

El LCR y su actual importancia en la esclerosis múltiple

M. I. GARCÍA-SÁNCHEZ, M. A. GAMERO GARCÍA, G. IZQUIERDO AYUSO

Servicio de Neurología. Unidad de Esclerosis Múltiple. Hospital Universitario Virgen Macarena. Sevilla.

RESUMEN. El gran número de artículos publicados en la última década acerca de la importancia del líquido cefalorraquídeo (LCR) en la esclerosis múltiple (EM), ha hecho plantearnos la necesidad de una revisión en la que se recojan todos los aspectos de interés sobre este tema. La búsqueda de biomarcadores diagnósticos y pronósticos de la enfermedad es la clave común en todos los estudios realizados ya que su descubrimiento daría respuesta a una pregunta aún sin resolver, la patogénesis de la enfermedad. De esta revisión extraemos unas conclusiones finales que pueden servir de ayuda en el conocimiento de los avances más recientemente realizados en el estudio del LCR de los pacientes con EM.

Palabras clave: LCR, esclerosis múltiple, bandas oligoclonales, biomarcadores, diagnóstico, pronóstico.

SUMMARY. Given the great number of papers published in the last decade about the importance of cerebrospinal fluid (CSF) in multiple sclerosis (MS), a close review that comprehended all the different aspects of interest on the subject was needed. The search for diagnosis and prognosis biomarkers of the disease is the common ground in all research. The discovery of such biomarkers would answer the unsolved question of the pathogenesis of this disorder. A final conclusion has been included at the end of this review which could prove useful in understanding the latest advances in studies involving CSF in patients with MS.

Key words: CSF, multiple sclerosis, oligoclonal bands, biomarkers, diagnosis, prognosis.

De manera oficial, la historia de la esclerosis múltiple (EM) comenzó a mediados del siglo XIX cuando dos médicos europeos, Robert Carswell y Jean Cruveilhier, comenzaron a describir sus observaciones sobre una nueva enfermedad. Si bien estos dos investigadores documentaron por primera vez las lesiones patológicas encontradas, fue Charcot el primero en estudiar el cuadro clínico de la misma^{1, 2, 3}. Nadie podría pensar por aquel entonces que la enfermedad desmielinizante que comenzó a investigar Jean-Martin Charcot (1825-1893) en la Salpêtrière, se convirtiera en nuestros días en la enfermedad neurológica más discapacitante en el adulto joven.

Desde aquél entonces, los avances en la investigación han sido absolutamente revolucionarios; las nuevas técnicas de estudio nos llevan a conocer hasta los más profundos secretos del organismo, los genes, pero sin embargo, seguimos sin entender los mecanismos por los cuales una persona joven en general con buenos hábitos y sin causa previa aparente desarrolla una esclerosis múltiple. La causa principal de este hecho es sin duda la propia complejidad de la enfermedad.

Los procesos patofisiológicos incluidos en la EM pasan por la inflamación, desmielinización, daño axonal y mecanismos de reparación. Estos procesos no se presentan de manera uniforme en la población que padece EM, lo que contribuye a la heterogeneidad en la expresión fenotípica de la enfermedad así como en su diagnóstico y su respuesta a las distintas terapias^{4, 5}.

Carácter autoinmune de la enfermedad

Pinceladas de historia

En 1935 Thomas Rivers (Rockefeller Institute NY), estableció el concepto de EM como enfermedad autoinmune, mediante la producción de encefalitis alérgica experimental (EAE) por inoculación de tejido neural en monos^{1, 6}. Fue en 1942 cuando Kabat y sus colaboradores identificaron proteínas anormales, inmunoglobulinas (Ig), en el LCR de personas que padecían EM⁷.

Se llevaron a cabo numerosos estudios electroforéticos^{8, 9, 10}, pero fue Lowenthal, en 1960¹¹, el que demostró el potencial diagnóstico del LCR en virtud de las bandas observadas en la región de las gammaglobulinas al realizar la electroforesis de las proteínas del LCR de pacientes con EM. La identificación de las bandas oligoclonales (BOC) como inmunoglobulinas G se la debemos a los estudios realizados por Link¹², y el trabajo de Tourtellotte en 1980 dio evidencias de la invariabilidad de dichas BOC con el tiempo en pacientes con esclerosis múltiple^{13, 14, 15}.

Todos los resultados obtenidos no sólo pusieron de manifiesto la importancia de la determinación de las BOC como prueba diagnóstica, sino que evidenciaron claramente que el sistema inmune juega un papel determinante en la enfermedad.

La irrupción de la resonancia magnética (RM) craneal como prueba paraclínica de creciente importancia en el diagnóstico de la enfermedad¹⁶ relegó a

un segundo plano la importancia del LCR, pasando a ser una prueba de laboratorio que sólo en los casos dudosos se utilizaba para descartar otras posibles patologías neurológicas.

Con el avance de la técnica y los programas de alta resolución de imagen, la RM se ha reafirmado como una técnica esencial en la EM ya que detecta lesiones características, permite estudiar la evolución de la enfermedad y se utiliza como marcador de eficacia terapéutica.

Entre los años 1972 y 1979 se estableció la utilidad de los potenciales evocados en el diagnóstico de la EM, al demostrarse la ocurrencia de desmielinización y la presencia de correlaciones neurofisiológicas mediante hallazgos histológicos^{17,18}.

Tanto la RM como los potenciales evocados, cuentan con una gran ventaja a su favor frente a la obtención del LCR al ser técnicas no invasivas. En el caso de la punción lumbar, el paciente debe estar informado de los riesgos de la prueba, si bien en la mayoría de los casos la realización de la misma se lleva a cabo sin más consecuencia que un periodo de reposo posterior a la extracción.

Sin embargo, en la última década, el LCR ha ido recuperando nuevamente la importancia que en su momento tuvo. Este hecho queda reflejado en la gran cantidad de publicaciones descritas en los últimos años, cuyo principal objeto de estudio vuelve a ser este preciado fluido. El gran avance de las técnicas para la investigación es el principal responsable de este hecho, al mejorar ostensiblemente la sensibilidad y especificidad de los métodos empleados en los laboratorios en la actualidad para el estudio del LCR.

Secreción intratecal de Inmunoglobulinas: estudios actuales en pacientes con EM

Cuantificación

La cuantificación de la secreción intratecal de IgG se realiza mediante nefelometría y queda reflejada mediante distintas fórmulas^{19,20} de las cuales la más utilizada en la actualidad es la de Tibbling-Link, al introducir en la ecuación la cuantificación de la albúmina como moderador de los niveles de inmunoglobulina²¹. De una manera más visual, la cuantificación es observada mediante los diagramas de Reiber, en los cuales se representan mediante eje de abscisa y ordenada las relaciones correspondientes a las cantidades de albúmina en LCR/suero e IgG en el LCR/suero respectivamente, contenidos en el LCR, en función de una línea base que sirve de patrón para poder obtener el porcentaje de secreción intratecal que presenta un paciente²².

Se considera como valor normal un índice de

Link por debajo de 0,5, no claramente patológico entre 0,5-0,7 y patológico $\geq 0,7$.

Con los datos de cuantificación nos informamos de manera rápida, del estado inflamatorio del sistema nervioso central y de la barrera hematoencefálica (BHE). Comparando los valores normales de las proteínas en el suero y en el LCR, se puede conocer si la BHE presenta alteraciones en su permeabilidad.

Bandas oligoclonales: la medida cualitativa de la secreción intratecal

El término banda oligoclonal se acuñó basándose en la premisa de que en enfermedades neurológicas inflamatorias como la EM, un número altamente restringido de clones de células-B se accionaban dentro del sistema nervioso central en el LCR y se transformaban en células plasmáticas que secretaban Ig. Cada clon producía una Ig específica que presentaba una movilidad electroforética característica²³.

En la práctica se han descrito 5 tipos de patrones que se pueden observar como resultado de la detección de las bandas oligoclonales de IgG en el LCR de los pacientes²⁴:

- Tipo 1: es normal, con una respuesta policlonal tanto en suero como en LCR.

- Tipo 2: es una respuesta típica oligoclonal (bandas discretas de IgG) en el LCR, con una respuesta paralela normal (policlonal) en el suero.

- Tipo 3: patrón oligoclonal tanto en suero como en LCR, pero difieren en los puntos isoelectrónicos de las bandas y/o en la altura de las tasas de los picos relativos entre las bandas de las dos muestras. Se denomina también patrón “mayor que”, puesto que hay un número mayor de bandas oligoclonales en el LCR frente al suero.

- Tipo 4: se ha denominado “patrón en espejo” porque el patrón oligoclonal en el suero y en el LCR es esencialmente el mismo.

- Tipo 5: es la respuesta monoclonal típica de las paraproteínas y muestra de forma grosera 3-5 bandas espaciadas regularmente, siendo más prominentes las que están cerca del cátodo.

Se consideran positivos los tipos 2 y 3, siempre y cuando el número de BOC de IgG diferentes en el LCR frente al suero sea ≥ 2 . En la Figura 1 se muestran algunos de estos patrones mencionados.

