

REPÚBLICA DE CUBA  
CENTRO INTERNACIONAL DE RESTAURACIÓN NEUROLÓGICA

TESIS EN OPCIÓN AL GRADO CIENTÍFICO DE DOCTOR EN CIENCIAS  
MÉDICAS

ASIMILACIÓN DEL MÉTODO DE FOCALIZACIÓN ISOELÉCTRICA EN  
AGAROSA Y APLICACIÓN DEL ELISA AL ESTUDIO DE LA RESPUESTA DE  
ANTICUERPOS EN SNC DE PERSONAS CON ESCLEROSIS MÚLTIPLE

Autor: Dra. María de los Ángeles Robinson Agramonte

Tutor: Prof. Tit., Dr. Gustavo Sierra Gonzalez, DrC

Asesor(es): Prof. Tit., Hansotto Reiber, DrC

Prof. Tit., Dr. Antonio González Griego, DrC

Ciudad Habana

2010

“Nada es tan poderoso en este mundo  
como una idea cuyo momento ha  
llegado”

*VICTOR HUGO*

## Dedicatoria

A la memoria de mi padre,  
*Ejemplo* insustituible de entereza y  
*actitud* ante la vida y por la vida  
A mi hijo, fuente de inspiración y aliento permanente  
A mi madre  
por enseñarnos a hacer del dolor,  
el mayor aliento para seguir adelante  
A mis hermanos *todos*, por sus enseñanzas

*LOS AMIGOS SON ÁNGELES QUE NOS  
AYUDAN A PONERNOS DE PIE CUANDO  
NUESTRAS ALAS OLVIDAN COMO VOLAR*

*A todos gracias por su apoyo*

## *Agradecimientos*

Porque para mi individualizar nunca cubre todas las expectativas y puede causar omisiones involuntarias, quiero hacer llegar mi gratitud infinita a todas las personas, sabidas ellas o no, de quienes recibí desde su preciado tiempo hasta el más mínimo aliento. Sobre todo en la etapa final de este proyecto, que aunque difícil y escabroso siempre estuvo permeado de una extraordinaria belleza.

Sólo me permito hacer estos apuntes especiales por las pautas sensibles que marcaron en esta etapa de mi vida. A mi tutor, DrC, Prof. Gustavo Sierra por confiar en mí, por su familiaridad, por la energía a mi transmitida desde su belleza interior *incalculable*, su apoyo humano, profesional y paternal, imprescindible en el logro de este objetivo.

Al Dr. Antonio González Griego por confiar en mí.

A mis amigos. ¡Sí ustedes!, los que siempre me acompañaron a corazón abierto y sin dobles vueltas, en la luz y en las penumbras.

A todos gracias por su mano leal Consideraciones especiales para el Prof. Hansotto Reiber, por su contribución en este proyecto.

A Dios gracias, por permitirme entregar a mi padre, donde quiera que esté, el fruto de su amor.

## SÍNTESIS

En nuestro medio, no existen métodos suficientemente sensibles para el diagnóstico temprano y la evaluación de la progresión en la EM. El trabajo muestra la asimilación del método de focalización isoeléctrica (FIE) en agarosa, para la detección de bandas oligoclonales en el LCR y la aplicación del método de ELISA en la evaluación de la respuesta de anticuerpos contra virus neurotrópicos y la proteína ligera de neurofilamentos (PLNF) en LCR de personas con EM; apoyado en el "reibergrama", sistema para el análisis de los datos del LCR. Se compararon personas cubanas y europeas portadoras de EM, respecto a la reacción<sub>SRZ</sub> y se evaluó el grado de asociación de la respuesta de Acs con las variables clínicas. La sensibilidad del método de FIE asimilado fue del 83,3 %, con una eficacia global mayor del 90% y una contribución mayor del 20% a la detección de IgG oligoclonal en el LCR. La respuesta contra el virus de la rubéola fue significativamente menor en el grupo cubano con EM y el IA<sub>PLNF</sub> se asoció significativamente con el ritmo de recaídas en las personas cubanas con EM. Los aportes más significativos de este estudio fueron, la asimilación del método de FIE e Inmunofijación para la detección de bandas oligoclonales de IgG en el LCR y la relación significativa del IA<sub>PLNF</sub> con el ritmo de recaídas en EM, este último no reportado con anterioridad. De manera adicional, la aplicación del método de ELISA permitió evidenciar por primera vez el carácter distintivo de la respuesta contra el virus de la rubéola de aquella contra otros virus neurotrópicos y contra la PLNF, su validez para el diagnóstico y al seguimiento clínico terapéutico en la EM, herramientas estas aplicables a otras enfermedades neurológicas.

# ÍNDICE

Pág.

|   |     |
|---|-----|
| 1. INTRODUCCIÓN.....  | 2   |
| 1.1 Hipótesis.....  | 0   |
| 1.2 Objetivos .....   | 5   |
| 1.3 Novedad científica e importancia práctica .....   | 6   |
| 2. MARCO TEÓRICO .....  | 8   |
| 2.1. Generalidades .....  | 8   |
| 2.2. Sistema de barreras.....   | 8   |
| 2.3. Respuesta de anticuerpo y síntesis de inmunoglobulinas en SNC.....                           | 10  |
| 2.4. Respuesta de anticuerpos y sistema nervioso central en EM .....                              | 13  |
| 2.5. Hallazgos etiopatogénicos en esclerosis múltiple .....                                       | 16  |
| 2.6. Mecanismos fisiopatológicos de las recaídas en EM.....                                       | 21  |
| 2.7. Marcadores biológicos en EM .....  | 22  |
| 3. MATERIALES Y MÉTODOS .....   | 24  |
| 3.1. Universo del estudio .....   | 24  |
| 3.2. Consideraciones éticas .....   | 25  |
| 3.3. Obtención y fuente de las muestras.....  | 26  |
| 3.4. METODOLOGÍA .....  | 27  |
| 3.4.1. Diseño experimental .....  | 27  |
| 3.4.2. Conceptos y definiciones operacionales .....   | 28  |
| 3.4.3. Reactivos utilizados .....   | 33  |
| 3.4.4. Descripción de los procedimientos por objetivos.....                                       | 34  |
| 1.1 Descripción del método de FIE en agarosa e inmunofijación .....                               | 36  |
| 3.4.5. Procesamiento estadístico .....  | 47  |
| 4. RESULTADOS.....  | 48  |
| 4.1. Objetivo 1 .Asimilación del método de FIE en agarosa e Inmunofijación para BOC .....         | 48  |
| 4.1.1. Validación interna del método del método de FIE en agarosa e inmunofijación .....          | 48  |
| 4.1.2. Validación externa del método de FIE en agarosa e inmunofijación .....                     | 53  |
| 4.2. Objetivo 2. Respuesta idiotípica (reacción <sub>SRZ</sub> e IA <sub>PLNF</sub> ) en EM ..... | 54  |
| 4.2.1. Función de la barrera Sangre -LCR e inmunidad intratecal de personas con EM .....          | 55  |
| 4.2.2 Reacción <sub>SRZ</sub> en SNC de personas con esclerosis múltiple y no EM .....            | 57  |
| 4.2.3. Patrones de reacción <sub>SRZ</sub> en personas cubanas y europeas con EM.....             | 60  |
| 4.2.4. Respuesta de Ac contra la PLNF en LCR de personas con EM .....                             | 61  |
| 4.3. Objetivo 3. Aspectos clínicos de la detección de la respuesta idiotípica en EM .....         | 63  |
| 4.3.1. Respuesta isotípica y formas clínicas en EM .....  | 63  |
| 4.3.2. Reacción <sub>SRZ</sub> y variables clínicas en EM.....                                    | 65  |
| 4.3.3. IA <sub>PLNF</sub> y variables clínicas en EM.....   | 66  |
| 5. DISCUSIÓN.....   | 69  |
| 6. CONCLUSIONES.....  | 92  |
| 7. RECOMENDACIONES .....  | 93  |
| 8. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS.....  | 94  |
| 9. PRODUCCIÓN CIENTÍFICA DEL AUTOR .....  | 106 |
| 10. ANEXOS .....  | 110 |

## LISTADO DE ABREVIATURAS

Acs: Anticuerpos  
BOC: Bandas oligoclonales  
EFP: Electroforesis de Proteína  
EM: Esclerosis Múltiple  
EMProg: Esclerosis Múltiple  
Progresiva  
EMSProg: EM Secundariamente  
Progresiva  
EMRR: Esclerosis Múltiple Recaída  
Remisión  
FCN: Factor de Crecimiento  
Nervioso  
*Fe*: Fracción específica  
FIE: Focalización Isoeléctrica  
FIlg.: Fracción Intratecal de Ig  
FNT: Factor de Necrosis Tumoral  
FNTC: Factor Neurotrófico Ciliar  
FTC: Factor Transformante del  
Crecimiento  
IA: Índice de Anticuerpo Específico  
IgGLoc: IgG Local  
MAIC: Molécula de Adhesión  
Intercelular  
Ig: Inmunoglobulina  
IL-12: Interleuquina 12  
IL-1 $\beta$ : Interleuquina 1 beta

INF $\gamma$ : Interferon  $\gamma$   
LCR: Líquido Cefalorraquídeo  
GAM: Glicoproteína Asociada a la  
Mielina  
NA: Noradrenalina  
PGs: Prostaglandina  
pI: Punto isoeléctrico  
PLNF: Proteína Ligera de  
Neurofilamento  
PMNF: Proteína Mediana de  
Neurofilamento  
PPL: Proteína Proteolípida  
PPA: Proteína Precursora de  
Amiloide  
QAlb: Cociente Albúmina  
Qesp: Cociente Específico  
reacción<sub>SRZ</sub>: Reacción sarampión,  
rubéola, zoster  
RIQ: Rango Intercuartil  
RM: Resonancia Magnética  
SI: Síntesis Intratecal  
HS: Herpes Simplex  
TA: Temperatura Ambiente  
MACV: Molécula de Adhesión de  
Célula  
Vascular  
UNV: Unidad Neurovascular



## 1. INTRODUCCIÓN

La esclerosis múltiple (EM), es una enfermedad neurodegenerativa primaria, inflamatoria, desmielinizante, autoinmune, que afecta el Sistema Nervioso Central (SNC) y Periférico (SNP). Resultados recientes sustentan el carácter degenerativo y hemodinámico de la enfermedad, a partir de la evidencia temprana de daño axonal<sup>(1,2)</sup> y cambios estenosantes en los vasos extracraneales que modifican la unidad neurovascular (UNV)<sup>(3,4)</sup>.

La EM, incluida entre las más de 50 patologías neurológicas autoinmunes que afectan a casi  $75 \times 10^6$  personas en el mundo<sup>(5)</sup>, es más frecuente en mujeres entre 20 y 40 años de edad y constituye la mayor causa de discapacidad neurológica en el adulto joven<sup>(6-8)</sup>.

La frecuencia de la enfermedad difiere ampliamente a nivel mundial y muestra un gradiente norte-sur desde áreas de alta prevalencia (Europa, regiones templadas de EU y Australia, 50-100/ 100 000) a áreas de baja prevalencia (Japón, sureste asiático, Africa y regiones tropicales, 5-10/ 100 000)<sup>(2-4)</sup>. Estudios publicados *ubican a Cuba en una zona de baja prevalencia* (4,43/100 000, 95% IC 4,03-4,82), con un registro nacional de 1235 personas portadoras de EM (70% mujeres) y de 10-25,5/100 000 habitantes en la provincia Cienfuegos<sup>(8-12)</sup>.

Desde el punto de vista clínico, la EM se caracteriza por episodios concretos de déficit neurológico, separados por cuadros de remisión y/o progresión, que varían sobre la base del tamaño y localización de la lesión<sup>(1, 9,13)</sup>.

La neuropatología de la enfermedad muestra afectación vascular periventricular e infiltración leucocítica dirigida contra la vaina de mielina y el axón <sup>(14-18)</sup>. La forma recaída-remisión (EMRR), tiene como principales efectores a macrófagos, linfocitos T citotóxicos y anticuerpos (Acs), estos últimos en la forma progresiva (EMProg) <sup>(19-22)</sup>.

El diagnóstico de la EM se basa en tres pilares fundamentales: el cuadro clínico como regla de oro, la identificación temporo-espacial de las lesiones por imágenes de resonancia magnética (RM) y la identificación de síntesis intratecal (SI) de inmunoglobulinas (Igs) en el líquido cefalorraquídeo (LCR), confirmatorio en los casos donde la imaginología no es definitiva para el diagnóstico <sup>(23-25)</sup>.

Metodologías de sensibilidad y especificidad variables usualmente se utilizan en la identificación de SI de Igs <sup>(25-29)</sup>. Hoy día, la producción local de Ig en el LCR puede determinarse, por técnicas de inmunodifusión radial simple (IDRS), nefelometría y ELISA <sup>(25, 27,29)</sup>. Sin embargo, la detección cualitativa de BOC en el LCR, representa un método más sensible para evaluar la presencia de SI.

En la actualidad, son tres los métodos de separación electroforética empleados en la detección de IgG oligoclonal en el LCR: la electroforesis de zona, la "isotachophoresis" y la focalización isoeléctrica (FIE) <sup>(30)</sup>. La "isotachophoresis" constituye el fundamento de la electroforesis en disco en geles de acrilamida con tinción azul Coomassie, utilizada hoy día en nuestros laboratorios para la detección de BOC y que tiene la desventaja de la toxicidad

de los reactivos y la necesidad para el análisis de muestras de LCR concentradas (30,31).

La FIE asociada a inmunodetección, tiene lugar en función del punto isoeléctrico (pI) de las proteínas y las variantes de uso más común son la *FIE en geles de agarosa y poliacrilamida*, la primera asegura una mayor sensibilidad en la identificación de BOC en el LCR con una toxicidad mínima (27, 28,30).

La desmielinización causada por la respuesta inflamatoria autoinmune es un elemento central en la patología de la EM, aunque ésta por si sola no justifica todas las alteraciones que se observan en la enfermedad (32-35). Recientemente, se ha reportado que el análisis cuantitativo del índice de Ac específico (IA) contra virus neurotrópicos como sarampión, rubéola y varicela zoster, resulta relevante como marcador, útil para evaluar eventos inflamatorios en SNC de pacientes con enfermedades neurológicas y de manera particular en la EM (28, 32-35). De ahí que en la actualidad se considere de gran importancia el análisis de la respuesta de Acs poliespecífica en el LCR de estos enfermos.

La inflamación que lleva al daño tisular focal progresivo y axonal temprano en la EM pudiera explicar tanto, la paradoja actual sobre la secuencia temporal de los eventos que median el daño axoneuronal en esta enfermedad, como la influencia del tratamiento inmunomodulador sobre el ritmo de recaídas (36,37), la supervivencia de células plasmáticas en el SNC, la persistencia de la respuesta oligoclonal en el LCR de estos enfermos y la respuesta contra las

proteínas de neurofilamento observada previo a la desmielinización en la EM<sup>(38-40)</sup>. Elementos estos que sustentan el carácter neurodegenerativo primario de la enfermedad.

La presencia de una respuesta inmune antiviral poliespecífica en el LCR, se ha convertido en los últimos años en una herramienta potencial para evidenciar la respuesta crónica autoinmune en el SNC<sup>(28)</sup>. La argumentación parte de que más del 80% de las personas con EM muestran una respuesta inmune humoral intratecal contra los virus neurotrópicos herpes simples, sarampión, rubéola y varicela zoster, entre otros. La detección combinada de Ac contra los virus del sarampión, rubéola y varicela zoster en LCR forman la reacción<sub>SRZ</sub><sup>(34,41-43)</sup>. Algunos autores consideran la reacción<sub>SRZ</sub>, de valor diagnóstico en EM, por su evidencia en más del 90% de personas con EM<sup>(34,42)</sup> y su menor frecuencia en otras enfermedades inflamatorias del SNC<sup>(42,43)</sup>.

Por otro lado, Silver y Eikelenboom reportaron la identificación de autoanticuerpos contra la proteína ligera de neurofilamento (PLNF) en el LCR de personas con EM y su valor como marcador para distinguir la forma progresiva de la enfermedad<sup>(44,46)</sup>. La afirmación se sustenta en su asociación con la atrofia cortical en personas con EM secundariamente progresiva (EMSProg) y no en la EMRR<sup>(44-46)</sup>. Reportes posteriores del grupo de Bartos y colaboradores, niegan la validez de este marcador para evidenciar daño axonal o relación con la progresión de la enfermedad<sup>(43,44)</sup>. La relación de la respuesta de anticuerpo específica contra la PLNF tampoco ha sido estudiada

respecto a otros patrones de respuesta idiotípica en EM, de ahí nuestro interés en evaluar la relación entre dicha respuesta y la reacción<sub>SRZ</sub> en las personas con EM.

La amplia heterogeneidad clínica, neuropatológica e inmunogenética de la EM, exige el uso de herramientas auxiliares para el diagnóstico y seguimiento de la enfermedad, y aunque múltiples investigaciones evidencian el papel de los Acs en enfermedades autoinmunes del sistema nervioso <sup>(47-49)</sup>, en la actualidad no se dispone de métodos sensibles para el diagnóstico temprano ni de marcadores que permitan predecir cambios clínicos relacionados con el daño axonal y la progresión de la enfermedad <sup>(42-45,50)</sup>. Con estos antecedentes, nos propusimos asimilar tecnologías no disponibles en nuestro medio, de utilidad para el diagnóstico y la caracterización de marcadores neuroinmunes en LCR de personas con EM, aplicables a otras enfermedades neurológicas.

### *1.1 Hipótesis*

La asimilación del método de focalización isoeléctrica en agarosa e inmunofijación y la aplicación de un ensayo inmunoenzimático, en la evaluación de la respuesta idiotípica en el SNC de pacientes con esclerosis múltiple, aportan herramientas auxiliares para el diagnóstico y la identificación de marcadores neuroinmunes útiles para evidenciar eventos clínicos relacionados con la enfermedad.

## 1.2 Objetivos

### 1.2.1 General

Asimilar nuevas tecnologías para el diagnóstico y la caracterización de la respuesta de Acs en el SNC de personas con enfermedades neurológicas.

### 1.2.2 Específicos

1) Asimilar el método de focalización isoeléctrica en agarosa e inmunofijación para la detección de bandas oligoclonales de IgG en el líquido cefalorraquídeo.

2) Caracterizar los patrones de respuesta idiotípica en LCR de personas cubanas con esclerosis múltiple

2.1. Caracterizar los patrones de respuesta de anticuerpos frente a los virus del sarampión, rubéola y varicela zoster, en el SNC de personas con esclerosis múltiple.

2.2. Comparar el patrón de la reacción<sub>SRZ</sub> en el SNC de personas con esclerosis múltiple, cubanas y europeas.

2.3. Evaluar la respuesta de anticuerpos contra la proteína ligera de neurofilamento en SNC de personas con esclerosis múltiple y su relación con la reacción<sub>SRZ</sub>.

3) Definir la utilidad de los métodos asimilados en la identificación de marcadores neuroinmunes y su relevancia para el diagnóstico y el seguimiento de personas con esclerosis múltiple.

### 1.3 Novedad científica e importancia práctica

El presente trabajo valida criterios internacionales referentes a la interpretación de la dinámica de la respuesta inmune intratecal (producción local de inmunoglobulinas e intensidad de respuesta), apoyado en el sistema de análisis de datos del LCR "reibergrama". Se describen por primera vez, aspectos de la respuesta de Acs contra virus neurotrópicos en el SNC de personas cubanas con EM y las diferencias comparadas con personas de la región europea.

La introducción del método de FIE con inmunodetección, constituye uno de los aportes más relevantes de este trabajo, por su contribución al diagnóstico en enfermedades neurológicas, avalado en la sensibilidad, eficacia y capacidad discriminativa demostrada. Se validó además, el estudio de la intensidad de la respuesta basado en la evaluación de la fracción intratecal de Igs.

Otro resultado novedoso de esta trabajo, lo constituyó la estimación indirecta del daño axonal basada en el cálculo de la fracción de Ac específica contra la PLNF en el LCR, esta última, como medida de intensidad de la respuesta. La relación significativa del  $IA_{PLNF}$  con el ritmo de recaídas en las personas portadoras de EM, permitió evidenciar un punto de contacto clínico-biológico en esta enfermedad, no reportado con anterioridad.

En el orden socio-económico los resultados obtenidos ofrecen herramientas paraclínicas auxiliares de utilidad para la confirmación diagnóstica precoz y el

seguimiento clínico terapéutico, equivalente mayor calidad en los servicios especializados de salud que se les brinda y la optimización de los recursos humanos y materiales en el manejo de las personas con EM.

Los resultados de este trabajo se publicaron en siete artículos aparecidos en revistas internacionales de impacto, se acreditaron con Premio Anual de Salud 2006, 2007 y 2009, Premio de la Academia de Ciencias de Cuba 2004 y 2009, Premio de la Sociedad Cubana de Inmunología 2007 y 2009, Forum de Ciencia y Técnica 2001 y 2008, la Certificación de Resultados Introducidos del CIREN y trabajos presentados en más de 15 eventos nacionales y/o internacionales.

El documento está formado por 10 secciones (Introducción, Revisión Bibliografía, Materiales y Métodos, Resultados, Discusión, Conclusiones, Recomendaciones, Referencias Bibliográficas, Producción científica del autor, Anexos); Consta de 111 páginas, 17 figuras y 8 tablas.

Los resultados referidos en este trabajo han sido publicados en 7 artículos aparecidos en revistas internacionales de impacto, han sido acreditativos de reconocimientos en 6 premios de los Concursos: Premio Anual de Salud, Premio de la Academia de Ciencias de Cuba , Premio de la Sociedad Cubana de Inmunología y Forum Municipal Provincial de Ciencia y Técnica. Los mismos han sido objeto de certificaciones de Resultados Científicos Introducidos y fueron presentados en más de 15 eventos científicos (nacionales e internacionales).



## 2. MARCO TEÓRICO

### 2.1. Generalidades

El SNC consiste en una serie de estructuras complejas que contienen elementos celulares con funciones básicas de comunicación y elaboración de información, como parte de su papel en el proceso de adaptación biológica y mantenimiento de la homeostasis<sup>(51)</sup>.

Durante siglos el sistema nervioso fue considerado como un sitio inmunológicamente privilegiado por la existencia de la barrera hematoencefálica (BHE), la ausencia de drenaje linfático convencional y la baja respuesta a los aloinjertos o antígenos inoculados en él SNC. Sin embargo, hoy día se conoce que *las principales diferencias de la respuesta inmune en el cerebro respecto a la periferia, se manifiestan en la cinética y el grado de regulación de las diferentes etapas de dicha respuesta a ese nivel y tiene lugar bajo el control funcional de mediadores celulares que actúan en una secuencia regulada y balanceada cuantitativa y temporalmente*<sup>(52)</sup>.

### 2.2. Sistema de barreras

El sistema de barreras existente entre el espacio intravascular y el cerebro constituye un fenómeno de permeabilidad selectiva e intercambio reducido de productos entre la sangre y el sistema nervioso, característico de los capilares cerebrales y regulado por las células de la unidad neurovascular (UNV)<sup>(53-55)</sup> y

la dinámica de flujo del LCR <sup>(53,54)</sup>. La UNV se refiere al intercambio dinámico entre los elementos celulares que forman el sistema de barreras del cerebro; interfase regional especializada entre el tejido neural y la sangre <sup>(56)</sup>.

Así, dicho sistema incluye: 1) *la barrera sangre-LCR*; sitio de comunicación inmunológica entre el LCR y el espacio intravascular que facilita el reconocimiento antigénico y la activación de linfocitos a este nivel <sup>(57-59)</sup>; 2) *la barrera que forman las meninges* formada por la membrana aracnoides que bordea la duramadre y donde el LCR drena en los senos venosos duros, el nervio olfatorio y las vainas carotídeas <sup>(60)</sup>; 3) *la barrera hematoencefálica (BHE)* formada por el endotelio vascular cerebral, que regula la entrada de moléculas y el suplemento de nutrientes al cerebro así como preserva la homeostasis iónica en el microambiente cerebral <sup>(61)</sup>; 4) *la barrera nervio-sangre* que rodea los ovillos de los axones e incluye la membrana endotelial del capilar endoneural y el "perinerium" <sup>(62)</sup>; 5) *la barrera retina-sangre*, formada por el endotelio capilar retiniano y el epitelio del pigmento retinial, la cual simula la BHE; 6) *la barrera laberinto-sangre* que tiene referencia anatómica en las barreras endolinfo-sangre y endolinfo-perilinfo, aunque diferente de la composición química de la sangre y los fluidos propios del oído; 7) y *la barrera médula espinal-sangre*, de permeabilidad mayor que la BHE, está en comunicación con la periferia a través de las raíces nerviosas que entran en las zonas carente de plexo coroideo <sup>(63)</sup>.

Las interacciones entre el sistema de barreras que forman la UNV, constituyen la base de los eventos patológicos que tienen lugar en enfermedades como la EM, la uveítis posterior, la vasculitis del SNC, las isquemias cerebrales, la enfermedad de Alzheimer y neuroSIDA, entre otras <sup>(64)</sup> y derivan de señales de transducción, disrupción y ensamble de la BHE en condiciones patológicas <sup>(65,66)</sup>.

### 2.3. Respuesta de anticuerpo y síntesis de inmunoglobulinas en SNC

La regulación de la respuesta de Acs en el SNC respecto a la periferia se manifiesta por 1) la ausencia de cambio de clases de IgM a IgG, 2) la existencia de patrones constantes de síntesis para las diferentes clases de Igs, y 3) un ritmo más lento de caída de la respuesta que en la periferia <sup>(67)</sup>. En este sentido la ausencia de SI o la síntesis combinada para los diferentes isotipos de Igs dependen del estímulo antigénico, del sitio de la lesión y de la etapa individual del proceso patológico de que se trate <sup>(68-70)</sup>.

La deducción de la fracción de Ig sintetizada en el SNC constituye en la actualidad una de las herramientas paraclínicas más utilizadas en el estudio de las enfermedades neurológicas. Para ello se han utilizado diferentes formulaciones matemáticas que tropiezan con la dificultad de no ser válidas en presencia de alteración de la permeabilidad de la barrera a las proteínas séricas <sup>(71-76)</sup>. Ante esta dificultad, la electroforesis de proteínas (EFP), una técnica para la separación de proteínas basadas en el tamaño, la forma o el

punto isoeléctrico, resultó de gran utilidad en la evaluación de la presencia de síntesis intratecal de IgG , basada en la detección de bandas oligoclonales (BOC) en el LCR,.

Existen diferentes tipos de EFP en función del tipo de separación empleado: electroforesis de zona (separación en función de la carga), isoelectroenfoque y separación por tamaño en tamiz molecular <sup>(77,78)</sup>, las cuales pueden realizarse sobre diferentes soportes sólidos: papel, acetato de celulosa, electroforesis en gel o electroforesis capilar. El Isoelectroenfoque se basa en el desplazamiento de las moléculas en un gradiente de pH y las proteínas se separan en función de su punto isoeléctrico (pI): valor de pH en el que la carga neta de la proteína es nula <sup>(77,78)</sup>.

La electroforesis de proteínas en geles, una de las técnicas más ampliamente usadas para caracterizar las proteínas, puede ser en geles de poliacrilamida, comúnmente denominada *electroforesis en poliacrilamida* o en agarosa denominada *electroforesis en agarosa*. Ambos métodos, son rápidos y económicos y requieren cantidades del orden de microgramos de proteína para su análisis <sup>(77)</sup>.

Los geles de poliacrilamida son químicamente inertes, transparentes y estables en un amplio rango de pH, temperatura y fuerza iónica, y permiten la identificación de IgG oligoclonal en el LCR, con la desventaja de la toxicidad de los reactivos, la difícil distinción del resultado con las técnicas de tinción convencional (azul Commassie), y la necesidad del uso de muestras

concentradas de LCR <sup>(77-80)</sup>. Los geles de agarosa, por su parte, forman una matriz inerte, no tóxica y no interfieren con la separación de las proteínas, de ahí que resulte especialmente adecuado para su detección específica por inmunofijación y aseguren su máxima transferencia a la membrana de nitrocelulosa con una mayor sensibilidad, un patrón estable, sin tiempo límite y una alta resolución <sup>(79-81)</sup>.

La electroforesis de proteínas, en geles de acrilamida en disco, utilizada desde la década de los 60, devino una alternativa para la identificación de la IgG oligoclonal en el LCR <sup>(78,80)</sup>. Desde la década del 80, este método aportaron sensibilidad a la detección de IgG en el LCR y aunque con algunas limitantes, fue utilizada en la práctica clínica apoyada en técnicas de tinción de plata de Poehling y Neuhoft que le dieron mayor sensibilidad al sistema de detección, en muestras no concentradas de LCR <sup>(81)</sup>.

La electroforesis en geles de agarosa, resultó ser especialmente adecuada para la detección de BOC de Igs en el LCR, seguida de la FIE e inmunofijación y fué más tarde recomendada para su implementación en los laboratorios por su sensibilidad y alta resolución <sup>(82,84)</sup>. En nuestro medio contamos hoy día con la EFP en disco en geles de acrilamida de menor sensibilidad para la detección de BOC de IgG en el LCR.

