



VNIVERSITATIS VALÈNCIAE

Doctorado de Neurociencias

TESIS DOCTORAL

Implicación de la zona subventricular en la progresión de
discapacidad en esclerosis múltiple

Presentada por:

María del Carmen Alcalá Vicente
(Licenciada en Medicina y Cirugía)

Bajo la dirección del profesor:

Bonaventura Casanova Estruch

Valencia, Octubre de 2019



VNIVERSITATIS VALÈNCIA

Doctorado de Neurociencias

TESIS DOCTORAL

Implicación de la zona subventricular en la progresión de
discapacidad en esclerosis múltiple

Presentada por:

María del Carmen Alcalá Vicente
(Licenciada en Medicina y Cirugía)

Bajo la dirección del profesor:

Bonaventura Casanova Estruch

Valencia, Octubre de 2019

**A Luis, mi compañero de vida, por tu amor y apoyo incondicionales.
Sin ti caminando a mi lado nada sería posible.**

**A Lola, mi niña, por tu alegría y por regalarme en tus primeros meses de vida el
tiempo para poder poner fin a este proyecto.**

A mi madre, que me lo ha dado todo.

Al resto de familia y amigos, por apoyarme siempre en todo lo que hago.

“Creo que el cerebro es un sistema dinámico en el que algunas partes ejercen control y otras partes los suprimen. Y si tal vez uno tiene daños en una de las áreas que controlan o suprimen, entonces es posible la aparición de algo inesperado, puede tratarse de un ataque, un rasgo diferente o incluso una súbita pasión por la música.”

Oliver Sacks,
Neurólogo, psiquiatra y escritor británico.

Agradecimientos

A Bonaventura Casanova, director de esta tesis doctoral y responsable de la Unidad de Neuroinmunología Central del Hospital La Fe. Por ser mi mentor, el que me ha enseñado mucho de neurología y todo de neuroinmunología. Gracias por adentrarme en el mundo de la esclerosis múltiple y conseguir que también sea mi mundo. Nunca podré agradecerte lo suficiente todas las oportunidades que me has dado, me has hecho crecer profesional y personalmente.

A Gracián García, por todo tu trabajo y esfuerzo. Nuestro ingeniero, sin ti este proyecto no habría sido posible. Gracias por tu ayuda y dedicación. Gracias por tu paciencia para resolver todas mis dudas.

A Paco P. Miralles, mi gran compañero, por ser mi guía y por tantos consejos.

A Sara Carratalá, por tu gran ayuda con el proceso de imágenes, siempre con una sonrisa.

A Sara García, por tu sabiduría y acertadas correcciones.

A todos los compañeros de la Unidad, en especial a Mati, por hacer el día a día más fácil y divertido.

Y, por último, a los pacientes, en especial a los que han aceptado participar en este proyecto. Ellos son quienes prestan su tiempo y colaboran de forma desinteresada para que podamos crecer como médicos e investigadores. Ellos son los que nos dan lecciones para la vida cada día.

Índice de contenidos

Abreviaturas	13
1. Introducción	19
1.1. Definición de esclerosis múltiple, criterios diagnósticos y tratamiento.....	19
1.2. Historia natural de la esclerosis múltiple.....	23
1.3. Marcadores subrogados de progresión de la discapacidad en esclerosis múltiple.....	26
1.3.1. Marcadores de imagen.....	29
1.3.1.1. Atrofia cerebral en resonancia magnética.....	30
1.3.1.2. Atrofia medular en resonancia magnética.....	31
1.3.1.3. Otros marcadores de imagen.....	32
1.3.1.3.1. Afectación cortical y folículos linfoides.....	32
1.3.1.3.2. Depósito de hierro.....	32
1.3.1.3.3. Estudio por tomografía por emisión de positrones: estudio patológico “in vivo”.....	33
1.3.2. Marcadores biológicos.....	33
1.3.2.1. Bandas oligoclonales IgG e IgM.....	33
1.3.2.2. Neurofilamentos de cadena ligera.....	34
1.3.2.3. Chitinasa 3-like-1.....	35
1.3.3. Otros marcadores: tomografía por coherencia óptica.....	35
1.4. Técnicas de resonancia magnética para la medición de volumen lesional y volumen cerebral en esclerosis múltiple.....	36
1.4.1. Técnicas de segmentación.....	38
1.5. Estudios no convencionales de resonancia magnética.....	39
1.5.1. Difusión por resonancia magnética.....	40
1.5.2. Resonancia magnética funcional.....	42
1.6. Mecanismos de neuroreparación en enfermedades neurodegenerativas: la zona subventricular.....	45
1.6.1. La zona subventricular.....	46
1.6.2. Estudio de la zona subventricular en inflamación.....	48

1.6.3. Implicación de microglía en la zona subventricular y en la patogenia de la esclerosis múltiple.....	51
1.6.4. Estudio de la zona subventricular en la esclerosis múltiple.....	54
1.7. Estudio “in vivo” de la zona subventricular.....	58
1.8. Dianas terapéuticas futuras en esclerosis múltiple: terapias neuroprotectoras y de remielinización.....	59
2. Justificación del estudio.....	67
3. Hipótesis.....	71
4. Objetivos.....	75
5. Pacientes y métodos.....	79
5.1. Diseño del estudio.....	79
5.2. Criterios de selección de pacientes.....	79
5.3. Recogida de información.....	80
5.4. Metodología de imagen por resonancia magnética.....	80
5.4.1. Delimitación de la zona subventricular.....	81
5.4.2. Cálculo de coeficiente de difusión aparente y fracción de anisotropía de la zona subventricular.....	81
5.4.3. Cálculo de volumen de lesiones.....	82
5.4.4. Cálculo de volumen cerebral.....	82
5.4.5. Análisis de resonancia funcional.....	83
5.5. Análisis estadístico.....	84
6. Resultados.....	89
6.1. Características de la cohorte del estudio.....	89
6.2. Análisis de la zona subventricular.....	92
6.3. Análisis de volumetría de lesiones y parénquima cerebral.....	95
6.4. Análisis de la resonancia funcional.....	104

7. Discusión	115
7.1. Diferencias epidemiológicas y clínicas de los pacientes con EM.....	115
7.2. Diferencias estructurales por neuroimagen entre pacientes con EM y respecto a controles.....	116
7.3. Diferencias estructurales por RM de difusión de la ZSV en pacientes con EM y su relación con variables clínicas y de neuroimagen.....	117
7.4. Diferencias de funcionamiento neuronal mediante RM funcional en pacientes de EM.....	119
7.5. Posibles mecanismos patogénicos asociados a los cambios microestructurales en la ZSV.....	120
7.6. Aplicación clínica y consecuencias de la afectación de la ZSV en pacientes de EM.....	124
7.7. Aplicación clínica del estudio de ZSV en EM y perspectivas de terapia en el futuro.....	126
8. Conclusiones	133
9. Limitaciones del trabajo	137
10. Líneas futuras de investigación	141
Referencias bibliográficas	143
Anexos	163

Abreviaturas (por orden alfabético)

A: activa

ADC: coeficiente de difusión aparente (apparent diffusion coefficient)

BET: herramienta de extracción cerebral (brain extraction tool)

BHE: barrera hematoencefálica

BOC: bandas oligoclonales

CA: crónica activa

CS: crónica silenciosa

Cx: córtex

BrdU: bromodesoxiuridina

Cd: caudado

CDA: coeficiente de difusión aparente

CHI3L1: chitinasa 3-like-1

D: derecho/a

DE: desviación estándar

DIS: diseminación en espacio

DIT: diseminación en tiempo

DM: difusibilidad media

DTI: tensor de difusión (diffusion tensor imaging)

Dx: diagnóstico

EAE: encefalitis aguda experimental

EDSS: Escala expandida de discapacidad (Expanded Disability Status Scale)

EM: esclerosis múltiple

EMAD: encefalomiелitis aguda diseminada

EMP: esclerosis múltiple progresiva

EMPP: esclerosis múltiple primaria progresiva

EMRR: esclerosis múltiple remitente recurrente

EMSP: esclerosis múltiple secundaria progresiva

Ep: epéndimo

FA: fracción de anisotropía

FDT: FMRIB Diffusion Toolbox

FPC: fracción de parénquima cerebral

FSL: FMRIB software library
GFAP: glicoproteina fibrilar ácida
H: hombre
I: izquierdo/a
IFN: interferón
Ig: inmunoglobulina
LCR: liquido cefalorraquídeo
LB: linfocito B
LT: linfocito T
LV: ventrículo lateral (lateral ventricle)
M: mujer
MIPAV: Medical Image Processing Analysis and Visualitation
NF-1: neurofilamentos de cadena ligera
NMO: neuromielitis óptica
OB: bulbo olfatorio (olfactory bulb)
OCT: tomografía por coherencia óptica
PCNA: célula proliferante (proliferating cell nuclear antigen)
PET: tomografía por emision de positrones
PIRA: progresión independiente de brotes (progression independent of relapses activity)
PP: primaria progresiva
PSA-NCAM: forma polisacárida de la molécula de adhesión de célula neuronal
PSC: porcentaje de señal de cambio (percent signal change)
PSS: esclerosis solitaria progresiva (Progressive Solitary Sclerosis)
RAP: progresión asociada a brotes (relapses associated progression)
RIQ: rango intercuartílico
RM: resonancia magnética
RM BOLD: resonancia magnética nivel dependiente de oxigenación de sangre (blood oxygenation level dependent)
ROI: region de interés (region of interest)
RR: remitente recurrente
SAMS: EM con brote único (Single Attack Multiple Sclerosis)
SAP: EM progresiva con brote único (Single Attack Progressive)
SB: sustancia blanca

SBAP: sustancia blanca aparentemente normal
SCA: síndrome clínico aislado
SD: desviación estándar (standard deviation)
SG: sustancia gris
SI: sistema inmune
SN: sistema nervioso
SNC: sistema nervioso central
SP: placa en sombra (del inglés “shadow” plaque)
SP: secundaria progresiva
SPM: statistical parametric mapping
St: estriado
TME: tratamientos modificadores de la enfermedad
VCN: volumen cerebral normalizado
ZSV: zona subventricular

1. INTRODUCCIÓN

1.1 Definición de esclerosis múltiple, criterios diagnósticos y tratamiento.

La esclerosis múltiple (EM) es una enfermedad de origen desconocido en la que probablemente estén involucrados tanto factores genéticos [1], provocando una susceptibilidad individual, como factores ambientales [2, 3]. En la EM coexisten mecanismos patogénicos derivados de procesos inflamatorios, degenerativos y fallos de la reparación del sistema nervioso central (SNC) [4–7]. Se inicia fundamentalmente en el adulto joven, entre los 25 y 35 años de edad, suponiendo la primera causa de discapacidad en este grupo de edad tras los accidentes de tráfico [8]. Existe un predominio de afectación en el sexo femenino, con ratio hombre/mujer de 2:1 [4]. La prevalencia de la EM es diferente según el área geográfica, siendo mayor en el norte de Europa, el sur de Australia y Norteamérica [9]. En la última década se ha registrado un aumento en la incidencia y prevalencia de la EM. La prevalencia en Europa oscila entre 10 y 188 casos por cada 100.000 habitantes, con una incidencia anual media de 4 casos por cada 100.000 habitantes, lo que supone que es la enfermedad neurológica autoinmune crónica más frecuentes en países desarrollados [4, 8–10]. La supervivencia de los pacientes con EM ha aumentado tras la aparición de los tratamientos modificadores de la enfermedad (TME) [11].