Determinación de las bandas oligoclonales de IgG: técnica en continua evolución

Al igual que el avance de la RM ha supuesto una evidente mejora para la valoración de la carga lesional y la atrofia, la determinación de las BOC mediante isoelectroenfoque (IEF)²⁵ fue el primer avance técnico para la mejora de la prueba. Pero lo que definitivamente aumentó la sensibilidad de la misma es

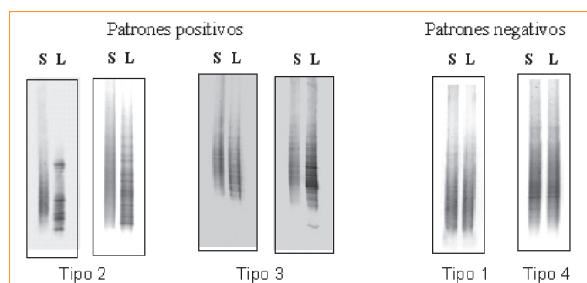


Figura 1 Diferentes patrones de BOC de IgG obtenidos mediante la técnica de isoelectroenfoque seguido de inmunodetección en el laboratorio de biología molecular del Hospital Universitario Virgen Macarena (Sevilla).

el proceso de detección mediante el uso de anticuerpos frente a inmunoglobulina G humana, bien sea por transferencia e inmunodetección posterior o por inmunofijación.

En el artículo publicado por Lunding y Midgard, en el año 2000, se realizó un estudio comparativo entre la detección de la síntesis intratecal de IgG mediante la determinación de las BOC por isoelectroenfoque seguido de inmunofijación y la obtención de las mismas por el procedimiento de electroforesis en gel de agarosa. Se comparaban a su vez los resultados obtenidos con la cuantificación reflejada mediante el índice de Tibbling-Link. La investigación demostró que la sensibilidad se duplicaba al trabajar con isoelectroenfoque seguido de inmunofijación frente a la electroforesis en agarosa, siendo también más sensible que la cuantificación de la secreción intratecal de IgG²⁶.

Artículos más recientes corroboran el mismo hecho. Fortini²⁷ compara los resultados del IEF seguido de transferencia e inmunodetección (*immunoblotting*), con la electroforesis de agarosa de alta resolución, llegando también a la conclusión de la mayor sensibilidad del primer método para la determinación de BOC de IgG en muestras de pacientes neurológicos.

Más recientemente, dos artículos publicados en los años 2005 y 2006 concluyen que la cuantificación de la secreción intratecal de inmunoglobulina G puede ser útil en el sentido de que es una medida fácil y rápida de obtener, pero no puede reemplazar a la determinación cualitativa de las BOC de IgG mediante isoelectroenfoque porque este último es el método más sensible para detectar anomalías en la IgG del LCR de pacientes con enfermedades desmielinizantes^{23,28}.

Sensibilidad y especificidad de la prueba diagnóstica.

A medida que el número de pacientes en los estudios ha ido aumentando, y como consecuencia de los distintos sistemas de detección y tratamiento del

LCR, se ha obtenido una gran disparidad en cuanto a la especificidad y sensibilidad de la prueba diagnóstica. Numerosos artículos han calculado estos parámetros para su propio laboratorio. En el caso del método de isoelectroenfoque seguido de inmunodetección, para pacientes con EM hemos encontrado una variabilidad en la sensibilidad que oscila entre el 95 (Ohman, *et al.*)²⁹ y el 100% (Kostulas, *et al.*)³⁰; y en la especificidad, entre el 82,5% (Falip M, *et al.*)³¹ y el 92,5% (Luisa M Villar, *et al.*)³².

La enorme investigación realizada en este campo, sobre todo en la última década, ha hecho que se publique en el año 2005 un consenso para incrementar la especificidad de la prueba y minimizar el número de falsos diagnósticos. Se recomienda para ello el uso de criterios clínicos y paraclínicos incluyendo la RM, los potenciales evocados y el análisis del LCR.

En el escrito, refrendado por investigadores de reconocimiento mundial, se pone de manifiesto que las variadas sensibilidades y especificidades que se obtienen son debidas a los distintos tratamientos de la muestra y los diferentes métodos seguidos para realizar las pruebas en el laboratorio y plantea una serie de puntos a seguir para llegar a un estándar mínimo aceptable que nos permita comparar resultados. El sistema recomendado es el isoelectroenfoque seguido de alguna técnica de inmunodetección bien sea mediante transferencia e incubación o mediante fijación con anticuerpos³³.

No obstante, métodos nuevos, variantes de los anteriores, parecen representar una alternativa atractiva en las determinaciones de las inmunoglobulinas que provienen de la síntesis intratecal. Los distintos reactivos utilizados en la fase final de la detección de las bandas son los que juegan un papel diferenciador respecto a los procedimientos previos^{32, 34, 35}.

BOC en los pacientes con síndrome neurológico aislado

Las investigaciones en los últimos años están centradas en el diagnóstico precoz de la EM y en la búsqueda de factores pronósticos del desarrollo de la enfermedad. Así, los síndromes neurológicos aislados (SNA) han pasado a ser una de las principales fuentes de investigación en la EM, pasando a ser el estudio del LCR de estos pacientes también de alto interés.

Existen varios artículos que valoran la presencia de bandas oligoclonales en pacientes con SNA, como la ayuda necesaria asociada a los criterios de RM para un temprano diagnóstico diferencial, presentando estos pacientes un factor de riesgo adicional para su conversión a esclerosis múltiple definida (EMD)^{23, 36, 37}.

En un artículo publicado en el 2006 por el grupo

de Álvarez Cermeño y Luisa María Villar, se evalúa el nuevo método de detección de BOC de IgG desarrollado en su laboratorio³², frente a los criterios de RM para predecir la conversión de SNA a EMD. Para estos investigadores, la presencia de BOC de IgG es altamente específica (94,1%) y sensible (91,4%) para predecir una pronta conversión a esclerosis múltiple³⁸.

Presencia de una única banda monoclonal de inmunoglobulina intratecal

Pocos estudios se han llevado a cabo con pacientes que presentan este tipo de patrón de banda, pero los realizados hasta ahora parece que coinciden en sus conclusiones. En el año 2003, Davies y colaboradores llevaron a cabo un estudio realizado con 31 pacientes que presentaban patrón de banda única. Los resultados mostraron que los pacientes que desarrollaron posteriormente más bandas oligoclonales eran principalmente diagnosticados de EMD o bien presentaban un síndrome neurológico aislado debido a desmielinización. Los pacientes cuyo LCR presentó normalidad o mantuvo el patrón de banda única no eran casos de EM³⁹.

En el 2004, Franciotta mostraba, tras sus resultados, que el patrón de banda única podía ser “la punta del iceberg” de la posterior respuesta oligoclonal, apoyando así los resultados obtenidos por el grupo de Davies. Un posterior estudio con un grupo de muestra más amplio, publicado en el 2005, corroboró de nuevo los resultados anteriormente obtenidos^{40,41}.

La IgA y la IgM

Las BOC de IgA e IgM también aparecen en los pacientes con EM, aunque no de manera tan característica como las de IgG^{42,43}.

Sobre la IgA y su implicación en el mecanismo inmunológico de la enfermedad hay poco descrito y con resultados contradictorios. En 2004, un grupo del hospital universitario de Suecia estudió el valor pronóstico de los índices de IgA e IgG del LCR en pacientes con EM. En el estudio retrospectivo de 68 pacientes escogidos entre los años 1980-1988, de los cuales aún vivían 61, se observó que el índice de IgA era significativamente más alto que en los fallecidos, sugiriendo que los anticuerpos IgA pudieran competir y proteger contra la degradación de la mielina causada por IgM e IgG en la esclerosis múltiple. El estudio justifica así la necesidad de una investigación prospectiva que verificara los resultados⁴⁴.

En un artículo publicado en 2005, mediante estudios inmunohistoquímicos se demostraba una infiltración de células plasmáticas positivas para el dímero y polímero IgA1 y A2 en los espacios periventriculares, en las lesiones parenquimatosas de EM y en la sustancia blanca adyacente. Mediante doble tinción de inmu-

nofluorescencia se mostraron enlaces de anticuerpos frente a IgA en axones y en las paredes de los microvasos en las áreas de actividad e inactividad crónica de desmielinización, observándose daño axonal en esas zonas. Los resultados sugieren que las IgA en el SNC pudieran contribuir al daño axonal en la EM⁴⁵.

En cuanto a las IgM, los estudios realizados en España por el grupo de Álvarez Cermeño y Villar, sugieren que la presencia de bandas de IgM en el LCR pudiera estar asociada a un peor pronóstico de la enfermedad a largo plazo⁴³. En 2005, el mismo grupo de investigación, tras el estudio de 15 pacientes que presentaban anticuerpos intratecales IgM anti-lípidos de la mielina, encontró que los pacientes con SNA incluidos en el estudio sufrían más tempranamente un segundo brote (90% tenían un brote antes de los 8 meses), y en general tenían mayor número de brotes y discapacidad cuando eran comparados con un grupo de 33 pacientes de EM que carecían de dichas bandas⁴⁶.