Las BOC de Ig, aparecen tempranamente en el curso de la EM y aunque el patrón puede diferir de paciente a paciente, una vez generadas se mantienen constantes en el LCR <sup>(27-29)</sup>, diferente a la concentración absoluta de Igs cuyos

valores fluctúan entre individuos y pueden ser reducidos con tratamiento inmunosupresor <sup>(27)</sup>. Se conoce además, que existe un pequeño grupo de personas, con diagnóstico clínico e imagenológico confirmado de EM, en quienes las BOC no son detectables en el LCR <sup>(28, 29,85)</sup>.

Las BOC en el LCR, evidencia de la participación de los linfocitos B en la patogenia de la enfermedad, muestran también variación en diferentes patologías neurológicas como, la neuritis óptica (34 -72%), las enfermedades cerebro vascular (30- 50%), los tumores cerebrales y la siringomielia (5 -10%) <sup>(27,29)</sup>. Algunos autores han reportado correlación entre el incremento de la IgG y/o la ausencia de BOC en el LCR de personas con EM tanto en cursos clínicos benignos de la enfermedad como en estados de empeoramiento <sup>(86-88)</sup>, de ahí el interés de su evaluación por métodos que permitan una mayor precisión en el análisis.

### 3.4. Respuesta de anticuerpos y sistema nervioso central en EM

El 85% de las personas portadoras de EM comienzan con recaídas y remisiones y pasado 15 a 20 años de iniciado los síntomas, el 50% transita eventualmente hacia la fase secundariamente progresiva, que se manifiesta por brotes que progresan en el tiempo con recuperación incompleta y discapacidad irreversible <sup>(89)</sup>. La EMPP (10-20%) por su parte, muestra una evolución crónica progresiva irreversible que ocurre entre y en ausencia de las recaídas <sup>(90)</sup>. La forma benigna (5-40%), no alcanza la fase secundariamente progresiva o al

menos no acumulan discapacidad significativa en largo tiempo, una vez iniciado los síntomas, mientras la forma maligna evoluciona hacia la forma fatal, en meses o años <sup>(91,92)</sup>.

La activación de linfocitos B por antígenos propios en la EM, parece ocurrir por un efecto de célula espectadora o por estimulación por superantígenos <sup>(93,94)</sup>.

La existencia de Acs de especificidad variada, se ha demostrado en lesiones de EM contra: ribonucleoproteína B1 nuclear, epitopes conformacionales de la glicoproteína del oligodendrocito de la mielina (GOM) y anticardiolipina, estos últimos en la forma progresiva de la enfermedad <sup>(95-103)</sup>. Acs contra antígenos virales también han sido detectados en el LCR de estas personas contra el sarampión, rubéola, Herpes virus 6, Epstein-Bar, herpes simple, citomegalovirus, varicela zoster y retrovirus endógenos) <sup>(104-106)</sup>. Los Acs sintetizados en LCR y suero de pacientes con EM, han sido reportados contra antígenos virales como, el virus de la rubéola, varicela zoster, herpes simplex, y papera <sup>(35-37)</sup>, de ahí, que la respuesta contra Acs no causales en esta enfermedad, represente un proceso inflamatorio más general no dependiente de la persistencia del estímulo antigénico o vinculado a procesos agudos, subagudos y crónicos <sup>(100-105)</sup>.

En opinión de Reiber y cols, la detección de síntesis intratecal contra un antígeno causal por "Western blots e immunoblots y el análisis cuantitativo del Índice de Acs (IA) son en la actualidad, relevantes para el diagnóstico en EM <sup>(101,102)</sup>, en concordancia con la alta frecuencia de combinación de la respuesta

de Acs contra virus neurotrópicos observada en la EM y esto ha llevado a reconocer la reacción<sub>SRZ</sub> como indicativo de un proceso inflamatorio crónico autoinmune <sup>(42, 43,107-109)</sup>.

La detección de respuesta de Acs contra virus, fue reportada por primera vez por Goldmann y cols en 1954, en enfermedades oculares <sup>(110)</sup>. Felgenhauer en 1982, comparó las concentraciones de IgG en LCR y suero de personas con EM, por densidades ópticas <sup>(111)</sup>. A estos primeros reportes le siguieron las correcciones introducidas por Reiber y Lange en las metodologías con el índice de Acs (IA) y aportaron una mayor precisión en la determinación de la respuesta de Acs específica en SNC <sup>(108)</sup>.

Si bien, el IA representa una herramienta sensible para la detección de respuesta de Acs específico en SNC, algunos autores consideran que este no se corresponde con la intensidad de dicha respuesta <sup>(107)</sup>. Jacobi y cols reportaron la determinación de la fracción específica como una herramienta que permite discriminar la intensidad de la respuesta de Acs en el SNC, basados en la estimación cuantitativa de los Acs, por ensayos inmunoenzimáticos, en el LCR y la significación especial a la interpretación de estos resultados.

Otro aspecto de la respuesta de Acs específica en la EM, es la reactividad contra componentes de la arquitectura axoneuronal. Silber y Eikelenboom fueron los primeros en reportar la presencia de Ac contra la subunidad ligera (PLNF) y media (PMNF) del axón, en LCR de personas con EM, y sugirieron su utilidad para distinguir la forma progresiva de la enfermedad <sup>(44,45)</sup>.



Más tarde, Bartos y cols en el 2007, reportaron la presencia de Acs de los isotipos IgM e IgG contra la PLNF en el LCR de pacientes con EM, sin atribuirles validez como marcador de daño axonal y/o utilidad para distinguir la forma progresiva de esta enfermedad <sup>(112,113)</sup>. Otro estudio reportado por Huizinga y cols, en el 2008, demostró un incremento de Acs IgG e IgM contra PMNF en personas con EM, aunque sin referir relación significativa con las formas clínicas de la enfermedad <sup>(114)</sup>. A partir de estos reportes, surgió nuestro interés de explorar, la presencia de Acs contra la PLNF en LCR de personas con EM teniendo en cuenta su implicación funcional a nivel axonal y su posible relevancia en el contexto de la degeneración axoneuronal, que acontece en la enfermedad.

## 2.5. Hallazgos etiopatogénicos en esclerosis múltiple

### 2.5.1. Influencia medioambiental y genética en la etiopatogenia de la EM

La prominencia del gradiente geográfico de la EM ha llevado al estudio de factores ambientales relativos a las latitudes, como son, la baja exposición a las radiaciones solares, la baja temperatura y la exposición a patógenos más frecuentes en las áreas del norte <sup>(115)</sup>. Factores dietéticos, nutricionales; el consumo de agua, la exposición a animales, minerales, agentes químicos; traumatismos por accidentes o cirugías; y factores de riesgo ocupacional se incluyen entre otros factores de riesgo <sup>(116)</sup>.

Estudios de migración refieren que personas que migran, hacia áreas de alta prevalencia, después de los 15 años de edad, mantienen el mismo riesgo para la enfermedad de su área de origen, mientras los que migran en edades más tempranas, muestran un riesgo más elevado <sup>(116)</sup>.

Desde hace más de un siglo, estudios realizados en Dinamarca demostraron una relación entre los antígenos del sistema mayor de histocompatibilidad y la EM relacionado con los haplotipos HLA DR <sup>(117-119)</sup>. Hoy día, se ha demostrado una clara susceptibilidad en miembros relacionados, con mayor riesgo en gemelos homocigóticos (30.8 %) que en heterocigóticos (4.7%), como consecuencia de la exposición a agentes virales inductores, en etapa temprana de la vida <sup>(118,119)</sup>.

### 2.5.2. Hipótesis viral

Múltiples investigaciones consideran a los virus como causa de la EM, aunque pocos creen en la existencia de un único virus como inductor para la enfermedad. Esta hipótesis aparece sustentada por la inusual distribución de la EM en zonas geográficas de alto y bajo riesgo y la hipótesis de la higiene referida, esta última, a la predisposición para el desarrollo de enfermedades autoinmunes por la exposición tardía o la baja exposición a las enfermedades infecciosas de la infancia en regiones desarrolladas <sup>(120)</sup>.

Otras infecciones plausibles, contribuyentes al desarrollo de EM incluyen los virus del sarampión, varicela zoster, virus Epstein-Barr (VEB), papera, rubéola, retrovirus endógenos, herpes simple y citomegalovirus, picarnovirus que

invaden el tracto respiratorio, aunque sin una definición del mecanismo involucrado <sup>(121-127)</sup>.

### 2.5.3. Mecanismos moleculares implicados en la patogenia de la EM

El primer evento molecular en la patogenia de la EM, lo constituye la activación periférica de células T autoreactivas específicas restringida a epítopes inmunodominantes, seguido de la degradación del endotelio vascular y un mayor paso de linfocitos al SNC, a través de la barrera, con destrucción de la mielina o daño directo por fallas en los mecanismos regulatorios <sup>(128-130)</sup>.

La Fig.1 muestra los mecanismos implicados en el daño tisular en EM.

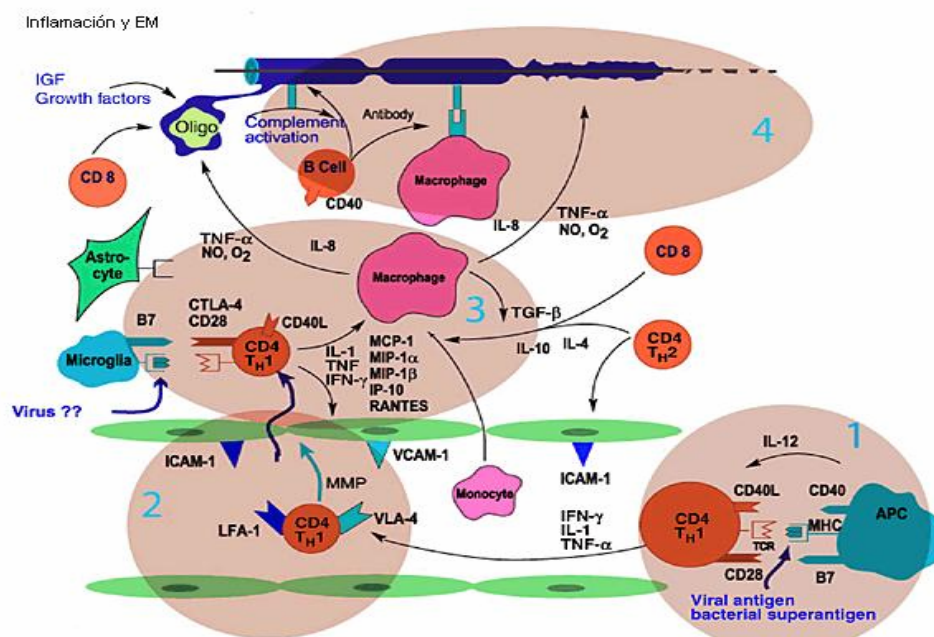


Fig 1. Mecanismos de daño tisular en EM. 1) Activación de células T autoreactivas, 2) Quimioatracción y trans migración de células T proinflamatorias y monocitos a través de la BHE, 3) Reactivación de linfocitos en el SNC, amplificación de la inflamación local y activación de microglías, 4) Fase efectora con daño de oligodendrocitos, Inducción de desmielinización y daño axonal, 5) Resolución de la lesión por mecanismos regulatorios y remielinización, amplificación de la respuesta inflamatoria e inducción de los procesos de desmielinización y daño axonal en el SNC. Tomado de Waldner H. *J Clin Invest*, 2004.

La reactividad de las células T contra proteínas y epítopes de la mielina, ocurre por la supresión de las células T reguladoras CD4+CD25+/Fox-P3+, las células T $\gamma\delta$  y NKV $\alpha$ 24+ <sup>(131)</sup>. Recientemente, se ha reportado que células T regulatorias que expresan factor de transcripción Fox-P3 (Tregs naturales CD4+/CD25+), suprimen la proliferación de células T autorreactivas y que la mutación del factor transcripcional (surfin), codificado por el gen Fox- P3, induce un descontrol funcional sobre las células CD4+/CD25+ con activación de las células T específicas para la mielina y la inducción de genes de reordenamiento, transposición y regulación de la transcripción que condicionan la susceptibilidad a desarrollar la enfermedad <sup>( 131,132)</sup>.

El compromiso axonal en la EM, descrito desde el siglo XIX por Charcot, se ha jerarquizado como un evento que ocurre tempranamente en el curso de la enfermedad, a partir de las evidencias de acumulación de proteína precursora de amiloide (PPA), en lesiones activas y crónicas de EM y el incremento de proteínas del axón en el LCR <sup>(133)</sup>.

Diferentes hipótesis tratan de explicar el daño axonal en EM y señalan que este tiene lugar por: 1) fenómenos inflamatorios mediados por citoquinas, enzimas proteolíticas o radicales libres derivados de la glia 2) la respuesta inmune directa contra el axón 3) por pérdida de factores tróficos como parte del proceso que subyace al daño axonal y 4) por mutaciones genéticas de proteínas de la mielina en ausencia de desmielinización primaria <sup>(134,135)</sup>. Otras hipótesis suman la secreción de exotoxinas por linfocitos, la liberación de

neurotransmisores excitatorios, y la acción de las caspasas, todas ellas causando degradación proteolítica de la estructura axonal desde fases tempranas en EM <sup>(136,137)</sup>.

La Fig.2 destaca los mecanismos patogénicos involucrados en los procesos de desmielinización y daño axonal en EM. Linfocitos circulantes activados atraviesan la barrera hematoencefálica y una vez en el SNC, reconocen autoAgs e inducen vía citoquinas el reclutamiento de macrófagos, responsables del proceso de desmielinización.

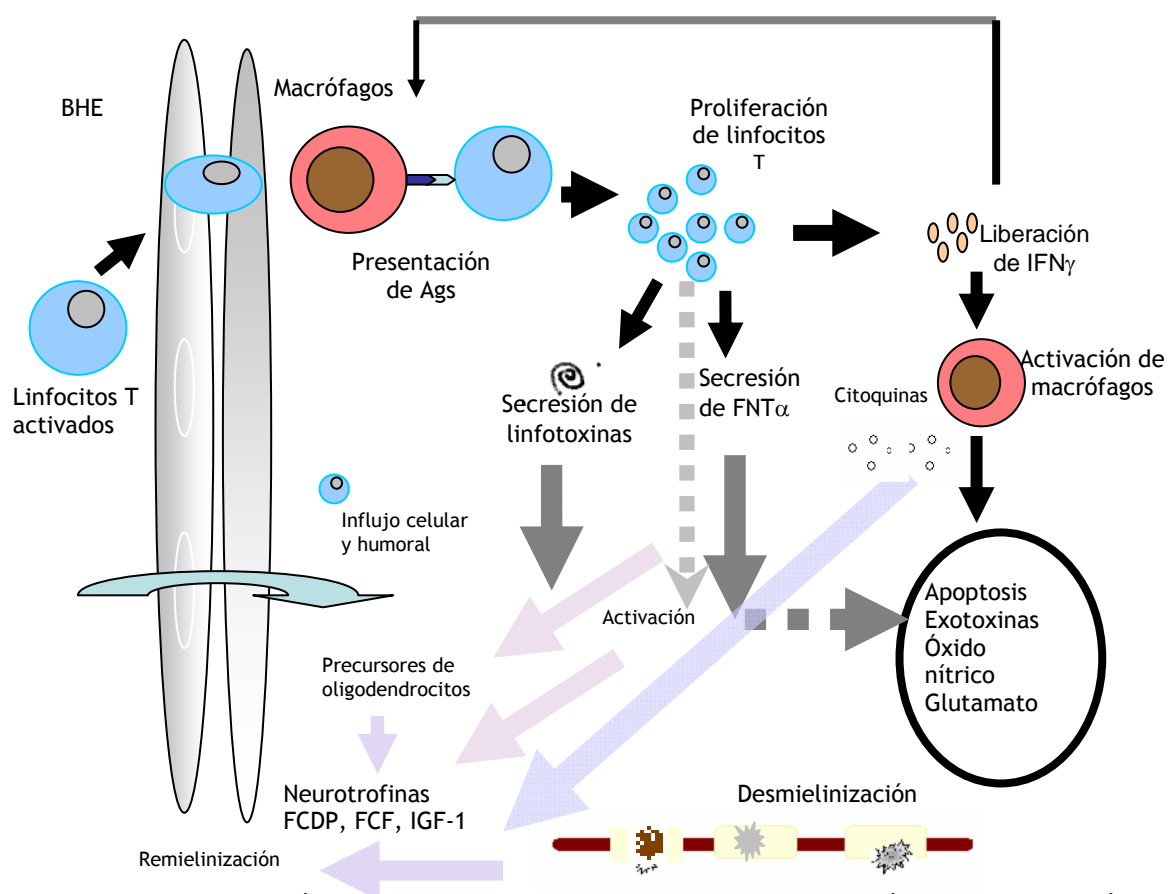


Fig 2. Mecanismos patogénicos involucrados en los procesos de inflamación, desmielinización, daño axonal y remielinización en EM. BHE (barrera hematoencefálica); Ags, antígenos; IFN $\gamma$ , Interferón gamma; FNT $\alpha$ , Factor de necrosis tumoral alfa; FCDP, factor de crecimiento derivado de plaqueta; FCF, Factor de crecimiento fibroblástico; FGI-1, Factor de crecimiento insulínico.

El daño axonal por exotoxinas y apoptosis directa no relacionado con el FNT $\alpha$ , inducen degeneración y muerte neuronal en EM <sup>(138-140)</sup>. La remielinización, con un papel neuroprotector sobre el axón, permite restaurar la conducción axonal y la función neurológica, sin embargo, en muchos casos esta se vuelve incompleta, sin que se conozcan las causas del fracaso de la regeneración, ni los factores celulares y moleculares que regulan dicho proceso<sup>(136,140)</sup>.

## 2.6. Mecanismos fisiopatológicos de las recaídas en EM

La cascada inmunológica que lleva a las recaídas en la EM, se inicia por la activación del sistema inmune innato, que induce al sistema inmune adaptativo involucrando a células T auxiliaadoras (Th1-Th17) y las células T citotóxicas que infiltran el SNC, moduladas por las células T y B reguladoras. La intervención terapéutica para el control de las recaídas implica, interferir todas las vías afectadas en la enfermedad: la supresión de células T proinflamatorias, la inducción de linfocitos T y B reguladores, control del tráfico de células hacia el sistema nervioso, protección de los axones y la mielina, así como el control de la respuesta inmune antiviral <sup>(123, 135,140)</sup>. Sin embargo, la heterogeneidad clínico -patológica de la EM y la ausencia de marcadores biológicos hacen difícil su modulación, de ahí la necesidad de poder contar con marcadores neuroinmunes que permitan predecir cambios

clínicos relativos a las recaídas y consecuentemente a la progresión de la enfermedad.

## 2.7. Marcadores biológicos en EM

Algunos autores han atribuido relevancia clínica individual en EM a los marcadores de daño axonal como: a) marcadores del citoesqueleto axonal (neurofilamentos, la actina, la tubulina y la proteína tau) y b) marcadores de la homeostasis de membrana (24s hidroxicolesterol, la apolipoproteína E, la PPA y el ácido N acetil aspártico (NAA), la proteína 14, 3,3 y la enolasa neuronal específica (ENE)<sup>(38-40,141)</sup>. Similar a otras enfermedades neurodegenerativas, el estudio del LCR en EM, muestra cambios en otros factores específicos e inespecíficos como la proteína S100 $\beta$  y el lactato relacionados con el daño glial y neuronal<sup>(112, 113,142-145)</sup>.

Siguiendo la desintegración axonal, las tres subunidades de los neurofilamentos, la cadena ligera de 68 kDa, (PLNF), la cadena intermedia, de 150 kDa, y la cadena pesada de 190-210 kDa son secretadas en el fluido extracelular del cerebro y se sabe que su ausencia en el SNC, resulta en una severa reducción del crecimiento axonal<sup>(141)</sup>. Variaciones en las concentraciones de proteínas de neurofilamentos han sido reportadas en EM, sin que se haya referido relación respecto al curso clínico y el grado de discapacidad<sup>(44-46,145)</sup>.

Si bien, la relación de la cantidad de neurofilamentos secretados a estos fluidos y el grado de degeneración axonal pudiera ser de interés para estimar el grado de progresión de la enfermedad, los reportes en este sentido son un tanto contradictorios y no han permitido establecer criterios definitorios y en este sentido, la identificación de síntesis intratecal en el LCR y de la respuesta poliespecífica contra virus neurotrópicos ha aportado mayor precisión al diagnóstico de enfermedades neurológicas.

Tampoco, se ha demostrada la relación de la respuesta poliespecífica con variables clínicas de interés para la EM, que permitan evidenciar al papel de la evaluación de la respuesta de Acs en el LCR de estas personas, como marcador para la enfermedad. Los resultados reportados con anterioridad, si bien respaldan su valor diagnóstico, no han permitido establecer su singularidad respecto a la progresión de la enfermedad.



### 3. MATERIALES Y MÉTODOS

#### 3.1. Universo del estudio

Se evaluaron personas con el diagnóstico de EM, controles neurológicos y no neurológicos. Las muestras fueron recibidas en el Laboratorio de Neuroinmunología del Centro Internacional de Restauración Neurológica (CIREN), en el período comprendido entre los años 2003-2006. En todos los casos el diagnóstico se obtuvo por recopilación de datos obtenidos de las historias clínicas.

##### *3.1.1. Criterios de inclusión*

El análisis incluyó tres grupos de personas, conformados según los criterios diagnósticos que se describen más adelante. Los datos sobre el número de personas y parámetros clínicos se muestran en los resultados.

##### **Grupo I (EM)**

*Personas procedentes del servicio de Neurología del Centro Internacional de Restauración Neurológica y el Hospital Militar "Carlos J Finlay" diagnosticados como EM según los criterios de McDonald<sup>(13)</sup>.*

##### **Grupo II (Grupo de referencia no EM)**

*Personas con enfermedades neurológicas (no EM) provenientes del servicio de Neurología del Centro Internacional de Restauración Neurológica. Las patologías incluidas fueron: cefalea migrañosa, vasculitis y demencia senil.*

### Grupo III (Controles no neurológicos)

*Personas portadoras de enfermedades no neurológicas procedentes del servicio de Cirugía del Hospital Militar "Carlos J. Finlay, intervenidos quirúrgicamente por Hernia discal, Adenoma prostático y Varicocele, quienes requirieron de anestesia raquídea. En ningún caso existió antecedente de enfermedad autoinmune o inflamatoria crónica con repercusión sobre el SNC.*

#### 3.1.2. Criterios de exclusión

Muestras de LCR provenientes de cualquiera de los grupos en estudio, en las que se demostró:

1. La presencia de 500 eritrocitos /mL o más en la muestra de LCR.
2. Personas con tratamiento inmunoestimulante o inmunosupresor al momento de la obtención de la muestra.
3. Pérdida irreparable de los datos clínicos.

#### 3.2. Consideraciones éticas

En todos los casos fue requisito indispensable la voluntariedad del paciente y el consentimiento informado de participación en la investigación, del paciente y el familiar bajo su custodia, el cual quedó plasmado en una planilla preparada al efecto (Anexo 1 y 2). Todos los sujetos estudiados fueron informados sobre la investigación, el procedimiento a aplicar, los riesgos de la toma de la muestra y los beneficios que el estudio reportaría desde el punto de vista personal, científico y social. Se les hizo saber además, sobre sus

derechos para abandonar la investigación sin que esto representara cambio alguno en el tratamiento que reciben por su enfermedad.

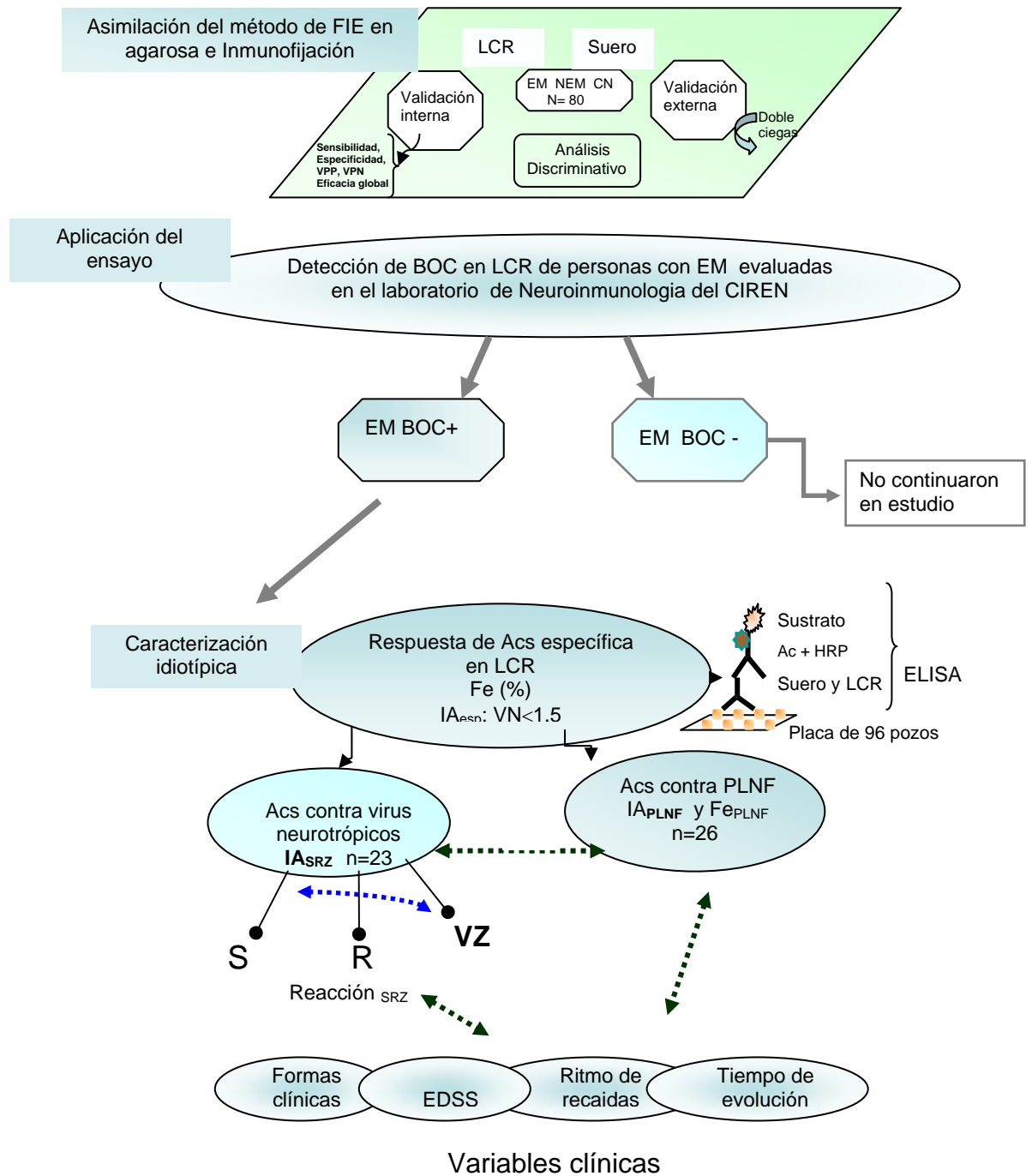
De igual forma todos los procedimientos se realizaron acorde a los principios de la ética médica, y siguiendo las recomendaciones para la investigación en seres humanos definidas en la declaración de Helsinki <sup>(146)</sup>.

### 3.3. Obtención y fuente de las muestras

- ✓ LCR y suero: De cada paciente se obtuvo, 2mL de LCR (por punción lumbar) y 3 mL de sangre venosa (por punción antecubital). La sangre se centrifugó a 350 G/10 min. /a TA. las muestras se conservaron a -80 oC hasta su uso.
- ✓ Control positivo del ensayo de FIE: LCR positivo para BOC de IgG, donados por el Laboratorio de Neuroquímica de la Universidad de Göttingen (Alemania), centro de referencia para este sistema diagnóstico.
- ✓ Control negativo del ensayo de FIE: Hemoglobina humana en polvo (Hb), donada por el laboratorio de referencia.
- ✓ Controles referenciados del ensayo de FIE: LCR de un panel casos controles, donados por el Laboratorio de Neuroquímica de la Universidad de Göttingen (Alemania). Las muestras se recibieron etiquetadas con una numeración del 1 al 5 (equivalente al número de muestras recibidas) y se congelaron a -80<sup>0</sup> C hasta su uso.

### 3.4. METODOLOGÍA

#### 3.4.1. Diseño experimental



### 3.4.2. Conceptos y definiciones operacionales

- ✓ Verdaderos positivos (VP): personas con diagnóstico clínico de EM y BOC positivas en el LCR.
- ✓ Falsos negativos (FN): personas con diagnóstico clínico de EM y BOC negativas en el LCR.
- ✓ Verdaderos negativos (VN): personas sin diagnóstico clínico de EM y BOC negativas en el LCR.
- ✓ Falsos positivos (FP): personas sin diagnóstico clínico de EM y con BOC positivas en el LCR.
- ✓ Número total de enfermos: VP + FN.
- ✓ Sensibilidad: Proporción de individuos enfermos con la prueba positiva para BOC en LCR. Se calculó como la proporción VP / número total de enfermos X 100. Se consideró como grupo caso a las personas con el diagnóstico clínico de EM <sup>(147)</sup>.
- ✓ Especificidad: Proporción de individuos no enfermos con la prueba negativa para BOC. Se calculó como la proporción VN/ VN+FP X 100. En este caso se consideró como control al grupo de referencia no EM <sup>(147,148)</sup>.
- ✓ pI: Punto isoeléctrico: gradiente de pH donde la carga de la proteína se hace cero.