La patogenia de la EM está mediada por el sistema inmune (SI), quedando demostrado por:

- Existencia de células inflamatorias en las lesiones de EM [12].
- Susceptibilidad de la enfermedad ligada a genes relevantes de la respuesta inmune [13].
- Producción de enfermedades inflamatorias y desmielinizantes del SNC tras la inyección de antígenos o linfocitos T en animales susceptibles [14].
- Modificación del curso de la enfermedad por el tratamiento inmunomodulador/inmunosupresor [15].

En la EM existe una respuesta reguladora defectuosa y, mediante mecanismos a día de hoy desconocidos, los linfocitos Th17 autorreactivos activados en la periferia pueden penetrar en el SNC y, una vez allí, aumentar la permeabilidad de la barrera hematoencefálica (BHE) mediante la secreción de las interleucinas (IL-17 e IL-22), desencadenando una respuesta inflamatoria en la que linfocitos Th1, linfocitos T

citotóxicos, linfocitos B y células plasmáticas pueden entrar en el SNC y dar lugar a los infiltrados perivenulares característicos de la enfermedad. La activación de la respuesta Th2, con linfocitos T CD4+, promueve una producción de interleucinas (IL-2, IFN-gamma y TNF-alpha) responsables de la activación de macrófagos y fagocitación de la mielina. La respuesta CD8+ citotóxica es responsable del daño directo sobre el oligodendrocito [14, 16, 17].

La respuesta humoral mediada por el linfocito B también tiene un papel fundamental en la patogenia de la EM, con producción de inmunoglobulina G (IgG) capaz de fijar complemento y contribución a activar a los linfocitos T [18, 19].

La EM se caracteriza por tener dos periodos clínicos claramente definidos: un primer estadio dominado por la presencia de episodios agudos de disfunción neurológica con recuperación más o menos completa; y un segundo estadio caracterizado por la progresión constante de la discapacidad neurológica sin signos evidentes de inflamación aguda.

En el primer estadio de la enfermedad, el SI adaptativo (linfocito T y B) juega un papel importante; en la fase tardía, la progresiva, parece que la respuesta queda confinada en el SNC y que las células del SI innato (microglía) cobran una mayor relevancia [20, 21].

Las lesiones en EM pueden ser detectadas mediante resonancia magnética (RM) convencional [22], se caracterizan por desmielinización, inflamación, daño y pérdida axonal y gliosis reactiva, con una gran heterogeneidad, tanto entre diferentes individuos, como en un mismo individuo en función del estadio de la enfermedad [12, 23, 24].

No existe ningún marcador diagnóstico de certeza para el diagnóstico de EM, por lo que el diagnóstico definitivo sólo se podría hacer mediante los hallazgos patológicos que definen la enfermedad. En la práctica clínica diaria el diagnóstico de EM se basa en la combinación de los síntomas y signos clínicos característicos, junto a las lesiones típicas de RM y la presencia bandas oligoclonales (BOC) tipo IgG, expresión de la síntesis intratecal de IgG restringida al SNC, en el líquido cefalorraquídeo (LCR) [25, 26]. Estos criterios se basan en documentar la diseminación en espacio (DIS) y en tiempo (DIT) de las lesiones debidas a un proceso inflamatorio restringido al SNC y

nos permiten diagnosticar la EM ante el primer brote clínico típico, mejorando cada vez más la sensibilidad y especificidad [26, 27].

Para demostrar la DIS por RM se utilizan los criterios propuestos por Swanton y cols. en 2006, con presencia de al menos una lesión en dos de las siguientes localizaciones características: periventricular, yuxtacortical, infratentorial y/o médula espinal [28, 29].

Para demostrar la DIT por RM, se utilizan los criterios propuestos por Montalban y cols en 2010, con aparición de al menos una nueva lesión en secuencias ponderadas en T2 y/o una lesión con realce de gadolinio en una RM de seguimiento respecto a la RM basal, independientemente de cuando se realice; o, también sería suficiente para la DIT la coexistencia simultánea en una RM de lesiones que realcen gadolinio con lesiones que no lo hagan, asumiendo el diferente estadio evolutivo y por tanto la aparición en diferentes tiempos [30]. La última actualización de los criterios diagnósticos corresponde a McDonald 2017, en las que las novedades aportadas se resumen en: las lesiones sintomáticas (de localización en tronco cerebral y médula espinal) tienen valor para contribuir a la DIS y la presencia de BOC en LCR implica cumplir el criterio de DIT, sin necesidad de objetivar la presencia simultánea de lesiones en distinto estadio radiológico, esperar a la aparición de una nueva lesión en una RM diferida o a un nuevo brote clínico [26].

Para el diagnóstico de EM primaria progresiva (EMPP) siempre ha tenido relevancia el estudio de LCR. A nivel clínico se exige la presencia de afectación sugerente de enfermedad desmielinizante progresiva durante al menos un año, ya sea documentado de forma retrospectiva o prospectiva, más 2 de los siguientes criterios: 1) evidencia de DIS a nivel cerebral, con al menos una lesión en localización característica (periventricular, yuxtacortical o infratentorial), 2) evidencia de DIS a nivel medular, con presencia de 2 lesiones en secuencia T2 localizadas en médula espinal, y 3) documentación de síntesis intratecal en LCR, con presencia de índice IgG elevado o al menos 2 BOC [26].

Actualmente disponemos de fármacos, TME, que, al menos a corto plazo, pueden modificar la historia natural de la enfermedad [31–41]. En la primera fase de la enfermedad conocida como EM remitente recurrente (EMRR) predomina el proceso inflamatorio focal, en forma de brotes clínicos o lesiones activas en la RM. Sabemos

que existe un fenómeno de degeneración axonal también desde el inicio, que se hará más evidente conforme evolucione la enfermedad. La discapacidad de los pacientes depende tanto de los brotes clínicos, con las secuelas que pueden derivar de ellos [42], como de la discapacidad acumulada secundaria al proceso de neurodegeneración progresivo, lo que ha dado lugar a la definición de dos conceptos: PIRA, de sus siglas en inglés -*progression independent of relapses activity*- y RAP -*relapses associated progression*- [43–46].

Las TME aprobadas actualmente para el tratamiento de la enfermedad van dirigidas contra la actividad inflamatoria y los mecanismos patogénicos subyacentes a la misma (presentación antigénica, producción/activación de célula T y/o B, regulación de subpoblaciones de linfocitos T colaboradores, migración a través de la BHE...). Por tanto, las TME son altamente eficaces en las formas de EMRR y algunas formas progresivas de la enfermedad que presentan brotes o lesiones activas en RM, consiguiendo en estos casos gran control de la actividad inflamatoria. Es un objetivo fundamental administrarlos de forma precoz, ya que se ha demostrado que con ello podemos modificar el pronóstico a corto y medio plazo de la enfermedad [47, 48].

Estos fármacos tienen escaso papel sobre los mecanismos patogénicos subyacentes a la neurodegeneración o remielinización en la EM, por lo que no han demostrado influir de forma significativa en el acúmulo progresivo de discapacidad que ocurre en los pacientes de forma independiente de los brotes o las lesiones activas en la RM [49]. Por ello, actualmente no existe ningún tratamiento aprobado para las formas progresivas de la enfermedad sin actividad.

Una vez que con las TME actuales podemos controlar la actividad inflamatoria de la mayor parte de los pacientes con EM, es prioritaria la búsqueda de nuevos fármacos o herramientas terapéuticas que puedan tener un mecanismo más neuroprotector, que puedan prevenir o influir sobre los mecanismos subyacentes a la degeneración axonal o ayudar a estimular los mecanismos de remielinización.

1.2 Historia natural de la esclerosis múltiple.

En la mayoría de los pacientes, en torno al 85%, la enfermedad se diagnostica con la forma clínica llamada EMRR, donde predomina la inflamación focal. Esta inflamación se expresa a nivel clínico en forma de brotes, que quedan definidos como aparición o empeoramiento de síntomas neurológicos compatibles con afectación de SNC (por ejemplo mielitis, neuritis óptica o afectación de tronco cerebral, cerebelo o hemisférica), ya sea de forma uni o multifocal, manteniéndose los síntomas más allá de 24 horas y con resolución o mejoría posterior [50, 51]. La inflamación a nivel radiológico la podemos objetivar con aparición de lesiones de carácter desmielinizante en RM convencional en secuencia T2 o lesiones que realzan contraste en secuencia de RM T1. La evolución clínica/radiológica en esta primera fase EMRR es muy heterogénea e impredecible. Puede ser evidente la aparición de un único brote o pueden ocurrir múltiples, afectando de forma repetida a diferentes zonas del SNC. La intensidad de los mismos también es muy variable, ya que pueden ser leves y que se resuelvan los síntomas de forma espontánea y por completo, o pueden ser más intensos y dejar secuelas más o menos incapacitantes e irreversibles.

Cuando los pacientes alcanzan la edad aproximada de 40-45 años, lo que normalmente supone unos 10-20 años de evolución de la enfermedad, se pone de manifiesto de forma insidiosa el paso a la forma clínica conocida como esclerosis múltiple secundaria progresiva (EMSP), en la que se hace evidente el acúmulo progresivo de discapacidad de forma independiente de los brotes o de la aparición de nuevas lesiones inflamatorias en la RM. La evolución de los pacientes en esta segunda fase se hace más homogénea [45, 47, 52].

Existe una minoría, en torno al 10 % de los pacientes, en los que la enfermedad se pone de manifiesto de forma más tardía, en torno a los 40-45 años de edad, y se hace evidente desde el punto de vista clínico con una discapacidad lentamente progresiva desde el inicio, en ausencia de brotes previos. Esta forma clínica es conocida como EMPP y la evolución clínica podría ser superponible a los pacientes con EMSP [52]. Cuando en la forma progresiva de EM se superponen brotes clínicos, se conoce EM progresiva recurrente (EMPR) y esto puede ocurrir hasta en el 40% de los casos de los pacientes que iniciaron una EMPP [52].

Recientemente se ha modificado la caracterización de fenotipos clínicos [52]. Además de la EMRR, se reconoce la enfermedad desde el primer brote, lo que es conocido

como síndrome clínico aislado (SCA). Ambas formas clínicas pueden ser activas o no activas, entendiendo como actividad la presencia de brotes clínicos o inflamación por RM. Por lo tanto, un SCA activo ya directamente se convierte en EMRR (figura 1). Una propuesta más reciente considera que los pacientes con un único brote y criterios de DIS y DIT, deberían ser llamados como EM con brote único (más conocido como SAMS, de sus siglas en inglés, Single Attack Multiple Sclerosis) [53], debiéndose abandonar el término SCA, para evitar el sobre-diagnóstico que ha ocurrido en los últimos 10 años. En cuanto a las formas progresivas, la EMSP, EMPP y EMPR, quedan unificadas a EM progresiva (EMP), y se clasifican según si existe actividad (brotes o inflamación en RM) y/o progresión (empeoramiento progresivo objetivo de la discapacidad independiente de brotes). En el grupo de EMP también debemos incluir a los pacientes que presentan una forma progresiva de la enfermedad tras haber presentado un único brote previamente (SAP, de sus siglas en inglés Single Attack Progressive) y a los pacientes con una única lesión visible en RM, normalmente a nivel medular, que posteriormente también presentan un curso progresivo (PSS, del inglés Progressive Solitary Sclerosis), ambos indistinguibles del curso progresivo de la EMSP y EMPP [53–57].

