayer Pharma MS Genetics Working Group; Steering Committees of Studies Evaluating IFN β -1b and a CCR1-Antagonist; ANZgene Consortium; GeneMSA; International Multiple Sclerosis Genetics Consortium, Esposito F, Reischl J, Lehr S, Bauer D, Heubach J, Sandbrink R, Pohl C, Edan G, Kappos L, Miller D, Montalbán J, Polman CH, Freedman MS, Hartung HP, Arnason BG, Comi G, Cook S, Filippi M, Goodin DS, Jeffery D, O'Connor P, Ebers GC, Langdon D, Reder AT, Traboulsee A, Zipp F, Schimrigk S, Hillert J, Bahlo M, Booth DR, Broadley S, Brown MA, Browning BL, Browning SR, Butzkueven H, Carroll WM, Chapman C, Foote SJ, Griffiths L, Kermode AG, Kilpatrick TJ, Lechner-Scott J, Marriott M, Mason D, Moscato P, Heard RN, Pender MP, Perreau VM, Perera D, Rubio JP, Scott RJ, Slee M,

Stankovich J, Stewart GJ, Taylor BV, Tubridy N, Willoughby E, Wiley J, Matthews P, Boneschi FM, Compston A, Haines J, Hauser SL, McCauley J, Ivinson A, Oksenberg JR, Pericak-Vance M, Sawcer SJ, De Jager PL, Hafler DA, de Bakker PI. Genome-wide meta-analysis identifies novel multiple sclerosis susceptibility loci. *Ann Neurol*. 2011 Dec;70(6):897-912.

Patrikios, P. et al. Remyelination is extensive in a subset of multiple sclerosis patients. *Brain* 129, 3165–3172 (2006).

Paty, D. W. & Li, D. K. Interferon beta-1b is effective in relapsing- remitting multiple sclerosis. II. MRI analysis results of a multicenter, randomized, double-blind, placebo-controlled trial. UBC MS/MRI Study Group and the IFNB Multiple Sclerosis Study Group. *Neurology* 43, 662–667 (1993).

Perier O, Gregoire A. Electron microscopic features of multiple sclerosis lesions. *Brain*. 1965; 88:937– 52

Peterson JW, Trapp BD. Neuropathobiology of multiple sclerosis. *Neurol Clin* 2005; 23: 107–29.

Peterson JW, Bo L, Mork S, Chang A, Trapp BD. Transected neurites, apoptotic neurons, and reduced inflammation in cortical multiple sclerosis lesions. *Ann Neurol* 2001; 50: 389–400

Piccio L, et al. Changes in B- and T-lymphocyte and chemokine levels with

rituximab treatment in multiple sclerosis. *ArchNeurol*. 2010; 67 (6): 707–714.

Pike GB, de Stefano N, Narayanan S, Francis GS, Antel JP, Arnold DL. Combined magnetization transfer and proton spectroscopic imaging in the assessment of pathologic brain lesions in multiple sclerosis. *AJNR Am J Neuroradiol* 1999; 20:829- 837

Pina MA, Ara JR, Modrego PJ, Morales F, Capablo JL. Prevalence of multiple sclerosis in the sanitary district of Calatayud, Northern Spain: is Spain a zone of high risk for this disease? *Neuroepidemiology* 1998;17:258-264

Pittock SJ, Mayr WT, McClelland RL, Jorgensen NW, Weigand D, Noseworthy JH, Rodriguez M. Disability profile of MS did not change over 10 years in a population-based prevalence cohort. *Neurology* 2004; 62: 601-606

Polman C, Reingold S, Banwell B, Clanet M, Cohen J, Filippi M, et al. Diagnostic Criteria for Multiple Sclerosis: 2010 Revisions to the McDonald Criteria. *Ann Neurol*. 2011;69:292-302.

Polman CH, O'Connor PW, Havrdova E, Hutchinson M, Kappos L, Miller DH, Phillips JT, Lublin FD, Giovannoni G, Wajgt A, Toal M, Lynn F, Panzara MA, Sandrock AW; AFFIRM Investigators. A randomized, placebo-controlled trial of natalizumab for relapsing multiple sclerosis. *N Engl J Med* 2006; 354:899-910

Polman CH, Reingold SC, Edan G, Filippi M, Hartung HP, Kappos L, Lublin FD, Metz

LM, McFarland HF, O'connor PW, Sandberg-Wollheim M, Thompson AJ, Weinshenker BG, Wolinsky JS. Diagnostic criteria for multiple sclerosis: 2005 revisions to the "McDonald Criteria". *Ann Neurol* 2005;58:840-846

Portaccio, E., Zipoli, V., Siracusa, G., Sorbi, S. & Amato, M. P. Response to interferon-beta therapy in relapsing–remitting multiple sclerosis, a comparison of different clinical criteria. *Mult. Scler.* 12, 281–286 (2006).

