

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE FARMACIA

Departamento de Bioquímica y Biología Molecular II



**MECANISMOS DE NEURODEGENERACIÓN
INDUCIDOS POR EL LÍQUIDO CEFALORRAQUÍDEO
EN LA ESCLEROSIS MÚLTIPLE**

**MEMORIA PRESENTADA PARA OPTAR AL GRADO DE
DOCTOR POR**

Cristina Cid Sánchez

Bajo la dirección del Doctor:

Alberto Alcázar

Madrid, 2003

ISBN: 84-669-2510-4

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE FARMACIA

DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA Y BIOLOGÍA MOLECULAR II

**MECANISMOS DE NEURODEGENERACIÓN INDUCIDOS
POR EL LÍQUIDO CEFALORRAQUÍDEO EN LA
ESCLEROSIS MÚLTIPLE**

TESIS DOCTORAL

CRISTINA CID SÁNCHEZ

Madrid, 2003



UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE FARMACIA

DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA Y BIOLOGÍA MOLECULAR II

**MECANISMOS DE NEURODEGENERACIÓN
INDUCIDOS POR EL LÍQUIDO CEFALORRAQUÍDEO
EN LA ESCLEROSIS MÚLTIPLE**

**Tesis para optar al Grado de Doctor en Farmacia
presentada por Cristina Cid Sánchez**

Madrid, 2003

Los resultados obtenidos en esta Tesis Doctoral han sido publicados parcialmente en:

Neuronal apoptosis induced by cerebrospinal fluid from multiple sclerosis patients correlates with hypointense lesions on T1 magnetic resonance imaging. Cid, C., Alcázar, A., Regidor, I., Masjuan, J., Salinas, M., y Álvarez-Cermeño, J. C. *J. Neurol. Sci.* (2002) 193:103-109.

Low concentrations of glutamate induce apoptosis in cultured neurons: implications for amyotrophic lateral sclerosis. Cid, C., Álvarez-Cermeño, J. C., Regidor, I., Salinas, M., y Alcázar, A. *J. Neurol. Sci.* (2003) 206:91-95.

Caspase inhibitors protect against neuronal apoptosis induced by cerebrospinal fluid from multiple sclerosis patients. Cid, C., Álvarez-Cermeño, J. C., Regidor, I., Plaza, J., Salinas, M., y Alcázar, A. *J. Neuroimmunol.* (2003) 136:119-124.

Antibodies reactive to heat shock protein 90 induce oligodendrocyte precursor cell death in culture. Implications for demyelination in multiple sclerosis. Cid, C., Álvarez-Cermeño, J.C., Camafeita, E., Salinas, M., Alcázar, A. *FASEB. J.* (2004) 18.

*A mis padres, a Paula y a Marina,
por su entusiasmo, y por el mío*

El trabajo realizado en esta Tesis Doctoral se ha llevado a cabo en el Servicio de Bioquímica del Departamento de Investigación del Hospital Ramón y Cajal de Madrid (durante los años 2000-2003) y ha sido financiado por los siguientes proyectos de investigación:

1999-2001 Proyecto concedido por el Fondo de Investigaciones Sanitarias (FIS) del Ministerio de Sanidad con el título: “Estudio del daño neuronal inducido por el líquido cefalorraquídeo de enfermos con esclerosis múltiple. Correlación con marcadores linfocitarios” (99/0355).

2002-2004 Proyecto concedido por la Dirección General de Investigación del Ministerio de Ciencia y Tecnología correspondiente al Plan Nacional I+D+I para el proyecto “Transducción de señales en la supervivencia y muerte neuronal. Implicación de los factores de iniciación” (BMC2001-0047).

2003-2005 Proyecto concedido por el Fondo de Investigaciones Sanitarias (FIS) del Ministerio de Sanidad con el título “Lesión neuronal inducida por el LCR de enfermos con esclerosis múltiple: correlaciones clínicas y estudio de posibles moléculas implicadas” (02/0726).

Mi agradecimiento a todos los que habéis participado en este trabajo, y en especial a:

Alberto Alcázar por ser para mí mucho más que un director de Tesis, por los estupendos momentos en que hemos desarrollado la imaginación para llevar a cabo nuestros “ingenios de laboratorio”, y porque gracias a él he aprendido a ejercitar la constancia y la paciencia siempre necesarias.

José Carlos Álvarez Cermeño que ha aportado su punto de vista desde el ámbito de la Neurología y ha conseguido la imprescindible financiación.

Matilde Salinas, que me ha acogido en su grupo de trabajo y me ha dado ánimo constantemente.

J.Carlos Martínez Honduvilla, le agradezco la deferencia de haber sido tutor de esta Tesis.

Todos los que habéis participado con vuestra ayuda técnica: Mercedes Gómez- Calcerrada por su trabajo con los cultivos celulares. Ignacio Regidor y José Plaza por las muestras de los pacientes. Rafael Martín del Río y Amparo Latorrre por haber realizado los análisis de aminoácidos. Emilio Camafeita y Maite Alonso, que han realizado los espectros de masas. Carlos Paíno y Carolina Redondo, me han proporcionado algunos anticuerpos y su desinteresada colaboración.

Mis compañeros del Hospital Ramón y Cajal, y en especial a Cristina y Nacho por su ayuda en la edición de esta tesis, y a los que han trabajado muy cerca de mí: Celia, Maribel, Elena, Ana, Lidia, Víctor y David, gracias por vuestro agradable ambiente de trabajo.

Mis familiares y amigos, por contribuir con vuestra alegría y confianza desde fuera del laboratorio, y por mantenerme en contacto con el “mundo exterior”.

Por último me gustaría expresar mi solidaridad con los pacientes de esclerosis múltiple, y espero que llegue el día en que se pueda tratar eficazmente su enigmática enfermedad.

ÍNDICE	I
ÍNDICE DE FIGURAS	VII
ABREVIATURAS	XI
INTRODUCCIÓN	1
1. ESCLEROSIS MÚLTIPLE	1
1.1. Historia de la enfermedad	1
1.2. Historia natural	2
1.3. Epidemiología y Clínica	3
1.3.1. Epidemiología	3
1.3.2. Clínica	5
1.3.3. Escalas de disfunción neurológica	5
1.4. Diagnóstico	6
1.4.1. Criterios diagnósticos	6
1.4.2. Estudio de las imágenes de resonancia magnética	7
1.4.3. Estudio del líquido cefalorraquídeo	9
1.5. Histología del SNC y Anatomía patológica	11
1.5.1. Histología del SNC	11
1.5.2. Anatomía patológica	13
1.6. Modelos experimentales	17
1.7. Etiología: susceptibilidad ambiental y genética	18
1.7.1. Factores ambientales	18
1.7.2. Factores genéticos	19
1.8. Fisiopatología	20
1.9. Tratamientos	21
2. INFLAMACIÓN Y DESMIELINIZACIÓN	23
2.1. Inmunopatogenia e inflamación	23
2.2. Desmielinización	27
2.3. Remielinización	28

3. NEURODEGENERACIÓN	29
3.1. Daño axonal	29
3.2. Agentes causantes del daño axonal	31
3.3. Apoptosis	34
3.4. Caspasas	35
HIPÓTESIS DE TRABAJO	39
OBJETIVOS	40
MATERIALES Y MÉTODOS	41
1. Cultivos celulares	41
2. Pacientes	44
3. Evolución clínica de los pacientes con EM	44
4. Evaluación de las Imágenes de Resonancia Magnética	45
5. Muestras de LCR	45
6. Tratamiento de los cultivos celulares con LCR	46
7. Viabilidad celular	47
8. Medida de apoptosis	47
9. Microscopía de contraste de fase y de fluorescencia	50
10. Inmunocitoquímica	50
11. Anticuerpos utilizados en inmunocitoquímica	51
12. Microscopía confocal	52
13. Medida de la intensidad de fluorescencia	52
14. Análisis de aminoácidos excitatorios	53
15. Cromatografía líquida de alta resolución	53
16. Identificación de péptidos por espectrometría de masas	53
17. Obtención de lisados celulares y determinación de la actividad caspasa	53
18. Electroforesis en geles de poliacrilamida	54
19. Transferencia a membrana e inmunodetección	55
20. Anticuerpos utilizados en la inmunodetección	55
21. Preparación de extractos celulares	56

22. Fraccionamiento subcelular	56
23. Obtención de la fracción de gangliósidos	57
24. ELISA	59
25. Purificación de IgG humanas	59
26. Inmunoprecipitación	59
27. Identificación de proteínas por espectrometría de masas	60
28. Obtención de anticuerpos humanos por inmunoafinidad	61
29. Electroforesis bidimensional	61
30. Análisis estadístico	61
31. Productos, reactivos y equipos	62
RESULTADOS	63
1. INDUCCIÓN DE APOPTOSIS NEURONAL Y DAÑO AXONAL POR LCR DE PACIENTES CON ESCLEROSIS MÚLTIPLE EN CULTIVOS NEURONALES	63
1.1. Análisis morfológico	63
1.2. Viabilidad celular	64
1.3. Apoptosis neuronal	65
1.4. Evaluación del daño axonal y neurítico	67
1.5. Relación entre apoptosis neuronal y daño axonal	70
2. CORRELACIÓN ENTRE LA NEUROTOXICIDAD INDUCIDA POR LCR DE PACIENTES CON EM EN CULTIVOS NEURONALES Y LA PATOLOGÍA DE LOS PACIENTES	72
2.1. Correlación entre la recuperación del brote y la hipointensidad de las lesiones en T1	72
2.2. Correlación entre los datos clínicos de los pacientes y la apoptosis neuronal inducida en cultivos por LCR de pacientes con EM	75
2.3. Correlación entre la apoptosis neuronal inducida en cultivos por LCR de pacientes con EM y la hipointensidad de sus lesiones en T1	76

2.4. Relación entre la recuperación clínica de los pacientes y la hipointensidad de sus lesiones en T1 con el daño axonal inducido por su LCR en los cultivos neuronales	78
2.5. Inducción de apoptosis neuronal y daño axonal en cultivos por LCR de pacientes con EM con lesiones en T1	80
3. CARACTERIZACIÓN DEL FACTOR NEUROTÓXICO DEL LCR CAUSANTE DEL DAÑO NEURONAL	82
3.1. Inactivación del complemento y adsorción de inmunoglobulinas	82
3.2. Análisis de péptidos inductores de apoptosis	84
3.3. Análisis de glutamato	85
3.4. Aislamiento del factor tóxico por exclusión molecular	86
3.5. Aislamiento del factor tóxico por HPLC y análisis por espectrometría de masas	87
4. MECANISMO DE INDUCCIÓN DE APOPTOSIS	90
4.1. Estudio de actividad de las caspasas 1 y 3	91
4.2. Detección de activación <i>in vivo</i> de la caspasa 3 por fragmentación de α -espectrina	92
4.3. Estudio de actividad de las caspasas 8 y 9	93
4.4. Protección de la apoptosis neuronal inducida por LCR de pacientes con EM por inhibidores de caspasas	96
5. IDENTIFICACIÓN DE ANTICUERPOS EN EL LCR DE PACIENTES CON EM QUE RECONOCEN CÉLULAS PRECURSORAS DE OLIGODENDROCITOS	99
5.1. Identificación de células A2B5+ en los cultivos celulares	100
5.2. Anticuerpos IgG de los LCR de pacientes con EM reconocen un antígeno en las células precursoras de oligodendrocitos	101
5.3. Cuantificación de la IgG humana unida a células A2B5+ en ensayos de inmunofluorescencia indirecta	104
5.4. Detección del antígeno en los extractos celulares	106
5.5. Localización del sitio de unión de las IgG humanas en células A2B5+ por microscopía confocal tridimensional	107

5.6. Identificación del antígeno de 82 kDa como Hsp90/Hsp84	109
5.7. Inmunodetección de Hsp90 a partir de electroforesis bidimensional	112
5.8. Detección de Hsp90 humana	114
5.9. La detección del antígeno Hsp90 depende del número de OPC en los cultivos	114
5.10. Localización del antígeno Hsp90 en la membrana celular	115
5.11. Activación de complemento debida a la unión de IgG humana a OPC	116
5.12. Eliminación de las células O4+ en cultivos tratados con LCR de pacientes con EM	121
DISCUSIÓN	123
1. MECANISMOS DE MUERTE CELULAR EN LAS NEURONAS	123
2. MECANISMOS DE MUERTE CELULAR EN LAS CÉLULAS PRECURSORAS DE OLIGODENDROCITOS	131
CONCLUSIONES	143
BIBLIOGRAFÍA	145

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Mecanismos posibles de lesión y reparación en la EM	25
Figura 2. Estirpe oligodendroglial	29
Figura 3. Cascada apoptótica	35
Figura 4. Cultivos neuronales primarios	42
Figura 5. Representación esquemática del tratamiento de los cultivos neuronales con LCR	47
Figura 6. Detección de apoptosis en los cultivos neuronales	49
Figura 7. Procedimiento empleado en el fraccionamiento subcelular	57
Figura 8. Procedimiento empleado en la extracción de gangliósidos	58
Figura 9. Evaluación de la morfología neuronal durante los días de tratamiento del cultivo con LCR	64
Figura 10. Curvas dosis-respuesta de la viabilidad celular en los cultivos neuronales después del tratamiento con muestras de LCR	65
Figura 11. Distribución de los LCR de pacientes con respecto a la apoptosis que inducen en el cultivo neuronal	66
Figura 12. Inducción de daño neuronal en cultivos tratados con LCR de pacientes con EM	67
Figura 13. Daño axonal inducido por LCR de pacientes con EM	69
Figura 14. Relación entre la apoptosis neuronal y el daño axonal inducido por LCR de pacientes con EM en cultivos neuronales	70
Figuras 15. Correlación entre la recuperación del brote y la hipointensidad en las secuencias ponderadas en T1	73
Figuras 16. Correlación entre el porcentaje de recuperación del brote y la hipointensidad en las secuencias ponderadas en T1	74
Figura 17. Correlación entre la recuperación del brote de los pacientes con EM y la apoptosis neuronal en cultivos tratados con LCR de estos pacientes	75

Figura 18. Correlación entre la hipointensidad de las lesiones en T1 de los pacientes con EM y la apoptosis neuronal en cultivos tratados con LCR de estos pacientes	76
Figura 19. Los LCR de pacientes con EM con lesiones en T1 inducen apoptosis neuronal en cultivos	77
Figura 20. Relación entre la recuperación del brote de los pacientes y sus lesiones en T1 con el daño axonal que inducen sus LCR en cultivos neuronales	78
Figura 21. IRM y daño axonal inducido en cultivos neuronales tratados con LCR de pacientes con EM	79
Figura 22. Tratamiento térmico del LCR	82
Figura 23. Inmunoprecipitación de IgM e IgG del LCR	83
Figura 24. Inducción de apoptosis por el pentapéptido QYNAD	84
Figura 25. Viabilidad y apoptosis de neuronas corticales en cultivo después del tratamiento con concentraciones crecientes de glutamato	85
Figura 26. Viabilidad neuronal y apoptosis tras la exposición al antagonista de glutamato NBQX en cultivos tratados con glutamato	86
Figura 27. Fraccionamiento del LCR	87
Figura 28. Cromatografía de los LCR	88
Figura 29. Correlación entre el área de la fracción 3 aislada por cromatografía y la apoptosis inducida en el cultivo por el LCR	89
Figura 30. Ensayo de actividad de las caspasas 1 y 3 en cultivos neuronales tratados con LCR de pacientes con EM	92
Figura 31. Detección de la actividad caspasa 3 inducida <i>in vivo</i> por tratamiento con LCR de pacientes con EM sobre un sustrato endógeno	93
Figura 32. Ensayo de actividad de las caspasas 8 y 9 en cultivos neuronales tratados con LCR de pacientes con EM	94
Figura 33. Detección de caspasa 8 activada	95
Figura 34. Detección de caspasa 9 activada	95

Figura 35. Inhibición de la apoptosis inducida por LCR de pacientes con EM por inhibidores de actividades caspasa	97
Figura 36. Inhibición de la apoptosis neuronal inducida por LCR de pacientes con EM por inhibidores de la caspasa 3	98
Figura 37. Células A2B5+ en cultivo de 6 días	99
Figura 38. Disminución del número de células A2B5+ en cultivo a lo largo del tiempo en paralelo con el aumento de células O4+	100
Figura 39. Inmunofluorescencia indirecta de cultivos celulares con anticuerpos A2B5 y anti-GFAP	101
Figura 40. Marcaje de OPC por anticuerpos de los LCR de pacientes con EM	102
Figura 41. Células cultivadas y marcadas por inmunofluorescencia indirecta con LCR de pacientes con EM y con los anticuerpos A2B5, O4 o anti-GFAP	103
Figura 42. Inmunofluorescencia indirecta con anti-IgM humano	104
Figura 43. Cuantificación de la IgG humana unida a células A2B5+	105
Figura 44. Detección del antígeno en los extractos celulares por ELISA e inmunodetección	106
Figura 45. Imagen tridimensional obtenida por microscopía confocal del sitio de unión de las IgG humanas en las células A2B5+	108
Figura 46. Identificación del antígeno reconocido por IgG de pacientes con EM	109
Figura 47. Inmunodetección de las proteínas inmunoprecipitadas con IgG humanas	110
Figura 48. Inmunocitoquímica de las proteínas inmunoprecipitadas en la superficie de las OPC	111
Figura 49. Identificación de Hsp90 β por inmunodetección e inmunocitoquímica	112
Figura 50. Identificación de Hsp90 por anticuerpos de los LCR de EM por electroforesis bidimensional	113
Figura 51. Anticuerpos de los LCR de EM reconocen a la Hsp90 humana	114
Figura 52. La detección del antígeno Hsp90 es dependiente del número de OPC en cultivos	115

Figura 53. Localización del antígeno por transferencia e inmunodetección en las fracciones subcelulares	115
Figura 54. Detección del antígeno en las OPC <i>in vivo</i>	116
Figura 55. Activación del complemento en OPC por unión de IgG de LCR de pacientes con EM	117
Figura 56. Inmunocitoquímica de células fijadas marcadas con LCR de EM, A2B5 y anti-C5b9 humano	119
Figura 57. Localización del antígeno reconocido por IgG de los LCR y del complemento en la superficie de las OPC	121
Figura 58. Eliminación de oligodendrocitos O4+ en cultivos celulares tratados con LCR de pacientes con EM	122
Figura 59. Activación del complemento	137

TABLAS

Tabla I. Comparación entre los valores de apoptosis, viabilidad y daño axonal obtenidos con LCR de los grupos de EM ANC y ANA	71
Tabla II. Comparación de las variables clínicas de los pacientes y de los datos bioquímicos de los LCR de pacientes con EM de los grupos ANA y ANC	81
Tabla III. Cuantificación de la muerte de OPC mediada por complemento	118
Tabla IV. Intensidad de fluorescencia debida a los anticuerpos IgG humana y anti-C5b9 por célula A2B5+	120

ABREVIATURAS

ANA	Grupo de pacientes de esclerosis múltiple cuyos LCR inducen apoptosis neuronal mayor de 33%. (Apoptosis Neuronal Alta)
AMPA	Ácido α -amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazol-propiónico
ANC	Grupo de pacientes de esclerosis múltiple cuyos LCR inducen apoptosis neuronal menor de 33%. (Apoptosis Neuronal análoga a la del Control)
amc	7-amino-4-metil-cumarina
afc	7-amino-4-trifluorometil-cumarina
Apaf-1	<i>Apoptosis protease activating factor</i>
A2B5	Anticuerpo marcador de OPC
BCIP	5-bromo-4-cloro-3-indolil-fosfato
β-APP	Proteína precursora β -amiloide (<i>β-Amyloid Precursor Protein</i>)
BSA	Albúmina de suero bovino
CHAPS	3-[(3-Colamidopropil)-dimetilamonio]-1-propanosulfonato
CMH	Complejo mayor de histocompatibilidad
cmk	Clorometil-cetona
C5b9	Complejo terminal del complemento
DO	Densidad óptica
DTT	DL-Ditiotreitol
ECL	Método de detección por quimioluminiscencia
EDSS	<i>Expanded Disability Status Scale</i>
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético
ELISA	<i>Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay</i>
EM	Esclerosis múltiple
EM PP	Esclerosis múltiple primaria progresiva
EM SP	Esclerosis múltiple secundaria progresiva
EM RR	Esclerosis múltiple remitente-recurrente
ERM	Espectroscopía de resonancia magnética
ESI	Espectrometría de masas con electrospray
fmk	Fluorometil-cetona
FS	Sistemas funcionales del EDSS
Gal C	Galactocerebrósido C
GFAP	<i>Glial fibrillary acidic protein</i>
HEPES	Ácido N-2-hidroxietil-N'-2 piperazín-etano-sulfónico
Hsp	Proteína de respuesta al choque térmico (<i>Heat shock protein</i>)
IL	Interleuquina
INS	Individuos neurológicamente sanos
IRM	Imágenes de resonancia magnética
LCR	Líquido cefalorraquídeo
LDH	Enzima lactato deshidrogenasa
MAG	Glucoproteína asociada a la mielina
MALDI-ToF	<i>Matriz Assisted Laser Desorption/Ionization-Time of Flight</i>
MBP	Proteína básica de mielina
MOG	Glucoproteína de la mielina de oligodendrocitos
ms	Milisegundos
NAA	N-acetil aspartato
NBT	Azul de nitrotetrazolio

NBQX	2,3-Dihidroxi-6-nitro-7-sulfamoil-benzo(f)quinoxalina-2,3-diona
NG2	Antígeno marcador de precursores de oligodendrocitos
OEN	Otras Enfermedades Neurológicas
OPC	Células precursoras de oligodendrocitos (<i>Oligodendrocyte Precursor Cells, O-2A progenitor cells</i>)
O1	Anticuerpo marcador de oligodendrocitos inmaduros
O4	Anticuerpo marcador de preoligodendrocitos
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
PBS	Tampón fosfato salino
PLP	Proteína proteolipídica
PVDF	Difluoruro de polivinilideno
p:v	Relación peso:volumen
S.D.	Desviación estándar
SDS	Dodecilsulfato sódico
SDS-PAGE	Electroforesis en gel de poliacrilamida en presencia de SDS
S.E.M.	Error estandar de la media
SNC	Sistema nervioso central
T1	Secuencia de IRM ponderada con TR corto (540 ms) y TE corto (15 ms)
T2	Secuencia de IRM ponderada con TR largo (2000 ms) y TE corto (22-80 ms)
TE	Tiempo de eco
TR	Tiempo de repetición
Tris	Tris-(hidroximetil)-aminometano
TUNEL	<i>Terminal deoxynucleotidyl transferase (TdT)-mediated dUTP-fluorescein Nick-End Labeling</i>
Tween-20	Monolaurato de polioxietilen-sorbitano
U.A.	Unidades de absorbancia
v:v	Relación volumen:volumen
z	N-bencil-oxi-carbonil
2-DE	Electroforesis bidimensional
3-D	Microscopía confocal tridimensional

INTRODUCCIÓN

1. ESCLEROSIS MÚLTIPLE

La esclerosis múltiple (EM) es la enfermedad desmielinizante más frecuente del sistema nervioso central (SNC) y una de las causas más comunes de incapacidad neurológica en adultos jóvenes. La enfermedad tiene una patogenia inmunológica en personas genéticamente susceptibles y se considera que los síntomas iniciales de la EM son el resultado de la desmielinización, que produce una ralentización o bloqueo de la conducción nerviosa. Ciertos factores, aún desconocidos, desencadenan la activación del sistema inmunológico con daño inflamatorio de glía y neuronas, seguidos por una recuperación de la función y reparación estructural, gliosis postinflamatoria y neurodegeneración. Esta secuencia de procesos implica un curso clínico caracterizado por episodios de recaídas (exacerbaciones o brotes) con recuperaciones o remisiones, seguidas en el tiempo por nuevos episodios que suelen dejar secuelas persistentes, y por un progreso de la discapacidad.

1.1. Historia de la enfermedad

Previamente desconocida, la esclerosis múltiple hace su aparición en los inicios del siglo XIX aunque su reconocimiento oficial en la neurología clínica no tuvo lugar hasta 1860. Robert Carswell en el año 1838 y Jean Cruveilhier en 1841 describieron por primera vez algunas de las características patológicas de la EM (Hickey, 1999). Sin embargo, estos médicos fundamentaban sus observaciones en material de necropsias, siendo Friederich von Frerichs quien primero correlacionó las lesiones patológicas con hallazgos clínicos. El mérito de las primeras descripciones clínicas y anatómicas detalladas de la enfermedad, válidas hasta hoy, se atribuye a Jean-Martin Charcot (1868), y fue uno de sus colaboradores, Vulpian, quien introdujo el término “esclerosis en placas”, que aún se utiliza en la literatura francesa. Debido a la reputación y notoriedad de Charcot, la existencia de la nueva enfermedad se difundió rápidamente. Las primeras descripciones en Estados Unidos se deben a Edward Seguin, quien la denominó con el término “esclerosis múltiple”. A principios del siglo XX, una enfermedad que sólo unos pocos años antes se describía en casos esporádicos comenzó a ser una de las razones más comunes de ingreso en centros de tratamiento neurológico.

Dando inicio al proceso de organización de especialistas y pacientes mediante la fundación de sociedades en Estados Unidos, en 1946 apareció la *National Multiple*

Sclerosis Society (NMSS), con sede en Nueva York. Posteriormente, con el objetivo de facilitar la investigación y el intercambio entre los diversos centros especializados surgieron varios comités tales como ECTRIMS (*European Committee for Treatment and Research in Multiple Sclerosis*) en 1982 y ACTRIMS (*American Committee for Treatment and Research in Multiple Sclerosis*) en 1996. En la actualidad, esta enfermedad enigmática aún sigue retando a los investigadores que intentan comprender su patogénesis y prevenir su progresión.

1.2. Historia natural

La historia natural de la EM se refiere particularmente al curso de la enfermedad sin “interferencia” o efecto de tratamiento alguno. Pueden considerarse un número variado de características para describirla, entre ellas el curso evolutivo de la enfermedad (remitente o progresiva, primaria o secundariamente progresiva, benigna o maligna), la frecuencia y gravedad de los ataques, la discapacidad y déficit de acuerdo con las escalas pertinentes, y las curvas de supervivencia a largo plazo.

En la mayoría de los pacientes (80%) la enfermedad comienza con episodios de disfunción neurológica que dura varias semanas, seguida de una mejoría parcial o completa (EM remitente - recurrente). Algunos pacientes continúan bien durante décadas como consecuencia de periodos prolongados de remisión clínica o por recuperación sustancial a partir de episodios repetidos de empeoramiento clínico (recidivas, exacerbaciones o brotes). Con el tiempo, la recuperación de los brotes es cada vez menos completa, y se desarrolla una progresión clínica gradual sin brotes (EM secundaria progresiva). En una pequeña proporción de pacientes (aproximadamente un 20%), el declive de la función neuronal es gradual, comenzando desde el inicio de la enfermedad (EM primaria progresiva). Esta forma de EM ocurre particularmente en pacientes en los que los síntomas se desarrollan después de los 40 años.

El curso de la enfermedad en cada paciente es muy impredecible. Los pacientes que desarrollan un síndrome neurológico aislado (por ejemplo afectación cerebelosa, disfunción en el tronco cerebral o mielitis transversa incompleta) como primer síntoma tienen un mayor riesgo de padecer una enfermedad recurrente y discapacidad dentro de una década. La presencia de bandas oligoclonales de inmunoglobulinas en el líquido cefalorraquídeo (LCR) incrementa el riesgo de enfermedad recurrente.

El 10% de los pacientes evolucionan bien durante más de 20 años y se considera que presentan una EM benigna. Aproximadamente el 70% tendrá una progresión secundaria. Los brotes frecuentes en los primeros dos años, el curso progresivo desde el inicio de la enfermedad, el sexo masculino y las lesiones tempranas, motoras o cerebelosas son independientemente predictivos de un curso clínico más grave. Las mujeres y los pacientes con síntomas predominantemente sensoriales o neuritis óptica tienen un pronóstico más favorable. La esperanza de vida suele disminuir ligeramente aunque en casos raros los pacientes con enfermedad maligna fulminante mueren en los meses posteriores al inicio de la enfermedad. El suicidio es también un riesgo, incluso en pacientes jóvenes con síntomas no muy graves (Noseworthy *et al.*, 2000).

1.3. Epidemiología y Clínica

1.3.1. Epidemiología

La epidemiología permite conocer la frecuencia de las enfermedades mediante la utilización de las tasas de incidencia, prevalencia y mortalidad. Puede aportar datos para determinar posibles factores desencadenantes y agravantes, así como para explicar la frecuencia variable de la EM en el mundo. Los estudios epidemiológicos han permitido saber que la EM es la enfermedad neurológica crónica más frecuente en adultos jóvenes en Europa y Norteamérica.

La tasa de prevalencia contabiliza el número de casos vivos por cada 100.000 habitantes en una fecha determinada *a priori*, llamada fecha de prevalencia. Los estudios de prevalencia han permitido apreciar una distribución irregular a lo largo del mundo, pues se detectan mayores frecuencias entre los 40 y 60 grados de latitud norte y se aprecia un fenómeno muy similar en el hemisferio sur. Se han definido zonas de riesgo alto (más de 100 casos/100.000), medio (50-100 casos/100.000) y bajo (menos de 50 casos/100.000) (Kurtzke, 1995). En la actualidad la EM se conoce en todo el mundo, con alrededor de dos millones y medio de afectados (Compston y Coles, 2002). Es frecuente en el norte de Europa y norte de América, pero no en África, Suramérica o India. Dentro del norte de Europa, la enfermedad es más frecuente en el sur de Escandinavia, norte de Alemania, Reino Unido y algunas zonas de Italia que en el sur de Escandinavia, Francia, España y países del Mediterráneo oriental. En España nos encontramos en una zona de riesgo medio (prevalencia de 53-65 casos/100.000)

(Fernández *et al.*, 1994; Bufill *et al.*, 1995). En Italia, existen grandes diferencias entre regiones e islas que están geográficamente cerca pero que difieren en su historia cultural y genética. En Norteamérica, hay un gradiente diagonal en frecuencia con las tasas más altas en el medio Oeste y las más bajas en el delta del Mississippi. Sólo en Estados Unidos hay entre 250.000 y 350.000 pacientes con EM. En Australia hay un gradiente latitudinal entre la población blanca con tasas mayores en el sur que en el norte. En resumen, la EM es común en áreas pobladas por norte-europeos (entre las personas de origen norte-europeo aproximadamente una de cada mil desarrollarán EM a lo largo de su vida) e infrecuente en regiones donde la población es de origen africano o asiático (Compston, 1999). Todo esto apoya la existencia de un factor genético. En 1994, Poser propuso una hipótesis según la cual la EM se originaría en las poblaciones con antecedentes escandinavos en las que se conocía a la enfermedad como el “mal de Odín”, y se propagaría a través de las invasiones vikingas (Poser, 1994, 1995).

En la actualidad, hay una tendencia hacia el aumento de la prevalencia e incidencia (número de casos nuevos al año), especialmente en el sur de Europa. Sin embargo la incidencia ha disminuido en algunas, aunque no en todas las zonas del norte de Europa. En regiones con altas prevalencia e incidencia es donde más a menudo se han encontrado tasas estables o en disminución. No se conoce con certeza si los aumentos en incidencia observados se pueden explicar por un aumento en la vigilancia de la enfermedad y una mejora de las técnicas diagnósticas. Hay un gran reservorio de casos de gravedad intermedia cuyo reconocimiento depende mucho de la pericia y recursos del sistema sanitario (Noseworthy *et al.*, 2000). No se comprenden las razones de la variación que existe en la prevalencia e incidencia de la EM en las distintas zonas geográficas. Se han barajado explicaciones ambientales y genéticas, y probablemente ambos factores contribuyan.

La EM afecta a todas las edades, pero la mayoría de los pacientes desarrollan los síntomas entre los 18 y 50 años. Hay una predominancia femenina importante (2:1) en la EM remitente-recurrente, aunque en la EM primaria progresiva, la proporción masculina supera ligeramente a la femenina.

No se conoce con certeza si la EM clásica es una enfermedad simple o si los patrones de variación clínica (por ejemplo las formas progresiva y recurrente) representan entidades distintas. Tampoco está clara la relación de la EM múltiple con otros síndromes inflamatorios y desmielinizantes menos comunes del SNC como son la

encefalomielitis aguda diseminada, neuromielitis óptica, esclerosis concéntrica de Baló, y la variante Marburg de EM aguda (Nosworthy, 1999).

1.3.2. Clínica

La característica clínica más llamativa de la EM es su gran variabilidad. Sus síntomas y signos vienen determinados por la localización de las lesiones desmielinizantes, que pueden ocurrir a lo largo del neuroeje. Sin embargo, las lesiones muestran predilección por ciertas partes del SNC con participación mayoritaria en la sustancia blanca periventricular, nervio y quiasma óptico, tronco cerebral, pedúnculos cerebelosos y médula espinal, lo que da lugar a debilidad, parestesias, alteración de la visión, diplopía, nistagmo, disartria, temblor intencional, ataxia, alteración de la sensibilidad profunda, disfunción vesical, paraparesia, alteraciones emocionales y deterioro intelectual.

1.3.3. Escalas de disfunción neurológica

La evaluación clínica es imprescindible en la EM, para valorar cuantitativamente el grado de afectación, que a su vez se necesita para conocer la evolución de la enfermedad y la influencia que sobre ella tienen los distintos tratamientos, especialmente los que están en fase experimental. En 1955, Kutzke desarrolló la primera escala para definir el estado de discapacidad física, la DSS (*Disability Status Scale*), que se aceptó mundialmente. En 1983, Kutzke publicó una versión ampliada de su escala, la EDSS (*Expanded Disability Status Scale*). Actualmente, a pesar de varias críticas, la EDSS es la escala más utilizada en todo el mundo, y funciona como un lenguaje universal entre los investigadores de la enfermedad. El estado del paciente recibe una puntuación entre 0 (exploración normal) y 10 (fallecido por EM), con intervalos de 0,5 puntos a partir de 1 punto. La puntuación se obtiene mediante la valoración de las alteraciones en los sistemas funcionales (FS). Para la valoración de los FS, Kutzke diseñó ocho escalas destinadas a cuantificar los resultados de la historia y la exploración neurológicas (función piramidal, función cerebelosa, función del tronco cerebral, función sensitiva, función esfinteriana, función visual, función mental y otras funciones).

1.4. Diagnóstico

El diagnóstico de la EM es fundamentalmente clínico aunque las imágenes de resonancia magnética (IRM) y la medida de los potenciales evocados han simplificado el proceso diagnóstico y han permitido realizarlo de forma más temprana.

Según la evolución clínica, se pueden encontrar diferentes formas de EM. La más habitual es la forma en brotes o remitente-recurrente (RR) que puede evolucionar a una forma secundaria progresiva (SP) o bien puede iniciarse con progresión sin relación con los brotes desde el inicio, es la forma primaria progresiva (PP).

Las formas remitentes se consideran clínicamente definidas cuando la disfunción neurológica es “diseminada en el espacio y en el tiempo”, este requisito junto con la exclusión de otras enfermedades sigue siendo el eje principal del diagnóstico. Ninguna prueba complementaria (de imagen, LCR o potenciales evocados) es patognomónica de la enfermedad, por lo que junto a los hallazgos clínicos sugestivos de enfermedad desmielinizante, es necesaria la valoración por un neurólogo con experiencia en dicha enfermedad. Se consideran síntomas clínicos sugestivos de enfermedad desmielinizante los síntomas neurológicos que duran más de 24 horas, se presentan habitualmente de forma subaguda y reflejan afectación de la sustancia blanca.

1.4.1. Criterios diagnósticos

El protocolo diagnóstico más utilizado hasta ahora es el del comité presidido por Poser (1983) que establece varias categorías de EM: EM clínicamente definida (dos brotes separados en el tiempo y de distinta localización en el SNC), EM definida con ayuda del laboratorio (con el apoyo de pruebas complementarias del LCR, neuroimagen o potenciales evocados) y EM clínicamente probable. Estos criterios además definen con exactitud los términos:

Brote (recurrencia, recidiva, exacerbación): es la ocurrencia de síntomas de disfunción neurológica de más de 24 horas de duración. Para aceptar la existencia de la enfermedad deben constatarse al menos dos brotes, estos deben afectar a diferentes partes del SNC y separarse en el tiempo por un periodo de, al menos, un mes.

Remisión: constituye una mejoría hasta la desaparición de los síntomas y signos que han estado presentes al menos durante 24 horas. La remisión debe permanecer un mes como mínimo para considerarse como tal.

Evidencia clínica de una lesión: presencia de algún signo clínico anormal en la exploración neurológica; se acepta como tal que el dato proceda de la historia clínica, aunque no se halle en el momento de ver al paciente, siempre que haya sido recogido por un clínico competente.

Evidencia paraclínica de una lesión: se acepta la demostración de una lesión en el SNC, haya o no dado lugar a síntomas y signos. Incluye los resultados obtenidos del estudio de los potenciales evocados, técnicas de neuroimagen y valoración urológica realizada por un experto.

Exclusiones: deben excluirse los síntomas y signos secundarios a la alteración del sistema nervioso periférico. La cefalea, convulsiones, depresión o alteraciones de la conciencia no deben en principio aceptarse como debidos a la EM.

Lesiones separadas: se consideran como tales aquellas que involucran distintas partes del neuroeje. Así por ejemplo, la neuritis óptica, si afecta a ambos ojos y ocurre en un intervalo inferior a 15 días entre uno y otro ojo, no constituye índice de existencia de lesiones separadas.

Apoyo de laboratorio: se refiere a la existencia de síntesis intratecal de IgG y de bandas oligoclonales en el LCR.

En el año 2001 se han redactado unos “nuevos” criterios diagnósticos (McDonald *et al.*, 2001) que incluyen los avances en las técnicas de imagen y otros datos clínicos y paraclínicos. Sin embargo, dado que nuestro estudio comenzó en el año 1998, hemos aplicado los criterios de Poser en el diagnóstico de los pacientes.

1.4.2. Estudio de las imágenes de resonancia magnética

Las imágenes de resonancia magnética (IRM) pueden ser muy útiles en la caracterización de los procesos patológicos subyacentes a la EM. La EM se caracteriza por la existencia de lesiones multifocales, aparecidas en diversos momentos en las IRM, especialmente las que afectan a la sustancia blanca periventricular, al tronco cerebral, cerebelo y sustancia blanca de la médula espinal.

Secuencias ponderadas en T2

Se considera que las imágenes de resonancia magnética en T2 (secuencia de IRM ponderada con TR (tiempo de repetición) (2000 ms) y TE (tiempo de eco) corto

(22-80 ms) reflejan un amplio espectro de cambios patológicos entre los que se encuentran inflamación, edema, desmielinización y gliosis. Los cambios en el número y volumen de lesiones en T2 son indicadores sensibles pero no específicos de actividad de la enfermedad y de la respuesta al tratamiento.

Secuencias ponderadas en T1

En las lesiones crónicas se producen degeneración axonal y gliosis que se observan en las secuencias en T1 (secuencia de IRM ponderada con TR corto (540 ms) y TE corto (15 ms) como lesiones hipointensas denominadas "agujeros negros" o "*black holes*". Estas señales hipointensas probablemente reflejan un sustrato patológico diferente según el tipo de lesión. En las lesiones activas reflejan la presencia de edema y grados variables de destrucción tisular y las señales pueden desaparecer cuando se resuelve el proceso inflamatorio. En las placas crónicas las señales hipointensas persisten y reflejan la presencia de destrucción tisular irreversible.

Secuencias ponderadas en T1 con gadolinio

Las imágenes de resonancia magnética en T1 que captan contraste de gadolinio detectan desmielinización inflamatoria con rotura de la barrera hematoencefálica (BHE) (lesiones activas). Existe evidencia patológica de que la sustancia blanca de apariencia normal está alterada en los pacientes con EM y que los cambios en esta sustancia preceden en semanas o meses a la alteración de la barrera que permite el paso de contraste y su visualización en IRM. También los estudios seriados de IRM de la sustancia blanca de apariencia normal pueden ser útiles para determinar dónde pueden desarrollarse nuevas lesiones (Brück *et al.*, 1997; Van Walderveen *et al.*, 1998; Van Waesberghe *et al.*, 1999).

Espectroscopia de resonancia magnética de protón

La espectroscopia de resonancia magnética permite medir de forma no invasiva los metabolitos cerebrales tales como colina, creatina, N-acetil aspartato (NAA) y lactato. Midiendo la intensidad de resonancia relativa de los grupos N-acetilo (principalmente de NAA que es un aminoácido confinado en las células del SNC y

especialmente en las neuronas y sus prolongaciones en el cerebro maduro) con respecto a la de la creatina, se puede obtener un índice de medida de pérdida axonal. Recientemente se ha descrito la presencia de NAA en otros tipos de células además de en las neuronas, tales como células precursoras de oligodendrocitos, oligodendrocitos inmaduros y maduros. Estos estudios aportan una nueva información sobre la distribución del NAA en el cerebro (Bhakoo *et al.*, 2000).

Transferencia de magnetización

Es una técnica de resonancia magnética basada en el intercambio de magnetización entre los núcleos de hidrógeno que forman parte del agua libre y los que forman parte del agua ligada a macromoléculas o de sus propios grupos hidroxilo. Entre estas macromoléculas cabe destacar el colesterol, que es un componente cuantitativamente importante de la mielina.

Cuantificación del volumen cerebral y del área medular cervical

La cuantificación del volumen cerebral y, por tanto, del grado de atrofia cerebral tiene una estrecha correlación con el grado de disfunción clínica. Esta valoración es especialmente útil en las formas PP, ya que en estos pacientes la carga de lesiones en T2 es cuantitativamente menor que en otras formas clínicas de la enfermedad.

1.4.3. Estudio del líquido cefalorraquídeo

El diagnóstico clínico de la EM se puede confirmar mediante el uso de técnicas de laboratorio, y en especial mediante el análisis del LCR. De los diversos análisis que se pueden aplicar al LCR, los más importantes son los que detectan una respuesta inmune humoral dentro del SNC. El resultado de estos análisis puede demostrar si las anomalías observadas en el SNC tienen un origen inflamatorio.

Extracción del LCR y examen de las células

Se extrae una cantidad determinada de LCR por punción lumbar y se realiza un examen citológico que se considera una prueba complementaria en el diagnóstico de la

EM. El número de leucocitos en el LCR normal no debe ser mayor de 4 por μl . El 50% de los pacientes con EM tienen un número normal de células y sólo el 1% presentan más de 35 por μl . Un recuento mayor de 35 células por μl descarta el diagnóstico de EM (Andersson *et al.*, 1994).

Evaluación del daño de barrera

Mediante el análisis del contenido de proteínas del LCR lumbar es posible comprobar la integridad funcional de la barrera hematoencefálica (BHE), realmente la barrera sangre-LCR. En personas sanas el paso de proteínas plasmáticas a través de la BHE depende de sus radios hidrodinámicos, que están relacionados con sus pesos moleculares. En tales poblaciones las concentraciones de proteínas plasmáticas en LCR dependen de diversos factores tales como la concentración plasmática, la integridad de la BHE, la tasa de flujo del LCR, el tamaño molecular de la proteína y la edad del paciente.

La albúmina, la mayor proteína del LCR, sólo se sintetiza por los hepatocitos y no se cataboliza dentro del SNC. Diversos estudios han demostrado que el suero es la fuente de albúmina del LCR, lo cual confirma que los cocientes de albúmina ($Q_{\text{Alb}} = \text{albúmina LCR}/\text{albúmina suero}$) pueden evaluar la función de la BHE. Otros métodos alternativos serían la medida de la cantidad de albúmina en LCR (cualquier aumento sobre la media indica una alteración en la BHE) y la determinación de proteínas totales, aunque es menos fiable que la de albúmina. El cociente de albúmina depende de la edad. El límite superior es $5,0 \times 10^{-3}$ para pacientes menores de 15 años, $6,5 \times 10^{-3}$ para pacientes entre 16 y 40 años, 8×10^{-3} para pacientes entre 40 y 60 años y $8-9 \times 10^{-3}$ para pacientes con más de 60 años. La mayoría de los pacientes con EM tienen valores del cociente de albúmina inferiores al límite superior. Valores superiores son indicativos de otras enfermedades neurológicas (Andersson *et al.*, 1994).

Cuantificación de la respuesta inmune humoral en el cerebro

La detección de una respuesta inmune humoral en el SNC requiere un análisis que discrimine entre las fracciones de inmunoglobulinas que procedan de la sangre y del cerebro. Esta cuantificación se basa en el cálculo de los cocientes LCR/suero. Estos cocientes también se utilizan para comparar la síntesis intratecal de todas las clases de

inmunoglobulinas (IgG, IgA, IgM), así como el seguimiento cuantitativo de la síntesis intratecal de anticuerpos y el cálculo de los valores del índice de anticuerpos específicos.

La utilización del cociente de IgG LCR/suero reduce la variación debida a las diferencias en las concentraciones individuales de IgG en el suero. Al referir este cociente respecto al cociente de albúmina es posible reducir más la variación en el cociente de IgG debida a las diferencias individuales en la BHE. Existen varias aproximaciones por las que ambos cocientes se combinan para obtener una expresión que discrimine entre la fracción de IgG sintetizadas localmente en el cerebro y la fracción de IgG del LCR que procede de la sangre por filtración (Andersson *et al.*, 1994).

Isoelectroenfoque de IgG oligoclonales

La mayoría (95%) de los LCR de pacientes con EM presentan bandas oligoclonales de IgG. El isoelectroenfoque es el método más sensible para la detección de la respuesta inmune humoral cuando se utilizan las mismas cantidades de IgG en muestras paralelas de LCR y suero. Las bandas oligoclonales que se resuelven se visualizan especialmente por tinción de anticuerpos específica para IgG. Existen diversos tipos de patrones de bandas oligoclonales pero solamente representan síntesis local de IgG dentro del SNC cuando no aparecen en el suero simultáneamente, o si lo hacen, es en menor cantidad que en el LCR. Sin embargo, la detección de bandas oligoclonales por isoelectroenfoque no es específica para la EM, sólo tiene valor diagnóstico cuando se han descartado otras causas de inflamación del SNC (Andersson *et al.*, 1994).

1.5. Histología del SNC y Anatomía patológica

1.5.1. Histología del SNC

Neuronas

Las neuronas son el componente más importante del SNC. Conectan para formar una intrincada red que conduce impulsos eléctricos. La sustancia gris está compuesta

principalmente por los cuerpos celulares, y la sustancia blanca está compuesta por las fibras nerviosas (axones) cubiertos por mielina que aísla los axones nerviosos permitiendo una conducción más rápida de los impulsos eléctricos. La mielina compacta consiste en una membrana condensada, enrollada alrededor de los axones para formar la vaina aislante segmentada que es necesaria en la conducción axonal saltatoria. Los canales de sodio voltaje-dependientes están localizados entre los segmentos de mielina, en los nodos de Ranvier, a partir de donde se propagan los potenciales de acción y se extienden pasivamente a lo largo del segmento mielinizado para enviar otro potencial de acción al nodo siguiente.

Oligodendrocitos

Los oligodendrocitos son los responsables de la mielinización de los axones en el SNC. Un solo oligodendrocito puede ser el responsable de mielinizar hasta 50 axones. La estirpe oligodendroglial está compuesta por una serie de fenotipos celulares que va desde células madre indiferenciadas (*stem cells*) hasta células maduras formadoras de mielina. Las células precursoras de oligodendrocitos (OPC), también conocidas como células progenitoras O-2A, son células bipolares proliferantes que pueden diferenciarse hacia oligodendrocitos maduros o hacia astrocitos tipo 2 *in vitro*. Las OPC se transforman en preoligodendrocitos multipolares inmunorreactivos para el anticuerpo anti-sulfátidos O4 que dan lugar a oligodendrocitos maduros que expresan galactocerebrósido C (Gal C). El fenotipo de oligodendrocito maduro se identifica por la aparición secuencial de antígenos específicos de mielina, proteína proteolipídica (PLP) y proteína básica de mielina (MBP). Se considera que las OPC *in vivo* se originan y diferencian inicialmente en las zonas subventriculares de los ventrículos laterales del cerebro que contiene una población heterogénea de progenitores. Después de multiplicarse, eventualmente emigran a la sustancia blanca y gris subyacente donde se desarrollan y maduran. (Dawson *et al.*, 2000; Levine *et al.*, 2001).

Astrocitos

Los astrocitos han sido considerados como células de soporte trófico, estructural y metabólico de las neuronas y otras células dentro del SNC, pero sin participación activa en el procesamiento de información. Esta idea, mantenida durante más de un

siglo, ha sido desafiada durante la última década, cuando el desarrollo de nuevas herramientas de estudio de la fisiología y la biología celular ha proporcionado evidencias experimentales que sugieren una mayor relevancia funcional de los astrocitos. Recientemente se ha demostrado que los astrocitos poseen una forma de excitabilidad basada en variaciones de la concentración intracelular de calcio y se comunican entre ellos mediante ondas de calcio intracelulares. Además, neurotransmisores liberados sinápticamente son capaces de movilizar calcio de los reservorios intracelulares astrocitarios. A su vez, los astrocitos pueden liberar glutamato de manera calcio dependiente, modulando así la actividad eléctrica neuronal y la transmisión sináptica (Araque *et al.*, 2001). Además, los astrocitos tienen también la función de reparar el tejido dañado en el SNC, cicatrizando las áreas lesionadas. Este proceso de reparación se conoce con el nombre de astrocitosis, gliosis o esclerosis.

Vasos sanguíneos cerebrales y barrera hematoencefálica

La barrera hematoencefálica controla el paso de células y moléculas al SNC. Los capilares cerebrales difieren estructural y funcionalmente de los vasos sanguíneos de otros órganos, existiendo una compleja relación entre sus células endoteliales, membranas basales y células asociadas (por ejemplo macrófagos perivasculares y astrocitos). Los endotelios de la barrera hematoencefálica están firmemente unidos con una resistencia eléctrica extremadamente alta. Además, hay poco o ningún paso de moléculas a través de las células endoteliales en las vesículas de transporte. Las células endoteliales están casi completamente rodeadas por las prolongaciones de los astrocitos y por microglía, y los macrófagos perivasculares, con características fagocíticas, actúan como una línea defensiva adicional.

1.5.2. Anatomía patológica

La EM produce lesiones que son visibles a simple vista en una observación *post-mortem*. Una característica general es la atrofia en el cerebro y médula espinal, con ensanchamiento de los surcos cerebrales y dilatación de los ventrículos. El examen histológico revela la existencia de lesiones redondas, ovales o irregulares, ligeramente deprimidas y bien delimitadas en la sustancia blanca del SNC. Estas lesiones, denominadas placas varían en tamaño y duración, incluso dentro de un mismo paciente.

Las lesiones antiguas son de color gris, translúcidas y endurecidas (esclerosadas). Las nuevas son esponjosas y rosadas. A lo largo de la vida del paciente y durante muchos años, aparecen nuevas lesiones en diferentes partes del SNC. Estas placas aumentan en tamaño bien por coalescencia de lesiones adyacentes o por extensión en forma de dedo a partir del borde de la placa (*Dawson's fingers*). El patrón de distribución de las placas varía considerablemente de un paciente a otro. Toda la sustancia blanca es susceptible, pero la gris puede también estar involucrada, lo cual está generalmente infravalorado. Las lesiones tienen predilección por los nervios ópticos, sustancia blanca periventricular, tronco cerebral, cerebelo y sustancia blanca de la médula espinal. Las placas son comunes cerca del sistema ventricular, especialmente en los ángulos de los ventrículos laterales. Además, tienden a estar rodeando uno o varios vasos de mediano tamaño (Lassmann, 1995).

Las placas son heterogéneas y se pueden clasificar, según diversos criterios. Estudios recientes realizados en un gran número de muestras de biopsias y autopsias de pacientes con EM sugieren que en los distintos pacientes pueden existir mecanismos diferentes de destrucción de la mielina. Se han encontrado cuatro patrones de lesiones. Mientras que en las lesiones de los patrones I y II el objetivo principal del proceso destructivo es la mielina, en los patrones III y IV parecen ser los oligodendrocitos los que sufren una degeneración. Sólo los tipos I y II se han podido reproducir en modelos animales, en los que las toxinas liberadas por los macrófagos tales como el TNF- α o especies reactivas de oxígeno (patrón I) o anticuerpos y complemento (patrón II) median la desmielinización. Las lesiones del patrón III se caracterizan por tener bordes bien definidos, y los vasos inflamados pueden estar rodeados por un reborde de mielina con una pérdida inicial de glucoproteína asociada a la mielina (MAG) dentro de las lesiones y con apoptosis de oligodendrocitos. En el patrón IV, los oligodendrocitos degeneran en la sustancia blanca que rodea a la placa por mecanismos no apoptóticos (Kornek y Lassmann, 2003).

A su vez, las placas pueden estar inflamadas y desmielinizadas (activas) o latentes (inactivas) y parece haber importantes diferencias patológicas entre las placas nuevas y crónicas (Lassmann, 1995; Kornek *et al.*, 2001).

Placas activas o agudas

La identificación de los productos de degradación de la mielina en los macrófagos es el método más fiable de identificación de lesiones activas. Las células inflamatorias presentan una localización perivascular típica, pero pueden infiltrarse difusamente en el parénquima. La BHE es más permeable en las placas activas que en las inactivas lo que permite a los macrófagos y a los linfocitos T entrar en el cerebro y causar inflamación (los macrófagos superan mucho en número a los linfocitos T). Los macrófagos pueden ser las células clave en la patogénesis de las lesiones activas, promoviendo la desmielinización al secretar citoquinas y presentar antígenos a los linfocitos T (Fabry *et al.*, 1994).

En estas placas, las vainas de mielina y algunas células son constantemente atacadas y su destrucción produce abundantes productos de degradación de la mielina y restos lipídicos. El grado de destrucción de los oligodendrocitos (al contrario que la degradación de la mielina) es variable. Además, en los bordes de las placas activas hay gran cantidad de macrófagos, y los astrocitos se extienden varios centímetros dentro del tejido que rodea a la placa. Ambos tipos de células pueden estar involucrados en la ampliación de la placa. Estas lesiones captan gadolinio en las IRM en las secuencias ponderadas en T1, lo cual permite saber cuando se están iniciando nuevas lesiones en el SNC. Si estas placas permanecen activas varios meses, pueden aumentar. Las lesiones activas durante mucho tiempo suelen aparecer hipocelulares y esclerosadas en el centro, desarrollando algunas de las características de las placas inactivas antiguas.

Placas inactivas

Son áreas que han sido afectadas por la enfermedad en el pasado, y aunque ya no son activas, muestran un daño residual. Están desmielinizadas (pero no contienen productos de degradación de la mielina), muestran pérdida de oligodendrocitos, son hipocelulares y esclerosadas. A lo largo de estas placas se observan axones desnudos que contactan con astrocitos de forma aberrante (debido a la pérdida de mielina). Las vénulas en las placas inactivas presentan paredes adelgazadas y los infiltrados inflamatorios perivenosos persisten. En las regiones periventriculares son especialmente comunes las placas inactivas alargadas.

Placas nuevas

En las placas activas de EM en el inicio de la enfermedad, la rotura de la BHE está acompañada de una acumulación de linfocitos y macrófagos alrededor de los vasos sanguíneos (hay menos células plasmáticas en las placas de EM inicial que en las de EM crónica). Las vainas de mielina se desintegran y los macrófagos infiltrados fagocitan la mielina. Los axones pueden permanecer intactos o estar fragmentados, y los astrocitos presentes cicatrizan el tejido alrededor de los axones desmielinizados. La destrucción de la mielina ocurre antes de que haya un daño evidente de los oligodendrocitos en estas etapas tempranas. Las placas contienen un número de oligodendrocitos casi normal, aunque algunos de ellos pueden ser nuevos diferenciados a partir de células progenitoras para reparar a los que se han destruido. La abundancia de zonas parcialmente remielinizadas denominadas “*shadow plaques*”, producidas por la actividad de los oligodendrocitos demuestra la normalidad relativa de esta población celular en los inicios de la enfermedad.

Placas crónicas

En contraposición a la EM inicial, las placas de EM crónica muestran una amplia pérdida de oligodendrocitos. También la remielinización es escasa y restringida a los bordes de las placas. Además, en algunos casos, la destrucción de oligodendrocitos parece ocurrir antes de la destrucción de la mielina. La activación de los astrocitos puede ser una característica muy temprana de la formación de la placa en la EM crónica, ocurriendo simultáneamente a la desmielinización activa, incluso en la sustancia blanca que la rodea. Otras características incluyen atrofia del cerebro y médula, desmielinización extensiva, pérdida de axones y esclerosis. Las placas en la EM crónica son causadas probablemente por inflamación, aunque los síntomas de esta sean menos obvios que en la EM inicial. Típicamente, la BHE está menos dañada, y la intensidad de la reacción inflamatoria perivenosa es menos pronunciada. Sin embargo, las células inflamatorias también aparecen en las placas desmielinizadas activas de la EM crónica e incluso en la sustancia blanca normal. También están presentes más células plasmáticas productoras de inmunoglobulinas que en los inicios de la enfermedad. En las placas inactivas de EM crónica, los signos de degeneración celular están restringidos a los bordes de la placa.

La frecuencia de placas activas en los pacientes con EM crónica es extremadamente baja cuando se utilizan criterios estrictos para definir la actividad de las lesiones. Aunque la remielinización es mínima en las lesiones asociadas con la EM crónica, las placas en la EM aguda y temprana pueden presentar una remielinización abundante y las lesiones en la EM crónica contienen un gran número de OPC. Así, la mielina del SNC se podría reparar y los mecanismos que promuevan la remielinización endógena podrían ser una posible estrategia terapéutica.

BHE y vasos sanguíneos cerebrales

Los episodios recurrentes de rotura de la BHE juegan un papel principal en la EM, y explicarían por qué las placas son generalmente perivenosas. El daño de la BHE se puede ver *in vivo* en las lesiones nuevas en IRM con contraste de gadolinio ya que este compuesto sólo atraviesa la BHE cuando esta dañada. Los linfocitos y los macrófagos entran al SNC por estos mismos puntos dañados.