Existen diversos estudios neuropatológicos y clínicos que han tratado de aclarar la naturaleza de la relación entre inflamación y degeneración, así como la influencia de la inflamación previa (brotes e inflamación en RM) sobre la degeneración posterior (progresión de discapacidad) [44, 45, 47, 58–64].

Clásicamente se había considerado que el daño axonal y la degeneración producida en la EM eran principalmente consecuencia de la inflamación y la desmielinización, considerándose una enfermedad puramente inflamatoria producida por daño inicial de la mielina. Varios estudios epidemiológicos y de historia natural de la enfermedad ponen de manifiesto las limitaciones de esta visión clásica, planteando el dilema de si la EM es una enfermedad inflamatoria o si realmente se trata de una enfermedad neurodegenerativa desde el inicio. En diversos estudios más recientes se ha demostrado que la afectación patológica axonal, que es la que fundamentalmente determina la discapacidad a largo plazo de los pacientes, está presente desde el inicio de la enfermedad [43, 53] (figura 2).

Confavreux y cols describieron factores pronósticos que condicionaban la evolución clínica de los pacientes en los primeros años de la enfermedad; como la edad, el sexo, los síntomas iniciales, el grado de recuperación tras el primer brote, el tiempo

transcurrido entre los brotes o el número total de brotes [44, 58]. Estos mismos autores enfatizaron que estos factores pronósticos no modificaban la evolución posterior de los pacientes, es decir, la evolución en la fase progresiva de la enfermedad era similar en todos ellos, independientemente de la evolución inicial que hubieran tenido, lo que se conoce como el “fenómeno amnésico” de la enfermedad [58].

Para explicar dicho fenómeno se postula que el SNC tiene una “reserva funcional” capaz de compensar al inicio los déficits que se van produciendo consecuencia del acúmulo de lesiones múltiples y difusas de la enfermedad, pero llega un momento en el que el SNC claudica y no puede seguir compensando dichos déficits, momento en el que comienza la progresión irreversible de la discapacidad. Esta teoría se basa en estudios de RM funcional, que demuestran como el cerebro cada vez precisa reclutar más áreas de actividad para ejercer una misma función, hasta que llega un punto en que ya no se pueden reclutar más y, consecuentemente, los déficits no pueden ser compensados [65, 66].

Los estudios clásicos de historia natural de la enfermedad centrados en la forma progresiva remarcan que la evolución de los pacientes con forma SAP, EMSP y EMPP es superponible, concluyendo que la fase progresiva de la enfermedad es un proceso neurodegenerativo común independiente de la inflamación clínica objetivada al inicio de la enfermedad y que se trata de un proceso degenerativo dependiente de la edad [67]. Los trabajos de historia natural de la EM que estudian el inicio y evolución de la forma progresiva de la enfermedad confirman que este proceso se hace evidente a nivel clínico en la mayoría de los pacientes al llegar a una determinada edad crítica, que coincide aproximadamente entre los 40-45 años [68, 69] No obstante, trabajos como el de Koch y cols, advierten que los pacientes que comienzan con los primeros síntomas a una edad más temprana, también alcanzarán una discapacidad establecida a una edad más precoz, dejando intuir que es el tiempo de evolución de la enfermedad más que la edad, el que determinará la claudicación del SN [70]. Existen otros muchos estudios que remarcan la independencia entre la inflamación y la degeneración de la enfermedad, concluyendo que durante los años iniciales de la enfermedad la discapacidad puede ser dependiente de la inflamación (discapacidad dependiente de brotes), pero, a partir de los 10 años de evolución de la enfermedad, la inflamación inicial tiene una influencia mínima en la discapacidad final (discapacidad independiente de brotes) [45, 46].

Para medir la discapacidad en EM en la práctica clínica y en investigación se usa la escala EDSS (Expanded Disability Status Scale) [71]. Esta escala ordena la discapacidad desde 0 (ningún síntoma o signo de la enfermedad) a 10 (muerte por la enfermedad). Existen puntos clave como el 3-4 (alguna discapacidad para caminar, ya no es capaz de correr), el 6 (necesidad de un apoyo para caminar) y el 7 (dependencia de silla de ruedas). A pesar de la independencia entre la fase inflamatoria y degenerativa de la enfermedad que se desprende de los estudios de historia natural, existen estudios que ponen de manifiesto que el tiempo a alcanzar una discapacidad crítica de EDSS=3 determina la velocidad para alcanzar la discapacidad de 6, 8 o 10 [47]. Dado que en la discapacidad inicial sí puede tener influencia la inflamación (al menos la discapacidad dependiente de brote), estos datos tienen implicaciones terapéuticas, ya que de ellos deriva el objetivo terapéutico de intentar alargar lo máximo posible el tiempo en el que los pacientes alcancen esta discapacidad crítica con los fármacos actuales, muy eficaces en controlar la inflamación. En la actualidad no disponemos de tratamientos eficaces aprobados para controlar o cambiar la evolución de la fase progresiva de la enfermedad en ausencia de actividad, responsable de la mayor parte de la discapacidad de los pacientes, lo cual hace imprescindible la investigación centrada en nuevas dianas terapéuticas.

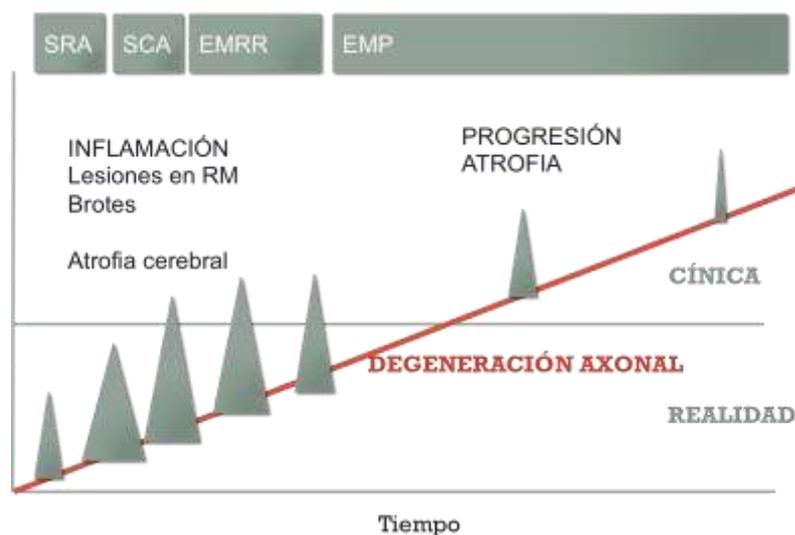
1.3 Marcadores subrogados de progresión de la discapacidad en esclerosis múltiple.

Sí bien los mecanismos patogénicos exactos de la EM son desconocidos, cada vez existe más evidencia de que los procesos tanto inflamatorios como neurodegenerativos responsables de la enfermedad coexisten desde el inicio. La transición a la forma progresiva se caracteriza por reducción de la actividad inflamatoria evidente en forma de brotes o lesiones nuevas en RM, reducción de la densidad de linfocitos T y extensión de gliosis en el SNC [72, 73]. El estrés oxidativo, la disfunción mitocondrial y el fallo en la remielinización son hechos que también caracterizan a esta etapa tardía de la enfermedad. Conforme evoluciona la enfermedad la inflamación se hace menos evidente y tiene unas características diferentes, como el predominio de la inmunidad primaria innata y la activación de la microglía, que será finalmente tóxica para las neuronas y oligodendroitos [74], además de producir reclutamiento de linfocitos y macrófagos en SNC, disrupción de BHE, perpetuar el daño por estrés oxidativo y

disfunción mitocondrial, y por tanto, reducir la neuroplasticidad e interferir en la remielinización eficaz [75].

En los pacientes en los que con el paso del tiempo se pone de manifiesto de forma evidente a nivel clínico la forma progresiva de la enfermedad, es probable que ésta estuviera presente desde el inicio, aunque no hayamos sido capaces de detectarlo con los métodos diagnósticos de los que disponemos en la actualidad. Existe una tendencia creciente en la investigación del desarrollo de biomarcadores que nos permitan detectar desde el inicio, ante el primer brote clínico, qué pacientes son los que presentan una forma progresiva de la enfermedad, que se pondrá de manifiesto con el paso de los años, en forma de acúmulo progresivo e irreversible de discapacidad, cuando ya hayan fracasado los mecanismos de compensación del SNC y el proceso neurodegenerativo sea clínica y radiológicamente manifiesto [43, 53]. A continuación se detallarán los principales marcadores usados en la actualidad, tanto de imagen como biológicos, que pueden ser de utilidad como marcadores subrogados de discapacidad en EM.

Figura 1. Fenotipos clínicos principales de esclerosis múltiple y su evolución a lo largo del tiempo. En estadios iniciales predomina el proceso inflamatorio focal expresado en forma de brotes y lesiones visibles en RM convencional. Conforme evoluciona la enfermedad se pone de manifiesto el proceso neurodegenerativo difuso expresado en forma de atrofia y progresión de discapacidad, aunque, en menor medida y sin que sea evidente clínicamente, este fenómeno está presente desde el inicio.



SRA: síndrome radiológico aislado, SCA: síndrome clínico aislado, EMRR: esclerosis múltiple remitente recurrente; EMP: esclerosis múltiple progresiva.

Figura 2. Mecanismos fisiopatológicos que ocurren en la esclerosis múltiple. Concurrencia de proceso inflamatorio y neurodegenerativo que finalmente desencadenarán la amplificación del proceso neurodegenerativo y el fallo en los mecanismos de reparación del SNC.

Inflamación			Amplificación de degeneración		
Inflamación	Activación microglía	Hipoxia	Acumulación del daño	Depósito de hierro	Enfermedad "quemada"
(LT y LB) - Cel. T citotóxicas - Anticuerpos - Macrófagos	- Daño oxidativo - Disfunción mitocondrial - Fallo energético	- Desequilibrio iónico - Fallo energético - Desmielinización - Daño axonal - Acúmulo de lesiones	- Degeneración anterógrada y retrógrada - Amplificación de activación de microglía	- Acúmulo de hierro en mielina, oligodendrocitos y lesiones - Amplificación de daño oxidativo	- Progresión de degeneración con la edad - Fallo de reserva funcional

LT: linfocito T, LB: linfocito

1.3.1 Marcadores de imagen.

La RM es la técnica más sensible para la identificación de las lesiones de EM, por lo que se ha convertido en una herramienta esencial para el diagnóstico precoz de la enfermedad. También nos ha permitido comprender mejor la historia natural de la EM, es de gran utilidad como marcador pronóstico tanto en la fase inicial de la enfermedad como a largo plazo y, además, nos permite evaluar la eficacia de los tratamientos modificadores de la enfermedad utilizados [76].

En la práctica clínica están bien establecidos algunos marcadores de RM, fundamentalmente el número de lesiones de perfil desmielinizante y su localización. En general, el acúmulo progresivo de lesiones en RM tiene una influencia negativa en la evolución de los pacientes con EM, pero nos da una información muy limitada de la enfermedad y la correlación del volumen lesional con la discapacidad a largo plazo de los pacientes es solo moderada [77–79].