Un artículo muy reciente apoya esta teoría, verificando en su estudio una posible relación entre el índice de IgM (punto de corte 0,1) y la evolución clínica de la enfermedad mediante la evaluación del estatus clínico que en ese momento presentaban los pacientes⁴⁷.

En este mismo año, un grupo holandés publica, tras su estudio, la relación entre la carga lesional y el índice de IgM, defendiendo de nuevo el papel patogénico de la IgM en la EM⁴⁸. En contraposición a esta hipótesis, los datos obtenidos por Schneider y colaboradores, publicados también en 2007, no sostienen la idea de que la presencia de las BOC de IgM en el LCR pueda predecir un curso desfavorable de la enfermedad. En la investigación realizada no se detecta correlación entre la presencia de las BOC de IgM, ni el índice de IgM y el riesgo de conversión a EMD durante el seguimiento de la población en estudio. De 42 pacientes con SNA, 31 presentaban BOC de IgM, no encontrando diferencias entre ambos grupos⁴⁹.

Ausencia de BOC de IgG en pacientes con EM. Implicación en la evolución de su enfermedad

Como hemos visto, la presencia de BOC de IgG en LCR es de gran importancia para el diagnóstico. La causa por la cual en algunos pacientes con EMD no se observa la aparición de estas inmunoglobulinas G en el LCR ha sido objeto de interés por parte de los investigadores. Ya en 1996 un estudio en pacientes con EM y bandas negativas, presentado por Zeman, concluía que los diagnósticos de pacientes que no presentaban bandas en su LCR debían tomarse con precaución, y que estos casos parecían estar relacionados con un pronóstico relativamente benigno de la enfermedad⁵⁰.

En el año 2003, Mesaros, en un estudio comparativo entre pacientes con EMD que presentaban presencia o ausencia de BOC de IgG, revela no encontrar diferencias significativas en los parámetros clínicos y neurofisiológicos entre los dos grupos de pacientes. Sin embargo, encontró una tendencia hacia un mejor pronóstico de la enfermedad en los pacientes de EM con BOC de IgG negativas⁵¹.

Esta conclusión también fue apoyada más tarde por un grupo portugués en el año 2005. En el artículo quedan reflejadas las diferencias altamente significativas en la correlación entre la presencia o ausencia de BOC de IgG en el LCR y la severidad de la enfermedad. Así, los pacientes con un patrón negativo presentaban un curso más benigno de la enfermedad, en función del índice de progresión de Poser calculado y en comparación a los pacientes con BOC positivas. En contraposición, no encontraban relación estadísticamente significativa entre los resultados de las BOC de IgG y otros parámetros clínicos, como el sexo, curso clínico y duración de la enfermedad^{52, 53}.

En el año 2006, un grupo italiano describe en un grupo de 209 pacientes con esclerosis múltiple remitente-recidivante (RR), de los que 22 (10,6%) no presentaban BOC de IgG, que los pacientes del grupo con ausencia de bandas tenían una progresión clínica más favorable y un número de placas significativamente menor en la RM basal respecto al grupo con BOC positivas. Concluyen en el artículo que la ausencia de BOC unido a un menor número de lesiones en T2 en la RM basal son factores pronósticos favorables e influyen positivamente en la respuesta clínica al interferón beta en pacientes con EMRR⁵⁴.

Secreción intratecal: relación con la patogénesis de la enfermedad

Aunque evidencias inmunológicas e histológicas actuales sostienen que las células B juegan un rol importante en la patogénesis de la EM, a día de hoy no se conoce cuál es su función real en el desarrollo de la enfermedad^{55, 56}.

En cuanto al particular significado de la secreción intratecal en la patogénesis de la enfermedad, los resultados obtenidos de los estudios realizados para descifrar los antígenos específicos de las bandas oligoclonales tampoco son concluyentes para poder entender la patogénesis de la lesión. Aunque un gran número de proyectos de investigación se han centrado en cómo tiene lugar la producción de los autoanticuerpos, encontrándose reactividad frente a muy diversos factores como la mielina y la glicoproteína oligodendrocítica, glicolípidos, antígenos axonales, componentes endoteliales, neurofilamento, proteínas de estrés y herpes virus tipo 6⁵⁷⁻⁶¹, sin embargo ninguno parece ser específico para esclerosis múltiple y

su papel en la patogénesis de la enfermedad es aún desconocido.

Un artículo del año 2006 propone la implicación de las células B en la patogénesis de la EM y que la Ig y/o las células B pueden jugar un papel median-do o regulando la respuesta inmune en los momentos críticos de la enfermedad, independientemente de su función como anticuerpo. Concluye exponiendo que las estrategias terapéuticas dirigidas hacia las células B/Ig pueden ser efectivas en la EM^{62, 63}.

Marcadores biológicos en la EM

Las estrategias terapéuticas futuras tienden a la combinación de diferentes tratamientos que incidan sobre procesos patofisiológicos previamente marcados. Para valorar tanto el éxito en el desarrollo de estos tratamientos, como su eficacia, es fundamental contar con biomarcadores de la actividad de la enfermedad y de la progresión de la misma. Los marcadores biológicos permitirían seleccionar la población de pacientes en la que los agentes terapéuticos pueden ser efectivos.

Los parámetros establecidos de RM para medir la actividad de la enfermedad (lesiones captadoras de gadolinio y cambios en el volumen lesional en imágenes T2) se correlacionan sólo débilmente con las variables clínicas, mientras que los marcadores biológicos de la enfermedad en fluidos corporales podrían ser capaces de medir el efecto de las terapias inmunes tanto en la actividad como en la progresión de la enfermedad. De hecho, los biomarcadores son esenciales para la comprensión de la patofisiología de la EM, así como para los propósitos diagnósticos y terapéuticos^{5, 64}.

En una revisión acerca de los biomarcadores, Bielekova⁵ propone una clasificación de posibles biomarcadores específicos de diferentes procesos fisiopatológicos en esclerosis múltiple. Entre otros muchos, en su clasificación incluye los siguientes:

- Biomarcadores que reflejan alteración en el sistema inmune: citoquinas y sus receptores, quemoquinas y sus receptores, anticuerpos (Ig), moléculas de adhesión y cambios en las subpoblaciones celulares (linfocitos).
- Biomarcadores de daño axonal/neuronal: proteínas solubles de la mielina, metabolitos NO, S100, filamentos neuronales y enolasa específica neuronal.
- Biomarcadores del incremento de permeabilidad a través de la barrera hematoencefálica medido en base a proteínas derivadas de la sangre: metaloproteinasas.

La cercanía del LCR al sistema nervioso central hace que pueda ser el fluido más informativo sobre las alteraciones que se producen a este nivel. Por otra parte, la existencia en el LCR de marcadores bioló-

gicos ya conocidos de los procesos patofisiológicos como son la albúmina, involucrada en las alteraciones de la BHE, la IgG, relacionada con la inmunología humoral o los productos de la proteína básica de la mielina, marcador del proceso de desmielinización que se produce, ha llevado a pensar que la posibilidad de identificar algún marcador específico de la progresión de la enfermedad sea real⁶⁵.

Repasaremos los resultados de algunos de los marcadores biológicos más investigados en el LCR.

Biomarcadores que reflejan alteración en el sistema inmune

Linfocitos B: anticuerpos

Las bandas oligoclonales son más que una herramienta de diagnóstico aunque sigue siendo éste su principal valor. Con el aumento de casos de pacientes diagnosticados de EM se han conseguido avances de gran importancia que proponen al LCR, mediante el estudio de las bandas oligoclonales, como un importante fluido donde identificar los posibles y futuros biomarcadores de la enfermedad.

Durante mucho tiempo se han intentado relacionar los patrones y el número de BOC de IgG con los distintos tipos de EM, así como se ha buscado una posible marca predictiva de la evolución del paciente, en un intento de arrojar luz sobre el papel de las BOC de IgG, pero a día de hoy su significado sigue siendo controvertido. En un estudio realizado en el 2000 se evaluó la importancia de las BOC de IgG en la estabilidad de la enfermedad. Los resultados indicaban que los pacientes sin BOC de IgG evolucionaban hacia secundaria progresiva (SP) significativamente más tarde que los pacientes con BOC de IgG positivas⁶⁶. Un año más tarde, Avasarala y Cross encontraron que los pacientes que presentaban menores valores (<3,5) en la escala de discapacidad (EDSS) presentaban un bajo número de bandas oligoclonales de IgG, respecto a los que tenían valores altos en la EDSS⁶⁷.

En este mismo año, 2007, los resultados obtenidos por Koch y Heersema discrepan de los anteriores, ya que sus resultados sugieren que la presencia y el número de BOC de IgG no influyen en el desarrollo de la EM⁶⁸.