- ✓ Razón Albúmina (QAlb): Estado funcional de la barrera Sangre/LCR. Se calculó como el cociente de la concentración de [(Albumina LCR ÷ suero) x 100]. Se consideró, disfunción de la barrera cuando valores de QAlb obtenidos fueron mayores que la Media  $\pm 2$  DE del grupo de referencia, para el rango de edad.
- ✓ QIgG: Razón IgG. Se define como la razón entre la concentración de la IgG derivada de la sangre y la producida localmente en el SNC. Se calculó como:  $[\text{IgG LCR}] \div [\text{IgG suero}] \times 100$ .
- ✓ Índice IgG: Se utiliza para el cálculo de la síntesis intratecal de inmunoglobulina G. Se calculó como:  $\text{QIgG} \div \text{QAlb}$  <sup>(72,73)</sup>.
- ✓ Índice Ac específico: Indica la diferencia de la cantidad de Acs entre el suero y el LCR por unidad de peso de la IgG. Se calculó como la  $[\text{Razón IgGesp LCR/Suero} \div \text{QIgG}]$ .
- ✓ Fracción específica ( $F_e$ ). Evalúa la intensidad de la respuesta de Acs intratecal específica. Se calculó como  $[(\text{IgGespLoc} \div \text{IgGtotalLoc}) \times 100]$ . Ambas, la IgG total local y la IgG específica local representan el valor medio del cociente IgG en función del rango de referencia <sup>(107, www.wormek.de,2008)</sup>. La Fe, se evaluó solo para la respuesta de Acs contra la PLNF.

- ✓ Inmunoglobulina local (IgG<sub>Loc</sub>/mg/L). IgG producida en el SNC. Se calculó como  $(Q_{IgG_{LCR/suero}} - Q_{media}) \times IgG_{suero}^{(107)}$ .
- ✓ FIlgG (%). Se refiere a la intensidad de la respuesta de Ac local y se calculó como  $IgG_{Loc} / IgG_{LCR} \times 100$ .
- ✓ Prevalencia (P): Se consideró como el porcentaje de casos positivos para BOC en los grupos estudiados.
- ✓ Valor predictivo positivo (VPP): Probabilidad de personas portadoras de EM, tengan una prueba positiva, se calculó como  $VP / (VP + FP) \times 100$ .
- ✓ Valor predictivo negativo (VPN): Probabilidad de que personas no portadoras de EM tengan una prueba negativa y se calculó como  $VN / (VN + FN) \times 100$ .
- ✓ Zona Gris: Zona alrededor del valor de discriminación donde los resultados pueden ser dudosos o no reproducibles. El ancho de la zona gris se definió como los límites de concentración entre el 5 y el 95% de los resultados positivos. A mayor estrechez de la zona gris mayor precisión <sup>(147)</sup>.
- ✓ Índice Kappa: El Índice Kappa (IK): parámetro útil para evaluar concordancia. El grado de concordancia aceptable con este coeficiente depende de las circunstancias del problema. Valores de Kappa inferior a 0.5 denota una baja correlación, baja eficacia del método y equivale a una baja capacidad para detectar correctamente los resultados positivos y negativos <sup>(147)</sup>. Este índice se aplicó para

evaluar los resultados obtenidos por los dos métodos utilizados en la evaluación del mismo panel de muestras.

Índice Kappa (K)

$$K = (p_o - p_e) / (1 - p_e)$$

$$p_o = (a+d)/n \quad p_e = (P+N)/n$$

$$P = \left[ \left\{ \frac{(a+b)}{n} \right\} \times \left\{ \frac{(a+c)}{n} \right\} \right] \times n$$

$$N = (c+d) - \{(a+c) - P\}$$

Las letras a, b, c y d corresponden a los valores de los resultados positivos y negativos en personas y controles, siguiendo una tabla de contingencia.

Valores de concordancia para el Índice

|            |           |
|------------|-----------|
| Deficiente | <0.20     |
| Regular    | 0.21-0.40 |
| Moderada   | 0.41-0.60 |
| Buena      | 0.61-0.80 |
| Muy buena  | 0.81-1.00 |

- ✓ Eficacia global (EG): Capacidad general de un ensayo para detectar correctamente todos los resultados positivos y negativos <sup>(147)</sup>.

$$EG = (VP + VN) / VP + FP + FN + VN$$

- ✓ Valor de discriminación (VD): Término analítico que define la concentración a la cual el 50% de los resultados fueron positivos.
- ✓ Prueba del producto cruzado: Se calcula como  $VP+VN/FP+FN$



✓ Valores de referencia de Igs y Albúmina en LCR y suero: valores de referencia, Instituto Neurología y Neurocirugía a partir de datos de la literatura <sup>(72,73)</sup>.

✓ *Tabla 1.* Valores de referencia de las Igs en suero, LCR y QAlb

| Clases de Igs                                      | Rango de edad<br>(años) |                         |
|--|-------------------------|-------------------------|
|  | 11-15                   | 15-64                   |
| IgG  | 8.38-15.58              | 8.0-18                  |
| IgA  | 1.58-3.74               | 0.9-4.50                |
| IgM  | 0.69- 2.6               | F 0.7-2.8<br>M 0.6- 2.5 |
| VN IgG/LCR hasta 0.034 g/ Índice IgG < 0.7         |                         |                         |
| Albúmina/LCR hasta 0.33 g/L                        |                         |                         |
| Suero 3.5- 5.5 g/L                                 |                         |                         |
| Razón Albúmina (QAlb)                              |                         |                         |
| Rango de edad                                      | VN                      |                         |
| 17 a 30 años -----                                 | 1.7 - 5.7               |                         |
| 31 a 41 años -----                                 | 1.8 - 6.2               |                         |
| 41 a 50 años -----                                 | 2.0 - 7.2               |                         |
| 51 a 60 años -----                                 | 2.1 - 8.9               |                         |
| 61 a 77 años -----                                 | 2.2 - 9.0               |                         |
| Daño ligero: 9 - 14.3, Daño moderado: 14.3 - 33.3. |                         |                         |
| Daño severo: 33.3 - 100, Total rompimiento > 100.  |                         |                         |

### 3.4.3. Reactivos utilizados

En los estudios se empleó agua destilada (conductividad < 1.0  $\mu$ S), tabla 2.

*Tabla 2.* Datos de los reactivos utilizados.

| Reactivos                                       | Firma                | Ciudad      | País        |
|---|----------------------|-------------|-------------|
| MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O            | Merck                | Darmstadt   | Alemania    |
| NaCl  | Merck                | Darmstadt   | Alemania    |
| Sorbitol  | Merck                | Darmstadt   | Alemania    |
| Acetato de Na trihidratado                      | Merck                | Darmstadt   | Alemania    |
| Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>                 | BDH                  | Poole       | Reino Unido |
| NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>                | BDH                  | Poole       | Reino Unido |
| MgCl <sub>2</sub> ·6H <sub>2</sub> O            | BDH                  | Poole       | Reino Unido |
| Sal disódica del ácido Etilendiaminotetracético | BDH                  | Poole       | Reino Unido |
| Glicerol 87%                                    | BDH                  | Poole       | Reino Unido |
| Suero fetal de ternera                          | BDH                  | California  | USA         |
| Farmallta ( Ph 3-10)                            | Pharmacia Biotech    | Uppsala     | Suecia      |
| Anfolita (Ph 3.5 -10)                           | Pharmacia Biotech    | Uppsala     | Suecia      |
| Albúmina de suero bovino                        | Sigma                | St. Luis MO | USA         |
| 3-Amino 9-etilcarbazol                          | Sigma                | St. Luis MO | USA         |
| Goat anti-human IgG                             | Sigma                | St. Luis MO | USA         |
| O-phenylendiamina Dehydrochloride               | Sigma                | St. Luis MO | USA         |
| Bufer fosfato salina PH 7.2                     | Biochrom             | Berlin      | Alemania    |
| Tween 20  | Serva Feinbiochemica | Heidelberg  | Alemania    |
| Neurofilament L 68kD porcine                    | BIOTREND             | Köln        | Alemania    |
| H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>                   | Merck                | Darmstadt   | Alemania    |
| Bicloruro de Tetrametylbenzidina                | Dade Behring         | Marburg,    | Alemania    |

#### 3.4.4. Descripción de los procedimientos por objetivos

##### Cuantificación de proteínas

La cuantificación de albúmina e inmunoglobulinas en las muestras de LCR y suero, se realizó por el método de inmunodifusión radial simple, utilizando placas comerciales *LC Albúmina* y *LC y NOR Partigen IgG* (Dade Behring, Alemania). Para ello se añadieron 5  $\mu$ L de los sueros estándar comerciales (IgG: 10,5 g/L), en las placas *NOR Partigen*. Se aplicaron diluciones seriadas de 1:100- 1:800 en las placas *LC Albumin* (Albúmina: 2.06 g/L) y de 1:200- 1:1600 en las placas LC de IgG (IgG: 0,501g/L). Las placas se colocaron cuidadosamente en cámara húmeda a 4° C entre 48 y 72 horas. Luego se midió el diámetro de los anillos de precipitación, sobre fondo oscuro, con iluminación lateral.

La concentración de Albúmina en LCR y suero e Igs en LCR, se determinaron en las muestras problemas aplicando la prueba de correlación lineal en el programa Excel sobre Windows 98. En suero los diámetros de los anillos obtenidos se hicieron corresponder, en una tabla de referencia, con sus valores de concentración para cada clase de Ig particular. Los valores se expresaron en g/L. Para el informe del resultado, se siguió el rango de normalidad establecido para la edad (ver definiciones operacionales). La determinación de IgM e IgA se realizaron por nefelometría.

## Interpretación del diagrama de las razones de Reiber

El diagrama de las razones de Reiber en un sujeto normal, se expresa como el cociente  $\text{IgG}, \text{QIgG}$  ( $\text{IgG LCR/suero}$ ) en función del cociente  $\text{Albúmina}, \text{QAlb}$  ( $\text{Alb LCR/ suero}$ ), referidas a las funciones sangre/cerebro y sangre/LCR. El mismo, tiene incorporado escalas logarítmicas para diferenciar la fracción de Ig presente en el LCR derivada del cerebro y la transferida desde la sangre. La Fig. 3, describe los detalles para la interpretación de este sistema, o validado para diferentes grupos etáreos en la población cubana <sup>(71)</sup>. Los rangos de referencia de las Fllgs en el LCR derivadas de la sangre (rango 1 y 2) corresponden a la línea hiperbólica de discriminación. Las curvas hiperbólicas más alta y más baja del rango de referencia representan las líneas de discriminación entre las fracciones de Igs del LCR derivada de la sangre y la derivada del cerebro. Valores por encima de la primera, representan la FllgG y se expresan como el porcentaje de la concentración de Ig en el LCR, leídas directamente en las líneas discontinuas del diagrama como 20%, 40%, 60% y 80% de síntesis intratecal. El 0% de síntesis representa la línea de discriminación superior. El límite del rango de referencia para QAlb entre las concentraciones de proteína en el LCR normal y aumentada (disfunción de la barrera Sangre/LCR), se indica por la línea vertical para los rangos de 5 años  $\text{QAlb} = (4+\text{edad}/15) \times 10$ ,  $\text{QAlb} = 5 \times 10^{-3}$  (hasta 15 años),  $\text{QAlb} = 6.5 \times 10^{-3}$  (hasta los 40 años) y  $\text{QAlb} = 8 \times 10^{-3}$  (hasta los 60 años). El diagrama muestra 5 zonas de interpretación: 1. Normal, 2. Disfunción pura de la barrera Sangre/LCR, 3. síntesis intratecal con cambios en el recambio del LCR, 4. síntesis intratecal sin recambio reducido de LCR y 5: valores por debajo de la línea hiperbólica inferior indica errores metodológicos. Software TR-CSF program of Wormek ([www.wormek.de](http://www.wormek.de)) <sup>(149,150)</sup>.

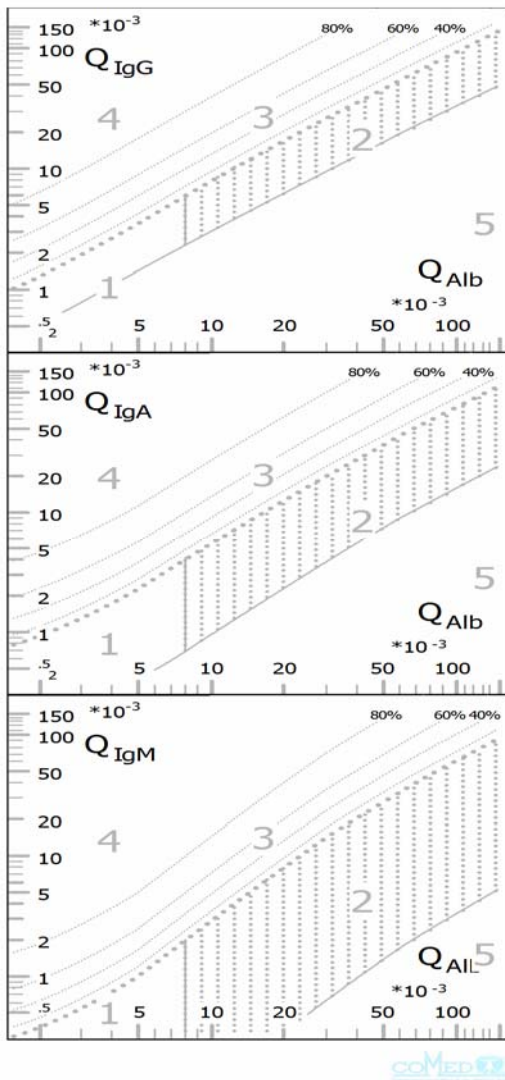


Fig 3. Diagrama del cociente LCR/Suero para IgG, IgM e IgA. Las curvas hiperbólicas del rango de referencia representan las líneas de discriminación entre la Igs en el LCR derivada de la sangre y del cerebro. Valores superiores al 0%, representan la FIIgG y se expresan como 20%, 40%, 60% y 80% de síntesis intratecal. Las zonas de interpretación son: 1. Normal, 2. Disfunción de barrera Sangre/LCR, 3 y 4 Síntesis intratecal de Igs, y 5: indica errores metodológicos.

**Objetivo 1.** Asimilación del método de FIE en agarosa e Inmunofijación para la detección de BOC de IgG en el LCR

### 1.1 Descripción del método de FIE en agarosa e inmunofijación

El análisis incluyó tres grupos:

Grupo I: n=30,

Grupo II: n = 38

Grupo III: n=12.

El método asimilado fue el de FIE en agarosa e inmunofijación con anti IgG humana obtenida en conejo/ conjugado con Peroxidasa, (DAKO). El gel de agarosa (0.25 g Agarosa IEF, 3.0 g Sorbitol, 22.5 mL Glicerol 87%/Anfolita, pH 3.5-10.0 for IEF/Farmalita 3-10 para IEF, Amersham Pharmacia Biotech, AB), fue montada sobre la parte hidrofóbica de una placa de "Gel Bond" (Pharmacy Fine Chemicals AB, Uppsala, Sweeding). Las muestras pareadas de LCR y suero de las personas enfermas, un control positivo y uno negativo (ver el acápite de muestras), se aplicaron sobre la superficie del gel.

La FIE se realizó en una cámara de electroforesis Multiphor II, (Amersham Pharmacia Biotech, AB, suplementada con una fuente de poder EPS 3501 XL, (Amersham Pharmacia Biotech), durante 1.45 horas a 1500 V y 150 mA a una temperatura de 10°C. Completada la corrida, las proteínas focalizadas se transfirieron del gel a una membrana de nitrocelulosa. Para ello se colocó un papel de filtro fino y tres gruesos (Schleicher & Schuell, Berlin, Alemania) y un peso de 1 Kg sobre el gel, durante 30 minutos. Se realizaron tres lavados con NaCl 0.9% durante 10 min. Una vez realizada la transferencia, se incubó la membrana de nitrocelulosa en la solución del Ac (70 µL de Anti-IgG $\gamma$ / 45 mL de BSA 2% en NaCl 0.9%) durante 60 minutos. Se lavó nuevamente con NaCl 0.9%. Se incubó con el cromógeno (3-Amino 9-ethylcarbazol/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>). La reacción se detuvo con agua corriente seguida del secado del gel, Fig. 4.

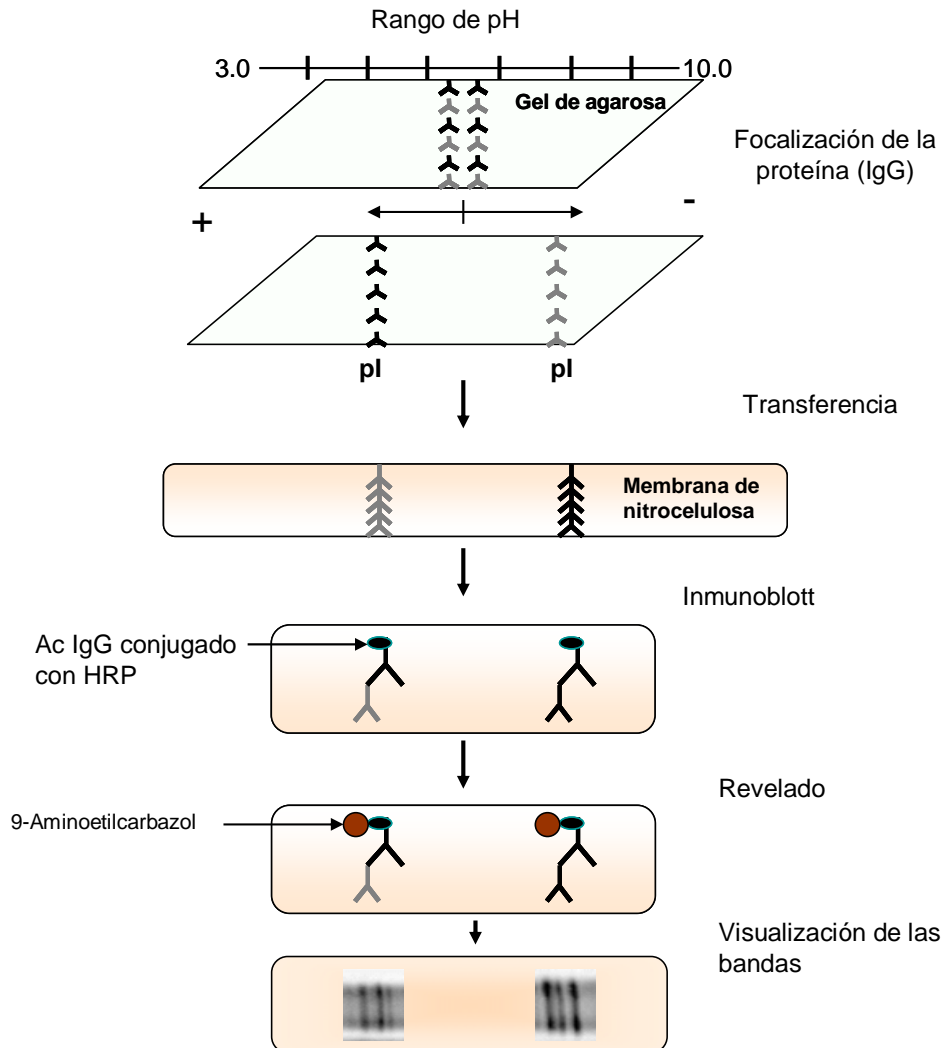


Fig 4. Diagrama del método de FIE en agarosa e Inmunofijación. Focalización de la proteína en un gradiente de pH, seguido de la transferencia a una membrana de nitrocelulosa y fijación con un Ac IgG $\gamma$  conjugado con peroxidasa (HRP), reacción con el sustrato y visualización de las bandas en la membrana de nitrocelulosa.

Los resultados se interpretaron por visualización de las BOC en la membrana de nitrocelulosa siguiendo los criterios de expertos ya establecidos y se consideró como positivo la restricción absoluta o mayoritaria de BOC en LCR<sup>(27)</sup>. Fig. 5. Por consenso internacional se describen 5 patrones de BOC en LCR: 1) LCR normal (No BOC en LCR), 2) BOC restringida al LCR (BOC en LCR), 3)

BOC en LCR y suero con mayor cantidad de bandas en LCR (combinación de los patrones 2 y 4), 4) BOC idénticas en LCR y suero y 5) Bandas monoclonales en suero y LCR. Los patrones 2 y 3 representan SI de IgG <sup>(27)</sup>.

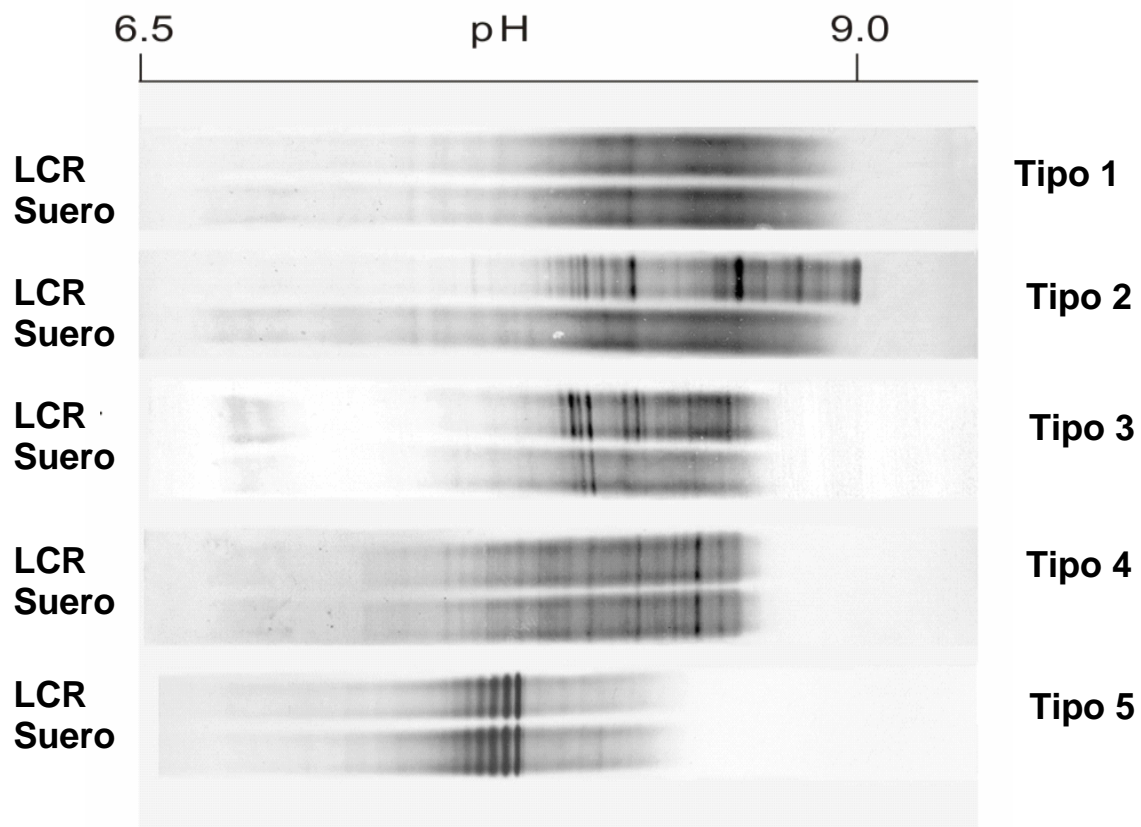


Fig 5. Focalización isoelectrica en gel de agarosa. La figura representa los 5 patrones clásicos de interpretación de las BOC en LCR y suero. Patrón tipo1: No BOC de IgG en LCR ni en suero, Tipo 2: BOC de IgG en LCR y no en suero, Tipo 3: Mayor cantidad de BOC de IgG en LCR que en suero, Tipo 4: BOC<sub>s</sub> idénticas en LCR y suero y Tipo 5: Bandas monoclonales en suero y LCR <sup>(27)</sup>.



## 1.2. Validación interna del método de FIE en agarosa e inmunofijación

Se realizaron 10 réplicas de diluciones de LCR y suero de personas positivas para BOC identificadas en este ensayo. Variables analizadas: Sensibilidad y especificidad con respecto al diagnóstico de EM, Valor predictivo positivo (VPP) y negativo (VPN), Eficacia global, precisión, concordancia y prueba del producto cruzado, Fig. 6.

Diagrama del flujo de validación interna del método de FIE e Inmunofijación

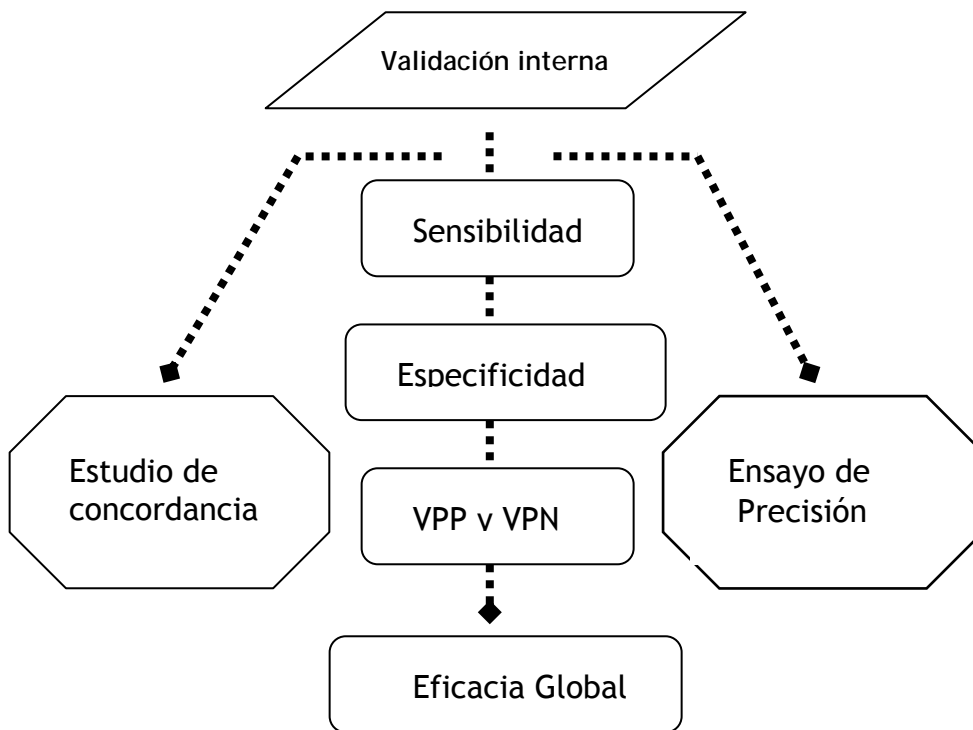


Fig 6. Diagrama de flujo de la validación interna del método de FIE e Inmunofijación. VPP: Valor predictivo positivo, VPN: Valor predictivo negativo

El ensayo de precisión se basó en el análisis del ancho de la zona gris y el valor de discriminación. Las muestras se evaluaron para los ensayos de reproducibilidad y repetibilidad. Para ello, se realizaron 10 diluciones seriadas (Puro, 1:2, 1:4, 1:8, 1:16, 1:32, 1:64, 1:128, 1:256, 1:512) de cada una de las muestras y se evaluaron las réplicas de las diluciones de 5 muestras pareadas de LCR y suero positivas, un control positivo y un control negativo de referencia.

### *1.3 Validación externa del método de FIE e inmunofijación*

Se evaluaron a ciegas, 5 muestras controles positivos y negativos de LCR referenciadas, de identidad no especificada y resultado desconocido, que fueron recibidas en nuestro laboratorio desde un panel de controles (Laboratorio de Neuroquímica, Universidad de Göttingen, Alemania). Las muestras se recibieron numeradas de forma continua del 1 al 5, adjunto a un documento que refería su contenido (LCR) y la concentración de IgG para cada caso. Los resultados (copias escaneadas de los geles) se enviaron al laboratorio de referencia. En un término de dos semanas se recibió el dictamen del grupo de expertos, con el dictamen de los resultados del ensayo, enviados desde nuestro laboratorio.

*Objetivo 2 Patrones de respuesta idiotípica contra virus neurotrópicos (sarampión, rubéola, varicela zoster (reacción<sub>SRZ</sub>) y PLNF en pacientes cubanos con EM*

- Grupo I : Personas con EM n=23
- Grupo II: Personas NEM n=8

### *2.1 Comparación de los patrones de reacción <sub>SRZ</sub> en personas EM y NEM*

Determinación de la fracción intratecal de anticuerpos contra virus neurotrópicos.

Para la determinación de la fracción intratecal de anticuerpos específicos en LCR fue necesaria la estimación cuantitativa de los niveles de Acs para cada uno de los virus neurotrópicos evaluados en LCR y suero. Para ello se siguió un ensayo inmunoenzimático modificado de Reiber y Lange <sup>(108)</sup>. Se utilizaron placas comerciales (Dade Behring) para Sarampión (Enzygnost Anti-Measles-Virus/IgG), Rubéola (Enzygnost Anti-Rrubella- Virus/\*IgG), Varicela Zoster (Enzygnost, Anti- VZV/IgG). Las placas de microtitulación recubiertas con el Ag, se incubaron toda la noche en agitación con las muestras. Se utilizó un sobrenadante de cultivo de células infectadas como control positivo. Las placas se lavaron tres veces con NaCl 0,9%, en un lavador de placa (SLT Labinstruments, Crailsheim, Alemania), luego se incubaron con 150 µL de solución de Ac IgG anti virus (sarampión, rubéola, varicela zoster), conjugado con peroxidasa durante 1hr a 37°C. Las placas se lavaron 4 veces, 10 min cada uno y se incubaron con el sustrato 20 min a TA y en oscuridad. La reacción se detuvo con 100 µL de solución de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 0.5N. Las lecturas se realizaron en un

lector de microplacas (SLT Labinstruments). Los resultados se obtuvieron por la diferencia de absorbancia  $\Delta A = A_{450} - A_{570}$  o  $\Delta A = A_{490} - A_{570}$  y fueron transferidos a unidades arbitrarias de concentración calculadas con un programa acoplado a la computadora (SLT "easy fit", Germany). Para el cálculo del cociente final LCR/suero, se seleccionaron los valores en el mejor rango de la curva estándar.