Por tanto, en este sentido existe una disociación clínico-radiológica y esto puede deberse parcialmente a que la hiperintensidad de las lesiones observadas en la RM convencional es inespecífica y no refleja un sustrato patogénico concreto, si no que puede ser combinación de diferentes procesos como edema, desmielinización, inflamación, lesión axonal, remielinización o gliosis [77]. Por otro lado, hemos de tener en cuenta que, aunque las lesiones puedan ser reflejo de la destrucción irreversible del parénquima cerebral, estos cambios pueden ser compensados por los mencionados mecanismos de reparación y no traducirse de forma directa en acúmulo de discapacidad, al menos inicialmente. Además, la discapacidad de los pacientes puede ser también secundaria a alteración del tejido aparentemente normal mediante las técnicas convencionales de RM, por lo que necesitaremos completar dicha información con otras técnicas de imagen no convencionales [80].

Por otro lado, especificar que la localización de las distintas lesiones en las diferentes áreas del SNC es un marcador útil de discapacidad a largo plazo. Ha sido confirmado en distintos estudios que las lesiones localizadas tanto a nivel infratentorial como a nivel medular suponen un marcador de especial mal pronóstico y se relacionan con mayor discapacidad a largo plazo [81–83].

Por tanto, la información aportada por los marcadores que reflejan el proceso

inflamatorio de la enfermedad es limitada de cara a predecir la progresión de discapacidad de los pacientes a largo plazo. Por ello, el esfuerzo en investigación está cada vez más orientado a detectar otros biomarcadores que representen con más exactitud el proceso neurodegenerativo de la enfermedad y por tanto predigan con más fiabilidad el riesgo de progresión de discapacidad de los pacientes con EM a largo plazo.

1.3.1.1 Atrofia cerebral en resonancia magnética.

Se ha demostrado que en la EM se produce una tasa de pérdida de tejido cerebral en torno al 0,5-1% anual, que es claramente superior a la población sana, y que ésta está presente de forma muy precoz, desde el inicio de la enfermedad [84–86].

En los pacientes con EM tiene lugar una atrofia cerebral global, en sustancia blanca (SB) y también en sustancia gris (SG) y este fenómeno acontece a todos los fenotipos clínicos de la enfermedad. El volumen de SB puede verse influido o artefactado en función del nivel de lesiones o inflamación de tipo desmielinizante, sin embargo, el volumen de SG se ve menos alterado en este sentido, por lo que resulta un marcador más fiable en relación con la neurodegeneración [87, 88].

La atrofia cerebral está presente en un subgrupo de pacientes desde el primer brote de la enfermedad y, en especial, la pérdida de volumen de SG se asocia con un mayor riesgo de presentar un segundo brote y conversión a EM [84, 89, 90]. Este hallazgo cambia el concepto que la pérdida de volumen cerebral es un fenómeno tardío, consecuencia del daño axonal progresivo que ocurre a lo largo de la evolución de la enfermedad, sino que es un fenómeno precoz, que puede estar presente en los pacientes desde el inicio de la enfermedad.

La presencia tanto de atrofia cerebral global como la selectiva de SG al inicio de la enfermedad se han asociado a un mayor riesgo de progresión de discapacidad medida mediante la escala EDSS, durante el primer año tras el primer brote [91, 92], así como a medio y largo plazo, a los 5, 15 y 20 años tras el diagnóstico [79, 84, 93–95].

Incluso antes de que la discapacidad física sea evidente, los pacientes que tienen mayor pérdida de volumen cerebral asocian alteración cognitiva precoz objetivada mediante test neuropsicológicos [96]. También se ha relacionado la atrofia específica y prominente del tálamo en pacientes con EM y alteración cognitiva, así como la

afectación difusa de los ganglios de la base y progresión de discapacidad explicado en parte por la degeneración anterógrada y retrógrada debido a la lesión de los tractos conectores [97].

Desde el punto de vista clínico, la medición de atrofia cerebral global y regional, en especial la de SG, tiene gran valor como marcador subrogado de la discapacidad de los pacientes con EM desde el diagnóstico, ya que la pérdida de volumen cerebral en el primer año nos permitirá predecir cual será la evolución de la discapacidad de los pacientes medida por EDSS a largo plazo, en los próximos 10 años [98].

Actualmente disponemos de tecnología fiable y reproducible para la medición de volumen cerebral global y regional, como se detalla en otro apartado de esta tesis doctoral, por lo que cada vez se está instaurando más este marcador de discapacidad en la práctica clínica habitual.

1.3.1.2 Atrofia medular en resonancia magnética.

Tradicionalmente los estudios de atrofia siempre se han focalizado a nivel cerebral, pero es bien conocido que la afectación de la médula espinal, sobre todo la región cervical, está en íntima relación con la discapacidad a largo plazo de los pacientes con EM, incluso de forma más consistente que la afectación a nivel cerebral [99]. La atrofia medular también puede estar presente en todos los subtipos clínicos de EM y es mucho más evidente en la forma progresiva de la enfermedad [100]. Al igual que la atrofia cerebral, puede ser un marcador útil de gravedad de la enfermedad y de riesgo de discapacidad a largo plazo. La tasa de atrofia medular en la enfermedad es mayor que la ocurrida a nivel cerebral, en torno a 1.78%/anual, superando el 2% anual en las formas progresivas [100]. En cuanto a su medición también existen métodos semiautomáticos y automáticos fiables y reproducibles, aunque en los trabajos publicados existe mucha más variabilidad y heterogeneidad respecto a la atrofia cerebral. Aunque su utilidad en la práctica habitual está siendo evaluada en la actualidad, podemos considerar que en el futuro próximo será un marcador de discapacidad y podrá utilizarse como marcador subrogado de tratamientos con acción neuroprotectora o de reparación de SN en EM.

1.3.1.3. Otros marcadores de imagen:

1.3.1.3.1 Afectación cortical y folículos linfoides.

A nivel cortical podemos distinguir diferentes tipos de placas: las tipo 1, con localización subcortical, las tipo 2 y 4, con afectación exclusiva intracortical y las tipo 3, con afectación subpial (las más frecuentes), en íntima relación con agregados linfocitarios a nivel meníngeo, conocidos como folículos linfoides [101]. Esta afectación cortical es característica de las formas progresivas de la enfermedad [102]. La existencia de nuevas formaciones estructuradas de agregados linfoides a nivel cortical cronifican la respuesta inmune y, por tanto, parte de la degeneración cortical puede ser independiente de la desmielinización y ocurrir de forma más difusa [103, 104]. Los agregados linfoides se relacionan con deterioro cognitivo, atrofia cerebral, degeneración axonal y acúmulo de discapacidad [105]. Estas estructuras pueden ser detectadas en los pacientes mediante secuencias especiales en la RM convencional y constituir así un marcador más de riesgo de discapacidad a largo plazo [105].

1.3.1.3.2 Depósitos de hierro

Existe en la actualidad un interés creciente sobre el rol que puede tener el acúmulo de hierro a nivel cerebral, tanto en SB como en SG, en la neurodegeneración en EM. A nivel de SNC el hierro se acumula fundamentalmente en SG profunda, en ganglios de la base. Es conocido que el acúmulo de hierro a este nivel es superior en pacientes con EM que en pacientes sanos, y ello puede contribuir a la neurodegeneración difusa que tiene lugar en la enfermedad [59, 106]. El depósito de hierro en SN se ha observado en todos los estadios de la enfermedad, aparece de forma precoz y se ha relacionado con neurodegeneración y discapacidad progresiva. Actualmente disponemos de tecnología mediante RM que nos permite obtener una cuantificación del acúmulo de hierro, tanto a nivel global, como en distintas regiones de interés como ganglios de la base o tálamo. Por tanto, la cuantificación del acúmulo progresivo de hierro in vivo mediante RM puede actuar como un marcador del proceso neurodegenerativo y de la futura discapacidad de los pacientes con EM [107].

1.3.1.3.3 Tomografía por emisión de positrones cerebral: estudio patológico “in vivo”.

Ante las limitaciones que surgen de la RM convencional, en la actualidad han surgido otras técnicas de imagen por RM no convencionales (como las ya mencionadas, o estudios de difusión y RM funcional que se detallan en otro capítulo de la presente tesis doctoral) u otras técnicas de imagen distintas como la tomografía por emisión de positrones (PET), que nos permiten caracterizar con mayor exactitud el sustrato patogénico subyacente al daño observado en el SNC.

Aunque todavía bajo proyectos de investigación no instaurados en la práctica clínica habitual, disponemos de distintos trazadores para PET que pueden actuar como marcador de microglía u otras dianas específicas de procesos inflamatorios, o de neurodegeneración/remielinización. Un trazador utilizado en PET para marcaje de microglía activada, el C-11195 (PK) se une con mucha menos intensidad en pacientes con EMRR respecto a las lesiones hipointensas en T1, los llamados agujeros negros, que suponen un marcador precoz de mal pronóstico en EMRR y aparecen de forma más típica en las formas progresivas de la enfermedad [108]. Estas técnicas, por tanto, nos permiten aproximarnos in vivo a los mecanismos patogénicos que ocurren en la enfermedad en cada momento y con ello caracterizar e identificar marcadores de procesos que puedan ser responsables del acúmulo de discapacidad a largo plazo en la EM.

1.3.2 Marcadores biológicos.

1.3.2.1 Bandas oligoclonales, IgG e IgM.

Más del 90% de los pacientes presentan síntesis intratecal de la inmuglobulina IgG, demostrada por la presencia de BOC en el LCR, independientemente del curso de la enfermedad, por lo que suponen el biomarcador más importante desde el punto de vista diagnóstico, ya que implican mayor riesgo de conversión a EM ante el primer brote [108]. Por otro lado, se ha descrito la producción de BOC tipo IgM dirigida contra antígenos neuronales en una subpoblación de EM, aproximadamente en el 40% de los pacientes, cuya presencia implica una evolución más agresiva de la enfermedad.

La presencia de BOC tipo IgM implica mayor riesgo de conversión a EM ante el primer brote, peor respuesta a tratamiento estándar con interferón (IFN), mayor riesgo de atrofia cerebral y mayor discapacidad a largo plazo [109–111].

1.3.2.2 Neurofilamentos de cadena ligera.

Los neurofilamentos de cadena ligera (NF-l) emergen en la actualidad como prometedor biomarcador útil para la detección y monitorización del daño axonal agudo y la neurodegeneración. Actualmente disponemos de tecnología que nos permite la detección de esta molécula con elevada sensibilidad, por lo que lo podemos detectar de forma fiable en suero y no necesariamente en LCR, lo cual lo hace un biomarcador atractivo y útil para la monitorización de los pacientes en la práctica clínica habitual. En EM, este marcador se eleva de forma considerable durante los brotes de la enfermedad, o acompañando a la presencia de lesiones con realce de contraste en la RM, expresión del daño axonal agudo, por lo que nos puede ser de utilidad para monitorización de la actividad inflamatoria de los pacientes y la respuesta a los distintos TME [112, 113]. En este sentido, los NF-l serían útiles para identificar a los pacientes con alta actividad inflamatoria y respuesta subóptima a TME durante los primeros años de la enfermedad, lo cual se ha relacionado con peor evolución y mayor discapacidad a largo plazo [114].