Linfocitos T

En cuanto a los linfocitos T también presentes en el LCR, las investigaciones realizadas tratan de buscar qué papel cumplen estas células en la EM. El conocimiento de un aumento en la relación entre células T CD4/CD8 en pacientes con EM, ha sido ampliamente estudiado, sugiriendo que los linfocitos T juegan un papel importante en la patogénesis de la

enfermedad. En el año 2002, Jacobsen M aporta nuevos datos que apoyan esta hipótesis al demostrar un selectivo enriquecimiento de la memoria de las células T CD8+ en el LCR de pacientes con EM⁶⁹.

Otro artículo muy reciente propone la implicación de las células T en el curso de la enfermedad ya que los resultados de su investigación sugieren que la activación de la memoria de las células T CD4+ está asociada a la exacerbación de la EM y la activación de la memoria TCD8+ refleja la desregulación del sistema inmunológico en los pacientes con dicha enfermedad⁷⁰.

Muchos de los trabajos realizados relacionan la modificación de las subpoblaciones de linfocitos T con el tratamiento aplicado a los pacientes. En la mayoría de los casos los tratamientos disminuyen la producción de linfocitos, alterando la relación celular T CD4+/CD8+⁷¹⁻⁷³.

Citocinas y quimiocinas: mediadores solubles de la inmunidad

Citocinas

Los estudios realizados hasta ahora relacionan la presencia de citoquinas proinflamatorias en el LCR con los estados de actividad de la enfermedad, mientras que los mediadores antiinflamatorios dominarían en la etapa de remisión. En cuanto a las proinflamatorias, el factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α) es particularmente importante en los periodos de actividad de la enfermedad ya que parece aumentar en la EM progresiva o cuando el paciente padece un brote, manteniéndose en niveles normales cuando la enfermedad se encuentra estabilizada⁷⁴.

En diferentes estudios se han encontrado numerosas citocinas que son importantes en la regulación de la inflamación mediada por las células T, entre ellas: IL-1; IL-2; IL-4; IL-6; IL-10; IL-12; IL-15; IL-18. En particular, la IL-4, IL-6 e IL-10 aparecen como indicadores de la estimulación de las células B intratecales y la producción de anticuerpos⁷⁵.

Una reciente revisión del año 2002 pone de manifiesto la controversia encontrada en el estudio de algunas de estas citocinas, y la necesidad de un mayor número de estudios para aclarar el papel que estos mediadores juegan en la enfermedad⁷⁶.

Quimiocinas

Las herramientas necesarias para que ocurra la migración de las células inflamatorias desde la circulación hasta el sistema nervioso central, son las quimiocinas y sus receptores. Las quimiocinas son un tipo de citocinas que comparten una región característica de residuos de cisteína en su estructura. Su expresión en las lesiones de EM refleja la composición

de los infiltrados inflamatorios así como la actividad y estado de las lesiones¹⁵.

Se han estudiado un gran número de la larga familia de estos marcadores asociados al sistema inmunitario, entre ellos el CXCL10 (también denominado IP-10: proteína 10 inducida por IFN- γ) y su receptor específico CXCR3. Se han encontrado niveles elevados de IP-10 en el LCR de pacientes con EM y una expresión de su receptor en la mayoría de los linfocitos presentes en el mismo^{77, 78}. Un estudio reciente relaciona la expresión del receptor CXCR3 en las células T del LCR con la aparición de lesiones activas en RMN de pacientes con EMRR, apoyando la idea de la migración de las células T activadas desde la circulación al interior del LCR⁷⁹.

En el artículo publicado en 2002 por Martínez-Cáceres se estudia la expresión de un grupo de receptores de quimiocinas CC y CXC en sangre periférica de 68 pacientes con EM frente a 26 controles. Los resultados muestran un aumento significativo de la expresión de CCR5 en la superficie de células T CD4+ y de CXCR3 y CXCR4 en células CD14+ en los pacientes con EM comparado con los controles. Los niveles de CXCL10 (IP-10) y CCL5 (RANTES) también fueron elevados en el grupo de pacientes con EMRR. Los resultados apoyan la idea de que las quimiocinas y sus receptores están relacionados con la patogénesis de la EM, pero no se han encontrado patrones característicos de expresión de los receptores de las quimiocinas en cada subtipo de la enfermedad⁷⁷.

Marcadores del daño axonal

Proteína tau

En cuanto a los marcadores de daño axonal la proteína tau es quizás sobre la que mayor número de estudios se han presentado. Los más recientes siguen marcando la controversia que se mantenía desde un principio.

Por una parte, hay publicaciones que ponen de manifiesto el valor de la proteína tau como biomarcador del daño axonal y encuentran niveles superiores en pacientes con EM frente a los controles⁸⁰. Además, se han estudiado numerosas relaciones estadísticamente significativas: pacientes remitentes recidivantes con proteína alta en LCR incrementan más rápidamente un punto en la EDSS⁸¹, pacientes con lesiones cerebrales que captan gadolinio en la RM presentan un aumento significativo de la proteína tau en el LCR, concluyendo que los niveles de tau y de neurofilamento, junto con la RM, pueden mejorar la predicción de la conversión de SNA a EMD⁸².

En contraposición, otros artículos sugieren que la medida como rutina de la proteína tau no parece ser

útil como marcador clínico del daño axonal, al encontrar similares concentraciones en el LCR de pacientes con EM frente a pacientes control (pacientes sin enfermedad neurológica)^{83, 84}.

Distintos enfoques en la búsqueda de un mismo fin: la proteómica y la genética

Proteómica

La proteómica estudia el proteoma, el conjunto de proteínas que se expresa a partir de un genoma. El proteoma es un elemento altamente dinámico, dado que sus componentes variarán en un organismo, tejido, célula o compartimiento subcelular dados, como consecuencia de cambios en su entorno, estrés, administración de fármacos, estado fisiológico, etc., incrementando de forma notable el número de proteínas presentes en un momento dado como consecuencia de la activación o supresión de determinados genes o la inducción de cambios en el estado de modificación post-traduccionales de las proteínas⁸⁵.

Estos cambios también pueden producirse en la forma en la que las proteínas interaccionan para formar complejos macromoleculares, siendo el estudio de éstos una de las áreas activas de la proteómica.

Básicamente, la proteómica es un término muy amplio que involucra a un conjunto de técnicas destinadas a resolver (geles de poliacrilamida monodimensionales y bidimensionales de alta resolución, técnicas cromatográficas), cuantificar (escáner, phosphorimatger), e identificar y caracterizar proteínas (espectrometría de masas, secuenciación de proteínas por degradación de Edman, Western blot, etc.), así como guardar y analizar los datos (bioinformática, bancos de datos de geles 2D-E y proteínas), así como comunicar y compartir los resultados (web, publicaciones, etc.).

La ciencia de la proteómica no es nueva, pero ha dado un salto cualitativo y cuantitativo sensible gracias al desarrollo convergente en diferentes áreas de investigación, tales como la disponibilidad de los genomas completos de un número creciente de organismos, incluido el hombre, la potencia de computación actual y las herramientas bioinformáticas, y finalmente, un refinamiento sin precedentes en las técnicas de análisis, tanto en sus posibilidades como en sensibilidad. Así, aunque el término incluye todas aquellas técnicas que nos proporcionen información sobre las proteínas, hoy en día, cuando se habla de proteómica, suele restringirse a los procedimientos más actuales que permiten la separación y el análisis de proteínas, es decir, la electroforesis bidimensional, las técnicas cromatográficas de alta resolución y el espectrómetro de masas.

Los mecanismos patogénicos de la EM a nivel

molecular aún son poco conocidos en la actualidad y no se dispone de marcadores proteicos fiables. La escasa investigación existente hasta el momento en este campo para la EM se ha llevado a cabo realizando principalmente el análisis proteómico serológico de los pacientes. Pero en pocos años se han puesto a punto los métodos para el uso del LCR como muestra, empezándose a obtener resultados de gran interés.

Recientemente, un grupo de investigadores belgas, mediante geles bidimensionales, identificaron 65 proteínas diferentes en pacientes de EM de las que 18 no habían sido reportadas previamente⁸⁶. Entre ellas se encontraron:

1.- ALDA: Aldolasa A envuelta en glicolisis. Se han encontrado niveles elevados en esclerosis lateral amiotrófica

2.- ANN: Anexina 1 muestra propiedades antiinflamatorias inducibles por los glucocorticoides y se ha descrito su relación lesiones activas en EM. Es una proteína enlazada a calcio.

3.- FHR-1: proteína 1 relacionada con el factor H del complemento. Se encuentra en el plasma. Las múltiples funciones del complemento pueden contribuir a la patofisiología de las enfermedades desmielinizantes inflamatorias incluida la EM.

4.- GPX: Glutathion peroxidasa. Es una enzima antioxidante.

5.- PSOR: Psoriasina reacción inmunohistoquímica en lesiones cerebrales de pacientes con EM. Niveles elevados han sido medidos en LCR de pacientes con Alzheimer en fase inicial en comparación a personas control. Es una proteína unida al calcio y posee actividad quimiotáctica hacia CD4+ linfocitos T y neutrófilos, y parece ser importante en los procesos inflamatorios en esclerosis múltiple.

6.- NPC-2: Proteína tipo C2. Encontrada en la enfermedad de Niemann-Pick.