El índice de Ac específico ( $IA_{esp}$ ): se evaluó como la razón entre el cociente LCR/suero del anticuerpo específico  $QIgG_{esp}$  y el cociente total de inmunoglobulina ( $QIgG_{total}$ );  $IA_{esp} = QIgG_{esp} / QIgG_{total}$ . Para evitar falsos negativos, en los casos de una muy elevada síntesis intratecal de inmunoglobulina ( $QIgG_{total} > Q_{lim}$ ),  $Q_{esp}$  se refirió a  $Q_{lim}$  (límite superior del rango de referencia) y el  $IA_{esp} = Q_{esp} / Q_{lim}$ . La respuesta combinada de anticuerpos contra los virus del Sarampión (S), Rubéola (R) Varicela Zoster (Z), se consideró como reacción<sub>SRZ</sub><sup>(108)</sup>.

La  $QIgG$  representó las condiciones de barrera referente a la fracción de IgG específica presente en el LCR derivada de la sangre, en ausencia de síntesis intratecal y calculada en el diagrama de las razones como:  $Q_{lim} = 0.93 \times \sqrt{(Q_{Alb}^2 + 6)} - 1.7$ .

## Interpretación de los resultados

Rango de referencia  $IA_{esp} = 0.7-1.3$ . Se consideraron positivos valores del  $IA > 1.5$  para cada uno de los virus evaluados. La reacción<sub>SRZ</sub> se consideró por la positividad del  $IA_{esp}$  para al menos dos de los virus evaluados <sup>(108)</sup>.

### *2.2 Patrones de reacción SRZ en personas cubanas y europeas con EM*

Se describen las diferencias entre los patrones de respuesta intratecal idiopática contra los virus neurotrópicos obtenidos en los pacientes cubanos evaluados y europeos ya reportados,  $n=177$  (Comunicación personal del Prof. Hansotto Reiber). Se establecen comparaciones respecto a la frecuencia de positividad del IA para cada uno de los virus y de la reacción<sub>SRZ</sub>.

### *2.3 Respuesta de Ac contra PLNF en LCR de pacientes EM. Relación a la reacción<sub>SRZ</sub>*

- Grupo I: Pacientes con EM  $n=26$

Determinación de la fracción intratecal de anticuerpos contra la PLNF

La determinación de la respuesta de anticuerpos contra la proteína ligera de neurofilamentos en SNC de personas portadoras de EM, se estimó por el  $IA_{PLNF}$  y la  $Fe_{PLNF}$ , esta última como medida de la intensidad de la respuesta. Las concentraciones de  $Acs_{PLNF}$  (IgG) en LCR y suero se determinaron utilizando un ensayo inmunoenzimático modificado de Reiber y Lange, descrito por Silber y cols <sup>(44)</sup>. Se utilizaron placas de 96-pozos (Maxisorp, Nunc, Denmark). Las placas, recubiertas con 100  $\mu$ L de una solución PLNF [2,5  $\mu$ g/mL/ solución

tampón de recubrimiento ( $\text{Na}_2\text{CO}_3$  11 mmol/L,  $\text{NaHCO}_3$  35 mmol/L (pH 9,6)]. Las placas fueron incubadas en cámara húmeda, a 4°C durante toda la noche y se lavaron tres veces con solución salina tampón-fosfato (SSTF) (pH 7.2).

La curva estándar se realizó con una mezcla de sueros altamente positivos para anticuerpo contra PLNF (Laboratorio de Neuroquímica, Universidad de Gottingen, Alemania), en diluciones seriadas (rango de adsorbancia entre 2.0-0.1 de DO) en cada ensayo. Los sueros a evaluar fueron diluidos 1:50 y 1: 150 en NaCl 0.9%, el LCR se aplicó puro. En ambos casos se aplicaron 100  $\mu\text{L}$ /pozo por duplicado de las muestras. Las placas se incubaron entre 18 y 22 h a 4°C y se lavaron 4 veces con SSTF. Luego se añadió 100  $\mu\text{L}$ /pozo del anticuerpo anti-IgG humano conjugado con peroxidasa (Ac de conejo anti cadena  $\gamma$ , SIGMA, St. Louis, MO, EUA), diluido 1:2000 en NaCl 0,9% .Las placas se incubaron durante 1 h a 37°C en cámara húmeda, se lavaron cinco veces con SSTF y se añadió 100  $\mu\text{L}$ /pozo del sustrato: TMB (Dicloruro de Tetrametylbenzidina, Dade Behring, Marburg, Alemania, 5 g/L) más  $\text{H}_2\text{O}_2$  (0,1g/L) en solución tamponada de acetato de sodio ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  25 mmol/L (pH 4,1). Las placas se incubaron en la oscuridad durante 30 min. La reacción se detuvo con 50  $\mu\text{L}$  de una solución de  $\text{H}_2\text{SO}_4$  0.5N.

La absorbancia de las muestras fueron medidas en un lector de microplacas (SLT Labinstruments) y se calculó la diferencia a un  $\Delta A = A_{450} - A_{620}$ , con un programa acoplado a la computadora (SLT "easy fit"). De las variaciones dentro del 10% del límite, se seleccionaron los valores en el mejor rango de la

curva estándar para el cálculo del cociente final LCR/suero. Los valores se expresaron en unidades arbitrarias.

El  $IA_{PLNF}$  se evaluó como el cociente  $QIgG_{PLNF}/QIgG_{total}$ . En los casos con una muy elevada síntesis intratecal de inmunoglobulina ( $QIgG > Q_{lim}$ ),  $Q_{PLNF}$  se refirió a  $Q_{lim}$ , como el límite superior del rango de referencia y el  $IA_{PLNF} = Q_{PLNF} / Q_{lim}$ , para evitar falsos negativos. El rango de referencia del IA fue considerado como 0.7-1.3 y como IA positivo se consideraron valores del  $IA > 1.5$  <sup>(44)</sup>. La intensidad de la respuesta contra la PLNF, se calculó como la  $Fe$  ( $Fe_{PLNF}$ ) <sup>(107)</sup>.

#### *2.4. Patrones de reacción<sub>SRZ</sub> y respuesta contra la PLNF ( $IA_{PLNF}$ y la $Fe$ ) en pacientes EM*

Se establecieron 3 patrones de respuesta de Ac, para la la reacción<sub>SRZ</sub>: *Patrón I*: de no reacción, se designó para aquellos pacientes con muestras positivas para uno de los virus evaluados, *Patrón II*: para las muestras positivas para dos de los virus evaluados y *Patrón III*: para las muestras positivas para tres de los virus evaluados. *Los patrones II y III se consideraron como reacción<sub>SRZ</sub>*. Se evaluaron los patrones de reacción<sub>SRZ</sub> y de estos respecto a los resultados del  $IA_{PLNF}$ . La relación entre el  $IA_{PLNF}$  y la  $Fe_{PLNF}$ , también fue estimada.

*Objetivo 3. Relación de los patrones de reacción<sub>SRZ</sub>, el IA<sub>PLNF</sub>, la Fe<sub>PLNF</sub> y las variables*

Las variables clínicas incluidas en el análisis fueron: formas clínicas de la enfermedad (EMRR y EMSProg), tiempo de evolución, ritmo de recaídas y escala de discapacidad (EDSS) en las personas portadoras de EM, datos tomados de las HC. Los valores de la EDSS se obtuvieron de las HC, evaluados pacientes según lo descrito por Kurtzke <sup>(151)</sup>. Los pacientes fueron clasificados de acuerdo a sus forma clínica siguiendo los criterios de Mc Donald <sup>(23)</sup>. El tiempo de evolución de la enfermedad se expresó en años de duración a partir del momento del diagnóstico.

#### 3.4.5. Procesamiento estadístico

Se realizó la estadística descriptiva y prueba de normalidad para todas las variables en estudio. Para el análisis de las diferencias entre los grupos se aplicaron las pruebas no paramétricas de comparación de frecuencias y medias, Chi cuadrado, Kruskal Wallis y la U de Mann Whitney respectivamente. La prueba de correlación de Spearman se aplicó para el análisis de la relación entre las variables. El nivel de significación de las diferencias se consideró para  $p < 0.05$ . Los resultados se presentan en tablas de contingencias 2x2, tablas de distribución de frecuencias, tablas de tabulación cruzada descriptiva y gráficos confeccionados en Graph Pad Software Inc (Prism Versión 5.01) y el programa "Statistic" (Versión 5, 2003).



## 4. RESULTADOS

### 4.1. Objetivo 1 .Asimilación del método de FIE en agarosa e inmunofijación para la detección de BOC de IgG en el LCR

La tabla 3 muestra los datos demográficos de las personas portadoras de EM, enfermedades neurológicas no EM y no portadoras de EM, incluidas en el estudio.

*Tabla 3.* Datos demográficos de pacientes EM y controles

| Grupos        | I<br>n=30 | II<br>n=38 | III<br>n=12 |
|---------------|-----------|------------|-------------|
| Edad (años)*  | 43/ 38-54 | 42/35-52   | 46/37-53    |
| Sexo (M/F)    | 13/17     | 26/12      | 5/7         |
| Raza $\Delta$ | 9/7/14    | 7/3/28     | 4/6/2       |

\*Mediana /Rango Intercuartil. Raza $\Delta$ Negra/Blanca/Mulata.

Grupos I(EM); II (NEM); III (CNN)

#### *4.1.1. Validación interna del método del método de FIE en agarosa e inmunofijación*

En la validación interna del método de FIE en agarosa e Inmunofijación, se evaluaron 80 muestras de pacientes agrupadas en tres grupos: 30 con el diagnóstico de EM (*Grupo I*), 38 con enfermedades neurológicas no EM (*Grupo II*) y 12 controles con enfermedades no neurológicas (*Grupo III*). Del total de casos evaluados, 25 correspondieron a personas con EM, Grupo I (83,3%) y 2 personas con enfermedades NEM (5.26 %) fueron positivos para BOC en el LCR.

En el grupo CNN, ningún caso fue positivo para BOC. La Fig 7 muestra el resultado de la FIE en agarosa, en las personas con enfermedades neurológicas evaluadas. El patrón predominante fue el de BOC de IgG restringida al LCR.

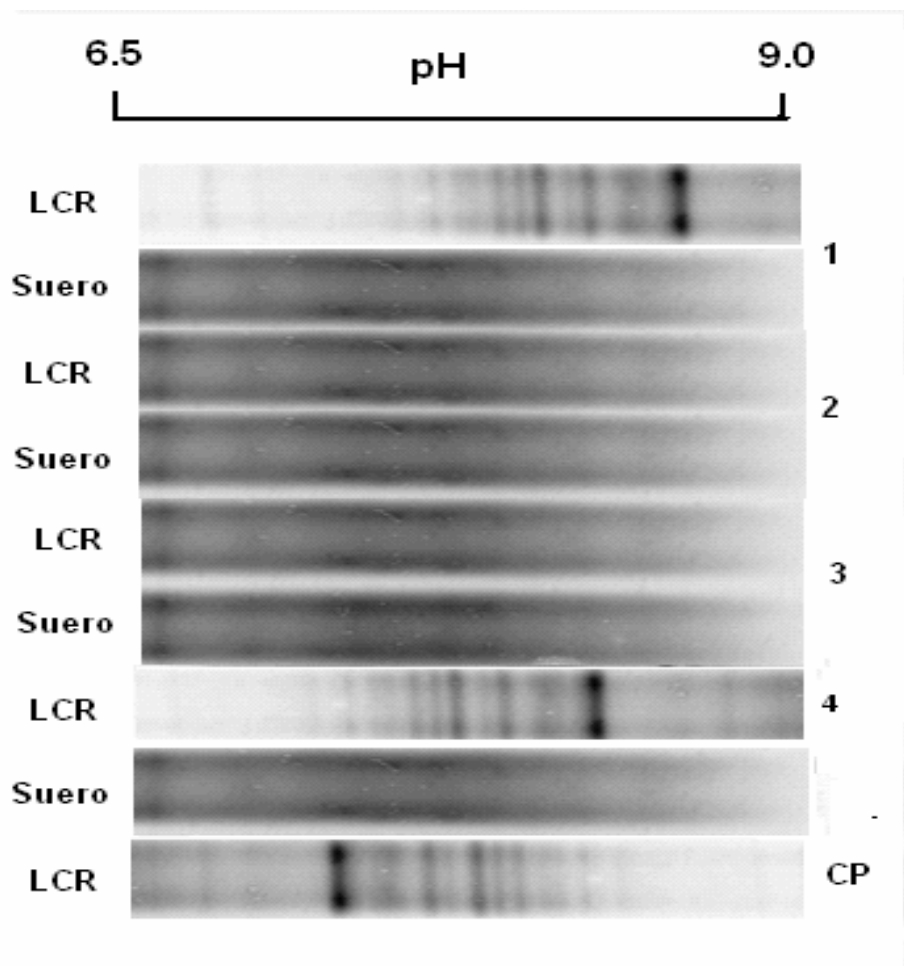


Fig.7. Gel de FIE. Del 1 al 5 los patrones de BOC corresponden a 4 pares de muestras pareadas de LCR y suero de personas con enfermedades neurológicas y un control positivo, evaluadas de rutina en nuestro laboratorio (Hbh). Muestras positivas (1 y 4).

La prueba Chi Cuadrado mostró diferencia altamente significativa de los resultados obtenidos en el Grupo I (EM) comparado con el Grupo II (NEM)  $p=0.000$  y III (CNN) ( $p=0.00003$ ). La figura 8 muestra la positividad de BOC en

LCR, obtenida en los grupos I y II. El porcentaje de BOC en el grupo EM, estuvo en el rango reportado (68-98 %) para este sistema diagnóstico <sup>(29)</sup>.

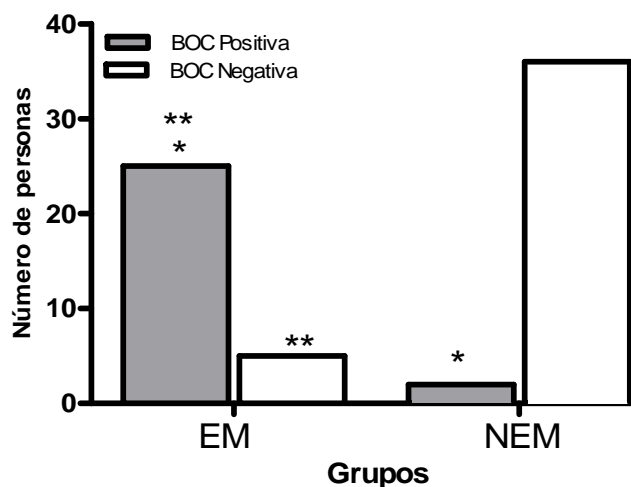


Fig 8. Frecuencia de BOC obtenida en los grupos EM: Grupo caso y NEM: Grupo de referencia. Se observaron diferencias significativas entre el número de casos positivos y negativos observados en cada grupo\* y entre los grupos\*\*. Prueba Chi Cuadrado (yates corregido)  $\chi^2=39.48$ ,  $P=0.0000$ .

La sensibilidad y especificidad obtenida en este ensayo fue del 83,3 % y del 96%, respectivamente. En la validación del método, se consideró como regla de oro de valor presuntivo, el diagnóstico clínico basado en criterio de expertos. Los valores predictivos positivos y negativos (VPP =92.6 y VPN = 90,5 %), respecto a la regla de oro y la eficacia global del ensayo (91,2%). fueron mayor del 90%. La prueba del producto cruzado mostró que el método asimilado fue 10,4 veces más eficiente en la detección de SI, comparado con el Índice IgG.

#### A. Ensayo de precisión

La dilución 1:8, fue la máxima dilución en la que se observaron resultados de positivos para BOC en el LCR. Para la dilución 1/4, (rango de concentración

entre 5.62 y 10.12 mg/L) la detección de BOC fue entre el 20-80 % de los casos. En todos los casos los valores de concentración de IgG fueron expresados en mg/L y la presencia de BOC en LCR se expresó en porcentaje de ensayos positivos con respecto al total de replicas realizadas, Fig 9.

El valor de discriminación correspondió a 10 mg/L, mientras que el rango de concentración de IgG en las muestras positivas para BOC estuvo entre 10-40 mg/L de IgG, óptimo según lo reportado para este método, (Comunicación personal Prof. Reiber, Lab. Bioquímica, Universidad de Gottingen, Alemania).

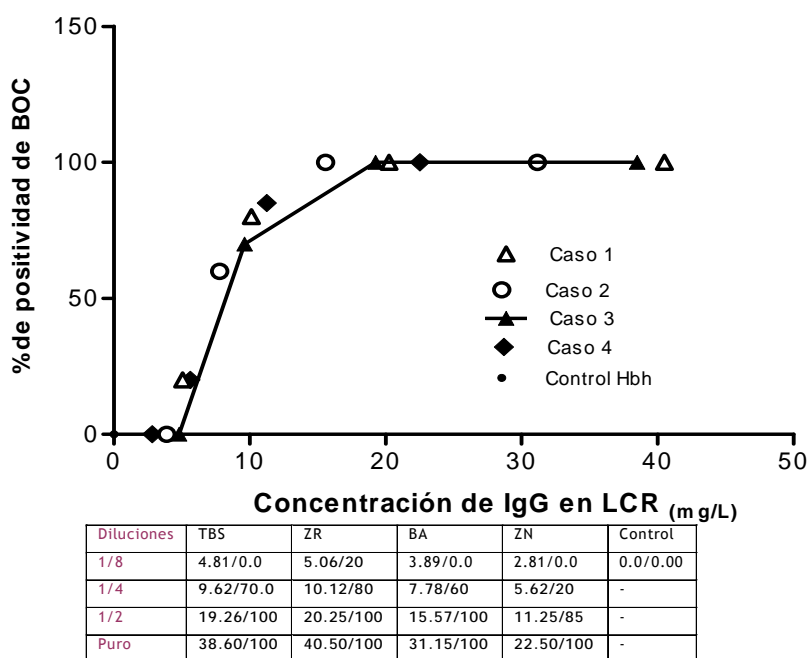


Fig.9. Ensayo de precisión del método de FIE en agarosa e inmunofijación para la detección de BOC de IgG en LCR. Ancho de la zona gris (5-95%) y valor de discriminación (10 mg/L). Los valores se expresaron como [IgG] (mg/L)/ BOC+ en LCR (%). Control (Hbh).

### *B. Análisis del Índice Kappa*

El *Índice Kappa* (IK), se aplicó para evaluar la concordancia de los porcentajes de SI identificada por FIE y el Índice IgG, tomando como regla de oro, el diagnóstico clínico. El valor del IK por la detección de BOC en el LCR fue de 0.8, equivalente a una muy buena concordancia de los resultados mientras que el del Índice IgG fue 0.6, indicativo de una concordancia moderada.

Se compararon los porcentajes de personas con SI de obtenido por el Índice IgG y la presencia de BOC en el LCR, obtenidos por la evaluación paralela en una misma muestra. Si bien ambos sistemas no son comparables, la evidencia de síntesis intratecal de Ig, permitió estimar las diferencias. El Índice IgG mostró 60 % de positividad y la FIE 83.3 % de evidencia de BOC de IgG en el LCR.

La figura 10 muestra el porcentaje SI detectada por FIE y el Índice IgG en personas con EM. El número de personas con BOC en el LCR fue superior a los que tuvieron Índice IgG positivo, (Prueba Chi cuadrado,  $*p < 0.001$ ). Un 20% de los resultados negativos por el Índice IgG, fue detectado por FIE como positivos. El número de falsos negativos observados por el Índice IgG fue mayor que por la FIE.

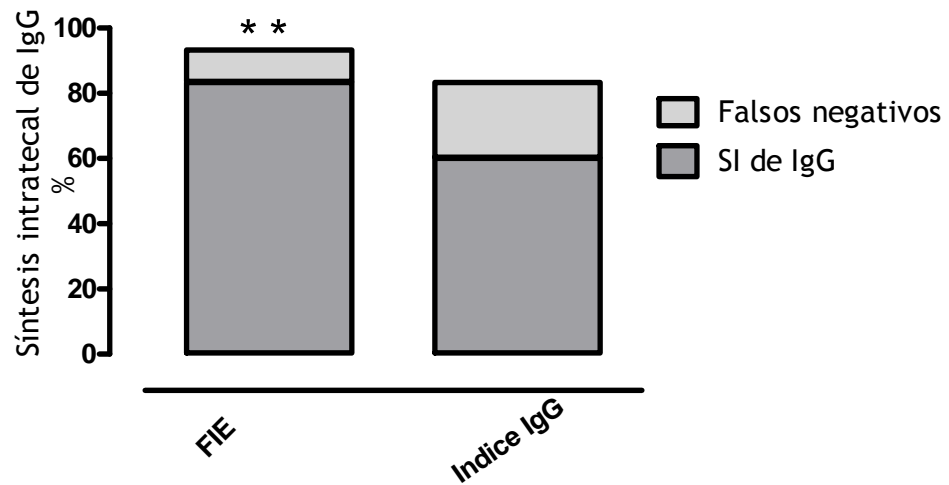


Fig. 10. Frecuencia de SI detectada por el Índice IgG y la identificación de BOC de IgG en el LCR por FIE en personas con EM (n=30). El número de casos positivos por FIE fue significativamente mayor que el Índice IgG. Prueba de  $\chi^2=12.98$ , \*\*p=0.0003.

#### 4.1.2. Validación externa del método de FIE en agarosa e inmunofijación

La Fig.11 representa la réplica de las muestras evaluadas para este ensayo. Los casos 2, 3, 4 y 5 fueron positivos, el caso 1 fue negativo. El Anexo 3 muestra el reporte de confirmación del resultado recibido en nuestro laboratorio. El dictamen consideró, 100% de concordancia de los resultados obtenidos a ciegas en nuestro laboratorio y el de referencia.

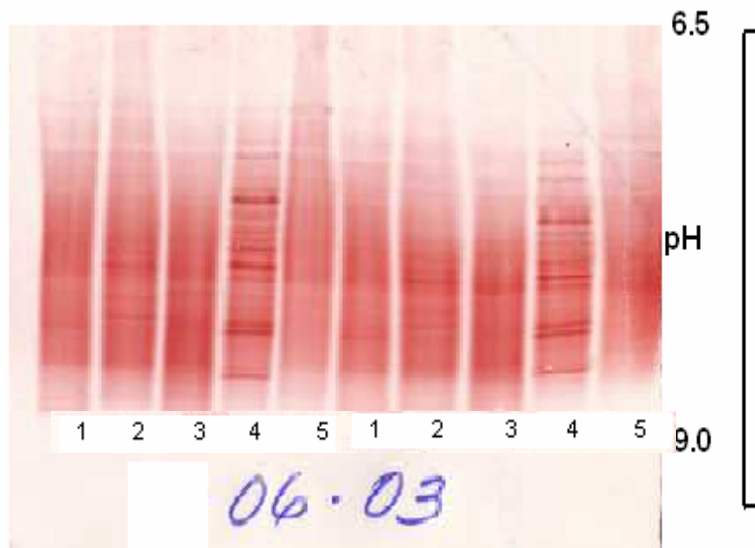


Fig.11 Patrón de las muestras duplicadas de LCR incluidas en el ensayo de validación externa realizado a ciegas en nuestro laboratorio. Las muestras duplicadas se muestran de izquierda a derecha, casos positivos 2, 3, 4,5 y caso 1 negativo.

#### 4.2. Objetivo 2. Respuesta idiotípica (reacción<sub>SRZ</sub> e IA<sub>PLNF</sub>) en EM

La tabla 4 muestra los datos demográficos obtenidos de la HC (edad, sexo y raza), de los pacientes evaluados para la respuesta idiotípica. Las personas del grupo NEM eran portadoras de cefaléa tensional, enfermedad de Alzheimer, epilepsia focal del lóbulo temporal y parálisis del nervio facial. No fue posible la definición de la forma clínica de la enfermedad en 3 de las personas portadoras de EM, por pérdida de los datos clínicos.

*Tabla 4.* Datos demográficos de las personas evaluadas

| Grupos          | EM<br>n=26 | EMSProg<br>n=13 | EMRR<br>n=10 | NEM<br>n=8 |
|-----------------|------------|-----------------|--------------|------------|
| ♣<br>Edad(años) | 38/31-46   | 45/36-50        | 38/36-45     | 43.6/36-51 |
| Sexo (M/F)      | 9/17       | 6/7             | 4/6          | 5/3        |
| Raza $\Delta$   | 10/11/5    | 7/5/1           | 3/6/1        | 3/2/3      |

♣Valores expresados en Mediana/RIQ (95 percentil).  $\Delta$  Negra/Blanca/Mulata

#### 4.2.1. Función de la barrera Sangre -LCR e inmunidad intratecal de personas EM y controles

La tabla 5 muestra el valor de la mediana de la razón albúmina y la producción local de Acs para los isotipos de Igs G, M y A de los pacientes de los grupos I y II. La disfunción de barrera Sangre/LCR fue observada en 5 personas con EM (19.2%) y 1 NEM (12,5%). En ambos grupos la mayor respuesta isotípica local (IgLoc) se observó para la IgG. Similar a lo ya reportado <sup>(68,69)</sup>, la SI para las diferentes clases de Igs mostró una frecuencia decreciente IgG>IgM>IgA. En el grupo I, la síntesis combinada de IgM e IgA estuvo asociada a la presencia de SI de IgG. En el grupo II, 2 personas (25%) mostraron SI de IgA, uno de ellos combinado con IgM.



*Tabla 5. Razón albúmina e inmunidad intratecal en las personas EM y NEM*

| <u>Grupo EM</u>  |           | <u>Ig Loc (mg/L)</u> |           |           |
|------------------|-----------|----------------------|-----------|-----------|
|                  | QAlb      | IgG                  | IgA       | IgM       |
| Mediana          | 5.55      | 9.159                | 2.46      | 0.75      |
| RIQ              | 4.2-7.7   | 4.95-27.98           | 1.16-3.86 | 0.24-1.27 |
| N                | 26        | 26                   | 26        | 26        |
| <u>Grupo NEM</u> |           | <u>Ig Loc (mg/L)</u> |           |           |
|                  | QAlb      | IgG                  | IgA       | IgM       |
| Mediana          | 4.15      | 8.006                | 2.54      | 0.66      |
| RIQ              | 3.30-7.15 | 6.95-25.8            | 0.66-4.53 | 0.57-1.38 |
| N                | 8         | 8                    | 8         | 8         |

Siguiendo las consideraciones de Jacobi y cols se consideró que, la fracción intratecal de inmunoglobulinas, como el grado de intensidad de la respuesta, difiere de la cantidad de Acs localmente sintetizado. A partir de la dinámica particular de regulación de la respuesta inmune en el SNC, nosotros exploramos la relación entre ambas variables, valida sólo para los isotipos IgG e IgM. Los resultados mostraron una correlación significativa entre las variables IgGLoc y FIlgG, en los pacientes con EM, Fig 12.

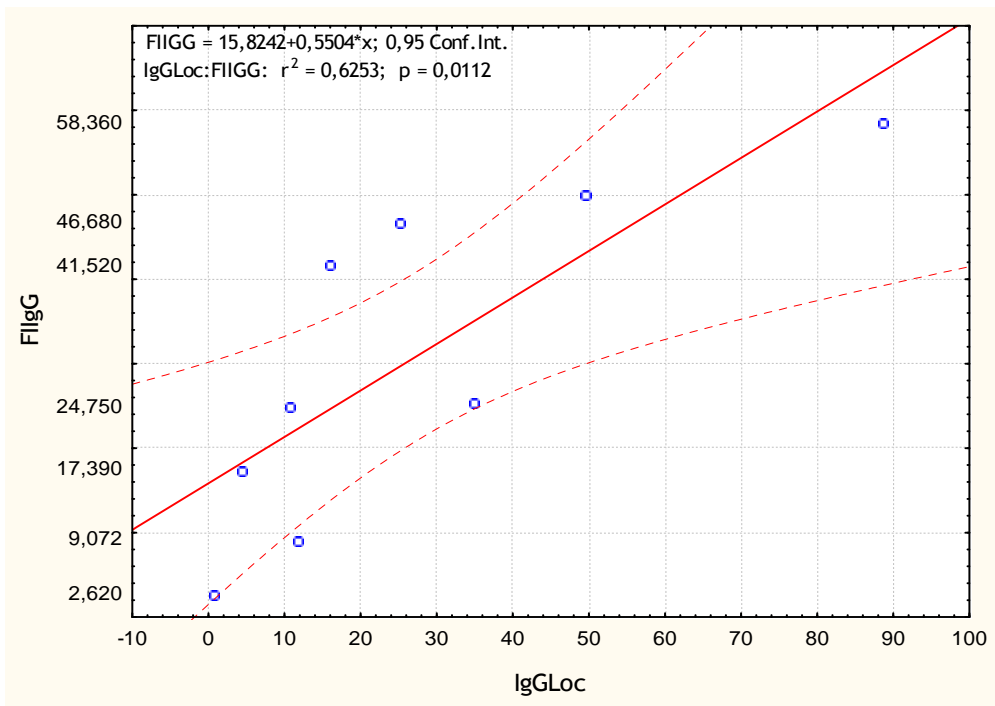


Fig 12. Relación entre la fracción intratecal de IgG (FIIG) y la IgGLoc (IgG producida localmente en el SNC) en el LCR de personas con EM. Prueba de correlación de Spearman, (IgG):  $r=0.90$ ,  $**p=0.001$ .