Poser C, Paty D, Scheinberg L, et al. New diagnostic criteria for multiple sclerosis: guidelines for research protocols. *Ann Neurol* 1983;13:227-231

Prentice, R. L. Surrogate endpoints in clinical trials, definition and operational criteria. *Stat. Med.* 8, 431–440 (1989).

Prineas, J. W. et al. Immunopathology of secondary-progressive multiple sclerosis. *Ann. Neurol.* 50, 646–657 (2001).

Prineas, J. W. & Wright, R. G. Macrophages, lymphocytes, and plasma cells in the perivascular compartment in chronic multiple sclerosis. *Lab. Invest.* 38, 409–421 (1978).

Prosperini, L. et al. One-year MRI scan predicts clinical response to interferon β in multiple sclerosis. *Eur. J. Neurol.* 16, 1202–1209 (2009).

Ramsaransing GS, De Keyser J (2006) Benign course in multiple sclerosis: a review.

Acta Neurol Scand 113:359–69

Randomised double-blind placebo-controlled study of interferon beta-1a in relapsing/remitting multiple sclerosis. PRISMS (Prevention of Relapses and Disability by Interferon beta-1a Subcutaneously in Multiple Sclerosis) Study Group. Lancet 1998; 352:1498-1504

Ransohoff RM, Perry VH. Microglial physiology: unique stimuli, specialized responses. Annu. Rev. Immunol. 27, 119–145 (2009).

Reboldi A, et al. C-C chemokine receptor 6-regulated entry of TH-17 cells into the CNS through the choroid plexus is required for the initiation of EAE. Nat Immunol. 2009;10(5):514–523.

Remington LT, Babcock AA, Zehntner SP, Owens T. Microglial recruitment, activation, and proliferation in response to primary demyelination. Am. J. Pathol. 170(5), 1713–1724 (2007).

Riise T, Gronning M, Fernandez O, Lauer K, Midgard R, Minderhoud JM, Nyland H, Palffy G, Poser S, Aarli JA. Early prognostic factors for disability in multiple sclerosis, a European multicenter study. Acta Neurol Scand 1992;85:212-218

Río, J. et al. Interferon in RRMS. An eight years experience in a specialist multiple sclerosis centre. J. Neurol. 252, 795–800 (2005)

Río, J. et al. Relationship between MRI lesion activity and response to IFN- β in relapsing–remitting multiple sclerosis patients. *Mult. Scler.* 14, 479–484 (2008).

Río, J. et al. Assessment of different treatment failure criteria in a cohort of relapsing-remitting multiple sclerosis patients treated with interferon: implications for clinical trials. *Ann. Neurol.* 52, 400– 406 (2002).

Rist, J. M. & Franklin, R. J. M. Taking ageing into account in remyelination-based therapies for multiple sclerosis. *J. Neurol. Sci.* 274, 64–67 (2008)

Robertson NP, Fraser M, Deans J, Clayton D, Walker N, Compston DA. Age-adjusted recurrence risks for relatives of patients with multiple sclerosis. *Brain.* 1996 Apr;119 (Pt 2):449-55.

Romeo, M. et al. Clinical and MRI predictors of response to interferon-beta and glatiramer acetate in relapsing–remitting multiple sclerosis patients. *Eur. J. Neurol.* 20, 1060–1067 (2013).

Romeo, M. et al. Rio Score and Modified Rio Score validation in an Italian cohort of relapsing–remitting multiple sclerosis patients (abstract P549). Presented at the 28th Congress of the European Committee for Treatment and Research in Multiple Sclerosis, 10–13 October 2012.