7.- TETN: Tetranectina. Proteína plasmática secretada por diferentes tejidos, incluido el cerebro. Se conoce su capacidad de enlace a varias proteínas, como el factor de crecimiento de los hepatocitos y activador del plasminógeno, lo que sugiere el importante papel en el sistema nervioso central al estar ambas proteínas implicadas en el proceso del daño cerebral.

En el año 2006, el mismo grupo identificó mediante cromatografía líquida y espectrometría de masa 60 nuevas proteínas en el LCR de pacientes con EM⁸⁷.

En ese mismo año, David y sus colaboradores, identificaron, mediante técnicas proteómicas, una única proteína, una variante de la cistatina C, que fue 100% específica en los pacientes con EMD y SNA frente al grupo de pacientes con mielitis transversa y otras enfermedades neurológicas incluidos como

controles en el estudio. Esta proteína es un inhibidor de las cisteín-proteasas, entre las que están incluidas las catepsinas, las cuales han sido implicadas en una gran variedad de efectos como la desgranulación de los linfocitos citotóxicos⁸⁸.

Marcadores genéticos

Aunque la etiología de la enfermedad es aún desconocida, es ampliamente reconocida la presencia de factores ambientales, así como la evidencia de una predisposición genética asociada al desarrollo de la enfermedad. En humanos, la mejor evidencia de que existen genes de susceptibilidad a la enfermedad proviene de la búsqueda de recurrencia dentro de una misma familia⁸⁹, y particularmente de los estudios de concordancia realizados en gemelos⁹⁰.

Al igual que en las técnicas de identificación de proteínas, el conocimiento completo del genoma humano, el avance en los métodos para el rastreo de cromosomas, y la posible selección de marcadores genéticos específicos a partir de genes candidatos de la enfermedad, hace que numerosas investigaciones se estén llevando a cabo en este campo con el mismo fin, el de encontrar marcadores en este caso genéticos de la esclerosis múltiple.

Los alelos de clase II HLA-DR(2)15 y DQ6 del complejo mayor de histocompatibilidad siguen siendo hoy en día los principales candidatos a pesar de que evidencias de su relación con la EM ya eran conocidas en 1987⁹¹⁻⁹³. No obstante, ningún estudio, hasta ahora, ha podido relacionar esta susceptibilidad con alguno de los signos clínicos de la enfermedad, ni con el pronóstico de la misma; tan sólo la presencia de DR(2)15 parece estar asociada al sexo femenino y a una menor edad en el momento del diagnóstico de la enfermedad^{94,95}. Sin embargo, parece muy relevante la identificación de dos nuevos genes IL7R-alfa e IL2R que se ha llevado a cabo en el marco de tres proyectos de investigación a gran escala en el que han intervenido EEUU junto a numerosos países europeos.

Conclusiones

El LCR en el diagnóstico de la EM

La inclusión del LCR en los criterios diagnósticos de McDonald recientemente revisados es el principal punto por el que se debe considerar la importancia de este fluido en el diagnóstico de la enfermedad⁹⁶.

Los estudios realizados durante la última década han apoyado la necesidad y utilidad del LCR, unido a la RM y los potenciales evocados, como los factores más importantes, junto a la clínica del paciente, para aumentar al máximo la especificidad en el diagnóstico de la EM.

En concreto, la determinación de bandas oligoclonales es particularmente útil para el diagnóstico de esclerosis múltiple primaria progresiva, en aquellos pacientes de edad más avanzada que presenten un desarrollo de los síntomas en años posteriores, ya que las lesiones en RM se han podido atribuir en un primer momento a su edad y no al resultado de la desmielinización inflamatoria¹⁵. Por otra parte, en aquellos casos en que la primera manifestación clínica es atípica y la RM no es claramente patológica, pero la anamnesis y exploración neurológica deriva hacia el diagnóstico de EM, el estudio del LCR es una importante ayuda en la precisión del diagnóstico.

Hay que tener en cuenta que tanto el comienzo como el desarrollo de la enfermedad son diferentes en cada paciente, debido a los distintos niveles de afectación y a las distintas respuestas, tanto de tipo inmunitario como degenerativo, que una persona puede tener por su propia identidad celular. De ahí que el propio médico tendrá que evaluar para cada paciente el valor del LCR en ese diagnóstico en particular.

En cuanto a la cuantificación de la secreción intratecal, los estudios realizados marcan un claro límite de sensibilidad en los métodos de cuantificación, otorgándole mayor importancia al estudio cualitativo. Debemos saber que en el análisis cuantitativo cada paciente se compara con una gran población y, por lo tanto, el rango de referencia de las proteínas derivadas de la sangre en el LCR de los pacientes es muy amplio. En el análisis cualitativo los patrones del IgG del LCR de cada paciente se comparan únicamente con su propia muestra de suero. Por ello los artículos referencian el uso de la cuantificación como un dato de interés pero nunca puede suplir el papel que juega la determinación de las bandas oligoclonales de IgG, en el diagnóstico de la enfermedad.

Con respecto al procedimiento para tratar la muestra de LCR debe ser importante para todos los laboratorios seguir unas mínimas normas que permitan relacionar los resultados obtenidos en los distintos centros de investigación. Deberían tenerse en cuenta las recomendaciones dadas en el artículo consenso del año 2005³³ a este respecto, para aunar criterios y obtener un mínimo exigible de referencia a la hora de interpretar los resultados obtenidos. Parece claro, por el número de estudios que así lo corroboran, que la técnica más fiable y sensible para la determinación de las BOC con la que contamos hoy en día es el isoelectroenfoque seguido de inmunodetección.

Biomarcadores en el LCR de los pacientes con EM

En el año 2002, nuestro grupo puso de manifiesto el valor del índice de IgG como marcador de progresión de la enfermedad. Encontramos que los pacien-

tes con un índice de Link muy elevado progresaban más rápidamente que el resto de pacientes en estudio⁹⁷. No obstante, la búsqueda de relaciones entre las BOC de IgG y el desarrollo de la enfermedad no ha dado frutos a día de hoy. Sin embargo, la presencia de IgM en los pacientes con EM parece sugerir un peor pronóstico de la enfermedad y la posibilidad de servir como marcador de una pronta conversión a EMD en aquellos pacientes con SNA. Estos estudios tienen una carencia importante en la mayoría de los casos, y es el escaso número de pacientes con el que se trabaja. Obviamente, la extracción de este tipo de muestras depende exclusivamente de lo que opine el neurólogo y en ningún caso debe estar al servicio del investigador. Esto conlleva la necesidad de numerosos estudios en muestras poblacionales diferentes que corroboren y aúnen resultados para llegar a una conclusión definitiva.

También parece dilucidarse con un gran apoyo por parte de las investigaciones realizadas, la relación entre la ausencia de BOC de IgG y la evolución benigna de la enfermedad. Aquí se puede plantear cierta reflexión pues hay pacientes en los que el efecto de la enfermedad sobre el sistema inmunológico no comienza a observarse hasta pasado un determinado tiempo^{40, 41}. Sería interesante poder confirmar si estos pacientes presentan una posterior respuesta oligoclonal o, por el contrario, mantienen su patrón negativo. Según los resultados obtenidos en los estudios de BOC única (considerados patrones negativos hoy en día), no se debería descartar una posible EM. Probablemente, hacer un seguimiento de estos pacientes nos llevará a aumentar la confianza en un diagnóstico más certero.

En cuanto a la búsqueda de otros biomarcadores de inmunidad, como los linfocitos, las citocinas y las quimiocinas, su estudio nos informa sobre los mecanismos posibles que forman parte de la respuesta inmune del sistema nervioso central a la enfermedad, mostrando además dianas sobre las que nuevos fármacos deben actuar. Si bien, como biomarcadores, no son específicos de la EM, y de momento no se han podido encontrar patrones característicos para la enfermedad.

Aunque en esta revisión hemos tratado sólo algunos de los posibles biomarcadores, de inmunidad y de daño axonal, son más numerosos los que están ahora mismo en estudio en el LCR. Probablemente, en pocos años, se obtengan datos más contundentes y seguros que nos den luz sobre la fisiopatología de la EM.

Respecto a la proteómica, no podemos olvidar que la dificultad del tratamiento de la muestra (contiene una alta cantidad de sales, azúcares y lípidos, predominan las proteínas de bajo peso molecular, la

cantidad de proteína total es tan sólo de 0,3-0,7 µg/µl) y la complejidad de la técnica, hace que exista una clara carencia de estudios que comparen los posibles cambios en el proteoma de los distintos tipos de EM. Aunque la tecnología para el análisis de las proteínas progresa rápidamente aún se requiere una cantidad de muestra grande y mucho tiempo para que la interpretación de los datos sea correcta. Sin embargo, a pesar de las limitaciones actuales, la proteómica tiene un enorme potencial para futuras investigaciones.

En cuanto a la genética de la EM, la asociación con el HLA de clase II, DR(2)15 es la que se ha demostrado indiscutiblemente. Los estudios genéticos más complejos parecen sugerir un modelo de herencia poligénico para la EM, en el que existen varios genes con un efecto menor y ninguno con un efecto predominante. Sin embargo, la identificación de los dos nuevos genes implicados en la patología de la enfermedad abrirá de nuevo el camino en la búsqueda de otros genes de susceptibilidad a la EM.