#### 4.2.2 Reacción<sub>SRZ</sub> en SNC de personas con esclerosis múltiple y no EM

La respuesta de Acs frente a los virus neurotrópicos fue observada en las 23 personas con EM estudiadas. El incremento del IA se obtuvo para al menos uno de los virus neurotrópicos evaluados ( $IA_{SRZ} \geq 1.5$ ). Respecto al sexo, 7 personas con EM mostraron un  $IA_R$  aumentado y de estos, sólo uno fue del sexo masculino (1:6). La mayor frecuencia de respuesta en el grupo EM, fue en orden decreciente, para los virus del sarampión (78 %), varicela zoster (59%) y rubéola (30%). La mayor frecuencia de combinación, en este grupo, se observó entre los virus sarampión y varicela zoster (52.2%). 15 pacientes con EM

mostraron una reacción<sub>SRZ</sub> positiva y 11 fueron negativos. De ellos 5 mostraron un patrón II y 10 un patrón III de reacción.

En el grupo de referencia (NEM), 4 pacientes fueron positivos para Acs contra los virus neurotrópicos evaluados. Dos para el virus del sarampión, 1 para el virus de la rubéola y 1 uno para el virus Varicela zoster. De estos, sólo un paciente mostró un patrón de reacción<sub>SRZ</sub> positiva tipo III.

La Fig. 13-A muestra la frecuencia de reacción<sub>SRZ</sub> y de los patrones observados en ambos grupos. Los valores se expresan como porcentaje de casos. La prueba Chi cuadrado mostró un incremento significativo de la frecuencia de reacción<sub>SRZ</sub> en el grupo EM comparado con el grupo NEM. El grupo EM mostró un incremento significativo del patrón III respecto al patrón II y comparado con el grupo NEM,  $p < 0.5$ , Fig 13-B.

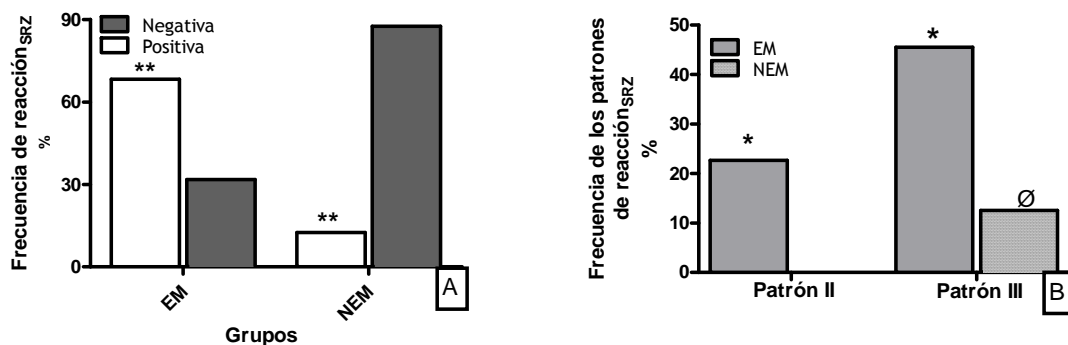


Fig 13. A. Reacción<sub>SRZ</sub> y B. patrón de reaccion<sub>SRZ</sub> en los grupos EM y NEM. Prueba no paramétrica Chi cuadrado, A: diferencia significativa de la frecuencia de reacción entre los grupos EM y NEM \*\*  $p < 0.01$  y B. Diferencia significativa de la frecuencia de los patrones de respuesta en los grupos EM, \* $p < 0.05$  y NEM, \*\* $p < 0.01$ . ∅Un solo caso.

*IA<sub>S</sub>, IA<sub>R</sub>, IA<sub>Z</sub> en los grupos EM con patrones II y III de reacción<sub>SRZ</sub>*

A partir de la mayor frecuencia del patrón III en el grupo EM, evaluamos el comportamiento del IA para cada uno de los virus en los pacientes con EM, con diferentes patrones de reactividad. La prueba de Kruskal-Wallis mostró diferencias entre los IA para sarampión, rubéola y varicela zoster para los patrones de reactividad II, III (\*\*p<0.01). La prueba de Mann Whitney permitió definir las diferencias, significativas para los valores del IA contra el sarampión y la rubéola (\*\*p<0.01,) Fig 14.

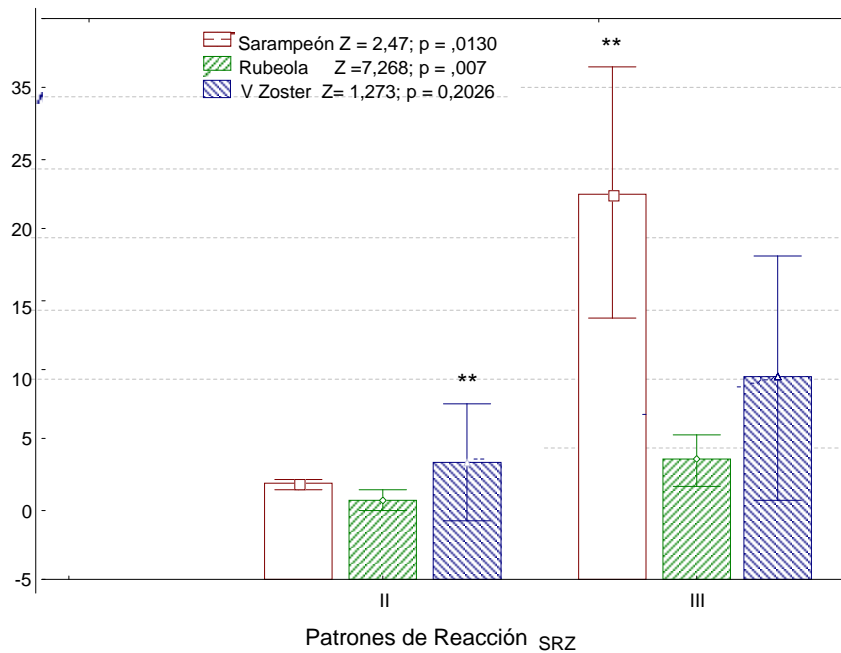


Fig 14. IA en pacientes EM con diferentes patrones de reactividad para los virus neurotrópicos. Los valores se expresan como la mediana/rango del IA. Mann Whitney U test, \*\*p<0.01

El análisis de interacción del IA para los virus neurotrópicos en los pacientes EM, con patrones II y III de reacción<sub>SRZ</sub>, no fué significatvo en ningún caso. Las personas con patrones II y III de reactividad mostraron una relación negativa, no significativa, entre el IA<sub>S</sub> e IA<sub>Z</sub> y del IA<sub>R</sub> con los IA<sub>S</sub> e IA<sub>Z</sub>.

#### 4.2.3. Patrones de reacción<sub>SRZ</sub> en personas cubanas y europeas con EM

La concentración de Acs contra la rubéola en la población cubana, para el rango de edad de las personas estudiadas, también fue estimada. Se tuvieron en cuenta los datos registrados en la *Dirección Nacional de Estadística y Registros Médicos del MINSAP*, sobre la infección por rubéola en Cuba y los esquemas de inmunización aplicados entre los años 1970 y 1986 *Anexo 4*. Los datos aportados por esta instancia indicaron una baja incidencia de infección por rubéola en la población cubana, una inmunoreactividad natural (Acs naturales) cercana al 4% y una seropositividad del 50%. Los datos correspondientes a la población europea muestran un 50-70% de anticuerpos séricos naturales contra rubéola y un 80-90% de positividad para estos anticuerpos (Comunicación personal Prof. Hansotto Reiber, Gottingen University, 2006).

La distribución por género (m: f =1:1,9) y edad (media en años =38) de los personas cubanas con EM, fue similar al grupo europeo, razón de género (m: f 1:2) y edad (media en años =36). La respuesta inmune intratecal mostró también una frecuencia similar de SI para los diferentes isotipos de Igs (IgG: IgM: IgA) (10:4:1 vs 10:3:1) <sup>(67,68)</sup>, comparada con el grupo europeo, y fue decreciente en frecuencia para la IgG, la IgM y la IgA. La SI de IgM se observó

en pacientes con IA positivo para VZ, mientras la SI de IgA se observó en 1 paciente con IA positivo para las tres especies virales.

La diferencia más relevante entre los grupos cubano y europeo, estuvo focalizada en la disminución significativa de la frecuencia de positividad del IA<sub>R</sub> en los pacientes cubanos (30%), comparado con la población europea (60%)

(Comunicación personal Prof. Hansotto Reiber, Gottingen University, 2006)

#### 4.2.4. Respuesta de Ac contra la PLNF en LCR de personas con EM

La respuesta de Ac contra la PLNF en LCR de 26 personas con EM se estimó por el IA<sub>PLNF</sub> y la intensidad de la respuesta de Ac contra la PLNF ( $Fe_{PLNF}$ )<sup>(107)</sup>. Once personas con EM (42%) fueron positivas para el IA<sub>PLNF</sub> y 13 negativas. Dos mostraron valores por debajo del límite de detección. Dos personas con IA<sub>PLNF</sub> positivo fueron excluidos del análisis por presentar valores de  $Q_{esp} < Q_{media PLNF}$ , según consideraciones reportadas para el análisis de esta variable. El valor promedio de intensidad de la respuesta de AC<sub>PLNF</sub> en el grupo I (EM) fue de 29.7%. La  $Fe_{PLNF}$  no mostró correlación con las variables  $Q_{ALB}$ , IgG<sub>LoC<sub>PLNF</sub></sub> e IA<sub>PLNF</sub> (Prueba de Correlación de Spearman,  $p > 0.05$ ).

La tabla 6 muestra los resultados del análisis de correlación entre la razón albúmina, y la respuesta frente a la proteína ligera de neurofilamento. La prueba de correlación de Spearman no mostró relación significativa para ninguna de las variables. La relación entre la  $Q_{ALB}$  y el IA<sub>PLNF</sub> fue negativa.

**Tabla 6.** Análisis de correlación de  $Q_{ALB}$  y la respuesta a la PLNF en EM

| Variables                      | n  | r     | p    |
|--------------------------------|----|-------|------|
| $Q_{ALB}$ & $Fe_{PLNF}$        | 9  | 0.06  | 0.53 |
| $Q_{ALB}$ & $IgG_{Loc_{PLNF}}$ | 9  | 0.25  | 0.17 |
| $Q_{ALB}$ & $IA_{PLNF}$        | 17 | -0,30 | 0,24 |

n: número de casos válidos para el análisis

A partir de la relación significativa observada entre las  $IgG_{Loc}$  y la fracción intratecal de  $IgG$  (Fig 12), y su no asociación con la PLNF y la  $Fe_{PLNF}$ , se exploró el nivel de interacción entre la  $IgG_{Loc}$  total y la específica para la PLNF ( $IgG_{Loc_{PLNF}}$ ). La prueba de correlación de Spearman, no mostró asociación significativa entre estas variables.

*Patrones de combinación del  $IA_{PLNF}$  y la reacción $_{SRZ}$  en personas EM*

Del los 26 pacientes evaluados para la reacción $_{SRZ}$  y el  $IA_{PLNF}$ , 8 fueron positivos para ambos índices y 4 negativos. La prueba Chi cuadrado, no mostró diferencia entre las frecuencias de positividad y negatividad para estos índices en el grupo EM,  $p > 0.05$ . El análisis de correlación de Spearman, tampoco mostró relación significativa entre la  $Q_{ALB}$ , el índice de Ac para la proteína ligera de neurofilamento y la reacción $_{SRZ}$ ,  $p > 0.5$ .

#### 4.3. Objetivo 3. Aspectos clínicos de la detección de la respuesta idiotípica en EM

La tabla 7 muestra las variables clínicas evaluadas en el grupo de pacientes con EM. El tiempo de evolución se expresó en años, el ritmo de recaídas como el número de ataques por año y el deterioro neurológico fue medido como la escala del estado de discapacidad extendido de Kurtzke (EDSS).

*Tabla 7.* Valores de las variables clínicas evaluadas en el grupo EM

| Variables clínicas  | n  | Mediana | RIQ     |
|---------------------|----|---------|---------|
| EDSS                | 14 | 6       | 3,5-6,5 |
| Tiempo de evolución | 17 | 10      | 5-13    |
| Ritmo de recaídas   | 15 | 5       | 4-9     |

RIQ: Rango intercuartil

##### 4.3.1. Formas clínicas y respuesta isotípica en EM

La Fig 15 muestra el comportamiento de la respuesta isotípica en los subgrupos de pacientes del grupo I (EM). La frecuencia de síntesis intratecal en los pacientes con EMSProg (3/8) y EMRR (5/6) no mostró diferencia significativa (Prueba Chi cuadrado,  $p > 0.05$ ), debido, posiblemente, al tamaño muestral. La fracción intratecal de IgG, tampoco mostró diferencias significativas para las formas clínicas de la enfermedad en los pacientes con EM. Un paciente portador de EMSProg, mostró síntesis aislada de IgA, mientras



la síntesis combinada para los tres isotipos de inmunoglobulinas se observó en un paciente portador de EMRR. El isotipo dominante fue la IgM.

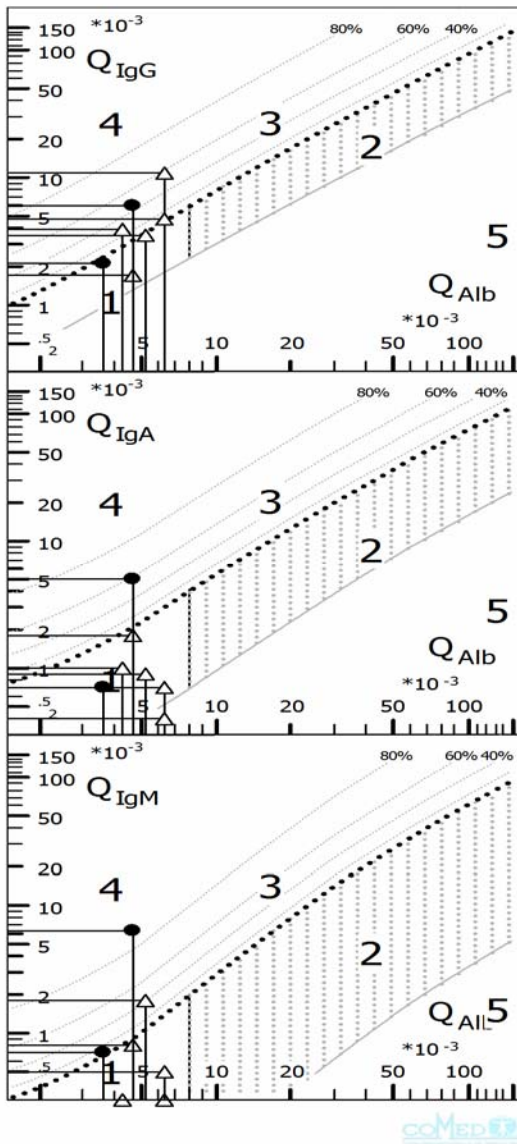


Fig 15. Función hiperbólica de Reiber en personas  $\Delta$ EMSProg y  $\bullet$ EMRR. Las líneas plotean los valores de  $Q_{Alb}$  y  $Q_{Ig}$  para cada caso. La dominancia de SI fue para la IgM (>80%) en un paciente EMRR.

#### 4.3.2. IA<sub>S</sub>, IA<sub>R</sub>, IA<sub>Z</sub>, formas clínicas, EDSS, tiempo de evolución y ritmo de recaídas en EM

La positividad del IA<sub>R</sub> fue menos frecuente en la forma clínica EMRR (38,4%), y significativamente menor que el IA<sub>S</sub> (92%) y IA<sub>Z</sub> (78%) en este subgrupo clínico y comparado con el IA para los tres virus neurotrópicos en la forma EMSProg. La Fig 16 muestra la frecuencia de positividad del IA para las especies virales evaluadas en personas EMSProg y EMRR,  $p > 0.05$ , Prueba exacta de Fisher.

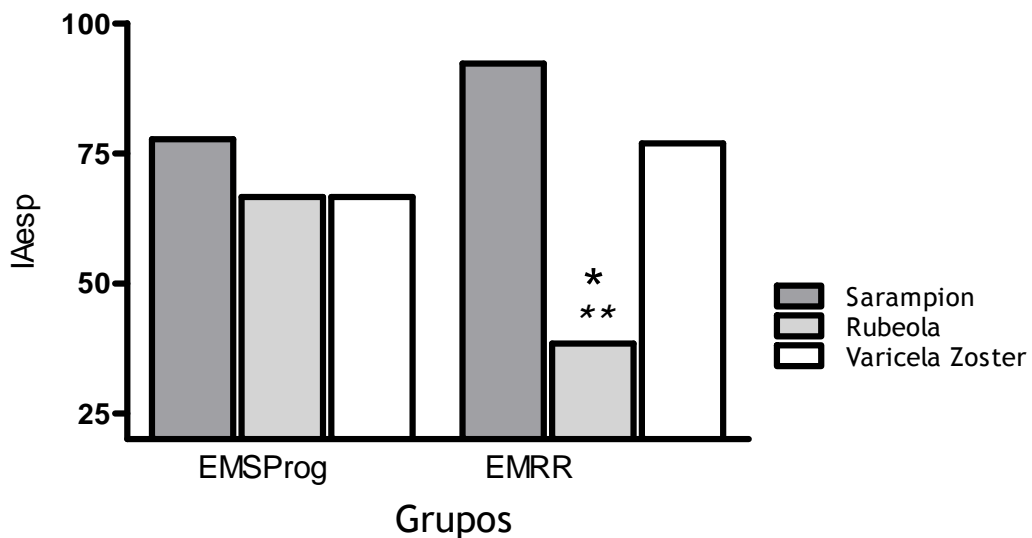


Fig 16 Frecuencia de IA<sub>S</sub><sup>+</sup>, IA<sub>R</sub><sup>+</sup>, IA<sub>Z</sub><sup>+</sup> para virus neurotrópicos en personas EMRR y EMSProg. Disminución significativa de la frecuencia de positividad del IA<sub>R</sub> en personas EMRR. Diferencias de frecuencia en relación con el IA<sub>S</sub> y el IA<sub>Z</sub> en EMRR (\*\* $p < 0.01$ , Prueba exacta de Fisher) y comparado para los IA<sub>S</sub>, IA<sub>Z</sub> comparado con el grupo EMSProg ( $p < 0.05$ , Chi cuadrado (B/C)). Los valores se expresan como porcentaje de casos.

La prueba de correlación de Spearman, no mostró asociación entre los IA<sub>S</sub>, IA<sub>R</sub>, IA<sub>Z</sub> y la EDSS, el tiempo de evolución y el número de recaídas en EM ( $p > 0.05$ ), tabla 8.

Tabla 8. IA<sub>S</sub>, IA<sub>R</sub>, IA<sub>Z</sub>, EDSS, tiempo de evolución y número de recaídas en EM

| IA <sub>SRZ</sub>   | n  | r    | p    |
|---------------------|----|------|------|
| EDSS                | 12 | 0,45 | 0,13 |
| Tiempo de evolución | 14 | 0,16 | 0,56 |
| Número de recaídas  | 12 | 0,14 | 0,65 |

n: número de casos válidos para el análisis

#### 4.3.3. IA<sub>PLNF</sub>, formas clínicas, EDSS, tiempo de evolución y número de recaídas en EM

La frecuencia de positividad del IA<sub>PLNF</sub>, fue similar entre los personas EMSProg (60%) y EMRR (58%). La prueba de correlación de Spearman, no mostró asociación entre el IA<sub>PLNF</sub> la intensidad de respuesta para esta proteína (Fe<sub>PLNF</sub>) y las formas clínicas de la enfermedad, la EDSS y el tiempo de evolución en el grupo EM.

La correlación entre el IA<sub>PLNF</sub> y el número de recaídas en los pacientes EM fue significativa ( $r=-0,82$ ,  $p= 0.04$ ), no así para la Fe<sub>PLNF</sub>, la cual no mostró asociación con esta variable clínica, Fig 17.

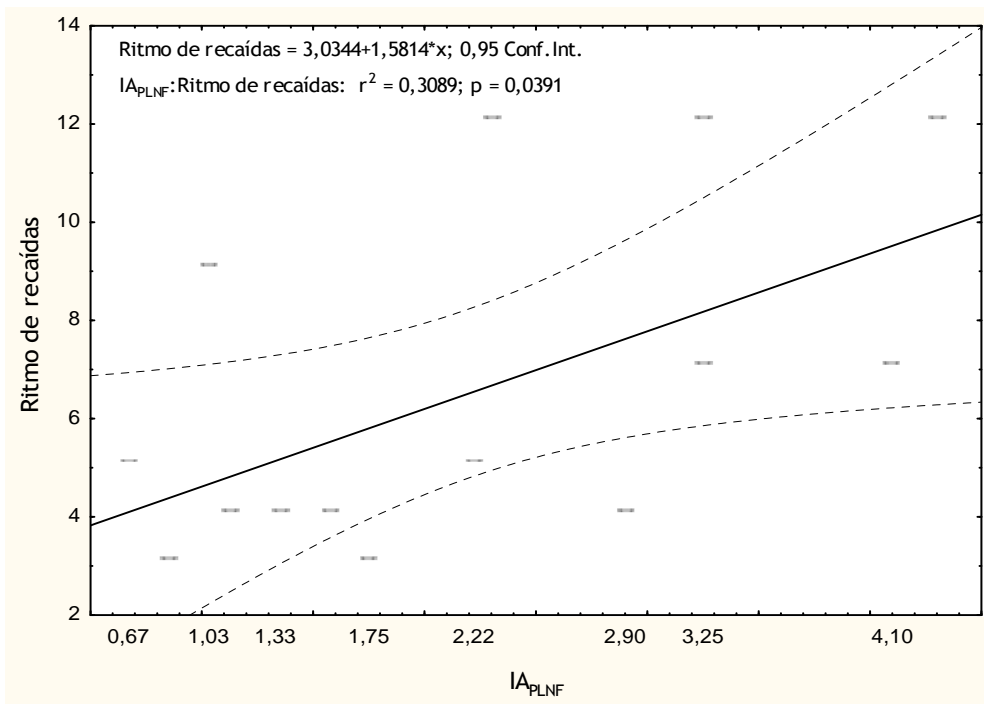


Fig 17. Análisis de correlación entre el  $IA_{PLNF}$ , el número de recaídas en EM. Relación significativa entre el  $IA_{PLNF}$  y el ritmo de recaídas. Prueba de correlación de Spearman\*  $p < 0,05$ .

Los aportes más significativos de la evaluación de la respuesta idiotípica en las personas con EM. fueron; la relación significativa observada entre el  $IA_{PLNF}$  y el ritmo de recaídas, no reportado con anterioridad para la enfermedad; la eficiencia del método de ELISA aplicado para evidenciar la respuesta idiotípica en estas personas y el condicionamiento probable de la respuesta contra virus neurotrópicos en SNC de personas con EM, por la no inmunización para el virus de la rubéola, en etapas tempranas de la vida, aspectos estos que si bien se sustentan, al menos en parte, por la hipótesis de la higiene, no existen reportes previos. Los resultados que se presentan constituyen herramientas

paraclínicas que contribuyen al diagnóstico precoz y seguimiento clínico terapéutico de la enfermedad.

## 5. DISCUSIÓN

✓ *Asimilación del método de FIE en agarosa e Inmunofijación para la detección de BOC de IgG en el LCR.*

La sensibilidad del método de FIE en agarosa e inmunofijación para la detección de BOC en el LCR fue superior a la obtenida por electroforesis de proteína en disco en geles de acrilamida y el Índice IgG, métodos aplicados en la actualidad en los laboratorios del país. La afirmación esta avalada en los resultados de la eficacia global y valor predictivo de positividad, superiores al 90% en el grupo EM y de la prueba del producto cruzado mayor del 20%, similares a los publicados por otros autores <sup>(78,79,82-84)</sup>.

El Índice Kappa resulta de valor para el análisis de la concordancia entre los métodos aplicados para identificar la presencia de SI. El mismo presupone una buena concordancia de los resultados cuando sus valores están entre 0.61 y 0.80 <sup>(148)</sup>. El valor de concordancia obtenido por nosotros durante la validación del método de FIE en agarosa e inmunofijación estuvo en el límite superior del rango referido, lo que permitió evidenciar la mayor capacidad del método para confirmar de la presencia de síntesis intratecal y su factibilidad, como herramienta auxiliar de valor diagnóstico en enfermedades neurológicas.

Durante décadas, las BOC han sido reconocidas como un elemento clave para el diagnóstico en enfermedades neuroinflamatorias <sup>(152)</sup>, con una mayor utilidad en la EM primariamente progresiva <sup>(153)</sup>. Variaciones, referentes a la

detección de BOC en LCR, se han reportado en diferentes regiones, en EM (60% en la población japonesa y hasta el 97% en las poblaciones sueca e inglesa) <sup>(27, 28,154)</sup>; las cuales son atribuidas a las diferencias de sensibilidad de los métodos aplicados <sup>(82-87,155)</sup>. Resultado de un estudio realizado en Cuba por Cabrera y cols en 30 personas con EM, mostró un 58.7% de positividad de BOC en el LCR, por el método de electroforesis en disco, en gel de poliacrilamida<sup>(7)</sup>, en contraposición con una frecuencia significativamente superior a la obtenida en este estudio por FIE, en un mismo número de personas con EM. Los resultados del Índice IgG fueron similares en ambos grupos (60%). Las diferencias observadas se explican por la menor sensibilidad del método de EFP en acrilamida comparado con la FIE, resultado este ya reportado con anterioridad <sup>(27-29)</sup>.

La frecuencia con que aparecen las BOC en el LCR de las personas con EM, no siempre es elevada. Varios estudios han reportado, una baja frecuencia o ausencia de BOC en LCR de algunas poblaciones (caucasianos, japoneses, de la península Arábiga y Taiwán), sin que esto sugiera una influencia geográfica adicional a los factores clínicos determinantes <sup>(156,157)</sup>. Recientemente un estudio en personas portuguesas portadoras de EM con y sin BOC en el LCR, demostró que ambos grupos eran muy similares respecto al sexo, edad de comienzo, proporción de casos con la forma EM primariamente progresiva, frecuencia de imágenes patológicas detectadas por RM y la severidad de la enfermedad, sugiriendo un comportamiento modulado por el patrón inmune y genético de cada grupo <sup>(158)</sup>. El análisis del comportamiento genético de esta

población de personas portadoras de EM, no fue realizado por no constituir un objetivo de este trabajo.

En la actualidad, es criterio establecido que la respuesta intratecal oligoclonal en EM evidencia una reacción crónica autoinmune en el SNC, aunque sin un consenso del origen de las BOC en estos enfermos, ni de su relación con la fisiopatología de la enfermedad <sup>(18,22)</sup>. Algunas hipótesis señalan que la persistencia de BOC en el LCR obedece a la supervivencia prolongada de las poblaciones de células plasmáticas y al microambiente que favorece la permanencia de células B a este nivel <sup>(159,160)</sup>, mientras otros lo atribuyen a la respuesta persistente frente a un estímulo antigénico en el SNC, como resultado del proceso de desmielinización y degeneración axonal <sup>(161)</sup>.

Algunas hipótesis señalan que la persistencia de BOC en el LCR obedece a la supervivencia de células plasmáticas en el SNC y al microambiente que favorece la permanencia de células B a este nivel, mientras otros lo atribuyen a la persistencia de un estímulo antigénico a este nivel, como resultado del proceso de desmielinización y degeneración axonal <sup>(158,161)</sup>. Una interpretación adicional a la ausencia de BOC en EM, ha sido dada como indicativo de un mejor pronóstico para la enfermedad y un bajo índice de progresión en estas personas. Sa Maria-José y cols demostraron una mayor frecuencia de anticuerpos anticardiolipina en personas positivas para BOC portadoras de EM con un curso clínico más benigno de la enfermedad que en aquellos negativos para BOC <sup>(87, 103)</sup>. A nuestro juicio, la ausencia de BOC en LCR, presupone un



mejor pronóstico para la enfermedad, a partir del número limitado de clones reactivos de células B contra la mielina.

Las BOC son un factor inmunopatológico clave en EM y otras enfermedades neuroinflamatorias y son representativas de un proceso inflamatorio crónico del SNC, luego cambios en el patrón de BOC. Están relacionados con la neuropatología.

La negatividad de BOC observado por nosotros en este estudio en algunos pacientes con diagnóstico clínico confirmado de EM, se inserta en el porcentaje de casos reportado por otros grupos <sup>(27-29)</sup> y en nuestro criterio es consecuencia de los eventos asociados al curso de la enfermedad en cuyo contexto tiene lugar una compartimentación de la respuesta inmune, con competencia limitada de las células B, que han perdurado durante años en el SNC de estos enfermos, por su blanco antigénico <sup>(158)</sup>.