Por otro lado, los NF-l también nos aportan información sobre la gravedad del daño axonal agudo producido, y ello podría suponer un marcador objetivo sobre la gravedad de los brotes en la enfermedad y, por tanto, del mayor riesgo de secuelas o discapacidad residual tras ellos, lo cual también se relaciona con menor capacidad de reparación del SN y mayor discapacidad a largo plazo [115].

Finalmente, la presencia de niveles basales elevados de NF-l en la fase precoz de EMRR se ha relacionado con mayor discapacidad a largo plazo medida por EDSS, en estudios de hasta 15 años de evolución, respecto a los pacientes con niveles normales o poco elevados al diagnóstico. Además, también se han correlacionado los niveles basales elevados de NF-l con otros marcadores objetivos de neurodegeneración, como la mayor pérdida de volumen cerebral y medular a largo plazo [116, 117]. Se encuentran más elevados en las formas primarias progresivas de la enfermedad y en las lesiones crónicas [118]. Se ha demostrado que los niveles de NF-l descienden tras

tratamientos de alta eficacia, como rituximab [119], tratamiento que además de controlar el proceso inflamatorio de la enfermedad también ha demostrado ser eficaz en un subgrupo seleccionado de pacientes con forma EMP. Por tanto, los niveles de NF-1 son considerados un biomarcador prometedor para la monitorización del daño axonal de la enfermedad y actualmente se proponen como un objetivo a evaluar en ensayos clínicos de EMP con especial interés en terapias neuroregenerativas.

1.3.2.3 Chitinasa 3-like-1.

La proteína “chitinasa 3-like-1” (CHI3L1) ha sido ampliamente estudiada en EM, está expresada por los astrocitos en SB, tanto en las lesiones como en SB aparentemente normal (SBAN), así como en la microglía de lesiones crónicas activas. Se considera un biomarcador de artrogliosis y microglía activada. Parece que en la EM la CHI3L1 juega un papel en la inflamación crónica y la remodelación de tejidos durante dicha inflamación. Los niveles altos de CHI3L1 se han relacionado con mayor riesgo de conversión de EM tras un CIS, mayor riesgo de discapacidad a corto plazo (medida por mayor riesgo a alcanzar EDSS=3 en periodo de 5 años) y mayor riesgo de deterioro cognitivo a largo plazo [116, 120, 121]. Los niveles de CHI3L1 disminuyen tras TME de alta eficacia como fingolimod o natalizumab. También se ha correlacionado los niveles altos de CHI3L1 con mayor riesgo de discapacidad a largo plazo, con mayor riesgo de alcanzar EDSS de 3 y de 6 [120] y alteración cognitiva [122], enfatizando la importancia de que la activación glial puede tener un papel central en la progresión de la discapacidad en la EM. En este sentido, otro marcador de actividad glial, la glicoproteína fibrilar ácida (GFAP), también ha sido relacionada con mayor riesgo de progresión de EM y discapacidad a largo plazo [120].

1.3.3 Otros marcadores: tomografía por coherencia óptica

La tomografía por coherencia óptica (del inglés, optical coherence tomography, OCT) con análisis segmentario de la retina, es una herramienta útil para la evaluación de la pérdida axonal y neurodegeneración en EM, permitiendo su estudio in vivo. Los cambios estructurales de la retina son diferentes en los distintos fenotipos de la

enfermedad y podrían reflejar los mecanismos fisiopatológicos subyacentes. Numerosos estudios han demostrado la existencia de un adelgazamiento de la capa de fibras nerviosas de la retina en pacientes con EM, tanto EMRR como EMP, respecto a controles sanos, independientemente de que los pacientes hayan tenido o no clínica previa de neuritis óptica. Existen también diferencias entre los pacientes con forma RR respecto a los pacientes con formas progresivas, siendo la afectación más evidente en el último grupo [123]. Existe una correlación de la afectación de las fibras nerviosas de la retina y la discapacidad de los pacientes medida por EDSS. Por tanto, el estudio de fibras nerviosas de la retina nos informa sobre la neurodegeneración en EM, es una herramienta no invasiva útil que nos permite monitorizar la progresión de la enfermedad y supone un marcador subrogado más de la discapacidad a largo plazo de los pacientes [124].

1.4 Técnicas de resonancia magnética para la medición de volumen lesional y volumen cerebral en esclerosis múltiple.

Integrar el contaje de lesiones en SB y la pérdida de volumen cerebral nos permite acercarnos a la patología de la EM, tanto a la afectación focal, secundaria a la inflamación/desmielinización, como a la difusa, secundaria al daño axonal.

Presentar lesiones en SB en secuencias flair (Fluid Attenuated Inversion Recovery) o potenciadas en T2 ante un SCA nos informa del riesgo de desarrollar EM a corto plazo, sin embargo, la atrofia cerebral actúa como un marcador más específico de la patología de la enfermedad y nos aporta más información referente al pronóstico a largo plazo. El daño neuroaxonal producido tanto en las lesiones como en SBAN conduce a la pérdida de volumen cerebral y es, probablemente, causa subyacente de la discapacidad permanente de los pacientes [125, 126]. Esta observación se demuestra en la EM establecida, donde tanto la atrofia cerebral como en médula espinal es mayor cuanto más discapacitados están los pacientes, como ya se ha comentado.

Las lesiones focales en SB son fácilmente identificables en secuencias flair o densidad protónica T2, y su volumen puede ser calculado mediante programas que nos permiten calcular el volumen en milímetros cúbicos de las lesiones señaladas de forma manual o programas semiautomáticos o totalmente automatizados. La medición manual de las

lesiones se hace por un operador, delimitando la superficie de las lesiones corte por corte, por lo que requiere mucho tiempo y durante el proceso se pueden cometer errores intraoperador o interoperador. Existen métodos de segmentación semiautomáticos y automáticos, que se basan en el rango de intensidades de los diferentes tejidos del cerebro, que pueden eliminar la subjetividad, pero también en están sujetos a errores y se requiere la corrección manual por un operador.

Para detectar las lesiones focales en sustancia gris se necesita de disponer de secuencias específicas para ello [127, 128].

Referente a la atrofia cerebral, se han desarrollado métodos de cálculo suficientemente sensibles y reproducibles para medirla, lo que supone que esta medida sea relativamente fácil y cada vez pueda ser utilizada de forma más extendida.

En función de la necesidad de intervención requerida por parte del investigador, podemos diferenciar los diferentes métodos de medición de atrofia cerebral en manuales, semi-automáticos y automáticos.

Como ya se ha comentado, los métodos manuales tienen la desventaja de consumir mucho tiempo y ser poco reproducibles, ya que dependen de un observador/operador. Se basan en la medición manual entre dos estructuras, por ejemplo la anchura del ventrículo lateral o el tercer ventrículo.

Los métodos automáticos son reproducibles y precisan menos tiempo, ya que no dependen de un operador.

La metodología para el postproceso de imagen [127], sigue el siguiente flujo de trabajo:

- 1) Adquisición de las imágenes originales (en crudo) de las que posteriormente se obtendrá el estudio volumétrico.
- 2) Preproceso: conjunto de técnicas necesarias para preparar las imágenes originales para su posterior análisis. Incluye los siguientes pasos:
 - a. Utilización de herramienta BET: (Brain Extraction Tool), programa usado para la extracción cerebral y su separación del resto de tejidos del cráneo.
 - b. Normalización espacial: adaptación del sistema de coordenadas de las

imágenes originales a un atlas anatómico especificado previamente (normalmente atlas MNI152 o espacio Talairach)

- c. Perfilar las lesiones: perfilar el contorno de las lesiones en sustancia blanca y crear una máscara de lesiones que posteriormente se podrá superponer a la imagen original.
- 3) Análisis: obtención de un conjunto de vóxeles etiquetados como sustancia gris, sustancia blanca y líquido cefalorraquídeo en las técnicas de segmentación, o a superficies de crecimiento o decrecimiento en las técnicas de registro.
- 4) Cuantificación de resultados: cálculo de los valores de interés, por ejemplo: fracción de parénquima cerebral (FPC), volumen cerebral normalizado (VCN), volúmenes regionales (sustancia gris, blanca y LCR), porcentaje de cambio de volumen cerebral o número y volumen de lesiones en T2.

1.4.1 Técnicas de segmentación.

Técnica para el procesamiento de una imagen, según la cual se divide en diferentes regiones homogéneas respecto a alguna característica común, como una intensidad de gris, una textura o una localización. Con ello se distribuye cada unidad de volumen (vóxel) según la probabilidad de corresponder a un tejido concreto (por ejemplo sustancia gris, blanca o LCR).

Actualmente podemos encontrar diversas herramientas de software que han sido desarrolladas por diferentes grupos de investigación para el cálculo de volúmenes cerebrales de forma automatizada. Los más ampliamente usados en el ámbito científico son: Statistical Parametric Mapping (SPM), la herramienta SIENAx, dentro de FMRIB Software Library (FSL) y FreeSurfer. Existen otros tales como Brain Voyager, NeuroQuant o Volbrain, los cuales no desarrollaremos en este texto.

SPM, desarrollado inicialmente por el Departamento de Neurología Cognitiva de la Universtiy College de Londres, realiza la segmentación del parénquima cerebral en LCR, sustancia gris y sustancia blanca, usando la intensidad del vóxel y su localización tras normalizar el espacio original (o nativo) a un atlas estándar, el espacio MNI152 (Montreal Neurological Institute), espacio obtenido de la superposición de 152 imágenes de RM de cerebros de voluntarios [129]. Una de sus

aplicaciones más frecuentes es la de organizar e interpretar los datos de resonancia magnética funcional.

FSL es una biblioteca completa de herramientas de análisis de imagen por RM (tanto estructural, como funcional o estudios de tractografía) desarrollado por los grupos del departamento de Ciencias Neurológicas y del Comportamiento de la Universidad de Siena (Italia) y el Centro Universitario de RM funcional cerebral (FMRIB) de la Universidad de Oxford (Reino Unido). Entre sus herramientas se encuentra Sienax (Evaluación de la atrofia de imagen estructural, usando normalización; del inglés Structural Image Evaluation, using Normalisation of Atrophy) [130], para análisis transversal del volumen del parénquima cerebral (y regional de sustancia blanca, gris y LCR) en una única RM, normalizado para el tamaño del cráneo, obteniendo el valor referente al VCN.

Por último, FreeSurfer es un paquete software gratuito para el estudio de propiedades funcionales, conexionales y estructurales del cerebro humano desarrollado por *Laboratory for Computational Neuroimaging, Athinoula A. Martinos Center for Biomedical Imaging*. El uso principal de FreeSurfer se basa en la representación de las macroestructuras de la superficie del córtex cerebral a partir de imágenes de resonancia magnética T1, etiquetar su localización y el análisis de su volumen. Otros procesos que incluye son la segmentación subcortical, la separación del cráneo, la reconstrucción de la superficie cortical y la estimación del grosor de la corteza.