Probablemente, encontrar biomarcadores específicos de la EM en el LCR de los pacientes suponga un importante esfuerzo por parte de los investigadores para unificar los estudios realizados. Son muchos

puntos los que habría que tener en cuenta, desde realizar ensayos clínicos a gran escala (ya propuesto por Hans Link) debido a que el número de pacientes se incrementaría notablemente, así como la posibilidad de obtener al menos dos muestras separadas en un tiempo establecido. Por otra parte, es preciso seguir sistemas de trabajo estandarizados (mismo tipo de técnicas para cada tipo de estudio), tiempo de recolección de la muestra y, algo fundamental, realizar la investigación considerando grupos de pacientes en función de su patrón de bandas inmunológico.

Además, los distintos criterios diagnósticos que cada grupo de investigación escoge para la inclusión de los pacientes en su estudio, sesga en gran medida la posibilidad de comparar resultados en grupos que en principio deberían presentar las mismas características.

Podemos concluir que aunque entre las desventajas del estudio del LCR se encuentre la naturaleza invasiva aunque relativamente benigna de su extracción, la cantidad de información que nos ofrece, y que falta aún por descubrir, nos indica que el papel del LCR en la EM es el de un preciado fluido que aún tiene mucho que decir.

BIBLIOGRAFÍA

- 1.- Moreira MA, Tilbery CP, Lana-Peixoto MA, Mendes MF, Kaimen-Maciél DR, Callegaro D. Historical aspects of multiple sclerosis. *Rev Neurol* 2002 Feb 16-28; 34 (4): 379-383.
- 2.- Rascol A, Clanet M. Multiple sclerosis From Charcot and Vulpian to the present time. *Rev Neurol (Paris)* 1982; 138 (12): 921-930.
- 3.- Compston A. The story of multiple sclerosis. In Compston A, Ebers G, McDonald I, Lassmann H, Matthews B, Wekerle H, eds. *McAlpine's multiple sclerosis*. London: Churchill Livingstone; 1999: 3-42.
- 4.- Fernández-Fernández O. Clinical features of relapsing remitting-multiple sclerosis. Prognostic factors. *Rev Neurol* 2002 Dec 1-15; 35 (11): 1067-1073.
- 5.- Bielekova B, Martin R. Development of biomarkers in multiple sclerosis. *Brain* 2004 Jul; 127 (7): 1463-1478.
- 6.- Rivers TM, Schwentker FF. Encephalomyelitis accompanied by myelin destruction experimentally produced in monkeys. *J Exp Med* 1935; 61: 689-702.
- 7.- Kabat EA, Wolf A, Bezer AE. Rapid production of acute disseminated encephalomyelitis in rhesus monkeys by injection of brain tissue with adjuvants. *Science* 1946; 104: 363.
- 8.- Bauer H. Über die Bedeutung der Papier-Elektrophorese des Liquors für die klinische Forschung. *Dtsch Z Nervenheilkd* 1953 Sep 15; 170 (5): 381-401.
- 9.- Cumings JN. The examination of the cerebrospinal fluid and cerebral cyst fluid by paper strip electrophoresis. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 1953 Aug; 16 (3): 152-157.
- 10.- Felgenhauer K. Vergleichende Disc-elektrophorese von Serum und Liquor cerebrospinalis, 1971 Stuttgart: Thieme.
- 11.- Lowenthal A, Van Sande M, Karcher D. The differential diagnosis of neurological diseases by fractionating electrophoretically the CSF gamma-globulins. *J Neurochem* 1960; 6: 51-56.
- 12.- Link H. Immunoglobulin G and low molecular weight proteins in human cerebrospinal fluid. Chemical and immunological characterisation with special reference to multiple sclerosis. *Acta Neurol Scand* 1967; 43: Suppl 28: 1-136.
- 13.- Tourtellotte WW, Potvin AR, Baumhefner RW, Potvin JH, Ma BI, Syndulko K, et al. Multiple sclerosis de novo CNS IgG synthesis. Effect of CNS irradiation. *Arch Neurol* 1980 Oct; 37 (10): 620-624.
- 14.- Tourtellotte WW, Baumhefner RW, Potvin AR, Ma BI, Potvin JH, Mendez M, et al. Multiple sclerosis de novo CNS IgG synthesis: effect of ACTH and corticosteroids. *Neurology* 1980 Nov; 30 (11): 1155-1162.

- 15.- Compston A. The story of multiple sclerosis. In Compston A, Confavreux C, Lassmann H, McDonald I, Miller B, Noseworthy J, Smith K, Wekerle H eds. *McAlpine's multiple sclerosis*. Fourth edition London: Churchill Livingstone; 2005: 3-68.
- 16.- Young IR, Hall AS, Pallis CA, Legg NJ, Bydder GM, Steiner RE. Nuclear magnetic resonance imaging of the brain in multiple sclerosis. *Lancet* 1981 Nov 14; 2 (8255): 1063-1066.
- 17.- Halliday AM, McDonald WI, Mushin J. Delayed visual evoked response in optic neuritis. *Lancet* 1972 May 6; 1 (7758): 982-985.
- 18.- Smith EJ, Blakemore WF, McDonald WI. Central remyelination restores secure conduction. *Nature* 1979 Aug 2; 280 (5721): 395-396.
- 19.- Syndulko K, Tourtellotte WW, Conrad AJ, Izquierdo G. Trans-blood-brain-barrier albumin leakage and comparisons of intrathecal IgG synthesis calculations in multiple sclerosis patients. Multiple Sclerosis Study Group, Alpha Interferon Study Group, and Azathioprine Study Group. *J Neuroimmunol* 1993 Jul; 46 (1-2): 185-192.
- 20.- Burcet J, Zabay JM, Usón M, Mulet J, Figuerola A, Viader C. Síntesis intratecal de IgG valorada mediante diferentes fórmulas: interés del análisis multivariante para el diagnóstico de esclerosis múltiple. *Rev Neurol* 2000 Nov 1-15; 31 (9): 812-816.
- 21.- Tibbling G, Link H, Ohman S. Principles of albumin and IgG analyses in neurological disorders. I. Establishment of reference values. *Scand J Clin Lab Invest* 1977 Sep; 37 (5): 385-90.
- 22.- Reiber H, Felgenhauer K. Protein transfer at the blood cerebrospinal fluid barrier and the quantitation of the humoral immune response within the central nervous system. *Clin Chim Acta* 1987 Mar 30; 163 (3): 319-328.
- 23.- Link H, Huang YM. Oligoclonal bands in multiple sclerosis cerebrospinal fluid: an update on methodology and clinical usefulness. *J Neuroimmunol* 2006 Nov; 180 (1-2): 17-28.
- 24.- Thompson EJ, Freedman MS. Cerebrospinal fluid analysis in the diagnosis of multiple sclerosis. *Adv Neurol* 2006; 98: 147-160.
- 25.- Staugaitis SM, Shapshak P, Tourtelotte WW, Lee MM, Reiber HO. Isoelectric focusing of unconcentrated cerebrospinal fluid: Applications to ultrasensitive analysis of oligoclonal immunoglobulin G. *Electrophoresis* 1985; 6: 287-291.
- 26.- Lunding J, Midgard R, Vedeler CA. Oligoclonal bands in cerebrospinal fluid: a comparative study of isoelectric focusing, agarose electrophoresis and IgG index. *Acta Neurol Scand* 2000 Nov; 102 (5): 322-325.
- 27.- Fortini AS, Sanders EL, Weinshenker BG, Katzmann JA. Cerebrospinal fluid oligoclonal bands in the diagnosis of multiple sclerosis. Isoelectric focusing with IgG immunoblotting compared with high-resolution agarose gel electrophoresis and cerebrospinal fluid IgG index. *Am J Clin Pathol* 2003 Nov; 120 (5): 672-675.
- 28.- Mayringer I, Timeltaler B, Deisenhammer F. Correlation between the IgG index, oligoclonal bands in CSF, and the diagnosis of demyelinating diseases. *Eur J Neurol* 2005 Jul; 12 (7): 527-530.
- 29.- Ohman S, Ernerudh J, Forsberg P, Henriksson A, von Schenck H, Vrethem M. Comparison of seven formulae and isoelectrofocusing for determination of intrathecally produced IgG in neurological diseases. *Ann Clin Biochem* 1992 Jul; 29 (Pt 4): 405-410.
- 30.- Kostulas VK, Link H, Lefvert AK. Oligoclonal IgG bands in cerebrospinal fluid. Principles for demonstration and interpretation based on findings in 1114 neurological patients. *Arch Neurol* 1987 Oct; 44 (10): 1041-1044.
- 31.- Falip M, Tintoré M, Jardí R, Duran I, Link H, Montalbán X. Clinical usefulness of oligoclonal bands. *Rev Neurol* 2001 Jun 16-30; 32 (12): 1120-1124.
- 32.- Villar LM, Masjuan J, Sádaba MC, González-Portués P, Plaza J, Bootello A, *et al*. Early differential diagnosis of multiple sclerosis using a new oligoclonal band test. *Arch Neurol* 2005 Apr; 62 (4): 574-577.
- 33.- Freedman MS, Thompson EJ, Deisenhammer F, Giovannoni G, Grimsley G, Keir G, *et al*. Recommended standard of cerebrospinal fluid analysis in the diagnosis of multiple sclerosis: a consensus statement. *Arch Neurol* 2005 Jun; 62 (6): 865-870.
- 34.- Richard S, Miossec V, Moreau JF, Taupin JL. Detection of oligoclonal immunoglobulins in cerebrospinal fluid by an immunofixation-peroxidase method. *Clin Chem* 2002 Jan; 48 (1): 167-173.
- 35.- Sádaba MC, González-Portués P, Masjuan J, Alvarez-Cermeño JC, Bootello A, Villar LM. An ultrasensitive method for the detection of oligoclonal IgG bands. *J Immunol Methods* 2004 Jan; 284 (1-2): 141-145.
- 36.- Sastre-Garriga J, Tintoré M, Rovira A, Grivé E, Pericot I, Comabella M, *et al*. Conversion to multiple sclerosis after a clinically isolated syndrome of the brainstem: cranial magnetic resonance imaging, cerebrospinal fluid and neurophysiological findings. *Mult Scler* 2003 Feb; 9 (1): 39-43.
- 37.- Rot U, Mesec A. Clinical, MRI, CSF and electrophysiological findings in different stages of multiple sclerosis. *Clin Neurol Neurosurg* 2006 Mar; 108 (3): 271-274. Epub 2005 Dec 27.
- 38.- Masjuan J, Alvarez-Cermeño JC, García-Barragán N, Díaz-Sánchez M, Espiño M, Sádaba MC, *et al*. Clinically isolated syndromes: a new oligoclonal band test accurately predicts conversion to MS. *Neurology* 2006 Feb 28; 66 (4): 576-578.