El grupo con patologías no neurológicas mostró la presencia de BOC en una frecuencia significativamente menor que el de EM, resultado similar a los reportes publicados previamente <sup>(162,163)</sup>. La positividad de BOC fue observada en una persona portadora de un síndrome neurológico paraneoplásico, recientemente reportada en esta entidad <sup>(162)</sup>.

De igual manera, la negatividad de BOC en enfermedades no desmielinizantes, es una consecuencia del cese de la exposición a nuevos antígenos derivados del daño del parénquima, mientras los cambios en el patrón de BOC observados en algunas personas con enfermedades neurológicas puede ser

resultado de la competencia de las células plasmáticas por un nicho de supervivencia limitada <sup>(152,159, 164,165)</sup> .

Estudios proteómicos han evidenciado que todas las células presentes en el LCR, son del mismo origen clonal que las productoras de BOC y representan una respuesta inflamatoria no exclusiva para la EM <sup>(160,165)</sup> . Así, se ha reportado una baja frecuencia de BOC (7.5-30 %), en enfermedades isquemias y cerebrovasculares del SNC, <sup>(27-29)</sup> y en procesos infecciosos encefálicos en niños y adultos <sup>(28)</sup> . La positividad de BOC observada en el grupo no EM coincidió con los reportes ya referidos para las personas con patologías diferentes a la EM <sup>(29,30)</sup> .

Los patrones de bandas oligoclonales de IgG en LCR contribuyen también a la heterogeneidad de la EM. Así BOC contra los lípidos de la mielina se asocian con la EMRR, EMSProg y no con la EMPP, mientras la EMPP en su mayoría, muestra un patrón de BOC en LCR y suero con BOC adicionales en el LCR, patrón de comportamiento que pudiera atribuirle un valor pronóstico en EM. Diferencias sobre la presencia de BOC en el LCR respecto a la edad, género, duración de la enfermedad y severidad clínica y características de la RM también introducen heterogeneidad en la EM.

✓ *Caracterización de la respuesta idiotípica en EM*

Sistema de barreras en EM

Las barreras del cerebro son vitales para el mantenimiento de la homeostasis interna y la preservación de la integridad neuronal. De la misma manera, los Acs presentes en el SNC provienen tanto de la producción local, como de su transferencia desde el compartimiento intravascular, mientras, el paso de Igs desde la sangre al SNC es regulada por el sistema de barreras, de ahí el interés de su valoración en el análisis de la respuesta de Acs. En este estudio se observó, un bajo porcentaje de personas con disfunción de la barrera Sangre-LCR, resultado que se insertan en los reportes diversos referidos en la EM <sup>(54, 61-63, 65, 117, 167,168)</sup>. La frecuencia no significativa observada para la disfunción de barrera en este estudio, no niega el papel patogénico que puede jugar la disfunción del sistema de barreras en la respuesta autoinmune crónica responsable de la progresión del daño axoneuronal en EM.

En la EM, el sistema nervioso central se convierte en un compartimento inmunológico con inflamación local lesional y producción intratecal de inmunoglobulinas asociada o no a la presencia de BOC que responden en gran medida a la persistencia de células inmunes a este nivel y a la disfunción del sistema de barreras, incluso fuera de las lesiones activas. El incremento de la permeabilidad de la barrera, ha sido confirmada recientemente en EM <sup>(169,170)</sup>, hecho este que argumenta la invasión temprana de células inmunes al cerebro seguida de desmielinización, <sup>(171)</sup> inflamación microvascular y daño axonal <sup>(169-171)</sup>.

Si bien, el cociente albúmina es considerado, como un marcador de integridad de la barrera y el reibergrama como una herramienta que ha aportado una mayor precisión a la interpretación de los resultados que se obtienen en el análisis del LCR normal y patológico; no existe un patrón específico para la disfunción de la barrera en el LCR y los resultados, en ocasiones inconsistentes, evidencian la necesidad del uso combinado de metodologías y marcadores que permitan definir con precisión, los cambios en la UNV en el contexto de procesos neurodegenerativos, más allá de la integridad física de la barrera, evaluada por el cociente albúmina. <sup>(54,172)</sup>.

Por otro lado, el grupo de Simka y cols señala que el compromiso del sistema de barrera y la inflamación endotelial en la EM, tiene lugar por la influencia de cambios hemodinámicas que interesan a los vasos extracraneales y causan un reflujo venoso retrógrado con una mayor entrada de proteínas séricas hacia el cerebro <sup>(173)</sup>. Staines y cols, refiriéndose a la influencia de neuropéptidos vasoactivos sobre la función de la barrera en la EM, consideró la EM, como una enfermedad hemodinámica donde la autoinmunidad vascular contribuye de forma importante a la etiopatogenia de la enfermedad <sup>(174)</sup>. Los grupos de Kom, Palmer, Linker sostienen, a su vez, que la transferencia, desde la periferia hacia el cerebro, de células T CD4 positivas, específicas para la mielina, argumentan el papel de la barrera en la fisiopatología de la EM <sup>(68, 175,176)</sup>

A partir de las consideraciones planteadas, la disfunción de la barrera parece involucrar no sólo cambios estructurales y en la dinámica de flujo del LCR, sino también cambios hemodinámicas y una respuesta autoinmune que interesan a la vasculatura extracerebral con un reflujo patológico que propicia una mayor entrada de proteínas séricas al cerebro y una mayor activación microglial e inflamación microvascular <sup>(159,162,165,174)</sup>. El mayor drenaje de proteínas séricas al cerebro, obviamente implica la mayor entrada de autoAbs hacia este sitio, y es la causante de desmielinización y progresión del daño axonal <sup>(152, 178,179)</sup>.

A partir de los cambios hemodinámicos periféricos que influyen la homeostasis interna del cerebro, la evaluación de QAlb resulta insuficiente como indicativo de alteración en la dinámica de flujo del LCR, de ahí que investigaciones futuras deberán trazar pautas dirigidas a validar marcadores biológicos que permitan evidenciar la existencia del daño de la barrera, en este contexto en el curso de la enfermedad y al mismo tiempo, aporten una herramienta de utilidad para monitorear la respuesta a tratamientos que tienen como blanco la existencia del daño de barrera<sup>(180)</sup>. La influencia de factores hemodinámicos extracraneales en el curso de la EM, son aspectos novedosos de investigación a ser explorados por su influencia sobre el endotelio vascular, la modificación del sistema de barreras y su valor probable

endotelio vascular como una diana a tener en cuenta en la implementación de nuevas estrategias terapéuticas.

### Respuesta isotípica en EM

Estudios relativo al comportamiento de las clases de inmunoglobulinas en el SNC de personas portadoras de EM, han sido abordado por diferentes grupos <sup>(181-183)</sup>.y esta ha sido motivo de análisis en la interpretación de la respuesta de Ac específica en el SNC de estos pacientes <sup>(34,113)</sup>. En este sentido, las diferentes clases de inmunoglobulinas, parecen tener que ver de manera diferencial con diferentes efectos patogénicos en el contexto de las enfermedades neurológicas <sup>(181, 182,184)</sup>. Así la IgG se le ha atribuido un acción mediadora en los mecanismos de citotoxicidad y activación del complemento contra los virus varicela zoster y sarampión en EM <sup>(183)</sup>, mientras que la IgM parece reflejar la permanencia del estímulo antigénico en el SNC y se sugiere una asociación con las recaídas agudas y como indicativo de un peor pronóstico para la enfermedad <sup>(181)</sup>.

La evaluación de la respuesta oligoclonal en el grupo de paciente con EM, mostró un comportamiento similar a lo reportado por otros estudios en EM, la mayor frecuencia de síntesis intratecal fue observada para la IgG y un solo caso mostró dominancia de IgM en el contexto de la síntesis combinada para las tres clases de inmunoglobulinas <sup>(26,76)</sup>. La identificación de una respuesta oligoclonal en relación con la respuesta contra virus neurotrópicos no fue

significativa para ninguno de los pacientes estudiados y en ningún caso se observó infección activa para estos virus.

En este estudio, la síntesis intratecal de IgM, fue observada en un paciente EMRR con un patrón de respuesta contra virus neurotrópico tipo III, una EDSS de 6.5 y 3 recaídas por año, hallazgos estos que pudiera sustentarse en el valor pronóstico atribuido a la IgM <sup>(181)</sup> y discrepa con el criterio de Schneider y cols, quienes niegan el valor de la IgM para predecir el curso clínico desfavorable de la enfermedad <sup>(181,185)</sup>.

La SI de IgA fue también poco frecuente en este estudio y no se observó relación alguna con datos clínicos en estos pacientes, en coincidencia con lo reportado para este isotipo de inmunoglobulina. Una frecuencia entre el 7-41% ha sido reportada en EM <sup>(183)</sup>

El grupo con patologías no escleroticas múltiples no mostró cambios relevantes en el comportamiento isotópico de la respuesta de Acs. Sólo un paciente con demencia senil mostró síntesis aislada de IgA sin que se pudiera establecer ninguna relación de interés con la fisiopatología de la enfermedad. Este hallazgo este ha sido reportado con anterioridad y en nuestro criterio no representa un hallazgo patológico relacionado con esta enfermedad.

Un elemento nuevo considerado en este estudio fue la determinación de Ig producida localmente (IgLoc) y la intensidad de la respuesta para las diferentes clases de inmunoglobulinas (FIgls), a partir de los datos del LCR obtenidos por el reibergrama <sup>(107)</sup>. Los valores obtenidos para estas variables

evidenciaron una relación significativa sólo para la clase IgG, aunque sin una relación relevante respecto al estado clínico-diagnóstico de la enfermedad.

Nuestros resultados, evidenciaron una correlación significativa, entre los valores de IgG<sub>Loc</sub> y la fracción intratecal de IgG, no así para la IgM. Si bien este análisis no había sido reportado con anterioridad, no existe una referencia para emitir criterio respecto al comportamiento de esta variable en nuestro estudio. Sin embargo, como ambas estimaciones muestran un significado diferente en el contexto de la dinámica de la respuesta inmune intratecal su validación, para todas las clases de inmunoglobulinas, pudiera ser de utilidad para distinguir la dominancia de dicha respuesta desde el punto de vista del agente causal o en relación al curso clínico de la enfermedad.

#### *Reacción<sub>SRZ</sub> en el sistema nervioso central de personas con EM*

Desde principios del siglo XX, se ha acumulado mucha información sobre el papel de los virus en el proceso de desmielinización en el SNC y se sabe que más de 10 clases de virus pueden inducir lesión en la sustancia blanca, tanto en modelos animales como en humanos <sup>(186-192)</sup>.

Más del 80% de las personas con EM desarrollan una respuesta inmune humoral contra agentes virales como el sarampión, la rubéola, varicela zoster y virus Epstein Barr, entre otros <sup>(188,191)</sup>, no relacionado a infecciones agudas. Por esta razón, hoy día, se considera la presencia de respuesta inmune contra estos virus como una evidencia útil para el diagnóstico en enfermedades neurológicas autoinmunes <sup>(175)</sup>.



La evaluación de la respuesta de Acs contra virus neurotrópicos en el grupo de pacientes con EM, mostró un patrón de comportamiento similar a lo reportado por el grupo de Reiber y cols <sup>(108)</sup>. El aspecto distintivo de nuestros resultados estuvo dado por una muy baja frecuencia de Acs contra el virus de la rubéola, en el grupo de pacientes cubanos comparado con personas europeas. Diferentes explicaciones pudieran explicar el comportamiento para este virus en el grupo EM.

Aspectos epidemiológicos relacionados con la edad, inmunizaciones previas o estado de no respuesta particular para estos virus en el SNC de estos enfermos pudieran ser algunos de estos argumentos. Sin embargo, protocolos epidemiológicos y de inmunización desarrollados en otras regiones reportan, una baja respuesta de Acs (30%) para rubéola en personas menores de 35 años procedentes de regiones tropicales (Trinidad y Panamá), comparado con más del 80% en Europa y EUA <sup>(117)</sup>. La media de edad de nuestra muestra en estudio es superior a los 35 años, Diferencias epidemiológicas respecto al sexo y la procedencia (región tropical), comparado con el grupo de referencia, no son explicables. Si bien ambos grupos mostraron una distribución similar de acuerdo al sexo y edad, las diferencias de procedencia no pueden ser explicables solo para esta especie viral. El único factor para el cual se observó la diferencia estuvo relacionado con el estado de inmunización para este virus en etapas tempranas de la vida en este grupo de pacientes, que tiene su argumento en la hipótesis de la higiene, referida en este trabajo.

Otro aspecto a considerar en este análisis es lo relacionado con inmunizaciones previas en este grupo de pacientes, a partir de la conocida hipótesis de la higiene, ya referida en este trabajo. En este grupo, existió el antecedente, de que estos pacientes, en su mayoría del sexo masculino, no fueron inmunizados para este virus, ni se recoge antecedente de haber padecido la enfermedad durante su niñez o adolescencia (datos obtenidos de las instancias de salud autorizadas, Anexo 4), resultado este que sustenta la hipótesis de la higiene y argumenta la baja frecuencia de respuesta para este virus particular en este grupo de pacientes y su diferencia respecto al grupo europeo.

El comportamiento diferencial de la respuesta de Acs contra las especies virales del sarampión y la rubéola es un argumento adicional a la hipótesis planteada. El estado de no respuesta para virus neurotrópicos en el SNC, aunque es un elemento a considerar en el comportamiento de este grupo de pacientes, en nuestro caso no es argumento para explicar la baja frecuencia de respuesta particular observada contra el virus de la rubéola en este grupo, dado que la respuesta para los otros virus neurotrópicos mostró un comportamiento similar a lo reportado por otros grupos <sup>(42, 43,108)</sup>, que evidencia el estado de competencia inmune en estas personas. Por otra parte, la respuesta de Acs contra estos virus neurotrópicos es del isotipo IgG, la cual mostró un comportamiento similar a lo reportado en el SNC de estos enfermos.

En nuestra opinión, la baja reactividad inmune para el virus de la rubéola observada en el grupo de pacientes cubanos EM estudiados, no puede ser considerada por la influencia de factores demográficos referidos al sexo o procedencia regional, sino que probablemente otros factores condicionantes como la inmunización pasiva o la infección natural por alguno de estos virus, pudiera ser un elemento a considerar <sup>(42, 43, 192,194)</sup>. La inmunización selectiva de las mujeres con anterioridad a la campaña de vacunación en Cuba en 1986, es un argumento adicional a la hipótesis planteada, dado que mayor frecuencia de positividad del IA contra esta especie viral fue observada en las personas del sexo femenino, que si fueron vacunadas contra esta especie viral. Si bien, no existen reportes previos referidos al comportamiento de la respuesta de Ac contra el virus de la rubéola en SNC de personas con EM, este hallazgo constituye un reporte novedoso, que aunque sustentado en la hipótesis de la higiene, debe ser confirmado en otros estudios para establecer su verdadera relevancia. No se descarta la posibilidad de subregistros relacionados con la infección por el virus de la rubéola u otros virus neurotrópicos en la niñez o la adolescencia, incluso en áreas donde los reportes son obligatorios <sup>(193)</sup>.

Si los Acs son sintetizados, secundariamente a una vacunación o a una infección natural, durante la infancia, dicha reacción<sub>SRZ</sub> pudiera considerarse entonces como una señal, razonablemente evaluable al inicio de la enfermedad.

Un último aspecto a considerar en este análisis, es lo relacionado con el efecto de la vacunación, como elemento inductor de la enfermedad. La asociación de la vacunación con la EM ha sido reportado a la inmunización contra el virus de la influenza, el tétano y la hepatitis B, los cuales han estado asociados con el inicio y/o empeoramiento de la enfermedad <sup>(192,194)</sup>, aunque estos mismos refieren que estos hallazgos pudieran ser resultado de factores propios del preparado vacunal, como los adyuvantes <sup>(192,194)</sup>.

La seguridad de las vacunas virales actuales y las manifestaciones clínicas derivadas de su aplicación han sido probadas, y aunque en opinión de algunos autores vacunación ha sido asociada con el curso de la EM, la baja frecuencia de enfermedades autoinmunes posterior a la vacunación y su no asociación con otras enfermedades como las vasculitis la diabetes mellitus, no permiten establecer un consenso sobre la influencia de la vacunación contra virus con tropismo hacia el SNC, en la incidencia o el curso de estas enfermedades <sup>(192)</sup>.

La evidencia de reacción positiva para los virus neurotrópicos en personas con demencia y vasculitis también fue observada en este estudio. Esto, coincide con algunos reportes de la existencia de respuesta contra estos virus en enfermos con patologías no EM, como evidencia del carácter autoinmune general que evidencia esta reacción<sub>SRZ</sub> y su relación con los procesos inflamatorios crónicos que tienen lugar en el SNC.

La alta frecuencia de respuesta poliespecífica contra virus neurotrópicos reportada en EM, ha argumentado su validez para distinguirla de otras

enfermedades inflamatorias del sistema nervioso <sup>(42, 43,109)</sup>. Una baja frecuencia de la reacción poliespecífica contra virus neurotrópicos se ha reportado en enfermedades infecciosas del SNC y en otras enfermedades neurológicas que le han aportado a este análisis elementos relevantes, desde el punto de vista del diagnóstico diferencial <sup>(43, 109,126)</sup>.

✓ *Aspectos clínicos de la identificación de la reacción<sub>SRZ</sub> en EM*

Muchos son los reportes que avalan la hipótesis medio ambiental como un factor predisponente para padecer la EM; sin embargo, no queda claro si la autoinmunidad del SNC induce la lesión primaria de la mielina, o si para que esta tenga lugar, se requiere de cambios degenerativos primarios a nivel del axón <sup>(33-35, 109, 173,175)</sup>. En este estudio no se observó relación significativa entre la reacción<sub>SRZ</sub> y las variables clínicas estudiadas.

Como quiera que la reacción<sub>SRZ</sub> no refleja un estado de respuesta a una infección activa, la no diferencia de comportamiento de la reacción en relación a las variables clínicas: formas clínicas de la enfermedad, el ritmo de recaídas y la escala de discapacidad, sustenta el carácter inflamatorio autoinmune dado a este análisis, que tienen lugar en todas las etapas de la enfermedad <sup>(43)</sup>.

Un mecanismo propuesto para el empeoramiento de los síntomas en EM, esta relacionado con factores inflamatorios agudos que aceleran el bloqueo de conducción y causan agravamiento, al menos, temporal del deterioro

neuroológico <sup>(195,196)</sup>. En este sentido, se ha señalado, que las infecciones pueden inducir recaídas prolongadas y discapacidad en EM <sup>(140)</sup>. La ausencia de infección viral activa en estos pacientes pudiera ser un elemento a tener en cuenta en los resultados obtenidos.

#### ✓ Respuesta de anticuerpos contra la PLNF en EM

La sensibilidad de las formulaciones y los métodos analíticos aplicados en la interpretación de las variables biológicas del LCR, son de importancia vital para evidenciar su implicación clínica e inmunológica. El método de ELISA por nosotros aplicados es un método sensible y validado para el análisis de la respuesta de Ac específica en LCR <sup>(108)</sup>

Nuestros resultados mostraron una frecuencia de positividad del  $I_{A_{PLNF}}$  similar en los grupos EMRR y EMSProg, y esta en correspondencia con lo reportado por Bartos y cols, <sup>(112,113)</sup>, aunque en contraposición a lo reportado por los grupos de Silver y Eikelembon <sup>(44,45)</sup>

Los reportes de Silver y Eikellembon, referidos al incremento de Acs específico contra la PLNF en LCR, mostraron una mayor frecuencia de positividad en personas con EMSProg, a partir de lo cual sugirieron su utilidad para distinguir la forma progresiva de la enfermedad <sup>(44,45)</sup>. Por otro lado, Bartos y cols negaron las diferencias para este índice respecto a la forma clínica y sugirieron que el mismo, reflejaba un factor inflamatorio general no relacionado a las variables clínicas en EM <sup>(112,113)</sup>.

Otros análisis en suero y LCR han demostrado la estabilidad de la producción intratecal de estos Acs y sostienen el criterio de que las variaciones observadas por los diferentes grupos en dicha respuesta responde a otros factores no relacionados con estos factores y que la detección de los isotipos IgM e IgG contra la PLNF no mostraron variaciones en el SNC de estos enfermos (114).

La relación significativa observada entre el IA<sub>PLNF</sub> y las variables clínicas observada en este estudio, tiene como antecedente los estudios de Silver y cols (44) respecto a las formas clínicas de la enfermedad y de Bartos y cols respecto a las formas clínicas y la EDSS (112), sin embargo, en la literatura, no han sido referido estudios referentes al comportamiento del ritmo de recaídas no han sido referidos. Un resultado novedoso de este trabajo, fue la correlación significativa observada entre el número de recaída y el IA<sub>PLNF</sub>. que sugiere su validez como marcador biológico en relación con esta variable clínica y de utilidad para evaluar la progresión de la enfermedad en EM

La historia natural de la EM sigue un patrón evolutivo muy variable e individualizado, en el cual la enfermedad puede permanecer estable durante largo tiempo, ser interrumpida por una recaída o progresar rápidamente desde sus inicios con o sin recaídas sobreañadidas (140). Las bases biológicas de las recaídas, aunque involucran mecanismos inflamatorios en general, muestran diferencias para las formas clínicas EMRR y EMSProg, en la primera, se asocia a un patrón de actividad caracterizado por inflamación, desmielinización y

transacción axonal con duración y distribución temporo-espacial variable del daño neurológico <sup>(200,201)</sup>; mientras en la forma EMSProg, se asocian de manera sustancial al daño axonal y la acumulación de la discapacidad <sup>(197,201)</sup>.

Con independencia de la relación significativa reportada por Silver y cols entre el IA contra PLNF y la atrofia cerebral en EM <sup>(44,45)</sup>, en nuestro criterio, la significación de la relación de este índice con el ritmo de recaídas aporta la posibilidad de evidenciar de manera precoz cambios relativos al daño axonal. De manera adicional, sirva para predecir de manera indirecta el curso clínico o de progresión de la enfermedad, a partir del criterio establecido, de que el proceso de degeneración axonal, tiene lugar desde las etapas tempranas de la enfermedad.

Como quiera que cambios relativos al daño axonal pueden ser significativos en cualquiera de las etapas de la enfermedad., el IA para la PLNF, como indicativo de progresión pudiera ser también de utilidad para monitorear intervenciones terapéuticas antiinflamatorias desde los estadios más tempranos de la enfermedad.

La evaluación de la intensidad de la respuesta de Ac específica en EM, es otro elemento abordado por primera vez en nuestro medio. Este tiene como antecedente los reportes de Jacobi y cols en el 2007 <sup>(107)</sup> referidos a la imposibilidad de evaluar la intensidad de la respuesta específica en el SNC, basado en el estudio del IA específico y si por la evaluación de la fracción intratecal <sup>(107)</sup>.



Desde este enfoque, la estimación de la fracción de Ac específica, resulta novedosa en la interpretación de la respuesta de Acs en el LCR, pues permite distinguir el grado de intensidad de la respuesta en cada caso particular. Nosotros no observamos diferencias significativas de los resultados obtenidos en el análisis de la intensidad de respuesta para la PLNF, ni fue de interés respecto a las variables clínicas. En la literatura no existen reportes previos de este análisis para la PLNF.

Luego, esta reacción inflamatoria derivada de las células T autoreactivas, pudiera ser el enlace responsable de la desviación de la respuesta hacia un patrón Th2 con producción de Acs contra la PLNF, teniendo como sustento la supervivencia de clones de células B en el SNC de estos pacientes <sup>(159)</sup>. De la misma manera, la ruptura de axones y neuronas asociados a la desregulación inmune podría ser, en mayor o menor medida, un elemento común a todas las fases de la EM como argumento a la positividad del índice en ambas formas clínicas de la enfermedad.

Estos resultados, son una evidencia más de que antígenos secretados desde el tejido cerebral dañado, pueden inducir la producción de autoAcs en EM en asociación al comportamiento de determinadas variables biológica. La correlación positiva observada entre el ritmo de recaída y el  $IA_{PLNF}$ , constituye un resultado novedoso, que aporta un sustento clínico al valor del  $IA_{PLNF}$  como indicador de progresión en pacientes EM, y pone en evidencia un punto de contacto de clínico/biológico.

Si se asume que la inflamación es el conductor principal de la neurodegeneración en EM <sup>(196)</sup>, estas implicaciones pudieran ser importantes a tener en cuenta en el contexto de validar el papel de los Acs respecto a los diferentes estadios clínicos de la enfermedad, y su valor para evidenciar el daño o la recuperación axonal, con el uso combinado de metodologías sensibles y validadas.

La heterogeneidad de la enfermedad respecto a su comienzo, curso clínico y respuesta al tratamiento, la sensibilidad de los métodos empleados para el estudio de marcadores en los fluidos biológicos, las formulaciones empleadas para el análisis y la interpretación de los resultados, así como la selección y caracterización de las muestras en estudio son elementos a tener en cuenta para este análisis en virtud de poder arribar a un consenso necesario en la búsqueda de marcadores biológicos ligados a la neuropatología de la enfermedad. Estos elementos permitirán, por una parte explicar las diferencias en los resultados obtenidos por los diferentes grupos y por otro lado atribuir la relevancia de este análisis en el contexto de las diferencias observadas por los diferentes grupos en EM <sup>(112, 113, 198,199)</sup>.

La ausencia de marcadores diagnósticos específicos es particularmente deletérea para el diagnóstico de la EM y como consecuencia los pacientes no pueden ser evaluados, ni manejados adecuadamente desde el punto de vista terapéutico. <sup>(145,202)</sup>. Los métodos de FIE en agarosa y ELISA para la evaluación de la respuesta idiótipica, asimilados en este trabajo, permiten disponer de

tecnologías altamente sensibles para el diagnóstico precoz y la evaluación del curso clínico de la enfermedad, apoyado en la evidencia novedosa de la relación significativa entre el ritmo de recaídas y la respuesta de Ac contra la PLNF demostrada en estos enfermos.

En general las contribuciones principales de este estudio están dadas en: 1) la asimilación del método de FIE e Inmunofijación con una alta sensibilidad para la identificación de la presencia de síntesis intratecal de IgG en el LCR y/o la confirmación diagnóstica, 2) la validez de la identificación de la respuesta de Acs específica en SNC de pacientes con EM, apoyado en el uso del ELISA combinado con otras metodologías y herramientas auxiliares para el análisis de los datos del LCR, 3) la eficiencia del método de ELISA para evidenciar la respuesta idiotípica distintiva en personas portadoras de EM y 4) la relación significativa entre el  $I_{A_{PLNF}}$  y el ritmo de recaídas como un elemento novedoso que aporta una herramienta auxiliar para el seguimiento clínico en EM.

Nuestros resultados aportan herramientas para el diagnóstico precoz y el seguimiento de la EM, en relación con variables clínicas determinantes, aspectos de impacto clínico biológico para la enfermedad. Al mismo tiempo, los mismos sientan pautas para el diseño de nuevas investigaciones dirigidas al estudio de nuevos marcadores para la evaluación de la función del sistema de barreras en el contexto de estas enfermedades y el estudio de condicionamientos genéticos que pudieran modular la respuesta de Acs contra virus neurotrópicos en SNC de estas personas.

Los métodos de FIE en agarosa y ELISA para la evaluación de la respuesta idiotípica, asimilados en este trabajo, permiten disponer de tecnologías de valor diagnóstico y la evaluación del curso clínico y/o progresión de la enfermedad, apoyados en la evidencia de su relación con variables clínicas determinantes para la enfermedad, aportan precisión al diagnóstico en EM y nos ponen en condiciones de poder contribuir al conocimiento de nuevos eventos relativos al curso clínico de la enfermedad y el monitoreo de nuevos fármacos en EM, aspectos estos de impacto clínico biológico no exclusiva para la EM.

Por todo lo referido, se hace necesario el desarrollo de protocolos de investigación dirigidos a la búsqueda y validación de marcadores neurobiológicos que permitan establecer un diagnóstico temprano más preciso y un seguimiento clínico y terapéutico en EM, apoyado en el uso combinado de métodos de sensibilidad validada.

## 6. CONCLUSIONES

1. El método validado aporta una herramienta auxiliar de apoyo clínico asistencial, no disponible en la actualidad en nuestro medio.
2. El comportamiento diferencial de la respuesta contra virus neurotrópicos en personas cubanas con EM respecto a lo reportes previos, se sustenta en factores referidos a la hipótesis de la higiene.
3. EL punto de contacto neurobiológico demostrado entre el Índice de Acs para la PLNF y el ritmo de recaídas en las personas con EM, aporta una herramienta auxiliar como indicador de progresión para la enfermedad

## 7. RECOMENDACIONES

1. Extender al resto de las instituciones del país, el método de FIE en agarosa e inmunofijación asimilado para su aplicación como herramienta paraclínica en el estudio de enfermedades neurológicas.
2. Diseñar investigaciones que permitan evaluar la relevancia del IA<sub>PLNF</sub> como marcador de progresión y su utilidad para distinguir cambios clínicos de mayor espectro en el curso de la EM.
3. Promover el desarrollo de investigaciones para el estudio de los factores hemodinámicos con repercusión en la fisiopatología de enfermedades neurológicas como la EM.
4. Desarrollar protocolos de investigación para validar nuevos marcadores neurobiológicos que permitan un diagnóstico y monitoreo clínico/terapéutico temprano en la EM.