1.6. Modelos experimentales

No existen modelos animales únicos que mimeticen todas las características de la EM, por lo que se utilizan modelos que reflejan facetas específicas de la enfermedad (Gold *et al.*, 2000). A mediados del siglo XIX, se observó la aparición de síntomas de neurodegeneración en algunas personas inmunizadas con la vacuna de la rabia desarrollada por Pasteur, compuesta por cerebro homogeneizado de animales infectados. Estudios posteriores pusieron de manifiesto que la administración de tejido nervioso sólo o con virus causaba también parálisis en animales, lo cual demostraba que el propio tejido nervioso era capaz de inducir una enfermedad autoinmune en el sistema nervioso, que actualmente conocemos como encefalomiелitis alérgica (o autoinmune) experimental (EAE). Este modelo se ha utilizado ampliamente para producir una respuesta inflamatoria crónica del SNC asociada con desmielinización y pérdida axonal. La EAE puede inducirse por la inmunización con mielina o con proteínas de mielina o por la transferencia de células T CD4+ específicas para proteínas de la mielina en varias especies animales, como ratas, ratones, conejos y primates.

Otra forma de inducir una enfermedad inflamatoria desmielinizante es mediante la inoculación de virus capaces de persistir en el SNC. El modelo mejor estudiado es el que utiliza el virus murino de la encefalomiелitis de Theiler que desencadena una respuesta patogénica que en ciertos aspectos es análoga a la EM PP ya que mantiene homologías patológicas, clínicas e histológicas (Arévalo-Martín *et al.*, 2003).

1.7. Etiología: susceptibilidad ambiental y genética

La EM se describió hace más de 150 años, pero su causa sigue siendo desconocida. A pesar de haberse planteado numerosas hipótesis sobre diferentes factores etiopatogénicos, no se ha podido identificar ninguno que explique adecuadamente la naturaleza del proceso ni su causa. Aunque es muy poco lo que se conoce acerca de los factores que contribuyen a su curso impredecible, los estudios epidemiológicos han demostrado la participación de factores ambientales y genéticos.

1.7.1. Factores ambientales

La ocurrencia de cambios rápidos en la incidencia de la EM es un argumento a favor de la influencia ambiental, como lo es la evidencia de casos aislados geográfica y cronológicamente en las epidemias, especialmente en las que tuvieron lugar en las Islas Feroe (Kurtzke y Hyllested, 1987). El aparente cambio en la frecuencia de la EM entre la gente que migra a y desde zonas de alta prevalencia es otro factor que apoya la existencia de un factor ambiental. Sin embargo cada una de estas relaciones está influida por variables que sugieren que existen otros factores que modulan el riesgo de aparición de la enfermedad.

La naturaleza de posibles factores ambientales no está clara en numerosos estudios caso-control. Así, los estudios que demuestran que la incidencia de la EM entre niños adoptados de pacientes con EM no es mayor de lo esperado parecen argumentar contra la posibilidad de que un factor transmisible es el responsable primario del aumento de riesgo de la enfermedad entre parientes y sugiere que los responsables pueden ser factores genéticos (Noseworthy *et al.*, 2000).

El herpesvirus humano tipo 6 puede causar una situación que mimetiza a la EM y aparece en los oligodendrocitos de los tejidos de algunos pacientes y no en tejidos control. Sin embargo no se ha confirmado la causa de esta relación. En otro estudio, se

aisló *Chlamydia pneumoniae* en el 64% de los pacientes con EM respecto al 11% en los pacientes control con otras enfermedades neurológicas y se detectó en el LCR por el ensayo de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) en el 97% de los pacientes de EM con respecto al 18% en los pacientes control. Estos resultados tienen aún que confirmarse por otros laboratorios (Sriram *et al.*, 1999).

1.7.2. Factores genéticos

Sin lugar a dudas los factores genéticos tienen una importancia fundamental en la susceptibilidad a la EM. La mayoría de los casos son esporádicos, a pesar del claro riesgo entre parientes de pacientes y, por ejemplo, la tasa de concordancia entre gemelos monozigóticos (31%) es aproximadamente seis veces mayor que la tasa entre gemelos dizigóticos (5%). El riesgo absoluto de la enfermedad entre parientes de primer grado de un paciente con EM es menor del 5%, sin embargo el riesgo en estos parientes es 20 a 30 veces mayor al de la población general. El modo de transmisión de la susceptibilidad genética de la EM es complejo. Los estudios genéticos de ligamiento y asociación han identificado como determinante genético para la EM al complejo mayor de histocompatibilidad (CMH), localizado en el brazo corto del cromosoma 6. La región clase II de este sistema se asocia con la EM, en particular el alelo DR2 y su correspondiente haplotipo (DRB1*1501, DQA1*0102, DQB1*0602).

Además, se han realizado otros estudios con genes candidatos en los que se ha estudiado el genoma completo (Whitney *et al.*, 1999; Lock *et al.*, 2002; GAMES, 2003; Goertsches *et al.*, 2003; Mycko *et al.*, 2003) y se han identificado numerosas regiones de interés aunque ninguna se ha podido asociar específicamente con la enfermedad. Considerando el gran número de pacientes que se han evaluado en esos estudios, se podría considerar que no hay un gen que influya directamente.

La gravedad y curso de la EM también pueden estar influidos por factores genéticos. La evidencia epidemiológica que justifica esta premisa procede de estudios que examinan la tasa de concordancia entre variaciones en el curso de la enfermedad, entre las que se incluyen la edad de instauración, la proporción de pacientes en los que progresa la enfermedad, y la evolución de la discapacidad a lo largo del tiempo. Los polimorfismos HLA-DR y DQ no se asocian con el curso y gravedad de la EM, a pesar de su importante contribución a la susceptibilidad de la enfermedad. Recientemente, se han asociado con el curso de la enfermedad variantes en el receptor de la interleuquina-

1- β , genes antagonistas del receptor de la interleuquina-1, genes del receptor de inmunoglobulinas F_c y gen de la apolipoproteína E, pero estos hallazgos están a la espera de confirmación (Noseworthy *et al.*, 2000).

1.8. Fisiopatología

Se considera que los síntomas iniciales de la EM son el resultado de la desmielinización axonal, que produce una ralentización o bloqueo de la conducción nerviosa. El cerebro casi siempre está involucrado como se comprueba en las IRM, pero la mayoría de las lesiones de la sustancia blanca no se pueden asociar a síntomas clínicos específicos. Las lesiones del tronco cerebral y del cerebelo presentan correlaciones clinicopatológicas precisas. Es frecuente la participación de la vía visual anterior, y también la médula espinal suele estar afectada produciendo alteraciones motoras, sensoriales y en las funciones autónomas (Compston y Coles, 2002).

Las consecuencias de la desmielinización en la conducción saltatoria explican muchas de las características clínicas de la EM. Los axones parcialmente desmielinizados conducen los impulsos a menos velocidad, lo que explica los retrasos de conducción característicos en los potenciales evocados. Los axones desmielinizados pueden descargar espontáneamente y aumentar su sensibilidad, causando destellos de luz al mover el ojo (fosfenos) y una sensación eléctrica que baja por la médula espinal al flexionar el cuello (signo de Lhermitte). En los axones parcialmente desmielinizados la conducción está comprometida y no pueden soportar la caída de capacitancia de la membrana inducida por un aumento de temperatura. Esto produce un fallo en la conducción que causa los síntomas y signos característicos del fenómeno de Uhthoff. Entre axones vecinos desmielinizados se origina una transmisión con interferencias, que produce síntomas paroxísticos (neuralgia de trigémino, ataxia, y disartria, o dolor postural tetánico) que dura uno o dos minutos y que a menudo se desencadena por contacto o movimiento.

La desconexión corticosubcortical o corticocortical resultantes de la desmielinización periventricular y del cuerpo calloso es la explicación que se da actualmente al déficit cognitivo de la EM, dado que las funciones superiores, como el razonamiento abstracto y la memoria, requieren un proceso de integración que puede interrumpirse en varias regiones del cerebro. El grado de deterioro intelectual varía ampliamente entre los pacientes, y no es infrecuente que sea un síntoma infravalorado.

Los individuos con EM sufren una característica fatiga por tareas intelectuales o físicas y tardan en recuperarse más tiempo de lo normal. Aunque muy desconocida, y probablemente multifactorial, la fatiga en la EM puede producir una gran discapacidad, incluso por sí sola. Otros síntomas se deben al edema, a los mediadores inflamatorios tóxicos y a la pérdida de axones. Los que se deben a edema y mediadores tóxicos se suelen resolver rápidamente al comenzar la terapia con corticosteroides. Los que se deben a la destrucción axonal tienden a ser permanentes.

La regresión de los síntomas se ha atribuido a la resolución del edema inflamatorio y a la remielinización parcial. Sin embargo, las citoquinas inflamatorias pueden inhibir la función axonal, y la recuperación de la función puede ser el resultado de la redistribución de los canales de sodio en los segmentos de axones desmielinizados. El daño axonal irreversible, la astrogliosis y el agotamiento de los precursores de oligodendrocitos pueden ser debidos a repetidos episodios de actividad de la enfermedad y conducir a la pérdida progresiva de función neurológica. El daño axonal puede ocurrir no sólo en las últimas fases de la EM sino también después de los episodios tempranos de desmielinización inflamatoria. No se conoce aún la patogénesis de este daño axonal temprano.

La conducción de las fibras nerviosas a veces se restablece antes del inicio de la remielinización. Esto es más fácil en las fibras de diámetro pequeño (por ejemplo en los nervios ópticos), que en las de gran diámetro (en la médula espinal). La remielinización es más fácil en los inicios de la EM. Sin embargo, no siempre se recupera la función, porque la nueva mielina puede ser fisiológicamente anómala. Sin embargo, la remielinización es probablemente una de las causas de remisión definitiva de los síntomas y la progresión de la enfermedad puede estar causada por un fallo en la remielinización.

1.9. Tratamientos

Dada la considerable heterogeneidad clínica, genética y patológica de la EM, quizás más de un mecanismo patogénico contribuya al daño tisular. Esta posibilidad tiene implicaciones terapéuticas ya que pueden ser necesarias diversas estrategias para tratar la enfermedad con eficacia. El objetivo del tratamiento es reducir la frecuencia y limitar las secuelas de los brotes, mejorar los síntomas, prevenir la discapacidad causada por la progresión de la enfermedad y promover la reparación de los tejidos.

EM remitente-recurrente

Durante décadas se han utilizado tratamientos breves con corticosteroides para favorecer la recuperación del brote más rápidamente. Sin embargo, esta mejoría del brote disminuye con el tiempo. En los últimos años varios agentes han demostrado disminuir la frecuencia de brotes y los marcadores de actividad de la enfermedad a corto plazo, evaluados según las manifestaciones clínicas y por IRM, aunque el beneficio a largo plazo de estos tratamientos necesitará aún un estudio más prolongado. El primer tratamiento útil en la prevención de nuevos brotes fue el interferón β 1b. En 1993 se demostró que reducía la aparición de nuevos brotes en un 30%. En 1995, el copolímero-1 o acetato de glatiramero fue también capaz de demostrar eficacia en la reducción del número de brotes. El interferón β 1a, en 1996, fue el primer tratamiento que además de reducir el número de brotes y su intensidad, disminuía la progresión de la discapacidad. Tras el uso prolongado de interferón pueden aparecer anticuerpos neutralizantes que reducen su eficacia terapéutica. En ese caso se utilizan fármacos alternativos como azatioprina o mitoxantrona.

EM primaria progresiva

Los ensayos clínicos con interferón β han demostrado que no se aprecia mejoría clínica y no hay datos que justifiquen la utilización de inmunomoduladores en esta forma de EM. Una vez el paciente entra en la fase progresiva de la enfermedad, ninguno de los fármacos ensayados -ciclofosfamida, ciclosporina, metotrexato, cladribina, mitoxantrona- ni la irradiación linfóide total han mostrado ser efectivos en modificar el curso progresivo de la enfermedad. El trasplante autólogo de progenitores hematopoyéticos obtenidos de sangre periférica es una opción terapéutica emergente que se basa en la erradicación de las células T autorreactivas y la reconstrucción, a partir de los progenitores, de un nuevo sistema inmune que tolere los antígenos responsables de desencadenar y perpetuar la respuesta inmune.

EM secundaria progresiva

No están claras las indicaciones de tratamiento para esta forma de la enfermedad. Se postula que probablemente la utilidad de interferón β podría limitarse sólo a los pacientes con actividad inflamatoria. En Europa y Canadá se ha aprobado el tratamiento de las formas secundarias progresivas que continúan teniendo brotes con interferón β 1-a y con interferón β 1-b.

También se ha utilizado mitoxantrona en formas de EM SP con brotes que no hayan respondido al tratamiento inmunomodulador convencional y que presenten claras muestras de inflamación activa.

2. INFLAMACIÓN Y DESMIELINIZACIÓN

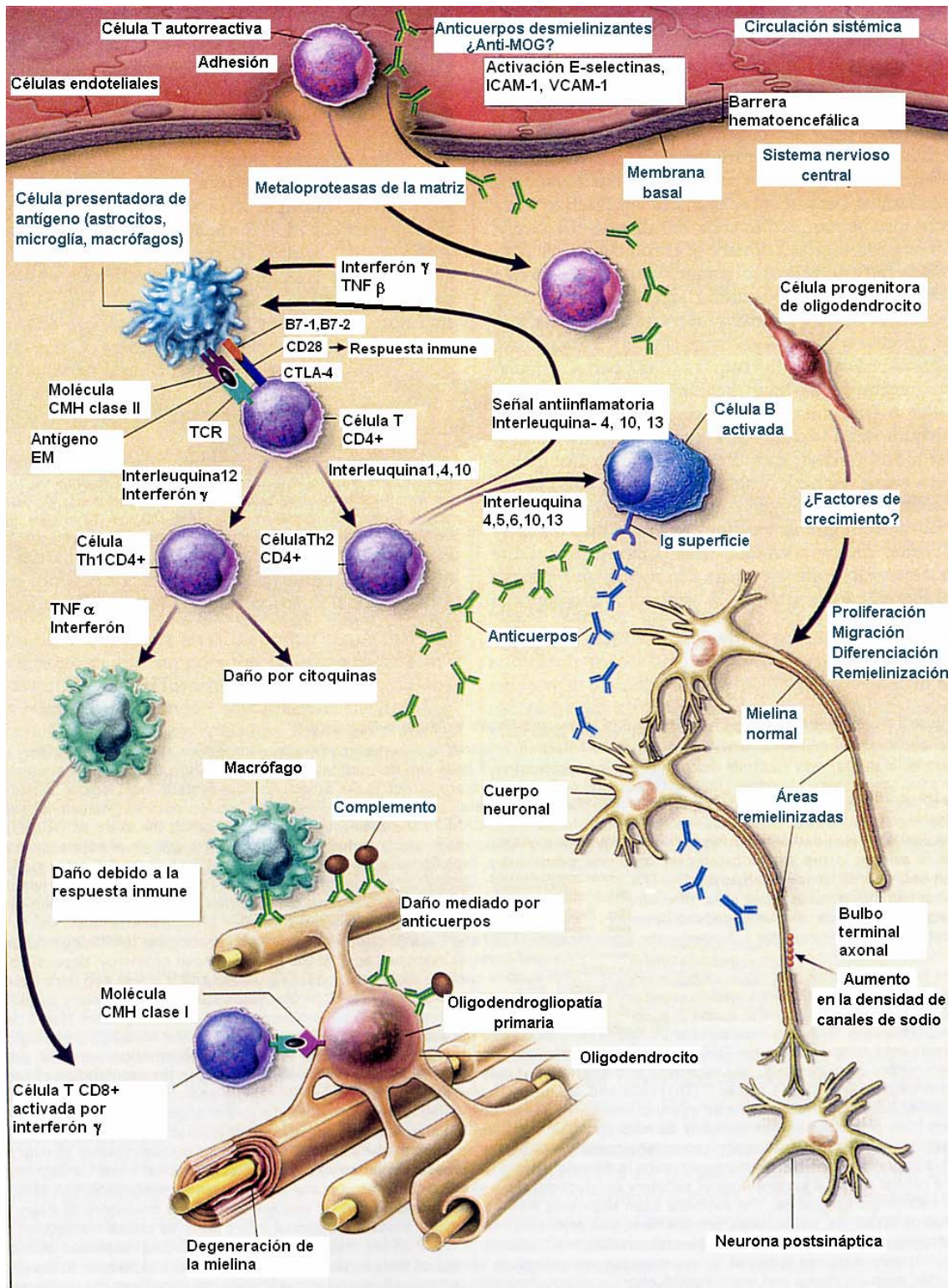
2.1. Inmunopatogenia e inflamación

La EM es una enfermedad inflamatoria y desmielinizante, en la que el daño y la pérdida axonal son importantes para el desarrollo de la discapacidad irreversible. La mayoría de los investigadores creen que el daño de los tejidos en la EM tiene una causa inmunológica en personas genéticamente susceptibles (Noseworthy, 1999). Sin embargo la secuencia de eventos que inicia la enfermedad dista mucho de conocerse.

Los modelos experimentales de desmielinización inflamatoria *in vitro* e *in vivo* sugieren que diversos procesos de la enfermedad, que incluyen autoinmunidad e infección viral, pueden inducir la formación de placas desmielinizadas inflamatorias análogas a las de la EM. Se piensa que células T CD4+ activadas específicas para uno o más autoantígenos se adhieren a la superficie de las células endoteliales en las vénulas del SNC y migran dentro del SNC en el momento en que se rompe la BHE (Figura 1).

Este proceso conlleva a una amplificación de la respuesta inmune después del reconocimiento de antígenos diana sobre células presentadoras de antígeno. Se ha propuesto la existencia de células T que son reactivas a varios posibles “autoantígenos de esclerosis múltiple”, algunos de ellos relacionados con la mielina como MBP, MAG, glucoproteína de la mielina de oligodendrocitos (MOG), PLP, α B-cristalina, fosfodiesterasas, y proteína S-100 y otras proteínas no mielínicas como las proteínas de choque térmico (Steinman, 2000). La implicación adicional de algunos factores como

Figura 1. Mecanismos posibles de lesión y reparación en la EM. Factores ambientales y genéticos tales como infecciones virales, lipopolisacáridos bacterianos, superantígenos, metabolitos reactivos y estrés metabólico pueden facilitar la movilización de células T autorreactivas y de anticuerpos desmielinizantes desde la circulación sistémica al interior del SNC gracias a la rotura de la BHE. En el SNC, otros factores locales como infecciones virales o estrés metabólico pueden activar la expresión de moléculas de adhesión endotelial, como la molécula de adhesión intracelular 1 (ICAM-1), la molécula de adhesión celular-vascular 1 (VCAM-1) y la E-selectina, que hacen posible la entrada de células T al SNC. Las proteasas, como las metaloproteasas de la matriz, pueden incrementar la migración de células inmunes autorreactivas mediante la degradación de macromoléculas de la matriz extracelular. Las citoquinas proinflamatorias liberadas por las células T activadas, tales como el interferón- γ y el TNF- β pueden activar la expresión de moléculas en los linfocitos y células presentadoras de antígeno. La unión de posibles antígenos de EM, como MBP, MAG, MOG, PLP, α B-cristalina, fosfodiesterasas y proteína S-100, por medio del complejo trimolecular – junto con el receptor de la célula T y las moléculas del CMH II sobre las células presentadoras de antígeno - pueden desencadenar un aumento en la respuesta inmune contra el antígeno unido, o por el contrario, pueden desencadenar anergia (disminución de la respuesta inmune), dependiendo del tipo de señal que resulte de las interacciones con las moléculas coestimuladoras de la superficie (por ejemplo CD28 y CTLA-4) y sus ligandos (por ejemplo B7-1 y B7-2). La anergia puede ser el resultado de la liberación de citoquinas antiinflamatorias (interleuquina-4 e interleuquina-10). Las células Th2 pueden enviar señales antiinflamatorias a las células presentadoras de antígeno activadas y estimular a las células B productoras de anticuerpos que pueden ser patológicos o por el contrario reparadores. Por otra parte, si los antígenos producen un aumento de la respuesta inmune, las citoquinas proinflamatorias (por ejemplo interleuquina-12 o interferón- γ) pueden desencadenar una cascada de eventos que conduce a la proliferación de células Th1 proinflamatorias y por último a la lesión de la mielina de los oligodendrocitos. Se han postulado múltiples mecanismos de daño a la mielina mediados por la respuesta inmune: daño a los oligodendrocitos y a la mielina mediado por citoquinas, digestión de antígenos de mielina por macrófagos que implica la unión de anticuerpos a la mielina y a los oligodendrocitos (por ejemplo citotoxicidad dependiente de anticuerpos), daño mediado por complemento y daño directo a los oligodendrocitos por células T CD4+ y CD8+. La consecuencia de todos estos procesos es que los axones desmielinizados no son capaces de transmitir los potenciales de acción con eficacia dentro del SNC por pérdida de la conducción saltatoria. Se produce una ralentización o bloqueo de los potenciales de acción que da lugar a los síntomas neurológicos. Los segmentos axonales expuestos pueden ser susceptibles a un daño adicional procedente de mediadores solubles (citoquinas, quimioquinas, complemento y proteasas) que producen un daño axonal irreversible (como la rotura axonal y la formación de bulbos axonales terminales). Hay varios mecanismos posibles de reparación de la vaina de mielina, como la resolución de la respuesta inflamatoria seguida por remielinización espontánea, diseminación de los canales de sodio a partir de los nódulos de Ranvier para cubrir los segmentos axonales desnudos y restaurar la conducción, remielinización mediada por anticuerpos, y remielinización procedente de la proliferación, migración y diferenciación de OPC. (Modificado de Noseworthy *et al.*, 2000).



autoanticuerpos o citoquinas puede ser también necesaria para producir la placa desmielinizada (Noseworthy, 1999; Lucchinetti *et al.*, 2000) (Figura 1).

Los anticuerpos que se dirigen contra los antígenos localizados en la superficie de la mielina o del oligodendrocito pueden causar desmielinización directa, posiblemente a través de la activación de complemento, que conduce a una citolisis mediada por complemento. Estos anticuerpos pueden tener acceso al SNC mediante la rotura de la BHE como consecuencia de la respuesta inflamatoria iniciada por las células T. La existencia de desmielinización debida a anticuerpos se justifica en parte por la observación de que la desmielinización aumenta por la administración de anticuerpos específicos de la MOG (glucoproteína de la mielina de oligodendrocitos) cuando se induce en ratas la encefalomiелitis alérgica experimental. En los cerebros de pacientes con EM se pueden encontrar anticuerpos contra MOG y MBP. En las lesiones de EM en las que la mielina se está degradando, pueden estar presentes depósitos de inmunoglobulinas y de complemento activado (Storch *et al.*, 1998). Todas estas observaciones en conjunto sugieren que los procesos inmunitarios tienen una gran importancia en la patogenia de la EM. Existen otros factores que también pueden contribuir a la degradación de la mielina y el daño en los oligodendrocitos. Los macrófagos activados y las células microgliales pueden contribuir a esta actividad produciendo citoquinas proinflamatorias (como TNF- α e interferón- γ) (Figura 1) generando especies reactivas de oxígeno o nitrógeno, produciendo aminoácidos excitatorios, activando componentes del complemento, o liberando enzimas proteolíticas o lipolíticas. Otros factores potencialmente tóxicos para las células oligodendrogiales incluyen productos solubles de las células T (tales como perforina), la interacción del antígeno Fas con Fas ligando, la citotoxicidad mediada por la interacción de las células CD8⁺ con los antígenos del complejo mayor de histocompatibilidad clase I (CMH) sobre las células presentadoras de antígeno, y las infecciones virales persistentes (Noseworthy *et al.*, 2000).

2.2. Desmielinización

Se ha demostrado que los síntomas iniciales de la EM se deben a la desmielinización de los axones neuronales causada por la inflamación del SNC y que la pérdida de aislamiento de la fibra nerviosa produce la disminución de la velocidad de conducción con deficiencia en la función neuronal. La desmielinización focal contribuye a una pérdida de función consecuente con el daño del SNC que puede conducir a una disfunción neurológica grave (Genain *et al.*, 1999; Noseworthy, 1999, 2000).

En la EM pueden estar involucrados varios mecanismos patogénicos. Hay un importante grado de variabilidad entre pacientes tanto en las características estructurales como inmunológicas de las lesiones. La supervivencia de los oligodendrocitos varía de paciente a paciente pero es uniforme dentro de un paciente determinado, lo que sugiere que el foco de la lesión (mielina, oligodendrocito maduro, célula progenitora) varía de un paciente a otro. Aunque la mayoría de las lesiones se caracterizan por una reacción inflamatoria, compuesta principalmente por linfocitos T y macrófagos (Figura 1), se han descrito diversos tipos de destrucción de la mielina.

En algunas lesiones, la presencia de inmunoglobulinas y de componentes del complejo terminal del complemento activado sugiere que los anticuerpos desmielinizantes tienen un papel patogénico. Diversos anticuerpos presentes en el LCR de los pacientes, con afinidad hacia las proteínas MBP, PLP, MOG (Genain *et al.*, 1999; Sun *et al.*, 1991; Sun *et al.*, 1991; Warren y Catz, 1994), gangliósidos (Sadatipour *et al.*, 1998) y antígenos indefinidos (Archelos *et al.*, 1998) pueden participar en la destrucción de la mielina y de los oligodendrocitos asociados. Estos autoantígenos podrían ser las dianas del ataque inmune que conduce al daño del SNC (Genain *et al.*, 1999) (Figura 1). En otros tipos de lesión, se ha observado una distrofia en los oligodendrocitos que se manifiesta por la pérdida selectiva de MAG y apoptosis de los oligodendrocitos. Finalmente, en otros casos, se ha encontrado un pequeño grupo de oligodendrocitos necróticos en la sustancia blanca de apariencia normal adyacente al borde de la placa activa. Los patrones de desmielinización son heterogéneos entre pacientes, pero homogéneos dentro de las placas activas de un mismo paciente. Así pues, la EM podría ser una serie de síndromes con diferentes causas y mecanismos patogénicos (por ejemplo, daño mediado por células inmunes, daño mediado por anticuerpos y complemento o distrofia oligodendroglial primaria). Si esto se confirmara,

se podrían identificar marcadores de los procesos patológicos que se podrían utilizar en tratamientos personalizados (Noseworthy *et al.*, 2000)

2.3. Remielinización

En los inicios de la EM, es posible la reparación de las placas desmielinizadas, pero cuando la enfermedad se hace crónica esta capacidad se pierde y falla la remielinización (Archer *et al.*, 1997; Wolswijk, 1998; Blakemore y Keirstead, 1999). Esta falta de remielinización sería una de las causas de la pérdida progresiva de la función neurológica. No existen medios efectivos para promover la remielinización del SNC cuando ya ha sido afectado por la EM (Archer *et al.*, 1997; Blakemore y Keirstead, 1999; Noseworthy, 1999). No se conoce aún el motivo, pero se ha observado que los oligodendrocitos supervivientes en un área de desmielinización no contribuyen a la remielinización. La remielinización se lleva a cabo por las células OPC (Raff *et al.*, 1983b; Blakemore y Keirstead, 1999). Recientes investigaciones sugieren que estas células son extremadamente eficientes en la reparación de la mielina, tanto espontáneamente como después de un trasplante dentro del SNC (Scolding *et al.*, 1999). Las OPC tienen una morfología bipolar típica, presentan inmunorreactividad A2B5 positiva (A2B5+) (Raff *et al.*, 1983b; Temple y Raff, 1985) (Figura 2) y la mayoría de ellas se diferencian en oligodendrocitos postmitóticos (Temple y Raff, 1986). Estas células se han identificado en el cerebro de roedores adultos (Ffrench-Constant y Raff, 1986; Reynolds y Hardy, 1997; Shi *et al.*, 1998). Aunque la demostración de su presencia en el SNC humano ha sido más problemática, las OPC también se han descrito en el cerebro fetal humano y en el SNC humano adulto. De hecho, estas células son A2B5+, inmunofenotípicamente similares a sus homólogas de los cultivos celulares de roedor y del sistema nervioso central de roedor adulto (Armstrong *et al.*, 1992; Rivkin *et al.*, 1995; Scolding *et al.*, 1995; Roy *et al.*, 1999; Scolding *et al.*, 1999). Es necesario entender por qué la remielinización falla para desarrollar estrategias para promoverla en la EM.

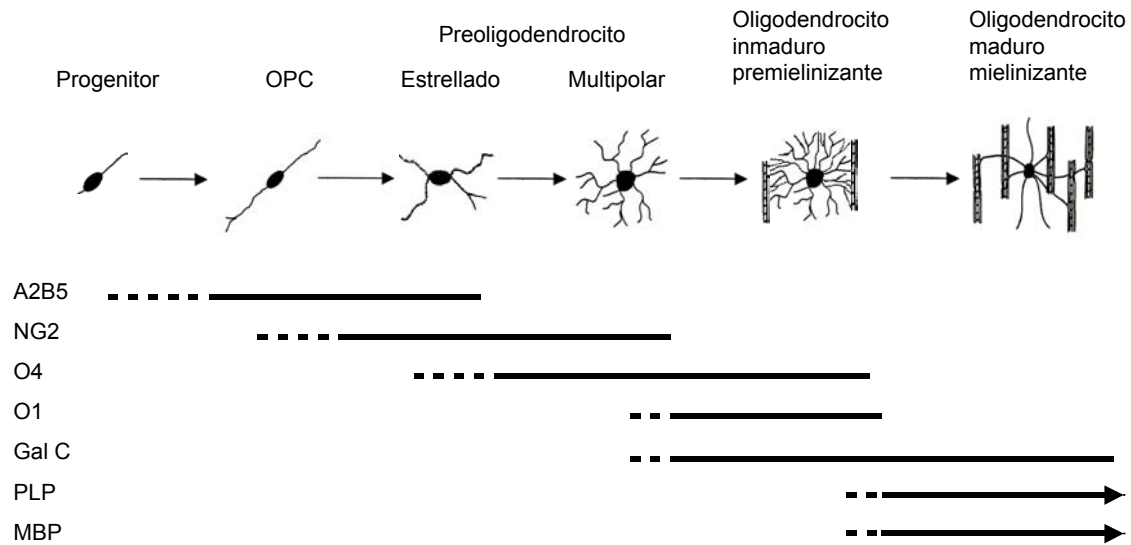


Figura 2. Estirpe oligodendroglial. La figura ilustra las características de la estirpe oligodendroglial que conducen a su diferenciación secuencial, desde células progenitoras y precursoras de oligodendrocitos (OPC) hasta oligodendrocitos maduros. Los distintos fenotipos se diferencian por su morfología y por sus marcadores específicos: A2B5 (tetrasialogangliósidos característicos de OPC), NG2 (proteína marcadora de precursores de oligodendrocitos), O4 (sulfátidos marcadores de preoligodendrocitos), O1 (galactocerebrósidos marcadores de oligodendrocitos inmaduros), Gal C (galactocerebrósido C marcador de oligodendrocitos maduros), PLP (proteína proteolipídica) y MBP (proteína básica de mielina).

3. NEURODEGENERACIÓN

3.1. Daño axonal

Clásicamente, se ha considerado que el axón se afectaba en las etapas tardías de la enfermedad o en formas muy agudas donde había una grave lesión de todo el tejido nervioso. Sin embargo, recientemente varios estudios han confirmado la presencia de lesión axonal en la EM y han demostrado que la discapacidad causada se correlaciona mejor con la pérdida axonal que con la desmielinización (De Stefano *et al.*, 2001). También se ha llamado la atención sobre el daño axonal en el paradigma de enfermedad desmielinizante del sistema nervioso periférico, el síndrome de Guillain-Barré (Sobue *et al.*, 1997).

Aunque ya se había descrito en los estudios patológicos iniciales de la EM (Charcot, 1868), la importancia de la pérdida axonal ha cobrado mayor importancia recientemente gracias a los estudios realizados por ERM de protón que permite el estudio *in vivo* de la estructura química tisular. El N-acetil aspartato, es un marcador

neuronal cuya pérdida refleja la existencia de lesión axonal (Arnold *et al.*, 1990) y puede disminuir en áreas de desmielinización reciente o crónica en la EM (Narayana *et al.*, 1997 y 1998). Esta disminución se incrementa con la progresión de la enfermedad (Arnold *et al.*, 1994) y está relacionada con el déficit funcional en la EM (Davie *et al.*, 1995; Pelletier *et al.*, 2001). La importancia de la pérdida axonal en el origen de los síntomas se ha demostrado por los estudios realizados con IRM (Filippi *et al.*, 1995) y con técnicas de inmunocitoquímica detectando la proteína precursora β -amiloide (β -APP) en muestras de autopsias (Gilbert y Sadler, 1983; Medana y Esiri, 2003), los cuales han demostrado que puede existir una desmielinización grave en pacientes con EM que son normales neurológicamente. Además, en un modelo de EAE, se ha observado que una gran desmielinización puede ser asintomática a menos que esté asociada con una lesión axonal (Rivera-Quiñones *et al.*, 1998). Así pues, la pérdida axonal puede jugar un papel más importante en la EM al determinar la incapacidad funcional del que se le había atribuido anteriormente (McDonald, 1994). Ferguson (1997) ha confirmado recientemente por medio de estudios patológicos la existencia de daño axonal en la EM en lesiones recientes, crónicas activas y crónicas no activas. Estas investigaciones han demostrado que el número de axones dañados está estrechamente asociado al número de macrófagos del entorno, sin relación con la actividad de la lesión y que el número de axones dañados está relacionado con el grado de inflamación dentro de la lesión (Trapp *et al.*, 1998; Bitsch *et al.*, 2000). Además, las placas nuevas y los bordes desmielinizados de las placas activas crónicas presentan numerosos axones dañados que son β -APP inmunorreactivos, mientras que las placas crónicas no activas contienen pocos o ninguno (Ferguson *et al.*, 1997; Kuhlmann *et al.*, 2002).

Las IRM han correlacionado la atrofia de la médula espinal, que se considera un reflejo de pérdida axonal (McGavern *et al.*, 2000), con la incapacidad de los pacientes (Stevenson *et al.*, 1998). Los estudios de lesiones de EM realizados con IRM en T1 han demostrado que existe una relación entre el daño neuronal, la concentración de NAA, la hipointensidad de las lesiones en T1 y la incapacidad neurológica (Brück *et al.*, 1997; Van Waesberghe *et al.*, 1999; Van Walderveen *et al.*, 1999). Se ha descrito que las lesiones hipointensas en T1 sin contraste se correlacionan con el grado de incapacidad de los pacientes con EM (Simon *et al.*, 2000b; Van Walderveen *et al.*, 2001), comparadas con las medidas convencionales de las lesiones en T2 hiperintensas que parecen ser relativamente inespecíficas (Brück *et al.*, 1997; Van Waesberghe *et al.*, 1999; Simon *et al.*, 2000b). Así pues, los estudios patológicos han demostrado una

disminución en la densidad de axones en las lesiones en T1 (Brück *et al.*, 1997; Van Walderveen *et al.*, 1998; Van Waesberghe *et al.*, 1999). Todos estos estudios nos llevan a la conclusión de que los síntomas neurológicos irreversibles y la progresión de la enfermedad en la EM se deben a la fragmentación axonal (Steinman, 2000; Trapp *et al.*, 2000). Sin embargo, la causa exacta por la cual los axones se lesionan en la EM es aún desconocida.

3.2. Agentes causantes del daño axonal

Como la fragmentación axonal también está presente en áreas sin respuesta inflamatoria evidente (Lovas *et al.*, 2000), podría haber en el SNC de los pacientes con EM un proceso alternativo capaz de inducir el daño neuronal. Se han propuesto diversos mecanismos causantes del daño axonal:

Desmielinización e Inflamación

Por estudios de inmunocitoquímica y patología se ha observado que el daño más precoz se situaría en la BHE, con rotura de la misma y entrada de linfocitos T autorreactivos que darían lugar a la lesión de la mielina (Figura 1). Se ha valorado mediante resonancia magnética el grado de daño axonal y de desmielinización en las lesiones crónicas de pacientes con EM y se ha encontrado una fuerte correlación entre estos dos parámetros. De manera indirecta se sugiere un paralelismo entre el daño axonal y la desmielinización. Sin embargo, también se ha demostrado (Gay y Esiri, 1991) que en fases muy precoces de la enfermedad existe daño axonal a la vez que activación de la microglía y de los linfocitos B, sin alteración estructural de la BHE. La cadena de acontecimientos se produciría desde el LCR a través de los espacios subaracnoideos, por difusión de alguna sustancia que actuaría desencadenando una respuesta inmune (Bo *et al.*, 2003).

También se ha propuesto como posible causa del daño axonal el ataque inflamatorio durante el proceso de desmielinización y/o la presencia de una alteración en la señalización. Los mediadores inflamatorios son atractivos candidatos como agentes de daño axonal en las placas activas de EM. El óxido nítrico y la óxido nítrico sintasa, cuyos niveles se han visto incrementados en las placas de EM, pueden dañar los axones *in vitro* (Bitsch *et al.*, 2000; Smith y Lassmann, 2002), especialmente las fibras

pequeñas. Las metaloproteasas de la matriz, que se liberan en las placas de EM, también son capaces de dañar los axones *in vitro*.

Dada la importancia de la desmielinización e inflamación en la EM, este aspecto se detalla en el siguiente capítulo.

Degeneración walleriana

La gran mayoría de axones dañados se encuentran dentro o en los bordes de las placas, y muy pocos en la sustancia blanca de apariencia normal. El daño a los axones en las placas produce degeneración walleriana, que se detecta por la reducida densidad de axones en la sustancia blanca (reducciones de hasta un 50%). La degeneración walleriana se han propuesto como un mecanismo responsable del daño axonal a distancia (Trapp *et al.*, 1998). Una vez dañado el axón en una zona de lesión determinada, el resto del axón puede degenerar aún estando mielinizado. Esta forma de daño axonal se ha comprobado al observar que existen zonas con una disminución de NAA en la sustancia blanca de apariencia normal que son contralaterales a las lesiones (Lovas *et al.*, 2000; Simon *et al.*, 2000b).

Daño directo al axón

Se puede proponer la presencia de un daño directo a los componentes axonales en la EM dada la existencia de daño axonal en áreas sin inflamación, detectadas por IRM y estudios histológicos, e incluso en áreas remielinizadas (Bitsch *et al.*, 2000). Se ha demostrado el aumento de los niveles intratecales de proteínas del citoesqueleto de los axones, especialmente actina y tubulina en pacientes con formas de EM progresivas (Semra *et al.*, 2002). También la acumulación de β -APP en los axones de lesiones inactivas (Bjartman *et al.*, 2002), y la progresión de la discapacidad aún en ausencia de actividad inflamatoria (Confavreux *et al.*, 2000; Noseworthy *et al.*, 2000), sugieren que mecanismos distintos a la desmielinización y la inflamación contribuyen a la transección axonal en los pacientes con formas SP. Se ha encontrado daño axonal agudo dentro de placas inactivas, lo que sugiere que el daño axonal causado por mecanismos no inflamatorios puede contribuir a la progresión de la enfermedad (Kornek *et al.*, 2001).

Estrés metabólico de las neuronas

La falta de factores tróficos segregados por las células gliales puede ser la causa del estrés metabólico que sufren las neuronas, el cual originaría secundariamente un daño axonal.

Alteración funcional eléctrica

En 1996, Köller demostró que el LCR de los pacientes con EM inhibe las corrientes de sodio. Dicha inhibición tiene como consecuencia la hiperpolarización del axolema y el bloqueo de la conducción nerviosa. Se ha descrito un pentapéptido (QYNAD) presente en el LCR de los pacientes con EM y con síndrome de Guillain-Barré que actúa como bloqueante en los canales de sodio alterando la función eléctrica (Brinkmeier *et al.*, 2000) y que podría ser la causa del daño o de la disfunción en la EM.

Factores solubles

El daño axonal en la EM podría proceder de mediadores inflamatorios solubles (Trapp *et al.*, 1998; Noseworthy *et al.*, 2000; Waxman, 2000) presentes en el LCR. Recientemente, se ha propuesto la excitotoxicidad por glutamato en la EM (Pitt *et al.*, 2000, 2003; Werner *et al.*, 2001). Las elevadas concentraciones del glutamato extracelular producen un efecto neurotóxico que se conoce desde el año 1969. Las neuronas, especialmente las del SNC, son sensibles a ciertos estímulos letales que no afectan a otros tipos celulares, por ejemplo la hiperestimulación de los receptores de glutamato debida al ácido glutámico o a algunos de sus análogos puede inducir necrosis neuronal o apoptosis, según la concentración extracelular. El glutamato está implicado directamente en el daño neuronal ya que contribuye a la pérdida de la integridad de la membrana y se considera que el efecto neurotóxico del glutamato no sólo se ejerce por el aumento de Ca^{2+} intracelular sino que además, puede estar mediado por segundos mensajeros.

Por otra parte, se ha demostrado que algún factor soluble del LCR de pacientes con EM es tóxico para las células gliales en cultivo, aunque aún no se ha caracterizado el factor gliotóxico (Ménard *et al.*, 1998).

3.3. Apoptosis

La apoptosis o muerte celular programada es un mecanismo fisiológico presente en todas las células del organismo por el cual éstas mueren cuando su propio funcionamiento es inapropiado o el órgano o sistema en que se encuentran inmersas se ve afectado por la presencia de esa célula. Es un proceso fundamental en el desarrollo del sistema nervioso pero las alteraciones en su regulación, sea por exceso o por defecto, parecen ser relevantes en numerosos procesos patológicos como el cáncer, SIDA, enfermedades autoinmunes y en diversas enfermedades neurodegenerativas, tales como esclerosis lateral amiotrófica, enfermedad de Parkinson y enfermedad de Alzheimer (De la Monte *et al.*, 1998; Sastry y Rao, 2000). El aspecto típico de una célula apoptótica es el de una célula encogida, con el núcleo condensado y con la membrana celular intacta, pero con abundantes protuberancias. Estas características se contraponen con las de la necrosis en que la célula se hincha y la membrana celular se rompe prematuramente. Los cambios en el tamaño y forma de la célula que conducen a esta situación parecen debidos a una profunda desestructuración del citoesqueleto y a un cierto grado de deshidratación del citoplasma. Las células adherentes pierden su adhesión y se redondean. La fase final de la célula apoptótica consiste en su fragmentación en vesículas, llamadas cuerpos apoptóticos, a partir de las ampollas superficiales, quedando siempre indemne la membrana, lo que explica la ausencia de inflamación. Los cuerpos apoptóticos son finalmente fagocitados por células vecinas. Sin embargo, los cambios más precoces y tal vez responsables de todo el resto de alteraciones de la célula apoptótica son los que se producen en el núcleo. Este, inicialmente se encoge y la cromatina se condensa en acúmulos que finalmente se van desgajando, de forma que el núcleo queda roto en múltiples fragmentos. Bioquímicamente, esta catástrofe nuclear viene determinada por la fragmentación del DNA en múltiples subunidades formadas por DNA bicatenario. Esta ruptura se lleva a cabo con una endonucleasa endógena que corta la cadena de DNA a intervalos regulares, de manera que se generan oligonucleótidos de unos 200 pares de bases.

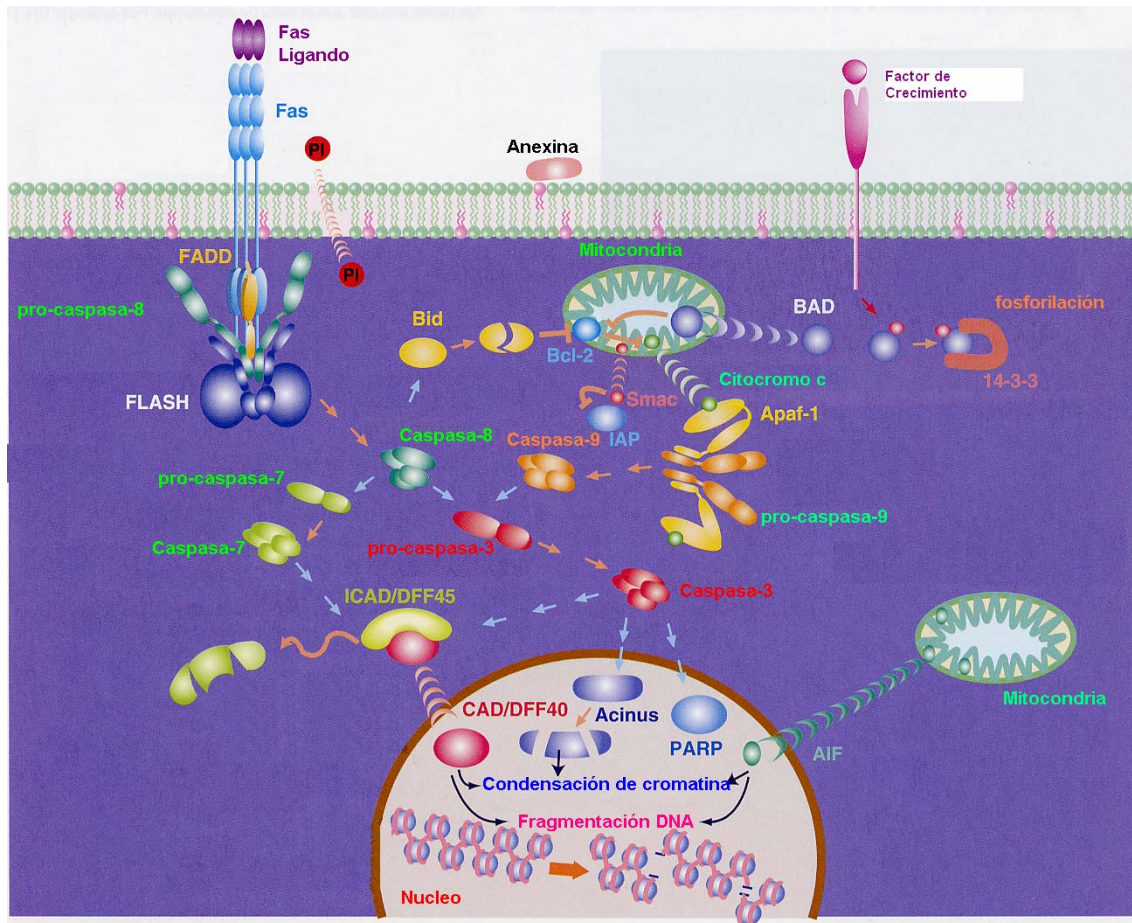


Figura 3. Cascada apoptótica. La iniciación de la cascada apoptótica se lleva a cabo por la activación de un receptor de muerte, por ejemplo el de TNF o Fas, o por la falta de un factor de crecimiento. A partir del receptor de muerte se activa la caspasa 8, lo cual conlleva la rotura de diversos sustratos o la activación de procaspasa 3. Las caspasas también se pueden activar por la vía mitocondrial. Aquí la familia Bcl-2 se asocia con la mitocondria, libera citocromo c junto con el factor Apaf-1 y activan la caspasa 9. Ambos caminos conducen a la activación de la caspasa 3, que se considera la “ejecutora central de la apoptosis”. Además, hay una familia de proteínas IAP que previenen la muerte celular al unirse e inhibir a las caspasas activas. (Modificado de Medical & Biological Laboratories, 2003).

3.4. Caspasas

Las células apoptóticas se pueden caracterizar por cambios morfológicos y bioquímicos específicos coordinados por una familia de cistein-proteasas denominadas caspasas, de la que hasta el momento se han identificado 14 miembros (Thornberry y Lazebnik, 1998) (Figura 3). Las caspasas se empezaron a relacionar con la apoptosis con el descubrimiento de que CED-3, el producto de un gen necesario para la muerte celular en el nematodo *Caenorhabditis elegans*, estaba relacionado con la enzima de

mamíferos ICE (*Interleukin-1 β -Converting Enzyme*) o caspasa 1. Aunque la caspasa 1 no tiene un papel directo en la muerte celular, fue el primer miembro identificado de una gran familia de proteasas cuyos miembros tienen distintas funciones en la inflamación y en la apoptosis.

En las células existen diversas caspasas expresadas de forma constitutiva que residen en el citosol en forma inactiva. La caspasa más abundante en la célula es la caspasa 3. Esta caspasa es la responsable última de la mayoría de los efectos aunque funciona junto con otras dos, las caspasas 6 y 7. Estas tres caspasas se suelen denominar “caspasas ejecutoras” debido a su papel en la ejecución de la muerte celular.

Se cree que las caspasas originan el fenotipo apoptótico por rotura o degradación de diversos sustratos. Por ejemplo, la fragmentación de DNA se debe a la acción de la caspasa 3 sobre un complejo de CAD/DFF40, una nucleasa, y su inhibidor ICAD/DFF45 (Liu *et al.*, 1997; Enari *et al.*, 1998). La caspasa 3 rompe el inhibidor, permitiendo que la nucleasa corte la cromatina. Otro ejemplo es la formación de vesículas apoptóticas que se produce a través de la rotura de una proteína del citoesqueleto, la fodrina o α -espectrina, lo cual disocia la membrana plasmática del citoesqueleto (Martin *et al.*, 1995; Nath *et al.*, 1996).

Las caspasas son similares en cuanto a su secuencia de aminoácidos, estructura y especificidad (Thornberry y Lazebnik, 1998). Todas ellas se expresan como proenzimas (de 30 a 50 kDa) que contienen tres dominios: un dominio N-terminal, una subunidad grande (~ 20 kDa) y una subunidad pequeña (~ 10 kDa). En general, su activación requiere su rotura, preferiblemente después de un residuo de aspartato, dando lugar a la formación de la enzima activa a partir de una proforma inactiva. Las caspasas se activan para convertirse en proteasas totalmente convencionales mediante dos roturas sucesivas: la primera rotura proteolítica divide la cadena en subunidades grande y pequeña y una segunda rotura elimina el prodominio N-terminal. La caspasa activa es un tetrámero de dos subunidades grandes y dos pequeñas, con dos centros activos. Puesto que la rotura proteolítica genera caspasas maduras, una forma de activar a estas enzimas es por la acción de proteasas, incluyendo a otras caspasas. Por lo tanto, las caspasas que desencadenan la apoptosis rompiendo y activando a las ejecutoras se denominan “caspasas iniciadoras”. Entre las caspasa iniciadoras, las más importantes son la caspasa 8 y la caspasa 9.

Hay dos rutas principales de muerte celular por apoptosis (Figura 3). Una de ellas consiste en la interacción de un receptor de muerte, como el receptor de TNF o el Fas con su ligando, lo cual conlleva la activación de la caspasa 8 que a su vez activa a otras caspasas. En la segunda ruta, está involucrada la mitocondria. Los miembros proapoptóticos y antiapoptóticos de la familia Bcl-2 regulan esta vía induciendo la liberación de citocromo c mitocondrial. Este citocromo c en el citosol forma parte del apoptosoma de los vertebrados, compuesto por citocromo c, Apaf-1 y procaspasa 9, que permite la activación de la caspasa 9.

El resultado final por cualquiera de estas dos vías es la activación de la caspasa 3 que se considera la “ejecutora central de la apoptosis”, y la rotura de sustratos celulares específicos, llevando a cabo los cambios morfológicos y bioquímicos asociados con el fenotipo apoptótico (Green y Reed, 1998; Zimmermann y Green, 2001).

Recientemente, se ha identificado una tercera ruta de apoptosis. La caspasa 12 se localiza en el retículo endoplásmico y es activada por estrés del retículo, lo que implica una alteración en la homeostasis del calcio, pero no por señales apoptóticas dirigidas a la membrana plasmática o a la mitocondria. La procaspasa 9 es un sustrato de la caspasa 12, y el estrés del retículo inicia una activación consecutiva de las caspasas 12, 9 y 3 de manera independiente al citocromo c.

El papel clave que estas enzimas juegan en las rutas apoptóticas se ha conservado a través de la evolución de los eucariotas multicelulares. Las rutas apoptóticas definidas hasta el momento parecen no presentar ninguna ambigüedad pero, ¿puede haber otras? Es casi seguro que existen, aunque aún no sabemos cómo se relacionan con la muerte celular o cómo interaccionan con las señales procedentes de los receptores de muerte o de la mitocondria. Además, cada vez está más claro que en muchos casos la muerte celular activa que se controla a nivel molecular puede ocurrir incluso en ausencia de activación de caspasas.

OBJETIVOS

HIPÓTESIS DE TRABAJO

En el estudio de la EM se pueden considerar tres aspectos fundamentales. En primer lugar, la desmielinización de los axones neuronales causada por la inflamación del SNC, en segundo lugar, la falta de remielinización, y por último, el daño axonal en las neuronas. Tradicionalmente se han estudiado la inflamación y desmielinización como causas primarias de la enfermedad. En este trabajo se ha abordado el estudio de los mecanismos de neurodegeneración causada por una desmielinización crónica debida a la ausencia de remielinización y/o por un daño directo a las células neuronales, dos aspectos de la enfermedad poco conocidos y que han adquirido una gran importancia en los últimos años.

Algunos autores consideran que la característica fundamental de las lesiones en la EM es la desmielinización crónica debida a la falta de remielinización. Así pues, es necesario entender por qué la remielinización falla para desarrollar estrategias capaces de promoverla. Teniendo en cuenta la extensa bibliografía, ya mencionada, que describe la presencia de anticuerpos contra los oligodendrocitos en el LCR de pacientes con EM, un ataque inmune a los precursores de oligodendrocitos podría ser un mecanismo posible que comprometería la capacidad de remielinización de las lesiones.

Por otro lado, existe una estrecha relación entre la pérdida de axones y la incapacidad de los pacientes, sugiriendo así que la disfunción y el daño neuronal pueden ser fundamentales en los mecanismos de discapacidad de los pacientes. Teniendo en cuenta los trabajos anteriores realizados en nuestro laboratorio que demostraban la existencia de muerte neuronal por apoptosis inducida por el LCR de pacientes con EM en cultivos neuronales, diversas moléculas, y entre ellas los mediadores inflamatorios, serían atractivos candidatos como agentes de daño axonal en las placas activas de EM.

En este trabajo nos planteamos como hipótesis avanzar en el conocimiento de los posibles agentes inductores de citotoxicidad presentes en el LCR de pacientes con EM. Esta toxicidad puede ser diferente para los distintos tipos celulares del cultivo y puede estar relacionada con la incapacidad de los pacientes y con sus lesiones.

OBJETIVOS

- 1.- Determinar la relación entre la neurotoxicidad inducida por LCR de pacientes con EM en cultivos neuronales y la patología de los pacientes.
- 2.- Caracterizar el factor neurotóxico del LCR causante del daño neuronal.
- 3.- Estudiar el mecanismo de muerte neuronal inducido por dicho factor y prevenir su efecto con posibles fines terapéuticos.
- 4.- Verificar si las células precursoras de oligodendrocitos que existen en nuestros cultivos pueden ser también las dianas de un ataque inmune en la EM, investigando si los anticuerpos contenidos en los LCR de pacientes reconocen específicamente a estas células, tal y como ya se ha descrito para los oligodendrocitos maduros.

MATERIALES Y MÉTODOS

1. Cultivos celulares

El cultivo de células ha llegado a ser un método muy valioso y difundido para la investigación en neurobiología. Los diversos orígenes de las células nerviosas que se cultivan y los diferentes métodos de cultivarlas componen una amplia gama de técnicas para estudiar las propiedades neuroquímicas y funcionales tanto de las neuronas como de la glía. Estas técnicas de cultivo son un poderoso medio para el estudio de la complejidad del sistema nervioso y hacen posible el estudio del efecto sobre el comportamiento celular de la adición o eliminación de moléculas específicas y ofrecen alternativas más rápidas y sencillas que los modelos animales para evaluar posibles efectos tóxicos.

El cultivo de tejidos del sistema nervioso comenzó en 1907 con un experimento cuya finalidad radicaba en esclarecer la controversia que suponía la doctrina neuronal, defendida por Santiago Ramón y Cajal basándose en observaciones anatómicas. Un punto importante de esta teoría era la noción de un sistema nervioso constituido por células separadas, bien definidas y que se comunicaban entre sí en las sinapsis, en la que cada neurita procedía directamente del cuerpo celular como una prolongación del soma, y no como producto de la fusión de diferentes células. Para esclarecer esta disputa, Harrison colocó pequeños fragmentos de tejidos o explantes procedentes del cordón dorsal del embrión de rana en plasma coagulado sobre una cámara húmeda y caliente, observándolos al microscopio a intervalos regulares. Al cabo de un día se pudo ver que las distintas células nerviosas emitían prolongaciones largas y finas hacia el plasma coagulado. De esta manera quedó confirmada la teoría neuronal y se establecieron las bases de los futuros cultivos celulares.

Cultivos primarios

En los años 60 se introdujo este tipo de cultivo que produce sistemas fácilmente accesibles para la manipulación. Son los cultivos preparados directamente a partir de tejidos de un organismo, en los que las células son descendientes directos de las células *in situ* y tanto su comportamiento como su función deberían ser próximos a los de estas células. En la actualidad los cultivos primarios se realizan habitualmente a partir de suspensiones de células disociadas de tejidos. En este método, el tejido se disocia por medios mecánicos o enzimáticos, para obtener una suspensión de células aisladas que se cultivan sobre la superficie de placas de cultivo. Hasta ahora se han podido cultivar con éxito células disociadas de diversas regiones cerebrales, del cerebelo y de la médula espinal. Bajo

condiciones favorables, el mantenimiento de estos cultivos es posible durante largos periodos de tiempo, en los que adquieren propiedades de células maduras. En el caso de las neuronas estas desarrollan neuritas, forman sinapsis y se hacen eléctricamente activas formando una densa red. En general, las propiedades morfológicas y fisiológicas se relacionan fuertemente con las características que presentan las poblaciones celulares en el tejido original (Banker y Waxman, 1988). Las ventajas de estos cultivos son numerosas y la mayor de todas radica en la posibilidad de acceder a las células de forma individual. Las células son fácilmente visualizadas y pueden estudiarse de manera aislada en cultivos puros neuronales o gliales.