Rose EM, Koo JC, Antflick JE, Ahmed SM, Angers S, Hampson DR (2009) Glutamate transporter coupling to Na,K-ATPase. *J Neurosci* 29:8143–55

Rovaris M, Confavreux C, Furlan R, Kappos L, Comi G, Filippi M. Secondary progressive multiple sclerosis: current knowledge and future challenges. *Lancet Neurol* 2006;5:343-354

Rovaris M, Filippi M. MR-based technology for in vivo detection, characterization, and quantification of pathology of relapsing-remitting multiple sclerosis. *J Rehabil Res Dev* 2002;39:243-259

Rudick RA, Fisher E, Lee JC, Duda JT, Simon J. Brain atrophy in relapsing multiple sclerosis: relationship to relapses, EDSS, and treatment with interferon beta-1a. *Mult Scler* 2000;6:365-72.

Rudick, R. A. & Polman, C. H. Current approaches to the identification and management of breakthrough disease in patients with multiple sclerosis. *Lancet Neurol.* 8, 545-559 (2009)

Runmarker B, Andersen O. Prognostic factors in a multiple sclerosis incidence cohort with twenty-five years of follow-up. *Brain* 1993;116:117-134

Saccardi R, Mancardi GL, Solari A, Bosi A, Bruzzi P, Di Bartolomeo P, Donelli A, Filippi M, Guerrasio A, Gualandi F, La Nasa G, Murialdo A, Pagliai F, Papineschi F, Scappini B, Marmont AM. Autologous HSCT for severe progressive multiple sclerosis in a multicenter trial: impact on disease activity and quality of life. *Blood* 2005;105:2601-2607

Sadovnick AD, Baird PA, Ward RH. Multiple sclerosis: updated risks for relatives. *Am J Med Genet.* 1988 Mar;29(3):533-41.

Salter MG, Fern R (2005) NMDA receptors are expressed in developing oligodendrocyte processes and mediate injury. *Nature* 438:1167-71

Sarchielli P, Presciutti O, Tarducci R, et al. 1H-MRS in patients with multiple sclerosis undergoing treatment with interferon beta-1a: results of a preliminary study. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* Feb;1998 64(2):204-212.

Sarchielli P, Presciutti O, Pelliccioli GP, Tarducci R, Gobbi G, Chiarini P, Alberti A, Vicinanza F, Gallai V. Absolute quantification of brain metabolites by proton magnetic resonance spectroscopy in normal-appearing white matter of multiple sclerosis. *Brain* 1999;122:513-521

Sarchielli P, Greco L, Floridi A, Gallai V (2003) Excitatory amino acids and multiple sclerosis: evidence from cerebrospinal fluid. *Arch Neurol* 60:1082-8

Saxena, A. et al. Multiple sclerosis-like lesions induced by effector CD8 T cells recognizing a sequestered antigen on oligodendrocytes. *J. Immunol.* 181, 1617-1621 (2008).

Scalfari, A. et al. The natural history of multiple sclerosis, a geographically based study 10: relapses and long-term disability. *Brain* 133, 1914-1929 (2010).

Schubert F, Seifert F, Elster C, Link A, Walzel M, Mientus S, Haas J, Rinneberg H. Serial 1H-MRS in relapsing-remitting multiple sclerosis: effects of interferon -beta therapy on absolute metabolite concentrations. *MAGMA* Jun 2002;14:213-222

Serafini B, Rosicarelli B, Magliozzi R, Stigliano E, Aloisi F. Detection of ectopic B-cell follicles with germinal centers in the meninges of patients with secondary progressive multiple sclerosis. *Brain Pathol.* 2004;14(2):164-174.

Segal BM, Constantinescu CS, Raychaudhuri A, Kim L, Fidelus-Gort R, Kasper LH; Ustekinumab MS Investigators. Repeated subcutaneous injections of IL12/23 p40 neutralising antibody, ustekinumab, in patients with relapsing-remitting multiple sclerosis: a Phase II, double-blind, placebo-controlled, randomised, dose-ranging study. *Lancet Neurol.* 7(9), 796-804 (2008).

Sharma, R. et al. Inflammation induced by innate immunity in the central nervous system leads to primary astrocyte dysfunction followed by demyelination. *Acta Neuropathol.* 120, 223-236 (2010).

Simon, J. H. et al. Magnetic resonance studies of intramuscular interferon 1a for relapsing multiple sclerosis. The Multiple Sclerosis Collaborative Research Group. *Ann. Neurol.* 43, 79-87 (1998).

Simmons MS, Frondoza CG, Coyle JT. Immunocytochemical localization of N-acetyl aspartate with monoclonal antibodies. *Neuroscience* 1991;45:37-45

Singh, M. K. et al. Gene expression changes in peripheral blood mononuclear cells from multiple sclerosis patients undergoing- interferon therapy. *J. Neurol. Sci.* 258, 52–59 (2007).