## 8. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Kira J. Etiology of multiple sclerosis. In: Theodore (ed). Multiple Sclerosis for the Practicing Neurologist. New York: Demos Medical Publishing, LLC; 2007. Vol 5, p. 1-6.
2. Porrás-Betancourt M, Nuñez-Orozco L, Plascencia-Alvarez NI, Quiñones-Aguilar S, Sauri-Suarez S. Esclerosis Múltiple. Rev Mex Neurosc 2007; 8:57-66.
3. Rose WJ, Carlson GN. Pathogenesis of multiple sclerosis. Continuum Lifelong Learning Neurol 2007; 13:35-62.
4. Meinl E, Krumbholz M, Derfuss T, Junker A, Hohlfeld R. Compartmentalization of inflammation in the CNS: A major mechanism driving progressive multiple sclerosis. J Neurol Sci 2008; 274: 42-44.
5. Lucchinetti C, Brück W, Scheithauer B, Rodriguez M, Lassman H. Heterogeneity of multiple sclerosis lesions: implications for the pathogenesis of demyelination. Ann Neurol 2000; 47: 707-17.
6. Boscoso S and Tongiorgi E. Quantification of antineural antibodies in autoimmune neurological disorders. Expert Rev Immunol 2007; 3:949-73
7. Martínez A, Mas A, de las Heras V, Arroyo R, Fernández-Arquero M, de la Concha EG et al. Early B-cell Factor gene association with multiple sclerosis in the Spanish population. BMC Neurol 2005; 5:19.
8. Cabrera-Gómez JA, Santana Capote E, Echazábal-Santana N, Díaz de la Fe A, Casanova M, Gómez L, et al. Estado actual de la Esclerosis Múltiple en Cuba. Rev Neurol 2000; 31: 482-93.
9. Martínez-Yélamos S, Ballabriga J, Martínez-Yélamos A, Hernández JJ, Arbizu T. Evolución y pronóstico de la esclerosis múltiple. Medicina 1998; 7:4333-7.
10. Mallada-Frechín J, Matías-Guio Guía J, Martín R, López Arlandis JM, Camacho Cuartero JM, Beltrán I, Moltó JM, Falip R, Abillán Miralles I. Prevalencia de la esclerosis múltiple en área sanitaria de Alcoi. Rev Neurol 2000; 30:1131-34.
11. Cabrera Gómez, JA. "Guías Prácticas Clínicas Esclerosis múltiple" de Editorial Ciencias Médicas. Cuba 2009; p.60.
12. Cabrera Gómez, JA. Guías Prácticas Clínicas Esclerosis múltiple de Editorial Ciencias Médicas. Cuba; 2009, p.10.
13. Martino G, Furtan R, Poliani P L. El significado patogénico de la inflamación en la Esclerosis Múltiple. Rev. Neurol 2000; 29:1213-17.
14. Forman ME, Racke KM, Raine SC. Multiple Sclerosis- the plaque and its pathogenesis. N Eng J Med 2006; 354:942-55.
15. Komek BL. Neuropathology of multiple sclerosis-new concepts. Brain Res Bull 2003; 61:321-26.
16. Babbe H, Roers A, Waisman A. Clonal expansion CD8+ T cells dominate the T cell infiltrate in active multiple sclerosis lesions as shown by micromanipulation and single cell polymerase chain reaction. J Exp Med 2000; 192:393-04.
17. Neumann H, Medana IM, Bawer J, Lassmann H. Cytotoxic T lymphocyte in autoimmune and degenerative CNS diseases. Trends Neurosci 2002; 25:313-19.
18. Jiang H, Chess L. Regulation of immune response by T cell. New Engl J Med 2006; 354: 1166-76.

19. Hemmer B, Jacobson M, Sommer N. Degeneration in T-cell antigen recognition. Implications for the pathogenesis of autoimmune diseases. *J Neuroimmunol* 2000; 107: 148-53.
20. Wingerchuck D, Kantarci O. Epidemiology and natural history of multiple sclerosis: new insights. *Curr Opin Neurol* 2006; 19: 248-54.
21. Lisak PR. Neurodegeneration in multiple sclerosis. Defining the problem. *Neurology* 2007; 68: S5-S12.
22. Patrikios P, Stadelman C, Kutzelnigg A. Remyelination is extensive in a subset of multiple sclerosis patients. *Brain* 2006; 129: 3165-72.
23. McDonald W, Compston A, Edan G, Hangtung H, Lublin F, McFarland H et al. Recommended diagnostic criteria for multiple sclerosis. *Ann Neurol* 2001; 50:121-7.
24. Lee MA, Palace D, Palace J. The diagnostic and differential diagnostic in multiple sclerosis. In: Theodore (ed). *Multiple Sclerosis for the Practicing Neurologist*. New York: Demos Medical Publishing, LLC; 2007. Vol 5, p. 33-50.
25. Fox RJ, Bethoux F, Goldman MD, Cohen JA. Multiple sclerosis: advances in understanding, diagnosing, and treating the underlying disease. *Cleve Clin J Med* 2006; 73: 91-102.
26. Tourtellotte WW, Potvin AR, Fleming JO. Multiple Sclerosis: measurement and validation of central nervous system IgG synthesis rate. *Neurology* 1980; 30:240-44.
27. Anderson M, Alvarez-Cermeño J, Bernardi G, Cogato I. Cerebro Spinal fluid in the diagnosis of multiple sclerosis: a consensus report. *J Neurol Neurosurg Psych* 1994; 57: 897-02.
28. Correales J. Oligoclonal bands and antibody response in multiple sclerosis. In: *Focus on Multiple sclerosis Research*. Frank Columbus (ed); 2004, p. 37-65.
29. Falip M, Tintore M, Jardi R, Duran I, Link H, Montalban X. Utilidad clínica de las bandas oligoclonales. *Rev Neurol* 2001; 32:1120-24.
30. Andrews AT, Chrambach A, Mosher RA. Isoelectric focusing. In: Reiner Westermeier (ed). *Electrophoresis in Practice. A guide to methods and applications of DNA and protein separations*. Fourth revised and enlarged edition. WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA 2005, p.51-6.
31. Berth M, Moser FM, Kolbe M. The state of the art in the analysis of two-dimensional gel electrophoresis images. *Appl Microbiol Biotechnol*. 2007;76:1223-43.
32. Barnett M H, Sutton I. The pathology of multiple sclerosis: a paradigm shift. *Curr Opin Neurol* 2006; 19: 242-47.
33. Arbizu-Urdiain T, Martinez-Yelamos A. Daño axonal en la esclerosis múltiple. *Rev Neurol* 2000; 30: 1223-7.
34. Correales J. Mecanismos moleculares implicados en la inmunopatogénia de la Esclerosis Múltiple. In: *Immunopatología molecular*. Ravinovich GA (ed). 2004. p 7-11.
35. Luchinetti CF. Advances in the neuropathology of multiple sclerosis: evolving pathogenesis insight. *Continuum Lifelong Learning Neurol* 2007; 13: 86-116.
36. Pittock SJ, Mayr WT, McClelland RL. Change in MS-related disability in a population-based cohort: a 10- year follow -up study. *Neurology* 2004; 62:51-59.
37. Coles AJ, Cox A, Le Page E. The window of therapeutic opportunity in multiple sclerosis: Evidence for monoclonal antibody therapy. *J Neurol* 2006; 253: 98-108.



38. Bielekova B, Kadom M, Fisher E. MRI as a marker for disease heterogeneity in Multiple sclerosis. *Neurology* 2005; 65: 1071-76.
39. Teunissen C, Dijkstra C, Palman C. Biological markers in CSF and blood axonal degeneration in multiple sclerosis. <http://neurology.thelancet.com>. 2005.
40. Lim ET, Sellebjerg F, Jensen CV, Altmann DR, Grant D, Keir G. Acute axonal damage predicts clinical outcome in patients with multiple sclerosis. *Mult Scler* 2005; 11:532-6.
41. Colleen MK, Burns BA, and KevinAA. Does rubella immunity predict measles immunity? A serosurvey of pregnant women. *Infectious Disease Obstetrics and Gynecology*. Clinical Study. Hindawi Publishing Corporation. 2006, p. 23.
42. Jarius S. Polyspecific, antiviral immune response distinguishes multiple sclerosis and neuromyelitis optica. *Nature Clinical Practice Neurology* 2008, 4:524.
43. Jarius S, Eichhorn P, Jacobi C, Wildemann B, Wick M, Voltz R. The intrathecal, polyspecific antiviral immune response: Specific for MS or a general marker of CNS autoimmunity?. *J Neurol Sci*. 2009; 280:98-100.
44. Silber E, Semra YK, Gregson NA, Sharief MK. Patients with progressive multiple sclerosis have elevated antibodies to neurofilament subunit. *Neurology* 2002; 58:1372-81.
45. Eikelenboom MJ, Petzold A, Lazeron RHC, Silber E, Sharief M, Thompson EJ, Barkhof F, Giovannoni G, Polman CH, and Uitdehaag BMJ. Neurofilament light chain antibodies are correlated to cerebral atrophy. *Neurology* 2003; 60:219-23.
46. Bruck W. Clinical implications of neuropathological findings in multiple sclerosis. *J Neurol* 2005; 252:iii10-iii14.
47. Margutti P, Delunardo F, Ortona E. Autoantibodies associated with psychiatric disorders. *Curr Neurovasc Res* 2006;3:149-57.
48. Yesudian PD, Edirisinghe DN, O'Mahony C. Behcet's disease. *Int J Sex Trans Dis. AIDS* 2007;18:221-27.
49. Winherchuk DM. Diagnosis and treatment of neuromyelitis optica. *Neurologist* 2007; 13: 2-11.
50. Berger T, Rubner P, Schautzer F, Egg R, Ulmer H. Antymyelin antibodies as a predictor of clinically definite multiple sclerosis after a first demyelinating event. *N Engl J Med* 2003; 349:139-45.
51. Hickey WF. Basic principles of immunological surveillance of the normal central nervous system. *Glia* 2001; 36:118-24.
52. Fisher L J and Gage FH. Grafting in the mammalian central nervous system. *Physiol Rev* 1993; 73:583-16.
53. Becher B, Bechmann I, Greter M. Antigen presentation in autoimmunity and CNS inflammation: how T lymphocytes recognize the brain. *J Mol Med* 2006; 84:532-43.
54. Seyfert S, Faultish A. Is the blood-CSF barrier altered in disease? *Acta Neurol Scand* 2003; 108: 252-56.
55. Nathanson JA, Chun LYL. Possible role of the choroid plexus in immunological communication between the brain and periphery. In. *Pathophysiology of the blood brain barrier*. BB Johansson, Ch Owman, H Widner (Eds), Elsevier Science Publisher 1990, p. 501.

56. Neutwelt, E, Abbott NJ , Abrey L, Banks W A, Blakley B, Davis T, et al. Strategies to advance translational research into brain barriers. *Lancet Neurol* 2008; 7: 84-96.
57. Redzic ZB, Preston JE, Duncan JA, Chdobski A. Szmydynger Chdobsk J. The choroid plexus- cerebrospinal fluid system from development to ageing. *Curr Top Dev Biol* 2005; 71: 1-52.
58. Bigio MR. The ependyma. A protective barrier between brain and cerebrospinal fluid. *Glia* 1995; 14:1-13.
59. Nathanson JA, Chun LY .Immunological function of the blood- cerebrospinal fluid barrier. *Proc Natl Acad Sci. USA*; 1990; 86: 1684-88.
60. Nag S. Pathophysiology of blood brain barrier breakdown. *Methods Mol Med* 2003; 89: 97-111.
61. Petty M A, Lo HE. Junctional complexes of the blood-brain barrier: permeability changes in neuroinflammation. *Progress in Neurobiology* 2002; 68:311-323.
62. Hemmer B, Cepok S, Zhou D, Sommer N. Multiple sclerosis - a coordinated immune attack across the blood brain barrier. *Current Neurovasc Res* 2004; 1:141-50.
63. Haukins BT, Davis TP, The blood-brain barrier/ neurovascular unit in health and disease. *Pharmacol Rev* 2005, 57: 173-85.
64. Hatterer E, Davoust N, Didier-Bazes M, Vuillat C, Malcus C, Belin M-F, Nataf S. How to drain without lymphatics? Dendritic cells migrate from the cerebrospinal fluid to the B-cell follicles of cervical lymph nodes. *Blood* 2006;107:806-12.
65. Brown K A. Factors modifying the migration of lymphocytes across the blood-brain barrier. *Int Immunopharmacol.* 2001; 1:2043-62.
66. Friese MA, Fugger L. Autoreactive CD8+ T cells in multiple sclerosis: a new target for therapy?. *Brain* 2005; 128:1747-63.
67. Reiber H. Cerebrospinal fluid - physiology, analysis and interpretation of protein patterns for diagnosis of neurological diseases. *Multiple Sclerosis* 1998; 4: 99-107.
68. Reiber H and Peter J B . Cerebrospinal fluid analysis disease-related data patterns and evaluation programs. *J Neurol Sci* 2001; 184:101-22.
69. Reiber H, Otto M, Trendelenburg Chron and Wormek A. Reporting cerebrospinal fluid data-knowledge base and interpretation software *Clin Chem Lab Med* 2001; 39:324-32.
70. Shao P, Reiber H, Brenman C. European Cerebrospinal Fluid Consensus Group- a TeamRoom (Lotus Notes)- Based Communication Network. *Clin Chem Lab Med* 2000; 38: 747-51.
71. Dorta Contreras AJ. Reibergram as epidemiological tool: a new approach.*Rev Neurol* 2001; 33:36-40.
72. Tourtellotte WW. On cerebrospinal fluid immunoglobulin G (IgG) quotients in multiple sclerosis and other diseases.A review and new formula to stimate the amount of IgG synthesis per day by the central nervous system. *J Neurol Sci* 1970; 10: 279-304.
73. Link H, Tibbling G. Principles of albumin and IgG disorders. Evaluation of IgG synthesis within the central nervous system in multiple sclerosis. *Scand J Clin Lab Invest* 1977; 37: 397-01.
74. Reiber H. The discrimination between different blood-CSF barrier dysfunctions and inflammatory reactions of the CNS by a recent evaluation graph for the protein profile of CSF. *J Neurol* 1980; 224: 89-99.

75. Reiber H. Evaluation of blood-cerebrospinal fluid barrier dysfunction in neurological diseases. In: Blood-Brain-Barrier in Health and Disease. Suckling AJ, Rumsby MG, Bradbury MWB, eds. Chichester: Ellis Horwood; 1986.pp147-57.
76. Ohman S, Ernerud J, Forsberg H, Von Schenck H, Vrethem M. Improved formulae for the judgement of the intrathecally produced IgA and IgM in the presence of blood-CSF barrier damage. *Ann Clin Biochem* 1993; 30:454-62.
77. Goldman D, Merrill CR, Ebert MH. Two dimensional gel electrophoresis of cerebrospinal fluid proteins. *Clin Chem* 1980, 26:1317-22.
78. Rabat EA, Moore DH, Landow H. An electrophoretic study of the proteins components in CSF and their relationship to serum proteins. *J Clin Invest* 1942; 21:571-77.
79. Lowenthal A. Agar electrophoresis in neurology. Elsevier Publishing Company :Amsterdam; 1964.
80. Reiner Westermeier. Electrophoresis In: Electrophoresis in Practice. Fourth revised enlarged edition. Part I Fundamentals. Reiner Westermeier (ed). Wiley-Vch. Verlag GmbH Co KGaA Weinheim, 2005, p.9-44.
81. Merrill C R, Goldman D, Sedman S A, Ebert M H. Ultrasensitive stain for proteins in polyacrilamide gels shows regional variation in cerebrospinal fluid proteins. *Science* 1981, 211: 1437-8.
82. Olsson J, Kostulas V, Link H. Improved detection of oligoclonal IgG in cerebrospinal fluid by isoelectric focusing in agarose, double-antibody peroxidase labeling, and avidin-biotin amplification. *Clin Chem* 1984; 30:1246-49.
83. Link H, Huang YM. Oligoclonal bands in multiple sclerosis cerebrospinal fluid: an update on methodology and clinical usefulness. *J Neuroimmunol* 2006; 180:17-28.
84. Reiner Westeimeier. Isoelectric focusing. In: Electroforesis in practice. A guide to methods and applicattions of DNA and protein separations. Fourth revised and enlarged edition. Reiner Westeimeier (ed). Wiley-Vch. Verlag GmbH Co KGaA Weinheim, 2005. p.51-64.
85. Kleine T O. Distinct heterogeneity of IgG immune response in cerebrospinal fluid (CSF) detected by isoelectric focusing (IEF) with extended immunofixation. *Brain Res Bull* 2003; 61:309-20.
86. Zeman AZJ, Kidd D, McLean. A study of oligoclonal band negative multiple sclerosis. *J Neurol Neurosurg Psych* 1996; 60:27-30.
87. Sa MJ, Sequeira L, Rio ME, Thompson EJ. Oligoclonal IgG bands in the cerebrospinal fluid of portuguese patients with multiple sclerosis: negative results indicate benign disease. *Arq Neuropsiquiatr* 2005; 63:375-9.
88. Ascherio A, Munger K. Epidemiology of Multiple Sclerosis: From Risk Factors to Prevention. *Semin Neurol* 2008; 28: 17-28.
89. Green A, Waubant E. Genetics and epidemiology of Multiple Sclerosis. *Continuum Lifelong Learning Neurol* 2007; 13:63-85.
90. Ojer J. Immunotherapy of multiple sclerosis: Theoretical basis and practical approach. In: Theodore (ed). *Multiple Sclerosis for the Practicing Neurologist*. New York: Demos Medical Publishing, LLC; 2007, p. 65-74.
91. Schapiro TR. Symptomatic management of multiple sclerosis. In: Theodore (ed). *Multiple Sclerosis for the Practicing Neurologist*. New York: Demos Medical Publishing, LLC; 2007, p. 51-57.

92. Achiron A. Predicting the course of relapsing-remitting MS using longitudinal disability curves. *J Neurol* 2004; 251:V65-V68.
93. Fujinami RS, von Herrath MG, Christen U, Whitton JL. Molecular mimicry, bystander activation, or viral persistence: infections and autoimmune disease. *Clin Microbiol Rev* 2006;19:80-94.
94. McCoy L, Tsunoda I, Fujinami RS. Multiple sclerosis and virus induced immune responses: autoimmunity can be primed by molecular mimicry and augmented by bystander activation. *Autoimmunity* 2006; 39:9-19.
95. Haase CG, Guggenmos J, Brehm U, Andersson M, Olsson T, Reindl M, et al. The fine specificity of the myelin oligodendrocyte glycoprotein autoantibody response in patients with multiple sclerosis and normal healthy controls. *J Neuroimmunol* 2001, 114:220-25.
96. Torkildsen O, Vedeler CA, Nyland HI, Myhr K-M. Fc $\gamma$ R and multiple sclerosis: an overview. *Acta Neurol Scand* 2006;113: 61-3.
97. Dotan N, Altstock RT, Schwarz M, Dukler A. Anti-glycan antibodies as biomarkers for diagnosis and prognosis. *Lupus* 2006; 15: 442-50.
98. Mantegazza R, Cristaldini P, Bernasconi P, Baggi F, Pedotti R, Piccini I, et al. Anti-MOG autoantibodies in Italian multiple sclerosis patients: specificity, sensitivity and clinical association. *Int Immunol* 2004; 16:459-565.
99. Markovic M, Trajkovic V, Drulovic J, Mesaros S, Stojsavljevic N, Dujmovic I, Mostarica Stojkovic M. Antibodies against myelin oligodendrocyte glycoprotein in the cerebrospinal fluid of multiple sclerosis patients. *J Neurol Sci* 2003; 211:67-73.
100. Aboul-Enein F, Rauschka H, Kornek B, Stadelmann C, Steffler A, Bruck W, . Preferential loss of myelin-associated glycoprotein reflects hypoxia-like white matter damage in stroke and inflammatory brain diseases. *J Neuropathol Exp Neurol* 2003, 62:25-33.
101. Pachner AR, Li L, Narayan K. Intrathecal antibody production in an animal model of multiple sclerosis. *J Neuroimmunol* 2007; 185: 57-63.
102. Sharief MK, Thompson EJ. Intrathecal immunoglobulin M synthesis in multiple sclerosis. Relationship with clinical and cerebrospinal fluid parameters. *Brain* 1991; 114: 181-95.
103. Vilisaar J, Wilson M, Niepel G, Blumhardt LD, Constantinescu CS. A comparative audit of cardiolipin antibodies in oligoclonal band negative and positive multiple sclerosis. *Mult Scler* 2005, 11: 378-80.
104. Christensen T. The role of EBV in MS pathogenesis. *The International MS Journal* 2005; 13:52-57.
105. Haahr S, Hollsberg P. Multiple sclerosis is linked to Epstein-Barr virus infection. *Rev Med Virol.* 2006; 16:297-10.
106. Christensen T. Association of human endogenous retroviruses with multiple sclerosis and possible interactions with herpes viruses. *Rev Med Virol* 2005; 15:179-211.
107. Jacobi C, Lange P, Reiber H. Quantitation of intrathecal antibodies in cerebrospinal fluid of subacute sclerosing panencephalitis, herpes simplex encephalitis and multiple sclerosis: Discrimination between microorganism-driven and polyspecific immune response. *J Neuroimmunology* 2007; 187:139-46.

108. Reiber H , Lange P. Quantification of virus-specific antibodies in cerebrospinal fluid and serum: sensitive and specific detection of antibody synthesis in brain. *Clin Chem* 1991; 37: 1153-60.
109. Quenting CD, Reiber H. Fuchs' Heterochromic Cyclitis- rubella virus antibodies and genome in aqueous humor. *AJO* 2004; 138:46-54.
110. Goldmann H, Witmer R. Antikörper im Kammerwasser. *Ophthalmologica* 1954;127:323-30.
111. Felgenhauer K, Nekić M, Ackermann R. The demonstration of locally synthesized herpes simplex IgG antibodies in CSF by a sepharose 4B linked enzyme immunoassay. *J Neuroimmunol* 1982;3:149-58.
112. Bartos A, Fialova L, Soukupová J, Kukal J, Malbohan I, Pitha J. Antibodies against light neurofilaments in multiple sclerosis patients. *Acta Neurol Scand* 2007;116:100-7.
113. Bartos A, Fialova L, Soukupová J, Kukal J, Malbohan I, Pitha J. Elevated intrathecal antibodies against the medium neurofilament subunit in multiple sclerosis. *J Neurol* 2007, 254: 20-25.
114. Huizinga R, Hintzen RQ, Assink K van Meur M Amor S. T cells response to neurofilament light protein are part of the normal immune repertoire. *International Immunol* 2008; 21:433-441.
115. Munger KL, Levin LI, Hollis BW. Serum 25-hydroxyvitamin D levels and risk of multiple sclerosis. *JAMA* 2006; 296: 2832-38.
116. Ebers G C. Prognostic factors for multiple sclerosis: the importance of natural history studies. *J Neurol* 2005; 252 :15-20.
117. Hauser SL, Oksenberg SJ. The neurobiology of multiple sclerosis: genes, inflammation and neurodegeneration. *Neuron* 2006; 52:61-76.
118. Dymant DA, Ebers GC, Sadovnick AD. Genetic of multiple sclerosis. *Lancet Neurol* 2004; 3:104-10.
119. Hillert J. Multiple sclerosis: postlinkage genetics. *Clin Neurol Neurosurg* 2006; 108:220-2.
120. Fernandez-Muñoz R, Celma-Serrat ML. Virus and desmielinization: ¿por qué sospechar la implicación de virus en la etiología de la esclerosis múltiple. *Rev Neurol* 2002; 35: 964-72.
121. Cepok S, Zhou D, Sivastava R. Identification of Epstein-Barr virus proteins as putative targets of the immune response in multiple sclerosis. *J Clin Invest* 2005; 115: 1352-60.
122. Levin LI, Munger KL, Rubertone MV. Temporal relationship between elevation of Epstein-Barr virus antibody titers and initial onset of neurological symptoms in multiple sclerosis. *JAMA* 2005; 293:2496-500.
123. Weiner HL. The challenge of multiple sclerosis: how do we cure the chronic heterogeneous diseases?. *Ann Neurol* 2009; 65:239-48.
124. Cooper LZ, Alford CA. Rubella. In: Remington JS, Klein JO (eds). *Infectious diseases of the fetus and newborn infant*: London W. B. Saunders 2001, p.347-87.
125. Burgoon PM, Cohrs JR, Bennett LJ, Anderson WS. Varicella Zoster is not a disease-relevant antigen in multiple sclerosis. *Ann Neurol* 2009; 5: 474-79.
126. Banwell B, Krupp L, Kennedy J, Tellier R, Tenembaum S, Ness J. Clinical features and viral serologies in children with multiple sclerosis: a multinational observational study. *Lancet Neurology* 2007, 6:773-781.

127. Kriesel JD, White A, Hayden FG. Multiple sclerosis attacks are associated with picornavirus infections. *Mult Scler* 2004;10:145-48.
128. Prat A, Antel J. Pathogenesis of multiple sclerosis. *Curr Opin Neurol* 2005; 18:225-30.
129. Sospedra M and Martin R. Immunology of multiple sclerosis. *Ann Rev Immunol* 2005; 23:683-747.
130. Prinz M, Garbe F, Schmidt H, Mildner A, Wolter I, Piesche M. Innate immunity mediated by TLR9 modulates pathogenici model of multiple sclerosis. *J Clin Invest* 2006; 116: 456-64.
131. Venken K, Hellings N, Thewissen M, Somers V, Hensen K, et al, Compromised CD4<sup>+</sup>CD25<sup>high</sup> regulatory T cell function in patients with relapsing-remitting multiple sclerosis is correlated with a reduced frequency of FOXP3-positive cells and reduced FOXP3 expression at the single-cell level. *Immunology* 2007;123:79-89
132. Jalbut SD. Pathogenesis of myelin/oligodendrocyte damage in multiple sclerosis. *Neurology* 2007; 68: S13-S21.
133. Marchetti B , Abbracchio M P. To be or not to be (inflamed)- is that the question in anti-inflammatory drug therapy of neurodegenerative disorders? *TRENDS in Pharmacol Sci* 2005; 25:518-25.
134. DeVries GH. Cryptic axonal antigens and axonal loss in multiple sclerosis *Neurochem Res* 2004; 29:1999-06.
135. Confavreux Ch and Vukusic S. Age at disability milestones in multiple sclerosis. *Brain* 2006; 129:595-605.
136. Ahmed Z, Doward AI, Pryce G, Taylor DL, Pocock JM, LeonVrd JP, Baker D, Cuzner MI. A role for caspase-1 and -3 in the pathology of experimental allergic encephalomyelitis: inflammation versus degeneration. *Am J Pathol* 2002; 161:1577-86.
137. Franciotta D, Martino G, Zardini E, Furlan R, Bergamaschi R, Gironi M, et al. Caspase-1 levels in biological fluids from patients with multiple sclerosis and from patients with other neurological and non-neurological diseases. *Eur Cytokine Netw* 2002; 13:99-103.
138. Zhu Luo R, Moore GR, Paty DW, Cynader MS. Dendritic and synaptic pathology in experimental autoimmune encephalomyelitis. *Am J Pathol* 2003; 162:1639-50.
139. Correales J, de los Milagros BM. Time course of T-cell responses to MOG and MBP in patients with clinically isolated syndromes. *J Neuroimmunol* 2003; 136:162-71.
140. Vollmer T. The natural history of relapses in multiple sclerosis. *J Neurol Sci* 2007; 256: S5-S13.
141. Petzold A, Eikelenboom MJ, Keir G, Grant D, Lazeron RH, Polman CH, et al. Axonal damage accumulates in the progressive phase of multiple sclerosis: three year follow up study. *J Neurol Neurosurg. Psychiatry* 2005; 76:206-11.
142. Mollenhauer R, Steinacker P, Bahn E, Bibl M, Brechlin P, Schlossmacher MG, et al. Serum heart-type fatty acid-binding protein and cerebrospinal fluid Tau: marker candidates for dementia with lewy bodies. *Neurodegenerative Dis* 2007; 4:349-65.
143. Hein K, Köhler A, Diem R, Sättler B M. Demmer I, Lange P, Bähr M, Otto M. Biological markers for axonal degeneration in CSF and blood of patients with the first event indicative for multiple sclerosis. *Neurosci Lett* 2008; 436: 72-6.
144. Koch M, Mostert J, Heersema D, Teelken A, De Keyser J. Plasma S100B and NSE levels and progresión in multiple sclerosis. *J Neurol Sci* 2007; 252:154-58.