1.5. Estudios no convencionales de RM: Difusión por RM y RM funcional.

El sustrato patológico existente bajo las lesiones visibles, aparentemente similares, en la RM convencional en los pacientes con EM es, sin embargo, muy heterogéneo; y ello se demuestra en la disociación clínico-radiológica que existe en esta enfermedad si nos restringimos sólo a analizar el volumen de lesiones mediante RM convencional. El desarrollo de nuevas técnicas no convencionales de RM nos permite aproximarnos a la estructura del tejido estudiado y de forma más específica a la patogenia de las distintas lesiones que ocurren en la EM, además de estudiar el daño microestructural aparentemente no visible [80]. Incorporar en nuestra práctica clínica estas técnicas de RM no convencionales nos puede ayudar a identificar de forma más específica el

sustrato lesional en la EM, y de esta forma, relacionarlo mejor con la afectación clínica de los pacientes y el seguimiento de la historia natural de la enfermedad. En la presente tesis doctoral nos restringiremos al estudio de difusión por RM y a la RM funcional.

1.5.1. Difusión por resonancia magnética.

La difusión por resonancia magnética es una técnica sensible al movimiento microscópico aleatorio o browniano de las moléculas de agua en el tejido cerebral, por lo que nos facilita información sobre el tamaño, la morfología, la integridad y la geometría de las de las estructuras que lo conforman. Tal como se ha comentado previamente, la información obtenida de las lesiones hiperintensas en T2 en la RM convencional es inespecífica, sin embargo, el estudio de difusión nos puede aportar más información sobre el sustrato patogénico que existe bajo una determinada lesión o de la SBAN.

Expresamos esta información a partir del coeficiente de difusión, que es menor en aquellas zonas en las que el movimiento está restringido, y del coeficiente de difusión aparente (CDA o ADC, del inglés *apparent diffusion coefficient*), que se refiere al porcentaje neto de traslación de las moléculas de agua por segundo y la eficacia del movimiento browniano, definiendo por lo tanto las características físicas de los tejidos. La mayoría de procesos patológicos del SNC afectan al CDA, aumentando su valor cuando existe destrucción de barreras y por tanto aumento del agua libre (como ocurre en el edema vasogénico), y disminuyéndolo en el caso contrario (como en el edema citotóxico).

La difusión no solo depende de la cantidad de movimiento, sino también de su dirección, y toda esta información se engloba en el concepto de tensor de difusión, cuya medida en la SB del SNC es reflejo de la organización e integridad de los axones mielinizados. De él podemos extraer información independiente de la dirección, llamada difusibilidad media (DM), e información dependiente de la dirección, mediante la fracción de anisotropía (FA), que mide la difusión en una dirección espacial concreta, por ejemplo, la marcada por las fibras axonales. A partir de la FA podemos obtener mapas axonales (tractografía) que ofrecen información sobre las

organización de las conexiones corticales y sus proyecciones hacia la sustancia blanca [131].

Existe una correlación estrecha entre las alteraciones de difusión por RM y la anatomía patológica postmortem en pacientes con EM, siendo más robustas para la FA que para otros parámetros [132].

En las lesiones visibles en T2 existe un aumento de la DM y una disminución de la FA, reflejo del aumento de agua extracelular y la desorganización de fibras mielínicas y axonales. En las lesiones agudas estos cambios son más marcados que en las crónicas, donde son moderados [133].

Donde más evidentes son los cambios de aumento de DM y disminución de FA son en las lesiones hipointensas en T1 de carácter crónico (“agujeros negros”), seguido de lesiones en T2 y afectación de la SG y posteriormente en SBAN, acorde con la gravedad y relevancia funcional del daño [133, 134].

En las lesiones corticales de EM se ha observado un aumento de la FA respecto a la SG normal, que podría reflejar la activación de células de la microglía [135].

Las alteraciones observadas en la difusión en lesiones en T2 se hacen más llamativas conforme evoluciona la enfermedad y tienen un mayor correlato con la discapacidad de los pacientes respecto al volumen global de carga lesional en T2. La mayor afectación de la difusión en SG aparecen en las formas progresivas de la enfermedad con mayor discapacidad, al igual que ocurre con la afectación a nivel medular [134, 136].

Por tanto, la difusión en RM puede ser útil para monitorizar la afectación de SNC a lo largo de la evolución de la enfermedad, de forma independiente al acúmulo progresivo de lesiones en T2 o a la pérdida de volumen cerebral.

1.5.2 Resonancia magnética funcional.

Disponemos de evidencia suficiente sobre la existencia de un fallo en la organización cortical cerebral a lo largo de la evolución de la EM, lo cuál podría explicar la heterogeneidad de las diferentes manifestaciones clínicas y los distintos grados de recuperación funcional observados entre los diferentes pacientes. La RM funcional ha sido ampliamente usada a nivel de investigación con el fin de comprender con mayor exactitud los mecanismos responsables del acúmulo irreversible de discapacidad que ocurre en los pacientes con EM. Sabemos que el daño en la EM no está limitado a las lesiones visibles en la secuencia T2 de la RM convencional, si no que también implica a la SBAN, que podemos medir mediante las técnicas de difusión ya comentadas. Por otro lado, también sabemos que la degeneración axonal es un proceso que ocurre de forma precoz en la enfermedad, que no solo está explicado de forma secundaria a la inflamación, y que contribuye de forma fundamental al acúmulo de discapacidad a largo plazo de los pacientes. Con todo ello, existe una discrepancia entre la correlación de la imagen que nos aporta la RM convencional y la clínica observada en los pacientes con EM, por lo que es en este campo donde nos puede aportar más información la RM funcional.

La RM funcional es una técnica de imagen que se fundamenta en los cambios en la concentración relativa de oxihemoglobina y desoxihemoglobina en el lecho capilar, inducidos por el incremento de la actividad cortical cerebral en respuesta a una tarea, ya sea motora, visual o cognitiva. La RM funcional se define como RM BOLD (del inglés blood oxygenation level dependent, o nivel de oxigenación de la sangre). Cuando ocurre una activación cerebral se produce un aumento de la actividad sináptica local, seguida del incremento del flujo sanguíneo local y del consumo de glucosa, lo que finalmente provoca un aumento de la concentración relativa de oxihemoglobina en relación a la desoxihemoglobina. Estos cambios producen una reducción del efecto paramagnético detectable en las secuencias ponderadas en T2, con el consiguiente aumento de la señal de RM en las áreas corticales activadas [137–139].

Para los estudios de RM funcional se han utilizado diversas tareas para objetivar la respuesta en forma de activación cortical, ya sea usando un paradigma motor, sensitivo, visual o cognitivo. En cuanto al paradigma motor, que es el que hemos

utilizado en este proyecto, se pueden realizar movimientos simples o movimientos más complejos, que necesiten mayor coordinación, como la flexión-extensión de dedos I-V forma rítmica. Al realizar movimientos más complejos, además del área motora principal (región precentral) contralateral, puede verse activada una región más amplia, como el área somatomotora global o el área motora suplementaria. También se ve activada el área correspondiente al cerebelo ipsilateral, responsable de la coordinación de los movimientos. Aunque a nivel global predominan estos resultados, se ha descrito gran variabilidad interindividual [140].

Existen diferentes formas de interpretar las zonas activadas. Las más utilizadas son:

- 1) Establecer, para cada zona de interés a estudiar, el valor obtenido en reposo y el obtenido tras la realización del paradigma a evaluar establecido. Posteriormente se realizaría un análisis estadístico para comparar ambas medias (t student) y se establecerían como áreas activadas aquellas en las que se objetivaran diferencias significativas desde el punto de vista estadístico.
- 2) Evaluar la señal porcentual de cambio (PSC, del inglés Percent Signal Change) de cada sujeto en cada región estudiada. Este valor corresponde a los incrementos/decrementos porcentuales de la señal funcional, con lo que se obtiene un valor único que marca la diferencia de activación de un área en estado de reposo y al realizar la tarea motora.

De ambas formas se convierten los parámetros obtenidos en un valor estadístico útil que permite objetivar si el periodo de estimulación produjo una activación significativa respecto al periodo de reposo.

En pacientes con EM, los estudios de RM BOLD han demostrado la existencia de plasticidad cerebral, es decir, los estudios de RM funcional nos ayudan a objetivar los mecanismos de compensación cerebral existentes en los pacientes al inicio de la enfermedad, capaces de limitar a nivel funcional, al menos en los primeros años, las consecuencias de la pérdida axonal [141].

Los estudios transversales de RM funcional en EM han demostrado de forma consistente alteraciones en el reclutamiento cerebral en todos los fenotipos clínicos, tanto por alteración en la activación de áreas con esperada activación ante un estímulo motor/cognitivo, como reclutamiento de otras áreas adicionales en comparación con sujetos sanos [142, 143]. Además estos estudios han puesto de manifiesto la diferente

capacidad de reclutamiento de nuevas áreas en función del fenotipo clínico o discapacidad de los pacientes, pudiendo estar en relación con la hipotética capacidad de plasticidad cerebral que tendrían los pacientes, más evidente en los estadios iniciales de la enfermedad [144].

Los hallazgos en la RM funcional ocurren de forma precoz en la enfermedad, estando presentes desde el primer brote clínico o incluso en pacientes sin ningún déficit. La capacidad de reclutamiento de distintas áreas varía a lo largo de la enfermedad, y está en relación con la gravedad del daño estructural, tanto con las lesiones aparentes en SB, como la SBAN, SG o daño medular [145].

En los trabajos de Roca y cols se pone de manifiesto la capacidad de adaptación en EM, con reclutamiento inicial de las áreas esperadas, por ejemplo, el área motora primaria y suplementaria contralateral ante un estímulo motor, para pasar en estadios más tardíos a un reclutamiento más amplio, por ejemplo ambas áreas motoras de forma bilateral, un patrón que en sujetos sanos sólo lo veríamos en respuesta a tareas motoras complejas. En las formas benignas de EM, quedaría preservada la activación estricta unilateral, como ocurre en sujetos sanos [146].

Este aumento de la capacidad reclutadora de nuevas áreas podría ser beneficioso como mecanismo de compensación de los pacientes, pero se ha visto que no siempre funciona así, sino que puede ser un mecanismo de mala adaptación, en el que se reclutan con menos intensidad las principales áreas y sin embargo se reclutan otras menos efectivas, como el giro temporal bilateral, el giro frontal ipsilateral, la ínsula o el claustro, ante una tarea motora. Por tanto, los estudios transversales de los que disponemos en EM, arrojan datos controvertidos en cuanto al incremento de conectividad existente en los pacientes, si realmente demuestran una capacidad compensatoria o si solo son reflejo de un mecanismo de mala adaptación ante un requerimiento concreto. Existen trabajos que, lejos de ver mayor reclutamiento cerebral en aquellos pacientes con mayor plasticidad y por tanto con mayor capacidad de compensación clínica del daño, correlacionan este mayor aumento de actividad cerebral en reposo y mayor conectividad con la gravedad del daño cognitivo o con la mayor discapacidad de los pacientes. Por tanto, destacar la gran complejidad en la interpretación de los hallazgos en estudios transversales de RM funcional de los que disponemos en pacientes con EM, y, por tanto, que surja la necesidad de estudios con diseño longitudinal. Los estudios longitudinales a largo plazo usando estudios seriados

de RM funcional en amplias cohortes de EM desde el inicio nos ayudarían a conocer más a fondo los mecanismos adaptativos que ocurren en esta enfermedad y también serían una herramienta para monitorizar la respuesta a medidas terapéuticas, como distintos TME o intervenciones de rehabilitación [146].