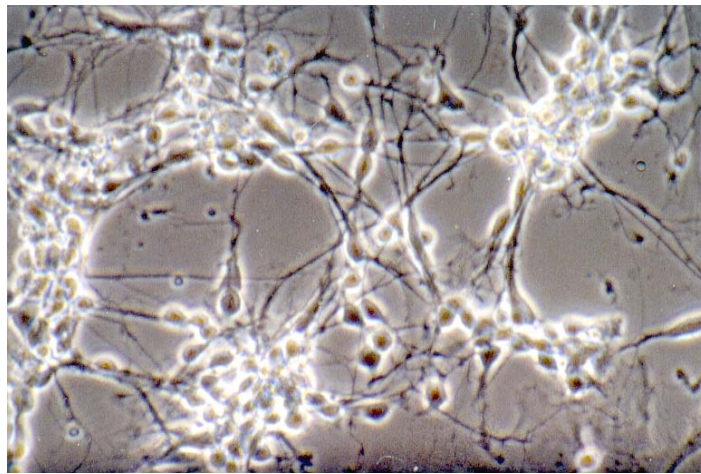


Figura 4. Cultivos neuronales primarios. Células cultivadas durante 6 días a partir de los hemisferios cerebrales de embriones de rata observadas mediante microscopio con contraste de fase y objetivo 40x.

En los estudios realizados en este trabajo se han utilizado cultivos primarios de células disociadas (Figura 4). Dada la mayor dificultad para mantener en cultivo las neuronas de animales adultos hemos utilizado neuronas de embriones. En estos cultivos primarios de neuronas de embrión están bien conservadas las propiedades neuronales intrínsecas, tales como la morfología, el comportamiento neuroquímico especializado, las propiedades de membrana, la quimiosensibilidad y el funcionamiento sináptico (Kriegstein y Dichter, 1983; Huettner y Baughman, 1986; Banker y Waxman, 1988). Dentro de los modelos animales se eligió la rata por ser la opción más accesible teniendo en cuenta las características del animalario del centro. Las neuronas que se obtienen de esta manera tienen características similares a las neuronas humanas, cosa que no ocurre con las células tumorales. Además, se

eligieron este tipo de cultivos con la intención de reproducir unas condiciones análogas a las que podrían existir en el SNC de los pacientes con EM.

Los cultivos primarios se realizaron según dos modelos fundamentales como se describe a continuación. Los cultivos neuronales se prepararon a partir de células de embriones de rata Sprague-Dawley de 16-17 días (Alcázar *et al.*, 1996) procedentes del animalario del Hospital Ramón y Cajal. Se procedió a la extracción de los fetos, con material previamente esterilizado, que se depositaron en una palca de Petri con medio L-15 (medio de Leibovitz L15 con rojo de fenol como indicador de pH, suplementado con anfotericina B 0,5 µg/ml, penicilina 200 U/ml y estreptomicina 200 µg/ml). Se retiró la membrana amniocoriónica y se realizó la disección de los cerebros en una campana de flujo horizontal, con ayuda de una lupa binocular. La corteza cerebral se separó del resto del cerebro, eliminando las meninges cuidadosamente para evitar la posible contaminación del cultivo con otros tipos de células. Después, se disociaron utilizando una pipeta Pasteur y agujas del número 20 y 21 hasta obtener una suspensión de células homogénea. Las células vivas se contaron con azul tripán en una cámara de Neubauer. Estas células se sembraron sobre cubres de vidrio a una densidad de 80×10^3 células/cm² en placas multipocillo recubiertas con poli-D-lisina 0.05 mg/ml y se mantuvieron en un incubador a 37°C en una atmósfera con 7.5% de CO₂ en medio D-15 (medio glucosado de Dulbecco suplementado con un 15% de suero ternera fetal inactivado por calor a 56°C, 30 minutos) y con anfotericina B 0,25 µg/ml, penicilina 100 U/ml y estreptomicina 100 µg/ml. Después de 24 horas, los cultivos se cambiaron a un medio de cultivo sin suero, como describieron Bottenstein y Sato (Bottenstein y Sato, 1979) con las modificaciones de Butler (Butler, 1992) (Dulbecco's/Ham's F12 1:1 (v:v), glucosa 5 mg/ml, L-glutamina 2 mM y piruvato sódico 1 mM y suplementado con transferrina 1 µg/ml, putrescina 100 µM, progesterona 20 nM, selenito sódico 30 nM e insulina 5 µg/ml). Este medio se denominará de forma abreviada DFN2. El contenido neuronal se determinó por inmunocitoquímica con anticuerpos específicos contra la proteína específica de neuronas β-tubulina isotipo III (Banerjee *et al.*, 1990). En estos cultivos el contenido de neuronas fue del 90%. Con estas condiciones de cultivo se obtiene un modelo que carece de células inflamatorias y con una baja proporción de células gliales.

En otros experimentos, los cultivos celulares se prepararon de acuerdo a las recomendaciones de Raff *et al.* (1983b) para favorecer el desarrollo de células gliales con antigenicidad A2B5 (Figura 3) en cultivos con gran cantidad de neuronas. Estos cultivos se

prepararon a partir de los hemisferios cerebrales de embrión de rata de 17-19 días, que contienen una mayor proporción de células inmunorreactivas A2B5+ (Eisenbarth *et al.*, 1979; Raff *et al.*, 1983b; Lubetzki *et al.*, 1991). En estas condiciones, se puede conseguir que el contenido de células A2B5+ sea mayor que en los cultivos descritos anteriormente, llegando a un 10-12% del total. Este contenido fue determinado por inmunofluorescencia indirecta con el anticuerpo monoclonal A2B5 (Eisenbarth *et al.*, 1979). Se utilizaron células cultivadas durante 6 a 7 días con una densidad celular total de 33×10^3 células/cm². Así, las células se sembraron sobre cubres de vidrio recubiertos con poli-D lisina para evitar el enmascaramiento de células A2B5+ por otros tipos de células. Los cubres se mantuvieron en medio de cultivo sin suero para evitar la proliferación de otros tipos de células (especialmente células GFAP+ (*glial fibrillary acidic protein*)). Las células se sembraron a una densidad muy baja para minimizar el contenido neuronal. Los cultivos de seis días contienen neuronas maduras β -tubulina positivas (Banerjee *et al.*, 1990; Menezes y Luskin, 1994) que no presentan afinidad por el anticuerpo A2B5 (Raff *et al.*, 1983a; Fanarraga *et al.*, 1999).

2. Pacientes

Los pacientes estudiados fueron 75 con EM RR clínicamente definida de acuerdo con los criterios vigentes (Poser *et al.*, 1983; McDonald *et al.*, 2001), 14 pacientes control con otras enfermedades neurológicas no inflamatorias tales como enfermedad vascular cerebral, neuropatías craneales o cefalea inespecífica (grupo OEN, Otras Enfermedades Neurológicas), 6 pacientes con polirradiculoneuropatía aguda (Síndrome de Guillain-Barré, enfermedad desmielinizante del sistema nervioso periférico) y 6 individuos neurológicamente sanos (INS). Los pacientes con EM fueron 52 mujeres y 23 hombres con edades comprendidas entre los 16 y 46 años (media 29 años) con una duración de la enfermedad entre 18 y 49 meses (media 26 meses). Su valor de EDSS inicial estuvo comprendido entre 1,0 y 5,0 (mediana 3,0), con el 77% de los valores entre 2,0 y 3,5.

El número de pacientes incluidos en cada ensayo concreto se detalla en Resultados.

3. Evolución clínica de los pacientes con EM

La evolución clínica de cada paciente de EM se cuantificó por la escala EDSS, calculada a partir de los valores de la escala funcional, utilizando la guía de Kurtzke (1983). También se evaluaron los cambios en los sistemas funcionales (FS). Los valores de FS y

EDSS se registraron en el momento de la punción lumbar (inicial) y 1 mes más tarde (después del brote), puesto que la recuperación del brote ocurre mayoritariamente en este periodo de tiempo (Kurtzke *et al.*, 1973). La evolución clínica de cada paciente de EM también se expresó como porcentaje de recuperación después del brote: $[(FS_{inicial} - FS_{después\ del\ brote}) / FS_{inicial} \times 100]$ y $[(EDSS_{inicial} - EDSS_{después\ del\ brote}) / EDSS_{inicial} \times 100]$. Los pacientes que se recuperaron completamente del brote obtuvieron una puntuación de 100% en FS o EDSS.

4. Evaluación de las imágenes de resonancia magnética

Los estudios de IRM se realizaron antes de la punción lumbar, utilizando un equipo estandar (Gyrosan, Philips, Eindhoven, Holanda) a 1,5 Teslas. Se realizaron secuencias ponderadas en T2 (tiempo de repetición [TR] 2000 ms; tiempo de eco [TE] 22-80 ms), secuencias ponderadas en T1 (TR 540 ms; TE 15 ms) y secuencias en T1 después de la administración de contraste de gadolinio. En todos los casos, se obtuvieron 22 cortes (de 5 mm de grosor con intervalos de 0,5 mm). Las lesiones se localizaron en las imágenes en T2 y se analizaron las lesiones hipointensas en T1 sin contraste que eran coincidentes con las imágenes en T1 con contraste. Para cuantificar el grado de hipointensidad de la lesión en T1 de las diferentes imágenes, se utilizó un densitómetro calibrado de transmisión con una resolución de 200 x 200 píxel y un rango de densidad óptica (DO) de 0-2,0 unidades, aplicando un método análogo al de Brück y col. (1997). La densidad óptica de cada lesión en T1 se determinó mediante análisis de imagen (Bio-Rad) y se corrigió respecto a la densidad óptica de la sustancia blanca de apariencia normal adyacente a la lesión como el cociente ($DO_{sustancia\ blanca} / DO_{lesión}$), para obtener el valor de hipointensidad relativa de la lesión. Un valor de 1.0 representa la sustancia blanca normal sin lesiones en la secuencia en T1. Los valores decrecientes representaron el grado de hipointensidad de las diferentes lesiones en T1 (con un rango de 0,9 a 0,1, desde lesiones moderadas hasta graves, respectivamente). En el estudio de correlación se consideraron tanto la media de lesiones hipointensas como la lesión más hipointensa encontrada.

5. Muestras de LCR

Las muestras de LCR de los pacientes con EM y control se obtuvieron durante el brote, mediante la punción lumbar realizada para el diagnóstico inicial. Se centrifugaron durante 10 minutos a 700xg, se hicieron alícuotas y se congelaron a -40°C hasta el momento

de su uso. Las muestras de LCR recibieron un código numérico, para realizar todos los procedimientos experimentales de forma ciega respecto a las características clínicas de los pacientes. Los estudios de los LCR, realizados en todos los casos, incluyeron recuento de células, determinación de glucosa y proteínas, cuantificación nefelométrica de albúmina e IgG y bandas oligoclonales mediante los procedimientos de rutina, realizados por los Servicios de Bioquímica e Inmunología del Hospital Ramón y Cajal. Después de la extracción de LCR, los pacientes con EM en brote fueron tratados con corticosteroides (1 g de metilprednisolona i.v. diario durante 5 días). Ningún paciente había recibido tratamiento con fármacos inmunosupresores, inmunomoduladores ni corticosteroides en los seis meses precedentes a la extracción de LCR. Todos los pacientes dieron su consentimiento informado para ser incluidos en este estudio.

6. Tratamiento de los cultivos celulares con LCR

En los experimentos en los que se estudió la neurotoxicidad del LCR en cultivos neuronales se utilizaron células cultivadas durante 4 a 6 días. Este se consideró el día 0 del experimento. Las células se trataron con 0.1 ml de LCR por ml de medio DFN2 los días 0, 2 y 4, y se mantuvieron a 37°C dos días más (Xiao *et al.*, 1996) (Figura 5). Después, las células de 11-12 días se procesaron para medir el parámetro de estudio. En cada experimento se llevaron en paralelo controles en los que las células se trataron con 0,1 ml de PBS (tampón fosfato salino) por ml de medio de cultivo sin suero. Cada LCR se analizó de forma ciega respecto a los datos clínicos 2-4 veces con diferentes cultivos y cada experimento se llevó a cabo por duplicado.

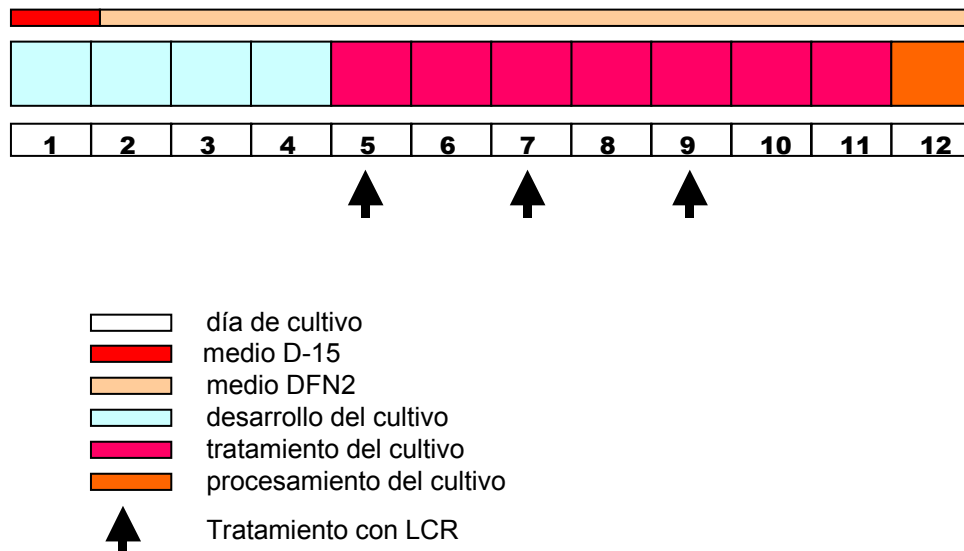


Figura 5. Representación esquemática del tratamiento de los cultivos neuronales con LCR. Las flechas representan los días de tratamiento con 0.1 ml de LCR en 1 ml de medio DFN2. (Modificado de Regidor, 2002).

7. Viabilidad celular

La viabilidad neuronal se evaluó mediante el ensayo de MTT que cuantifica las células metabólicamente activas capaces de llevar a cabo la reducción del reactivo de bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil-tetrazolio a un producto de azul formazán en sus mitocondrias. El ensayo se realizó incubando las células con 0,2 mg/ml de MTT en medio sin suero durante 1,5 horas en un incubador a 37°C en atmósfera de CO₂ al 7,5%. Después del periodo de incubación, las células se lisaron con un volumen igual de HCl 10 mM y SDS (dodecilsulfato sódico) 10% en incubador toda la noche. Los resultados de la valoración colorimétrica realizada por espectrofotometría se dieron en unidades de absorbancia (U.A.) (595 nm, referencia 690 nm).

8. Medida de apoptosis

Para el estudio de los factores que intervienen en la apoptosis de un tipo celular es esencial disponer de un método capaz de determinar el número o, más concretamente, el porcentaje de células que se hallan en apoptosis en una determinada preparación o cultivo. El estudio por microscopía óptica y electrónica es muy específico para detectar células en

apoptosis y para distinguirlas de las necróticas. Otros métodos habitualmente empleados se basan en la detección de la ruptura del DNA nuclear, que se produce de una forma característica en la apoptosis, dando lugar a fragmentos de un tamaño bastante regular (180-200 pares de bases). El método clásico es la electroforesis en gel del DNA, en la que se observan las bandas típicas correspondientes a dichos fragmentos, lo que se denomina “escalera de DNA” (*DNA ladder*). Si bien es muy útil para estudios cualitativos, es ineficaz para cuantificar. El primer método cuantitativo utilizado fue el colorimétrico. Consiste en la separación del DNA intacto del fragmentado mediante centrifugación y posterior tinción con sustancias que se unen a la desoxirribosa del DNA. En la actualidad los procedimientos cuantitativos más utilizados son los que emplean la citometría de flujo. Para ello se utilizan colorantes fluorescentes capaces de unirse al DNA. Los colorantes más usados son el yoduro de propidio y el Hoechst 33342. Sin embargo, este método no es adecuado cuando se utilizan cultivos adherentes como los neuronales.

Otro método habitualmente empleado para la detección de la apoptosis, especialmente en sus estadios iniciales es el de la anexina que detecta la externalización de fosfatidil serina en las células. En los momentos iniciales de la apoptosis, las células pierden la asimetría de los fosfolípidos de su membrana y exponen la fosfatidilserina a la superficie celular. Este proceso se puede monitorizar mediante la anexina, una proteína dependiente de calcio que se une a los fosfolípidos, con alta afinidad por la fosfatidilserina. La translocación de fosfatidilserina a la superficie celular externa no es una característica única de la apoptosis. La diferencia más importante entre los dos tipos fundamentales de muerte celular, apoptosis y necrosis, es que durante los estadios iniciales de la apoptosis la membrana celular permanece intacta, mientras que en la necrosis se pierde la integridad celular. Así pues, las células necróticas se pueden marcar fácilmente con yoduro de propidio (que puede atravesar las membranas celulares) y con anexina, mientras que las células apoptóticas sólo se marcan con anexina.

Otro método muy empleado para la detección de la apoptosis es el ensayo de TUNEL (terminal deoxynucleotidyl transferase (TdT)-mediated dUTP-fluorescein nick end-labeling), que detecta la fragmentación de DNA nuclear mediante la deoxinucleotidil transferasa terminal que incorpora nucleótidos marcados con fluoresceína en los extremos 3'-OH de los fragmentos de DNA generados en respuesta a las señales apoptóticas. En nuestros estudios, la apoptosis neuronal causada en los cultivos después del tratamiento con LCR de pacientes con EM se analizó mediante esta técnica de TUNEL. Además se utilizó el marcaje fluorescente de la cromatina con Hoechst 33342 para observar la morfología nuclear y detectar las

características de las células apoptóticas tales como la condensación de cromatina y su segmentación en pequeños cuerpos apoptóticos redondeados (Earnshaw, 1995). Las células se consideraron apoptóticas cuando aparecieron encogidas en el análisis morfológico por contraste de fase, mostraron condensación de la cromatina nuclear con Hoechst 33342, y además fueron TUNEL positivas (Figura 6).

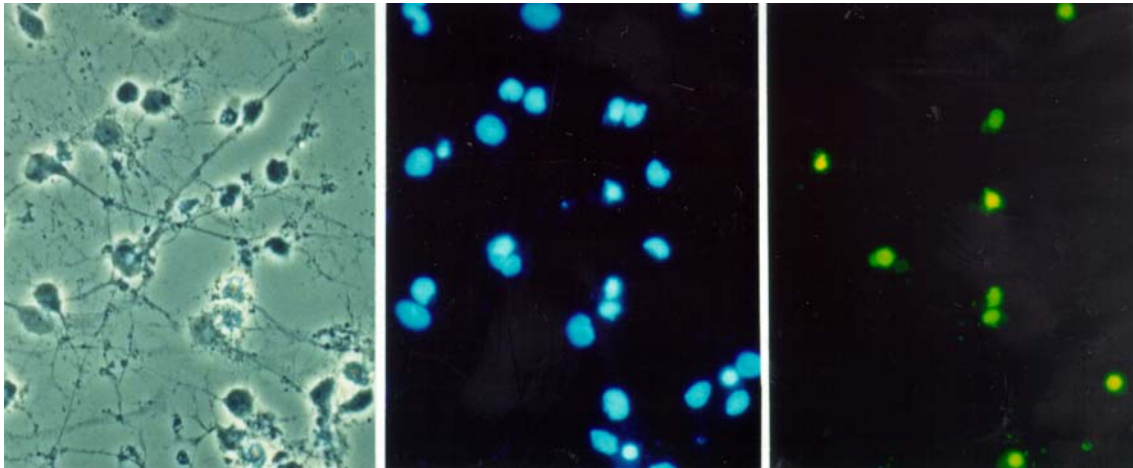


Figura 6. Detección de apoptosis en los cultivos neuronales. Observación del mismo campo simultáneamente con contraste de fase (izquierda), Hoechst 33342 (centro) y TUNEL (derecha). Los núcleos marcados en la reacción de TUNEL son los mismos que aparecen picnóticos (azul intenso) en la imagen central. Objetivo 40x. (Alcázar *et al.*, 2000)

Después del tratamiento con LCR, las neuronas cultivadas sobre cubres de vidrio se fijaron durante 25 minutos a 4°C con formaldehído al 3,7%, se permeabilizaron en hielo con Triton X-100 al 0,2% en PBS durante 5 minutos, se lavaron 3 veces en PBS y se llevó a cabo la incorporación catalítica de dUTP-fluoresceína en los extremos 3'-OH del DNA utilizando el ensayo de TUNEL (Promega, Madison, EEUU). Se realizó un control positivo con DNasa I, y un control negativo excluyendo a la enzima TdT de la reacción. Después, los cubres se montaron sobre portas de vidrio en tampón con glicerol, p-fenilendiamina y bis-benzimida 30 μM (Hoechst 33342). Las células apoptóticas TUNEL positivas (en verde) se contaron en un microscopio de fluorescencia (objetivo 20 x) y se expresaron en porcentaje con respecto al número total de núcleos teñidos con Hoechst 33342 (en azul). Las imágenes se digitalizaron con una cámara de video color Sony DXC-950P-3CCD (*Charge-Coupled Device*) (con una resolución de 760 x 570 pixel). Las imágenes se procesaron y contaron con un analizador de imagen (PDQest y Diversity One, Bio-Rad, Nueva York, EEUU). En cada experimento se contaron cuatro puntos cardinales por cubre con un área de 140.725 μm^2 .

9. Microscopía de contraste de fase y de fluorescencia

La morfología celular se examinó en un microscopio invertido (Olympus IX70, Hamburgo, Alemania) con objetivo (40x) con contraste de fase, utilizando luz transmitida.

La observación de las células en algunos experimentos de inmunocitoquímica y el recuento de células apoptóticas marcadas con Hoechst 33342 y TUNEL se realizó en el mismo microscopio utilizando una fuente de fluorescencia, con objetivos de fluorita de 20x y 40x. Las imágenes se digitalizaron con una cámara de video CCD (con una resolución de 760 x 570 pixel) con el programa informático Image-Pro Plus.

10. Inmunocitoquímica

Los estudios de inmunocitoquímica se realizaron mediante ensayos de inmunofluorescencia indirecta llevados a cabo por tres métodos:

Con células permeabilizadas. Las células cultivadas sobre cubres recubiertos con poli-D-lisina se fijaron con p-formaldehído 3,7% durante 10 minutos y se lavaron tres veces con PBS. Después, las células se permeabilizaron con etanol/ácido acético 19:1 (v:v) durante 15 minutos a -20°C y se incubaron durante 2 horas con una solución de bloqueo (suero de ternera fetal inactivado por calor 10% en PBS). Las células se expusieron durante una hora a temperatura ambiente a los anticuerpos primarios correspondientes: anti- β -tubulina o anti-GFAP. Después se expusieron a los anticuerpos secundarios específicos conjugados con fluorocromos durante una hora a temperatura ambiente. Los cubres se montaron sobre portas de vidrio en glicerol con p-fenilendiamina y se observaron por microscopía confocal de fluorescencia. También se realizaron controles omitiendo el anticuerpo primario.

Con células sin permeabilizar. Este método se aplicó para la detección de moléculas en la superficie celular. Las células cultivadas sobre cubres recubiertos con poli-D-lisina se fijaron con p-formaldehído 3,7% durante 10 minutos se lavaron tres veces con PBS y se incubaron durante 3,5 horas en una solución de bloqueo (suero de ternera fetal inactivado por calor 10% en PBS). Las células fijadas se incubaron una hora a temperatura ambiente o toda la noche a 4°C con los anticuerpos primarios correspondientes: A2B5, O4, anti-*heat shock protein* (Hsp) 90, anti-Hsp70, anti- β -actina, anti-IgM humana, anti-complejo terminal del complemento

humano (C5b9) o IgG humanas. En los marcajes dobles o triples, los anticuerpos se añadieron secuencialmente. Después se expusieron a los anticuerpos secundarios específicos conjugados con fluorocromos durante una hora a temperatura ambiente, los cubres se montaron sobre portas de vidrio en glicerol con p-fenilendiamina y se observaron por microscopía confocal de fluorescencia.

Con células vivas. Las células vivas se incubaron con IgG purificadas de LCR de pacientes con EM y control (50 µg/ml de medio) durante 30 minutos a 25°C (1 hora a 37°C en los experimentos de detección del complemento) y se marcaron con su anticuerpo secundario 1 hora a 4°C. Después, las células se fijaron y se expusieron a los anticuerpos A2B5, O4, anti-GFAP o anti-C5b9. Además se realizaron experimentos control en los que las células se incubaron con PBS o con IgG purificadas de donantes de sangre. Todos los anticuerpos se diluyeron en suero de ternera fetal 10% en PBS inactivado por calor. En otros experimentos, las células cultivadas se trataron con LCR, y después se fijaron y se expusieron a los anticuerpos primarios.

11. Anticuerpos utilizados en inmunocitoquímica

Anticuerpos monoclonales de ratón: anti β -tubulina IgG (Sigma, EEUU); A2B5 IgM (Eisenbarth *et al.*, 1979) contra tetrasialogangliósidos, característico de OPC (Raff *et al.*, 1983b; Temple y Raff, 1985); O4 IgM, contra sulfátidos, como marcador de preoligodendrocitos (Sommer y Schachner, 1981; Bansal *et al.*, 1989). Estos anticuerpos fueron donados por los Drs. C. Paíno y C. Redondo (Hospital Ramón y Cajal, Madrid) obtenidos a partir de los sobrenadantes de cultivos celulares de hibridoma (American Type Tissue Collection, EEUU); anti-Hsp90 (α y β) IgG (Calbiochem, EEUU); anti-Hsp70 IgG (Santa Cruz, EEUU); anti- β -actina IgG (Sigma, EEUU).

Anticuerpos policlonales de conejo: anti-GFAP (Dako, Dinamarca), como marcador de astrocitos; anti-Hsp90 β (Chemicon, EEUU); anti-IgM humana (Jackson, EEUU); anti-C5b9 humano (Calbiochem, EEUU), para estudiar la activación de complemento (Schäfer *et al.*, 1986).

Anticuerpos humanos: IgG purificadas de LCR de pacientes con EM y control; anti-Hsp90 inmunopurificadas de LCR de EM; IgG purificadas a partir de suero de donantes de sangre

(Flebogamma[®], Grifols, España). En otros experimentos, se utilizaron como fuente de anticuerpos humanos LCR individuales o mezclados de pacientes con EM o control.

Anticuerpos secundarios: los anticuerpos monoclonales de ratón se visualizaron en ensayos de inmunofluorescencia indirecta con anticuerpos anti-IgM conjugados con rojo de rodamina (Jackson, EEUU) o con fluoresceína (Roche, Alemania), o con anticuerpos anti-IgG conjugados con fluoresceína (Chemicon, EEUU). Los anticuerpos de conejo se visualizaron con anticuerpos anti-IgG conjugados con lisamina-rodamina (Chemicon, EEUU). Los anticuerpos humanos se visualizaron con anticuerpos anti-IgG conjugados con Cy5 (Chemicon, EEUU), o con fluoresceína (Chemicon, EEUU). Todos los anticuerpos secundarios conjugados se habían purificado por afinidad y adsorbido en fase sólida por el fabricante para asegurar una mínima reacción cruzada.

12. Microscopía confocal

Las células se analizaron en un microscopio confocal (MRC-1024 Bio-Rad, Hercules, EEUU). Se realizaron controles para eliminar la señal de fondo omitiendo los anticuerpos primarios.

Las imágenes de inmunocitoquímica están formadas por 11 secciones fusionadas para formar una imagen. Las secciones (de 1,0 μm cada una) se tomaron simultáneamente a una resolución de 512 x 512 pixel en los tres canales del láser: 488 nm para fluoresceína, 568 nm para rodamina y 647 nm para Cy5, usando filtros de emisión de 540, 585 y 680 nm respectivamente. No se observó cruce de señales entre los canales (se comprobó utilizando cada fluorocromo por separado). Las imágenes tridimensionales se reconstruyeron usando el programa informático LaserSharp y Confocal Assistant (Bio-Rad, EEUU).

13. Medida de la intensidad de fluorescencia

Las intensidades de fluorescencia de los anticuerpos IgG humanos o anti-C5b9 unidos a las células A2B5 se midieron en las imágenes confocales utilizando el programa informático LaserSharp (Bio-Rad, EEUU). Estas medidas se expresaron como la intensidad media de pixel en la escala de grises (valores entre 0 y 255) por célula A2B5+, corrigiendo la señal de fondo. Los datos registrados para cada muestra son la intensidad de fluorescencia media debida a los anticuerpos IgG humanos o anti-C5b9, observada en 3 x 3 campos de 74,529

μm^2 . Los experimentos se realizaron con los mismos lotes de fluorocromos y medio de montaje.

14. Análisis de aminoácidos excitatorios

Las muestras de LCR de pacientes con EM se sometieron a derivatización con o-ftalaldehído. Posteriormente, se determinó su composición de aminoácidos excitatorios mediante cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) utilizando un equipo Beckman con columna C18 y se cuantificaron con un detector de fluorescencia.

15. Cromatografía líquida de alta resolución

Los LCR se filtraron a través de membranas con una exclusión molecular de 10 kDa (Centricon C10, Millipore). La fracción del LCR menor de 10 kDa se analizó por HPLC con una columna de fase reversa μRPC C2/C18 con gradiente de acetonitrilo 0%-90% y flujo de 0,3 ml/minuto en condiciones ácidas (ácido trifluoroacético 0,1%). Se utilizó un cromatógrafo Amersham Biosciences con detector de fotodiodos Waters 490E. Los cromatogramas se registraron con el programa informático FPLCdirector.

16. Identificación de péptidos por espectrometría de masas

En otros experimentos, las fracciones de LCR aisladas por HPLC (ver más adelante) se analizaron directamente por espectrometría de masas MALDI-ToF (*Matriz Assisted Laser Desorption/Ionization Time of Flight*) utilizando como matriz ácido α -cianocinámico y ácido dihidroxibenzoico. Se admitió una exactitud en la masa de (100 ppm).

17. Obtención de lisados celulares y determinación de la actividad caspasa

La actividad caspasa en las neuronas tratadas con LCR se midió por un ensayo fluorimétrico basado en la hidrólisis de los sustratos selectivos: N-acetil-Tyr-Val-Ala-Asp-7-amino-4-metil-cumarina (Ac-YVAD-amc), N-acetil-Asp-Glu-Val-Asp-7-amino-4-metil-

cumarina (Ac-DEVD-amc), N-acetil-Ile-Glu-Thr-Asp-7-amino-4-trifluorometil-cumarina (Ac-IETD-afc) y N-acetil-Leu-Glu-His-Asp-7-amino-4-trifluorometil-cumarina (Ac-LEHD-afc), para las caspasas 1, 3, 8 y 9 respectivamente.

Las células cultivadas en placas multipocillo tratadas con LCR y sin tratar se lisaron con tampón Tris-HCl 10 mM pH 7.6, KCl 140 mM, MgCl₂ 4 mM, DTT (DL-ditioneitol) 1 mM, EDTA 1 mM, fluoruro de fenilmetilsulfonilo 1 mM, benzamidina 1 mM y leupeptina, pepstatina y antipaina 10 µg/ml, Tritón X-100 0,1% y Nonidet NP40 0,5%, y el lisado se centrifugó durante 10 minutos a 12.000xg para obtener el lisado celular. La actividad caspasa en los lisados celulares (25 µg de proteína) se determinó utilizando el sustrato correspondiente (50 µM) en tampón HEPES (ácido N-2-hidroxi-etil-N'-2 piperazín-etano-sulfónico) 50 mM, pH 7,5, NaCl 100 mM, DTT 10 mM, EDTA (ácido etilendiaminotetraacético) 1mM, glicerol 10% y Chaps (3-[(3-Colamidopropil)-dimetilamonio]-1-propanosulfonato) 0,1%. Se midió la fluorescencia debida al amc (360 nm excitación/465 nm emisión) o al afc (405 nm excitación/535 nm emisión) entre 1 y 3 horas a 30°C en un lector de placas (Spectra Fluor Tecan).

Para comprobar la eficacia del ensayo, se utilizaron controles negativos realizados con los inhibidores de caspasa 1 N-acetil-Tyr-Val-Ala-Asp-clorometil-cetona (Ac-YVAD-cmk), de caspasa 3 N-acetil-Asp-Glu-Val-Asp-clorometil-cetona (Ac-DEVD-cmk), de caspasa 8 N-bencil-oxi-carbonil-Ile-Glu-Thr-Asp-fluorometil-cetona (z-IETD-fmk) y de caspasa 9 N-bencil-oxi-carbonil-Leu-Glu-His-Asp-fluorometil-cetona (z-LEHD-fmk) (25 µg/ml), así como controles positivos con caspasas 1, 3, 8 y 9 recombinantes.

El incremento de fluorescencia a lo largo del tiempo para cada muestra se calculó como $\Delta F_t = [F_{\text{muestra}} - F_{\text{blanco}}]$ (donde F es la intensidad de fluorescencia y t es el tiempo de reacción) y se expresó en unidades relativas de fluorescencia ($\Delta U F$). El blanco estaba compuesto solamente por sustrato en la mezcla de reacción.

18. Electroforesis en geles de poliacrilamida

Los lisados o los extractos celulares (50 µg) se analizaron por electroforesis en geles de poliacrilamida-dodecil sulfato sódico (SDS-PAGE) con geles discontinuos de acrilamida 5%-12% (2,6%C). Las muestras se prepararon añadiendo tampón de carga de electroforesis (Tris-HCl 186 mM, pH 6,8; SDS 9%; β-mercaptoetanol 6%; glicerol 15% y azul de

bromofenol 0,025%) en proporción 2:1 (v:v). En algunos ensayos se utilizaron diferentes proporciones de acrilamida, que se indican en las leyendas de cada figura.

Los geles se tiñeron con plata o se transfirieron a membranas (ver siguiente capítulo).

19. Transferencia a membrana e inmunodetección

Las proteínas de los geles de electroforesis se transfirieron a membranas de nitrocelulosa o de PVDF (difluoruro de polivinilideno) (Amersham Biosciences) y se incubaron con el anticuerpo primario correspondiente durante una o dos horas a temperatura ambiente o durante toda la noche a 4°C. Después, las membranas se incubaron a temperatura ambiente durante una hora con anticuerpos anti-IgG frente a las diferentes especies conjugados con fosfatasa alcalina o peroxidasa (Bio-Rad, EEUU), y se revelaron con sus reactivos respectivos.

Revelado con fosfatasa alcalina: para el bloqueo de la membrana se utilizó BSA (5%) en PBS durante 1,5 horas. La incubación con el suero primario correspondiente, diluido en BSA (1%) en PBS, se realizó durante 2 horas a temperatura ambiente. Para el lavado de la membrana se utilizó Tween-20 (0,05%) en PBS. La incubación del anticuerpo secundario anti-especie conjugado con fosfatasa alcalina y diluido en BSA (1%) en PBS, se realizó durante 1 hora. La actividad de la fosfatasa alcalina se detectó con NBT (azul de nitrotetrazolio) 0,3 mg/ml y BCIP (5-bromo-4-cloro-3-indolil-fosfato) 0,15 mg/ml en Tris-HCl 100 mM, pH 9,0, NaCl 100 mM y MgCl₂ 5 mM.

Quimioluminiscencia de ECL™: se utilizó el procedimiento y los reactivos recomendados por el fabricante. Para los lavados de la membrana se empleó Tween-20 (0,05%) en PBS.

20. Anticuerpos utilizados en la inmunodetección

Anticuerpos monoclonales IgG de ratón: anti- α -espectrina (Chemicon, EEUU); anti-Hsp90 (α y β) (Calbiochem, EEUU); anti-Hsp70 (Santa Cruz, EEUU); y anti β -actina (Sigma, EEUU).

Anticuerpos policlonales de conejo: anti-caspasa 9 (Alexis, EEUU); anti-Hsp90 β (Chemicon, EEUU); anti-IgM humana (Jackson, EEUU); anti-NG2 (Chemicon, EEUU).

Anticuerpos policlonales de cabra: anti-caspasa 8 (Santa Cruz, EEUU).

Anticuerpos humanos: Muestras de LCR individuales o mezclados (diluídos 1:5); IgG de LCR de pacientes con EM y control; anticuerpos inmunopurificados de LCR de pacientes con EM; IgG purificadas a partir de suero de donantes de sangre (Flebogamma[®], Grifols, España).

21. Preparación de extractos celulares

Los extractos celulares se obtuvieron por un método análogo al de Hovanessian *et al.*, (1987). Las células cultivadas durante seis días en placas multipocillo tratadas con poli-D-lisina, se recogieron, se lavaron con PBS y se lisaron durante 10 minutos en tampón hipotónico A (Tris-HCl 10 mM pH 7.6, KCl 10 mM, DTT 1 mM, EDTA 1 mM, fluoruro de fenilmetilsulfonilo 1 mM, benzamidina 1 mM y leupeptina, pepstatina y antipaína 10 µg/ml). Después se añadieron acetato magnésico 4 mM y acetato potásico 140 mM y se centrifugaron durante 10 minutos a 500xg. El precipitado se lavó, se resuspendió en tampón A con acetato magnésico 4 mM, acetato potásico 140 mM y Triton X-100 0,3% (v:v), y se centrifugó durante 10 minutos a 12.000xg. El sobrenadante, que correspondió a una fracción de membrana, es el denominado extracto celular. Todos los pasos de la extracción se realizaron a 4°C.

22. Fraccionamiento subcelular

Para realizar el fraccionamiento subcelular se empleó un método similar al descrito por Hovanessian *et al.*, (1987) (Figura 7). Las células cultivadas se lisaron con un tampón hipotónico A con acetato magnésico y acetato potásico, y el lisado se centrifugó a 500xg durante 10 minutos. El sobrenadante se centrifugó de nuevo a 12.000xg durante 20 minutos para obtener una fracción citosólica 12.000xg (S12) y un precipitado mitocondrial (P12). El precipitado de 500xg se resuspendió en tampón que contenía Triton X-100 0,5% (v:v) y se centrifugó para separar la fracción de membranas extraída con detergente (M) y el precipitado nuclear (N). Para la determinación de la concentración de proteína en los extractos se empleó el método Bradford, utilizando BSA (albúmina de suero bovino) como patrón (Bradford, 1976).

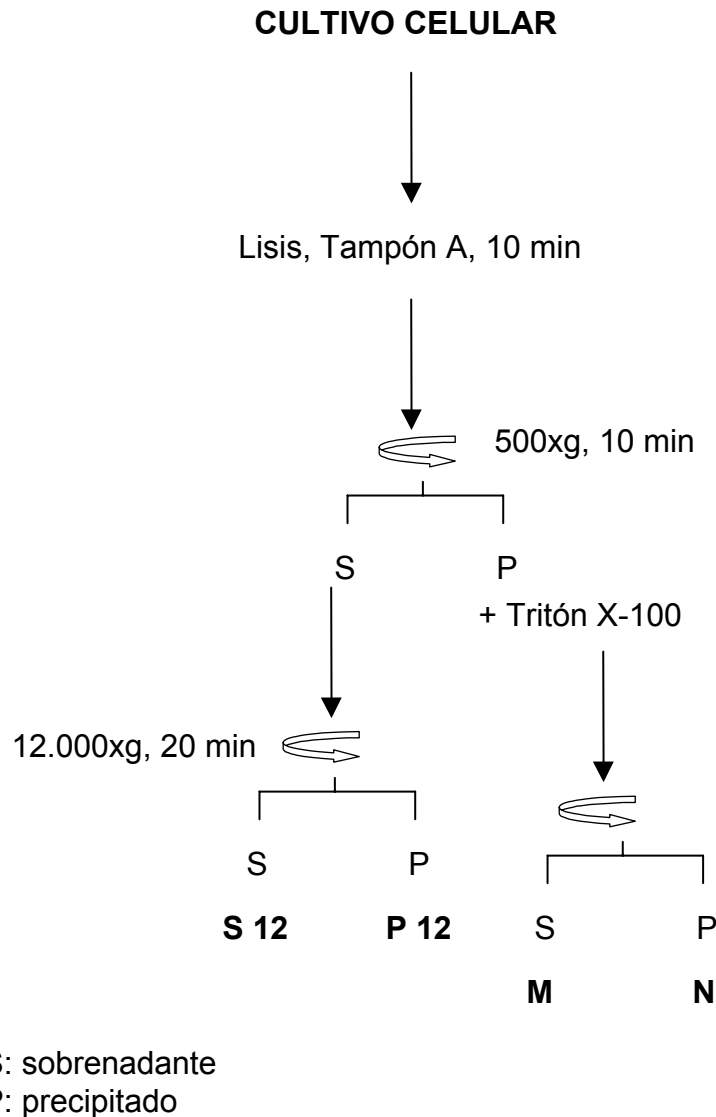


Figura 7. Procedimiento empleado en el fraccionamiento subcelular.

23. Obtención de la fracción de gangliósidos

La fracción enriquecida en gangliósidos se extrajo según el procedimiento de (Eisenbarth *et al.*, (1979). Los hemisferios cerebrales de embriones de rata de 19 días se homogeneizaron con metanol/cloroformo/agua, 2:1:0,3 (v:v) en un homogeneizador Potter-Elvehjem. El homogeneizado se centrifugó durante 10 minutos a 3.000xg y el precipitado se volvió a extraer y se centrifugó. Las fracciones de sobrenadante se combinaron y se añadieron dos volúmenes adicionales de cloroformo y agua. La mezcla se centrifugó durante 10 minutos a 3.000xg, y se separó la fase superior de metanol/agua que contenía los gangliósidos (Figura 8). El metanol se evaporó con vacío. Todos los pasos se realizaron a 4°C.

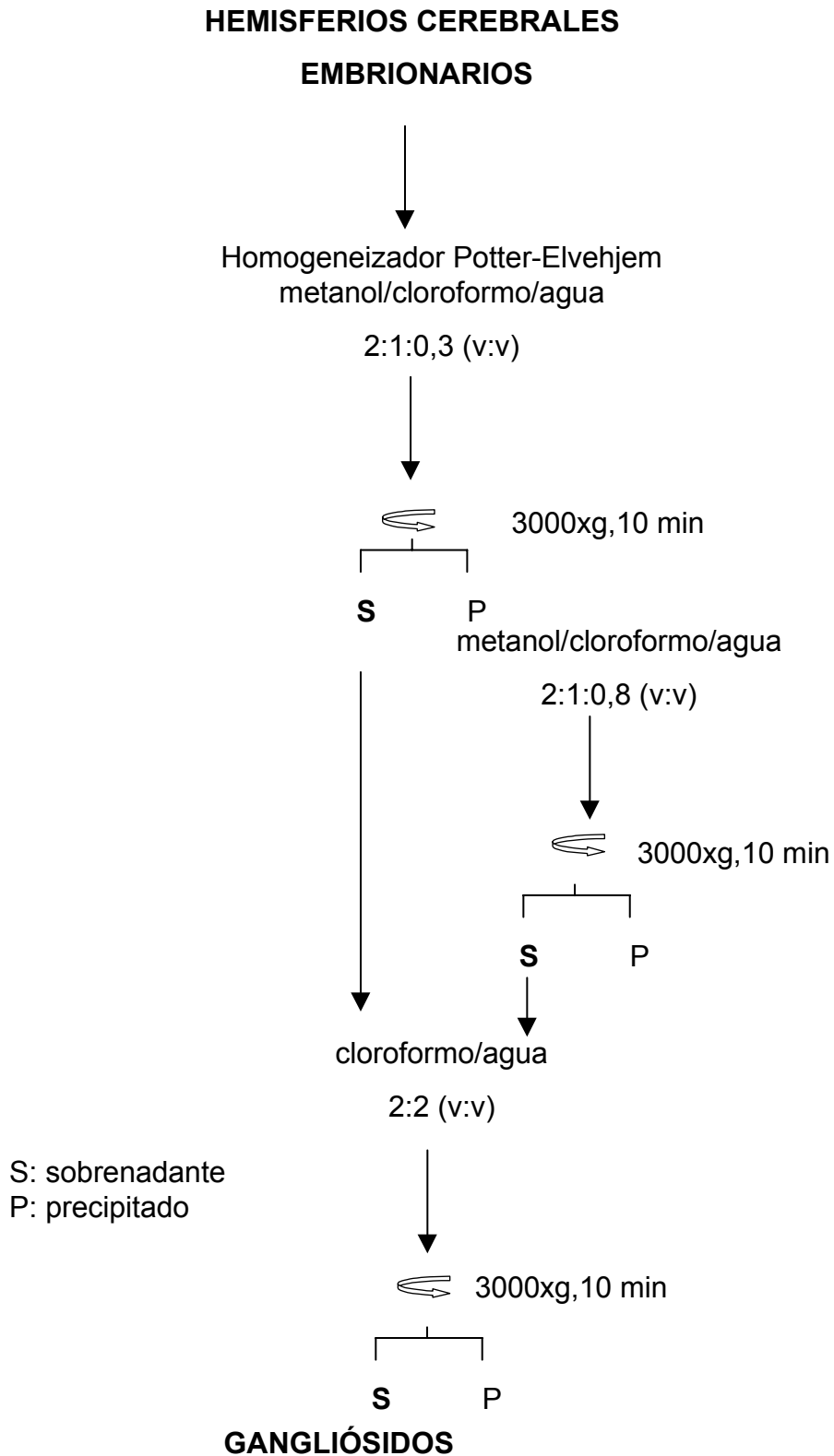


Figura 8. Procedimiento empleado en la extracción de gangliósidos.

24. ELISA

Para realizar el ensayo de ELISA (*Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay*), las placas se recubrieron con el extracto de gangliósidos como describieron Sadatipour *et al.*, (1998). En otros experimentos, las placas se recubrieron con los extractos celulares (50 μ l). Las placas se incubaron toda la noche a 4°C con muestras de LCR y después se incubaron a temperatura ambiente durante una hora con los anticuerpos de cabra anti-IgG conjugados con fosfatasa alcalina descritos anteriormente. Se revelaron utilizando como sustrato p-nitrofenil-fosfato y se leyeron a 405 nm en un equipo Spectra Fluor Tecan.

25. Purificación de IgG humanas

Algunos LCR se utilizaron para obtener IgG humanas. Se reunieron LCR de pacientes con EM y OEN (Otras Enfermedades Neurológicas) (12 a 14 ml de cada grupo de 5 a 7 pacientes), y sus IgG se purificaron con una columna de afinidad de proteína G-sefarosa (Amersham Biosciences, España) siguiendo las instrucciones del fabricante.

26. Inmunoprecipitación

Los extractos celulares se sometieron a un paso de preinmunoprecipitación previa incubándolos con IgG (procedentes del suero de donantes de sangre) y proteína G-sefarosa. Estos extractos (500 μ g) se inmunoprecipitaron con IgG purificadas de los LCR de pacientes con EM durante 2 horas a temperatura ambiente en tampón A. Después, se añadió proteína G-sefarosa (100 μ l de resina al 50%), se mantuvo una hora a 4°C y se centrifugó. Los inmunoprecipitados se lavaron tres veces en 1 ml de tampón con HEPES-KOH 25mM, pH 7,4, DTT 1 mM y acetato magnésico 4 mM y se analizaron por SDS-PAGE y posterior tinción de los geles con plata o transferencia a membranas e inmunodetección. Se llevaron a cabo controles en paralelo en los que se omitieron los extractos celulares (con tampón A sólo).

En otros experimentos, se inmunoprecipitaron los extractos celulares (200 μ g) obtenidos de los cultivos celulares de embriones de rata o de células de neuroblastoma humano con 5 μ g de anticuerpo anti-Hsp90 monoclonal y 50 μ l de proteína G-sefarosa como se ha descrito anteriormente.

27. Identificación de proteínas por espectrometría de masas

Las bandas de proteínas procedentes de la inmunoprecipitación se recortaron de los geles de poliacrilamida y se procesaron automáticamente utilizando un equipo Investigator ProGest™ (Genomics Solutions, Gran Bretaña) (Houthaeve *et al.*, 1995). El protocolo de digestión utilizado fue el de Schevchenko *et al.*, (1996) con algunas variaciones: los fragmentos de gel se lavaron con bicarbonato amónico 25 mM y acetonitrilo antes de su reducción con DTT 10 mM en bicarbonato amónico 25 mM y su alquilación con yodoacetamida 100 mM en bicarbonato amónico 50 mM. Después los fragmentos de gel se lavaron con bicarbonato amónico 50 mM y acetonitrilo y se secaron con una corriente de nitrógeno. Se añadió tripsina porcina modificada (para secuenciación; Promega, EEUU) a una concentración final de 16 ng/μl en bicarbonato amónico 25 mM para realizar la digestión de proteínas durante 12 horas a 37°C. Los péptidos se eluyeron con acetonitrilo, bicarbonato amónico 25 mM y ácido fórmico 10% (v:v) en un volumen de extracción final de 100 μl.

Para la obtención de la huella peptídica se depositó manualmente una alícuota de 0,5 μl de solución matriz (ácido 2,5-dihidroxibenzoico 5 g/l en acetonitrilo:agua 33% y ácido trifluoroacético 0,1%) sobre una sonda de MALDI AnchorChip™ de 400 μm y se dejó secar a temperatura ambiente. Después se añadieron 0,5 μl de la solución de extracción anteriormente mencionada y se dejaron secar de nuevo.

Las muestras se analizaron por espectrometría de masas MALDI-ToF en un espectrómetro (Bruker Reflex™ IV, Broker-Franzen Analytic GMBH, Alemania) equipado con una fuente SCOUT™ en modo positivo. El voltaje aplicado para la aceleración de iones fue de 20 kV. El equipo se calibró primero externamente empleando señales de masa protonada de una mezcla peptídica con un rango de masas entre 1000 y 3200 m/z y después cada espectro se calibró internamente utilizando señales seleccionadas procedentes de la autoproteólisis de la tripsina para conseguir una medida de masa típica con una exactitud de ± 30 ppm. Las masas peptídicas de los fragmentos tripsinizados se transfirieron con el programa MS BioTools™ a la base de datos NCBIInr utilizando el programa informático Mascot™ (Matrix Science, Gran Bretaña). No se establecieron restricciones en cuanto a las especies de origen de las proteínas, y el rango de masa molecular permitido fue de 1-200 kDa. En todas las búsquedas se consideraron los siguientes límites: hasta un error como máximo en la rotura por tripsina y una exactitud en la masa de 50 ppm.

28. Obtención de anticuerpos humanos por inmunoafinidad

Los extractos celulares se cargaron en un gel de electroforesis con peine continuo. Las proteínas se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa, y se recortó una tira horizontal en la posición de 82 kDa. Esta tira se incubó toda la noche a 4°C con 1 ml de LCR. El LCR se recogió y se reservó como “adsorbido”. Los anticuerpos ligados a la membrana se extrajeron con HCl pH 2,2, se neutralizaron con Tris 1 M y se dializaron en PBS.

29. Electroforesis bidimensional

La electroforesis bidimensional (2-DE) se realizó por combinación de isoelectroenfoque horizontal (IEF) con electroforesis SDS-PAGE utilizando un equipo Multiphor II (Amersham Biosciences, España) para la primera dimensión y un equipo de electroforesis en gel vertical para la segunda, siguiendo las instrucciones del fabricante. El isoelectroenfoque con urea y anfólitos se realizó utilizando tiras inmovilizadas con gradiente de pH. Los extractos celulares (hasta 100 µg) se prepararon con urea 7 M, tiourea 2 M y β-mercapto-etanol 5% y se aplicaron en tiras de 13 cm con gradiente no lineal de pH 3-10. La electroforesis de la segunda dimensión se realizó en geles de acrilamida 12% (2,6% C) de 1 mm de espesor, utilizando las tiras de IEF como gel concentrador. Posteriormente, los geles se tiñeron con plata o Coomassie, o se transfirieron a membranas.

30. Análisis estadístico

Todos los ensayos y correlaciones se llevaron a cabo de forma ciega. Los datos se expresaron como medias ± su error estándar (S.E.M.). Las correlaciones se determinaron por el coeficiente de correlación de Spearman (r). Las diferencias entre grupos de pacientes se estudiaron por análisis de varianza usando el test de Kruskal-Wallis y por ANOVA seguida por el post-test de Newman-Keuls cuando el valor de p con la ANOVA fue menor de 0,05. En los ensayos, las diferencias significativas para las comparaciones entre grupos se determinaron por el test Mann-Whitney o por el test de ANOVA con el post test de Dunnett cuando el valor de p con el análisis de varianza fue menor de 0,05. El análisis estadístico se realizó mediante el programa informático PRISM[®], versiones 2.0 y 4.0 para Windows (Graph Pad Software).

31. Productos, reactivos y equipos

Análisis de imagen: PDQest y Diversity One de Bio-Rad.

Columnas: Columnas para HPLC de fase reversa RP C18, μ RPC C2/C18. Columna de afinidad de proteína G-sefarosa de Amersham Biosciences.

Cromatógrafo: Amersham Biosciences con detector de fotodiodos Waters 490E y programa informático FPLCdirector.

Espectrofotómetro: Beckman DU 640

Homogeneizador: Potter-Elvehjem vidrio-vidrio de Afora.

Inhibidores: de proteasas de Sigma, de caspasas de Calbiochem.

Lector de placas: Spectra Fluor Tecan.

Medios de cultivo: Invitrogen-Gibco.

Membranas de transferencia: de nitrocelulosa y de PVDF (Hybond-P) de Amersham Biosciences.

Microscopios: Microscopio de fluorescencia Olympus IX70. Microscopio confocal MRC-1024 Bio-Rad.

Películas fotográficas: Agfa RX e hipersensibles Hyper-film de Amersham Biosciences.

Placas y tubos para cultivos: Costar, Afora y Falcon.

Reactivos: Sigma, Merck, Panreac y Bio-Rad.

Resinas: Proteína A-sefarosa y proteína A/G sefarosa de Amersham Biosciences.

Sistemas de electroforesis, isoelectroenfoque y transferencia: Equipo Multiphor II (Amersham Biosciences). Acrilamida, bisacrilamida, marcadores de alto y bajo peso molecular y el resto de reactivos de Amersham Biosciences y Bio-Rad.

Sustratos de caspasas: Calbiochem.

La procedencia del resto de los materiales se detalla en el texto.

RESULTADOS

1. INDUCCIÓN DE APOPTOSIS NEURONAL Y DAÑO AXONAL POR LCR DE PACIENTES CON ESCLEROSIS MÚLTIPLE EN CULTIVOS NEURONALES

Tanto la espectroscopía de resonancia magnética como los estudios patológicos han destacado recientemente la importancia del daño axonal y de la apoptosis en relación con la EM, sin embargo el mecanismo exacto por el que se producen estos fenómenos aún sigue siendo desconocido. Ya se ha indicado anteriormente que el daño axonal en la EM podría ser causado por mediadores inflamatorios solubles que podrían estar presentes en el LCR de los pacientes. Así pues, se ha continuado un estudio en el que se han intentado caracterizar los LCR de pacientes con EM RR que contienen factores solubles que puedan dañar a las neuronas en cultivo, ya que estos factores podrían ser igualmente tóxicos para su SNC. En este grupo de ensayos se estudiaron 47 LCR de pacientes con EM RR, 12 pacientes control, 6 individuos neurológicamente sanos y 6 pacientes con síndrome de Guillain-Barré. Cada muestra de LCR que se obtuvo de los pacientes se analizó individualmente, y estos ensayos fueron ciegos respecto a sus parámetros clínicos. Se realizaron 2-4 veces con diferentes lotes de cultivos neuronales y se llevaron a cabo por duplicado.

1.1. Análisis morfológico

En primer lugar, se prepararon cultivos neuronales primarios y se mantuvieron las células en cultivo durante 4 a 6 días. Después, los cultivos neuronales se trataron con muestras de LCR, como se ha descrito en Materiales y Métodos, con 0.1 ml de LCR por ml de medio DFN2 sin suero en los días 0, 2 y 4, y se mantuvieron a 37°C hasta el día 8-10. En cada experimento se llevaron en paralelo controles en los que las células se trataron con 0,1 ml de PBS por ml de medio de cultivo sin suero. El cultivo neuronal se estudió después del tratamiento observando la morfología celular por microscopía con contraste de fase (objetivo 40x). El resultado de esta observación demostró que los LCR de algunos pacientes con EM resultaron ser tóxicos para las neuronas en cultivo. La degeneración de las neuronas a lo largo de los días de este tratamiento se definió por la presencia de encogimiento celular y retracción de las neuritas. Para realizar el análisis de la morfología celular, se estableció una escala semicuantitativa de observación: (-), más del 50% de las células se apreciaron encogidas y con retracción de las neuritas; (+/-), del 25 al 50% de las células se observaron encogidas y con retracción en las neuritas; (+), menos del 25% de las células se apreciaron encogidas y con retracción en las neuritas. El deterioro de las células se produce mayoritariamente cuando

el cultivo tiene a partir de 8 días de tratamiento (11-12 días de cultivo), y este es el momento en que se procesaron y analizaron. El valor que se dio a cada muestra fue la media de los valores asignados a 3 x 3 campos observados por pocillo, con un área de 237.583 μm^2 en cada campo (Figura 9).