Smith, K. J. Axonal protection in multiple sclerosis—a particular need during remyelination? *Brain* 129, 3147–3149 (2006).

Smith, K. J., Blakemore, W. F. & McDonald, W. I. Central remyelination restores secure conduction. *Nature* 280, 395–396 (1979).

Song GG, Choi SJ, Ji JD, Lee YH. Genome-wide pathway analysis of a genome-wide association study on multiple sclerosis. *Mol Biol Rep.* 2013 Mar;40(3):2557-64.

Sormani, M. P. et al. Combined MRI lesions and relapses as a perfect surrogate for disability in multiple sclerosis. *Neurology* 77, 1684– 1690 (2011).

Sormani, M. et al. Scoring treatment response in patients with relapsing multiple sclerosis. *Mult. Scler.* 19, 605–612 (2013).

Sriram, U. et al. Pharmacogenomic analysis of interferon receptor polymorphisms in multiple sclerosis. *Genes Immun.* 4, 147–152 (2003).

Srinivasan R, Sailasuta N, Hurd R, et al. Evidence of elevated glutamate in multiple sclerosis using magnetic resonance spectroscopy at 3 T. *Brain* 2005;128:1016–

1025.

Staffen W, Zauner H, Mair A, et al. Magnetic resonance spectroscopy of memory and frontal brain region in early multiple sclerosis. *J Neuropsychiatry Clin Neurosci* 2005;17(3):357–363.

Steen C, Wilczak N, Hoogduin JM, Koch M, De Keyser J (2010) Reduced creatine kinase B activity in multiple sclerosis normal appearing white matter. *PLoS One* 5: e10811

Steinman L. A brief history of T(H)17, the first major revision in the T(H)1/T(H)2 hypothesis of T cell-mediated tissue damage. *Nat Med.* 2007; 13(2):139–145.

Stürzebecher, S. et al. Expression profiling identifies responder and non-responder phenotypes to interferon in multiple sclerosis. *Brain* 126, 1419–1429 (2003).

Stys, P. K. General mechanisms of axonal damage and its prevention. *J. Neurol. Sci.* 133, 3–13 (2005).

Stys PK, Waxman SG, Ransom BR. Ionic mechanisms of anoxic injury in mammalian CNS white matter: role of Na⁺ channels and Na⁺-Ca²⁺ exchanger. *J Neurosci* 1992;12:430–439.

Summers M, Swanton J, Fernando K, et al. Cognitive impairment in multiple

sclerosis can be predicted by imaging early in the disease. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 2008;79(8):955–958.

Swanton JK, Fernando KT, Dalton CM, Miszkiet KA, Thompson AJ, Plant GT, Miller DH. Modification of MRI criteria for MS in patients with clinically isolated syndromes. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 2006;77:830-833

Thacker EL, Mirzaei F, Ascherio A. Infectious mononucleosis and risk for multiple sclerosis: a meta-analysis. *Ann Neurol.* 2006; 59(3): 499–503.

Tintoré M, Rovira A, Brieva L, Grive E, Jardi R, Borrás C, Montalban X. Isolated demyelinating syndromes: comparison of CSF oligoclonal bands and different MR imaging criteria to predict conversion to CDMS. *Mult Scler* 2001;7:359-363

Tintoré M, Rovira A, Rio J, Nos C, Grive E, Téllez N, Pelayo R, Comabella M, Sastre-Garriga J, Montalban X. Baseline MRI predicts future attacks and disability in clinically isolated syndromes. *Neurology* 2006;67:968-972

Tola MA, Yugueros MI, Fernandez-Buey N, Fernandez-Herranz R. Prevalence of multiple sclerosis in Valladolid, northern Spain. *J Neurol* 1999;246:170-174

Tomassini, V. et al. Predictors of long-term clinical response to interferon beta therapy in relapsing multiple sclerosis. *J. Neurol.* 253, 287–293 (2006).

Toyoda H, Formby B. Contribution of T cells to the development of autoimmune

diabetes in the NOD mouse model. *Bioessays*. 1998; 20(9): 750–757.

Trapp BD, Peterson J, Ransohoff RM, Rudick R, Mork S, Bo L. Axonal transection in the lesions of multiple sclerosis. *N Engl J Med* 1998;338:278-285

Trapp, B. & Stys, P. Virtual hypoxia and chronic necrosis of demyelinated axons in multiple sclerosis. *Lancet Neurol*. 8, 280–291 (2009).