1.6 Mecanismos de reparación en enfermedades neurodegenerativas: la zona subventricular

A medida que pasan los años se produce una pérdida de neuronas en el cerebro humano que siempre se ha considerado irreversible, dada la imposibilidad de reemplazarlas. Esta incapacidad para generar nuevas neuronas o, lo que es lo mismo, para inducir “neurogénesis”, podría influir en la evolución de enfermedades neurodegenerativas, situación en la que la pérdida neuronal progresiva se hace más evidente.

Definimos como neurogénesis al proceso por el cual se crean nuevas neuronas a partir de células madre y células progenitoras. En las últimas décadas ha habido una gran expansión en el conocimiento experimental de la neurogénesis en mamíferos, lo cual ha llevado a la motivación en la investigación de este proceso en humanos, tanto en neonatos como en adultos [147–149]. Sabemos que existe neurogénesis en adultos humanos. Fue en el artículo de Eriksson y cols, (1998) [62] donde se demostró por primera vez la capacidad del cerebro humano para generar nuevas células y que su potencial para la renovación celular se puede mantener a lo largo de la vida. Para ello, seleccionó pacientes con cáncer que habían recibido bromodesoxiuridina (BrdU) por fines diagnósticos. La BrdU es un nucleótido sintético análogo de la timidina capaz de integrarse en el ADN de células en división y que puede ser detectado posteriormente por técnicas de inmunohistoquímica. En este trabajo se demostró la presencia de células marcadas con BrdU en la zona subgranular del giro dentado y el hilus del hipocampo de estos pacientes, a diferencia del grupo control.

Conocer la existencia y funcionamiento de la neurogénesis en el cerebro humano del adulto nos puede ayudar a entender su significado biológico o su funcionalidad en el cerebro sano pero también a asociar su alteración a la etiopatogenia o a la evolución progresiva de enfermedades neurodegenerativas o psiquiátricas [150]. Además podría

dar opción a una era de nuevas terapias de reemplazo celular en enfermedades neurodegenerativas [151].

Pero el giro hipocampal no es la única región en la que se ha demostrado neurogénesis adulta en mamíferos. La zona subventricular (ZSV) es una región que subyace o tapiza los ventrículos laterales y que también ha demostrado ser nicho de células madre neurales como detallamos a continuación.

1.6.1 Zona subventricular.

En las últimas décadas del siglo XX se demostró que en mamíferos (de forma similar a como ocurría con reptiles y peces) existía una población de células con capacidad de división tapizando la luz de los ventrículos laterales del cerebro en íntimo contacto con LCR (revisado en Gil-Perotin et al. [152]). Esta zona recibe el nombre de ZSV y su estructura queda reflejada en la figura 3. Concretamente en roedores, Doetsch et al. [153] describen a la célula madre de mamífero adulto por primera vez, demostrando su capacidad proliferativa, su potencial de autorrenovación y la diferenciación de estas células hacia los tres linajes de la estirpe neural (astrocitos, oligodendrocitos y neuronas jóvenes o neuroblastos). Lim et al., habían observado que estas neuronas jóvenes que procedían de la ZSV eran capaces de migrar “grandes” distancias (milímetros) de forma tangencial, formando cadenas, con destino en el bulbo olfativo. Con posterioridad, este hallazgo se hizo extensivo a humanos donde se demostró neurogénesis en fetos y en neonatos [152–156].

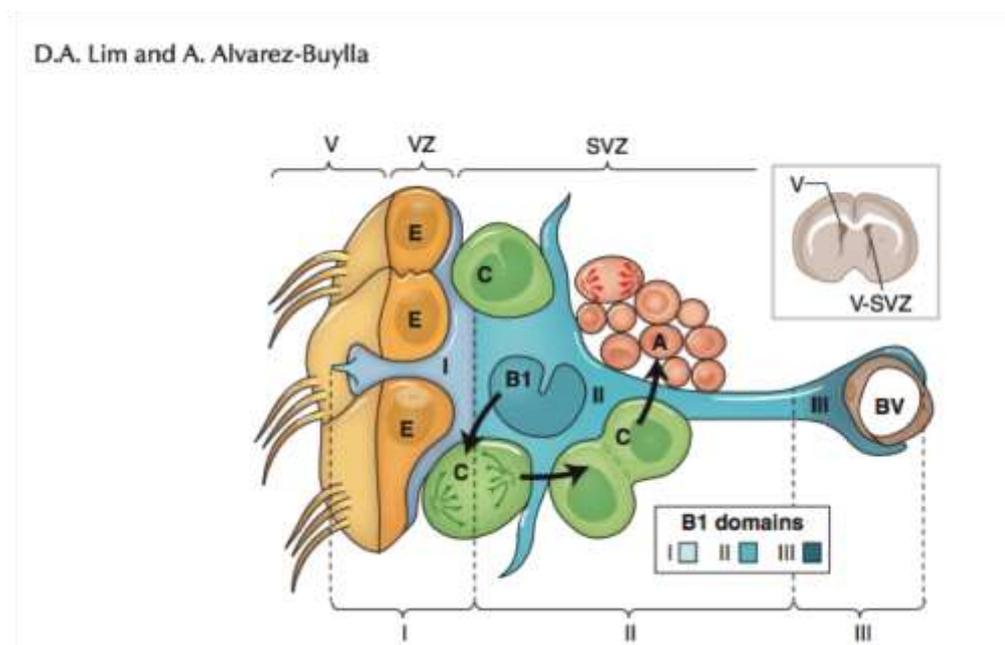
Asimismo, en roedores, Doetsch et al. [153] pudieron identificar morfológicamente a la célula madre como de estirpe astrocitaria, célula a la que llamaron tipo B. Expresaban marcadores de astrocitos como la proteína GFAP y ultraestructuralmente eran idénticos a astrocitos de otras regiones del cerebro. Con peculiaridad, las células tipo B presentaban un único cilio, muy característico, en su región apical, corto y recto, con un centriolo en su base y estructura del axonema 9+0, a diferencia de los cilios móviles de las células endimarias que eran múltiples y de estructura 9+2 [157, 158]. Este cilio es característico de células madre de distintos órganos y del embrión, es inmóvil y se le atribuye una función semejante a la de una antena receptora de señales. Junto a las células B se encuentra otro tipo celular en la ZSV, la célula tipo C. Ésta procede de la activación de la célula B, que suele permanecer en estado de reposo o

quiescencia hasta que ciertas señales (no del todo conocidas, entre ellas, factores de crecimiento) inducen su activación [148]. La célula tipo C o célula amplificadora, es una célula transicional que se caracteriza por una gran capacidad de división. Tras una serie de ciclos de división, se diferenciará aún más y adoptará un fenotipo más fusiforme, expresando marcadores neuronales (fundamentalmente microtúbulos) para dar lugar a la célula tipo A o neuroblasto. Estas células progenitoras son las precursoras directas de las neuronas maduras y son las únicas células de la ZSV con capacidad de migrar de forma tangencial, formando una red de cadenas (lo que se denomina flujo migratorio rostral (del inglés “rostral migratory stream”), para finalmente llegar al bulbo olfatorio e integrarse en los circuitos neuronales locales [148, 155, 157–160].

Las células tipo B también son capaces de generar células de estirpe glial, como oligodendrocitos, aunque, en condiciones normales, esto ocurre en menor medida. Sin embargo, en respuesta a lesiones desmielinizantes la producción de nuevos oligodendrocitos se ve claramente incrementada [151]; en respuesta a daño cerebral, la ZSV también produce astrocitos capaces de migrar al lugar de la lesión [161].

Existen claras diferencias en la organización de la ZSV del cerebro humano respecto al de roedores; así como en el roedor, la células que integran la ZSV se disponen por debajo de la capa ependimaria bien cohesionadas unas con otras, en el humano existe una región vacía de cuerpos celulares entre el epéndimo y las células tipo B, que ha llamado capa GAP (“hueco”), con gran densidad de procesos celulares y conexiones [157]). Además parece ser que estos astrocitos podrían tener propiedades intermedias de diferenciación y migración, sin embargo, la cantidad de nuevas neuronas que migran desde la ZSV hasta bulbo olfatorio en el cerebro adulto humano no se ha descrito, parece limitada al periodo de desarrollo fetal y neonatos [160]. Otros estudios más recientes, sin embargo, sugieren que estas células progenitoras podrían migrar hacia el estriado y es allí donde se diferenciarían en neuronas [162]. Se ha sugerido que la densidad de neuroblastos en el estriado podría ser similar a la de la ZSV y el hipocampo, y se ha demostrado que están especialmente agotados en la enfermedad neurodegenerativa de Huntington [162].

Figura 3. Esquema de la estructura de la ZSV en corte coronal de cerebro de ratón adulto. Extraído del artículo: The Adult Ventricular-Subventricular Zone (V-SVZ) and Olfactory Bulb (OB) Neurogénesis [148]. En verde se muestran las células tipo C, de transición, que darán lugar a las de tipo A (en rojo), que serán los neuroblastos con capacidad de migración. Las células tipo E tienen una prolongación ciliar que está en íntimo contacto con los ventrículos. La ZSV se divide en 3 dominios; el I (apical), que contiene las células ependimarias y la parte apical de las células B1; el dominio II (intermedio), que contiene el cuerpo de la mayoría de las células B1, que están en contacto con las células C y las A, y el dominio III, que contiene la parte basal de las células B1, en contacto directo con los vasos sanguíneos.



V: ventrículo, VZ: Zona ventricular (del inglés, ventricular zone), SVZ: zona subventricular (del inglés, subventricular zone), E: epéndimo, C: células C, B1: células B1, A: células A, BV: vaso sanguíneo (del inglés, blood vessel).

1.6.2 Estudio de zona subventricular en inflamación.

Como ya hemos comentado, la ZSV es un nicho celular privilegiado en SNC con capacidad de producción de nuevas células que ha demostrado mantenerse activo hasta en el cerebro adulto humano. Sin embargo, la contribución relativa de cada tipo celular residente en la ZSV a la reparación del daño real del SNC en distintas enfermedades neurodegenerativas es materia de debate [163].

Los diferentes daños en el SNC pueden producir diferentes respuestas en la ZSV, ya sea una proliferación y migración de nuevas células, destrucción del ciclo e inhibición de la migración, o producir viraje a promover neurogénesis o gliogénesis según más interese en función del tipo de insulto provocado.

Distintos modelos animales han reproducido el daño de tipo inflamatorio agudo en el SNC para el estudio de la ZSV en estas circunstancias. Existe acuerdo en que se produce una activación de la ZSV, con nueva neurogénesis con capacidad migratoria ante un estímulo inflamatorio agudo, por ejemplo un ictus [163], o distintos modelos de encefalitis aguda experimental (EAE) [164].

De forma específica, estudios animales en enfermedades desmielinizantes tipo EM han demostrado que la ZSV es un nicho con potencial para la producción de oligodendrocitos que tendrían un papel en la contribución a la remielinización [154]. La producción de oligodendrocitos en la ZSV es menor en comparación con la de neuronas, pero ésta se ve incrementada en respuesta a las lesiones, expresando marcadores de mielina, por lo que pueden contribuir al proceso de remielinización [159, 165, 166].