- 39.- Davies G, Keir G, Thompson EJ, Giovannoni G. The clinical significance of an intrathecal monoclonal immunoglobulin band: a follow-up study. *Neurology* 2003 Apr 8; 60 (7): 1163-1166.
- 40.- Franciotta D, Zardini E. Single immunoglobulin band in cerebrospinal fluid isoelectric focusing. *J Neurol Sci* 1997 Feb 27; 146 (1): 93-94.
- 41.- Franciotta D, Zardini E, Lolli F. The clinical significance of an intrathecal monoclonal immunoglobulin band: a follow-up study. *Neurology* 2004 Feb 24; 62 (4): 675.
- 42.- Leary SM, McLean BN, Thompson EJ, et al. Local synthesis of IgA in the cerebrospinal fluid of patients with neurological diseases. *J Neurol* 2002; 247: 609-615.
- 43.- Villar LM, Masjuan J, González-Porqué P, Plaza J, Sádaba MC, Roldán E, Bootello A, Alvarez-Cermeño JC. Intrathecal IgM synthesis is a prognostic factor in multiple sclerosis. *Ann Neurol* 2003 Feb; 53 (2): 222-226.
- 44.- Vrethem M, Fernlund I, Ernerudh J, Ohman S. Prognostic value of cerebrospinal fluid IgA and IgG in multiple Sclerosis. *Mult Scler* 2004 Aug; 10 (4): 469-471.
- 45.- Zhang Y, Da RR, Hilgenberg LG, Tourtellote WW, Sobel RA, Smith MA, Olek M, Nagra R, Sudhir G, van der Noort S, Qin Y Clonal expansión of IgA-positive plasma cells and axon-reactive antibodies in EM lesions. *J Neuroimmunol* 2005 Oct; 167 (1-2): 120-130.
- 46.- Villar LM, Sádaba MC, Roldán E, Masjuan J, González-Porqué P, Villarrubia N, Espiño M, García-Trujillo JA, Bootello A, Alvarez-Cermeño JC. Intrathecal synthesis of oligoclonal IgM against myelin lipids predicts an aggressive disease course in MS. *J Clin Invest* 2005 Jan; 115 (1):187-194.
- 47.- Perini P, Ranzalo F, Calabrese M, Battistin L, Gallo P. Intrathecal IgM production at clinical onset correlates with a more severe disease course in multiple sclerosis. *J Neurol Neurosurg* Aug 77 (8): 953-955.
- 48.- Jongen PJ, Lycklama a Nijeholt G, Lamers KJ, Doesburg WH, Barkhof F, Lemmens WA, Klasen IS, Hommes OR. Cerebrospinal fluid IgM index correlates with cranial MRI lesion load in patients with multiple sclerosis. *Eur Neurol* 2007; 58 (2): 90-95. Epub 2007 Jun 12.
- 49.- Schneider R, Euler b, Rauer S Intrathecal IgM-synthesis does not correlate with the risk of relapse in patients with a primary demyelinating event. *Eur J Neurol* 2007 Aug; 14 (8): 907-911.
- 50.- Zeman AZ, Kidd D, McLean BN, Kelly MA, Francis DA, Miller DH, Kendall BE, Rudge P, Thompson EJ, McDonald WI A study of oligoclonal band negative multiple sclerosis. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 1996 Jan; 60 (1): 27-30.
- 51.- Mesaros S, Drulovic J, Levic Z Clinical characteristics and neurophysiologic findings in patients with multiple sclerosis without oligoclonal IgG in cerebrospinal fluid; *Srp Arh Celok Lek* 2003 Mar-Apr; 131 (3-4): 122-126.
- 52.- Poser S, Raun NE, Poser W. Age at onset, initial symptomatology and the course of multiple sclerosis. *Acta Neurol Scand* 1982; 66: 355-362.
- 53.- Maria José Sá, Lucinda Sequeira, Maria Edite Rio, Edward J Thompson Oligoclonal IgG bands in the cerebrospinal fluid of portuguese patients with multiple sclerosis: negative results indicate benign disease. *Arq Neuro-Psiquiatr* June 2005. Vol 63 no.2b.
- 54.- Absence of cerebrospinal fluid oligoclonal bands is associated with delayed disability progression in relapsing-remitting MS patients treated with interferon-beta. *J Neurol Sci* 2006 May 15; 244(1-2): 97-102. Epub 2006 Feb 13.
- 55.- Lassmann H, Bruck W, Lucchinetti C. Heterogeneity of multiple sclerosis pathogenesis: implications for diagnosis and therapy. *Trends Mol Med* 2001; 7: 115-121,
- 56.- Corcione A, Casazza S, Ferretti E, et al. Recapitulation of cell differentiation in the central nervous system of patients with multiple sclerosis *Proc Natl Acad Sci USA* 2004; 101: 11064-11069.
- 57.- Archelos JJ, Storch MK, Hartung HP. The role of B cells and autoantibodies in multiple sclerosis. *Ann Neurol* 2000 Jun; 47 (6): 694-706.
- 58.- Silber E, Semra YK, Gregson NA, Sharief MK Patients with progressive multiple sclerosis have elevated antibodies to neurofilament subunit. *Neurology* 2002 May 14; 58 (9): 1372-1381.
- 59.- Ilyas AA, Chen ZW, Cook SD Antibodies to sulfatide in cerebrospinal fluid of patients with multiple sclerosis. *J Neuroimmunol* 2003 Jun; 139 (1-2): 76-80.
- 60.- Mantegazza R, Cristaldini P, Bernasconi P, Baggi F, Pedotti R, Piccini I, Mascoli N, La Mantia L, Antozzi C, Simoncini O, Cornelio F, Milanese C. Anti-MOG autoantibodies in Italian multiple sclerosis patients: specificity, sensitivity and clinical association. *Int Immunol* 2004 Apr; 16 (4): 559-565.
- 61.- Derfuss T, Hohlfeld R, Meinl E. Intrathecal antibody (IgG) production against human herpesvirus type 6 occurs in about 20% of multiple sclerosis patients and might be linked to a polyspecific B-cell response. *J Neurol* 2005 Aug; 252 (8): 968-971. Epub 2005 Mar 21.
- 62.- Antel J, Bar-Or A. Roles of immunoglobulins and B cells in multiple sclerosis: from pathogenesis to treatment. *J Neuroimmunol* 2006 Nov; 180 (1-2): 3-8. Epub 2006 Aug 23.
- 63.- Owens GP, Bennett JL, Gilden DH, Burgoon MP. The B cell response in multiple sclerosis. *Neurol Res* 2006 Apr; 28 (3): 236-244.