Trapp BD, Wujek JR, Criste GA et al. Evidence for synaptic stripping by cortical microglia. *Glia* 55(4), 360–368 (2007).

Tremlett H, Paty D, Devonshire V. The natural history of primary progressive MS in British Columbia, Canada. *Neurology* 2005;65:1919-1923

Tremlett H, Paty D, Devonshire V. Disability progression in multiple sclerosis is slower than previously reported. *Neurology* 2006;66:172-177

Troyano, M. et al. Interferon in relapsing–remitting multiple sclerosis: an independent postmarketing study in southern Italy. *Mult. Scler*. 9, 451–457 (2003).

Uria DF, Abad P, Calatayud MT, Virgala P, Diaz A, Chamizo C, Dean G. Multiple sclerosis in Gijon health district, Asturias, northern Spain. *Acta Neurol Scand* 1997;96:375-379

Vallejo-Illarramendi A, Domercq M, Perez-Cerda F, Ravid R, Matute C (2006)

Increased expression and function of glutamate transporters in multiple sclerosis. *Neurobiol Dis* 21:154–64

Van Au Duong M, Audoin B, Le Fur Y, et al. Relationships between gray matter metabolic abnormalities and white matter inflammation in patients at the very early stage of MS : a MRSI study. *J Neurol* Jul;2007 254(7):914–923.

van Baarsen, L. G. et al. Pharmacogenomics of interferon therapy in multiple sclerosis: baseline IFN signature determines pharmacological differences between patients. *PLoS One* 3, e1927 (2008).

Van Horsen, J. , Witte, M. E. , Schreibelt, G. & de Vries, H. E. Radical changes in multiple sclerosis pathogenesis. *Biochim. Biophys. Acta* 1812, 141–150 (2011).

Van Horsen, J. et al. Severe oxidative damage in multiple sclerosis lesions coincides with enhanced antioxidant enzyme expression. *Free Radic. Biol. Med.* 45, 1729–1737 (2008).

Van Horsen, J. et al. Nrf2 and DJ1 are consistently upregulated in inflammatory multiple sclerosis lesions. *Free Radic. Biol. Med.* 8, 1283–1289 (2010).

Veto, S. et al. Inhibiting poly(ADP-ribose) polymerase: a potential therapy against oligodendrocyte death. *Brain* 133, 822–834 (2010).

Villar LM, Masjuan J, Sádaba MC, González-Porqué P, Plaza J, Bootello A, Alvarez-Cermeño JC. Early differential diagnosis of multiple sclerosis using a new oligoclonal band test. *Arch Neurol.* 2005 Apr;62(4):574-7.

Villoslada, P. et al. The HLA locus and multiple sclerosis in Spain. Role in disease susceptibility, clinical course and response to interferon. *J. Neuroimmunol.* 130, 194–201 (2002).

Visser, F., Wattjes, M. P., Pouwels, P. J., Linssen, W. H. & van Oosten, B. W. Tumefactive multiple sclerosis lesions under fingolimod treatment. *Neurology* 79, 2000–2003 (2012).

Vogt J, Paul F, Aktas O et al. Lower motor neuron loss in multiple sclerosis and experimental autoimmune encephalomyelitis. *Ann. Neurol.* 66(3), 310–322 (2009).

Waubant, E. et al. Clinical characteristics of responders to interferon therapy for relapsing MS. *Neurology* 61, 184–189 (2003).

Wegner, C., Esiri, M. M. , Chance, S. A. , Palace, J. & Matthews, P. M. Neocortical neuronal, synaptic, and glial loss in multiple sclerosis. *Neurology* 67, 960–967 (2006).

Weinstock-Guttman, B. et al. Genomic effects of once-weekly, intramuscular interferon- β 1a treatment after the first dose and on chronic dosing: relationships to 5-year clinical outcomes in multiple sclerosis patients. *J. Neuroimmunol.* 205,

113–125 (2008).

Weinstock-Guttman, B., Tamaño-Blanco, M., Bhasi, K., Zivadinov, R. & Ramanathan, M. Pharmacogenetics of MXA SNPs in interferon treated multiple sclerosis patients. *J. Neuroimmunol.* 182, 236–239 (2007).

Wiendl, H. et al. Basic and escalating immunomodulatory treatments in multiple sclerosis: current therapeutic recommendations. *J. Neurol.* 255, 1449–1463 (2008).