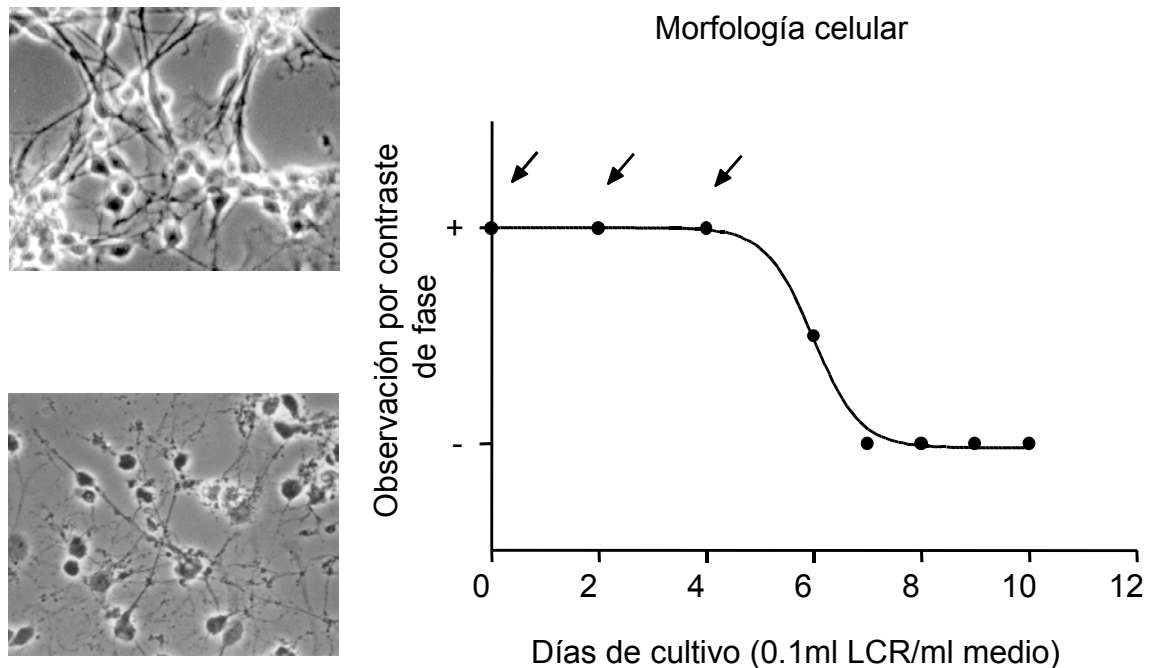


Figura 9. Evaluación de la morfología neuronal durante los días de tratamiento del cultivo con LCR. La morfología neuronal se observó por contraste de fase y se asignó un valor al estado de las neuronas, estableciendo una escala semicuantitativa de observación entre (+) y (-). El valor (+) corresponde al cultivo en buen estado y el (-) al cultivo deteriorado. Las flechas corresponden a los días en que se trató el cultivo con LCR.

1.2. Viabilidad celular

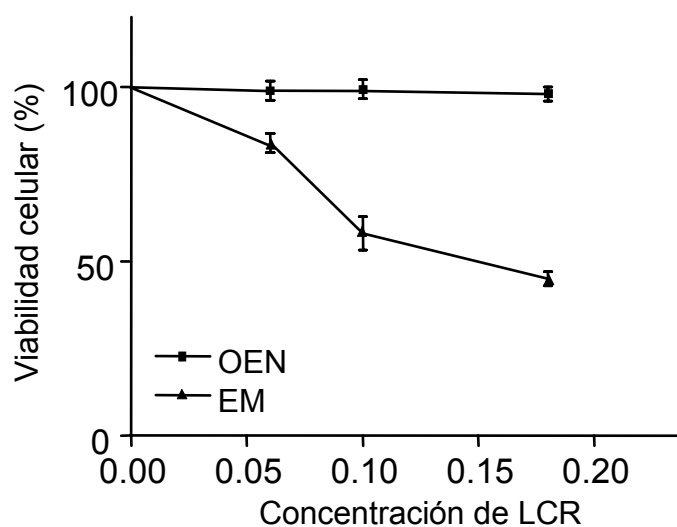
La actividad neurotóxica de los LCR sobre el cultivo de neuronas también se evaluó con el ensayo de viabilidad celular. Una disminución en la medida de MTT implica una disfunción mitocondrial y cuantifica la pérdida de viabilidad celular.

Además, se realizó un estudio de toxicidad dosis-respuesta midiendo la viabilidad celular para determinar la dosis tóxica de LCR y observar la neurotoxicidad en los cultivos tratados con LCR de estos pacientes con EM en comparación con cultivos tratados con LCR de pacientes control OEN (Figura 10). La supervivencia neuronal disminuyó con concentraciones crecientes de LCR, de manera dosis-dependiente únicamente en los cultivos

tratados con LCR de pacientes con EM, mientras que los LCR de OEN no resultaron tóxicos para el cultivo utilizando dosis análogas.

Figura 10. Curvas dosis-respuesta de la viabilidad celular en los cultivos neuronales después del tratamiento con muestras de LCR.

Las neuronas cultivadas se trataron con LCR de tres pacientes con EM RR y tres controles OEN. La viabilidad celular se cuantificó mediante el ensayo de MTT y se expresó como porcentaje de células viables. El 100% corresponde a la viabilidad de las células sin tratamiento. Las concentraciones de LCR se expresan en ml de LCR por ml de medio de cultivo. Las barras representan la media + S.F.M.



1.3. Apoptosis neuronal

Posteriormente, se caracterizó el tipo de muerte que sufrían los cultivos neuronales tratados con LCR de pacientes con EM. Con este objetivo, los cultivos neuronales se trataron con muestras de LCR de pacientes con EM y de pacientes control, y después se cuantificó la apoptosis neuronal. El porcentaje medio de apoptosis neuronal inducida por LCR de pacientes con EM fue $34,3 \pm 1,9\%$, significativamente diferente del porcentaje que se obtuvo con LCR de pacientes control OEN ($23,4 \pm 0,93\%$, $p < 0,01$), individuos neurológicamente sanos ($22,8 \pm 0,72\%$, $p < 0,01$) y pacientes con síndrome de Guillain-Barré ($19,8 \pm 1,5$, $p < 0,01$) (Figura 11).

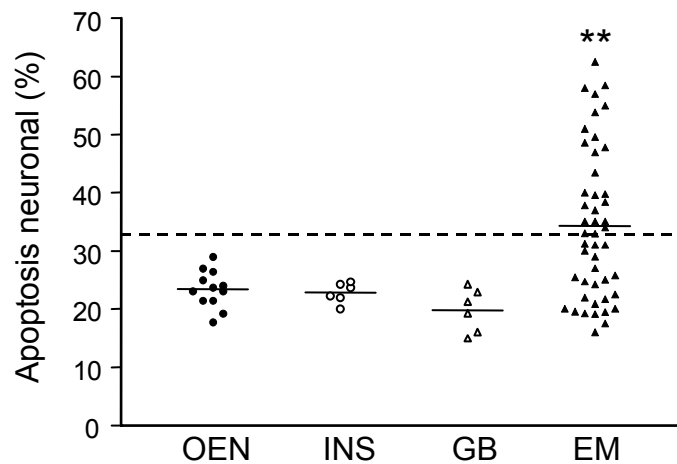


Figura 11. Distribución de los LCR de pacientes con respecto a la apoptosis que inducen en el cultivo neuronal. La figura muestra la apoptosis neuronal que se induce en los cultivos por tratamiento con LCR de pacientes: control (OEN, n=12), individuos neurológicamente sanos (INS, n=6), pacientes con síndrome de Guillain-Barré (GB, n=6) y pacientes con EM RR (n=47). Las barras horizontales representan el porcentaje medio de apoptosis neuronal. Las diferencias estadísticas entre los cuatro grupos se estudiaron por ANOVA y post test de Dunnett. Se encontró diferencia con significación estadística en el grupo EM con respecto a los grupos OEN, INS y GB (**, $p < 0,01$). La línea punteada horizontal representa el límite estadístico superior de apoptosis inducida por LCR del grupo OEN (33%), que define dos categorías en la población de LCR de EM: LCR que inducen altos valores de apoptosis neuronal (ANA) y LCR que inducen valores de apoptosis análogos a los de los controles (ANC). El porcentaje medio de apoptosis en los cultivos sin tratamiento fue de $22,5 \pm 1,1$ (n=66). (Modificado de Cid *et al.*, 2003b).

En el grupo OEN, el 99,7% de los valores de apoptosis neuronal, evaluada como media ± 3 S.D., están entre 13,8% y 33,0%. En esta población, los percentiles 5 y 95 fueron 17,7% y 29,0% respectivamente. En la población control total, (incluyendo el grupo OEN y los individuos neurológicamente sanos), el 99,7% de los valores de apoptosis neuronal están comprendidos entre 12,7% y 32,5%. Los percentiles 5 y 95 fueron 12,5% y 28,5%, respectivamente. Por tanto, se consideró al valor 33% como el límite superior de los valores control.

En el grupo de EM, el 49% de los pacientes (n = 23) tenían LCR que inducían una apoptosis neuronal igual o mayor que el límite superior (33%) de los valores control con una media de $45,06 \pm 1,92\%$. Este grupo de pacientes se denominó ANA (Apoptosis Neuronal Alta). En un segundo grupo de pacientes con EM que comprende el 51% (n = 24) de los pacientes, los LCR indujeron una apoptosis inferior al límite superior de los valores control con una media de $23,97 \pm 1,0\%$, valor significativamente diferente al del grupo ANA ($p < 0,0001$ calculado por el test de Mann-Whitney). Este segundo grupo de EM se denominó ANC (Apoptosis Neuronal análoga a la del Control) (Figura 12 A).

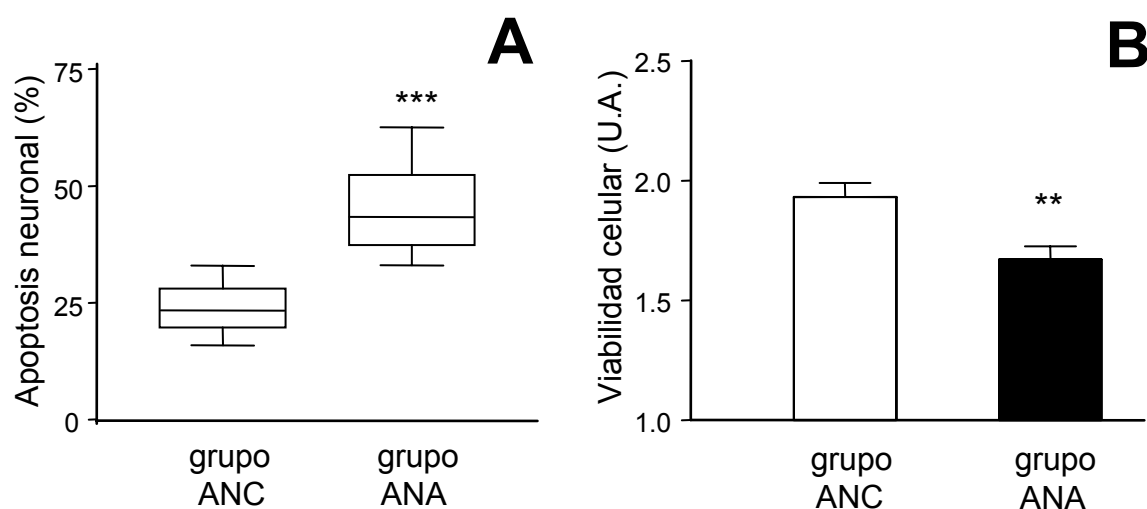


Figura 12. Inducción de daño neuronal en cultivos tratados con LCR de pacientes con EM. (A) El gráfico representa la cuantificación de la apoptosis neuronal en cultivos tratados con LCR de pacientes con EM. En estos LCR se pueden considerar dos grupos significativamente diferentes ($p < 0,0001$, test de Mann-Whitney). En el diagrama de cajas la media de los datos se muestra como una línea horizontal, los extremos de la caja representan su S.E.M., y las líneas superior e inferior representan los datos máximo y mínimo. (B) Los LCR de pacientes con EM del grupo ANA mostraron valores de viabilidad celular medida con el ensayo de MTT significativamente más bajos que los del grupo ANC ($p < 0,0071$).

El porcentaje de apoptosis en los cultivos control en los que no se añade LCR fue $22,5 \pm 1,1$ ($n = 66$). La ausencia de suero en el medio de cultivo, necesaria para evitar la proliferación glial, es por sí misma inductora de apoptosis.

Por otra parte, también se observó que los LCR de los pacientes con EM que pertenecían al grupo ANA indujeron una pérdida de viabilidad celular significativa con respecto al grupo ANC (Figura 12 B). Este resultado demuestra que la falta de viabilidad de los cultivos tratados con estos LCR de pacientes con EM del grupo ANA y la apoptosis inducida son dos fenómenos paralelos, o lo que es lo mismo, que la pérdida de viabilidad de estas neuronas debe ser producida por apoptosis.

1.4. Evaluación del daño axonal y neurítico

Una vez observada la neurotoxicidad de los LCR de un grupo de pacientes con EM sobre los cultivos neuronales, se intentó determinar si este proceso alteraba de algún modo la morfología de los procesos neuronales y la estructura del citoesqueleto neuronal, y para ello se llevó a cabo su análisis morfológico y su estudio inmunocitoquímico.

En el análisis morfológico que se realizó en los cultivos tratados con LCR de pacientes con EM del grupo ANC se observaron procesos neuronales completos (Figura 13 A), mientras que los cultivos tratados con LCR del grupo ANA presentaron características indicativas de daño axonal y apoptosis tales como fragmentación de neuritas y cuerpos neuronales retraídos (Figura 13 C). Los resultados obtenidos en los experimentos control (tratamiento con PBS) y con LCR del grupo OEN fueron similares a los obtenidos con el grupo ANC.

Los cambios neuronales patológicos que se produjeron como consecuencia del tratamiento del cultivo con LCR se determinaron también mediante estudios inmunocitoquímicos realizados en paralelo a la observación por microscopía con contraste de fase. Las neuronas se marcaron con anticuerpos contra la proteína específica del citoesqueleto de las neuronas β -tubulina isotipo III y con fluoresceína como anticuerpo secundario, y posteriormente se observaron por microscopía confocal. Para analizar el daño de los procesos neuríticos y axonales se estableció una valoración semicuantitativa, denominando “sin daño axonal” (β -tubulina +), cuando menos del 25% de las neuronas mostraban axones o neuritas rotos, y denominando “con daño axonal” (β -tubulina -) cuando más del 25% de las neuronas marcadas mostraban axones o neuritas rotos. El valor final de cada muestra fue la media de los valores asignados a 3 x 3 campos por cubre y por duplicado.

Entre los LCR de los pacientes con EM se observaron estos dos tipos de inmunorreactividad frente a β -tubulina. Únicamente los cultivos tratados con LCR de los grupos ANC y OEN presentaron neuritas intactas, que se observan como líneas continuas marcadas con β -tubulina (Figura 13 B). Por el contrario, los cambios patológicos en las neuronas se hicieron evidentes en los cultivos tratados con LCR del grupo ANA (Figura 13 D). Estos procesos neuronales aparecieron fragmentados, e incluso cuando el daño fue extremo, se observó degeneración neurítica total identificada por la ausencia de marcaje.

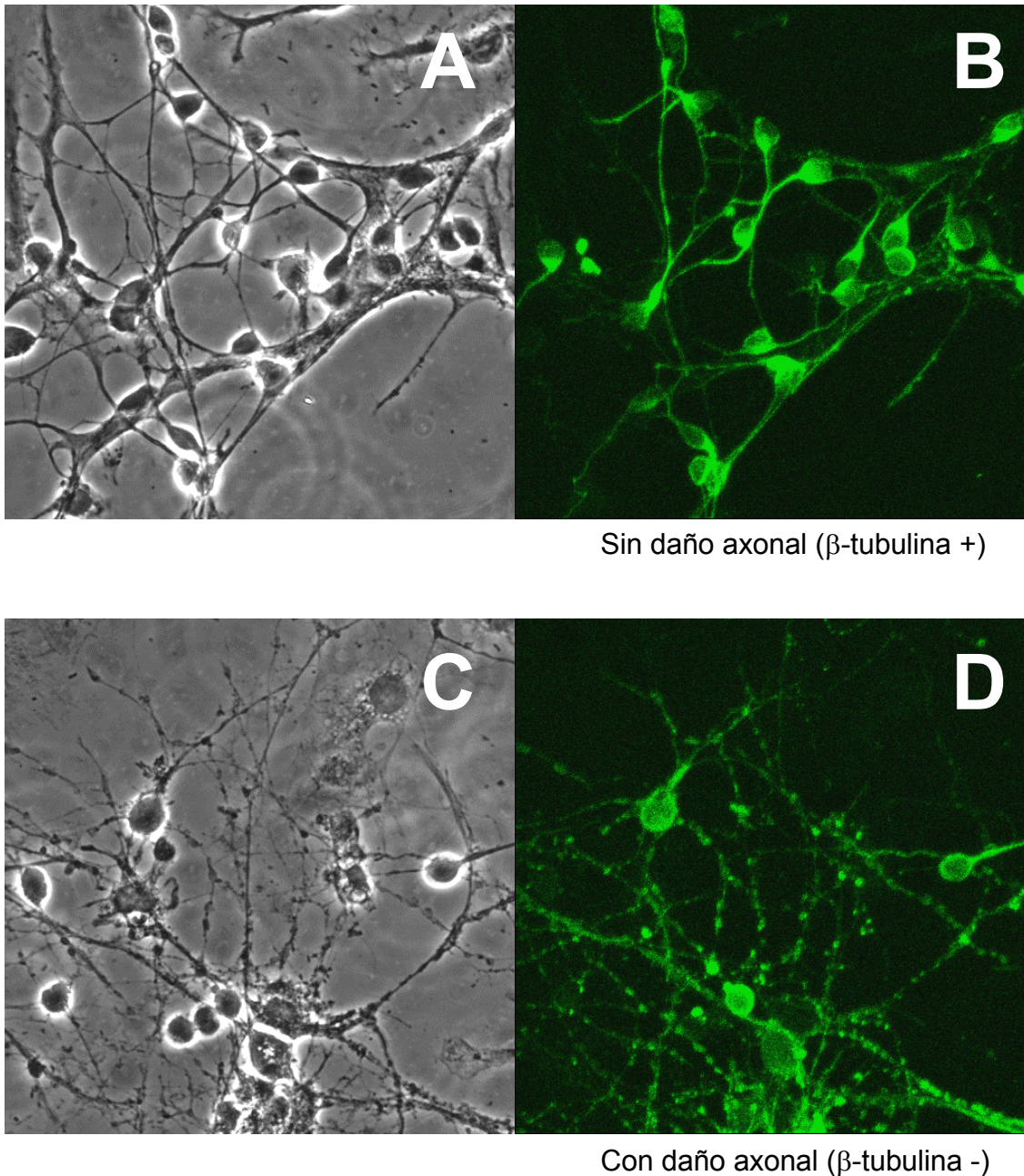


Figura 13. Daño axonal inducido por LCR de pacientes con EM. Las neuronas se observaron en el mismo campo por microscopía confocal utilizando un detector de luz de transmisión (A, C) y un filtro con paso de banda de 522-535 nm para la β -tubulina marcada con fluoresceína (B, D). Las imágenes A y B son neuronas tratadas con LCR del grupo ANC y presentan cuerpos neuronales completos y procesos completos marcados con β -tubulina, lo cual indica neuronas y axones intactos (sin daño axonal). Las imágenes C y D son neuronas tratadas con LCR de pacientes del grupo ANA y presentan cuerpos neuronales deteriorados con procesos neuronales discontinuos (con daño axonal). Barra de escala, 50 μ m. (Alcázar *et al.*, 2000).

1.5. Relación entre apoptosis neuronal y daño axonal

Para confirmar la relación entre la apoptosis neuronal y el daño axonal, se observaron en paralelo los marcajes con TUNEL y β -tubulina en preparaciones gemelas. De los 47 pacientes con EM estudiados en este grupo de ensayos, 18 de ellos tenían LCR que no inducían daño axonal en los cultivos neuronales y que pertenecían al grupo ANC. Los 29 LCR restantes indujeron daño axonal en los cultivos, y de ellos 23 pertenecían al grupo ANA y 6 al grupo ANC (Figura 14).

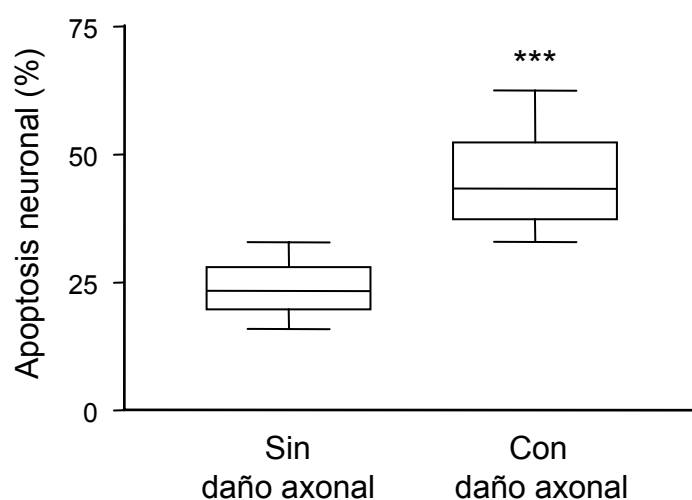


Figura 14. Relación entre la apoptosis neuronal y el daño axonal inducido por LCR de pacientes con EM en cultivos neuronales. El gráfico representa la cuantificación de la apoptosis neuronal en cultivos tratados con LCR de pacientes con EM y su relación con el daño axonal. Los 18 LCR del grupo ANC no ocasionaron daño axonal en cultivos neuronales y el valor medio de apoptosis que indujeron en cultivo fue $23,08 \pm 1,03$, mientras que otros 29 LCR (23 del grupo ANA y 6 del grupo ANC) indujeron daño axonal y una apoptosis de $41,25 \pm 2,12$ (***, $p < 0,0001$, test de Mann-Whitney).

En resumen, se pueden apreciar dos grupos de LCR en los pacientes con EM en cuanto a la neurotoxicidad que inducen en los cultivos. En la tabla I se muestran los datos relativos a estos dos grupos de LCR y se puede observar que los que inducen mayores porcentajes de apoptosis y menor viabilidad según el ensayo de MTT también inducen mayor daño axonal observado con β -tubulina (grupo ANA), mientras que los que inducen menores valores de apoptosis en cultivo, presentan mayores valores de viabilidad y menor daño axonal (grupo ANC).

Tabla I. Comparación entre los valores de apoptosis, viabilidad y daño axonal obtenidos con LCR de los grupos de EM ANC y ANA

	grupo ANC (n=24)	grupo ANA (n=23)	P
Apoptosis	23,97 ± 1,0	45,06 ± 1,92	<0,0001
Viabilidad celular (MTT en U.A.)	1,932 ± 0,059	1,672 ± 0,055	<0,0071
Con daño axonal (β-tubulina-)	6/24 (25%)	23/23 (100%)	<0,0001

Los análisis estadísticos para la comparación de los datos de apoptosis y viabilidad se realizaron con el test de Mann-Whitney. Los datos de daño axonal indican la proporción de LCR del grupo ANC y del grupo ANA que inducen daño axonal en cultivo. Entre paréntesis se indica el porcentaje de esta proporción. El análisis estadístico de los datos de daño axonal se realizó con el test de Fisher.

2. CORRELACIÓN ENTRE LA NEUROTOXICIDAD INDUCIDA POR LCR DE PACIENTES CON EM EN CULTIVOS NEURONALES Y LA PATOLOGÍA DE LOS PACIENTES

Puesto que todos los resultados obtenidos hasta el momento apuntaban la posibilidad de que la toxicidad de los LCR sobre las neuronas en cultivo estuviera relacionada con la incapacidad de los pacientes, confirmando que la disfunción y el daño neuronal pueden ser fundamentales en los mecanismos de discapacidad, estudiamos si existía algún tipo de relación entre la neurotoxicidad inducida por los LCR de pacientes con EM y la patología de los pacientes. Para evaluar el estado de los pacientes y su recuperación después de los brotes de la enfermedad, se utilizaron dos parámetros: la hipointensidad de sus lesiones en secuencias ponderadas en T1 en las IRM y la valoración de la incapacidad clínica de los pacientes en la escala EDSS.

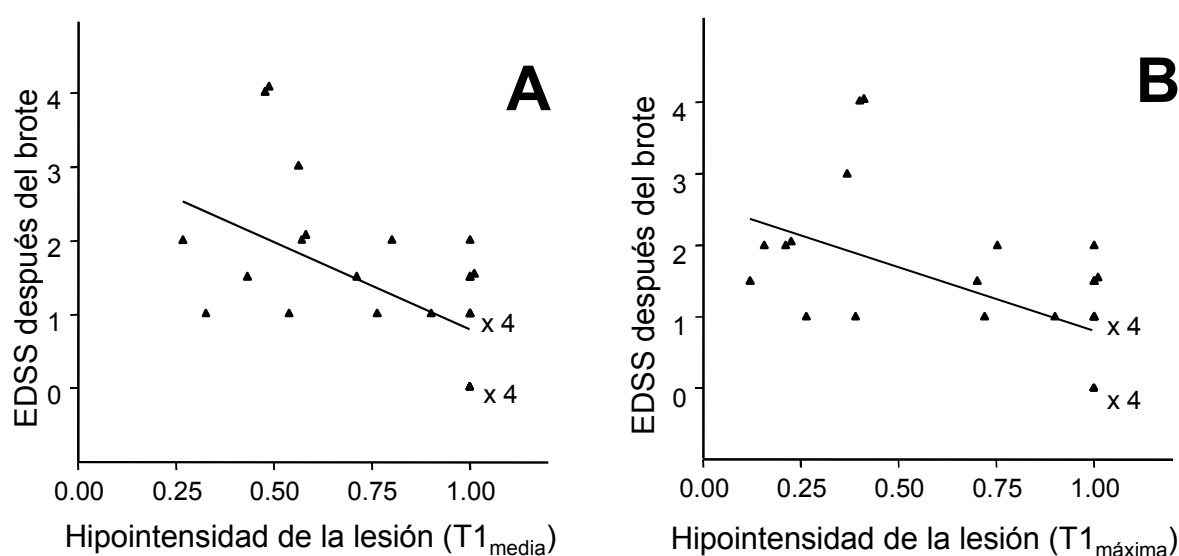
En estos ensayos se estudiaron 24 pacientes con EM RR. Las características clínicas de los pacientes revelaron que en algunos de ellos la incapacidad neurológica debida al brote no se recuperó completamente, y que ese déficit se mantendría un mes más tarde del brote. En estos pacientes, el valor de EDSS fue el mismo antes y después del brote o su mejoría fue limitada en la escala funcional, representando un porcentaje de recuperación del brote de un 50% o menor. En otros pacientes, la incapacidad neurológica se recuperó completamente, o acumularon solamente un déficit residual un mes después del brote. Su valor de EDSS mejoró varios puntos en esta escala funcional. Estos valores representaron un rango de 60-100% de recuperación.

2.1. Correlación entre la recuperación del brote y la hipointensidad de las lesiones en T1

Para la realización de este estudio se dispuso de IRM con secuencias ponderadas en T2, T1 y T1 con contraste de gadolinio de los 24 pacientes con EM. Se considera que las imágenes de resonancia magnética en T2 reflejan inflamación y edema, y que los cambios en el número y volumen de lesiones en T2 son indicadores sensibles pero no específicos de actividad de la enfermedad. Además, en las lesiones crónicas se producen degeneración axonal y gliosis que se observan en las secuencias en T1 como lesiones hipointensas denominadas "agujeros negros" o "*black holes*", estas lesiones sí se consideran específicas de actividad de la enfermedad ya que se ha demostrado histológicamente que las lesiones hipointensas en T1 están causadas por destrucción tisular y pérdida axonal, y están más

relacionadas con el déficit permanente que las lesiones hiperintensas en T2 (Brück *et al.*, 1997; Van Walderveen *et al.*, 1998; Van Waesberghe *et al.*, 1999).

Todos los pacientes mostraron lesiones hiperintensas en las secuencias ponderadas en T2. En 13 de las 24 IRM aparecieron también lesiones hipointensas en las secuencias ponderadas en T1. En las IRM de los 11 pacientes restantes, no se encontraron lesiones en las secuencias en T1 y su valor de hipointensidad relativo (1,0) fue el correspondiente a la sustancia blanca normal. Las lesiones en T1 se clasificaron, según su grado de hipointensidad, como moderadamente hipointensas (rango 0,9-0,7), muy hipointensas (rango 0,7-0,5) o extremadamente hipointensas (rango 0,5-0,1).

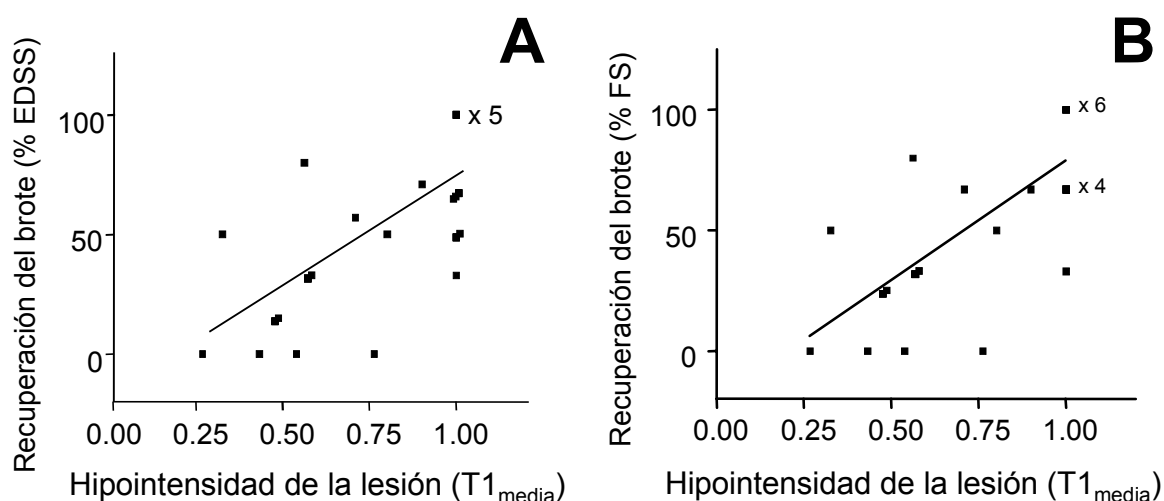


Figuras 15. Correlación entre la recuperación del brote y la hipointensidad en las secuencias ponderadas en T1. La recuperación de los brotes se expresó como puntuación en el EDSS después del brote. Los valores decrecientes de hipointensidad corresponden a distintos grados de hipointensidad de las diferentes lesiones en T1. El valor 1,0 representa a la sustancia blanca normal sin lesiones en las secuencias en T1. Para estudiar la correlación en este estudio se consideraron tanto la media de las lesiones hipointensas (T1_{media}) (A) como la lesión más hipointensa encontrada en cada paciente (T1_{máxima}) (B). La correlación se realizó mediante el test de Spearman. A: $r = -0.573$, $p < 0.002$. B: $r = -0.587$, $p < 0.0013$.

Al comparar la recuperación clínica del brote y la hipointensidad de las lesiones en T1 se pudo comprobar que la hipointensidad de las lesiones en T1 se correlacionó con la recuperación del brote en la valoración EDSS (Figuras 15 A y B). Cuanto mayor fue la hipointensidad en T1 en las IRM, peor fue la recuperación del brote. Además, la incapacidad clínica de estos pacientes se correlacionó mejor con la hipointensidad de las lesiones en T1

cuando se midió la lesión más hipointensa en lugar de la media de las lesiones hipointensas ($r = -0,573, p < 0,002$; $r = -0,587, p < 0,0013$ respectivamente).

Por otra parte, se estableció una correlación análoga utilizando el porcentaje de recuperación en la valoración EDSS, en lugar de sus valores absolutos. Se observó que la hipointensidad media de las lesiones en T1 también se correlacionó estrechamente con el porcentaje de recuperación del brote en la valoración EDSS. Cuanto mayor fue la hipointensidad en T1 en las IRM, peor fue la recuperación del brote (inferior al 50%) (Figura 16 A). Además, los cambios clínicos de los pacientes con EM se correlacionaron más con la hipointensidad media de las lesiones en T1 cuando se utilizaron los valores FS en lugar de valores de EDSS (Figuras 16 B) ($r = 0,656, p < 0,0005$; $r = 0,724, p < 0,0001$ para porcentaje de EDSS y porcentaje de FS respectivamente). La incapacidad clínica de estos pacientes expresada en porcentaje de EDSS también se correlacionó mejor con la hipointensidad de las lesiones en T1 cuando se midió la lesión más hipointensa en lugar de la media de las lesiones hipointensas ($r = 0,640, p = 0,0007$ y $r = 0,715, p < 0,0001$ con los valores de EDSS y FS respectivamente).



Figuras 16. Correlación entre el porcentaje de recuperación del brote y la hipointensidad en las secuencias ponderadas en T1. La recuperación de los brotes se expresó como porcentaje de recuperación en el EDSS después del brote. Un valor del 100% corresponde a pacientes que se recuperan completamente del brote. Para estudiar la correlación en este estudio se consideró la media de las lesiones hipointensas (T1_{media}) frente al porcentaje de recuperación en los valores de EDSS (A) o de FS (B). La correlación se realizó mediante el test de Spearman. A: $r = 0.656, p < 0.0005$. B: $r = 0.724, p < 0.0001$. (Cid *et al.*, 2002).

2.2. Correlación entre los datos clínicos de los pacientes y la apoptosis neuronal inducida en cultivos por LCR de pacientes con EM

Además, se estudió la relación entre el efecto de los LCR de pacientes con EM en cultivos neuronales y la respuesta clínica después del brote de cada paciente. En la Figura 17 se puede observar la correlación entre la recuperación de los pacientes después del brote y la apoptosis neuronal que inducen sus LCR. Hay un mayor porcentaje de mejoría en el valor de EDSS en el grupo de pacientes que tienen un LCR que induce valores bajos de apoptosis neuronal en los cultivos tratados. Esta recuperación estaba inversamente correlacionada con el porcentaje de apoptosis neuronal (Figura 17 B) ($r = -0,725$, $p < 0,0001$). La incapacidad clínica en estos pacientes se correlacionó más exactamente con la apoptosis neuronal cuando se utilizaron los valores de FS ($r = -0,743$, $p < 0,0001$) en lugar de valores de EDSS (datos no mostrados).

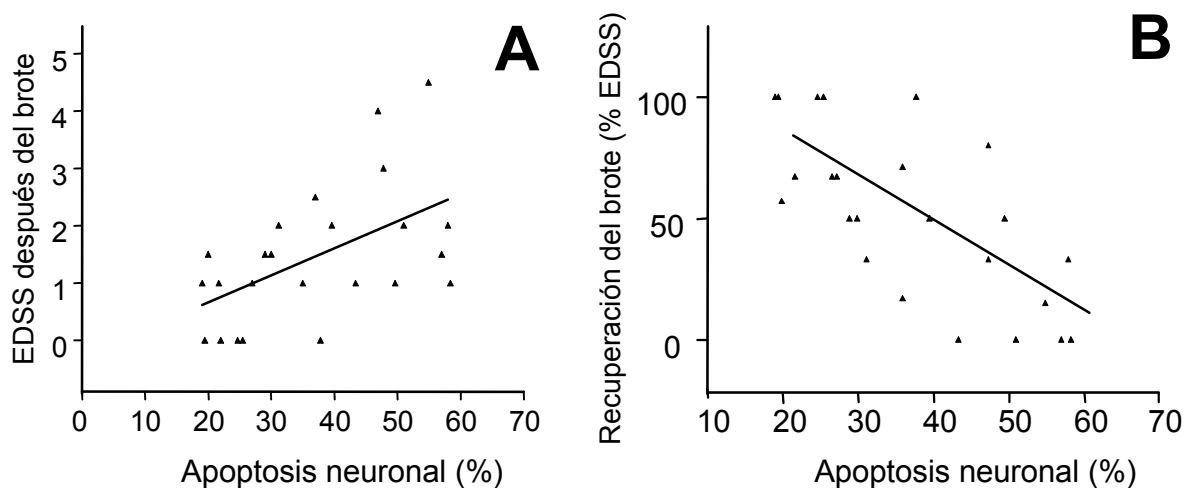


Figura 17. Correlación entre la recuperación del brote de los pacientes con EM y la apoptosis neuronal en cultivos tratados con LCR de estos pacientes. La recuperación de los brotes se expresó como puntuación en el EDSS después del brote (A) y como porcentaje de recuperación en el EDSS después del brote (B). La correlación con los porcentajes de apoptosis neuronal se realizó mediante el test de Spearman. A: $r = 0,521$, $p < 0,009$. B: $r = -0,725$, $p < 0,0001$. (Cid *et al.*, 2002).

También se estudiaron los datos bioquímicos de los LCR con el fin de identificar si existía alguna correlación con los efectos tóxicos observados en los cultivos neuronales. No se encontró ninguna correlación con los parámetros de los LCR relacionados con fenómenos inflamatorios tales como el número de células ($r = 0,280$, $p = 0,185$), el cociente de albúmina ($r = 0,022$, $p = 0,916$) o el índice de IgG ($r = 0,027$, $p = 0,897$) y la apoptosis neuronal.

2.3. Correlación entre la apoptosis neuronal inducida en cultivos por LCR de pacientes con EM y la hipointensidad de sus lesiones en T1

Dado que existe una correlación entre la recuperación del brote y el porcentaje de apoptosis inducida en el cultivo (Figura 17) y que también están correlacionados la recuperación del brote con la hipointensidad de las lesiones en T1 (Figuras 15 y 16), hemos estudiado si la hipointensidad de las lesiones en T1 y la apoptosis están correlacionadas entre sí. Los resultados de este estudio demostraron que la correlación entre la apoptosis neuronal inducida en los cultivos y la hipointensidad de la lesión en T1 fue muy elevada, no solo cuando se utilizó la hipointensidad media de las lesiones sino también cuando se utilizó la lesión más hipointensa ($r = -0,779$, $p < 0,0001$ y $r = -0,793$, $p < 0,0001$, respectivamente; Figura 18).

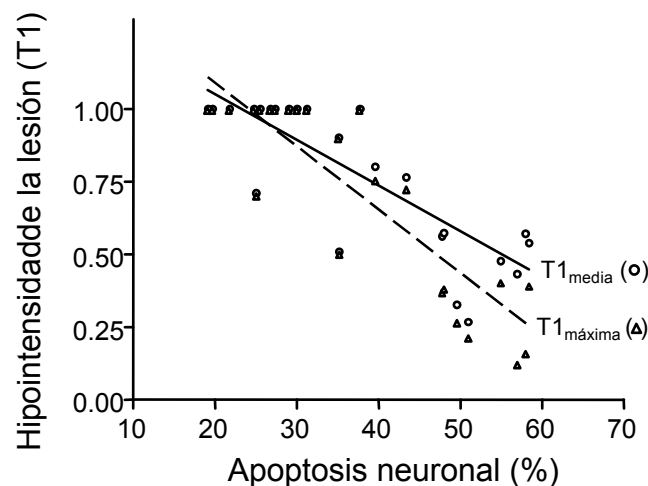


Figura 18. Correlación entre la hipointensidad de las lesiones en T1 de los pacientes con EM y la apoptosis neuronal en cultivos tratados con LCR de estos pacientes. La correlación se determinó tanto con la media de las lesiones hipointensas en T1 ($T1_{media}$; línea continua) como con la lesión más hipointensa en T1 ($T1_{máxima}$; línea discontinua). Un valor de hipointensidad de 1,0 corresponde a pacientes sin lesiones en T1. (Cid *et al.*, 2002).

Los LCR del grupo de pacientes sin lesiones en T1 (valor de hipointensidad 1,0) indujeron bajos porcentajes de apoptosis cuando se trataron con ellos los cultivos neuronales. (Figura 19 A, B y C). El grupo de pacientes con EM con lesiones en T1 moderadamente hipointensas (con valores 0,9 - 0,7) o con lesiones muy o extremadamente hipointensas (con valores 0,7 - 0,1) correspondieron a valores crecientes de apoptosis neuronal estadísticamente

significativos (*, $p < 0,05$ y ***, $p < 0,001$, respectivamente) cuando los cultivos se trataron con sus respectivas muestras de LCR (Figura 19 A, D y E).

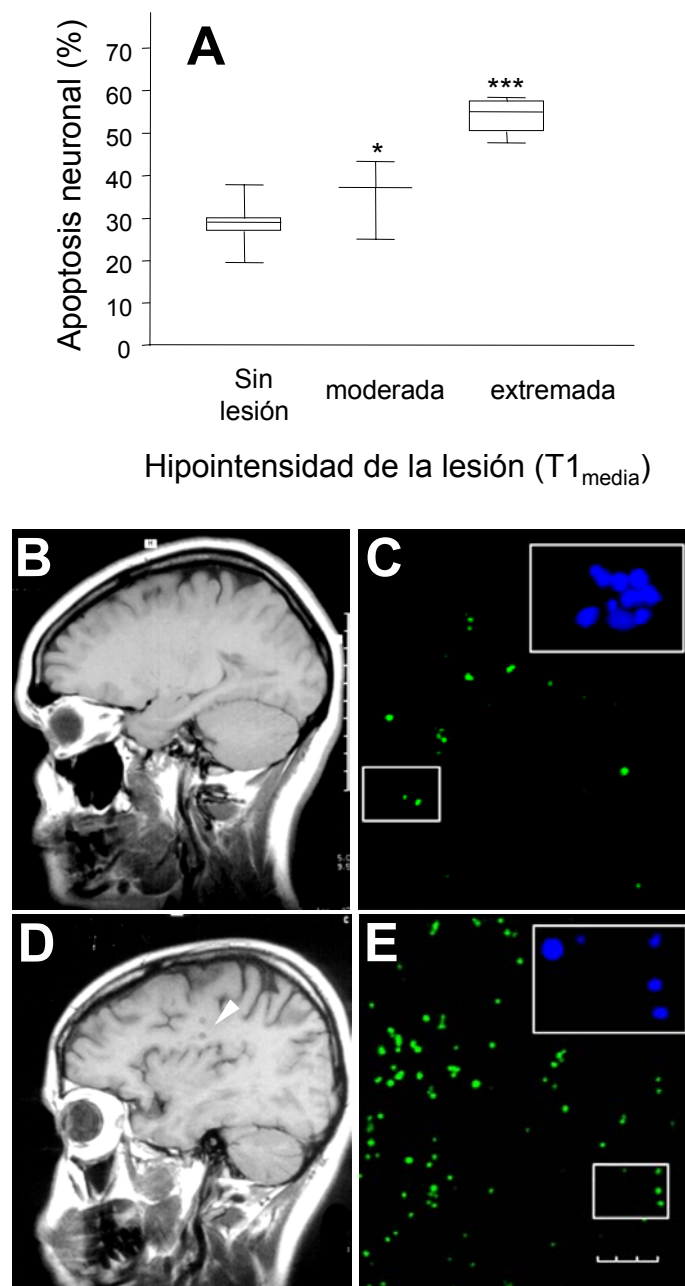


Figura 19. Los LCR de pacientes con EM con lesiones en T1 inducen apoptosis neuronal en cultivos. (A) El diagrama de cajas representa la apoptosis inducida en cultivos neuronales por LCR de pacientes con EM sin lesiones en T1 o con lesiones moderadas o con lesiones muy o extremadamente hipointensas (*, $p < 0,05$, ***, $p < 0,001$, post-test de Newman-Keuls). Las IRM sagitales realizadas en secuencias ponderadas en T1 en pacientes con EM no mostraron lesiones en 11 casos (B) y mostraron lesiones en 13 casos (D). La flecha blanca indica las lesiones hipointensas en T1 en las IRM. (C) y (E) Inducción de apoptosis en cultivos neuronales por LCR de pacientes con EM sin lesiones (C) y con lesiones (E) en T1. (C) y (E) corresponden a una imagen representativa del ensayo de apoptosis TUNEL en cada caso. (Insertos) Tinciones con Hoechst. Barra de escala, 50 μm .

2.4. Relación entre la recuperación clínica de los pacientes y la hipointensidad de sus lesiones en T1 con el daño axonal inducido por su LCR en los cultivos neuronales

Teniendo en cuenta estos resultados y la ya descrita relación existente entre la apoptosis y el daño axonal (Figura 14), se estudió la relación entre el porcentaje de recuperación en el EDSS y la hipointensidad de las lesiones de los pacientes en T1 con el daño axonal que inducían sus LCR en los cultivos neuronales (Figura 20). Según los resultados obtenidos, los pacientes con EM se agruparon en dos grupos. Uno de los grupos con pacientes con LCR que no producían daño axonal en cultivo y que se recuperaron mejor del brote (porcentaje de recuperación $71,9 \pm 7,0\%$, $p < 0,0126$), y otro grupo de pacientes cuyos LCR indujeron daño axonal en los cultivos neuronales y presentaron baja recuperación del brote (porcentaje de recuperación $34,5 \pm 9,0\%$) (Figura 20 A).

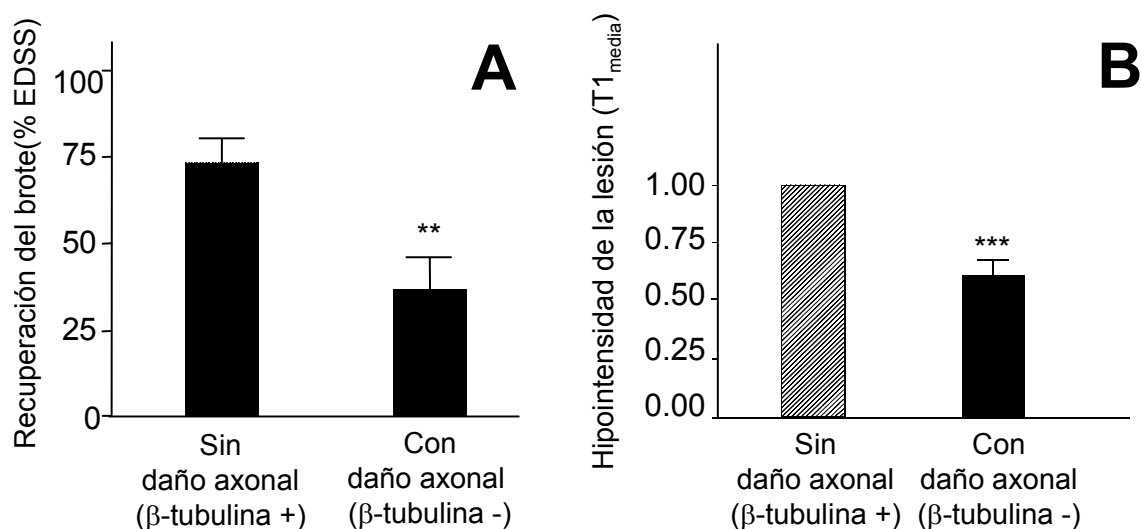


Figura 20. Relación entre la recuperación del brote de los pacientes y sus lesiones en T1 con el daño axonal que inducen sus LCR en cultivos neuronales. El daño axonal se detectó en los cultivos tratados con LCR por observación mediante microscopía confocal de neuronas marcadas con β-tubulina. (A) Comparación entre el porcentaje de recuperación del brote de los pacientes con EM cuyos LCR no inducen y si inducen daño axonal (porcentaje de recuperación $71,9 \pm 7,0$ y $34,5 \pm 9,0$ respectivamente). Un valor del 100% representa recuperación clínica completa en la escala EDSS. El análisis estadístico de comparación entre pacientes con EM se realizó mediante el test de Mann-Whitney; **, $p < 0,0126$. (B). Todos los LCR que no indujeron daño axonal correspondieron a pacientes sin lesiones en T1 (valor de hipointensidad = 1,0). Los LCR de todos los pacientes con lesiones hipointensas en T1 indujeron daño axonal en cultivos neuronales. El diagrama de barras representa la media \pm S.E.M. de los respectivos valores de hipointensidad. ***, $p < 0,005$, test de Wilcoxon.

Un resultado análogo se obtuvo al relacionar la hipointensidad de las lesiones de los pacientes en T1 con el daño axonal inducido por sus LCR en los cultivos neuronales (Figura 20 B). Los pacientes cuyos LCR no dañaban los axones de las neuronas cultivadas no presentaban lesiones en T1 mientras que los pacientes con lesiones hipointensas en T1 tenían LCR que indujeron daño axonal en cultivo.

En resumen, es importante destacar que las lesiones hipointensas en T1 sólo se encontraron en aquellos pacientes cuyos LCR inducían apoptosis neuronal y daño axonal en los cultivos significativamente elevados (Figuras 20 B y 21).

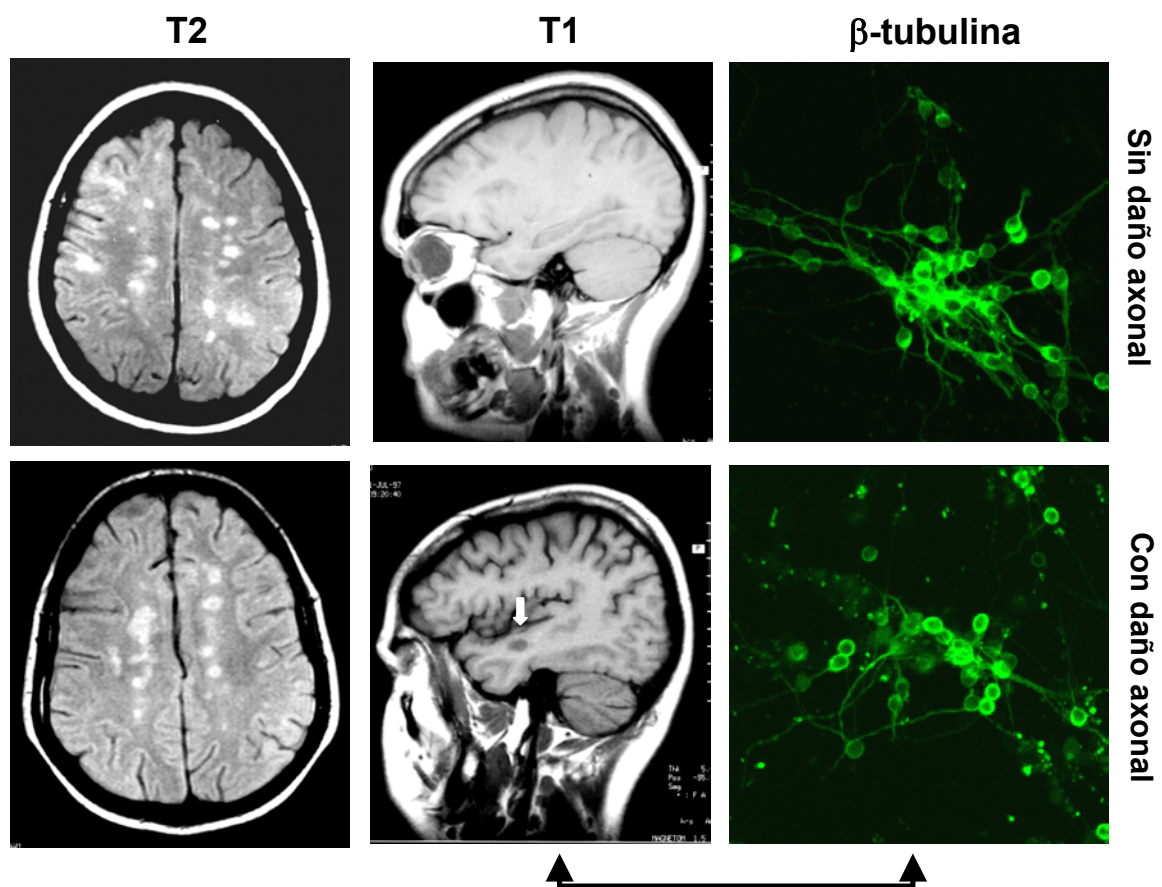


Figura 21. IRM y daño axonal inducido en cultivos neuronales tratados con LCR de pacientes con EM. Las 24 IRM realizadas mostraron lesiones hiperintensas en las secuencias ponderadas en T2 (imágenes de la izquierda). De estas, 11 no presentaron lesiones hipointensas (agujeros negros) ni captaron contraste de gadolinio en las secuencias ponderadas en T1 (imagen superior central). Las imágenes con agujeros negros (13 de las 24) correspondieron a pacientes cuyos LCR indujeron daño axonal en cultivos neuronales (imágenes inferiores). Las flechas blancas representan las lesiones hipointensas en secuencias en T1.

2.5. Inducción de apoptosis neuronal y daño axonal en cultivos por LCR de pacientes con EM con lesiones en T1

Hemos descrito anteriormente que la apoptosis inducida en cultivos neuronales por los LCR de pacientes con EM RR con mala recuperación en el valor de EDSS después del brote es significativamente mayor que la que inducen los LCR de pacientes con EM RR con buena recuperación, estando la apoptosis neuronal y la recuperación después del brote inversamente correlacionadas. Al clasificar a los pacientes estudiados según los grupos ANA y ANC, 13 pertenecerían al grupo ANA y los 11 restantes al grupo ANC (los 13 pacientes no fueron exactamente los mismos que tenían lesiones hipointensas en T1, el número es casual).

Lógicamente, al comparar los grupos ANA y ANC, se encontró una diferencia significativa en los valores de EDSS después del brote ($1,9 \pm 0,35$ y $0,86 \pm 0,22$ para los grupos ANA y ANC respectivamente, $p < 0,0363$). Así pues, los pacientes del grupo ANA presentaron mala recuperación después del brote en el valor de EDSS. También se encontraron diferencias significativas entre los dos grupos en la presencia de lesiones en T1. El 92% de los pacientes del grupo ANA (12 de los 13) presentaron lesiones en T1, con una hipointensidad media de $0,6 \pm 0,24$. Sin embargo, significativamente, sólo el 9% de los pacientes del grupo ANC (1 de 11; $p < 0,0001$) presentaron lesiones en T1, con una hipointensidad media para todo este grupo de $0,97 \pm 0,09$. Esta correlación ya se observaba en la Figura 19 en la que todos los pacientes con lesiones hipointensas graves pertenecen al grupo de pacientes ANA, puesto que inducen porcentajes de apoptosis en cultivo superiores al 33%.

Sin embargo, el análisis de las variables clínicas de los pacientes y los datos bioquímicos de los LCR no mostró diferencias significativas, utilizando el test de Mann-Whitney (Tabla II), entre los dos grupos de EM, ANA y ANC, respecto a la edad ($30,8 \pm 2,6$ años con respecto a $26,7 \pm 2,1$, $p < 0,5936$), duración de la enfermedad ($9,9 \pm 3,2$ meses con respecto a $7,8 \pm 4,9$, $p < 0,2297$), EDSS inicial ($2,9 \pm 0,5$ con respecto a $2,8 \pm 0,16$, $p < 0,56$), número de células en su LCR ($3,2 \pm 1,0$ células/ μ l con respecto a $2,3 \pm 0,7$, $p < 0,4143$), cociente de albúmina ($4,4 \pm 0,5$ con respecto a $4,8 \pm 0,8$, $p < 0,7499$) o índice de IgG ($1,16 \pm 0,16$ con respecto a $0,85 \pm 0,09$, $p < 0,2235$).

Tabla II. Comparación de las variables clínicas de los pacientes y de los datos bioquímicos de los LCR de pacientes con EM de los grupos ANA y ANC

Variable	grupo ANA (n=13)	grupo ANC (n=11)	p
Sexo (F, femenino; M, masculino)	9 F y 4 M	9 F y 2 M	
Edad (años)	30,8 ± 2,6	26,7 ± 2,1	< 0,5936
Duración enfermedad (meses)	9,9 ± 3,2	7,8 ± 4,9	< 0,2297
Cociente de albúmina	4,4 ± 0,5	4,8 ± 0,8	< 0,7499
Índice de IgG	1,16 ± 0,16	0,85 ± 0,09	< 0,2235
Nº de células(cél./µl)	3,2 ± 0,10	2,3 ± 0,7	< 0,4143
EDSS inicial	2,9 ± 0,5	2,8 ± 0,16	< 0,5600
EDSS después del brote	1,9 ± 0,35	0,86 ± 0,22	< 0,0363
Hipointensidad de la lesión (T1 _{media})	0,6 ± 0,24	0,97 ± 0,09	< 0,001
Con lesiones hipointensas en T1	12/13 (92%)	1/11 (9%)	< 0,0001

Los datos clínicos y bioquímicos de los pacientes con EM y de sus LCR se estudiaron utilizando un análisis estadístico para determinar su posible relación con los grupos de EM ANA y ANC. No se encontraron diferencias significativas entre los dos grupos excepto en el EDSS después del brote y en la hipointensidad de las lesiones en T1. Los datos se expresan como media ± S.E.M. El análisis estadístico se realizó con el test de Mann-Whitney, excepto en el análisis de la proporción de pacientes con lesiones hipointensas en T1 en el que se utilizó el test de Fisher (entre paréntesis el porcentaje de esta proporción).

3. CARACTERIZACIÓN DEL FACTOR NEUROTÓXICO DEL LCR CAUSANTE DEL DAÑO NEURONAL

Con el objetivo de identificar la naturaleza del factor tóxico que contienen los LCR de pacientes con EM se realizaron una serie de experimentos en los que se estudiaron 15 LCR de pacientes con EM y 13 LCR controles.

3.1. Inactivación del complemento y adsorción de inmunoglobulinas

El sistema de complemento tiene un papel fundamental en los mecanismos de defensa contra agentes infecciosos y en el proceso inflamatorio. Está formado por una treintena de proteínas plasmáticas, algunas de las cuales crean canales transmembranales dando lugar a la lisis osmótica de las células. Ante la posibilidad de que el efecto neurotóxico de los LCR de pacientes con EM estuviera mediado por estas proteínas, se intentaron inactivar por calor. Es conocido que los componentes C1 y C2 del complemento se desnaturalizan calentándolos 3 minutos a 56°C, mientras que los componentes C3, C4 y el complejo C5b9 se desnaturalizan a 56°C durante 30 minutos.