145. Petzold A. CSF biomarkers for improved prognostic accuracy in acute CNS disease. *Neurol Res* 2007;29:691-705.
146. Mainetti J. Ética médica: Introducción Histórica. *Documentos de Deontología Médica* 1989: 121-2.
147. Control de Calidad En Control de calidad en bioquímica clínica. Cap 1. Eds Carlos Pascual Marquez y Wilfredo Torres Yribar. Editorial Ciencias Cubanas 2003: p 11-40.
148. Ochoa R, Martinez JC, Estrada E, Garcia AM. Validación de inmunoensayos cualitativos usados para evaluar inmunogenicidad de vacunas. *VacchiMonitor* 2000; 9:1-5.
149. Reiber H. Flow rate of cerebrospinal fluid (CSF)-a concept common to normal blood CSF barrier function and dysfunction in neurological diseases. *J Neurol Sci* 1994; 122: 189-203.
150. Dorta- Contreras AJ, Reiber H. Teoría de la difusión molecular/flujo del líquido cefalorraquídeo. In: Barrera sangre-líquido cefalorraquídeo. Barreiro-García R (ed). Editorial Academia 2006.p. 47-59.
151. Kurtzke JF. Rating neurologic impairment in multiple sclerosis: an expanded disability status scale (EDSS). *Neurology (Cleveland)* 1983; 33: 1444-52.
152. Meinl E, Krumbholz M, Hohlfeld R. B lineage cells in the inflammatory central nervous system environment: migration, maintenance, local antibody production and therapeutic modulation. *Ann Neurol* 2006; 59:880-92.
153. Yamashita k, Nomura T, Ohyagi Y, Taniwaki T, Furuya H, Kuwabara Y, Kira J. A case of primary progressive multiple sclerosis with onset of memory impairment. *Rinsho Shinkeigaku* 2005; 45: 351-6.
154. Kira J. Multiple Sclerosis in the Japanese population. *Lancet Neurol* 2003; 2: 117-127.
155. Link H, Huang YM. Oligoclonal bands in multiple sclerosis cerebrospinal fluid: an update on methodology and clinical usefulness. *J Neuroimmunol* 2006; 180:17-28.
156. Imrell K, Landtblom A-M, Hillert J, Masterman T. Multiple Sclerosis with and without CSF bands: clinically indistinguishable but immunogenetically distinct. *Neurology* 2006; 67: 1062-4.
157. Tsai CP, Yuan CL, Yu HY, Chen C, Gou YC, Shan DE. Multiple sclerosis in Taiwan. *J Chin Med Assoc* 2004; 67:500-5.
158. Hemmer B, Archelos, JJ, Hartung, H. New concepts in the immunopathogenesis of multiple sclerosis. *Nat. Rev Neurosci* 2002; 3: 291-301.
159. Plumb J, Quaid S, Mirakhur M, Kirk J. Abnormal endothelial tight junctions in active lesions and normal-appearing white matter in multiple sclerosis. *Brain Pathol* 2002; 12, 154-69.
160. Obermeier B, Mentele R, MalOtka J, Kellermann J, Kümpfel T, Wekerle H. Matching of oligoclonal Ig transcriptomes and proteomes of cerebrospinal fluid of cerebrospinal fluid in multiple sclerosis. *Nat Med* 2008; 14:688-93.
161. Correales J. , Villa A. The neuroprotective role of inflammation in nervous system injuries. *J. Neurol* 2004; 251:1304-16.
162. Aktas O, Ullrich O, Infante-Duarte Carmen, Nitsch R, Zipp F. Neuronal Damage in Brain Inflammation. *Arch Neurol* 2007; 64:185-89
163. Stich O, Rauer S. Antigen-specific oligoclonal bands in cerebrospinal fluid and serum from patients with anti-amphiphysin- and anti-CV2/CRMP5 associated paraneoplastic neurological syndromes. *Eur J Neurol.* 2007;14:650-3.

164. Bourahoui A, De Seze J, Guttierrez R, Onraed B, Hennache B, Ferriby D, Stojkovic T, Vermersch P. CSF isoelectrofocusing in a large cohort of MS and other neurological diseases. *Eur J Neurol* 2004; 11: 525-9.
165. Pohl D, Rostasy K, Reiber H, Hanefeld F. CSF characteristic in early onset multiple sclerosis. *Neurology* 2004; 63:1966-67.
166. Prat A, Biernacki K, Lavoie JF, Duquette P, Antel JP. Migration of multiple sclerosis lymphocytes through brain endothelium. *Arch Neurol* 2002; 59:391-7.
167. Khoury SJ, Guttman CR, Orav EJ, Kikinis R, Jolesz FA, Weiner HL. Changes in activated T cells in the blood correlate with disease activity in multiple sclerosis. *Arch Neurol* 2000; 57:1183-89.
168. Linker RA, Kieseier BC, Gold R. Identification and development of new therapeutics for multiple sclerosis. *Trends Pharmacol Sci* 2008; 29:558-65.
169. Simka /Leech S, Kira, J Pluma J, McQuaid S. Persistent endothelial abnormalities and blood brain barrier leak in primary and secondary progressive multiple sclerosis. *Neuropathol Appl Neurobiol* 2007; 13:36-8.
170. Hochmeister S, Grundtner R, Bauer J, Engelhardt B, Lyck R, Gordon G, et al. Dysferlin is a new marker for leaky brain blood vessels in multiple sclerosis. *J neuropathol exp Neurol* 2006; 65: 855-65.
171. O' Connor KC, McLaughlin KA, De Jager PL, Chitnis T, Betelli E, Xo C, et al. Self-antigen treatment discriminate between myelin autoantibodies to native or denatured protein. *Nat Med* 2007; 13:211-7
172. Steinberg TA, Boettcher IC, Matiasek K, Hirschvogel K, Hartmann K, Kunz A, Fischer A. Use of albumin quotient and IgG index to differentiate blood- vs brain-derived proteins in the cerebrospinal fluid of cats with feline infectious peritonitis. *Vet Clin Pathol*. 2008: 234-8.
173. Simka M. Blood brain barrier compromise with endothelial inflammation may lead to autoimmune loss of myelin during sclerosis. *Curr Neurovasc Res* 2009; 6:132-9.
174. Staines DR, Brenu EW, Marshall-Gradisnik S. Postulated role of vasoactive neuropeptide-related immunopathology of the blood brain barrier and Virchow-Robin spaces in the aetiology of neurological-related conditions. *Mediators Inflamm* 2008;79:24-28.
175. Korn T. Pathophysiology of multiple sclerosis. *J Neurol* 2008;255:2-6.
176. Palmer AM. Pharmacotherapy for multiple sclerosis: progress and prospects. *Curr Opin Invest Drugs* 2009;10: 407-17
177. Biernacki K, Prat A, Blain M, Antel JP. Regulation of cellular and molecular trafficking across human brain endothelial cells by Th1- and Th2-polarized lymphocytes. *J Neuropathol Exp Neurol* 2004; 63:223-32.
178. Mathey EK, Derfuss T, Storch MK, Williams KR, Hales K, Whoolley DR, et al. Neurofascin as a novel target for autoantibody-mediated axonal injury. *J Exp Med* 2007; 204:2363-72
179. Magliozzi R, Howell O, Vora A, Serafini B, Nicholas R, Puopolo M, et al. Meningeal B-cell follicles in secondary progressive multiple sclerosis associate with early onset of disease and severe cortical pathology. *Brain* 2007; 130: 1089-104.
180. Mathey EK, Derfus T, Stoeck MK, Williams KR, Hales K, Woolley DR, et al. Neurofascin as a novel target for autoantibody-mediated axonal injury. *J Exp Med* 2007; 04:2363-72



181. Schneider R, Euler B, Rauer S. Intrathecal IgM-synthesis does not correlate with the risk of relapse in patients with a primary demyelinating event. *Eur J Neurol* 2007;14:907-11.
182. Levert AK, Link H. IgG production within the central nervous system a critical review of proposed formula. *Ann Neurol* 1985; 17:13-20.
183. Leary SM, McLean BN, Thompson EJ. Local synthesis of IgA in the cerebrospinal fluid of patients with neurological diseases. *J Neurol* 2000;247:609-15
184. Olson JK, Ercolini AM, Miller SD. A Virus-induced molecular mimicry model of multiple sclerosis. *Curr Top Microbiol Immunol* 2005; 296:39-53.
185. Pittock SJ, McClelland RL, Achenbach SJ, Konig F, Bitsch A, Bruck W, et al. Clinical course, pathological correlations, and outcome of biopsy proved inflammatory demyelinating disease. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 2005; 76:1693-97.
186. Kruhliak HO. Multiple sclerosis and herpetic infection. *Lik Sprava* 2004; 1: 3-8.
187. Fernandez-Muñoz R, ML Celma-Serrat. Virus and desmielinization: ¿por qué sospechar la implicación de virus en la etiología de la esclerosis múltiple. *Rev Neurol* 2002; 35: 964-72.
188. Cosby SL, McQuaid S, Taylor MJ, Bailey M, Rima BK, Martin SJ and Allen IV. Examination of eight cases of multiple sclerosis and 56 neurological and no neurological controls for genomic sequences of measles virus, canine distemper virus, simian virus 5 and rubella virus. *J Gen Virol* 1989; 70: 2027-36.
189. Buljevac D, Flach HZ, Hop WC, Hijdra D, Laman JD, Savelkoul HF. Prospective study on the relationship between infections and multiple sclerosis exacerbations. *Brain* 2002; 125: 952-60.
190. Chapman MD, Keir G, Petzold A, Thompson EJ. Measurement of high affinity antibodies on antigen-immunoblots. *J. Immunol Methods* 2006; 310: 62-6.
191. Vandvik B, Norrby E, Nordal HJ. Optic neuritis: local synthesis in the CNS of oligoclonal antibodies to measles, mumps, rubella and herpes simplex viruses. *Acta Neurol Scand* 1979; 60
192. Schattner A. Consequence or coincidence? The occurrence, pathogenesis and significance of autoimmune manifestations after viral vaccines. *Vaccine* 2005; 23:3876-86.
193. Nardone A, Tischer A, Andrews N, Backhouse J, Theeten H, Gatcheva N, Zarvou M, et al. Comparison of rubella seroepidemiology in 17 countries: progress towards international disease control targets. *Bulletin of the World Health Organization* 2008; 86: 118-25.
194. Naismith TR and Cross HA. Does the hepatitis B vaccine cause multiple sclerosis?. *Neurology* 2004; 63: 772-73.
195. Bonneville F, Moriarty DM, Li BS, Babb JS, Grossman RI, Gonen O. Whole-brain N-acetylaspartate concentration: correlation with T2-weighted lesion volume and expanded disability status scale score in cases of relapsing-remitting multiple sclerosis. *Am J Neuroradiol* 2002; 23:371-75.
196. Gadea M, Martinez-Bisbal MC, Marti-Bonmati L, Espert R, Casanova B, Coret F, Celda B. Spectroscopic axonal damage of the right locus coeruleus relates to selective attention impairment in early stage relapsing-remitting multiple sclerosis. *Brain* 2004; 127:89-98.
197. Palace J. Inflammation versus neurodegeneration: consequences for treatment. *J Neurol Sci.* 2007 ;259:46-9.

198. Chari DM. Remyelination in multiple sclerosis. *Int Rev Neurobiol* 2007; 79:589-602.
199. Bejartmar C, Trapp B D. Axonal degeneration and progressive neurologic disability in multiple sclerosis. *Neurotox Res* 2003; 5:157-64.
200. Araji AI. Special investigations in Multiple Sclerosis. In: *Multiple Sclerosis for the Practicing Neurologist* . First edition. Araji AI (Ed). New York; 2007, p.10-31.
201. Semra YK, Seidi OA, Sharief MK. Heightened intrathecal release of axonal cytoskeletal proteins in multiple sclerosis is associated with progressive disease and clinical disability. *J Neuroimmunol* 2002; 122:132-39.
202. Hemmer B, Frohman EP, Hartung HP, Stüve O. Central nervous system infections- a potential complication of systemic immunotherapy. *Curr Opin Neurol* 2006; 19: 271-280.

## 9. PRODUCCIÓN CIENTÍFICA DEL AUTOR

### Publicaciones relacionadas con el tema de la tesis

M A Robinson Agramonte, Reiber Hansotto, A Dorta Contrera, Intrathecal oligoclonal and polyspecific immune response in Multiple sclerosis. *Revista Neurol* 2001 ,33, 809-11.

M A Robinson-Agramonte A Restricted Intrathecal Oligoclonal and Polyspecific Immune Response in Multiple Sclerosis In: *Focus in Múltiple Sclerosis Research*. Chapter 4. Editor Frank Columbus. 2004 Nova Science Publisher, Inc USA, pp. 67-78.

Robinson Agramonte, MA; Gusmeli, V; Martínez Benítez, M; Infante Velázquez, E; Galvizu Sánchez, RJ; Ochoa Zaldívar, M; Robinson Agramonte, JE. Contribución de la detección de bandas oligoclonales (BOC) en LCR para la confirmación del diagnóstico en esclerosis múltiple (EM) *Rev Mex de Neurociencia* 6(1):8-15, 2005.

Robinson-Agramonte M, H. Reiber, J. A. Cabrera-Gomez, R. Galvizu .Intrathecal polyspecific immune response to neurotropic viruses in multiple sclerosis: a comparative report from Cuban patients. *Acta Neurol Scand*. 2007 May; 115(5):312-8.

M A Robinson. FIE en la detección de BOC de IgG en el LCR. LIBRO *NEUROINMUNOLOGIA BÁSICA*. COLECTIVO DE AUTORES. Editorial Academia: pp 72, 2008.

Cabrera-Gomez, Ramón-Pérez L, Saiz A, Llerena-Fernández P, Fernández-Fernández L, Ercilla G, Grass-Fernández D, Robinson-Agramonte MA, Romero-García K, Macías-Betancourt R, Galvizu-Sánchez R, Otero-Motolá C, Sojo-Gómez M, Aguilar-Arias C, Rodríguez-Cordero, M, González-Quevedo A. Neuromyelitis optica and multiple sclerosis in sisters. *Multiple Sclerosis*;15(2): 269-271,2009.

M A Robinson. Respuesta de Acs contra virus neurotrópicos. Libro "Neuroinmunología Clínica". Editorial Academia: pp185-193, 2009.

Premios recibidos (en orden cronológico ascendente).

Forun Municipal de Ciencia y Técnica, 2001. Mención Validéz del Reibergrama en el evaluación de la respuesta inmune intratecal en el diagnóstico de enfermedades neurológicas. Autora

Premio de la Academia de Ciencias de Cuba 2004 Investigación Científica: "El factor de crecimiento nervioso en la neurodegeneración y el tratamiento neurorestaurativo". Coautora

Concurso Central Premio Anual de Salud 2006. Mención. Categoría de Investigación Aplicada: Asimilación de un inmunoblott para la detección de bandas oligoclonales de IgG en LCR. Autor Principal

Concurso Central Premio Anual de Salud 2007.Mención en la Categoría de LIBRO NEUROINMUNOLOGIA BÁSICA. COLECTIVO DE AUTORES.

Concurso Premio Anual de Inmunología 2007. Mención LIBRO NEUROINMUNOLOGIA BÁSICA. COLECTIVO DE AUTORES

Mención Forum Provincial de Ciencia y Técnica 2008, LIBRO NEUROINMUNOLOGIA BÁSICA. COLECTIVO DE AUTORES

Premio Anual de Inmunología, 2009. 2do Premio. Libro "Neuroinmunología Clínica" Autor José A Dorta Contreras. Colaboradora.

Premio de la Academia de Ciencias de Cuba 2009 Y Premio Anual de Salud 2009. Identificación de nuevos eventos moleculares en la patogénesis y mecanismos de acción de terapias en enfermedades desmielinizantes Unidad Ejecutora Principal del Resultado. Centro de Ingeniería Genética y Biotecnología (CIGB).

Autor Principal: Giselle Pentón Rol

Otros Autores: Majel Cervantes Llanos, Gregorio Martínez Sánchez, Carmen Valenzuela Silva, Pedro Antonio López Saura, Ileana Lopategui Cabezas

Colaboradores científicos: Ruby Alonso Ramírez, Omar Ramírez Nuñez, Mayté Casanova Orta, José A Cabrera Gómez, Rosa Lara Rodríguez, Enrique Montero

Casimiro, Iraldo Bello Rivero, María de los Angeles Robinson Agramonte, Dunia Gómez Chávez.

#### Certificaciones de Resultados Científico-Técnicos introducidos

Inflamación y estrés oxidativo en la esclerosis múltiple. Relación al diagnóstico inmunológico del LCR. CIREN 2001

Asimilación del método de focalización isoelectrica en agarosa e inmunofijación para el diagnóstico inmunológico del LCR. CIREN 2004

#### Artículos no relacionados con el tema de candidatura

Citoquinas circulantes en enfermedad de Alzheimer. Robinson Agramonte M A, Ada de Luigi, Maria Grazia de-Simoni, T serrano, Eraida Hernandez. Rev Neurol 33 (3) 2001.

Differential reibergram patterns. A tool for the diagnostic exclusion of dementia. J Neuroimmunol 2001, 118: 114.

Robinson-Agramonte MA, Hernández-Díaz Eraida, Robinson-Agramonte JE, Macías-Betancourt R, Galvizo Análisis básico del LCR. Relación al diagnóstico patológico de las demencias. R. Rev Mex Neurosc 2003, 4(4):227-231.

L. Lorigados, L. Morales, N. Pavón, T. Serrano, MA Robinson, ME García Navarro, JE Bender. Alteraciones inmunológicas en pacientes epilépticos asociados a la localización del foco epileptogénico. Rev. Neurol. 39 (2): 101-104, 2004.

ME González, MA Robinson, T. Serrano. J J Llibre. Indicadores de estrés oxidativo e inmunológicos en pacientes con enfermedad de Alzheimer. Arch Neurocién (Mex) Vol. 9, No. 1: 3-10, 2004.

Lorigados Pedré, L; Morales Chacón, L; Pavón Fuentes, N; Serrano Sánchez, T; Robinson Agramonte, MA..Réplica: Alteraciones inmunológicas en pacientes epilépticos asociadas a la localización del foco epileptogénico. Rev Neurol 40(5):319-20, 2005.

Utilidad De la ecografía tímica en la Miastenia Gravis juvenil. Relato de casos. Leticia Christian, M A Robinson. Med Rehabil 2006, 25(1): 19-21.

M A Robinson. International Workshop on Neuroimmunology. *J Neuroimmunol* 203: 1-2, 2008.

Cabrera-Gómez J, Saiz-Hinarejos A, Graus F, González-Quevedo A, Rodríguez-Rojas R, Quevedo-Sotolongo L, Real-González Y, Grass-Fernández D, Cristófol-Corominas M, Rodríguez-Cordero M, Robinson-Agramonte M, Infante-Velázquez E, Cabrera-Núñez A, Ugarte-Sánchez C, Jordán-González J, González de la Nuez J, García-Lahera J, Tellez R, Baez-Martín M, Romero-García K. Brain magnetic resonance imaging findings in acute relapses of neuromyelitis optica spectrum disorders. *Mult Scler*. 2008 ; 14(2):248-51.

J A Cabrera-Gómez, L Ramón-Pérez, A Zaíz, P Llerena-Fernández, G Ercilla, D Grass-Fernández, Robinson-Agramonte MA, K Romero García et al. Neuromyelitis optica in sisters. *Mult Scler* 2009,15:269-71.

Giselle Pentón-Rol, Majel Cervantes-Llanos, Gregorio Martínez-Sánchez, José A Cabrera-Gómez, Carmen M Valenzuela-Silva, Omar Ramírez-Nuñez, Mayté Casanova-Orta, María A Robinson-Agramonte, Ileana Lopategui-Cabezas and Pedro A López-Saur. *J of Inflammation* 2009, 6:18.

L Lorigados, N Pavón, T Serrano, MA Robinson, Lilia Morales. *Inmunología y epilepsia*. Capítulo de " Libro Neuroinmunología Clínica " 2009.

Robinson-Agramonte MA, Gonçalves CA, Portela LV, Saiz- Hinarejos A, Oses JP, Motta LS, Muller AP, Marquez Gonzalez ME, Gomes de Souza DO. Differential regulation of IgG-NMO autoantibodies on S100B protein and disability in relapsing neuromyelitis optica. *Neuroimmunomodulation*, 2010,17:177-179.

## 10. ANEXOS

### ANEXO 1

#### CONSENTIMIENTO DE PARTICIPACION EN INVESTIGACION CLINICA

Yo: -----estoy de acuerdo en participar como paciente en la investigación clínica dirigida a estudiar la presencia de bandas oligoclonales y otros marcadores biológicos en líquido cefalorraquídeo y suero de pacientes con esclerosis múltiple.

Yo he sido informado de los objetivos de esta investigación y de lo que representaría para nosotros, que padecemos de esta enfermedad. Esta aprobación es totalmente voluntaria y no representa ningún compromiso, pues estoy en plena libertad de no aceptarla con garantía de recibir una atención médica adecuada.

Al firmar este documento autorizo mi inclusión en dicha investigación y para que así conste y por mi libre voluntad firmo la presente. Consentimiento, que doy en presencia del médico que me asiste y del cual he recibido todas las explicaciones, a los --- días del mes ---- del 200---.

-----  
Firma del enfermo

-----  
Firma del médico

-----  
Testigo

## ANEXO 2

### CONSENTIMIENTO DE PARTICIPACION EN INVESTIGACION CLINICA

Yo: -----estoy de acuerdo en participar como control en la investigación clínica dirigida a estudiar la presencia de bandas oligoclonales y otros marcadores biológicos en líquido cefalorraquídeo y suero de pacientes con esclerosis múltiple.

Yo he sido informado de los objetivos de esta investigación y de lo que representaría para las personas que padecen de esta enfermedad. Esta aprobación es totalmente voluntaria y no representa ningún compromiso, pues estoy en plena libertad de no aceptarla.

Al firmar este documento autorizo mi inclusión en dicha investigación y para que así conste y por mi libre voluntad firmo la presente. Consentimiento, que doy en presencia del médico que solicita mi colaboración y del cual he recibido todas las explicaciones, a los --- días del mes ---- del 200---.

-----  
Firma del enfermo

-----  
Firma del médico

-----  
Testigo



## ANEXO 3

### Aval de validación externa

Date: Mon, 30 Jun 2003 16:29:48 +0200

From: Hansotto Reiber <hreiber@med.uni-goettingen.de>

To: Maria Robinson-Agramonte <robin@linux.neubas.sld.cu> ,

Subject: IEF

Dear Maria!

Your results of the isoelectric focussing with oligoclonal IgG detection have been perfect regarding the interpretation. Lore found in case 3 as much bands as you have described, and also in case 5 she found 5-6 oligoclonal bands, one in the far alkaline range. So, may be your method could be a bit more sensitive or your electrophoretic range is not so far into the alkaline region. But the many bands in case 3 are in the normal pH range between 7 and 9.

ANEXO 4



CASOS NOTIFICADOS POR RUBÉOLA SEGÚN GRUPOS DE EDAD. CUBA 1970 - 2003

| AÑOS | <1 año |        | 1 - 4 años |       | 5 - 9 años |       | 10 - 14 años |       | 15 - 24 años |        | 25 - 64 años |       | 65 y más |       | TOTAL * |       |
|------|--------|--------|------------|-------|------------|-------|--------------|-------|--------------|--------|--------------|-------|----------|-------|---------|-------|
|      | Casos  | Tasas  | Casos      | Tasas | Casos      | Tasas | Casos        | Tasas | Casos        | Tasas  | Casos        | Tasas | Casos    | Tasas | Casos   | Tasas |
| 1970 | 109    | 52.3   | 189        | 18.8  | 115        | 9.9   | 105          | 23.2  | 203          | 10.1   | 199          | 5.9   | 3        | 0.6   | 1069    | 17.5  |
| 1971 | 103    | 50.6   | 149        | 15.2  | 65         | 5.6   | 36           | 4.1   | 48           | 3.2    | 34           | 1.0   | -        | -     | 436     | 5.0   |
| 1972 | 84     | 41.9   | 123        | 12.7  | 87         | 7.4   | 27           | 2.9   | 35           | 2.3    | 24           | 0.7   | 2        | 0.4   | 385     | 4.4   |
| 1973 | 733    | 371.9  | 2568       | 270.6 | 3472       | 294.9 | 4162         | 413.2 | 7938         | 521.4  | 5537         | 154.5 | 58       | 10.3  | 24648   | 273.8 |
| 1974 | 2316   | 1199.6 | 8847       | 951.9 | 8272       | 699.6 | 8568         | 795.0 | 19908        | 1296.3 | 21374        | 585.4 | 349      | 59.7  | 70172   | 766.5 |
| 1975 | 564    | 296.5  | 986        | 108.3 | 514        | 43.2  | 316          | 27.4  | 317          | 20.4   | 231          | 6.2   | 8        | 1.3   | 2951    | 31.6  |
| 1976 | 405    | 206.7  | 697        | 81.0  | 631        | 53.2  | 314          | 26.4  | 303          | 18.8   | 150          | 3.9   | 2        | 0.3   | 2511    | 26.5  |
| 1977 | 330    | 182.9  | 693        | 84.5  | 500        | 42.3  | 360          | 30.0  | 316          | 18.8   | 252          | 6.5   | 3        | 0.5   | 2460    | 25.6  |
| 1978 | 157    | 96.7   | 369        | 47.8  | 242        | 20.6  | 129          | 10.7  | 89           | 5.0    | 65           | 1.6   | 2        | 0.3   | 1054    | 10.8  |
| 1979 | 131    | 87.7   | 282        | 39.1  | 167        | 14.6  | 153          | 12.8  | 288          | 15.6   | 102          | 2.5   | 1        | 0.1   | 1127    | 11.5  |
| 1980 | 237    | 186.5  | 435        | 64.6  | 354        | 41.7  | 778          | 66.0  | 817          | 42.8   | 807          | 7.6   | 5        | 0.7   | 3035    | 31.0  |
| 1881 | 758    | 482.1  | 3530       | 578.6 | 6150       | 589.6 | 8001         | 684.2 | 10074        | 508.2  | 3974         | 97.5  | 72       | 10.0  | 32716   | 335.3 |
| 1982 | 286    | 177.7  | 747        | 127.1 | 1442       | 146.2 | 1175         | 101.0 | 834          | 40.4   | 514          | 12.5  | 9        | 1.2   | 5025    | 51.2  |
| 1983 | 380    | 229.3  | 1454       | 247.7 | 798        | 86.7  | 1439         | 125.1 | 582          | 27.2   | 414          | 9.9   | 4        | 0.5   | 4218    | 42.7  |
| 1984 | 431    | 251.3  | 954        | 158.0 | 1525       | 178.0 | 964          | 85.7  | 773          | 35.0   | 517          | 12.2  | 8        | 1.0   | 5174    | 52.0  |
| 1985 | 485    | 276.0  | 1346       | 207.8 | 2294       | 288.3 | 2796         | 260.2 | 1921         | 85.1   | 1407         | 32.7  | 11       | 1.4   | 10268   | 102.3 |
| 1986 | 912    | 502.5  | 2895       | 457.0 | 5431       | 826.2 | 4409         | 413.7 | 2836         | 117.8  | 2205         | 49.9  | 26       | 3.1   | 18725   | 183.7 |
| 1987 | 235    | 128.3  | 287        | 44.9  | 182        | 27.4  | 134          | 12.5  | 286          | 11.8   | 109          | 2.4   | 3        | 0.4   | 1237    | 12.0  |
| 1988 | 28     | 15.5   | 35         | 5.2   | 22         | 3.0   | 16           | 1.8   | 35           | 1.5    | 13           | 0.3   | 3        | 0.3   | 152     | 1.5   |
| 1989 | 13     | 7.1    | 8          | 1.2   | 15         | 2.0   | 8            | 1.0   | 102          | 4.4    | 42           | 0.9   | -        | -     | 188     | 1.8   |
| 1990 | 3      | 1.6    | 10         | 1.6   | 3          | 0.4   | 8            | 0.9   | 2            | 0.1    | 4            | 0.1   | -        | -     | 26      | 0.2   |
| 1991 | 5      | 2.7    | 6          | 0.8   | 3          | 0.4   | -            | -     | -            | -      | 3            | 0.1   | -        | -     | 17      | 0.2   |
| 1992 | 4      | 2.5    | 3          | 0.4   | 2          | 0.2   | -            | -     | 1            | 0.05   | -            | -     | -        | -     | 10      | 0.1   |
| 1993 | -      | -      | -          | -     | 1          | 0.1   | 1            | 0.1   | -            | -      | -            | -     | -        | -     | 2       | 0.02  |
| 1994 | 2      | 1.2    | 1          | 0.1   | -          | -     | -            | -     | -            | -      | 1            | 0.02  | -        | -     | 4       | 0.04  |
| 1995 | -      | -      | 2          | 0.3   | 1          | 0.1   | -            | -     | -            | -      | -            | -     | -        | -     | 3       | 0.03  |
| 1996 | -      | -      | -          | -     | -          | -     | -            | -     | -            | -      | -            | -     | -        | -     | -       | -     |
| 1997 | -      | -      | -          | -     | -          | -     | -            | -     | -            | -      | -            | -     | -        | -     | -       | -     |
| 1998 | -      | -      | -          | -     | -          | -     | -            | -     | -            | -      | -            | -     | -        | -     | -       | -     |
| 1999 | -      | -      | -          | -     | -          | -     | -            | -     | -            | -      | -            | -     | -        | -     | -       | -     |
| 2000 | -      | -      | -          | -     | -          | -     | -            | -     | -            | -      | -            | -     | -        | -     | -       | -     |
| 2001 | -      | -      | -          | -     | -          | -     | -            | -     | -            | -      | -            | -     | -        | -     | -       | -     |
| 2002 | -      | -      | -          | -     | -          | -     | -            | -     | -            | -      | -            | -     | -        | -     | -       | -     |
| 2003 | -      | -      | -          | -     | -          | -     | -            | -     | -            | -      | -            | -     | -        | -     | -       | -     |

Tasas por 100 000 habitantes  
\* Incluye casos sin clasificar por edad.