- 64.- Alstair C, Alasdair C. Multiple Sclerosis. *Lancet* 2002 359: 1221-1231.
- 65.- Sorensen PS. Biological markers in body fluids for activity and progression in multiple sclerosis. *Mult Scler* 1999 Aug 5 (4): 287-290.
- 66.- Amato MP, Ponziani G. A prospective study on the prognosis of multiple sclerosis. *Neurol Sci* 2000; 21 (4 Suppl 2): S831-8.
- 67.- Avasarala JR, Cross AH, Trotter JL. Oligoclonal band number as a marker for prognosis in multiple sclerosis. *Arch neurol* 2001; 58: 2044-2045.
- 68.- Koch M, Heersema D, Mostert J, Teelken A, De Keyser J. Cerebrospinal fluid oligoclonal bands and progression of disability in multiple sclerosis. *Eur J Neurol* 2007 Jul; 14 (7): 797-800.
- 69.- Jacobsen M, Cepok S, Quak E, Happel M, Gaber R, Ziegler A, Schock S, Oertel WH, Sommer N, Hemmer B. Oligoclonal expansion of memory CD8+ T cells in cerebrospinal fluid from multiple sclerosis patients. *Brain* 2002 Mar; 125 (Pt 3): 538-550.
- 70.- Okuda Y, Apatoff BR, Posnett DN. Apoptosis of T cells in peripheral blood and cerebrospinal fluid is associated with disease activity of multiple sclerosis. *J Neuroimmunol* 2006 Feb; 171 (1-2): 163-170. Epub 2005 Nov 10.
- 71.- Stuve O, Marra CM, Bar-Or A, Niino M, Cravens PD, Cepok S, Frohman EM, Phillips JT, Arendt G, Jerome KR, Cook L, Grand'Maison F, Hemmer B, Monson NL, Racke MK. Altered CD4+/CD8+ T-cell ratios in cerebrospinal fluid of natalizumab-treated patients with multiple sclerosis. *Arch Neurol* 2006 Oct; 63 (10): 1383-1387.
- 72.- Cross AH, Stark JL, Lauber J, Ramsbottom MJ, Lyons JA. Rituximab reduces B cells and T cells in cerebrospinal fluid of multiple sclerosis patients. *J Neuroimmunol* 2006 Nov; 180 (1-2): 63-70. Epub 2006 Aug 14.
- 73.- Stuve O, Marra CM, Jerome KR, Cook L, Cravens PD, Cepok S, Frohman EM, Phillips JT, Arendt G, Hemmer B, Monson NL, Racke MK. Immune surveillance in multiple sclerosis patients treated with natalizumab. *Ann Neurol* 2006 May; 59 (5): 743-747.
- 74.- Spuler S, Yousry T, Scheller A, Voltz R, Holler E, Hartmann M, Wick M, Hohlfeld R. Multiple sclerosis: prospective analysis of TNF-alpha and 55 kDa TNF receptor in CSF and serum in correlation with clinical and MRI activity. *J Neuroimmunol* 1996 May; 66 (1-2): 57-64.
- 75.- Nakashima I, Fujihara K, Mitsu T, Okita N, Takase S, Itoyama Y. Significant correlation between IL-10 levels and IgG indices in the cerebrospinal fluid of patients with multiple sclerosis. *J Neuroimmunol* 2000 Nov 1; 111 (1-2): 64-67.
- 76.- Ozenci V, Kouwenhoven M, Link H. Cytokines in multiple sclerosis: methodological aspects and pathogenic implications. *Mult Scler* 2002 Oct; 8 (5): 396-404.
- 77.- Martinez-Caceres EM, Espejo C, Brieva L, Pericot I, Tintore M, Saez-Torres I, Montalban X. Expression of chemokine receptors in the different clinical forms of multiple sclerosis. *Mult Scler* 2002 Oct; 8 (5): 390-395.
- 78.- Narikawa K, Mitsu T, Fujihara K, Nakashima I, Sato S, Itoyama Y. CSF chemokine levels in relapsing neuromyelitis optica and multiple sclerosis. *J Neuroimmunol* 2004 Apr; 149 (1-2): 182-186.
- 79.- Sindern E, Patzold T, Ossege LM, Gisevius A, Malin JP. Expression of chemokine receptor CXCR3 on cerebrospinal fluid T-cells is related to active MRI lesion appearance in patients with relapsing-remitting multiple sclerosis. *J Neuroimmunol* 2002 Oct; 131 (1-2): 186-190.
- 80.- Bartosik-Psujek H, Stelmasiak Z. The CSF levels of total-tau and phosphotau in patients with relapsing-remitting multiple sclerosis. *J Neural Transm* 2006 Mar; 113 (3): 339-345.
- 81.- Martínez-Yelamos A, Saiz A, Bas J, Hernandez JJ, Graus F, Arbizu T. Tau protein in cerebrospinal fluid: a possible marker of poor outcome in patients with early relapsing-remitting multiple sclerosis. *Neurosci Lett* 2004 Jun 3; 363 (1):14-17.
- 82.- Brettschneider J, Petzold A, Junker A, Tumani H. Axonal damage markers in the cerebrospinal fluid of patients with clinically isolated syndrome improve predicting conversion to definite multiple sclerosis. *Mult Scler* 2006 Apr; 12 (2): 143-148.
- 83.- Jimenez-Jimenez FJ, Zurdo JM, Hernanz A, Medina-Acebron S, de Bustos F, Barcenilla B, Sayed Y, Ayuso-Peralta L. Tau protein concentrations in cerebrospinal fluid of patients with multiple sclerosis. *Acta Neurol Scand* 2002 Dec; 106 (6): 351-354.
- 84.- Guimaraes I, Cardoso MI, Sa MJ. Tau protein seems not to be a useful routine clinical marker of axonal damage in multiple sclerosis. *Mult Scler* 2006 Jun; 12 (3): 354-356.
- 85.- Graves PR, Haystead AJT. Molecular Biologist's Guide to Proteomics. *Microbiol Molec Biol* 2002; 39-63.
- 86.- Dumont D, Noben JP, Raus J, Stinissen P, Robben J. Proteomic analysis of cerebrospinal fluid from multiple sclerosis patients. *Proteomics* 2004 Jul; 4 (7): 2117-2124.
- 87.- Noben JP, Dumont D, Kwasnikowska N, Verhaert P, Somers V, Hupperts R, Stinissen P, Robben J. Lumbar cerebrospinal fluid proteome in multiple sclerosis: characterization by ultrafiltration, liquid chromatography, and mass spectrometry. *J Proteome Res* 2006 Jul; 5 (7): 1647-1657.
- 88.- Irani DN, Anderson C, Gundry R, Cotter R, Moore S, Kerr DA, McArthur JC, Sacktor N, Pardo CA,

- Jones M, Calabresi PA, Nath A. Cleavage of cystatin C in the cerebrospinal fluid of patients with multiple sclerosis. *Ann Neurol* 2006 Feb; 59 (2): 237-247.
- 89.- Dymment DA, Willer CJ, Scott B, *et al.* Genetic susceptibility to MS: a second stage analysis in Canadian MS families. *Neurogenetics* 2001 Jul; 3 (3): 145-151.
- 90.- Willer CJ, Dymment DA, Risch NJ, Sadovnick AD, Ebers GC; Canadian Collaborative Study Group. Twin concordance and sibling recurrence rates in multiple sclerosis. *Proc Natl Acad Sci USA* 2003 Oct 28; 100 (22): 12877-12882.
- 91.- Olerup O, Fredrikson S, Olsson T, Kam-Hansen S. HLA class II genes in chronic progressive and in relapsing/remitting multiple sclerosis. *Lancet* 1987 Aug 8; 2 (8554): 327.
- 92.- Marrosu MG, Murru R, Murru MR, Costa G, Zavattari P, Whalen M, Cocco E, Mancosu C, Schirru L, Sollà E, Fadda E, Melis C, Porru I, Rolesu M, Cucca F. Dissection of the HLA association with multiple sclerosis in the founder isolated population of Sardinia. *Hum Mol Genet* 2001 Dec 1; 10 (25): 2907-2916.
- 93.- Fernandez O, Fernandez V, Alonso A, Caballero A, Luque G, Bravo M, Leon A, Mayorga C, Leyva L, de Ramon E. DQB1*0602 allele shows a strong association with multiple sclerosis in patients in Malaga, Spain. *J Neurol* 2004 Apr; 251 (4): 440-444.
- 94.- Masterman T, Ligiers A, Olsson T, Andersson M, Olerup O, Hillert J. HLA-DR15 is associated with lower age at onset in multiple sclerosis. *Ann Neurol* 2000 Aug; 48 (2): 211-219.
- 95.- Hensiek AE, Sawcer SJ, Feakes R, Deans J, Mander A, Akesson E, Roxburgh R, Coraddu F, Smith S, Compston DA. HLA-DR 15 is associated with female sex and younger age at diagnosis in multiple sclerosis. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 2002 Feb; 72 (2): 184-187.
- 96.- McDonald WI, Compston A, Edan G, Goodkin D, *et al.* Recommended diagnostic criteria for multiple sclerosis: guidelines from the International Panel on the diagnosis of multiple sclerosis. *Ann Neurol* 2001 Jul; 50 (1): 121-127.
- 97.- Izquierdo G, Angulo S, Garcia-Moreno JM, Gamero MA, Navarro G, Gata JM, Ruíz-Peña JL, Páramo MD. Intrathecal IgG synthesis: marker of progression in multiple sclerosis patients. *Acta Neurol Scand* 2002 Mar; 105 (3): 158-163.