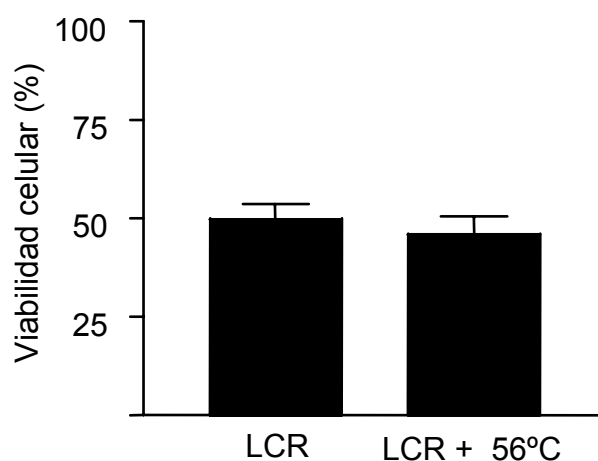


Figura 22. Tratamiento térmico del LCR. El tratamiento a 56°C de LCR de pacientes con EM del grupo ANA no aumentó la viabilidad neuronal medida con el ensayo de MTT, lo cual demuestra que la activación del complemento no es causante de la neurotoxicidad del LCR. Las barras indican la media \pm S.E.M. de los valores obtenidos con tres LCR diferentes de pacientes con EM.

El tratamiento a 56°C durante 30 minutos de LCR de pacientes con EM del grupo ANA no aumentó la viabilidad neuronal medida con el ensayo de MTT cuando los cultivos se

trataron con estos LCR, con respecto a la viabilidad de los cultivos tratados con los mismos LCR sin calentar. Con este ensayo se demuestra que la activación del complemento no es causante de la neurotoxicidad del LCR (Figura 22).

De todas las anomalías inmunológicas descritas en la EM, la más frecuente se refiere a las inmunoglobulinas en el LCR, por lo que tradicionalmente se ha supuesto que la inmunidad humoral desempeña un papel principal en su patogenia. Para comprobar si estas proteínas estaban involucradas en la neurotoxicidad de los LCR, se eliminaron por adsorción. Las IgM e IgG se retiraron de los LCR con IgG (conejo) anti-IgM humana y proteína A-sefarosa y con proteína G-sefarosa respectivamente. Su eliminación, que se comprobó mediante electroforesis (Figura 23 A), no disminuyó el efecto neurotóxico del LCR en los cultivos neuronales (Figura 23 B). Así pues, tampoco las inmunoglobulinas son causantes de la neurotoxicidad de los LCR.

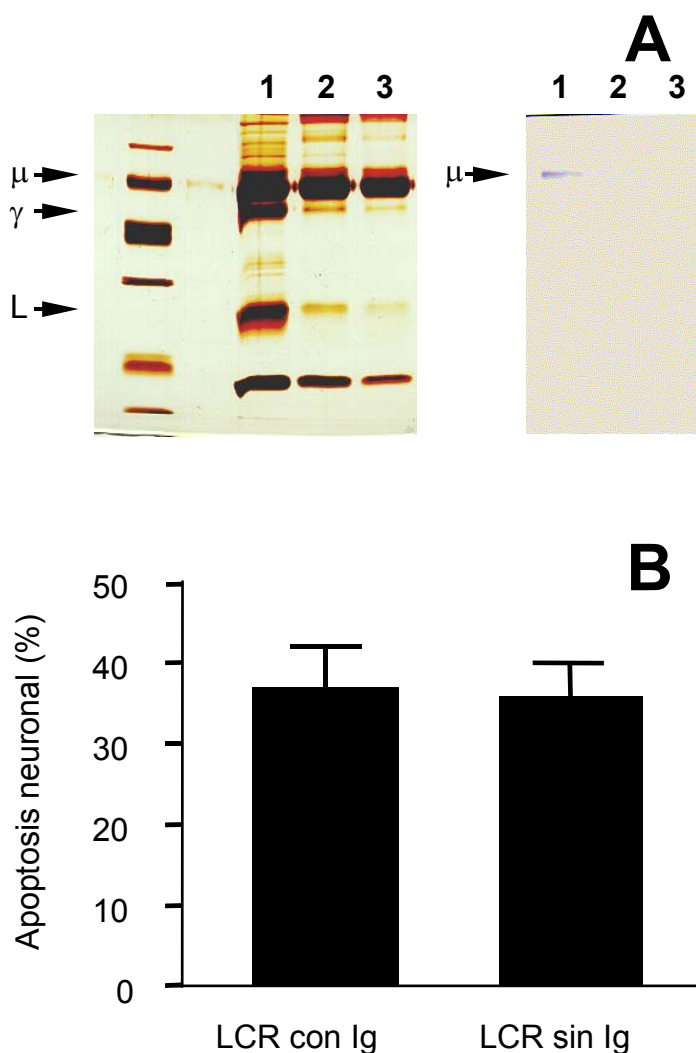


Figura 23. Inmunoprecipitación de IgM e IgG del LCR. La inmunoprecipitación de IgM y posterior adsorción de éstas y de las IgG humanas de los LCR con proteína A/G-sefarosa se comprobó mediante electroforesis con SDS y tinción con plata (A) o transferencia e inmunodetección con IgG (conejo) anti-IgM (humana) y proteína A fosfatasa alcalina respectivamente. (B) Línea 1, LCR completo; líneas 2 y 3, LCR sin inmunoglobulinas G y M (Ig). Los marcadores de peso molecular son de 94, 67, 43, 30, 20,1 y 14 kDa. La inmuno-precipitación de IgG e IgM de los LCR de pacientes con EM RR del grupo ANA no disminuyó su efecto neurotóxico medido como porcentaje de apoptosis neuronal inducida en el cultivo (C). Las barras indican la media \pm S.E.M. de los valores obtenidos con cuatro LCR de pacientes con EM diferentes.

3.2. Análisis de péptidos inductores de apoptosis

Entre los compuestos relacionados con la EM se encuentran diversos péptidos tales como TNF- α (Sharief *et al.*, 1991) o bloqueantes de los canales de sodio como el pentapéptido QYNAD (Brinkmeier *et al.*, 2000). Considerando que alguno de ellos podría ser inductor de apoptosis y daño axonal en nuestros cultivos, se investigó la presencia de estas moléculas en los LCR de pacientes con EM del grupo ANA mediante HPLC en fase reversa de forma análoga a como se analizaron los LCR (ver apartado 3.5.). El TNF- α eluyó en la fracción 10, que no resultó ser tóxica en los LCR (ver figura 28). El pentapéptido QYNAD eluyó en la fracción número 7, que sí fue una fracción tóxica de los LCR. Sin embargo, al realizar un estudio de toxicidad dosis-respuesta del pentapéptido QYNAD para determinar si era inductor de apoptosis en los cultivos neuronales, los resultados demostraron que este péptido no era neurotóxico en dosis de hasta 50 μM (Figura 24), a pesar de que se había descrito que su efecto como bloqueante de los canales de sodio se manifiesta a una concentración de 10 μM (Brinkmeier *et al.*, 2000).

En conclusión, los resultados obtenidos demuestran que ninguno de estos péptidos son causantes de neurotoxicidad en los cultivos neuronales.

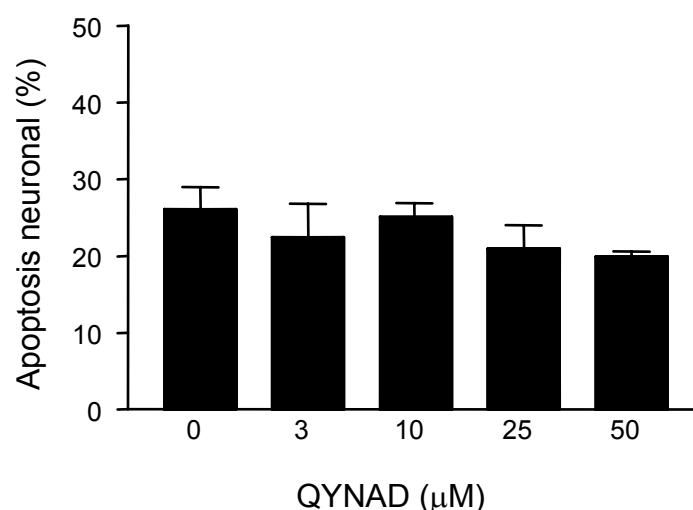


Figura 24. Inducción de apoptosis por el pentapéptido QYNAD. Los datos de apoptosis representan la media \pm S.E.M. de los valores obtenidos con tres experimentos diferentes.

3.3. Análisis de glutamato

Se ha descrito que el exceso de glutamato extracelular puede ser uno de los factores neurotóxicos implicados en diversas enfermedades neurodegenerativas incluida la EM, y también se ha demostrado recientemente la excitotoxicidad del glutamato en un modelo de EAE (Pitt *et al.*, 2000) y en cultivos de oligodendrocitos humanos (Pitt *et al.*, 2003). En este estudio, hemos analizado por HPLC la concentración de glutamato en el LCR de los pacientes, encontrando unos niveles de 2 μM . Además, hemos determinado mediante los ensayos de MTT y TUNEL que este aminoácido es inductor de apoptosis en nuestro modelo experimental a partir de 6 μM (Figura 25).

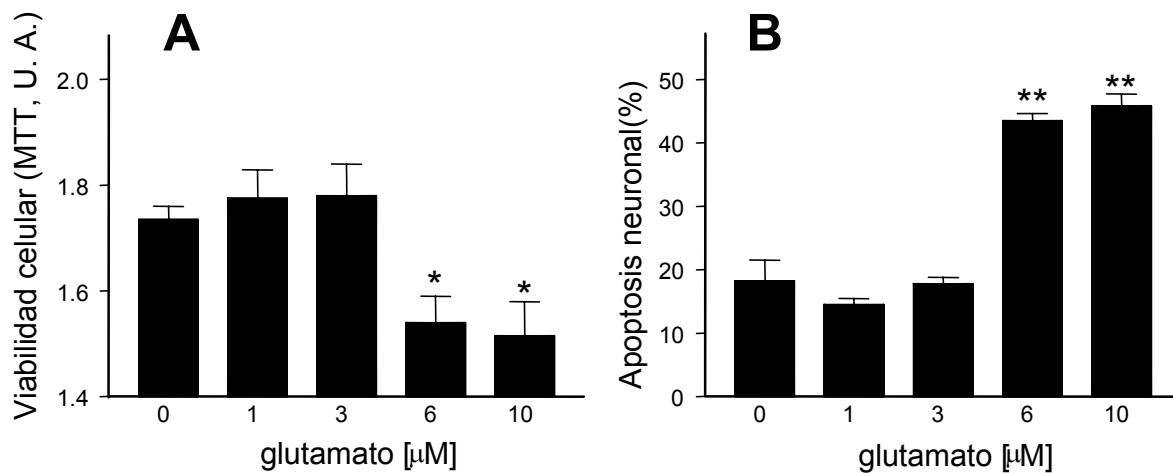


Figura 25. Viabilidad y apoptosis de neuronas corticales en cultivo después del tratamiento con concentraciones crecientes de glutamato. (A) La viabilidad celular se evaluó utilizando el ensayo de MTT. (B) Apoptosis inducida por glutamato. Los datos representan la media \pm S.E.M. de tres a seis experimentos llevados a cabo por duplicado. Las diferencias estadísticas se estudiaron por el test de ANOVA y el post test de Dunnett (*, $p < 0,05$ y **, $p < 0,01$ con respecto a las células sin tratar).

Este efecto tóxico del glutamato 6 μM se inhibió en presencia de NBQX (2,3-dihidroxi-6-nitro-7-sulfamoil-benzo(f)quinoxalina-2,3-diona), un antagonista del receptor de glutamato AMPA (Ácido α -amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazol-propiónico)/kainato (Figura 26), demostrando que la inducción de apoptosis por glutamato en los cultivos neuronales es a través de estos receptores. Así pues, el factor neurotóxico implicado en la EM no parece ser el glutamato libre.

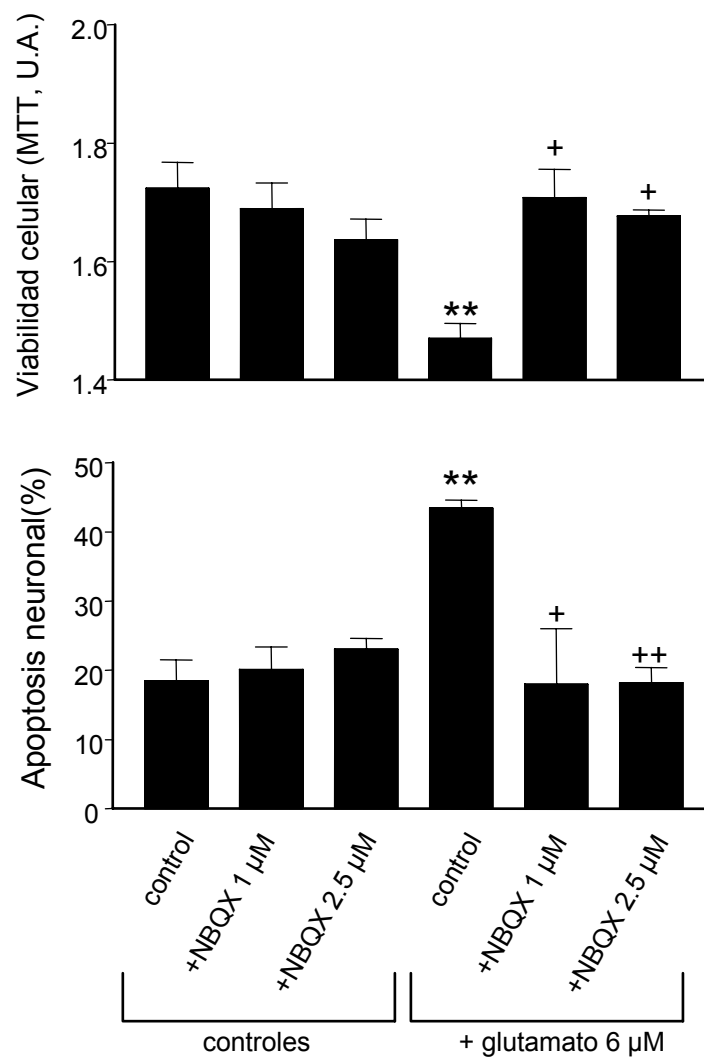


Figura 26. Viabilidad neuronal y apoptosis tras la exposición al antagonista de glutamato NBQX en cultivos tratados con glutamato. El NBQX protegió de la toxicidad del glutamato 6 μ M, sin afectar a las células control. Los datos representan la media \pm S.E.M. de tres experimentos llevados a cabo por duplicado. Las diferencias estadísticas se estudiaron por el test de ANOVA y el post test de Dunnett (**, $p < 0,01$ con respecto a las células control; +, $p < 0,05$ y ++, $p < 0,01$ con respecto a las células tratadas con glutamato).

3.4. Aislamiento del factor tóxico por exclusión molecular

Los LCR de pacientes con EM RR del grupo ANA y de pacientes control se filtraron a través de una membrana con una exclusión molecular de 30 kDa. Con este tipo de membranas se pueden aislar moléculas análogas al TNF- α que se han relacionado con la patología de la EM. Las fracciones filtradas (con moléculas menores de 30 kDa) y las retenidas (mayores de

30 kDa) se usaron en el tratamiento del cultivo neuronal. Los resultados indicaron que el factor neurotóxico se encontraba en la fracción menor de 30 kDa. (Figura 27).

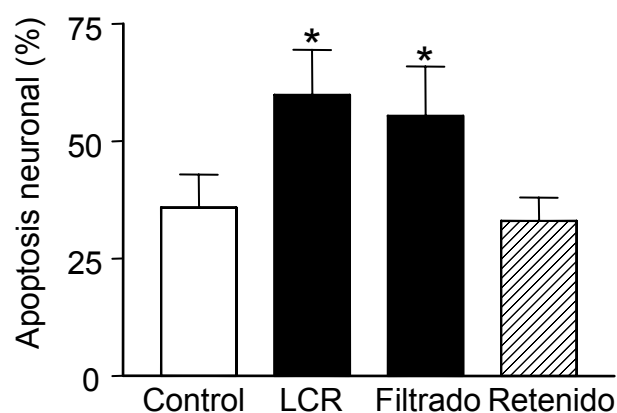


Figura 27. Fraccionamiento del LCR. La neurotoxicidad de la fracción menor de 30 kDa se midió por el porcentaje de apoptosis neuronal inducida en el cultivo. Control, cultivo sin tratamiento; LCR, cultivo tratado con el LCR sin fraccionar; Filtrado, cultivo tratado con la fracción menor de 30 kDa del LCR filtrado; Retenido, cultivo tratado con la fracción mayor de 30 kDa del LCR anterior. Las barras indican la media \pm S.E.M. de los valores obtenidos con tres LCR de pacientes con EM diferentes. *, $p < 0,05$ con respecto al control.

3.5. Aislamiento del factor tóxico por HPLC y análisis por espectrometría de masas

La fracción del LCR menor de 30 kDa se analizó por HPLC con una columna de fase reversa μ RPC C2/C18 (este tipo de columna es muy adecuado para la separación de péptidos y proteínas pequeñas de tamaños comprendidos entre 3 y 30 kDa) y con gradiente de acetonitrilo 0-90% en condiciones ácidas (ácido trifluoroacético 0,1%). Se recogieron fracciones de 1 ml y se desecaron a vacío hasta su evaporación completa. Se resuspendieron en 200 μ l de agua y se esterilizaron por filtración. Cada una de ellas se ensayó en el cultivo neuronal. Sólo tres de las fracciones (las denominadas 2, 3 y 7) indujeron apoptosis en el cultivo. La fracción 2 fue tóxica tanto en las muestras procedentes de los LCR de EM, como de pacientes control (Figura 28).

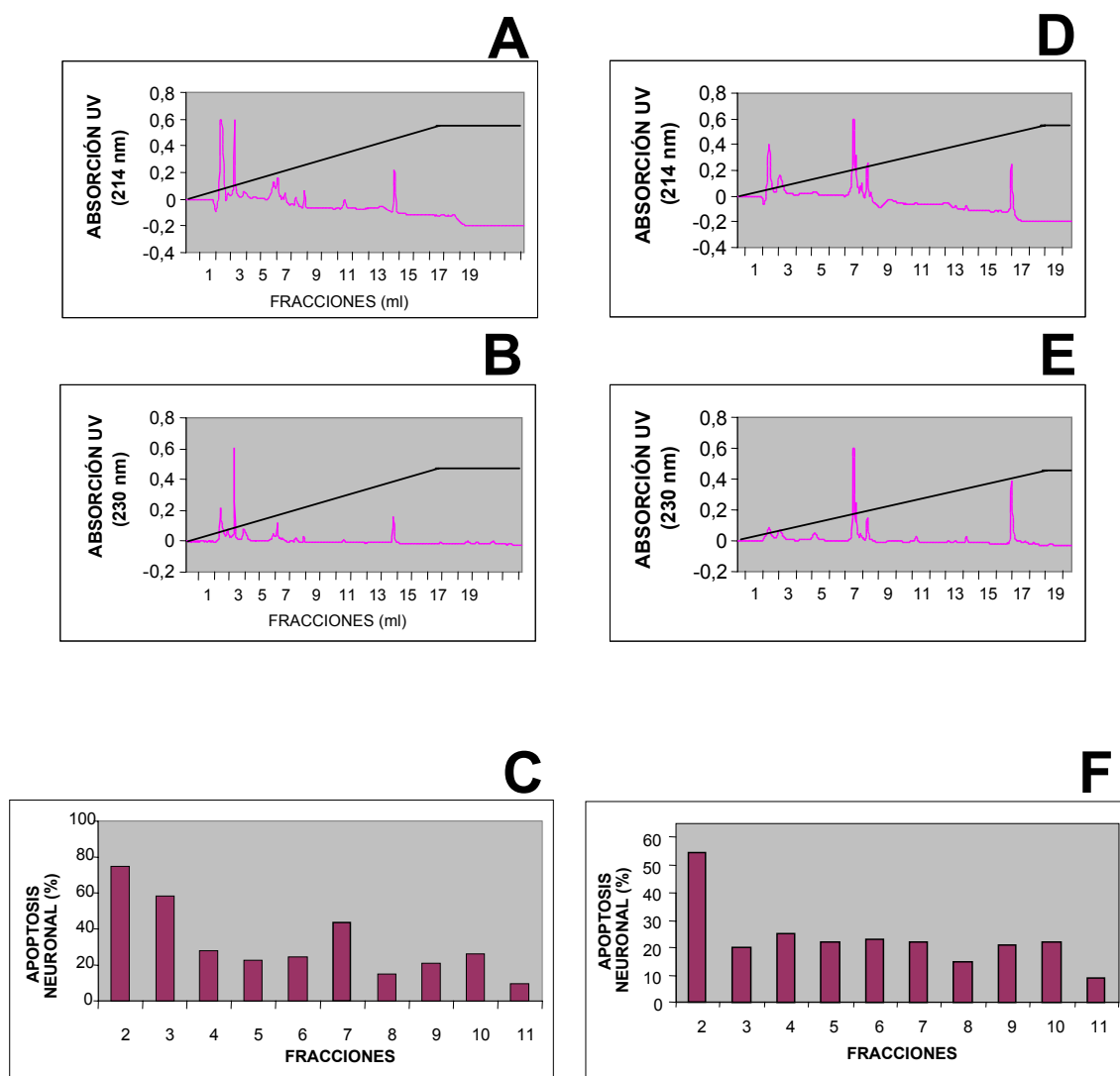


Figura 28. Cromatografía de los LCR. Las fracciones de LCR menores de 30 kDa procedentes de LCR de pacientes con EM del grupo ANA (A, B, C) y de pacientes control (D, E, F) se cromatografiaron en una columna de fase reversa (A, B, D, E). Las fracciones obtenidas se ensayaron en cultivo cuantificando la apoptosis neuronal (C, F).

Sin embargo, la fracción 3 fue tóxica en todos los LCR de pacientes con EM del grupo ANA que se ensayaron en el cultivo. La fracción 7 del LCR también indujo elevados porcentajes de apoptosis.

Al correlacionar la apoptosis que inducen los LCR de pacientes con EM de los grupos ANA y ANC en los cultivos neuronales con el área del pico correspondiente a la fracción 3, se observó que esta fue significativa, siendo el área mayor en los cromatogramas de los LCR que producían mayores porcentajes de apoptosis en los cultivos (Figura 29).

Por último, las fracciones tóxicas de los LCR (fracciones 3 y 7) se analizaron por espectrometría de masas MALDI-ToF. No se detectó ningún pico significativo en los espectros obtenidos con diferentes matrices (ácido α -cianocinámico y ácido dihidroxibenzoico). El factor tóxico fue indetectable por esta técnica, realizada tanto en modo positivo como negativo.

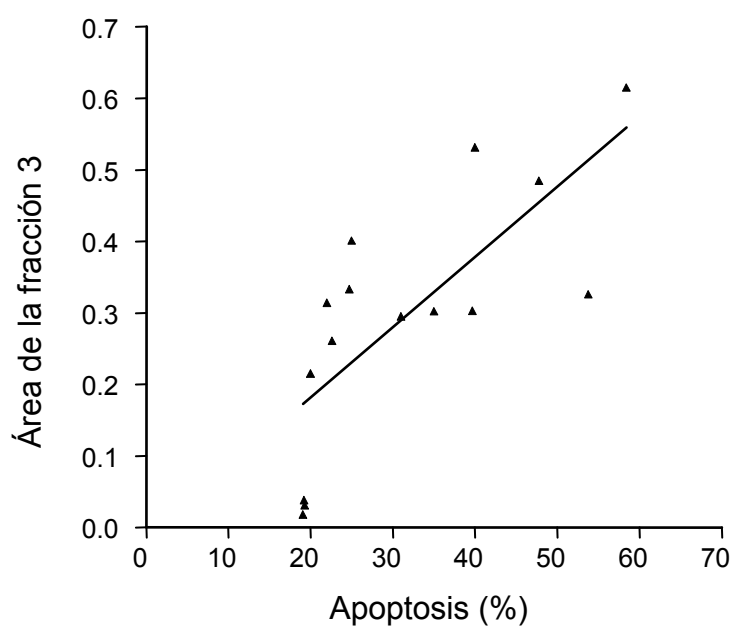


Figura 29. Correlación entre el área de la fracción 3 aislada por cromatografía y la apoptosis inducida en el cultivo por el LCR. Cada dato representa la media de 2-3 cromatogramas ($r = 0,7487$, $p < 0,0013$). Las barras de error se han omitido para simplificar la gráfica.

4. MECANISMO DE INDUCCIÓN DE APOPTOSIS

Puesto que se ha demostrado la muerte por apoptosis en los cultivos neuronales tratados con LCR de pacientes con EM RR del grupo ANA, y que este efecto está relacionado con la clínica de los pacientes, hemos considerado de interés profundizar en este estudio con un doble objetivo, por una parte para encontrar el mecanismo mediante el cual mueren las neuronas tratadas y por otra parte para estudiar su posible protección. Para alcanzar ambos objetivos, se ha estudiado la actividad de las caspasas implicadas en la muerte por apoptosis de los cultivos neuronales tratados con LCR de pacientes con EM, teniendo en cuenta que estas proteínas son esenciales en la regulación de la apoptosis.

En estos experimentos se utilizaron mezclas de LCR, para conseguir cantidades suficientes de LCR de cada grupo. Así, los LCR estudiados en estos experimentos se reunieron en tres categorías: LCR del grupo ANA, LCR del grupo ANC y LCR de pacientes controles OEN y se determinaron las actividades caspasas que se inducían en los cultivos por cada uno de estos grupos de LCR reunidos.

La actividad de estas proteasas se cuantificó *in vitro* mediante la utilización de sustratos e inhibidores selectivos. Las caspasas son proteasas muy específicas, con un requerimiento inusual y absoluto de hidrolizar detrás de aspártico. También es necesario el reconocimiento de una zona de cuatro aminoácidos que son diferentes dependiendo de cada caspasa, lo cual explica la diversidad de sus funciones biológicas. Son tan específicas que no todas las proteínas que contengan la secuencia óptima del tetrapéptido son catalizadas, lo cual implica que la estructura terciaria también influye en el reconocimiento del sustrato (Thornberry y Lazebnik, 1998). Gracias a estos requerimientos estructurales de los sustratos de las caspasas, se han podido diseñar sustratos e inhibidores específicos para cada caspasa que constituyen útiles herramientas para su estudio.

Así pues, los sustratos permeables a las membranas celulares que se utilizan en los ensayos de actividad de estas caspasas están formados por tetrapéptidos análogos a sus sustratos endógenos (YVAD, DEVD, IETD y LEHD para las caspasas 1, 3, 8 y 9 respectivamente), marcados con moléculas fluorescentes tales como la 7-amino-4-trifluorometil cumarina (afc) y la 7-amino-4-metil cumarina (amc). Cuando una caspasa determinada hidroliza el enlace entre la molécula fluorescente y el tetrapéptido, se emite una radiación de fluorescencia que permite su detección y cuantificación.

Por el contrario, existen derivados de estos tetrapéptidos que se utilizan como inhibidores irreversibles de caspasas. En su extremo N-terminal están unidos a moléculas

como Z (N-bencil-oxi-carbonil) que permiten su paso a través de las membranas celulares, mientras que en el extremo C-terminal tienen radicales con iones haluro como la clorometil-cetona (cmk) o fluorometil-cetona (fmk), gracias a los cuales la caspasa se une mediante un enlace covalente que la inactiva de forma irreversible (Nicholson y Thornberry, 1997).

4.1. Estudio de actividad de las caspasas 1 y 3

La caspasa 1 está especialmente involucrada en el proceso inflamatorio ya que regula la salida extracelular de citoquinas proinflamatorias tales como IL-1 β e IL-18. Los niveles de RNAm de la caspasa 1 están correlacionados con la actividad de la enfermedad en pacientes con EM (Furlan *et al.*, 1999). Además, la transcripción de la caspasa 1 se induce y está correlacionada con las tasas de transcripción de las citoquinas proinflamatorias TNF- α , IL-1 β , IFN- γ e IL-6 en la EAE. Puesto que algunas de estas citoquinas también tienen acciones proapoptóticas, hemos intentado comprobar si existía una relación directa entre la activación de la caspasa 1 y la muerte neuronal inducida por LCR. Por otra parte, hemos estudiado la posible activación de la caspasa 3 puesto que ésta es la caspasa responsable de llevar a cabo la ejecución de la apoptosis.

En nuestros cultivos, los ensayos de actividad de las caspasas 1 y 3 se realizaron utilizando los sustratos específicos para ambas, Ac-YVAD-amc y Ac-DEVD-amc, respectivamente. Los resultados obtenidos demostraron que la actividad de la caspasa 1 medida en los lisados celulares de neuronas tratadas con LCR de los pacientes con EM RR del grupo ANA fue baja o indetectable (Figura 30 A). Sin embargo, la actividad de la caspasa 3 aumentó significativamente en las neuronas tratadas con LCR de este grupo de pacientes con respecto a los controles ($p < 0.01$; Figura 30 B). La caspasa 3 presentó un aumento en su actividad muy notable, llegando a valores de hasta 15.000 unidades de fluorescencia a las dos horas. Además, la actividad de la caspasa 3 es mucho mayor que la de la caspasa 1, teniendo en cuenta la diferencia de escala entre ambas gráficas (Figura 30). Los valores de actividad de ambas caspasas correspondientes al grupo de EM ANC fueron muy próximos a los realizados con cultivos neuronales tratados con LCR del grupo OEN. También los experimentos control realizados con cultivos neuronales sin tratar dieron resultados similares a los obtenidos con este grupo.

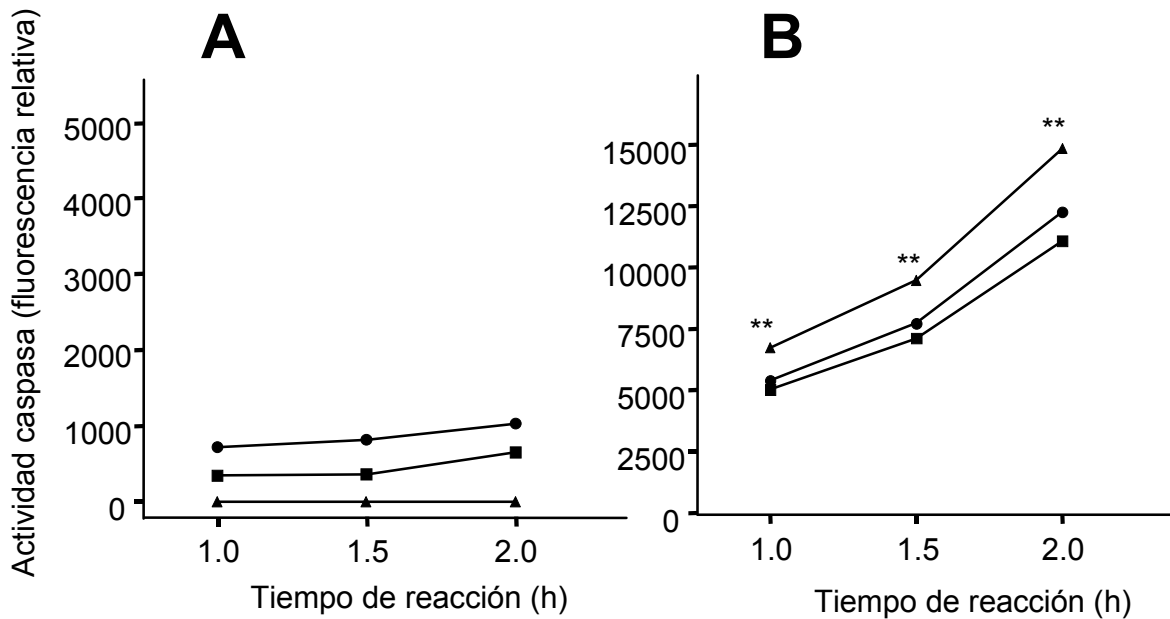
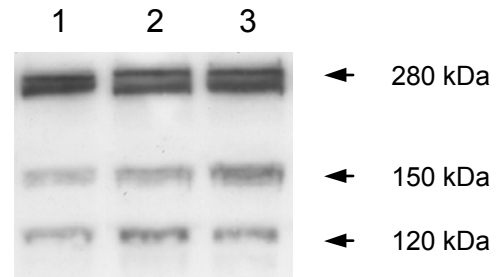


Figura 30. Ensayo de actividad de las caspasas 1 y 3 en cultivos neuronales tratados con LCR de pacientes con EM. Actividad caspasa inducida en los cultivos neuronales tratados con LCR de pacientes con EM de los grupos ANA (▲), ANC (■) y de pacientes control OEN (●), ensayando lisados celulares (25 μ g) procedentes de estos cultivos con los sustratos Ac-YVAD-amc (A) y Ac-DEVD-amc (B) (50 μ M), específicos para las caspasas 1 y 3 respectivamente. El LCR de los pacientes del grupo ANA indujo un aumento de actividad caspasa 3 en los cultivos neuronales en comparación con los LCR de pacientes de los grupos ANC y OEN. **, $p < 0,01$ con respecto a la actividad de las células tratadas con LCR del grupo control OEN utilizando ANOVA y post test de Dunnet. (Modificado de Cid *et al.*, 2003b).

4.2. Detección de activación *in vivo* de la caspasa 3 por fragmentación de α -espectrina

Una vez demostrada la activación *in vitro* de la caspasa 3 mediante la utilización de un sustrato específico como es el Ac-DEVD-amc, intentamos comprobar si éste fenómeno se podría haber llevado a cabo en el cultivo *in vivo* al tratarlo con LCR de pacientes del grupo ANA. Con este objetivo, se estudió la degradación de un sustrato endógeno de esta caspasa como es la proteína del citoesqueleto celular α -espectrina o fodrina (Figura 31). Los cultivos neuronales se trataron con LCR y posteriormente se lisaron las células como se indica en Materiales y Métodos. Estos lisados se sometieron a electroforesis, transferencia e inmunodetección con un anticuerpo monoclonal anti- α -espectrina. Esta proteína de 280 kDa se puede fragmentar por la caspasa 3, y genera fragmentos de 150 y 120 kDa, siendo el fragmento de 120 kDa específico de la actividad de esta caspasa (Nath *et al.*, 1996).

Figura 31. Detección de la actividad caspasa 3 inducida *in vivo* por tratamiento con LCR de pacientes con EM sobre un sustrato endógeno. Lisados celulares de neuronas tratadas con LCR del grupo ANC (1), del grupo ANA (2) y de pacientes control OEN (3) analizados por inmunodetección con anti- α -espectrina. El fragmento de 120 kDa es específico de la actividad proteolítica de la caspasa 3 sobre la α -espectrina.



La calpaína, una cistein-proteasa dependiente de calcio, se activa en ciertas condiciones patológicas normalmente asociadas con la necrosis. Esta proteasa origina fragmentos de α -espectrina de 150 y de 145 kDa. En nuestros lisados celulares no hemos detectado el fragmento de 145 kDa, lo cual indica que la calpaína no se activa al tratar las neuronas con LCR de pacientes con EM.

4.3. Estudio de actividad de las caspasas 8 y 9

Con el objetivo de identificar cuál es la caspasa iniciadora que activa a la caspasa 3, se determinó la posible actividad *in vitro* de las caspasas 8 y 9 inducida en los cultivos neuronales tratados con LCR de pacientes con EM de los grupos ANA, ANC y de controles OEN. Se ensayaron lisados celulares (25 μ g de proteína) procedentes de estos cultivos mediante un ensayo fluorimétrico basado en la hidrólisis de los sustratos Ac-IETD-afc y Ac-LEHD-afc (50 μ M), específicos para las caspasas 8 y 9, respectivamente.

También se realizaron controles positivos de activación de estas caspasas tratando los cultivos neuronales con actinomicina D (2 μ g/ml durante 19 horas), en las mismas condiciones en que se realizaron los tratamientos con LCR. Son conocidas las características proapoptóticas de la actinomicina D, que se considera un inhibidor de la transcripción de RNA. El tratamiento de cultivos celulares con actinomicina D disminuye los niveles de proteínas esenciales e inhibe la síntesis de proteínas inhibitorias de la apoptosis neuronal espontánea (Wertz y Hanley, 1996).

Los resultados obtenidos mostraron que la actividad de la caspasa 8 medida en los lisados celulares fue muy baja o indetectable (Figura 32 A).

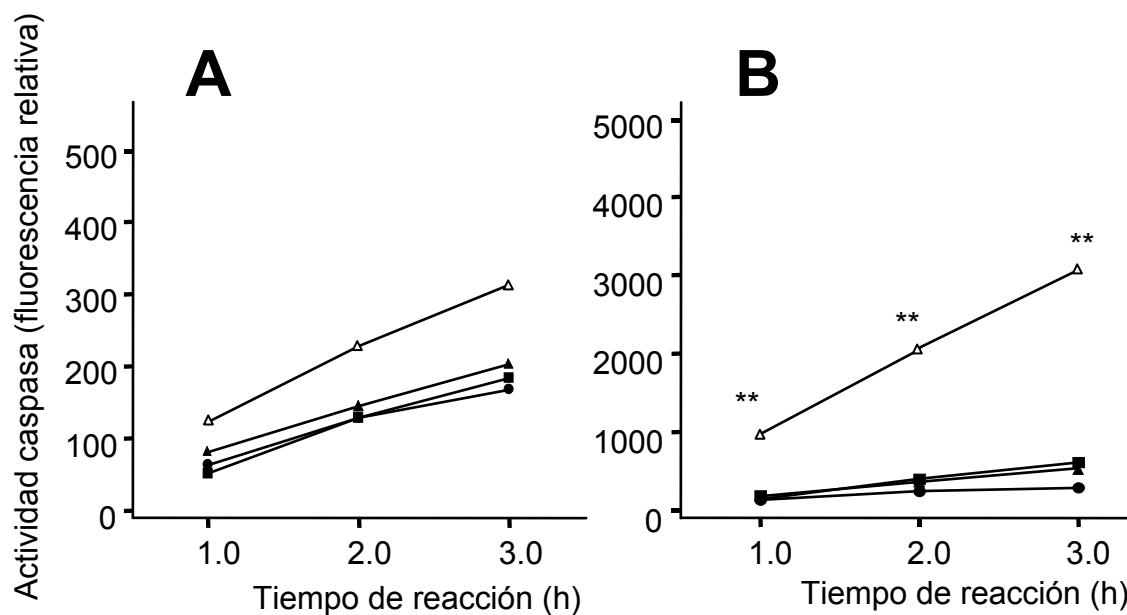


Figura 32. Ensayo de actividad de las caspasas 8 y 9 en cultivos neuronales tratados con LCR de pacientes con EM. Actividad caspasa inducida en los cultivos neuronales tratados con LCR de pacientes con EM de los grupos ANA (▲), ANC (■) y OEN (●), o con actinomicina D (Δ) ensayando lisados celulares (25 μ g) procedentes de estos cultivos con los sustratos Ac-IETD-afc (A) y Ac-LEHD-afc (B) 50 μ M, específicos para las caspasas 8 y 9 respectivamente. **, $p < 0,01$ con respecto a la actividad de las células tratadas con LCR del grupo control OEN utilizando ANOVA y post test de Dunnet.

Los LCR de los pacientes con EM indujeron un ligero aumento de actividad caspasa 9 en los cultivos neuronales en comparación con los LCR de pacientes control OEN (Figura 32 B). Sin embargo, los resultados obtenidos en este ensayo (con valores de 400 unidades de fluorescencia a las dos horas) son mucho menores que los obtenidos con actinomicina D (Figura 30 B).

Además, los lisados celulares de neuronas tratadas con LCR se analizaron por electroforesis y posterior inmunodetección incubando con anticuerpos anti-caspasa 8 (Figura 33) y anti-caspasa 9 (Figura 34).

La caspasa 8 está en las células en forma de procaspasa de 55 kDa. Cuando se hidroliza, origina la caspasa activa de 18 kDa. En el ensayo de inmunodetección realizado incubando lisados celulares de cultivos neuronales tratados con LCR con anticuerpos anti-caspasa 8 tampoco se pudo detectar el fragmento de 18 kDa correspondiente a la caspasa 8 activa. En estos experimentos se realizaron controles positivos utilizando diversas moléculas que tienen una conocida actividad proapoptótica. La caspasa 8 se activa en respuesta a factores que actúan sobre los receptores de muerte de las células como el TNF- α , así pues los controles positivos de caspasa 8 se realizaron tratando los cultivos neuronales con este

compuesto en concentraciones de 0,2 $\mu\text{g/ml}$ durante 3 horas. Por otra parte, la caspasa 9 está en las células en forma de procaspasa de 50 kDa que se hidroliza dando lugar a la caspasa activa de 36 kDa. Los resultados obtenidos con estos experimentos detectaron el fragmento de 36 kDa que demuestra la activación de la caspasa 9 en los cultivos neuronales tratados con LCR de pacientes con EM del grupo ANA. La caspasa 9 se activa por la vía mitocondrial, y la ceramida, un segundo mensajero implicado en la señalización de la apoptosis que interrumpe el transporte electrónico en la mitocondria, activa a esta caspasa. Los controles positivos de activación de caspasa 9 se obtuvieron por tratamiento de los cultivos con ceramida 2 $\mu\text{g/ml}$ durante 3 horas.

Figura 33. Detección de caspasa 8 activada. Lisados celulares de neuronas tratadas con LCR de pacientes de los grupos OEN (línea 1), de pacientes con EM del grupo ANA (línea 2) y ANC (línea 3) y con $\text{TNF-}\alpha$ (0,2 $\mu\text{g/ml}$) como control positivo (línea 4), se analizaron por electroforesis y posterior inmunodetección incubando con anti-caspasa 8. La figura muestra el fragmento de 18 kDa de la pro-caspasa 8 (55 kDa) correspondiente a la caspasa 8 activada.

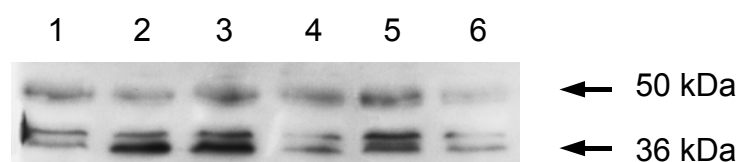
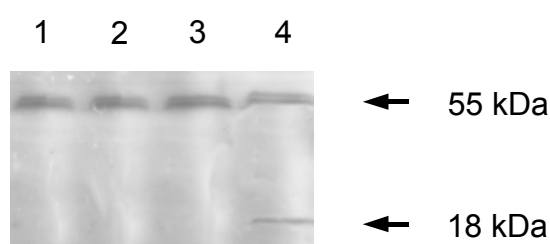


Figura 34. Detección de caspasa 9 activada. Lisados celulares de neuronas tratadas con LCR de pacientes de los grupos OEN (línea 1) y de pacientes con EM del grupo ANA (líneas 2, 3) y ANC (línea 4), con ceramida como control positivo (2 $\mu\text{g/ml}$) (línea 5) y sin tratamiento (línea 6), se analizaron por electroforesis y posterior inmunodetección incubando con anti-caspasa 9. La figura muestra el fragmento de 36 kDa de la pro-caspasa 9 (50 kDa) correspondiente a la caspasa 9 activada.

4.4. Protección de la apoptosis neuronal inducida por LCR de pacientes con EM por inhibidores de caspasas

Para determinar si era posible proteger a las neuronas de la muerte inducida por LCR, se trataron en primer lugar con los inhibidores de caspasas 1 y 3 Ac-YVAD-cmk y Ac-DEVD-cmk. Las dosis utilizadas en nuestro estudio se determinaron previamente por una serie de ensayos dosis-respuesta en los que se examinaron los efectos de los inhibidores sobre la viabilidad celular y la actividad caspasa 3 en neuronas control cultivadas. Puesto que dosis altas de inhibidores resultaron tóxicas en los ensayos de MTT, y las dosis más bajas no fueron capaces de inhibir la actividad caspasa 3, se eligió una dosis de 25 $\mu\text{g/ml}$ para utilizar en los experimentos. Tanto Ac-YVAD-cmk como Ac-DEVD-cmk inhibieron la actividad caspasa 3 en los lisados celulares de cultivos neuronales tratados con LCR de EM en unos porcentajes de $53 \pm 7\%$ y $96 \pm 1\%$ respectivamente. Aunque Ac-YVAD-cmk es un inhibidor de la caspasa 1, también inhibió parcialmente a la caspasa 3 (Figura 35 A). Es conocido que este inhibidor puede inhibir actividades análogas a la de la caspasa 3 a las concentraciones usadas. Por otra parte, Ac-DEVD-cmk inhibió casi completamente la actividad de esta caspasa 3.

Los cultivos neuronales se trataron con los inhibidores una hora antes y durante el tratamiento con LCR, y después se determinaron los efectos de la inhibición de las caspasas sobre la apoptosis neuronal inducida por LCR mediante el ensayo de TUNEL. Los inhibidores antes mencionados evitaron que los LCR del grupo ANA indujeran muerte por apoptosis en las neuronas (Figuras 35 B y 36). Este resultado sugiere que es posible bloquear la toxicidad neuronal inducida por LCR de EM. Así, la apoptosis neuronal inducida por los LCR del grupo ANA ($39 \pm 1,4\%$) disminuyó significativamente en presencia de los inhibidores de caspasa 3 Ac-YVAD-cmk y Ac-DEVD-cmk ($25 \pm 1,3\%$ y $26 \pm 2,0\%$, respectivamente; Figuras 35 B y 36).

También se investigó el efecto sobre la apoptosis de los inhibidores de las caspasas iniciadoras 8 y 9. Para ello, los cultivos neuronales se trataron con los inhibidores z-IETD-fmk y z-LEHD-fmk (25 $\mu\text{g/ml}$), selectivos para las caspasas 8 y 9 respectivamente una hora antes y durante el tratamiento con LCR. El inhibidor de caspasa 9 previno parcialmente la apoptosis neuronal inducida por los LCR (desde un $38,4 \pm 1,33\%$ hasta un $33,2 \pm 2,1\%$) (Figura 35 B). Los porcentajes de apoptosis inducida no se vieron afectados por el inhibidor de caspasa 8, en concordancia con los resultados de actividad, por los que previamente habíamos comprobado que esta caspasa no se activaba por el tratamiento con LCR (Figura 32 A).

En conclusión, con estos resultados se demuestra que la actividad de la caspasa 3 se induce por los LCR de aquellos pacientes con EM que se recuperan peor después del brote, y que los inhibidores de esta caspasa (incluido el Ac-YVAD-cmk) pueden proteger a las células neuronales de la muerte por apoptosis. También el inhibidor de caspasa 9 previene, en menor medida, la apoptosis neuronal inducida por los LCR.

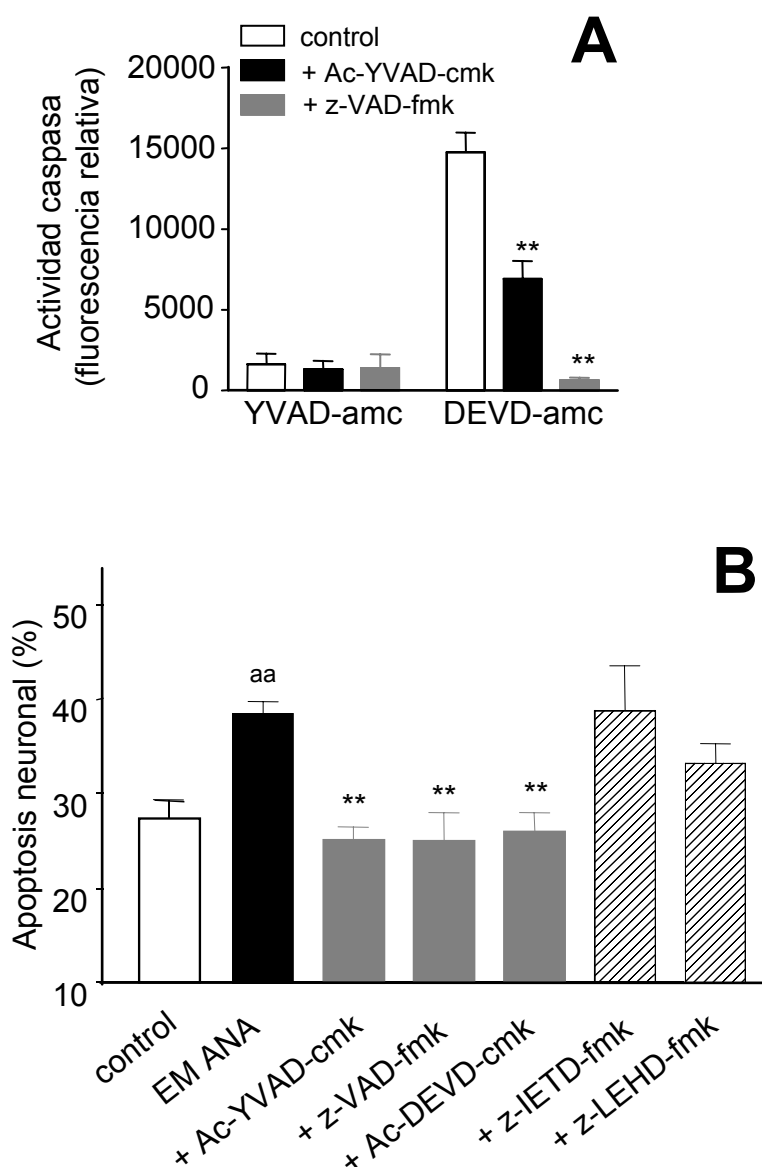


Figura 35. Inhibición de la apoptosis inducida por LCR de pacientes con EM por inhibidores de actividades caspasa. (A) Inhibición de la actividad caspasa 3 por el inhibidor Ac-YVAD-cmk. Los cultivos neuronales se trataron con LCR y sus extractos celulares (25 μ g) se ensayaron con los sustratos Ac-YVAD-amc y Ac-DEVD-amc (50 μ M) de las caspasas 1 y 3 respectivamente. El tratamiento indujo una activación de la caspasa 3 en los cultivos neuronales (control) inhibida en presencia de Ac-YVAD-cmk y z-VAD-fmk (25 μ g/ml). **, $p < 0,01$. (B) Los cultivos neuronales tratados con LCR de pacientes con EM RR del grupo ANA fueron simultáneamente tratados con los inhibidores Ac-YVAD-cmk, z-VAD-fmk, Ac-DEVD-cmk, z-IETD-fmk y z-LEHD-fmk (25 μ g/ml), selectivos para las caspasas: 1, análogas a 3, 3, 8 y 9, respectivamente. ^{aa}, $p < 0,01$ con respecto a cultivos sin tratar con LCR (control); **, $p < 0,01$ con respecto a cultivos tratados con LCR, calculados mediante ANOVA y post test de Dunnet.

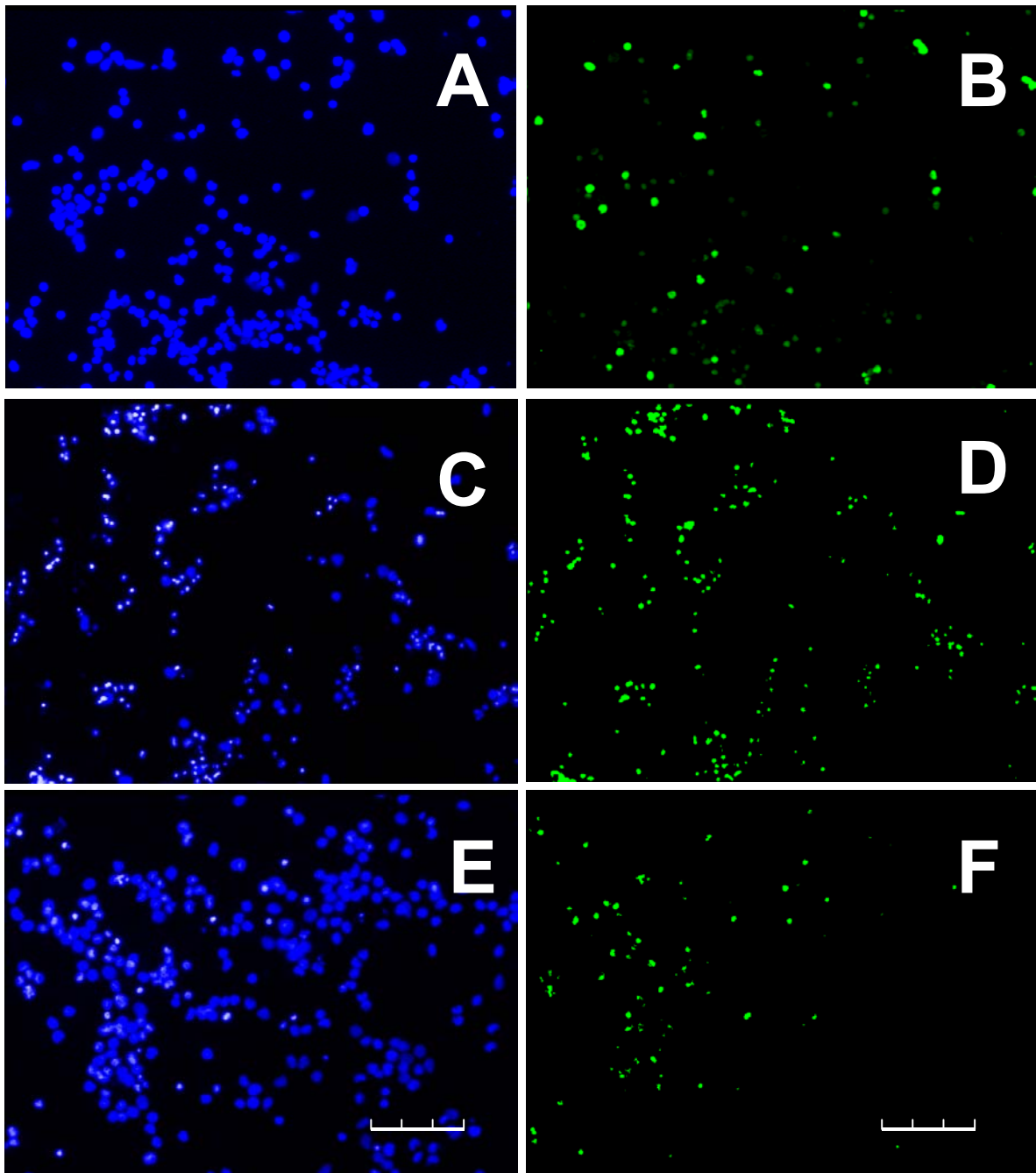


Figura 36. Inhibición de la apoptosis neuronal inducida por LCR de pacientes con EM por inhibidores de la caspasa 3. Imágenes de neuronas marcadas con Hoechst 33342 (A, C, E) o con TUNEL (B, D, F). Las neuronas se trataron con LCR individuales de pacientes OEN (A, B) o con LCR de pacientes del grupo ANA en ausencia (C, D) o presencia (E, F) de Ac-DEVD-cmk 50 μ M. La imagen muestra núcleos marcados con Hoechst 33342 y TUNEL positivos que corresponden a células apoptóticas. Las células viables no presentaron marcaje por TUNEL. La figura es representativa de los resultados obtenidos con cultivos tratados con LCR de seis pacientes OEN y con LCR de ocho pacientes distintos de EM del grupo ANA analizadas por duplicado en diferentes cultivos. Barra de escala, 80 μ m.

5. IDENTIFICACIÓN DE ANTICUERPOS EN EL LCR DE PACIENTES CON EM QUE RECONOCEN CÉLULAS PRECURSORAS DE OLIGODENDROCITOS

Todos los resultados obtenidos hasta el momento demuestran que los LCR de algunos pacientes con EM contienen factores tóxicos para las neuronas en cultivo. Sin embargo, nuestros cultivos contienen otros tipos de células, aparte de las neuronas, que también podrían ser objetivo de algún componente tóxico de los LCR. La EM se ha definido clásicamente como una enfermedad desmielinizante, en la que el daño principal afecta a la mielina y a los oligodendrocitos. Nuestros cultivos neuronales no son un buen modelo para el estudio de la desmielinización, debido a la baja proporción de oligodendrocitos que contienen y a la falta de células inflamatorias. No obstante estos cultivos contienen OPC y hemos intentado comprobar, optimizando las condiciones de cultivo, si las OPC que también existen en humanos adultos, pueden ser el objetivo de un ataque autoinmune en la EM que podría impedir la remielinización.

En este grupo de ensayos se estudiaron 33 pacientes con EM RR (23 en brote) y 17 pacientes control (11 con OEN y 6 con GB).

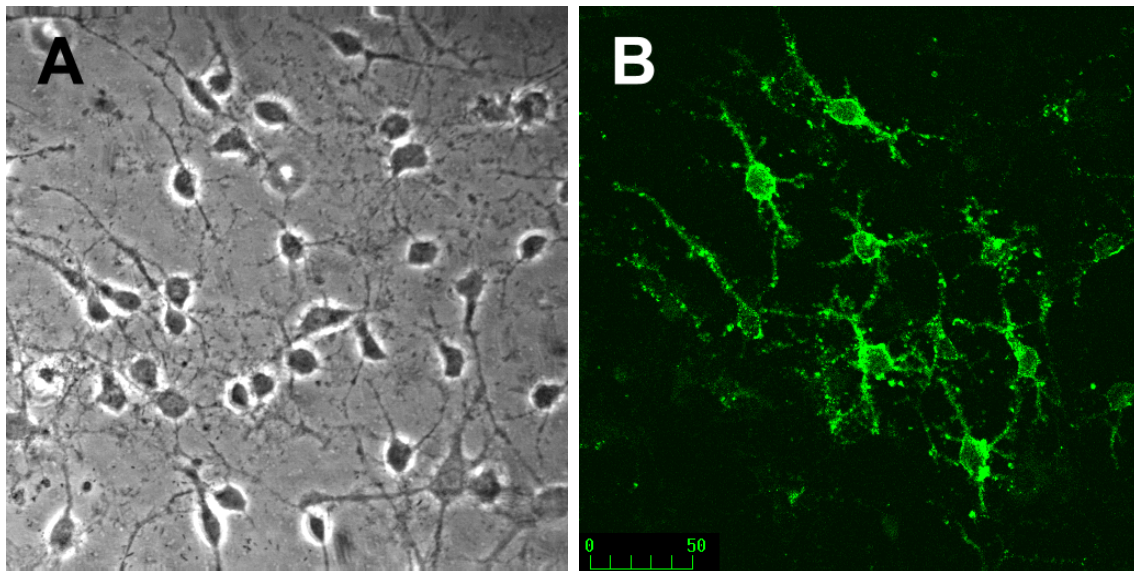


Figura 37. Células A2B5+ en cultivo de 6 días. (A) Imagen en contraste de fase de células cultivadas durante 6 días. (B) El mismo campo marcado con el anticuerpo A2B5 y su respectivo anticuerpo secundario. Se puede observar la morfología bipolar y la inmunorreactividad A2B5+ características de las OPC. Barra de escala en μm .