Willer CJ, Dymment DA, Risch NJ, Sadovnick AD, Ebers GC. *Proc Natl Acad Sci USA* 2003, 100:12877-87

Willis SN, et al. Epstein-Barr virus infection is not a characteristic feature of multiple sclerosis brain. *Brain.* 2009;132(pt 12):3318–3328.

Witte ME, Bo L, Rodenburg RJ, Belien JA, Musters R, Hazes T, Wintjes LT, Smeitink JA, Geurts JJ, De Vries HE, van der Valk P, van Horssen J (2009) Enhanced number and activity of mitochondria in multiple sclerosis lesions. *J Pathol* 219:193–204

Wolf, C. R., Smith, G. & Smith, R. L. Science, medicine, and the future: pharmacogenetics. *BMJ* 320, 987–990 (2000).

Wolinsky JS, Narayana PA. Magnetic resonance spectroscopy in multiple sclerosis:

window into the diseased brain. *Curr Opin Neurol* 2002; 15: 247–51.

Wolinsky JS, Narayana PA, Fenstermacher MJ. Proton magnetic resonance spectroscopy in multiple sclerosis. *Neurology* Nov;1990 40(11):1764–1769.

Wolosker H, Panizzutti R, Engelender S (1996) Inhibition of creatine kinase by S-nitrosoglutathione. *FEBS Lett* 392: 274–6

Xu GY, Liu S, Hughes MG, McAdoo DJ (2008) Glutamate- induced losses of oligodendrocytes and neurons and activation of caspase-3 in the rat spinal cord. *Neuroscience* 153:1034–47

Yeo TW, De Jager PL, Gregory SG, Barcellos LF, Walton A, Goris A, Fenoglio C, Ban M, Taylor CJ, Goodman RS, Walsh E, Wolfish CS, Horton R, Traherne J, Beck S, Trowsdale J, Caillier SJ, Ivinson AJ, Green T, Pobywajlo S, Lander ES, Pericak-Vance MA, Haines JL, Daly MJ, Oksenberg JR, Hauser SL, Compston A, Hafler DA, Rioux JD, Sawcer S. A second major histocompatibility complex susceptibility locus for multiple sclerosis. *Ann Neurol*. 2007 Mar;61(3):228-36.

Yudkoff M, Nelson D, Daikhin Y, Erecinska M (1994) Tricarboxylic acid cycle in rat brain synaptosomes. Fluxes and interactions with aspartate aminotransferase and malate/aspartate shuttle. *J Biol Chem* 269:27414–20

Zawadzka, M. et al. CNS-resident glial progenitor/stem cells produce Schwann cells as well as oligodendrocytes during repair of CNS demyelination. *Cell Stem Cell* 6,

578–590 (2010).

Zambonin, J. L. et al. Increased mitochondrial content in remyelinated axons: implications for multiple sclerosis. *Brain* 134, 1901–1913 (2011).

Zhang, X. et al. Cytokine toxicity to oligodendrocyte precursors is mediated by iron. *Glia* 52, 199–208 (2005).

Zhao C, Zawadzka M, Roulois AJ, Bruce CC, Franklin RJ. Promoting remyelination in multiple sclerosis by endogenous adult neural stem/precursor cells: defining cellular targets. *J Neurol Sci.* 2008; 265:12–16.

Ziabreva, I. et al. Injury and differentiation following inhibition of mitochondrial respiratory chain complex IV in rat oligodendrocytes. *Glia* 58, 1827–1837 (2010).

Ziemssen T, Kumpfel T, Schneider H, Klinkert WE, Neuhaus O, Hohlfeld R. Secretion of brain-derived neurotrophic factor by glatiramer acetate-reactive T-helper cell lines: Implications for multiple sclerosis therapy. *J Neurol Sci* 2005;233:109-112

Ziskin JL, Nishiyama A, Rubio M, Fukaya M, Bergles DE (2007) Vesicular release of glutamate from unmyelinated axons in white matter. *Nat Neurosci* 10:321–30

Zivadinov R, Leist TP. Clinical-magnetic resonance imaging correlations in multiple sclerosis. Clinical-magnetic resonance imaging correlations in multiple sclerosis. *J Neuroimaging* 2005;15:10S-21

Zivadinov R, Locatelli L, Cookfair D, et al. Interferon beta-1a slows progression of brain atrophy in relapsing-remitting multiple sclerosis predominantly by reducing gray matter atrophy. *Mult Scler* 2007;13:490-501