5.1. Identificación de células A2B5+ en los cultivos celulares

En primer lugar se estudió la proporción de cada tipo de células gliales en los cultivos y su variación a lo largo del tiempo. Las células se cultivaron entre 6 y 12 días y se marcaron con los anticuerpos A2B5, O4 y anti-GFAP para detectar OPC, preoligodendrocitos y astrocitos respectivamente. En los cultivos de 6 días se identificaron células inmunorreactivas A2B5 positivas (A2B5+) con morfología bipolar (Figura 37). El contenido de células A2B5+ varió entre 10 y 13%. El número de células O4+ que se detectó fue mucho menor (0,5 a 0,8%). Entre 6 y 12 días de cultivo se observó un incremento gradual de células O4, alcanzando un 11% del total de células en los cultivos de 12 días (Figura 38).

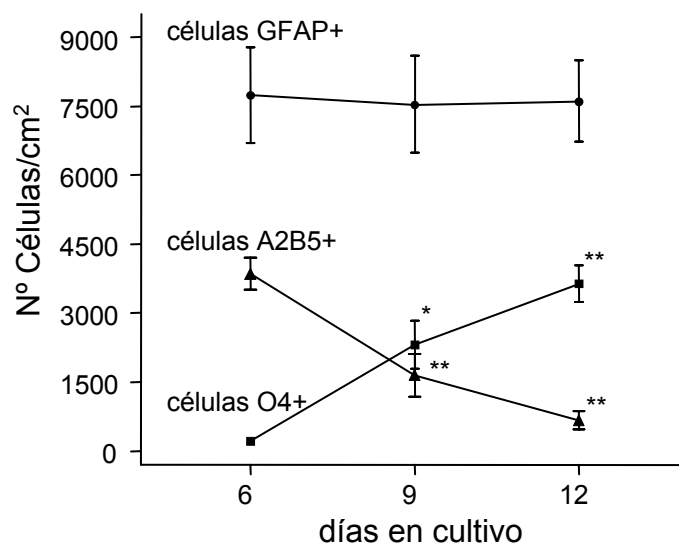


Figura 38. Disminución del número de células A2B5+ en cultivo a lo largo del tiempo en paralelo con el aumento de células O4+. Las células se cultivaron en medio sin suero durante los tiempos indicados, se fijaron y se marcaron en un ensayo de inmunofluorescencia con los anticuerpos A2B5, O4 y anti-GFAP. Las células marcadas se contaron por dos observadores independientes en cada experimento. Los datos se expresan como media \pm S.E.M. de tres experimentos independientes realizados por duplicado. *, $p < 0.05$ y **, $p < 0.01$ con respecto a 6 días en cultivo.

También se observó una disminución paralela de las células A2B5+ hasta el 2%. El número de células GFAP+ permaneció constante (Figura 38). En estos cultivos, ninguna de las células A2B5+ comarcó con el anticuerpo anti-GFAP (Figura 39). Estos resultados indican que, en los cultivos de 6 días, las células con morfología bipolar e

inmunorreactividad A2B5+/ GFAP-negativa (GFAP-), típica de las OPC (Raff *et al.*, 1983b; Temple y Raff, 1985; Raff, 1989) sólo se diferencian hacia oligodendrocitos, lo cual se puede observar durante la segunda semana de cultivo. Estos cultivos de 6 días serán los utilizados en los próximos experimentos.

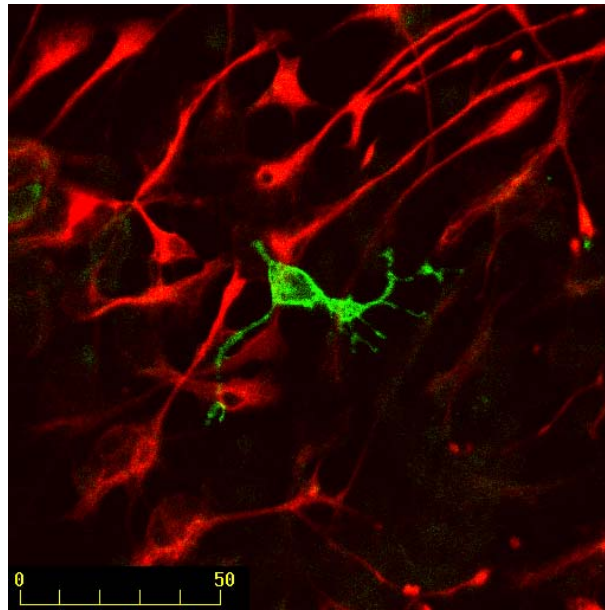


Figura 39. Inmunofluorescencia indirecta de cultivos celulares con anticuerpos A2B5 y anti-GFAP. Las células se marcaron con los anticuerpos A2B5 y anti-GFAP, y los correspondientes anticuerpos secundarios anti-IgM de ratón conjugado con fluoresceína (verde) y anti-IgG de conejo conjugado con lisamina rodamina (rojo). La figura muestra las células A2B5+/GFAP- y los astrocitos GFAP+/A2B5-, y permite observar sus diferentes morfologías. No se encontraron células con doble marcaje. Barra de escala en μm .

5.2. Anticuerpos IgG de los LCR de pacientes con EM reconocen un antígeno en las células precursoras de oligodendrocitos

Las células cultivadas se fijaron y se incubaron con muestras de LCR de pacientes con EM y controles. Después de la incubación se expusieron al anticuerpo A2B5. Las células marcadas se detectaron por inmunofluorescencia indirecta con los correspondientes anticuerpos secundarios conjugados anti-IgG humanos, así como con anti-IgM de ratón. Estos experimentos demostraron que anticuerpos IgG de los LCR de pacientes con EM se unieron a células A2B5+ (Figura 40). Estos anticuerpos sólo se encontraron en LCR de pacientes con EM (Figura 40 C). Los LCR control no marcaron

las células A2B5+ (Figura 40 A-B). Cuando las células se incubaron con LCR de pacientes con EM en los que se habían extraído las IgG, no se detectó ninguna señal en las células A2B5+ (Figura 40 D).

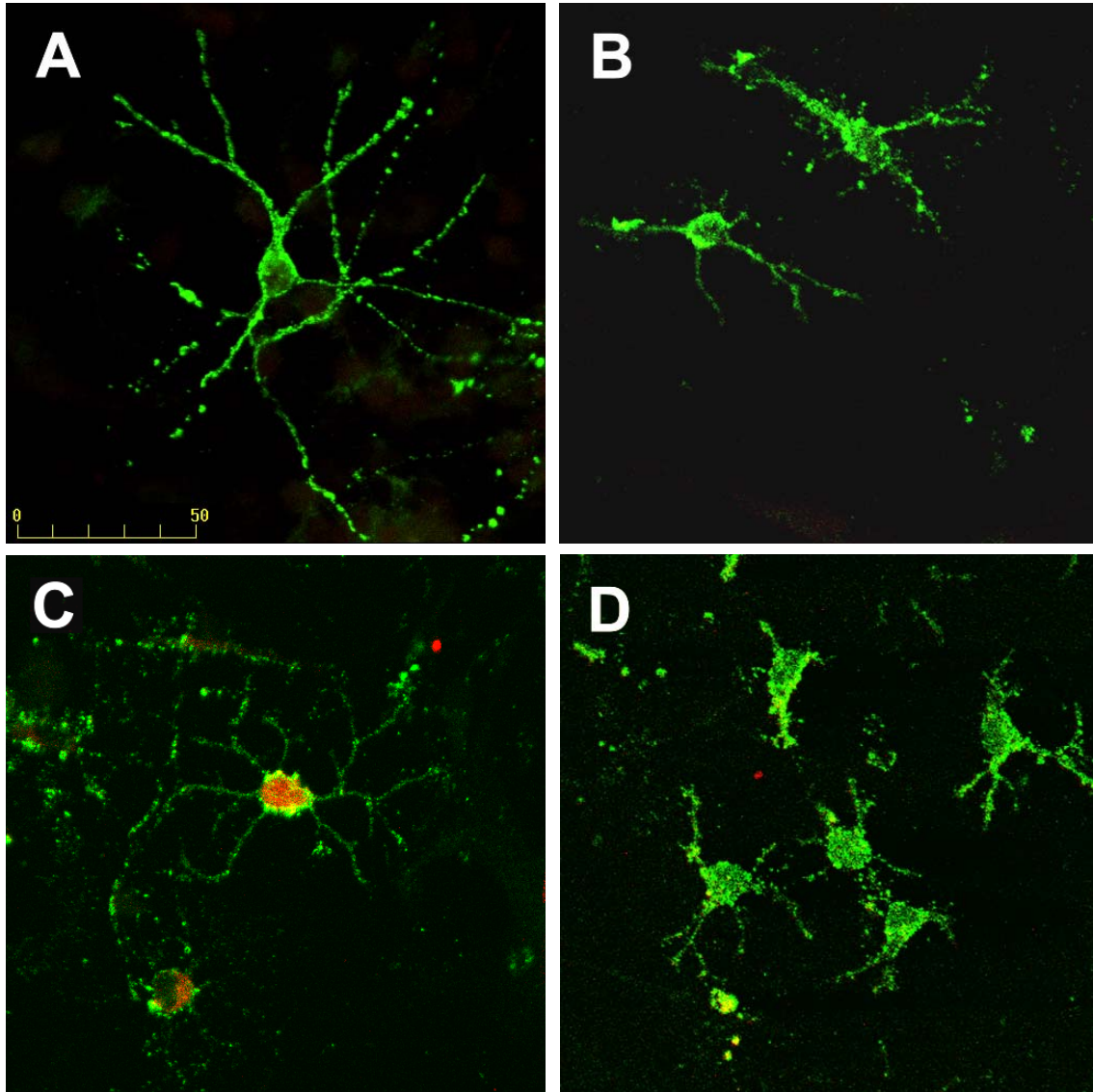


Figura 40. Marcaje de OPC por anticuerpos de los LCR de pacientes con EM. Las células marcadas con A2B5 se detectaron con anticuerpo anti-IgM de ratón conjugado con rojo de rodamina (verde). Las IgG de los LCR se detectaron con anticuerpo anti-IgG humana conjugado con Cy5 (rojo) como anticuerpo secundario para realizar doble marcaje. No se detectó ninguna reacción con las IgG de los LCR de pacientes OEN (A) ni con las de pacientes con polirradiculoneuropatía aguda (B), mientras que las IgG de pacientes con EM mostraron una reacción positiva con las células A2B5+ (C). Esta reacción se inhibió cuando se eliminaron las IgG de los LCR (D). El aislamiento de IgG se realizó según se describe en Materiales y Métodos. La marca amarilla es la resultante de la superposición de la marca roja sobre la verde. Barra de escala en μm .

Las células precursoras A2B5⁺ son capaces de diferenciarse a oligodendrocitos o a astrocitos tipo 2, dependiendo de las condiciones de cultivo (Raff *et al.*, 1983a; Temple y Raff, 1985; Raff, 1989). Se llevaron a cabo diversos experimentos con el fin de comprobar si estos tipos de células gliales podrían reaccionar con IgG de LCR de pacientes con EM. Dobles marcajes con estos anticuerpos y con A2B5 pero no con O4 o anti-GFAP, demostraron que sólo las células A2B5⁺ eran inmunorreactivas para los anticuerpos IgG de los LCR de pacientes con EM (Figura 41).

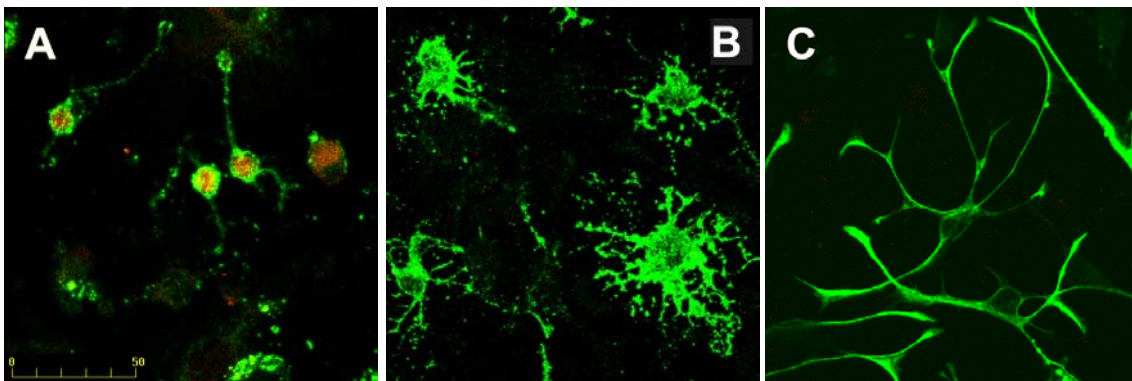


Figura 41. Células cultivadas y marcadas por inmunofluorescencia indirecta con LCR de pacientes con EM (rojo) y con los anticuerpos A2B5, O4 o anti-GFAP (verde). El marcaje se realizó como se describe en la figura 40. El anticuerpo anti-GFAP se observó con anticuerpo anti-IgG de conejo conjugado con lisamina rodamina. Se muestran las células doblemente marcadas para IgG de LCR y A2B5 (A), pero no para IgG de LCR y O4 (B), o IgG de LCR y anti-GFAP (C). Sólo las células A2B5⁺ fijaron anticuerpos IgG humanos de pacientes con EM. Barra de escala en μm .

Con la intención de determinar si las IgM humanas estaban también implicadas en el reconocimiento de las células A2B5⁺, las células se fijaron y se expusieron al anticuerpo A2B5 y al anticuerpo de conejo anti-IgM humana después de la incubación con LCR, para realizar el ensayo de inmunofluorescencia. Después, las células marcadas se detectaron con el correspondiente anticuerpo secundario para realizar triple marcaje (Figura 42). No se detectó ninguna unión de IgM de los LCR a células A2B5⁺ (Figura 42 B). Concentraciones crecientes de anticuerpo anti-IgM humano no revirtieron la reacción de IgG humana detectada con el anticuerpo secundario conjugado con Cy5, demostrando que no existe reactividad cruzada entre las subclases de IgG e IgM humanas.

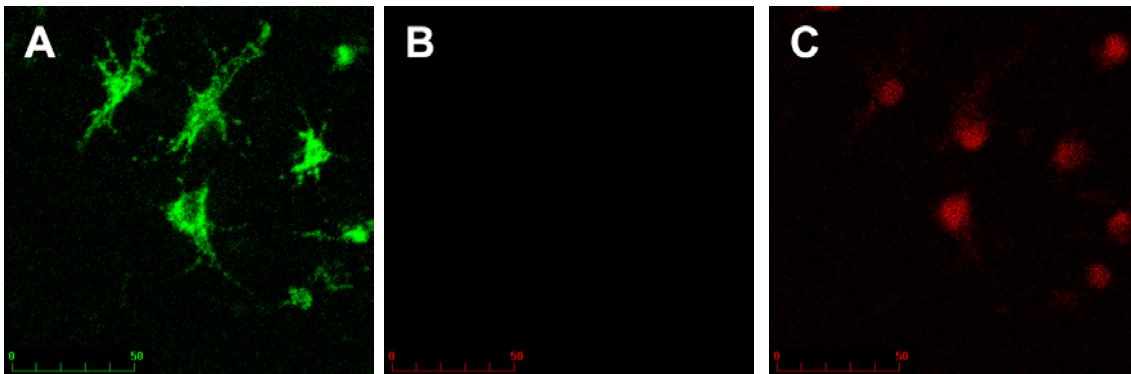


Figura 42. Inmunofluorescencia indirecta con anti-IgM humano. Las células cultivadas se incubaron en ensayos de inmunofluorescencia con LCR de pacientes con EM y A2B5 y con anticuerpos anti-IgM humana de conejo. El marcaje se realizó con anticuerpo anti-IgM de ratón conjugado con fluoresceína para el anticuerpo A2B5 (A), anticuerpo anti-IgG de conejo conjugado con lisamina rodamina para el anticuerpo anti-IgM humano (B) y anticuerpo anti-IgG humana conjugado con Cy5 para las IgG de los LCR (C) como anticuerpos secundarios para triple marcaje. No se detectó unión de IgM de los LCR a las células A2B5+. Barra de escala en μm .

Con el objetivo de comprobar la especificidad de los marcajes de inmunofluorescencia con IgG de los LCR de pacientes con EM sobre las células A2B5+ se llevaron a cabo diferentes experimentos de control: (i) incubar las células sin LCR en los ensayos de inmunofluorescencia para eliminar la señal de fondo; (ii) omitir el anticuerpo secundario anti-IgG humana conjugado con Cy5 en los experimentos de doble y triple marcaje; (iii) incubar con IgG purificadas de donantes de sangre en lugar de los LCR, a las mismas concentraciones que las de los LCR de los pacientes con EM (rango 20-100 $\mu\text{g/ml}$). En ninguno de estos controles se detectó unión de IgG a células A2B5+. Diferentes concentraciones de anticuerpo A2B5 tampoco modificaron la reacción de las IgG de los LCR de pacientes con EM. Esto descarta cualquier tipo de reacción cruzada entre anticuerpos primarios y sus anticuerpos secundarios correspondientes.

5.3. Cuantificación de la IgG humana unida a células A2B5+ en ensayos de inmunofluorescencia indirecta

El reconocimiento de las células A2B5+ por IgG de los LCR de pacientes con EM se hizo más evidente cuando se cuantificó la intensidad de fluorescencia debida a la

IgG humana. El marcaje de células A2B5+ por IgG humana fue significativamente superior cuando se utilizaron LCR de pacientes con EM que cuando se emplearon LCR control (en los que la intensidad de fluorescencia fue irrelevante) (Figura 43).

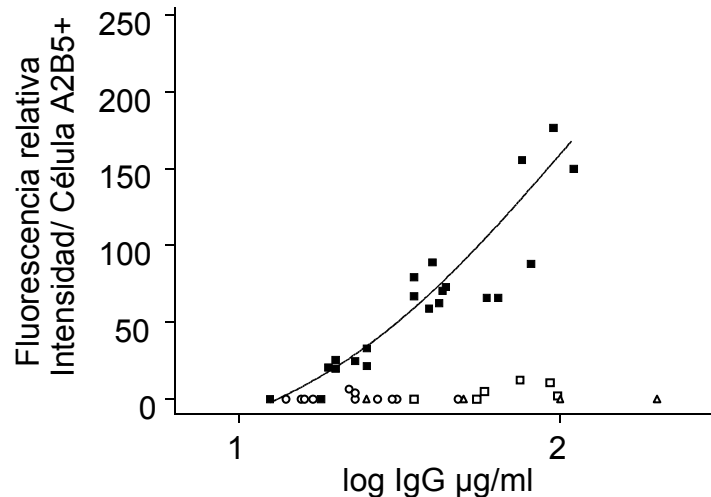


Figura 43. Cuantificación de la IgG humana unida a células A2B5+. Las células cultivadas se marcaron con anticuerpo A2B5 y con LCR de pacientes con EM y controles, como se describe en la figura 40, y se cuantificó la intensidad de inmunofluorescencia debida a la unión de IgG humanas en estas células. La figura muestra la cuantificación de las intensidades de fluorescencia de IgG humana por célula A2B5+ marcadas con LCR de pacientes con EM (■), con LCR de pacientes OEN (○) y polirradiculoneuropatía (□) y con IgG purificadas de donantes (△). En los pacientes con EM la intensidad de fluorescencia por célula A2B5+ y las concentraciones de IgG de los LCR se ajustaron a una regresión no lineal.

Cuando los LCR tenían menos de 20 µg/ml de IgG, la intensidad de fluorescencia estuvo en el rango de la señal del fondo que se observaba en las imágenes al microscopio, dando valores mínimos cuando se corregía esta señal. En los pacientes con EM, se observaron intensidades de fluorescencia de IgG humana por célula A2B5+ crecientes en aquellos pacientes en los que la concentración de IgG del LCR era mayor; esto no ocurrió con los LCR control (por ejemplo en los casos de polirradiculoneuropatía, a pesar de que estos pacientes tienen elevadas concentraciones de IgG) ni con altas concentraciones de IgG purificadas de donantes de sangre (Figura 43). Todos estos resultados demuestran que los anticuerpos de los LCR de los pacientes con EM reconocen específicamente antígenos localizados en las células A2B5+.

5.4. Detección del antígeno en los extractos celulares

Además de los ensayos de inmunofluorescencia, se realizó un ELISA recubriendo las placas con extractos celulares, y utilizando LCR de pacientes con EM y controles. Las medidas de absorbancia obtenidas presentaron valores crecientes cuando las concentraciones de IgG de los LCR fueron mayores. (Figura 44 A).

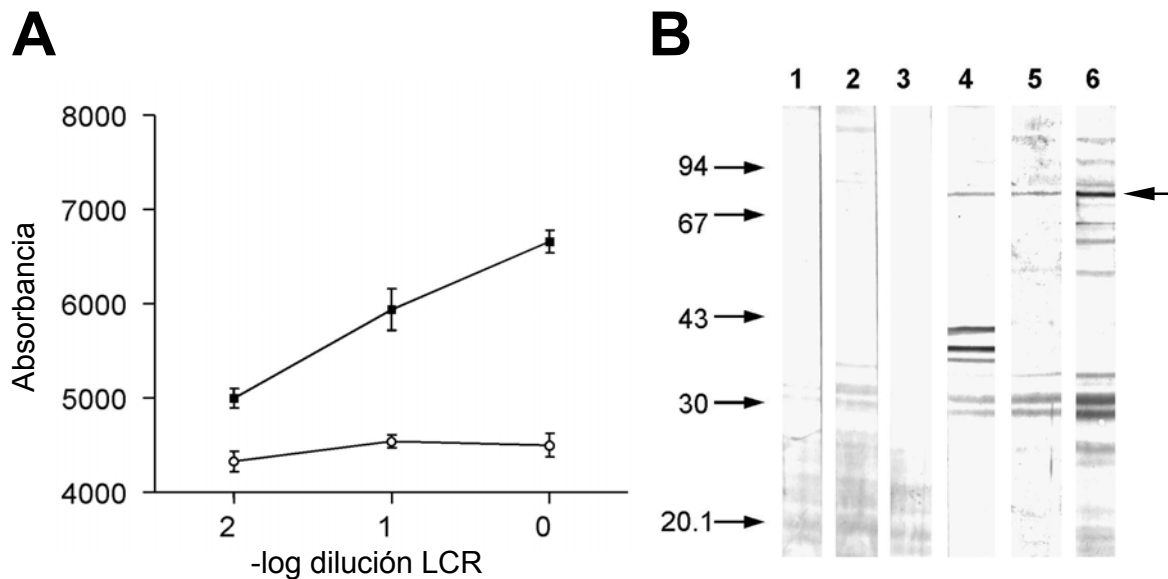


Figura 44. Detección del antígeno en los extractos celulares por ELISA e inmunodetección. (A) ELISA realizado con placas recubiertas con extractos celulares e incubadas con mezclas de LCR de pacientes con EM (■) y controles (○). Los LCR se concentraron 10 veces por ultrafiltración y se utilizaron las diluciones indicadas. El valor de absorbancia fue de 4180 ± 100 en ausencia de LCR. Las absorbancias se expresaron en unidades arbitrarias. (B) Las muestras de extractos celulares procedentes de cultivos se corrieron en un gel de poliacrilamida 12% con SDS, y se transfirieron a membranas. Estas se incubaron con LCR diluidos 1:5 de controles (1, paciente de polirradiculoneuropatía aguda; 2 y 3 pacientes OEN) y pacientes con EM (4, 5, 6). Las membranas se incubaron con anticuerpo anti-IgG humana conjugado con fosfatasa alcalina y se revelaron con los reactivos de fosfatasa alcalina. Los anticuerpos IgG de los LCR de pacientes con EM reaccionaron con un antígeno de 82-kDa que se indica con una flecha, mientras que las muestras de LCR de pacientes control no reaccionaron con este antígeno. Las flechas indican el peso molecular relativo en kDa. La figura es representativa de los resultados de todos los pacientes. (Cid *et al.*, 2004).

Diversas moléculas de la mielina, y entre ellas algunos gangliósidos, se han identificado como antígenos en la EM y se ha sugerido que pueden participar en la destrucción de la mielina y de los oligodendrocitos asociados. Para comprobar si los anticuerpos presentes de los LCR de pacientes con EM con afinidad hacia las células A2B5+ reconocen a los gangliósidos característicos de estas células, las placas de ELISA se recubrieron también con la fracción de gangliósidos (obtenidos como se

detalla en Materiales y Métodos) y se ensayaron con muestras de LCR de pacientes con EM y controles. En este caso no se obtuvo reacción, demostrando que los antígenos detectados por las IgG de los LCR no son gangliósidos.

Además, las muestras de extractos celulares se analizaron por transferencia a membranas e inmunodetección y se ensayaron con LCR de pacientes con EM y de controles. Los anticuerpos de los LCR de pacientes con EM reaccionaron con un antígeno de 82 kDa en las membranas (Figura 44 B). Las muestras de LCR de controles no reaccionaron con dicho antígeno. También se observaron otros antígenos, pero no se detectaron por todos los LCR de pacientes con EM o se detectaron por anticuerpos de LCR de algunos pacientes control.

5.5. Localización del sitio de unión de las IgG humanas en células A2B5+ por microscopía confocal tridimensional

Puesto que los LCR de pacientes con EM contienen anticuerpos que reconocen específicamente a las células A2B5+, se investigó la localización del sitio de unión de las IgG en estas células. Las imágenes confocales tridimensionales (3-D) mostraron los antígenos reconocidos por el anticuerpo A2B5 en los procesos celulares y también alrededor del cuerpo celular, especialmente en la zona basal (Figura 45). Las imágenes 3-D localizaron el sitio de unión de las IgG en la zona superior del cuerpo celular, sobre la marca de A2B5 (Figura 45 B, D). Esto indica una localización extracelular del sitio de unión de las IgG, que debe de ser un antígeno de superficie de estas células.

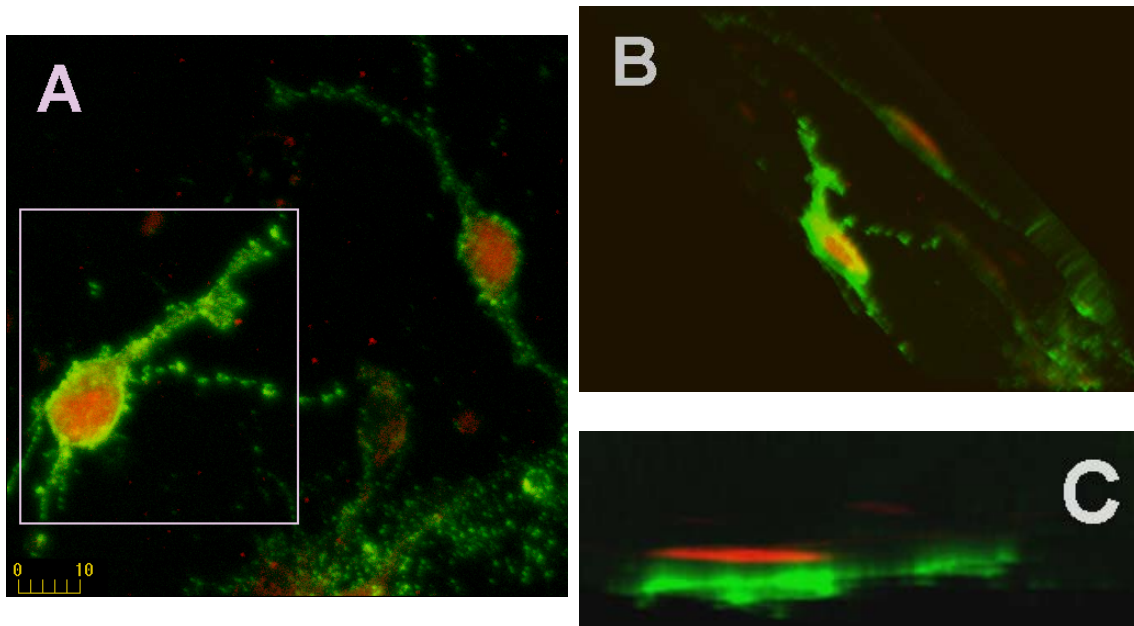


Figura 45. Imagen tridimensional obtenida por microscopía confocal del sitio de unión de las IgG humanas en las células A2B5+. Las células cultivadas durante seis días se marcaron en los ensayos de inmunofluorescencia con anticuerpo A2B5 y LCR de pacientes con EM. El ensayo se realizó como se describe en la figura 40. La imagen mostrada en A se reconstruyó para formar proyecciones tridimensionales. (B) Figura A rotada 40° en el eje X y 70° en el eje Y. (C) Sección (rotada 90° en el eje X) del recuadro marcado en A. Las imágenes tridimensionales localizan el sitio de unión de las IgG sobre la marca de A2B5, correspondiente a la superficie del cuerpo celular. Barra de escala en μm .

5.6. Identificación del antígeno de 82 kDa como Hsp90/Hsp84

Los antígenos se inmunoprecipitaron a partir de extractos celulares con IgG purificadas de mezclas de LCR de pacientes con EM (que habían detectado el antígeno de 82 kDa). Los inmunoprecipitados se analizaron por electroforesis y los geles se tiñeron con plata. Se detectaron tres proteínas con masas moleculares aparentes de 82, 70 y 42 kDa (Figura 46 A). La banda de 82 kDa se identificó por espectrometría de masas MALDI-ToF como la proteína Hsp90 β (Hsp84, Figura 46 B), una proteína de 83.185 Da y un punto isoeléctrico de 5,1 según la secuencia de rata.

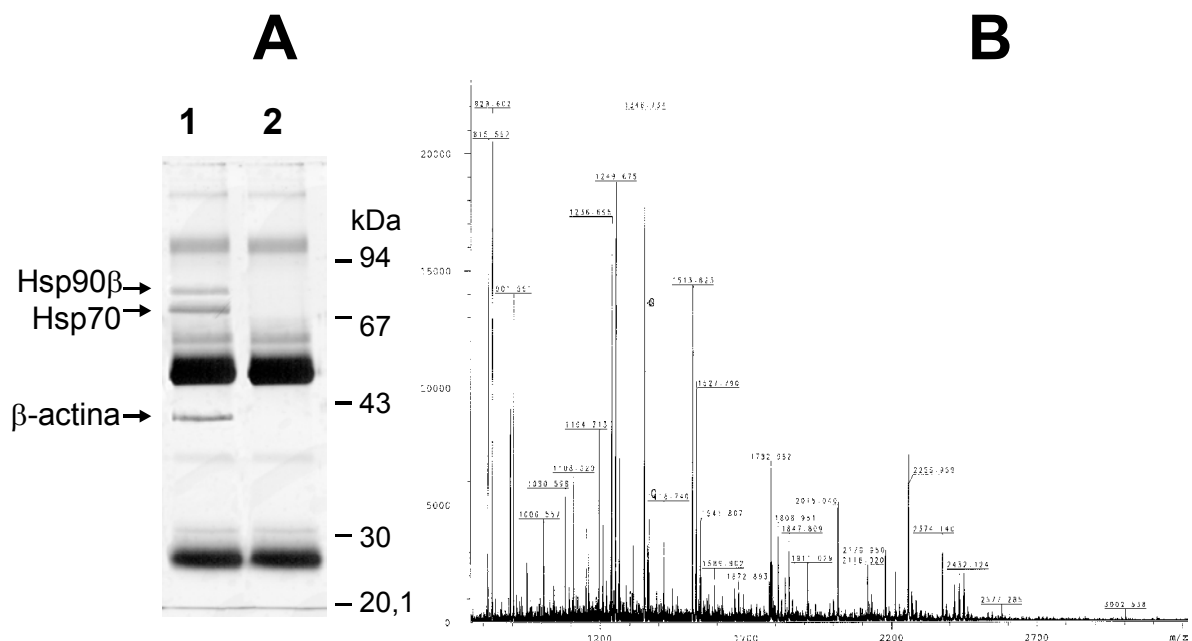
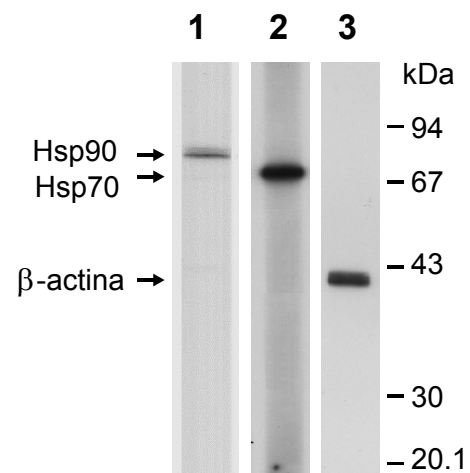


Figura 46. Identificación del antígeno reconocido por IgG de pacientes con EM. (A) Tinción de plata del gel realizado con los inmunoprecipitados realizados con los extractos celulares (línea 1) o con tampón como control (línea 2), utilizando IgG de los LCR de EM. Las flechas indican las proteínas inmunoprecipitadas en las posiciones de 82, 70 y 42 kDa. La figura A es representativa de tres inmunoprecipitaciones realizadas con tres lotes diferentes de IgG purificadas. (B) Identificación de la banda de 82 kDa. Espectro de masas MALDI-ToF de la proteína de 82 kDa tripsinizada. Esta figura es representativa de varias inmunoprecipitaciones realizadas con tres lotes diferentes de IgG purificadas. (Cid *et al.*, 2004).

Las bandas de 70 y 42 kDa se identificaron por MALDI-ToF-MS como las proteínas Hsp70 y β -actina respectivamente. Los inmunoprecipitados se analizaron por transferencia e inmunodetección y se incubaron con anticuerpos monoclonales contra

Hsp90, Hsp70 y β -actina que reconocieron respectivamente a las proteínas identificadas (Figura 47).

Figura 47. Inmunodetección de las proteínas inmunoprecipitadas con IgG humanas. Transferencia e inmunodetección de los inmunoprecipitados incubados con anticuerpos monoclonales contra Hsp90 (Línea 1), Hsp70 (Línea 2) y β -actina (Línea 3).



En los ensayos de inmunofluorescencia, el anticuerpo monoclonal anti-Hsp90 reconoció las células A2B5+ en el cuerpo celular, de la misma forma que lo hicieron las IgG de los LCR de pacientes con EM (Figura 48 A). El anticuerpo anti-Hsp70 reconoció estas células marcando sus prolongaciones en vez de su cuerpo celular (Figura 48 B), sin embargo el anticuerpo anti- β -actina no reconoció a las células en ninguna localización de su superficie celular (Figura 48 C). Puesto que la actina es una proteína muy abundante en el citosol, de esta forma también se comprueba que el procedimiento utilizado para fijar las células no las ha permeabilizado.

Además, se realizaron ensayos de competencia tanto por inmunocitoquímica con células cultivadas como por transferencia e inmunodetección, incubando con LCR de pacientes con EM y anticuerpos monoclonales anti-Hsp90. La marca de IgG de LCR sobre las OPC permaneció únicamente como una traza (Figura 48 D) y la detección del antígeno de 82 kDa prácticamente desapareció en las membranas.

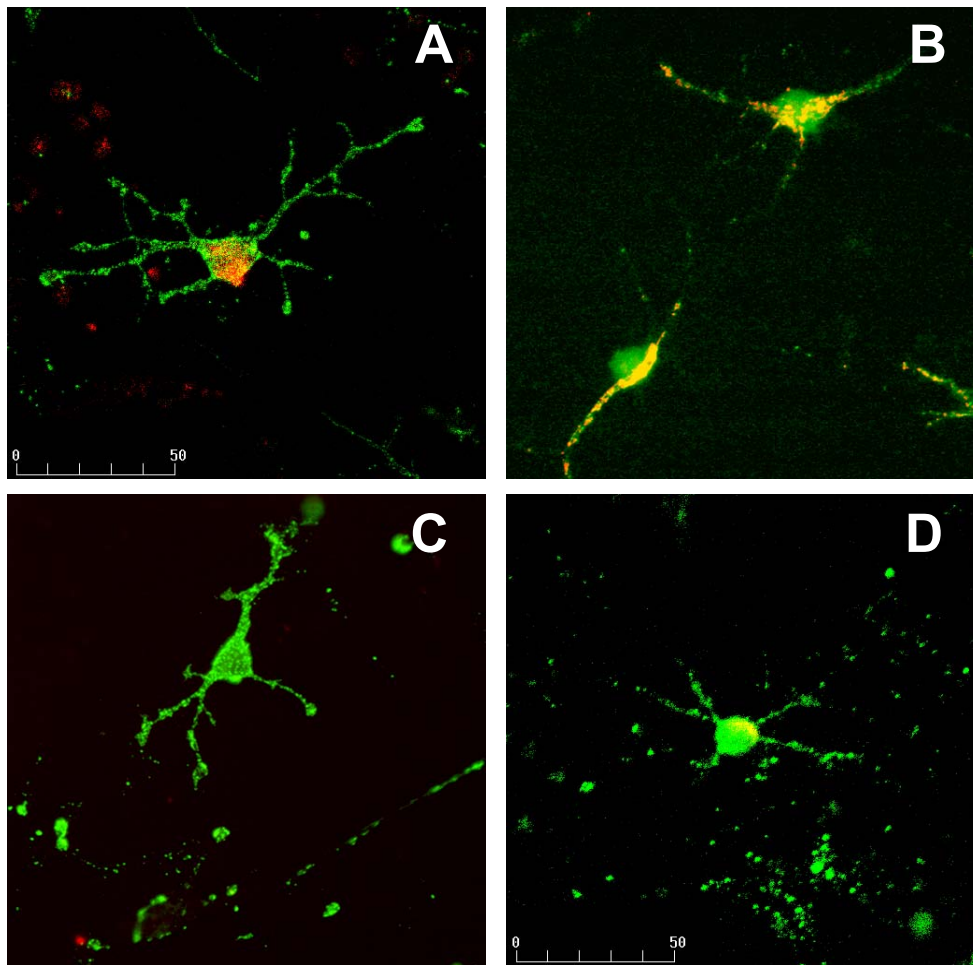


Figura 48. Inmunocitoquímica de las proteínas inmunoprecipitadas en la superficie de las OPC. Inmunocitoquímica de OPC con A2B5 (verde) y anticuerpos monoclonales anti-Hsp90 (A), anti-Hsp70 (B) o anti- β -actina (C) (rojo). (D) Inmunocitoquímica de OPC con A2B5 (verde) y con IgG humanas purificadas (rojo) y anti-Hsp90, añadidas simultáneamente para realizar un ensayo de competencia entre estos dos últimos. Estos anticuerpos se detectaron con sus respectivos secundarios para realizar dobles marcajes. La marca amarilla es la resultante de la superposición de la marca roja sobre la verde. Barra de escala en μm .

Posteriormente, se obtuvieron anticuerpos anti-Hsp90 a partir de los LCR de pacientes con EM por inmunofinidad (Figura 49 A y B). Una muestra de extracto celular (500 μg) se analizó por SDS-PAGE (12% acrilamida, 2,6% C) con un peine continuo y se transfirió. La membrana se cortó en la región de 82 kDa y se incubó con una mezcla de LCR de EM. Después se retiró el LCR y las IgG que se habían adsorbido se extrajeron con pH 2,2 y se recogieron. Estas IgG inmunopurificadas detectaron específicamente al antígeno Hsp90 de 82 kDa en membranas de extractos celulares (Figura 49 A) y marcaron a las células A2B5+ en los ensayos de inmunofluorescencia

(Figura 49 B). La fracción de LCR que no se adsorbió detectó al antígeno muy débilmente en membranas y el marcaje en las células A2B5+ disminuyó 2,9 veces.

El anticuerpo monoclonal anti-Hsp90 también detectó en la inmunodetección llevada a cabo con los extractos celulares a la proteína Hsp90, con una masa molecular relativa de 82 kDa, de forma análoga a los anticuerpos de los LCR de pacientes con EM (Figura 49 A, línea 2).

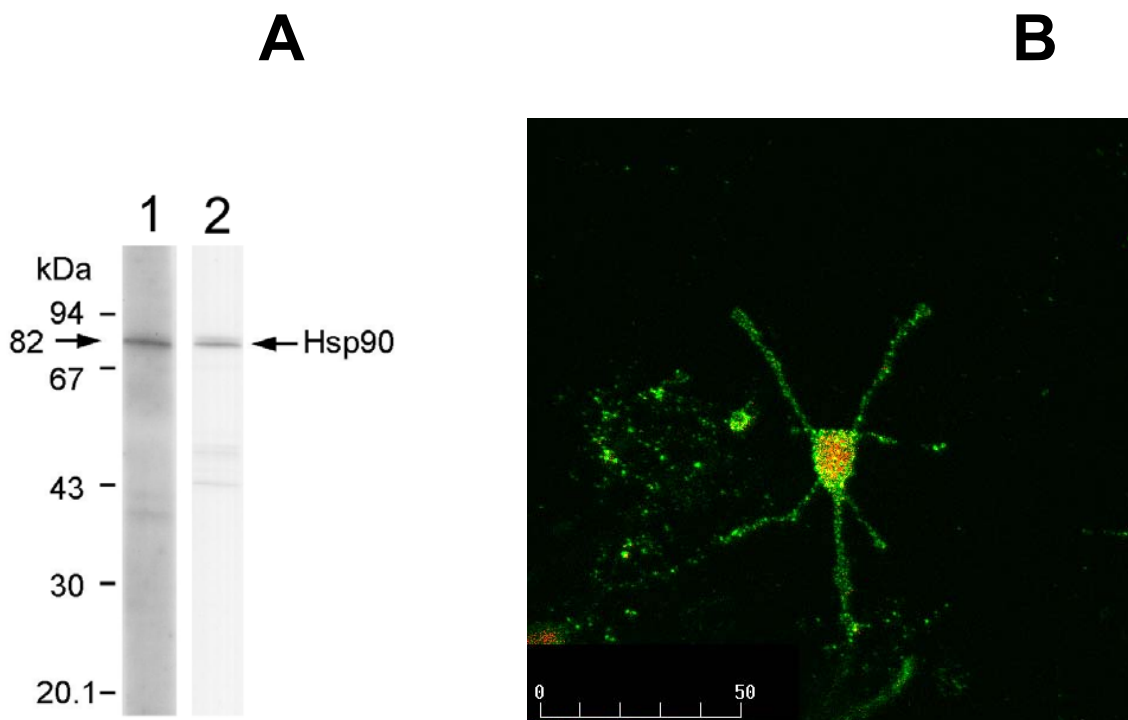


Figura 49. Identificación de Hsp90 β por inmunodetección e inmunocitoquímica. (A) Extractos celulares incubados con anticuerpo anti-Hsp90 inmunopurificado a partir de LCR de EM (línea 1) y con anticuerpo monoclonal anti-Hsp90 (línea 2). (B) Inmunocitoquímica de OPC marcadas con anticuerpo A2B5 y anticuerpo anti-Hsp90 inmunopurificado a partir de LCR de EM. Las células A2B5 (verde) y las IgG humanas (rojo) se detectaron como en la figura 40. La marca amarilla es la resultante de la superposición de la marca roja sobre la verde. Barra de escala en μm . (Cid *et al.*, 2004).

5.7. Inmunodetección de Hsp90 a partir de electroforesis bidimensional

Además, confirmamos mediante electroforesis bidimensional (2-DE) que el antígeno de 82 kDa reconocido por anticuerpos del LCR de EM era Hsp90. Los extractos celulares de células cultivadas se sometieron a 2-DE, transferencia e inmunodetección con anticuerpo monoclonal anti-Hsp90, LCR de EM y anticuerpo

policlonal anti-Hsp90 β . Los anticuerpos monoclonal y policlonal reconocieron cinco isoformas de Hsp90 en la posición de 82 kDa que denominamos isoformas *a*, *b*, *c*, *d* y *e* (Figura 50 A, C). Los anticuerpos de los LCR de EM sólo reconocieron dos isoformas en la posición de 82 kDa y en la región de pH 3-10 que correspondieron a las isoformas *b* y *c* identificadas de Hsp90 β (Figura 50 B). También se sometió a 2-DE Hsp90 purificada de células HeLa (Stressgene, Canadá), se transfirió y se incubó con anticuerpos monoclonal y policlonal anti-Hsp90 que reconocieron especialmente dos isoformas con una masa molecular relativa de 82 kDa (Figura 50 D). Estas proteínas correspondieron a una nueva isoforma de Hsp90 que denominamos *a'* y a la isoforma *a* previamente identificada. También se identificó otra isoforma menor en una posición de pH intermedia entre las isoformas *c* y *d*.

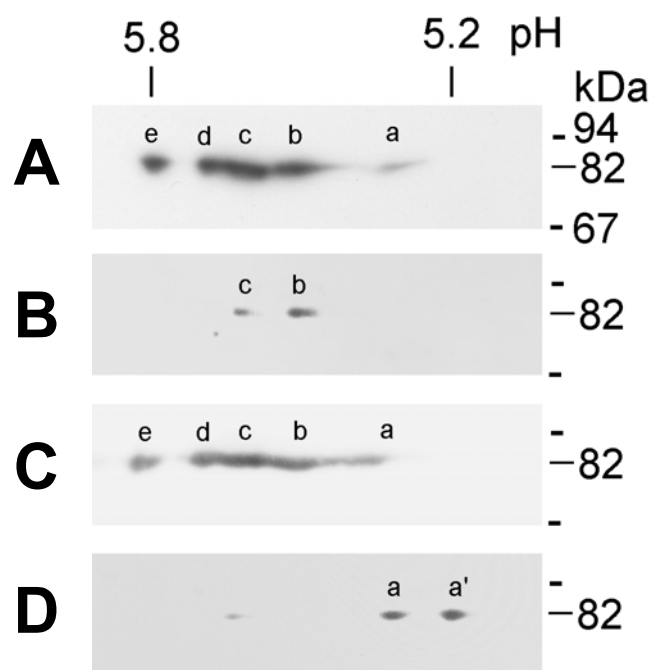


Figura 50. Identificación de Hsp90 por anticuerpos de los LCR de EM por electroforesis bidimensional. Los extractos celulares se sometieron a electroforesis bidimensional, transferencia e inmunodetección con anticuerpo monoclonal anti-Hsp90 (A), LCR reunidos de pacientes con EM (B) y anticuerpo policlonal anti-Hsp90 β (C). También se analizó Hsp90 de células HeLa (1 μ g) por electroforesis bidimensional y se incubó con anticuerpo policlonal anti-Hsp90 β (D). *a'*, *a*, *b*, *c*, *d* y *e*, representan las isoformas de Hsp90 identificadas por los anticuerpos monoclonales y policlonales. (Cid *et al.*, 2004).

5.8. Detección de Hsp90 humana

La proteína Hsp90 se inmunoprecipitó utilizando anticuerpo monoclonal anti-Hsp90 a partir de cultivos celulares de rata (línea 1) o a partir de células de neuroblastoma humano (línea 2) y Hsp90 purificada de células HeLa (línea 3). Como se esperaba, los anticuerpos de los LCR de EM también reconocieron a la Hsp90 humana en análisis por transferencia e inmunodetección. De acuerdo con los resultados obtenidos en las 2-DE, los anticuerpos de los LCR de EM no detectaron a la Hsp90 humana purificada de las células HeLa (Figura 51, imagen izquierda), que si se detectó con anticuerpo monoclonal anti-Hsp90 (Figura 51, imagen derecha).

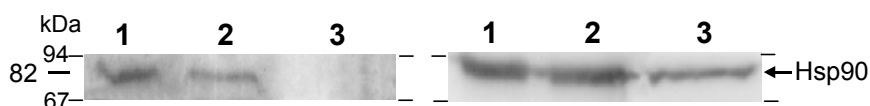


Figura 51. Anticuerpos de los LCR de EM reconocen a la Hsp90 humana. Transferencia e inmunodetección de Hsp90 inmunoprecipitada utilizando anticuerpo monoclonal anti-Hsp90 a partir de cultivos celulares de rata (línea 1) o a partir de células de neuroblastoma humano (línea 2) y Hsp90 purificada de células HeLa (línea 3) incubadas LCR reunidos de pacientes con EM (imagen izquierda) o con anticuerpo monoclonal anti-Hsp90 (imagen derecha). Las figuras muestran resultados representativos. (Cid *et al.*, 2004).

5.9. La detección del antígeno Hsp90 depende del número de OPC en los cultivos

Se analizaron por transferencia e inmunodetección diversos extractos celulares de cultivos de 6, 9 y 12 días utilizando anticuerpos de LCR de EM o anticuerpo monoclonal anti-Hsp90. Ambos anticuerpos detectaron que el antígeno Hsp90 presentó una reacción antigénica decreciente entre los días 6 y 12 de cultivo en paralelo al descenso en el número de OPC (Figura 52).

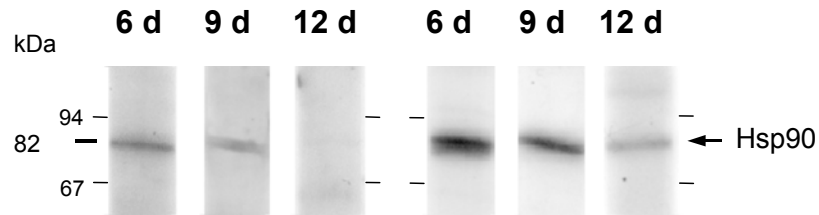


Figura 52. La detección del antígeno Hsp90 es dependiente del número de OPC en cultivos. Se sometieron a transferencia e inmunodetección diversas muestras de extractos celulares de cultivos de 6, 9 y 12 días (6 d, 9 d y 12 d respectivamente). La membrana se incubó utilizando LCR reunidos de pacientes con EM (imagen izquierda), los anticuerpos se levantaron de la membrana que se incubó otra vez con anticuerpo monoclonal anti-Hsp90 (imagen derecha). La figura es representativa de tres experimentos. (Cid *et al.*, 2004).

5.10. Localización del antígeno Hsp90 en la membrana celular

El método de fijación de las células con paraformaldehído, sin permeabilización, mantiene las células intactas y permite marcarlas con anticuerpos solamente en la superficie (Harlow y Lane, 1999). Nosotros comprobamos que las células fijadas con paraformaldehído 3,7% no se permeabilizaron, incubándolas con un colorante no permeable (dextrano conjugado con tetrametilrodamina 10 kDa, Molecular Probes, Holanda) y que el antígeno Hsp90 detectado en los experimentos de inmunofluorescencia estaba localizado en el exterior de la membrana celular. Para confirmar este resultado, se realizó un fraccionamiento subcelular. La inmunodetección utilizando LCR de EM y anticuerpo anti-Hsp90 de las fracciones subcelulares demostró que el antígeno está en la fracción de membrana. Además, el anticuerpo monoclonal anti-Hsp90 también detectó esta proteína en la fracción citosólica y débilmente en las fracciones mitocondrial y nuclear (Figura 53).

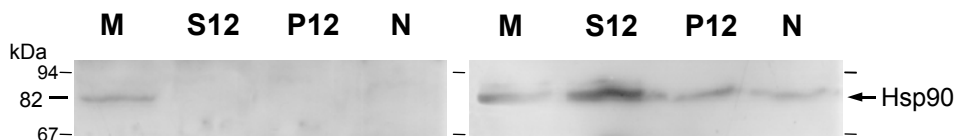


Figura 53. Localización del antígeno por transferencia e inmunodetección en las fracciones subcelulares. Las fracciones subcelulares (45 μ g de cada una) se sometieron a electroforesis, se transfirieron a membranas y se incubaron con mezclas de LCR de EM (imagen izquierda), los anticuerpos se levantaron de la membrana y esta se incubó otra vez con el anticuerpo monoclonal anti-Hsp90 (imagen derecha). La figura es representativa de tres experimentos. (M) fracción de membrana extraída con detergente, (S12) fracción citosólica 12.000xg, (P12) fracción mitocondrial, (N) fracción nuclear. (Cid *et al.*, 2004).

Para comprobar el reconocimiento *in vivo* del antígeno por anticuerpos de los LCR en la superficie de las OPC, incubamos cultivos celulares con IgG purificadas a partir de los LCR de pacientes control y de EM. Después, las células se fijaron y marcaron con el anticuerpo A2B5. De acuerdo con los resultados anteriormente descritos, el $42 \pm 8,3\%$ de las OPC se marcaron *in vivo* con los anticuerpos de EM (Figura 54), mientras que los anticuerpos de pacientes control no marcaron ninguna célula. El anticuerpo policlonal anti-Hsp90 β también detectó el antígeno *in vivo* en un $34 \pm 6\%$ de las OPC, de forma análoga a las IgG de EM.

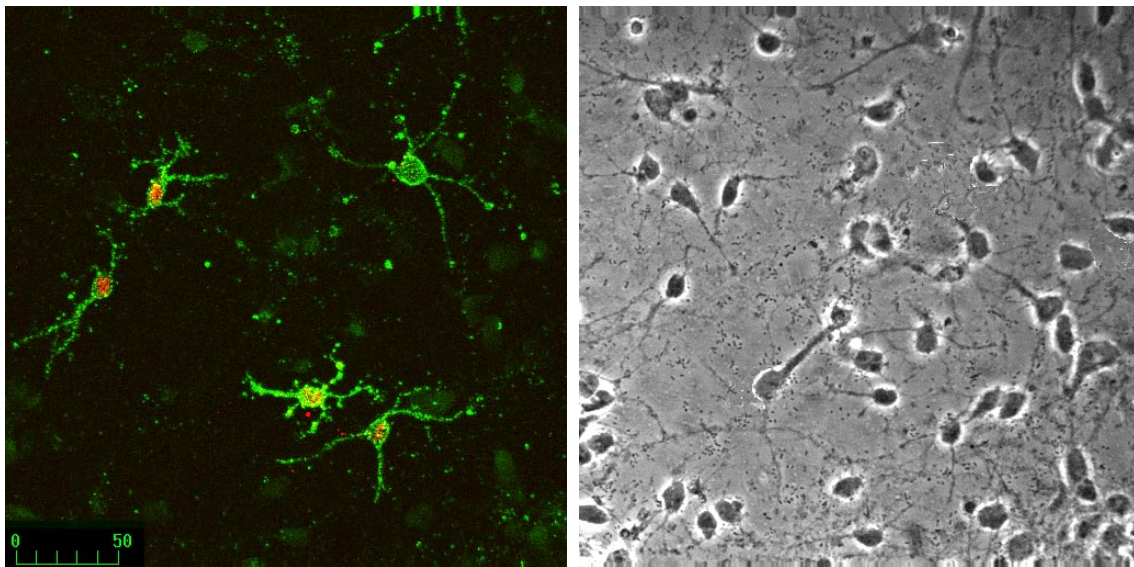


Figura 54. Detección del antígeno en las OPC *in vivo*. Inmunocitoquímica de células vivas marcadas con IgG purificadas de LCR de pacientes con EM (rojo) como se describe en Materiales y Métodos. Después, las células se fijaron y se marcaron con el anticuerpo A2B5 (verde) (imagen izquierda). La imagen derecha representa el contraste de fase del mismo campo. (Cid *et al.*, 2004).

5.11. Activación de complemento debida a la unión de IgG humana a OPC

Cuando las IgG se unen a la superficie de una célula, se inicia la vía clásica de la activación del sistema de complemento, dando lugar a la formación del complejo terminal del complemento (C5b9). La activación de complemento debida a la unión de IgG de los LCR de EM a la superficie de las OPC se demostró utilizando el anticuerpo anti-C5b9 humano.

Las células vivas que se habían cultivado durante seis días se incubaron con IgG de pacientes con EM en presencia de LCR de EM para que se activara el complemento. Después, las células se fijaron y se marcaron con los anticuerpos A2B5 y anti-C5b9 humano. Encontramos algunas células intactas A2B5+ que no se habían unido ni a IgG humanas ni a C5b9 (células IgG/C5b9 negativas) (Figura 55, punta de flecha hueca). Estas células mantuvieron su morfología y se consideraron células “vivas”. Las OPC que se habían unido a IgG de EM (IgG humana positivas) también se marcaron con el anticuerpo anti-C5b9 (C5b9+) y su aspecto era una “huella” A2B5+ (Figura 55, punta de flecha blanca).

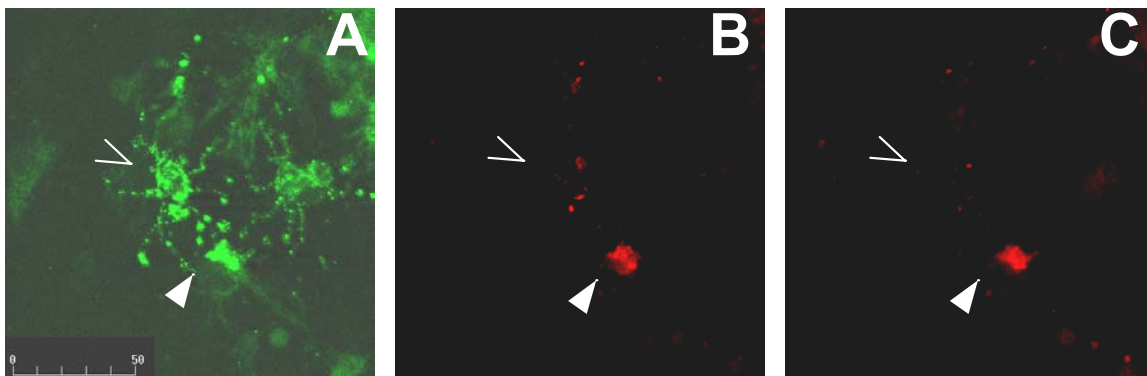


Figura 55. Activación del complemento en OPC por unión de IgG de LCR de pacientes con EM. Inmunocitoquímica de células vivas marcadas con IgG purificadas de LCR de pacientes con EM y con LCR de EM (0,1 ml/ml) para activar el complemento como se describe en Materiales y Métodos. Después, las células se fijaron y se marcaron con los anticuerpos A2B5 (A) y anti-C5b9 humano (B). Marcaje de IgG humana (C). Las imágenes muestran una célula A2B5+/IgG humana-negativa/C5b9-negativa (punta de flecha hueca) y una célula positiva A2B5/IgG humana/C5b9, con aspecto de “huella” A2B5+ (punta de flecha blanca).

Las OPC “vivas” (células A2B5+/IgG humana negativas/C5b9 negativas) y las OPC muertas por complemento (A2B5+/IgG humana+/C5b9+) se cuantificaron en la Tabla III. La incubación de células vivas con IgG de LCR de pacientes con EM originó una importante disminución en la población de OPC, que permanecieron intactas cuando las células se trataron con IgG de OEN (Tabla III). Las células A2B5+ incubadas con IgG y LCR de controles OEN no se unieron a IgG humanas y no se marcaron con el anticuerpo anti-C5b9 (Tabla III).

Tabla III. Cuantificación de la muerte de OPC mediada por complemento

	Células A2B5+/IgG-/C5b9- "células vivas"(N°/cm ²)	Células A2B5+/IgG+/C5b9+ "células muertas" (N°/cm ²)
IgG de OEN (control)	2021 ± 230	0
IgG de EM	516 ± 215***	1354 ± 91***

Los cultivos celulares se incubaron *in vivo* con IgG purificadas de pacientes control con OEN y EM en presencia de sus respectivos LCR reunidos (0,1 ml/ml) para activar el complemento. Después las células se fijaron y se marcaron con los anticuerpos A2B5 y anti-C5b9. Dos observadores independientes contaron las células en cada experimento. Los datos se expresan como media ± S.E.M. de seis experimentos independientes llevados a cabo por duplicado. ***, $p < 0,0001$ con respecto al control, con el test t de Student.

Las OPC intactas marcadas con IgG humana y anti-C5b9 sólo se pudieron observar utilizando células que se habían fijado antes de los marcajes con anticuerpos (Figura 56 A-C). Los quelantes de calcio y magnesio inhiben la activación de complemento, y además varios de sus componentes se inactivan por calor (Davis *et al.*, 1967). Nosotros inhibimos la activación del complemento cuando los LCR se calentaron a 56°C durante 30 minutos (Figura 56 D-F) o cuando se les añadió EDTA (Tabla IV).

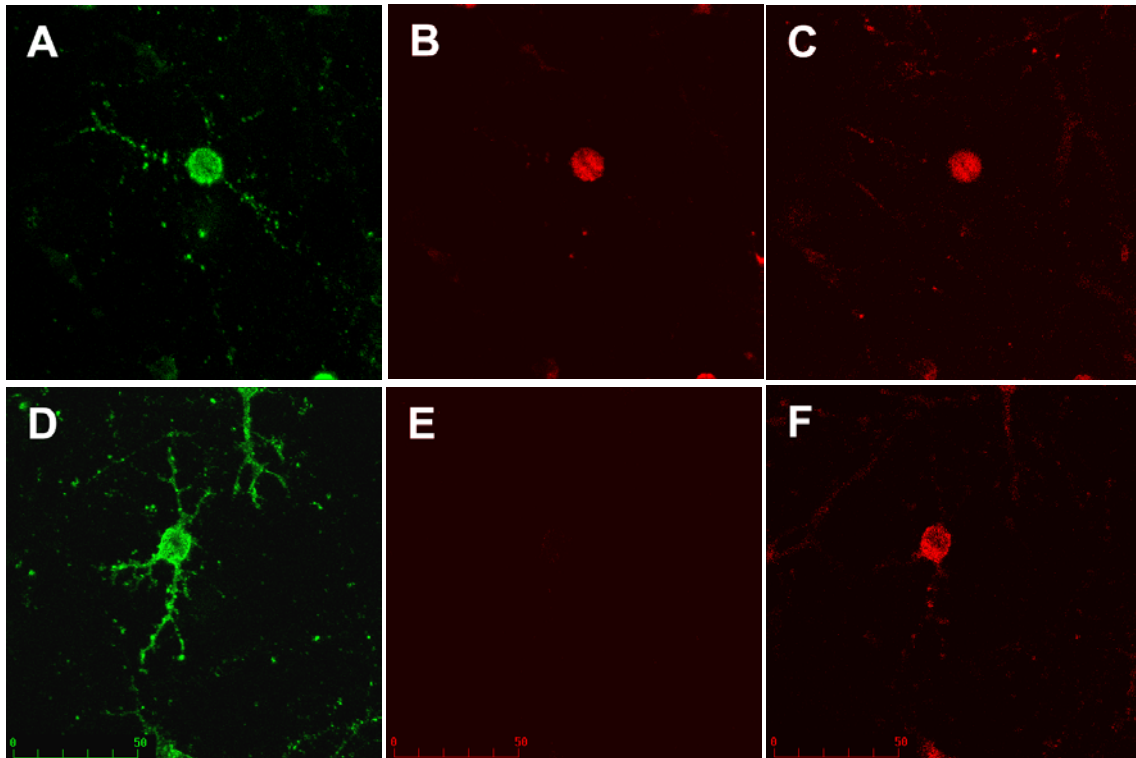


Figura 56. Inmunocitoquímica de células fijadas marcadas con LCR de EM, A2B5 y anti-C5b9 humano. Las células cultivadas durante 6 días se marcaron con anticuerpos A2B5 y anti-C5b9 humano y LCR de los pacientes con EM en los ensayos de inmunofluorescencia. El marcaje se realizó con los correspondientes anticuerpos anti-IgM de ratón conjugado con fluoresceína (A,D), anti-IgG de conejo conjugado con lisamina rodamina (B,E) y anti-IgG humana conjugado con Cy5 (C,F) como anticuerpos secundarios para marcaje triple. Se utilizaron LCR calentados a 56°C durante 30 minutos (D-F) y sin calentar (A-C). El marcaje con anticuerpo anti-C5b9 demuestra la activación de complemento en las células A2B5+. El anticuerpo anti-C5b9 colocalizó con los anticuerpos IgG de los LCR (B,C). Se puede observar el marcaje con anti-C5b9 cuando se produce la activación de complemento (B), mientras que este marcaje no pudo observarse cuando el complemento se inactiva por calor (E). Barra de escala en μm .

Tabla IV. Intensidad de fluorescencia debida a los anticuerpos IgG humana y anti-C5b9 por célula A2B5+

	Marcaje para IgG humana	Marcaje para C5b9 humano
LCR de controles	2,5 ± 1,6	11,7 ± 4,8
LCR de EM	22,0 ± 1,0***	47,1 ± 3,3**
+ EDTA 5 mM	21,6 ± 1,7	26,3 ± 4,4
+ EDTA 10 mM	21,4 ± 2,3	6,1 ± 3,0 ^a
+ 56 °C, 30 min	22,3 ± 1,6	2,6 ± 1,4 ^a

En los ensayos de inmunofluorescencia se utilizaron LCR de pacientes control y de EM. Antes de su uso se les añadió EDTA a la concentración indicada o se calentaron a 56° durante 30 min. En la tabla se indican los datos de intensidad de fluorescencia relativa de las marcas debidas a IgG y C5b9 en triple marcaje en las células A2B5+. La intensidad de fluorescencia se determinó como se describe en Materiales y Métodos y se expresa en intensidad de píxel en la escala de grises (valores entre 0 y 255). Los experimentos se realizaron con muestras de LCR de tres pacientes control y tres pacientes con EM. Los datos son la media ± S.E.M. de tres experimentos independientes llevados a cabo por duplicado. **, $p < 0.01$; ***, $p < 0.001$ con respecto al control; ^a, $p < 0,01$ con respecto a LCR de EM no tratados.

Además, se realizaron imágenes confocales en proyección tridimensional que demuestran la localización del sitio de unión de las IgG humanas en la superficie de las OPC y su colocalización con la marca del complemento en las células A2B5+/IgG humana+/C5b9+ (Figura 57 B, D).

Todos estos resultados demuestran que la Hsp90 presenta una localización extracelular en las OPC y que es inmunorreactiva frente a anticuerpos del LCR de pacientes con EM, dando lugar a la activación del complemento.

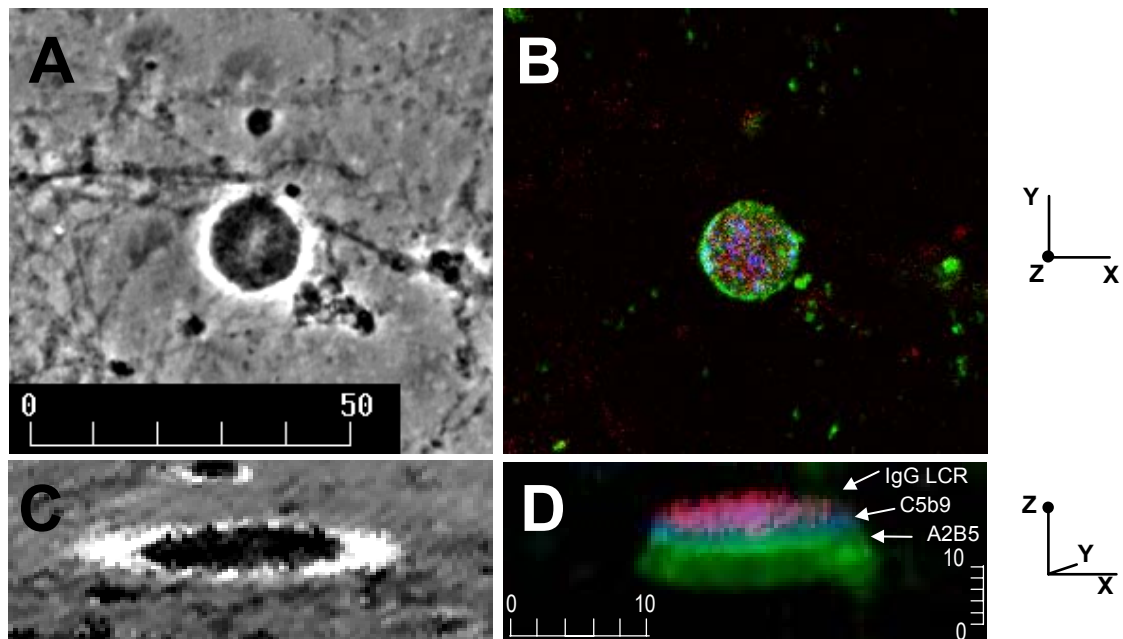


Figura 57. Localización del antígeno reconocido por IgG de los LCR y del complemento en la superficie de las OPC. (A) Imagen de una célula A2B5 observada con contraste de fase. (B) La célula muestra un triple marcaje para A2B5 (verde), IgG de LCR de EM (rojo) y anti-C5b9 (azul). (D) La proyección confocal tridimensional de la imagen B localizó los sitios de unión de las IgG de los LCR (rojo) y del complemento C5b9 (azul) en la superficie de las células marcadas con A2B5 (verde). La marca violeta muestra el comarcaje de rojo y azul. La marca blanca es debida a la superposición de las marcas roja y azul sobre la verde. Las imágenes A y C son las correspondientes a las B y D en contraste de fase. Los ejes representan el plano de cada proyección. La barra de escala está en μm .

5.12. Eliminación de las células O4⁺ en cultivos tratados con LCR de pacientes con EM

Los cultivos celulares de seis días se trataron durante otros siete días con LCR de pacientes con EM y controles, y las células se fijaron y se expusieron al anticuerpo O4. Se observó la eliminación de células O4⁺ en los cultivos tratados con LCR de pacientes con EM (Figura 58). Por el contrario, las células O4⁺ permanecieron intactas cuando los cultivos se trataron con LCR calentados (56°C durante 30 minutos), lo cual indica la existencia de un proceso mediado por complemento que impide el desarrollo de los oligodendrocitos (Figura 58 C).

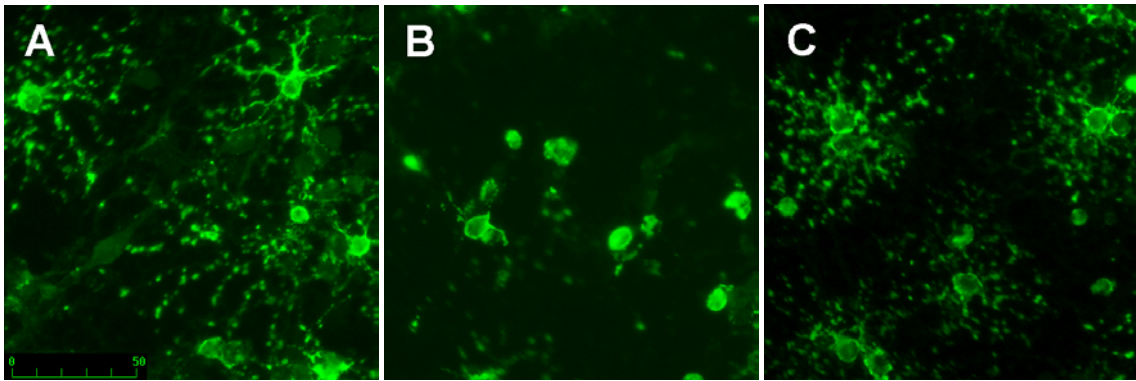


Figura 58. Eliminación de oligodendrocitos O4+ en cultivos celulares tratados con LCR de pacientes con EM. Los cultivos celulares de seis días se trataron con LCR durante otros 7 días, y entonces las células se marcaron y se trataron con anticuerpo O4 y con anticuerpo anti-IgM de ratón conjugado con rojo de rodamina como anticuerpo secundario. Las células se trataron con LCR de pacientes control (A), con LCR de pacientes con EM (B), o con LCR de pacientes con EM calentados a 56°C durante 30 minutos para inactivar el complemento. La figura B muestra la eliminación de células O4+ en cultivos tratados con LCR de pacientes con EM, pero las células O4+ permanecen íntegras cuando se trataron con LCR calentado (C). Barra de escala en μm .

DISCUSIÓN

1. MECANISMOS DE MUERTE CELULAR EN LAS NEURONAS

Para llevar a cabo el estudio del daño neuronal en la EM es importante contar con un modelo ya que existen grandes limitaciones en la disponibilidad de tejido nervioso humano. Los modelos clásicos de estudio de la EM, entre los que indudablemente destaca la EAE, incluyen fenómenos inflamatorios. Sin embargo, para estudiar al posible efecto de moléculas específicas frente a las neuronas hay que recurrir a modelos libres de células inflamatorias, como son los cultivos neuronales. Las técnicas de cultivo celular son un medio apropiado para el estudio de la complejidad del sistema nervioso y hacen posible la simulación del efecto sobre el comportamiento celular de la adición o eliminación de moléculas específicas. Además, ofrecen alternativas más sencillas que los modelos animales para evaluar sus posibles efectos tóxicos.

Con este modelo, en nuestro laboratorio hemos obtenido resultados que demuestran que los LCR de pacientes con EM RR contienen factores solubles capaces de inducir daño axonal y apoptosis de neuronas en cultivo. Esta fragmentación axonal que hemos observado en los cultivos también se ha puesto de manifiesto en los estudios patológicos que se han realizado en cerebros de pacientes con EM (Trapp *et al.*, 1998).

El número de axones dañados que se pueden observar en los estudios patológicos de EM parece mucho mayor que el número de neuronas con núcleos apoptóticos encontradas en estos mismos estudios (Dowling *et al.*, 1997). Sin embargo, el número de neuronas apoptóticas en un momento determinado no es representativo de la población total de células que acabarán muriendo. La apoptosis es un fenómeno dinámico que puede desarrollarse a lo largo de un periodo de tiempo prolongado en una población celular y esto no se puede reflejar adecuadamente en un estudio histológico (Schwartz y Milligan, 1996).

Nuestros resultados también pueden explicar la existencia de neurodegeneración en zonas sin inflamación en las IRM de pacientes con EM (Davie *et al.*, 1997; Narayanan *et al.*, 1997; Fu *et al.*, 2000). Los LCR pueden contener mediadores inflamatorios (Hartung *et al.*, 1992; Trapp *et al.*, 1998) que pueden inducir daño axonal y nuclear a distancia de las placas, que son el posible origen de tales moléculas. No obstante, la degeneración walleriana de las fibras que cruzan las áreas inflamadas también puede ser un mecanismo alternativo de daño axonal en la sustancia blanca de apariencia normal (Narayanan *et al.*, 1997; Simon *et al.*, 2000a).

La posibilidad de daño axonal en las lesiones agudas en pacientes con EM RR se ha descrito con anterioridad en estudios de IRM (Narayana *et al.*, 1998) y de anatomía patológica (Ferguson *et al.*, 1997; Trapp *et al.*, 1998). Nuestros datos relativos a la inducción de daño axonal pueden explicar las diferentes tasas de recuperación de los pacientes con EM RR después de los brotes. Las diferencias en el tipo o en la cantidad de factores solubles que causan el daño axonal, o en el tiempo que están presentes en el LCR, pueden inducir diferentes grados de daño axonal, y explicar la variabilidad en la recuperación de los brotes.

Este estudio también puede dar una explicación acerca del daño axonal, que parece ser una de las mayores causas de discapacidad en los pacientes con EM (Steinman, 2000; Trapp *et al.*, 2000). Puesto que se han descrito otros mecanismos que pueden explicar la pérdida axonal en la EM (Neumann *et al.*, 1995), nuestros resultados corroboran la idea de que la patogénesis de la EM podría ser de naturaleza heterogénea (Lucchinetti *et al.*, 1996) y el hecho de que algunos pacientes tengan tendencia a desarrollar lesiones destructivas (Van Walderveen *et al.*, 1999). También hemos demostrado que el efecto nocivo del LCR puede aparecer en la fase clínica más temprana de la enfermedad puesto que los LCR que se han obtenido en el primer brote han sido tóxicos para los cultivos, en concordancia con los resultados de los estudios de IRM (Brex *et al.*, 1998). Así pues, estaría indicado el tratamiento de los pacientes con EM RR en los estados iniciales de la enfermedad para evitar el déficit funcional permanente debido al daño axonal.

Todos estos resultados están de acuerdo con la relación entre la pérdida de axones y la incapacidad de los pacientes, sugiriendo que la disfunción y el daño neuronal pueden ser fundamentales en los mecanismos de discapacidad (De Stefano *et al.*, 2001). Hemos demostrado que los pacientes de EM con LCR capaces de inducir mayor apoptosis neuronal y daño axonal en cultivo, tuvieron una recuperación peor del brote. Esto podría ser una demostración de la correlación entre la recuperación clínica del brote y la apoptosis neuronal inducida por los LCR en cultivo. En este estudio, la incapacidad clínica de los pacientes se correlacionó más exactamente con la apoptosis neuronal cuando se utilizaron los valores de FS en lugar de los valores EDSS. Este resultado se debe a que el segundo índice puede no ser sensible a todos los cambios clínicos (Schwid y Trotter, 2000), que se reflejan mejor en la valoración directa de los sistemas funcionales afectados por el brote.

Las IRM son una herramienta fundamental en el diagnóstico de la EM y proporcionan la medida más sensible de la lesión y de la actividad de la enfermedad (Brück *et al.*, 1997). Se ha observado que la hipointensidad en T1 se correlaciona con una disminución en la concentración de NAA en ERM (Van Walderveen *et al.*, 1999) y con una reducción axonal histológica, que se puede encontrar incluso en lesiones débilmente hipointensas (Brück *et al.*, 1997; Van Walderveen *et al.*, 1998). Así pues, se ha sugerido que, como manifestación de la heterogeneidad de la patogénesis de la EM (Lucchinetti *et al.*, 1996), algunos pacientes tienden a desarrollar lesiones más destructivas, que muestran mayor hipointensidad en T1 (Van Walderveen *et al.*, 1999). Hemos estudiado las lesiones en T1 de cada caso y hemos encontrado que existe una correlación entre la recuperación del brote y el grado de hipointensidad de las lesiones. Hasta ahora no se había descrito una correlación tan estrecha en estudios de hipointensidad en T1, si bien estos otros estudios han sido realizados con un elevado número de pacientes con EM. Los cambios clínicos de los pacientes con EM presentaron una mejor correlación con la hipointensidad de las lesiones en T1 cuando se comparó la lesión más hipointensa en lugar de la media de las lesiones hipointensas. Hemos demostrado que los pacientes con LCR más agresivos tenían las lesiones más hipointensas y que el porcentaje de apoptosis neuronal inducida por el LCR se correlacionaba muy bien con la hipointensidad de las lesiones en T1. Es interesante que los LCR de todos los pacientes con lesiones hipointensas en T1 causaron un aumento significativo de apoptosis, mientras que todos los LCR que no indujeron tales efectos correspondían a pacientes sin lesiones en T1.

Todos estos resultados nos llevan a la conclusión de que existe un subgrupo de pacientes con EM (ANA) que presentan una enfermedad más agresiva con recuperación clínica del brote incompleta y con lesiones en T1 más hipointensas. Estos fenómenos son consistentes con los ensayos en los cultivos, en los que los LCR de estos pacientes con EM inducen apoptosis neuronal. Nuestros resultados sugieren una relevancia patológica del efecto nocivo en las neuronas en cultivo, ya que este mismo hecho puede ocurrir en los cerebros de los pacientes con EM; por lo tanto, el daño neuronal en cultivo puede ser un reflejo del daño axonal *in vivo*, impidiendo la recuperación clínica después del brote.

Hasta el momento no se dispone de ningún ensayo específico para evaluar el pronóstico de recuperación de los brotes de EM. El grado de remisión de un brote agudo de EM se ha asociado significativamente con el pronóstico favorable de la enfermedad

(Runmarker y Andersen, 1993). Nuestro estudio demuestra que los cambios clínicos en los pacientes con EM acerca de la recuperación del brote son significativamente peores en los que presentan lesiones en T1 más hipointensas y cuyos LCR son capaces de dañar a las neuronas en cultivo. Este efecto en el cultivo está correlacionado estrictamente con la hipointensidad de las lesiones en T1 *in vivo* en la IRM de los pacientes.

El efecto neurotóxico del LCR sobre cultivos de neuronas se ha estudiado con anterioridad en algunas enfermedades neurodegenerativas. Por ejemplo, se ha demostrado que una neurotoxina similar a la *N*-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetrahidropiridina (MPTP) se libera al LCR de pacientes con enfermedad de Parkinson e induce apoptosis en líneas de neuronas dopaminérgicas en cultivo (Le *et al.*, 1999). El LCR de pacientes con enfermedades de motoneurona induce apoptosis en cultivos primarios de médula espinal de rata (Tikka *et al.*, 2002) y disminuye la supervivencia de las neuronas en cultivos primarios de corteza de embrión de rata (Cid *et al.*, 2003a). En otros estudios se ha estudiado el efecto neurotóxico del LCR en enfermedades inflamatorias del SNC y por ejemplo, el LCR en la meningitis bacteriana también tiene capacidad neurotóxica (Braun *et al.*, 1999). Por último, la inducción de apoptosis por LCR de pacientes con EM se ha demostrado recientemente en cultivos de astrocitos y de oligodendrocitos inmortalizados, aunque la molécula responsable no se ha caracterizado todavía (Ménard *et al.*, 1998).

Nuestros resultados concluyen claramente que el factor soluble del LCR de pacientes con EM que induce apoptosis y daño axonal en los cultivos neuronales no está correlacionado con los parámetros inflamatorios estudiados del LCR (número de células, cociente de albúmina o índice de IgG). De acuerdo con esto, tampoco el complemento, parece ser el responsable del daño ocasionado por los LCR de pacientes con EM sobre las neuronas, puesto que su inactivación no evitó su efecto en estas células. Y, en la misma línea, la falta de relación entre el índice de IgG y el daño neuronal, y los efectos similares inducidos sobre las neuronas por los LCR con o sin IgG e IgM, también descartan la participación de estas proteínas. Estos resultados están de acuerdo con el hecho de que, en estudios patológicos de EM, la salida de proteínas procedentes del suero que reflejan rotura de la BHE, aparecen en zonas del SNC sin desmielinización ni daño tisular (Kwon y Prineas, 1994; Brück *et al.*, 1997). De acuerdo con estos resultados, mediante ensayos de exclusión molecular con membranas de

filtración se descartaron todas las moléculas con tamaños moleculares mayores de 30 kDa, por ejemplo las inmunoglobulinas.

Con el objetivo de identificar al factor neurotóxico de los LCR se ha realizado un análisis comparativo con una serie de compuestos conocidos como inductores de apoptosis, entre los que se encuentran aminoácidos excitatorios y péptidos de diversa naturaleza. El glutamato es el principal neurotransmisor excitatorio en el sistema nervioso de los mamíferos. Su concentración excesiva en el espacio extracelular es neurotóxica, y se ha descrito que puede estar involucrado en la patología de diversas enfermedades neurodegenerativas, incluida la EM (Pitt *et al.*, 2000, 2003). Los linfocitos T activados, macrófagos y glía residente de las zonas con inflamación en la sustancia blanca del SNC provocan la liberación de glutamato. Este glutamato extracelular se une a los receptores AMPA/kainato (Steinman, 2000) y la activación selectiva de estos receptores induce un aumento en la concentración de calcio intracelular de 2 a 8 veces en las neuronas y los oligodendrocitos produciendo su muerte, la cual se previene con antagonistas de estos receptores, como el NBQX. El tratamiento con NBQX reduce la pérdida de axones y de oligodendrocitos sin modificar la respuesta inflamatoria (Pitt *et al.*, 2000; Smith *et al.*, 2000). Sin embargo, hemos comprobado que la concentración de glutamato como aminoácido libre en el LCR de los pacientes con EM es mucho menor (2 μM) que la concentración tóxica mínima en nuestro modelo (6 μM). Si bien, este efecto tóxico del glutamato 6 μM se inhibió en presencia de NBQX, lo cual confirma la intervención de los receptores AMPA/kainato en la neurotoxicidad por glutamato en las neuronas en cultivo. Por otra parte, la alteración en la homeostasis del glutamato conduciría a una activación de la calpaína (Wang *et al.*, 1998), una cistein-proteasa dependiente de calcio, que se activa en ciertas condiciones patológicas (Nath *et al.*, 1996) pero que nosotros no detectamos en los cultivos tratados con LCR. Así pues, hemos descartado al glutamato como agente inductor de apoptosis en el LCR de los pacientes.

También se analizaron diversos péptidos con pesos moleculares menores de 30 kDa que se han relacionado con la inducción de apoptosis en la EM, tales como TNF- α (Sharief *et al.*, 1991). Su tiempo de retención en los cromatogramas no coincidió con los de las fracciones tóxicas de los LCR. Los resultados obtenidos con TNF- α están de acuerdo con los publicados anteriormente en los que se mostraba que los niveles medidos de TNF- α no eran significativamente diferentes entre los pacientes con EM ni

diferentes de los niveles encontrados en los controles (Alcázar *et al.*, 2000). Respecto al pentapéptido QYNAD, no hemos encontrado que sea neurotóxico en dosis de hasta 50 μ M. Además, no ha sido posible su identificación en los LCR de pacientes con EM mediante espectrometría de masas, que ha sido publicada recientemente (Brinkmeier *et al.*, 2000).

Por último, el análisis por HPLC de la fracción del LCR menor de 30 kDa demostró que las fracciones 3 y 7 de los cromatogramas son las que contienen las moléculas inductoras de apoptosis. El intento de detección de estas fracciones tóxicas de los LCR por espectrometría de masas MALDI-ToF y por espectrometría de masas con electrospray no ha resuelto la identificación de los compuestos.

Se ha propuesto que la apoptosis neuronal puede ser el resultado de una señal citotóxica (Alcázar *et al.*, 2000; Peterson *et al.*, 2001) o estar causada por un ataque inflamatorio durante el proceso de desmielinización (Meyer *et al.*, 2001; Peterson *et al.*, 2001). Hasta el momento, no se conocen los estímulos que inducen la apoptosis, pero el mecanismo de muerte neuronal en la EM puede tener una gran importancia terapéutica. La existencia de apoptosis neuronal en la EM ha sido un hallazgo reciente. Por una parte, en nuestro laboratorio se ha demostrado que los LCR de pacientes con EM inducen muerte celular por apoptosis en neuronas cultivadas (Alcázar *et al.*, 1998; Alcázar *et al.*, 2000), lo cual está correlacionado con la evolución clínica de los pacientes (Cid *et al.*, 2002) y además, se han identificado neuronas apoptóticas tanto en lesiones corticales de EM (Peterson *et al.*, 2001) como en la EAE (Meyer *et al.*, 2001).

En este estudio se ha continuado utilizando el modelo de cultivo neuronal embrionario de rata, teniendo en cuenta que la activación de las caspasas en mamíferos es un mecanismo extremadamente conservado.

Uno de los objetivos de este trabajo fue caracterizar la muerte inducida por LCR en neuronas cultivadas de rata con el fin de conocer el mecanismo de señalización de las caspasas que opera dentro de las células. Además, intentamos determinar si era posible proteger a las neuronas de la muerte por apoptosis.

La iniciación de la cascada apoptótica se lleva a cabo por la activación de un receptor de muerte, o por la falta de un factor de crecimiento. A partir del receptor de muerte se activa la caspasa 8. Las caspasas también se pueden activar por la vía mitocondrial a través de la caspasa 9. Ambos caminos conducen a la activación de la caspasa 3, que se considera la “ejecutora central de la apoptosis”. Nuestros resultados

demuestran que la caspasa 3 y en menor proporción la caspasa 9, pero no las caspasas 1 y 8, se activan en los cultivos neuronales en respuesta al tratamiento con LCR de pacientes con EM. Así pues los resultados previos que describían la inducción de apoptosis neuronal en cultivo (Alcázar *et al.*, 2000) se corroboran por estos resultados que demuestran la inducción de la actividad de la caspasa 3, enzima esencial en la apoptosis (Cid *et al.*, 2003b).

La caspasa 1 está especialmente involucrada en el proceso inflamatorio ya que regula la salida extracelular de citoquinas proinflamatorias tales como IL (interleuquina)-1 β e IL-18. Los niveles de RNAm de la caspasa 1 están correlacionados con la actividad de la enfermedad en pacientes con EM (Furlan *et al.*, 1999). Además, la transcripción de la caspasa 1 se induce y está correlacionada con las tasas de transcripción de la citoquinas proinflamatorias TNF- α , IL-1 β , IFN- γ e IL-6 en la EAE. Puesto que algunas de estas citoquinas también tienen acciones proapoptóticas, buscamos si existía una relación directa entre la activación de la caspasa 1 y la muerte neuronal inducida por LCR. La actividad de la caspasa 1 que se encontró en los extractos celulares fue baja o indetectable, lo cual descarta a las citoquinas proinflamatorias y a la caspasa 1 en la apoptosis neuronal inducida por LCR de pacientes con EM. Este resultado está de acuerdo con el hecho de que los cultivos neuronales son un modelo experimental en el que no intervendrían procesos inflamatorios.

La caspasa 3 es la responsable de llevar a cabo la ejecución de la apoptosis. En este trabajo se demuestra que la actividad de la caspasa 3 se induce en neuronas por LCR de pacientes con EM y la contribución de la apoptosis neuronal en la patogenia de la EM. Las neuronas desmielinizadas son especialmente susceptibles a las señales apoptóticas, esenciales en el desarrollo y diferenciación del SNC. El caso más llamativo de fenotipo apoptótico que se ha descrito hasta el momento es el del ratón *knockout* en caspasa 3. Sus anomalías están restringidas a la apoptosis neuronal, dando lugar a alteraciones sustanciales en las estructuras cerebrales y en especial en los ventrículos, nervio óptico y médula espinal. Sin embargo, estos defectos no se extienden a otros tejidos o sistemas (Nicholson y Thornberry, 1997).

Es interesante destacar que los inhibidores de caspasas permeables Ac-YVAD-cmk y AC-DEVD-cmk proporcionan significativos niveles de protección contra los mediadores solubles nocivos presentes en el LCR de pacientes con EM. Aunque la actividad de la caspasa 1 fue baja o indetectable, ambos inhibidores de las caspasa 1 y 3

restauraron la supervivencia neuronal por igual. El efecto del inhibidor de la caspasa 1 se puede explicar porque Ac-YVAD-cmk fue también capaz de inhibir parcialmente la actividad caspasa 3. En este resultado también hay que tener en cuenta las diferencias entre estos inhibidores en cuanto a su capacidad de internalización celular y a sus potenciales efectos inhibitorios sobre las caspasas iniciadoras.

Entre las caspasas iniciadoras que podrían activar a la caspasa 3 se encuentra la caspasa 8. En los cultivos neuronales tratados con LCR de pacientes con EM, hemos comprobado que la caspasa 8 no es la caspasa iniciadora de apoptosis, lo que nos permite descartar la intervención de los receptores de muerte. Este resultado corrobora la ausencia de participación de un activador de caspasa 8 como es el TNF- α en este proceso de apoptosis.

En las placas desmielinizadas activas, las vainas de mielina y algunas células son atacadas constantemente. Su destrucción produce abundantes productos de degradación de la mielina y restos lipídicos que pueden ser inductores de apoptosis. Entre estos compuestos, la ceramida es un segundo mensajero implicado en la señalización de la apoptosis que interrumpe el transporte electrónico en la mitocondria (Green y Reed, 1998). En los cultivos dañados por LCR, se observaron neuronas con alteración en la función mitocondrial según el ensayo de MTT. Las caspasas también se pueden activar por la vía mitocondrial mediante la familia Bcl-2 que se asocia con la mitocondria y libera citocromo c y otras proteínas que activan la caspasa 9. En los cultivos neuronales tratados con LCR de pacientes con EM hemos observado que los valores obtenidos en los ensayos de activación de la caspasa 9 son bajos y no nos permiten concluir que solamente la caspasa 9 sea la caspasa iniciadora en este proceso apoptótico. Se ha intentado resolver esta polémica mediante el empleo de técnicas alternativas tales como inmunodetección con anticuerpos anti-caspasa 9 y mediante ensayos preliminares de inmunocitoquímica. Los resultados obtenidos nos permiten concluir que existe actividad caspasa 9, si bien su actividad no parece alcanzar valores suficientemente elevados como para ser la única caspasa iniciadora. Este resultado podría tener varias explicaciones: (i), la reducida actividad de la caspasa 9 observada podría ser suficiente para activar la caspasa 3. (ii), La caspasa 3 podría sufrir un proceso de autocatálisis exponencial, una vez iniciado el proceso de activación por la caspasa 9. Las caspasas son proteasas que pueden regular su propia activación, y la proteasa activa puede directa o indirectamente activar a su propio precursor, lo cual ocasiona una activación exponencial (Thornberry y Lazebnik, 1998). (iii), Podría existir una activación

secundaria de la caspasa 9 debido a su hidrólisis por otra proteasa que podría ser la caspasa 3. Una situación análoga, en la que la caspasa 3 actúa como caspasa iniciadora de la caspasa 9 se ha descrito también en líneas celulares de leucemia humana (Varghese *et al.*, 2003). (iv), Podría existir otra caspasa iniciadora de apoptosis que activaría a la caspasa 3, y que podría ser la caspasa 12 (Morishima *et al.*, 2002). Sin embargo, esto implicaría un estrés del retículo endoplásmico con liberación de iones de calcio al citosol, con posible activación de calpaína que no se ha podido detectar en nuestros cultivos tratados con LCR.

Dado que el inhibidor de la caspasa 9, z-LEHD-fmk, no previene la apoptosis de forma total hasta alcanzar los valores control, es lógico pensar que la caspasa 9 no sería la única caspasa activadora de la caspasa 3. No obstante, dicho inhibidor sí previene parcialmente la apoptosis, lo cual indicaría la participación de la caspasa 9 en la señalización apoptótica. Por lo tanto, creemos que la opción más probable sería la autocatálisis de la caspasa 3 después de que la caspasa 9 iniciara el proceso.

Por último, estudios recientes permiten concluir que la progresión de la enfermedad se correlaciona mejor con el daño neuronal que con el grado de desmielinización o con las lesiones inflamatorias agudas. La inhibición de las caspasas no siempre inhibe la muerte celular inducida por estímulos proapoptóticos (Green y Reed, 1998) pero en este caso, los inhibidores de la caspasa 3 sí son capaces de prevenir la muerte neuronal. Hemos demostrado que es posible interferir en la ruta apoptótica y proteger a las células de la muerte neuronal inducida por LCR. Así pues, la capacidad de bloquear la apoptosis neuronal en los seres humanos sería de gran interés en el tratamiento de la EM.

2. MECANISMOS DE MUERTE CELULAR EN LAS CÉLULAS PRECURSORAS DE OLIGODENDROCITOS

Algunos autores consideran que la característica fundamental de las lesiones en la EM no es la desmielinización sino la falta de remielinización (William y Keirstead, 1999). Así pues, es necesario entender por qué la remielinización falla para desarrollar estrategias capaces de promoverla. El ataque inmune a los precursores de oligodendrocitos es un mecanismo posible que podría comprometer la capacidad de remielinización de las lesiones. Teniendo en cuenta los antecedentes bibliográficos que relacionan las inmunoglobulinas con la oligodendrogía, se modificaron las condiciones

de cultivo con la intención de favorecer el desarrollo de las células oligodendrogliales y poder observar el efecto que sobre ellas tenían los LCR. Con el objetivo de verificar si las OPC, que también existen en los humanos adultos, son la diana de un ataque autoinmune que impediría la remielinización, se llevó a cabo un estudio en el que se identificaron anticuerpos en el LCR de pacientes con EM que reconocen específicamente a las OPC.

En primer lugar, se caracterizaron por su morfología y por técnicas inmunocitoquímicas los distintos tipos celulares del cultivo. En los cultivos de nervio óptico, el anticuerpo A2B5 identifica a precursores gliales tempranos denominados OPC. Estas células son capaces, dependiendo de las condiciones de cultivo, de diferenciarse hacia oligodendrocitos o hacia astrocitos tipo 2. Cuando las OPC se cultivan en medio sin suero, se diferencian a oligodendrocitos (Raff *et al.*, 1983b; Temple y Raff, 1985; Raff, 1989). Se han utilizado anticuerpos específicos para detectar distintas estirpes de oligodendrocitos en cultivos celulares: A2B5 para OPC y O4 para preoligodendrocitos. Estas células precursoras de oligodendrocitos se han identificado en el SNC humano adulto como células bipolares A2B5+ o multipolares A2B5+/O4+ (Armstrong *et al.*, 1992; Scolding *et al.*, 1995; Roy *et al.*, 1999; Scolding *et al.*, 1999). En este trabajo, los cultivos celulares se prepararon a partir de los hemisferios cerebrales de rata prenatal y se mantuvieron *in vitro* durante 6 días. Las células se cultivaron en medio sin suero, y, según criterios morfológicos e inmunocitoquímicos, aquellas que fijaron el anticuerpo A2B5 correspondiente las OPC se identificaron como A2B5+. Estas células mostraron morfología bipolar e inmunorreactividad A2B5+/GFAP- típica de OPC. Después, se observaron células A2B5+ con morfología estrellada y, más tarde aún, aparecieron células multipolares que fijaban el anticuerpo O4, característico de preoligodendrocitos (Sommer y Schachner, 1981) e indicativo de diferenciación celular en la estirpe oligodendroglial. Desde 6 hasta 12 días, las células cultivadas bipolares A2B5+/GFAP- disminuyeron *in vitro* al tiempo que aparecían oligodendrocitos O4+, como se había descrito en nervio óptico de rata adulta (Shi *et al.*, 1998) y en cultivos de células humanas adultas (Armstrong *et al.*, 1992; Roy *et al.*, 1999). Estos resultados, y las cantidades de cada tipo de estas células, demostraron que las células A2B5+ dieron lugar a oligodendrocitos en nuestras condiciones de cultivo, mientras que el número de células GFAP+ permaneció constante. GFAP, la mayor subunidad de los filamentos gliales, se utiliza como marcador de astrocitos de vertebrados tanto en cultivos como en secciones de tejido (Raff *et al.*, 1983a). Nosotros encontramos que las células GFAP+

con morfología típica de astrocitos mostraron inmunorreactividad A2B5- y que las células A2B5+ cultivadas nunca desarrollaron antigenicidad GFAP.

Las interacciones célula-célula son necesarias para la diferenciación celular en cultivo, así como para la proliferación y diferenciación de OPC. Esto también depende de las señales que proceden de otras células (Raff, 1989; Temple y Raff, 1985; Barres *et al.*, 1992), por ejemplo, la actividad eléctrica en los axones circundantes controlan la producción o liberación de factores de crecimiento que son responsables del desarrollo de células precursoras de oligodendrocitos en la región (Barres *et al.*, 1992; Barres y Raff, 1993). Puesto que el nervio óptico es una de las zonas más simples del SNC con células progenitoras, pero no contiene neuronas intrínsecas, nuestros cultivos se prepararon a partir de los hemisferios cerebrales, con la intención de conseguir una aproximación más cercana a las condiciones *in vivo* de los pacientes de EM con regiones lesionadas (Noseworthy *et al.*, 2000).

Hemos demostrado que anticuerpos del LCR de los pacientes con EM reconocen específicamente un antígeno en la superficie de las OPC que se ha identificado como Hsp90 β . Los anticuerpos detectados en los LCR estuvieron presentes en el 84,8% de los pacientes con EM.

Se emplearon diversos controles con el fin de confirmar los resultados obtenidos, entre ellos el más importante es el uso de altas concentraciones de IgG procedentes de donantes de sangre, las cuales no se unieron a las OPC. Además, se relacionó la intensidad de fluorescencia de las IgG unidas a OPC con la concentración de IgG de los LCR de pacientes con EM. Ni concentraciones crecientes de IgG procedentes de donantes de sangre ni las altas concentraciones de IgG de los pacientes de polirradiculoneuropatía dieron valores de intensidad de fluorescencia elevados en las OPC.

Por otra parte, nuestros resultados también demuestran que sólo las IgG y no las IgM de los LCR son capaces de unirse a las OPC y desencadenar el daño celular.

Los anticuerpos de los LCR de los pacientes con EM reconocieron antígenos específicos en los extractos celulares de las células cultivadas. El 78,8% de los LCR individuales de EM detectaron un antígeno de 82 kDa, y este porcentaje fue análogo a las muestras de LCR de EM que reconocieron OPC en los ensayos de inmunofluorescencia. Además, los LCR de las muestras control no mostraron reacción con este antígeno en concordancia con los resultados de los análisis de inmunofluorescencia. Estos resultados destacan la posible importancia del antígeno de

82 kDa. En primer lugar, inmunoprecipitamos el antígeno de 82 kDa en los extractos celulares obtenidos de los cultivos celulares utilizando IgG purificadas a partir de mezclas de LCR de EM e identificamos esta proteína por MALDI-ToF-MS como Hsp90 β . Se realizaron varios experimentos adicionales para confirmar estos resultados: (i), los anticuerpos anti-Hsp90 monoclonal y anti-Hsp90 β policlonal detectaron la proteína Hsp90 en la posición de 82 kDa en ensayos de inmunodetección de extractos celulares y marcaron las OPC en los ensayos de inmunofluorescencia de una manera similar a como lo hicieron los anticuerpos de los LCR de EM. (ii), Las IgG inmunopurificadas a partir de LCR de EM contra el antígeno de 82 kDa – que reconocieron el antígeno como una banda simple en las membranas de los extractos celulares – marcaron las OPC. (iii), Los ensayos de competencia con LCR de EM y con anticuerpo monoclonal anti-Hsp90 mostraron un bloqueo en la reacción de las IgG de los LCR. Y (iv), La Hsp90 inmunoprecipitada con anticuerpo monoclonal también fue reconocida por los anticuerpos de los LCR de EM. Por último, los experimentos de 2-DE, transferencia e inmunodetección demostraron que los anticuerpos de los LCR de EM sólo reconocieron dos bandas en la posición de 82 kDa con la misma localización exactamente en que los anticuerpos anti-Hsp90 monoclonal y policlonal reconocieron dos isoformas de Hsp90 β . Además, en los cultivos de 6 a 12 días, el número de OPC disminuyó en paralelo a la reducción de la señal de Hsp90 inmunodetectada en membranas tanto por los anticuerpos de los LCR de EM como por el anticuerpo monoclonal anti-Hsp90, demostrando que el antígeno Hsp90 detectado en las membranas corresponde a las OPC. Todos estos resultados demuestran que la Hsp90 expresada sobre las OPC es un antígeno reconocido por anticuerpos IgG de los LCR de pacientes con EM.

Diversas proteínas de membrana, tales como la MBP, MAG y MOG (Sun *et al.*, 1991; Sun *et al.*, 1991; Warren y Catz, 1994; Genain *et al.*, 1999), gangliósidos (Sadatipour *et al.*, 1998), y algunas proteínas de choque térmico (Goldbaum y Richter-Landsberg, 2001) -consideradas antígenos potenciales en la EM- sólo se han descrito en oligodendrocitos maduros (Storch *et al.*, 1998; Goldbaum y Richter-Landsberg, 2001). Sin embargo, este antígeno que reconocen las IgG de los LCR sólo está presente en las OPC y ni siquiera lo está en los preoligodendrocitos O4+. Otro posible antígeno descrito en la EM, la glucoproteína AN2 (Niehaus *et al.*, 2000), se ha detectado sólo en preoligodendrocitos O4+ (Niehaus *et al.*, 1999) de ratón y se ha identificado

posteriormente como la proteína homóloga de rata NG2, expresada por los precursores de oligodendrocitos. Nosotros hemos detectado la proteína NG2 por transferencia e inmunodetección utilizando el anticuerpo policlonal anti-NG2, sin embargo la proteína NG2 no fue reconocida por las IgG de los LCR y no se han podido reproducir los resultados obtenidos con AN2. Además hay que tener en cuenta que el antígeno AN2 sólo fue encontrado por inmunodetección utilizando la glucoproteína AN2 purificada (Niehaus *et al.*, 2000).

O4 es un marcador de precursores más diferenciados que A2B5, y no se ha probado que los preoligodendrocitos O4+ humanos proliferen *in vitro* (Armstrong *et al.*, 1992) ni en las lesiones crónicas de EM (Wolswijk, 1998). Así pues, es de interés la identificación de células A2B5+/O4-. No hemos podido comprobar si las células A2B5+ de nuestros cultivos eran también O4+, porque ambos eran anticuerpos monoclonales IgM de ratón. Sin embargo, puesto que detectamos el antígeno Hsp90 sólo en células A2B5+ y nunca en preoligodendrocitos multipolares O4+, creemos que las células reconocidas por las IgG de los LCR deben corresponder fundamentalmente a células progenitoras de oligodendrocitos A2B5+/O4- que deben ser la diana principal de los anticuerpos anti-Hsp90 humanos. Además, en nuestros cultivos celulares (cultivados durante 6 días) el número de preoligodendrocitos O4+ representan menos del 1% de las células y los oligodendrocitos O1+ son inexistentes.

Junto con la Hsp90, hemos inmunoprecipitado Hsp70 y β -actina que podrían ser otros antígenos posibles. Sin embargo, hemos detectado pocas muestras de LCR de pacientes con EM capaces de detectar Hsp70 o β -actina en membranas, y la β -actina no se detectó en los ensayos de inmunofluorescencia. Hsp70 y Hsp90 son proteínas muy relacionadas que forman complejos (Frydman, 2001) y es conocido que la β -actina se une a Hsp70 y Hsp90. Así pues, es posible la co-inmunoprecipitación de Hsp70 y β -actina con Hsp90.

Los anticuerpos de los LCR de EM no detectaron las grandes cantidades de Hsp90 que existen en la fracción citosólica. Estos anticuerpos de los LCR tampoco detectaron la Hsp90 purificada de células HeLa. Los resultados obtenidos con los experimentos de electroforesis bidimensionales demostraron que los anticuerpos de los LCR de EM reconocen isoformas específicas de Hsp90 y no detectan otras isoformas diferentes de Hsp90, por ejemplo las presentes en las células HeLa. Se han descrito diversas isoformas de Hsp90 -con las mismas masas moleculares y localizadas en la

región ácida del gel- que corresponden a diferentes formas inducibles o a diferentes estados de fosforilación (Takenaka y Hightower, 1992). Por lo tanto, es posible que los anticuerpos de los LCR de EM reconozcan isoformas de Hsp90 que están poco expresadas en citosol.

Los anticuerpos IgG de los LCR y el anticuerpo A2B5 se localizaron por imágenes de microscopía confocal en posiciones diferentes. Las IgG de los LCR se unieron en el exterior del cuerpo celular de las células A2B5+, y no reconocieron el antígeno en la región celular rica en gangliósidos que es la reconocida por el anticuerpo A2B5, lo cual está de acuerdo con el hecho de que en los análisis por ELISA de gangliósidos no se detectara reacción. Esta localización del antígeno es consistente con las observaciones realizadas en los ensayos de inmunofluorescencia con células no permeabilizadas, en los que se puede concluir que se encuentra sobre la superficie celular.

Los ensayos de inmunofluorescencia con células fijadas detectaron el antígeno Hsp90 en una localización extracelular. Esta localización está de acuerdo con el fraccionamiento subcelular en el que se detectó el antígeno en la fracción de membrana, y con el marcaje de las OPC en las células vivas. La Hsp90 se ha localizado en la superficie celular en células tumorales humanas (Ferrarini *et al.*, 1992) y en líneas de células tumorales de ratón (Sapozhnikov *et al.*, 1999), así como en células microgliales en la enfermedad de Alzheimer (Kakimura *et al.*, 2002). La expresión de la Hsp90 en la superficie celular podría suponer una diana para la respuesta inmune, que ya se ha descrito en algunas enfermedades como las formas autoinmunes de la artritis reumatoide (Hayem *et al.*, 1999) o en el cáncer de mama (Conroy y Latchman, 1996).

La localización del antígeno reconocido por las IgG humanas en la superficie de las OPC podría jugar un papel importante en la fijación del complemento. Cuando ciertas moléculas de anticuerpo, tales como IgG e IgM, se unen a la superficie de una célula, se dispara la ruta clásica de activación del sistema de complemento (Alberts *et al.*, 1983) dando lugar a la formación del complejo terminal del complemento (C5b9) (Figura 59 A). Dos de estos complejos se combinan para formar el complejo lítico que constituye un canal transmembranal, que ocasiona la muerte de la célula (Figura 59 B). Las proteínas del complemento se han detectado en el LCR (Spiegel *et al.*, 1998). El SNC produce varios componentes del sistema de complemento, y obviamente, en las enfermedades del sistema nervioso que alteran la integridad de la barrera hematoencefálica, tales como la EM, aumenta el paso de proteínas del complemento

desde el suero hacia el LCR. El uso del anticuerpo humano anti-C5b9 demuestra que la unión de IgG de los LCR de los pacientes con EM produce activación del complemento con la formación del complejo terminal del complemento.

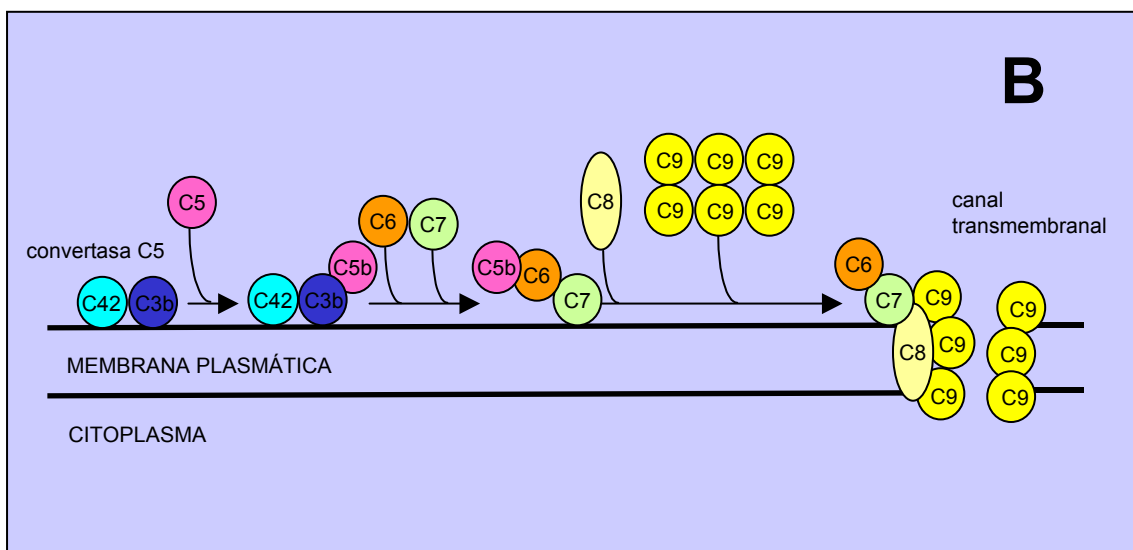
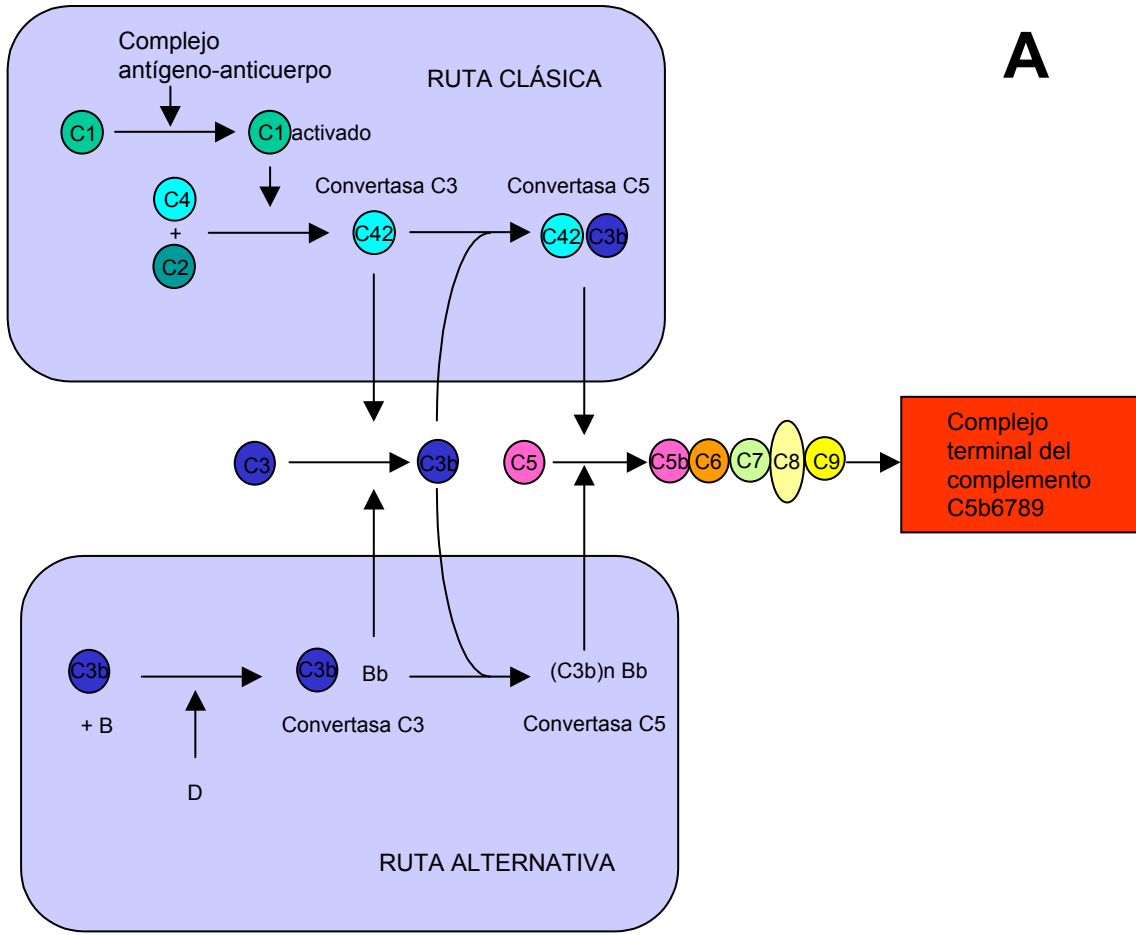


Figura 59. Activación del complemento. (A) El sistema de complemento, que está formado por una treintena de proteínas plasmáticas, tiene un papel fundamental en los mecanismos de defensa contra agentes infecciosos y en el proceso inflamatorio. Dentro de este sistema, varias proteínas de membrana reguladoras previenen la activación autóloga del complemento y protegen a las células de ataques accidentales. La activación del sistema se realiza a través de dos rutas: la clásica o la alternativa. La ruta clásica interviene en la respuesta específica de los anticuerpos y se activa especialmente cuando algunas moléculas de anticuerpos (IgM o IgG) se unen a una partícula extraña. La ruta alternativa es importante en los mecanismos de defensa contra infecciones bacterianas. A diferencia de la ruta clásica, la ruta alternativa se activa por microorganismos y no es necesariamente un proceso dependiente de anticuerpos. La ruta clásica requiere Ca^{2+} y Mg^{2+} , mientras que la ruta alternativa requiere sólo Mg^{2+} . En ambas rutas de activación, la rotura y activación del componente C5 conduce a la formación del complejo terminal del complemento (C5b9). (B) El complejo C5b9 está formado por unas veinte moléculas. Por cada molécula de C5b, C6, C7 y C8, contiene una o más moléculas de C9. La unión de una molécula C8 a cada complejo C5b67 da lugar a pequeños canales transmembranales. Cada complejo C5b678 actúa como un receptor de numerosas moléculas C9 que inician un proceso de oligomerización en el sitio de ataque de la membrana. Este complejo una vez insertado dentro de las membranas celulares, crea canales transmembranales completos dando lugar a la lisis osmótica de la célula. (Modificado de Alberts *et al.*, 1983).

Los ensayos de inmunocitoquímica en los que se incubó con LCR de pacientes con EM mostraron células A2B5+ dañadas. Al calentar los LCR, o al añadir EDTA durante la incubación, se inhibió la unión de anti-C5b9 a las células A2B5+, sin cambios en la unión de las IgG de los LCR. Esto demuestra que la activación de complemento es dependiente de LCR y que su inhibición previene la rotura de las células A2B5+/LCR IgG+. Los cultivos tratados con IgG del LCR de pacientes con EM presentan una muerte celular de células A2B5+ mediada por complemento con una significativa desaparición de la población de OPC. Se ha encontrado que el antígeno C9, que refleja formación del complejo terminal del complemento, colocaliza selectivamente con inmunoglobulinas en sitios de desmielinización activa (Storch *et al.*, 1998). Existe evidencia convincente de la activación intratecal del sistema de complemento en pacientes con EM, pero no se ha establecido su papel preciso en la patogénesis (Morgan *et al.*, 1984; Sanders *et al.*, 1986; Mollnes *et al.*, 1987; Scolding *et al.*, 1989; Sellebjerg *et al.*, 1998).

A pesar de que la deficiencia en la rata de un homólogo del factor humano CD59 podría predisponer a la lisis por un ataque del complemento independiente de anticuerpos en nuestros cultivos de rata, se ha descrito que las OPC de rata perinatal son resistentes a esta lisis al igual que las células humanas (Wren y Noble, 1989). Además, nosotros detectamos que la activación del complemento colocalizó con las IgG humanas y fue dependiente de la unión de las IgG del LCR a las células A2B5+. En algunas lesiones de EM, la presencia de inmunoglobulinas y complejo terminal del

complemento sugiere que los anticuerpos desmielinizantes tienen un papel patogénico. Tales anticuerpos podrían activar al complemento e impedir la remielinización (Noseworthy *et al.*, 2000).

El papel de las Hsp en la EM ha surgido especialmente por su alta inmunogenicidad en mamíferos. Ciertas familias de Hsp, en particular Hsp60 y Hsp70, han demostrado ejercer una fuerte reacción inmunológica (Brosnan *et al.*, 1996; Birnbaum y Kotilinek, 1997) y es conocida la expresión en la membrana plasmática de estas Hsp en varios tipos celulares, incluidos los oligodendrocitos (Freedman *et al.*, 1992; Aquino *et al.*, 1997). Además, se ha descrito una alteración en la expresión de Hsp27, Hsp60, Hsp70 y Hsp90 en las lesiones de EM (Wucherpfennig *et al.*, 1992; Aquino *et al.*, 1997). La Hsp90 pertenece a la familia de proteínas de 82 a 90 kDa muy conservada en mamíferos. Hemos encontrado anticuerpos contra Hsp90 en 26 de las 33 muestras de LCR de pacientes con EM (en 21 de los 23 pacientes en brote y en 5 de los 10 pacientes sin brote). Estos resultados corroboran la hipótesis de que la patogénesis de la EM es de naturaleza heterogénea y que el objetivo del daño (oligodendrocitos o sus precursores) puede ser diferente en distintos pacientes o dependiendo del curso de la enfermedad. Los anticuerpos contra Hsp90 expresados en OPC bipolares A2B5+ y la activación de complemento pueden conducir a la desaparición de las OPC. Esto podría ser la causa de la escasa remielinización que se observa en las lesiones de EM. Estos resultados están de acuerdo con trabajos recientes que describen una menor densidad de OPC en lesiones de EM que en las áreas no lesionadas y que no detecta OPC bipolares en lesiones sin oligodendrocitos (Chang *et al.*, 2002). Estos autores han confirmado otros trabajos previos que sugieren que las lesiones de EM crónicas pierden eventualmente la capacidad de producir oligodendrocitos nuevos (Wolswijk, 1998) y proponen que el entorno de las lesiones de EM crónicas inactivas produce oligodendrocitos nuevos, mientras que es el mismo entorno el que da lugar a la presencia de una señal inhibitoria que origina un fallo en la remielinización (Chang *et al.*, 2002). Nuestros resultados corroboran que una exposición prolongada a anticuerpos anti-Hsp90 contribuiría a una disminución en la población de OPC y limitaría la remielinización en los pacientes con EM. Es también interesante observar la coincidencia entre la localización de estas células en el SNC y la de las lesiones en los pacientes con EM. Así, las placas de EM muestran predilección por ciertas partes del SNC con participación mayoritaria en la sustancia blanca

periventricular, nervio y quiasma óptico, aquellas zonas en las que las OPC son más abundantes.

El desarrollo de estrategias para potenciar la remielinización y obtener posibles medidas terapéuticas en la EM requiere la comprensión previa de los mecanismos endógenos que impiden la remielinización. La identificación de anticuerpos anti-Hsp90 en los pacientes con EM que afectan específicamente a las OPC es un paso hacia este objetivo.

En resumen, nuestros resultados corroboran la idea de que la patogénesis de la EM es de naturaleza heterogénea (Lucchinetti *et al.*, 1996). En el estudio de la enfermedad se pueden considerar tres aspectos fundamentales. En primer lugar, un proceso inflamatorio que conduce a la desmielinización por ataque a los oligodendrocitos y a la mielina debido a una causa desconocida. Tradicionalmente, la EM se considera una enfermedad inflamatoria en la que las células Th1 reconocen componentes de la mielina e inician un proceso autodestructivo dentro del SNC. Sin embargo, las células T por sí solas no son capaces de producir las típicas placas desmielinizadas grandes y confluentes de la EM. Por el contrario, la inflamación cerebral característica de las células T suele producir una enfermedad multifocal y monofásica denominada ADEM (encefalomielitis desmielinizante aguda). Además son necesarios factores desmielinizantes adicionales como los anticuerpos que se dirigen contra los antígenos localizados en la superficie de la banda de mielina o del oligodendrocito, que pueden ser diferentes en los distintos pacientes (Kornek y Lassmann, 2003). En segundo lugar, la falta de remielinización debida a los anticuerpos contra OPC, entre los que caben destacar los anti-Hsp90 y, con menor importancia, los anti-Hsp70 que se describen en este trabajo. La activación del sistema de complemento por estos anticuerpos en las OPC impediría la remielinización. Y en tercer lugar, el daño axonal y la apoptosis en las neuronas, debido a factores tóxicos solubles en el LCR que activan a la caspasa 3, probablemente a través de la caspasa 9, y podrían ser indicativos de mal pronóstico en la evolución clínica de los pacientes.

Hasta el momento no se ha abordado el estudio de la posible relación entre la existencia del factor neurotóxico y de los anticuerpos anti-Hsp90 en los LCR de pacientes con EM. Dada la naturaleza multifactorial de esta enfermedad, es posible que ambos factores sean en cierto modo independientes, ya que el factor neurotóxico no está relacionado con la concentración de IgG en LCR ni con la activación del complemento,

lo cual descarta su origen inflamatorio. Sin embargo, hemos demostrado que la concentración de anticuerpos anti-Hsp90 en los LCR de pacientes con EM depende de la concentración total de IgG en los LCR de estos pacientes y que su toxicidad está mediada por el complemento. Tampoco sabemos si el efecto que ambos factores podrían ocasionar en los pacientes puede ser simultáneo pero con distintas dianas (neuronas y OPC), o si afectarían a pacientes distintos, o en distintos estadios de la enfermedad.

Por otra parte, la tecnología de microarray de DNA ha supuesto un cambio radical en la investigación molecular de enfermedades complejas al permitir analizar la expresión simultánea de miles de genes. Recientemente, se ha aplicado esta tecnología para estudiar los perfiles de expresión génica en tejido cerebral post-mortem de pacientes con el objetivo de mejorar el conocimiento de los mecanismos moleculares implicados en la etiología de la EM (Whitney *et al.*, 1999; Lock *et al.*, 2002; Goertsches *et al.*, 2003; Mycko *et al.*, 2003; GAMES, 2003). Se ha encontrado alteración en la expresión de un gran número de genes, lo cual ha confirmado la heterogeneidad de la enfermedad. Entre los genes con alteración de su expresión se han descrito los de algunas de las proteínas identificadas en este trabajo tales como las Hsp, y entre ellas la Hsp70 (Lock *et al.*, 2002) y Hsp90 (Mycko *et al.*, 2003), la caspasa 9 (Mycko *et al.*, 2003), y algunos componentes de la cascada del complemento como el C1r y C3 (Lock *et al.*, 2002). Desgraciadamente, la gran mayoría de alteraciones genéticas encontradas en estas investigaciones no cuenta todavía con una interpretación lógica.

A pesar de la gran cantidad de estudios que se han llevado a cabo acerca de la EM -se publican unos 1.500 trabajos al año sobre sus causas y tratamiento- sigue siendo una de las enfermedades con etiología más desconocida. Aunque en la actualidad se dispone de tratamientos con agentes inmunomoduladores, capaces de reducir tanto los síntomas como la actividad de las lesiones en IRM, la eficacia a largo plazo de estos compuestos sigue siendo polémica. Esto puede ser debido, al menos en parte, al hecho de que estos compuestos actúan contra el componente inflamatorio de la enfermedad, mientras que la desmielinización y el daño axonal que contribuyen a la pérdida de función transitoria o permanente no se pueden tratar adecuadamente (Kornek y Lassmann, 2003). La diana terapéutica de algunos de los fármacos utilizados en los tratamientos es desconocida, tanto es así que su utilización, como en el caso del interferón β , comenzó siendo empírica (Jacobs *et al.*, 1996, 2000). Posiblemente sea

necesario conocer las bases moleculares de esta enfermedad antes de conseguir un tratamiento verdaderamente útil.

La desmielinización en asociación con la inflamación es la alteración estructural fundamental en la EM. La remielinización espontánea es parcial en el SNC, en parte porque los oligodendrocitos son células postmitóticas. Se ha intentado promover la remielinización con diversos métodos, no sólo con agentes farmacológicos sino también mediante trasplantes autólogos de progenitores hematopoyéticos. Además, estudios recientes sobre la neurogénesis en adulto están sugiriendo nuevas estrategias para la sustitución terapéutica de neuronas. Los mecanismos de formación de estas nuevas neuronas, la forma en que migran y se incorporan a circuitos del cerebro adulto son cuestiones de extraordinario interés. Investigaciones sobre los mecanismos de nacimiento, migración e incorporación han permitido la identificación de las células madre (*stem cells*) del sistema nervioso e indican cómo estas células son capaces de moverse grandes distancias dentro del sistema nervioso a través del tejido adulto. Sin embargo, es difícil reestablecer las conexiones introduciendo nuevas células en el cerebro. El ambiente que las células encuentran en el cerebro adulto no es claramente permisivo al crecimiento de axones, por no hablar de que las moléculas responsables de su guía muy probablemente no se encuentren en el lugar adecuado en el momento adecuado. Parece difícil pensar que la terapia celular con trasplantes vaya a resolver problemas que se desprenden de la degeneración de oligodendrocitos y neuronas maduros que forman conexiones largas. Si pudiéramos modular la apoptosis neuronal, guiar a los axones, aumentar la proliferación de OPC, y orientar su diferenciación, podríamos intentar reparar los circuitos lesionados en el SNC adulto. Desgraciadamente, aún estamos muy lejos de poder emplear estas técnicas en el tratamiento de la EM. No obstante, la comprensión de sus mecanismos celulares y moleculares podría evitar la neurodegeneración y facilitar la reparación del sistema nervioso.

CONCLUSIONES

CONCLUSIONES

1. Nuestros datos confirman la existencia de dos poblaciones entre los pacientes con esclerosis múltiple remitente-recurrente. En un primer subgrupo de pacientes, grupo denominado ANA, su líquido cefalorraquídeo induce altos porcentajes de apoptosis y daño axonal en neuronas en cultivo. En el otro subgrupo de pacientes, denominado grupo ANC, su líquido cefalorraquídeo no induce apoptosis ni daño axonal a neuronas en cultivo, de forma análoga al líquido cefalorraquídeo de pacientes controles también estudiados.
2. La hipointensidad de las lesiones estudiadas por imagen de resonancia magnética en las secuencias ponderadas en T1 está correlacionada con el porcentaje de recuperación del brote valorado con la escala EDSS. Cuanto mayor es la hipointensidad de las lesiones en T1, peor es la recuperación del brote.
3. La neurotoxicidad inducida por el líquido cefalorraquídeo de pacientes con EM en cultivos neuronales está estrechamente correlacionada con la patología de los pacientes valorada mediante su EDSS y sus lesiones en IRM. Así, pacientes cuyo líquido cefalorraquídeo induce una mayor apoptosis y daño neuronales en cultivo, se corresponden con aquellos que presentan peor recuperación después del brote y mayores lesiones hipointensas en T1.
4. No se ha podido identificar el factor inductor del daño neuronal, si bien podemos descartar a las inmunoglobulinas, el TNF- α , el péptido QYNAD y el glutamato, como agentes directos del daño neuronal.
5. La caspasa 3, pero no la caspasa 1, está directamente implicada en la inducción de apoptosis neuronal por el líquido cefalorraquídeo de los pacientes con esclerosis múltiple remitente-recurrente.
6. La caspasa 8 no parece ser la caspasa que activa a la caspasa 3, si bien, no podemos descartar la participación de la caspasa 9 en la activación de dicha caspasa 3.

7. Los inhibidores de caspasa 3 previenen de la apoptosis neuronal inducida por el líquido cefalorraquídeo de pacientes con esclerosis múltiple. Es posible interferir en la ruta apoptótica y proteger a las células de la muerte neuronal inducida por líquido cefalorraquídeo. La capacidad de bloquear la apoptosis neuronal en los pacientes sería de gran interés en el tratamiento de la esclerosis múltiple.
8. La proteína Hsp90 β se expresa en la superficie celular de los precursores de oligodendrocitos.
9. Los LCR de pacientes con EM contienen anticuerpos que reconocen específicamente isoformas de Hsp90 β en la superficie de los precursores de oligodendrocitos.
10. La activación del sistema de complemento por anticuerpos anti-Hsp90 del LCR de pacientes con EM, causa la extinción de los precursores de oligodendrocitos en cultivo. Este mismo proceso podría limitar la remielinización en los pacientes con EM.

BIBLIOGRAFÍA

1. Alberts, B., Bray, D., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K., y Watson, J. D. (1983) *Molecular biology of the cell*. Garland Publishing, Inc., New York. 988-993 pp.
2. Alcázar, A., Regidor, I., Masjuan, J., Salinas, M., y Álvarez-Cermeño, J. C. (1998) Induction of apoptosis by cerebrospinal fluid from patients with primary-progressive multiple sclerosis in cultured neurons. *Neurosci. Lett.* 255:75-78.
3. Alcázar, A., Regidor, I., Masjuan, J., Salinas, M., y Álvarez-Cermeño, J. C. (2000) Axonal damage induced by cerebrospinal fluid from patients with relapsing-remitting multiple sclerosis. *J. Neuroimmunol.* 104:58-67.
4. Alcázar, A., Rivera, J., Gómez-Calcerrada, M., Muñoz, F., Salinas, M., y Fando, J. L. (1996) Changes in the phosphorylation of eukaryotic initiation factor 2a, initiation factor 2B activity and translational rates in primary neuronal cultures under different physiological growing conditions. *Mol. Brain Res.* 38:101-108.
5. Andersson, M., Álvarez-Cermeño, J. C., Bernardi, G., Cogato, I., Fredman, P., Frederiksen, J., Fredrikson, S., Gallo, P., Grimaldi, L. M., Gronning, M. *et al.* (1994) Cerebrospinal fluid in the diagnosis of multiple sclerosis: a consensus report. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatr.* 57:897-902.
6. Aquino, D., Capello, E., Weisstein, J., Sanders, V., Lopez, C., Tourtellotte, W. W., Brosnan, C. F., Raine, C. S., y Norton, W. T. (1997) Multiple sclerosis: altered expression of 70- and 27-kDa heat shock proteins in lesions and myelin. *J. Neuropath. Exp. Neurol.* 56:664-672.
7. Araque, A., Carmignoto, G., Haydon, P.G. (2001) Dynamic signaling between astrocytes and neurons. *Annu. Rev. Physiol.* 63:795-813.
8. Archelos, J., Trotter, J., Previtali, S., Weibbrich, B., Toyka, K., y Hartung, H. P. (1998) Isolation and characterization of an oligodendrocyte precursor-derived B-cell epitope in multiple sclerosis. *Ann. Neurol.* 43:15-24.
9. Archer, D. R., Cuddon, P. A., Lipsitz, D., y Duncan, I. D. (1997) Myelination of the canine central nervous system by glial cell transplantation: a model for repair of human myelin disease. *Nat. Med.* 3:54-59.
10. Arévalo-Martín, Á., Vela, J. M., Molina-Holgado, E., Borrel, J., Guaza, C. (2003) Therapeutic actions of cannabinoids in a murine model of multiple sclerosis. *J. Neurosci.* 23:2511-2516.
11. Armstrong, R. C., Dorn, H. H., Kufta, C. V., Friedman, E., y Dubois-Dalcq, M. E. (1992) Pre-oligodendrocytes from adult human CNS. *J. Neurosci.* 12:1538-1547.

12. Arnold, D. L., Matthews, P. M., Francis, G. S., y Antel, J. P. (1990) Proton magnetic resonance spectroscopy of human brain in vivo in the evaluation of multiple sclerosis: assessment of the load of the disease. *Magn. Reson. Med.* 14:154-159.
13. Arnold, D. L., Riess, G. T., Matthews, P. M., Phil, D., Francis, G. S., Collins, D. L., Wolfson, C., y Antel, J. P. (1994) Use of proton magnetic resonance spectroscopy for monitoring disease progression in multiple sclerosis. *Ann. Neurol.* 36:76-82.
14. Banerjee, A., Roach, M. C., Trcka, P., y Luduenda, R. F. (1990) Increase microtubule assembly in bovine brain tubulin lacking the type III isotype of beta-tubulin. *J. Biol. Chem.* 265:1794-1799.
15. Banker, G. A. y Waxman, A. B. (1988) Hoppocampal neurons generate natural shapes in cell culture. In *Intrinsic Determinants of Neuronal Form and Function*. R. B. M. M. Lasek, editor. 61- 82.
16. Bansal, R., Warrington, A. E., Gard, A. L., Ranscht, B., y Pfeiffer, S. E. (1989) Multiple and novel specificities of monoclonal antibodies O1, O4 and R-mAb used in the analysis of oligodendrocyte development. *J. Neurosci. Res.* 24:548-557.
17. Barres, B. A., Hart, I. K., Coles, H. S. R., Burne, J. F., Voyvodic, J. T., Richardson, W. D., y Raff, M. C. (1992) Cell death and control of cell survival in the oligodendrocyte lineage. *Cell* 70:31-46.
18. Barres, B. A. y Raff, M. C. (1993) Proliferation of oligodendrocyte precursor cells depends on electrical activity in axons. *Nature* 361:258-260.
19. Bhakoo, K.K., Pearce, D. (2000) In vitro expression of N-acetyl aspartate by oligodendrocytes: implications for proton magnetic resonance spectroscopy signal in vivo. *J.Neurochem.* 74:254-262.
20. Birnbaum, G. y Kotilinek, L. (1997) Heat shock or stress proteins and their role as autoantigens in multiple sclerosis. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 835:157-167.
21. Bitsch, A., Schuchardt, J., Bunkowski, S., Kuhlmann, T., y Brück, W. (2000) Acute axonal injury in multiple sclerosis. Correlation with demyelination and inflammation. *Brain* 123:1174-1183.
22. Bjartman, C., Kidd, G., Mörk, S., Rudick, R., y Trapp, B. D. (2002) Neurological disability correlates with spinal cord axonal loss and reduced N-acetyl aspartate in chronic multiple sclerosis patients. *Ann. Neurol.* 48:893-901.

23. Blakemore, W. F. y Keirstead, H. S. (1999) The origin of remyelinating cells in the central nervous system. *J. Neuroimmunol.* 98:69-76.
24. Bo, L., Vedeler, C. A., Nyland, H. I., Trapp, B. D., y Mork, S. J. (2003) Subpial demyelination in the cerebral cortex of multiple sclerosis patients. *J. Neuropath. Exp. Neurol.* 62:723-732.
25. Bottenstein, J. E. y Sato, G. H. (1979) Growth of a rat neuroblastoma cell line in serum-free supplemented medium. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 76:514-517.
26. Bradford, M. M. (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry* 72:248-254.
27. Braun, J. S., Novak, R., Herzog, K. H., Bodner, S. M., Cleveland, J. L., y Tuomanen, E. I. (1999) Neuroprotection by a caspase inhibitor in acute bacterial meningitis. *Nat. Med.* 5:298-302.
28. Brex, P. A., Gómez-Ansón, B., Parker, G. J. M., Barker, G. J., MacManus, D. G., Davie, C. A., Plant, G. T., y Miller, D. H. (1998) Proton MR spectroscopy in clinically isolated syndromes suggestive of multiple sclerosis. *Mult. Scler.* 4:275.
29. Brinkmeier, H., Aulkemeyer, P., Wollinsky, K. H., y Rüdell, R. (2000) An endogenous pentapeptide acting as a sodium channel blocker in inflammatory autoimmune disorders of the central nervous system. *Nat. Med.* 6:808-811.
30. Brosnan, C. F., Battistini, L., Gao, Y.-L., Raine, C. S., y Aquino, D. (1996) Heat shock proteins and multiple sclerosis: a review. *J. Neuropath. Exp. Neurol.* 55:389-402.
31. Brück, W., Bitsch, A., Kolenda, H., Brück, Y., Stiefel, M., y Lassmann, H. (1997) Inflammatory central nervous system demyelination: correlation of magnetic resonance imaging findings with lesion pathology. *Ann. Neurol.* 42:783-793.
32. Bufill, E., Blesa, R., Galán, I., y Dean, G. (1995) Prevalence of multiple sclerosis in the region of Osona, Catalonia, Northern Spain. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatr.* 58:577-581.
33. Butler, M. (1992) Neuronal cell lines. IRL Press, New York. 55-75 pp.
34. Carswell, R. (1838) Pathological anatomy: illustrations of the elementary forms of disease. London.

35. Chang, A., Tourtellotte, W. W., Rudick, R., y Trapp, B. D. (2002) Premyelinating oligodendrocytes in chronic lesions of multiple sclerosis. *New Engl. J. Med.* 346:165-200.
36. Charcot, M. (1868) Histologie de la sclerose en plaques. *Gaz. Hosp.* 141:554-555.
37. Cid, C., Alcázar, A., Regidor, I., Masjuan, J., Salinas, M., y Álvarez-Cermeño, J. C. (2002) Neuronal apoptosis induced by cerebrospinal fluid from multiple sclerosis patients correlates with hypointense lesions on T1 magnetic resonance imaging. *J. Neurol. Sci.* 193:103-109.
38. Cid, C., Álvarez-Cermeño, J. C., Regidor, I., Salinas, M., y Alcázar, A. (2003a) Low concentrations of glutamate induce apoptosis in cultured neurons: implications for amyotrophic lateral sclerosis. *J. Neurol. Sci.* 206:91-95.
39. Cid, C., Álvarez-Cermeño, J. C., Regidor, I., Plaza, J., Salinas, M., y Alcázar, A. (2003b) Caspase inhibitors protect against neuronal apoptosis induced by cerebrospinal fluid from multiple sclerosis patients. *J. Neuroimmunol.* 136:119-124.
40. Cid, C., Álvarez-Cermeño, J.C., Camafeita, E., Salinas, M., Alcázar, A. (2004) Antibodies reactive to heat shock protein 90 induce oligodendrocyte precursor cell death in culture. Implications for demyelination in multiple sclerosis. *FASEB. J.* 18.
41. Compston, A. (1999) The genetic epidemiology of multiple sclerosis. *Phil. Trans. R. Soc. Lond.* 354:1623-1634.
42. Compston, A. y Coles, A. (2002) Multiple sclerosis. *Lancet* 359:1221-1231.
43. Confavreux, C., Vukusic, S., Moreau, T., y Adeleine, P. (2000) Relapses and progression of disability in multiple sclerosis. *New Engl. J. Med.* 343:1430-1438.
44. Conroy, S. E. y Latchman, D. S. (1996) Do heat shock proteins have a role in breast cancer? *Br. J. Cancer* 74:717-721.
45. Cruveilhier. (1841) Anatomie pathologique du corps humain; descriptions avec figures lithographiées et coloriées; des diverses alterations morbides dont le corps humain est susceptible. Paris.
46. Davie, C. A., Barker, G. J., Thompson, A. J., Tofts, P. S., McDonald, W. I., y Miller, D. H. (1997) ¹H magnetic resonance spectroscopy of chronic cerebral

- white matter lesions and normal appearing white matter in multiple sclerosis. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatr.* 63:736-742.
47. Davie, C. A., Barker, G. J., Webb, S., Tofts, P. S., Thompson, A. J., Harding, A. E., McDonald, W. I., y Miller, D. H. (1995) Persistent functional deficit in multiple sclerosis and autosomal dominant cerebellar ataxia is associated with axon loss. *Brain* 118:1583-1592.
48. Davis, B. D., Dulbecco, R., Eisen, H. N., Ginsberg, H. S., y Wood, W. B. Jr. (1967) Microbiology. Hoeber Medical Division - Harper & Row, Publishers, Inc., 521-536 pp.
49. Dawson, M. R. L., Levine, J. M., y Reynolds, R. (2000) NG2-expressing cells in the central nervous system: are they oligodendroglial progenitors? *J. Neurosci. Res.* 61:471-479.
50. De la Monte, S. M., Sohn, Y. K., Ganju, N., y Wands, J. R. (1998) p53- and CD95-associated apoptosis in neurodegenerative diseases. *Lab. Invest.* 78:401-411.
51. De Stefano, N., Narayanan, S., Francis, G. S., Arnaoutelis, R., Tartaglia, M. C., Antel, J. P., Matthews, P. M., y Arnold, D. L. (2001) Evidence of axonal damage in the early stages of multiple sclerosis and its relevance to disability. *Arch. Neurol.* 58:65-70.
52. Dowling, P., Husar, W., Mennona, J., Donnenfeld, H., Cook, S., y Sidhu, M. (1997) Cell death and birth in multiple sclerosis brain. *J. Neurol. Sci.* 149:1-11.
53. Earnshaw, W. C. (1995) Nuclear changes in apoptosis. *Curr. Opin. Cell Biol.* 7:337-343.
54. Eisenbarth, G. S., Walsh, F. S., y Nirenberg, M. (1979) Monoclonal antibody to a plasma membrane antigen of neurons. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 76:4913-4917.
55. Enari, M., Sakahira, H., Yokohama, H., Okawa, H., Iwamatsu, y Nagata, S. (1998) A caspase-activated DNase that degrades DNA during apoptosis, and its inhibitor ICAD. *Nature* 391:43-50.
56. Fabry, Z., Raine, C. S., y Hart, M. N. (1994) Nervous tissue as an immune compartment: the dialect of the immune response in the CNS. *Immunol. Today* 15:218-224.
57. Fanarraga, M. L., Avila, J., y Zabala, J. C. (1999) Expression of unphosphorylated class III beta-tubulin isotype in neuroepithelial cells

- demonstrates neuroblast commitment and differentiation. *Eur. J. Neurosci.* 11:517-527.
58. Ferguson, B., Matyszak, M. K., Esiri, M. M., y Perry, V. H. (1997) Axonal damage in acute multiple sclerosis lesions. *Brain* 120:393-399.
59. Fernandez, O., Luque, G., San Román, C., Bravo, M., y Dean, G. (1994) The prevalence of multiple sclerosis in the sanitary district of Vélez-Málaga, Southern Spain. *Neurology* 44:425-429.
60. Ferrarini, M., Heltai, S., Zocchi, R., y Rugarli, C. (1992) Unusual expression and localization of heat-shock proteins in human tumors cells. *Int. J. Cancer* 51:613-619.
61. Ffrench-Constant, C. y Raff, M. C. (1986) Proliferating bipotential glial progenitor cells in adult rat optic nerve. *Nature* 319:499-502.
62. Filippi, M., Paty, D. W., Kappos, L., Barkhof, F., Compston, D. A. S., Thompson, A. J., Zhao, G. J., Wiles, C. M., McDonald, W. I., y Miller, D. H. (1995) Correlations between changes in disability and T2-weighted brain MRI activity in multiple sclerosis: a follow-up study. *Neurology* 45:255-260.
63. Freedman, M. S., Buu, N. N., Ruijs, T. C. J., Williams, K., y Antel, J. P. (1992) Differential expression of heat shock proteins by human glial cells. *J. Neuroimmunol.* 41:231-238.
64. Frydman, J. (2001) Folding of newly translated proteins in vivo: the role of molecular chaperons. *Annu. Rev. Biochem.* 70:603-649.
65. Fu, L., De Stefano, N., Worsley, K. J., Narayanan, S., y Francis, G. S. (2000) Imaging axonal damage of normal-appearing white matter in multiple sclerosis. *Brain* 121:103-113.
66. Furlan, R., Filippi, M., Bergami, A., Rocca, M. A., Martinelli, V., Poliani, P. L., Grimaldi, L. M. E., Desina, G., Comi, G., y Martino, G. (1999) Peripheral levels of caspase-1 mRNA correlate with disease activity in patients with multiple sclerosis; a preliminary study. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatr.* 67:785-788.
67. GAMES (Genetic Analysis of Multiple sclerosis in EuropeanS) and the Transatlantic Multiple Sclerosis Genetics Cooperative. (2003) A meta-analysis of whole genome linkage screens in multiple sclerosis. *J. Neuroimmunol.* 143:39-46.
68. Gay, D. y Esiri, M. (1991) Blood-brain barrier damage in acute multiple sclerosis. An immunological study. *Brain* 114:557-572.

69. Genain, C. P., Cannella, B., Hauser, S. L., y Raine, C. S. (1999) Identification of autoantibodies associated with myelin damage in multiple sclerosis. *Nat. Med.* 5:170-175.
70. Gilbert, J. J. y Sadler, M. (1983) Unsuspected multiple sclerosis. *Arch. Neurol.* 40:533-536.
71. Goertsches, R., Villoslada, P., Comabella, M., Montalban, X., Navarro, A., de la Concha, E. G., Arroyo, R., Lopez de Munain, A., Otaegui, D., Palacios, R., *et al.*, A genomic screen of Spanish multiple sclerosis patients reveals multiple loci associated with the disease. *J. Neuroimmunol.* 143:124-128.
72. Gold, R., Hartung, H. P., y Toyka, K. V. (2000) Animal models for autoimmune demyelinating disorders of the nervous system. *Molecular Medicine Today* 6:88-91.
73. Goldbaum, O. y Richter-Landsberg, C. (2001) Stress proteins in oligodendrocytes: differential effects of heat shock and oxidative stress. *J. Neurochem.* 78:1233-1242.
74. Green, D. R. y Reed, J. C. (1998) Mitochondria and apoptosis. *Science* 281:1309-1312.
75. Harlow, E. y Lane, D. (1999) Using Antibodies. Cold Spring Harbor Lab. Press, New York. 103-249 pp.
76. Hartung, H. P., Jung, S., Stoll, G., Zielasek, J., Schmidt, B., Archelos, J., y Toyka, K. V. (1992) Inflammatory mediators in demyelinating disorders of the CNS and PNS. *J. Neuroimmunol.* 40:197-210.
77. Hayem, G., De Brand, M., Palazzo, E., Rouxd, S., Combe, B., Eliaou, J. F., Sany, J., Kahn, M. F., y Meyer, O. (1999) Anti-heat shock protein 70 kDa and 90 kDa antibodies in serum of patients with rheumatoid arthritis. *Ann. Rheum. Dis.* 58:291-296.
78. Hickey, W. F. (1999) The pathology of multiple sclerosis: a historical perspective. *J. Neuroimmunol.* 98:37-44.
79. Houthaeve, T., Gausepohl, H., Mann, M., y Ashman, K. (1995) Automation of micropreparation and enzymatic cleavage of gel electrophoretically separated proteins. *FEBS Lett.* 376:91-94.
80. Hovanessian, A. G., Laurent, A. G., Chebath, J., Galabru, J., Robert, N., y Svab, J. (1987) Identification of 69-kd and 100-kd forms of 2-5A synthetase in

- interferon-treated human cells by specific monoclonal antibodies. *EMBO J.* 6:1273-1280.
81. Huettner, J. E. y Baughman, R. W. (1986) Primary culture of identified neurons from the visual cortex of postnatal rats. *J. Neurosci.* 6:3044-3060.
 82. Jacobs, L. D., Beck, R. W., Simon, J. H., Kinkel, R. P., Brownschidle, C. M., Murray, T. J., Simonian, N., Slasor, P. J., y Sandrock, A. W. (2000) Intramuscular interferon beta-1a therapy initiated during a first demyelinating event in multiple sclerosis. *New Engl. J. Med.* 343:898-904.
 83. Jacobs, L. D., Cookfair, D., y Rudick, R. (1996) Intramuscular interferon beta-1a for disease progression in relapsing multiple sclerosis. *Ann. Neurol.* 39:285-294.
 84. Kakimura, J. I., Kitamura, Y., Takata, K., Umeki, M., Suzuki, S., Shibagaki, K., Nomura, Y., Gebicke-Haerter, P. J., Smith, M. A., Perry, G. *et al.* (2002) Microglial activation and amyloid-beta clearance induced by exogenous heat-shock proteins. *FASEB J.* 16:601-603.
 85. Kornek, B. y Lassmann, H. (2003) Neuropathology of multiple sclerosis-new concepts. *Brain Res. Bull.* 61:321-326.
 86. Kornek, B., Storch, M. K., Bauer, J., Djamshidian, A., Weissert, R., Wallstroem, E., Stefferl, A., Zimprich, F., Olsson, T., Linington, C. *et al.* (2001) Distribution of a calcium channel subunit in dystrophic axons in multiple sclerosis and experimental autoimmune encephalomyelitis. *Brain* 124:1114-1124.
 87. Köller, H., Buchholz, J., y Siebler, M. (1996) Cerebrospinal fluid from multiple sclerosis patients inactivates neuronal Na⁺ current. *Brain* 119:457-463.
 88. Kriegstein, A. y Dichter, M. A. (1983) Morphological classification of rat cortical neurons in cell culture. *J. Neurosci.* 3:1634-1647.
 89. Kuhlmann, T., Lingfeld, G., Bitsch, A., Schuchardt, J., y Brück, W. (2002) Acute axonal damage in multiple sclerosis is most extensive in early disease stages and decreases over time. *Brain* 125:2202-2212.
 90. Kurtzke, J. F. (1983) Rating neurologic impairment in multiple sclerosis: an expanded disability status scale (EDSS). *Neurology* 33:1444-1452.
 91. Kurtzke, J. F. (1995) MS epidemiology worldwide. One view of current status. *Acta Neurol. Scand.* 161:23-33.

92. Kurtzke, J. F., Beebe, G., Nagler, B., Auth, T., Kurland, L., y Nefzger, M. (1973) Studies on the natural history of multiple sclerosis. Correlates of clinical change in an early bout. *Acta Neurol. Scand.* 49:379-395.
93. Kurtzke, J. F. y Hyllested, K. (1987) Multiple sclerosis in the Faroe Islands.III. *Acta Neurol. Scand.* 76:317-339.
94. Kwon, E. E. y Prineas, J. W. (1994) Blood-brain barrier abnormalities in longstanding multiple sclerosis lesions. *J. Neuropath. Exp. Neurol.* 53:625-636.
95. Lassmann, H. (1995) Multiple Sclerosis. Schering A.G., Viena. 1-26 pp.
96. Le, W.-D., Rowe, D. B., Jankovic, J., Xie, W., y Appel, S. H. (1999) Effects of cerebrospinal fluid from patients with Parkinson disease on dopaminergic cells. *Arch. Neurol.* 56:194-200.
97. Levine, J. M., Reynolds, R., y Fawcett, J. W. (2001) The oligodendrocyte precursor cell in health and disease. *Trends Neurosci.* 24:39-47.
98. Liu, X., Zou, H., Slaughter, C., y Wang, X. (1997) DFF, a heterodimeric protein that functions downstream of caspase-3 to trigger DNA fragmentation during apoptosis. *Cell* 89:175-184.
99. Lock, C., Hermans, G., Pedotti, R., Brendolan, A., Schadt, E., Garren, H., Langer-Gould, A., Strober, S., Cannella, B., Allard, J. *et al.* (2002) Gene-microarray analysis of multiple sclerosis lesions yields new targets validated in autoimmune encephalomyelitis. *Nat. Med.* 8:500-508.
100. Lovas, G., Szilágyi, N., Majtényi, K., Palkovits, M., y Komololy, S. (2000) Axonal changes in chronic demyelinated cervical spinal cord plaques. *Brain* 123:308-317.
101. Lubetzki, C., Zalc-Goujet, C., Gansmüller, A., Monge, M., Brillat, A., y Zalc, B. (1991) Morphological, biochemical, and functional characterization of bulk isolated glial progenitor cells. *J. Neurochem.* 56:671-680.
102. Lucchinetti, C., Brück, W., Parisi, J., Scheithauer, B., Rodriguez, M., y Lassmann, H. (2000) Heterogeneity of multiple sclerosis lesions: implications for the pathogenesis of demyelination. *Ann. Neurol.* 47:707-717.
103. Lucchinetti, C. F., Brück, W., Rodriguez, M., y Lassmann, H. (1996) Distinct patterns of multiple sclerosis pathology indicates heterogeneity in pathogenesis. *Brain Pathol.* 6:259-274.

104. Martin, S. J., O'Brien, G. A., Nishioka, W. K., McGahon, A. J., Mahboubi, A., y Saido, T. C. (1995) Proteolysis of fodrin (non-erythroid spectrin) during apoptosis. *J. Biol. Chem.* 270:6425-6428.
105. McDonald, W. I. (1994) The pathological and clinical dynamics of multiple sclerosis. *J. Neuropath. Exp. Neurol.* 53:338-343.
106. McDonald, W. I., Compston, A., Edan, G., Googkin, D., Hartung, H. P., Lublin, F. D., McFarland, H. F., Paty, D. W., Polman, C. H., Reingold, S. C. *et al.* (2001) Recommended diagnostic criteria for multiple sclerosis: guidelines from the international panel on the diagnosis of multiple sclerosis. *Ann. Neurol.* 50:121-127.
107. McGavern, D. B., Murray, P. D., Rivera-Quiñones, C., Schmelzer, J. D., Low, P. A., y Rodriguez, M. (2000) Axonal loss results in spinal cord atrophy, electrophysiological abnormalities and neurological deficits following demyelination in a chronic inflammatory model of multiple sclerosis. *Brain* 123:519-531.
108. Medana, I. M. y Esiri, M. M. (2003) Axonal damage: a key predictor of outcome in human CNS disease. *Brain* 126:515-530.
109. Menezes, J. R. y Luskin, M. B. (1994) Expression of neuron-specific tubulin defines a novel population in the proliferative layers of the developing telencephalon. *J. Neurosci.* 14:5399-5416.
110. Meyer, R., Weissert, R., Diem, R., Storch, M. K., De Graaf, K. L., Kramer, B., y Bähr, M. (2001) Acute neuronal apoptosis in a rat model of multiple sclerosis. *J. Neurosci.* 15:6214-6220.
111. Ménard, A., Amouri, R., Dobránski, T., Charriaut-Marlangur, C., Pierig, R., Cifuentes-Diaz, C., Ghandour, S., Belliveau, J., Gascan, H., Hentati, F. *et al.* (1998) A gliotoxic factor in multiple sclerosis. *J. Neurol. Sci.* 154:209-221.
112. Mollnes, T. E., Vandvik, B., Lea, T., y Vartdal, F. (1987) Intrathecal complement activation in neurological diseases evaluated by analysis of the terminal complement complex. *J. Neurol. Sci.* 78:17-28.
113. Morgan, B. P., Campbell, A. K., y Compston, D. A. S. (1984) Terminal component of complement (C9) in cerebrospinal fluid of patients with multiple sclerosis. *Lancet* 2:251-254.

114. Morishima, N., Nakanishi, K., Takenouchi, H., Shibata, T., y Yasuhiko, Y. (2002) An endoplasmic reticulum stress-specific caspase cascade in apoptosis. *J. Biol. Chem.* 277:34287-34294.
115. Mycko, M. P., Papoian, R., Boschert, U., Raine, C. S., y Selmaj, K. W. (2003) cDNA microarray analysis in multiple sclerosis lesions: detection of genes associated with disease activity. *Brain* 126:1048-1057.
116. Narayana, P. A., Doyle, T. J., Lai, D., y Wolinsky, J. S. (1998) Serial proton magnetic resonance spectroscopic imaging, contrast-enhanced magnetic resonance imaging, and quantitative lesion volumetry in multiple sclerosis. *Ann. Neurol.* 43:56-71.
117. Narayanan, S., Fu, L., Pioro, E., De Stefano, N., Collins, D. L., y Francis, G. S. (1997) Imaging of axonal damage in multiple sclerosis: spatial distribution of magnetic resonance imaging lesions. *Ann. Neurol.* 41:385-391.
118. Nath, R., Raser, K. J., Stafford, D., Hajimohammadreza, I., Posner, A., Allen, H., Talanian, R. V., Yuen, P., Gilbertsen, R. B., y Wang, K. K. W. (1996) Non-erythroid α -spectrin breakdown by calpain and interleukin 1 β -converting enzyme-like protease(s) in apoptotic cells: contributory roles of both protease families in neuronal apoptosis. *Biochem. J.* 319:683-690.
119. Neumann, H., Cavalie, A., Jenne, D. E., y Wekerle, H. (1995) Induction of MHC class I genes in neurons. *Science* 28:549-552.
120. Nicholson, D. W. y Thornberry, N. A. (1997) Caspases: killer proteases. *Trends Biochem. Sci.* 22:299-306.
121. Niehaus, A., Shi, J., Grzenkowski, M., Diers-Fenger, M., Archelos, J., Hartung, H. P., Toyka, K., Brück, W., y Trotter, J. (2000) Patients with active relapsing-remitting multiple sclerosis synthesize antibodies recognizing oligodendrocyte progenitor cell surface protein: implications for remyelination. *Ann. Neurol.* 48:362-371.
122. Niehaus, A., Stegmüller, J., Diers-Fenger, M., y Trotter, J. (1999) Cell-surface glycoprotein of oligodendrocyte progenitors involved in migration. *J. Neurosci.* 19:4948-4961.
123. Noseworthy, J. H. (1999) Progress in determining the causes and treatment of multiple sclerosis. *Nature* 399:A40-A47.
124. Noseworthy, J. H., Lucchinetti, C., Rodriguez, M., y Weinshenker, B. G. (2000) Multiple sclerosis. *New Engl. J. Med.* 343:938-952.

125. Pelletier, J., Sucher, L., Witjas, T., Habib, M., Guttmann, C. R., y Salamon, G. (2001) A longitudinal study of callosal atrophy and interhemispheric dysfunction in relapsing-remitting multiple sclerosis. *Arch. Neurol.* 58:105-111.
126. Peterson, J. W., Bö, L., Mörk, S., Chang, A., y Trapp, B. D. (2001) Transected neurites, apoptotic neurons, and reduced inflammation in cortical multiple sclerosis lesions. *Ann. Neurol.* 50:389-400.
127. Pitt, D., Nagelmeier, I. E., Wilson, H. C., y Raine, C. S. (2003) Glutamate uptake by oligodendrocytes: Implications for excitotoxicity in multiple sclerosis. *Neurology* 61(8):1113-1120.
128. Pitt, D., Werner, P., y Raine, C. S. (2000) Glutamate excitotoxicity in a model of multiple sclerosis. *Nat. Med.* 6:67-70.
129. Poser, C. M. (1994) The dissemination of multiple sclerosis: a Viking saga? A historical essay. *Ann. Neurol.* 36:231-243.
130. Poser, C. M. (1995) Viking voyages: the origin of multiple sclerosis? *Acta Neurol. Scand.* 161:11-22.
131. Poser, C. M., Paty, D. W., Scheinberg, L., McDonald, W. I., Davis, F. A., Ebers, G. C., Johnson, K. P., Sibley, W. A., Silberberg, D. H., y Tourtellotte, W. W. (1983) New diagnostic criteria for multiple sclerosis: guidelines for research protocols. *Ann. Neurol.* 13:228-231.
132. Raff, M. C. (1989) Glial cell diversification in the rat optic nerve. *Science* 24:1450-1455.
133. Raff, M. C., Abney, E. R., Cohen, J., Lindsay, R., y Noble, M. (1983b) Two types of astrocytes in cultures of developing rat white matter: differences in morphology, surface gangliosides, and growth characteristics. *J. Neurosci.* 3:1289-1300.
134. Raff, M. C., Miller, R. H., y Noble, M. (1983a) A glial progenitor cell that develops in vitro into an astrocyte or an oligodendrocyte depending on culture medium. *Nature* 303:390-396.
135. Regidor, I. (2002). Tesis Doctoral. Universidad de Alcalá.
136. Reynolds, R. y Hardy, R. (1997) Oligodendroglial progenitors labeled with the O4 antibody persist in the adult rat cerebral cortex in vivo. *J. Neurosci. Res.* 47:455-470.
137. Rivera-Quiñones, C., McGavern, D., Schmelzer, J. D., Hunter, S. F., Low, P. A., y Rodríguez, M. (1998) Absence of neurological deficits following extensive

- demyelination in a class I-deficient murine model of multiple sclerosis. *Nat. Med.* 4:187-193.
138. Rivkin, M. J., Flax, J., Mozell, R., Osathanondh, R., Volpe, J. J., y Villa-Komaroff, L. (1995) Oligodendroglial development in human fetal cerebrum. *Ann. Neurol.* 38:92-101.
 139. Roy, N. S., Wang, S., Harrison-Restelli, C., Benraiss, A., Fraser, R. A. R., Gravel, M., Braun, P. E., y Goldman, S. A. (1999) Identification, isolation, and promoter-defined separation of mitotic oligodendrocyte progenitor cells from the adult human subcortical white matter. *J. Neurosci.* 19:9986-9995.
 140. Runmarker, R. y Andersen, O. (1993) Prognostic factors in a multiple sclerosis incidence cohort with twenty-five years of follow-up. *Brain* 116:117-134.
 141. Sadatipour, B. T., Greer, J. M., y Pender, M. P. (1998) Increased circulating antiganglioside antibodies in primary and secondary progressive multiple sclerosis. *Ann. Neurol.* 44:980-983.
 142. Sanders, M. E., Koski, C. L., Robbins, D., Shin, M. L., Rank, M. M., y Oiner, K. A. (1986) Activated terminal complement in cerebrospinal fluid in Guillain-Barre syndrome and multiple sclerosis. *J. Immunol.* 136:4456-4459.
 143. Sapozhnikov, A. M., Ponomarev, E. D., Tarasenko, T. N., y Telford, W. G. (1999) Spontaneous apoptosis and expression of cell surface heat-shock proteins in cultured EL-4 lymphoma cells. *Cell Prolif.* 32:363-378.
 144. Sastry, P. S. y Rao, K. S. (2000) Apoptosis and the nervous system. *J. Neurochem.* 74:1-20.
 145. Schäfer, H., Mathey, D., Hugo, F., y Bhakdi, S. (1986) Deposition of the terminal C5b-9 complement complex in infarcted areas of human myocardium. *J. Immunol.* 137:1945-1949.
 146. Schevchenko, A., Wilm, M., Vorm, O., y Mann, M. (1996) Mass spectrometry sequencing of proteins from silver stained polyacrylamide gels. *Anal. Chem.* 68:850-858.
 147. Schwartz, L. M. y Milligan, C. E. (1996) Cold thoughts of death: the role of ICE proteases in neuronal cell death. *Trends Neurosci.* 19:555-562.
 148. Schwid, S. R. y Trotter, J. L. (2000) Lessons from linomide. A failed trial, but not a failure. *Neurology* 54:1716-1717.
 149. Scolding, N. J., Morgan, B. P., Houston, W. A. J., Linington, C., Campbell, A. K., y Compston, D. A. S. (1989) Vesicular removal by oligodendrocytes of

- membrane attack complexes formed by activated complement. *Nature* 339:620-622.
150. Scolding, N. J., Rayner, P. J., y Compston, D. A. S. (1999) Identification of A2B5-positive putative oligodendrocyte progenitor cells and A2B5-positive astrocytes in adult human white matter. *Neuroscience* 89:1-4.
 151. Scolding, N. J., Rayner, P. J., Sussman, J., Shaw, C., y Compston, D. A. S. (1995) A proliferative adult human oligodendrocyte progenitor. *NeuroReport* 6:441-445.
 152. Sellebjerg, F., Jaliashvili, I., Christiansen, M., y Garred, P. (1998) Intrathecal activation of the complement system and disability in multiple sclerosis. *J. Neurol. Sci.* 157:168-174.
 153. Semra, Y. K., Seidi, O. A., y Sharif, M. K. (2002) Heightened intrathecal release of axonal cytoskeletal proteins in multiple sclerosis is associated with progressive disease and clinical disability. *J. Neuroimmunol.* 122:132-139.
 154. Sharief, M. K., Phil, M., y Hentges, R. (1991) Association between tumor necrosis factor-alfa and disease progression in patients with multiple sclerosis. *New Engl. J. Med.* 325:467-472.
 155. Shi, J., Marinovich, A., y Barres, B. A. (1998) Purification and characterization of adult oligodendrocyte precursor cells from the rat optic nerve. *J. Neurosci.* 15:4627-4636.
 156. Simon, J. H., Kinkel, R. P., Jacobs, L. D., Bub, L., y Simonian, N. (2000a) A Wallerian degeneration pattern in patients at risk for MS. *Neurology* 54:1155-1160.
 157. Simon, J. H., Lull, J., Jacobs, L. D., Rudick, R. A., Cookfair, D. L., Herndon, R. M., Richert, J. R., Salazar, A. M., Sheeder, J., Miller, D. *et al.* (2000b) A longitudinal study of T1 hypointense lesions in relapsing MS. *Neurology* 55:185-192.
 158. Smith, K. J. y Lassmann, H. (2002) The role of nitric oxide in multiple sclerosis. *Lancet Neurol.* 1:232-241.
 159. Smith, T., Groom, A., Zhu, B., y Turski, L. (2000) Autoimmune encephalomyelitis ameliorated by AMPA antagonists. *Nat. Med.* 6 :62-66.
 160. Sobue, G., Li, M., Terao, S., Aoki, S., Ichimura, M., y Ieda, T. (1997) Axonal pathology in japanese Guillain-Barré syndrome: a study of 15 autopsied cases. *Neurology* 48:1694-1700.

161. Sommer, I. y Schachner, M. (1981) Monoclonal antibodies (O1 to O4) to oligodendrocyte cell surfaces: an immunocytological study in the central nervous system. *Dev. Biol.* 83:311-327.
162. Spiegel, K., Emmerling, M. R., y Barnum, S. R. (1998) Strategies for inhibition of complement activation in the treatment of neurodegenerative diseases. In *Neuroinflammation: mechanism and management*. P. L. Wood, editor. Humana Press, Totowa. 129-176.
163. Sriram, S., Stratton, C. W., y Yao, S. (1999) Chlamydia pneumoniae infection of the central nervous system in multiple sclerosis. *Ann. Neurol.* 46:6-14.
164. Steinman, L. (2000) Multiple approaches to multiple sclerosis. *Nat. Med.* 6:15-16.
166. Stevenson, V. L., Leary, S. M., Losseff, N. A., Parker, G. J. M., Barker, G. J., Husmani, Y., Miller, D. H., y Thompson, A. J. (1998) Spinal cord atrophy and disability in MS. A longitudinal study. *Neurology* 51:234-238.
166. Storch, M. K., Piddlesden, S., Haltia, M., Livanainen, M., Morgan, P., y Lassmann, H. (1998) Multiple sclerosis: in situ evidence for antibody and complement-mediated demyelination. *Ann. Neurol.* 43:465-471.
167. Sun, J. B., Link, H., y Olsson, T. (1991b) T- and B-responses to myelin oligodendrocyte glycoprotein in multiple sclerosis. *J. Immunol.* 146:1490-1495.
168. Sun, J. B., Olsson, T., y Wang, W. Z. (1991a) Autoreactive T- and B-cells responding to myelin proteolipid protein in multiple sclerosis and controls. *Eur. J. Immunol* 21:1461-1468.
169. Takenaka, I. M. y Hightower, L. E. (1992) Transforming growth factor- β 1 rapidly induces Hsp70 and Hsp90 molecular chaperones in cultured chicken embryo cells. *J. Cell. Physiol.* 151:568-577.
170. Temple, S. y Raff, M. C. (1985) Differentiation of a bipotential glial progenitor cell in single cell microculture. *Nature* 313:223-225.
171. Temple, S. y Raff, M. C. (1986) Clonal analysis of oligodendrocyte development in culture: evidence for a developmental clock that counts cell divisions. *Cell* 44:773-779.
172. Thornberry, N. A. y Lazebnik, Y. (1998) Caspases: enemies within. *Science* 281:1312-1316.
173. Tikka, T.M., Vartiainen, N.E., Goldsteins, G., Oja, S.S., Andersen, P.M., Marklund, S.L., *et al.* (2002) Minocycline prevents neurotoxicity induced by

- cerebrospinal fluid from patients with motor neurone disease. *Brain* 125:722-731.
174. Trapp, B. D., Peterson, J., Ransohoff, R. M., Rudick, R., Mörk, S., y Bö, L. (1998) Axonal transection in the lesions of multiple sclerosis. *New Engl. J. Med.* 338:278-285.
 175. Trapp, B. D., Ransohoff, R., y Rudick, R. (2000) Axonal pathology in multiple sclerosis: relationship to neurologic disability. *Curr. Opin. Neurol.* 12:295-302.
 176. Van Waesberghe, J. H. T. M., Kamphorst, W., De Groot, C. J. A., Van Walderveen, M. A. A., Castelijns, J. A., Ravid, R., Lycklama á Nijeholt, G. J., Van der Valk, P., Polman, C. H., Thompson, A. J. *et al.* (1999) Axonal loss in multiple sclerosis lesions: magnetic resonance imaging insights into substrates of disability. *Ann. Neurol.* 46:747-754.
 177. Van Walderveen, M. A. A., Barkhof, F., Pouwels, P. J. W., Van Schijndel, R. A., Polman, C. H. , y Castelijns, J. A. (1999b) Neuronal damage in T1-hypointense multiple sclerosis lesions demonstrated in vivo using proton magnetic resonance spectroscopy. *Ann. Neurol.* 46:79-87.
 178. Van Walderveen, M. A. A., Kamphorst, W., Scheltens, P., Ravid, R., Valk, J., Polman, C. H., y Barkhof, F. (1998) Histopathologic correlate of hypointense lesions on T1-weighted spin-echo MRI in multiple sclerosis. *Neurology* 50:1282-1288.
 179. Van Walderveen, M. A. A., Lycklama á Nijeholt, G. J., Adér, H. J., Jongen, P. J. H., Polman, C. H., Castelijns, J. A., y Barkhof, F. (2001) Hypointense lesions on T1-weighted spin-echo magnetic resonance imaging. *Arch. Neurol.* 58:76-81.
 180. Van Walderveen, M. A. A., Truyen, L., Van Oosten, B. W., Castelijns, J. A., Lycklama á Nijeholt, G. J., Hein, J., y *et al.* (1999a) Development of hypointense lesions on T1-weghted spin-echo magnetic resonance images in multiple sclerosis. Relation to inflammatory activity. *Arch. Neurol.* 56:345-351.
 181. Varghese, J., Khandre, N. S., y Sarin, A. (2003) Caspase-3 activation is an early event and initiates apoptotic damage in a human leukemia cell line. *Apoptosis* 8:363-370.
 182. Wang, K. K. W., Posmantur, R., Nath, R., McGinnis, K., Whitton, M., Talanian, R. V., Glantz, S. B., Morrow, J. S. (1998) Simultaneous degradation of α II- and β II-spectrin by caspase 3 (CPP32) in apoptotic cells. *J. Biol. Chem.* 273:22490-22497.

183. Warren, K. G. y Catz, I. (1994) Relative frequency of autoantibodies to myelin basic protein and proteolipid protein in optic neuritis and multiple sclerosis cerebrospinal fluid. *J. Neurol. Sci.* 121:66-73.
184. Waxman, S. G. (2000) Multiple sclerosis as a neuronal disease. *Arch. Neurol.* 57:22-24.
185. Werner, P., Pitt, D., y Raine, C. S. (2001) Multiple sclerosis: altered glutamate homeostasis in lesions correlates with oligodendrocyte and axonal damage. *Ann. Neurol.* 50:169-180.
186. Whitney, L. W., Becker, K. G., Tresser, N. J., Caballero-Ramos, C. I., Munson, P. J., Prabhu, V. V., Trent, J. M., McFarland, H. F., y Biddison, W. E. (1999) Analysis of gene expression in multiple sclerosis lesions using cDNA microarrays. *Ann. Neurol.* 46:425-428.
187. William, F. B. y Keirstead, H. S. (1999) The origin of remyelinating cells in the central nervous system. *J. Neuroimmunol.* 98:69-76.
188. Wolswijk, G. (1998) Chronic stage multiple sclerosis lesions contain a relatively quiescent population of oligodendrocyte precursor cells. *J. Neurosci.* 15:601-609.
189. Wren, D. R. y Noble, M. (1989) Oligodendrocytes and oligodendrocytes/type-2 astrocyte progenitor cells of adult rats are specifically susceptible to the lytic effects of complement in absence of antibody. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86:9025-9029.
190. Wucherpfennig, K. W., Newcombe, J., Li, H., Keddy, C., Cuzner, M. L., y Hafler, D. A. (1992) gd T-cell receptor repertoire in acute multiple sclerosis lesions. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89:4588-4592.
191. Xiao, B.-G., Zhang, G.-X., Ma, C.-G., y Link, H. (1996) The cerebrospinal fluid from patients with multiple sclerosis promotes neuronal and oligodendrocyte damage by delayed production of nitric oxide in vitro. *J. Neurol. Sci.* 142:114-120.
192. Zimmermann, K. C. y Green, D. R. (2001) How cells die: apoptosis pathways. *J. Allergy. Clin. Immunol.* 108:S99-S103.