En modelos de EAE con desmielinización en cuerpo calloso se ha observado la producción de múltiples cambios en la ZSV en respuesta a los cambios producidos en el LCR por la inflamación. Las células B tiene un papel principal en la señalización celular y su proliferación será clave para la producción de nuevos oligodendrocitos en respuesta a la desmielinización, que podrán contribuir a la futura remielinización [167, 168]. Los modelos clásicos de neurogénesis separan por un lado las células que producirán neuronas y por otro las que producirán oligodendrocitos. Las células tipo B (astrocitos GFAP+) de ZSV podrían producir tanto nuevas neuronas como oligodendrocitos.

Sin embargo, es más controvertido el comportamiento de la ZSV ante insultos inflamatorios repetidos o inflamación crónica mantenida en el tiempo, por lo que surge el debate de si la ZSV se mantiene activada en esta situación o si, por el contrario, esta capacidad de neurogénesis/oligodendrogénesis se ve mermada.

Estudios animales con modelos de EAE que estudian la inflamación crónica en SNC han demostrado que se produce un cambio en la ZSV tras la inflamación crónica mantenida, con el decremento de la proliferación de células de tipo C y B, acompañado de aumento de nuevos neuroblastos, células tipo A, pero con pérdida de su capacidad migradora, al menos hacia el bulbo olfatorio.

Rasmussen y cols [164] usan un modelo especial de EAE desarrollado en la cepa SJL [169]. Con este modelo se puede estudiar la inflamación aguda, con insultos repetidos, y la inflamación crónica mantenida, provocando una activación persistente de la microglía, similar a la que ocurre a nivel cortical de los pacientes con EM. Por tanto, supone un modelo muy atractivo para el estudio de la ZSV en la EM, ya que refleja la historia natural de esta enfermedad.

En este modelo se observa una activación de la ZSV, expresada por aumento de Sox 2 (producido por neuroblastos) respecto a controles sanos tras la provocación de la inflamación aguda, que posteriormente retorna a los niveles basales. Además se ha visto la capacidad migratoria de esta nueva proliferación celular tras un daño agudo, hacia bulbo olfatorio, cuerpo calloso o incluso a zonas más distales de la ZSV, como a lesiones perivenulares y a lesiones corticales. Es interesante la observación de que con sucesivos ataques inflamatorios esta activación de la ZSV no se reproduce, sino que se mantiene en sus niveles basales, por lo que podemos decir que se produce una inhibición progresiva de la ZSV, a pesar de que el daño inflamatorio persista. Estos hallazgos sugieren que la capacidad proliferativa de la ZSV va cambiando en función del daño inflamatorio que se produce y por tanto, puede cambiar con las distintas fases de la enfermedad. En este modelo se estudia el efecto de la inflamación crónica, expresada por la microglía persistentemente activada, sobre la capacidad proliferativa de la ZSV, observando como en esta situación el comportamiento de la ZSV es distinto, se ve inhibida tanto su capacidad proliferativa como su capacidad migratoria. Es más, la desactivación de microglía con minociclina restaura la arquitectura de la ZSV, revierte el daño causado y consigue la mejora de la producción de oligodendrogénesis y oligodendrocitos maduros, mejorando así el pronóstico de los ratones a los que se le ha provocado la enfermedad. En definitiva, en este trabajo se objetiva que la inactivación de microglía en la ZSV va ligado al aumento de progenitores en la ZSV, y por tanto concluyen que la microglía persistentemente activada influye directamente en la capacidad de proliferación de la ZSV, provocando su desestructuración e inhibición.

1.6.3 Implicación de la microglía en la ZSV y en la patogenia de la esclerosis múltiple.

Conocemos como microglía a las células residentes en el SNC cuya función es la de fagocitosis de patógenos o células degeneradas. La microglía es beneficiosa en situación de normalidad, manteniendo la continua supervivencia del microambiente circundante, gracias a su gran plasticidad morfológica y funcional. Cuando aparece un estímulo nocivo en el SNC, la microglía adquiere el fenotipo “activado”, cambiando su morfología y alterando su comportamiento normal. Se produce un viraje del fenotipo M2, considerado como neuroprotector y anti-inflamatorio al fenotipo M1, que es el clásico activado, neurotóxico y pro-inflamatorio [170].

Además de su función fagocítica, la microglía tiene otras funciones, entre ellas destacar la eliminación de las sinapsis disfuncionales o la regulación de la plasticidad sináptica, influyendo en el correcto funcionamiento del circuito neuronal. Sin embargo, la activación crónica de la microglía es responsable de la neuroinflamación implicada en varias enfermedades neurodegenerativas, entre ellas la EM. Por tanto la microglía activada está siendo investigada como diana terapéutica en muchos de estos procesos patológicos, intentando inmunomodular su componente neurotóxico y promoviendo su cambio hacia el neuroprotector [171, 172].

Es conocido que la microglía se encuentra más densamente concentrada en los dos nichos con capacidad neurogénica, tanto en el giro dentado del hipocampo como en la ZSV, además que en estas zonas presenta un fenotipo más activo que en las regiones no neurogénicas.

Por tanto, se asume que la microglía está implicada en el proceso de proliferación de progenitores neuronales y su posterior migración y diferenciación funcional [173].

La microglía en la ZSV tiene una localización estratégica, y su función en circunstancias normales es la de soporte trófico para inducir la neurogénesis y favorecer la supervivencia de los neuroblastos. Se considera un componente esencial de la ZSV se encuentra en íntimo contacto con las células de tipo B, los neuroblastos y las células amplificadores, además de tener contacto directo con el plexo vascular, por lo que está bien posicionada para influir en el funcionamiento de la ZSV. La microglía en la ZSV adquiere un fenotipo característico con expresión de distintos marcadores y citoquinas. Se ha demostrado que libera factores solubles que influyen de forma directa en la migración de células de la ZSV y que además estos factores son

esenciales para la generación de nuevos neuroblastos y oligodendroblastos en la ZSV [173]. El mayor efecto de la microglía ocurre en el periodo postnatal precoz y decrece en el adulto, donde adopta una morfología ramificada de reposo. Aun así, la microglía residente en la ZSV del adulto es esencial para la supervivencia de los nuevos neuroblastos, con función de soporte trófico, y para su capacidad de migración. La microglía participa además en la organización de redes en las que participan las nuevas neuronas y en su incorporación al circuito existente, en el hipocampo y en el bulbo olfatorio.

En contexto ambiental de la ZSV puede determinar el estado de activación de la microglía y, en función de este, determinar una activación o inhibición de su capacidad proliferativa. En situaciones patológicas, factores liberados por la microglía activada estimulan la producción y diferenciación neuronal a partir de células madres en la ZSV; también se ha demostrado la generación de nuevos oligodendrocitos mediante la estimulación de la microglía tras provocar la desmielinización focal del cuerpo calloso. Pero es importante entender que la microglía activada en sí no estimula o inhibe la neurogénesis, sino que es un proceso más complejo en el que el equilibrio en la secreción de factores/moléculas pro o anti inflamatorias influye en el efecto final de dicha activación. Es importante remarcar que con la edad el fenotipo de la microglía sufre cambios que van asociados al fallo progresivo de la neurogénesis en la ZSV.

Por tanto, la microglía en la ZSV es fenotípicamente única, interviene en el control de la neurogénesis durante los distintos estadios de la vida y promueve tanto la neurogénesis como la oligodendrogénesis ante los distintos tipos de daño del SN.

Además de estas señales solubles, recientemente se han identificado las vesículas extracelulares que contienen microRNA como forma de comunicación entre las células de la ZSV y la microglía, para regular la neurogénesis en situaciones fisiológicas y patológicas, por lo que sería una vía más a través de la cual influir o potenciar la neurogénesis/gliogénesis en situaciones patológicas [173].

En resumen, existe un diálogo bilateral y complejo entre las células precursoras y la microglía de la ZSV, que varía en función de la edad y las distintas condiciones patológicas. Los precursores controlan la actividad de la microglía y al contrario, el estado de la microglía que forma parte de la ZSV determina si se potencia o se inhibe su capacidad proliferativa.

En cuanto a la EM, cada vez hay más evidencia de que la activación crónica de la microglía juega un papel en la destrucción de la mielina influyendo en la progresión de la EM. La microglía está implicada en todas las fases de la enfermedad; durante los brotes sirve como célula presentadora de antígeno implicándose en la respuesta inflamatoria aguda, durante la remisión tras la inflamación aguda contribuye a la “limpieza” del daño, con su papel fagocítico, y se pone en marcha su función neuroprotectora durante la fase de remisión, contribuyendo a la remielinización inicial. Sin embargo, en la fase tardía de la enfermedad el rol se invierte y la microglía persistentemente activada tiene un papel fundamental contribuyendo a la inflamación crónica responsable del daño irreversible del SN [6, 174–176].

En este sentido, los inhibidores de microglía son agentes potenciales para el tratamiento de la EM, sobre todo para prevenir la degeneración en la fase progresiva de la enfermedad. Pese al concepto teórico beneficioso, actualmente no disponemos terapias orientadas a inhibir la microglía. Se han investigado fármacos como el dipiridamol, que reduce el TNF- α expresado por la microglía activada o salfinamida, recientemente aprobada en la enfermedad de Parkinson, que actúa como modulador de la transmisión dopaminérgica y glutaminérgica en modelos experimentales de EM y en modelos animales de EAE suprime la producción de superóxido por la microglía [171]. Actualmente disponemos de fármacos en práctica clínica que parte de su efecto neuroprotector puede ser a través de la inhibición de la microglía crónica activada, como el dimetilfumarato, usado en la forma RR de la enfermedad o el rituximab, que puede ser usado en la forma progresiva, ya que es uno de los únicos fármacos, junto a otro anticuerpo monoclonal anti-cd 20 (ocrelizumab), que ha demostrado ser eficaz en esta fase de la enfermedad, siendo capaz de reducir el acúmulo progresivo de discapacidad [177, 178].

El futuro terapéutico en la interacción con la microglía se está centrando en la investigación con la terapia celular. La degeneración y muerte neuronal es el hecho subyacente a la mayoría de las enfermedades neurodegenerativas; por tanto, la terapia de reemplazamiento celular es una estrategia terapéutica prometedora para abordar a este tipo de enfermedades. Podemos aproximarnos mediante reclutamiento in vivo de células endógenas o mediante trasplante de células exógenas. Las células precursoras de la ZSV se consideran una fuente celular adecuada para el trasplante neuronal. Se considera que su efecto beneficioso no sólo reside en la habilidad para generar nuevas

neuronas u oligodendrocitos, sino en otras capacidades neuroprotectoras, como soporte neurotrófico, inmunomodulación o mecanismos de reparación endógenos.

Las células progenitoras indiferenciadas inyectadas inducen la activación de la microglía, y ésta puede adquirir un fenotipo neuroprotector que puede contribuir al funcionamiento más eficaz del injerto [175, 176, 179, 180].

1.6.4 Estudio de zona subventricular en esclerosis múltiple.

La ZSV ha sido estudiada en modelos animales de diferentes afectaciones neurológicas, como epilepsia, isquemia o tras un traumatismo. Se ha demostrado su capacidad de expansión y la movilización de precursores neuronales desde la ZSV hacia el lugar de la lesión, donde después se podrán diferenciar en neuronas o astrocitos [151]. En modelos de enfermedad inflamatoria desmielinizante se ha demostrado asimismo la movilización de precursores desde la ZSV al lugar de la lesión y su posterior diferenciación en células gliales, en concreto en oligodendrocitos [159], pudiendo contribuir con ello al fenómeno de remielinización en enfermedades desmielinizantes como la EM.

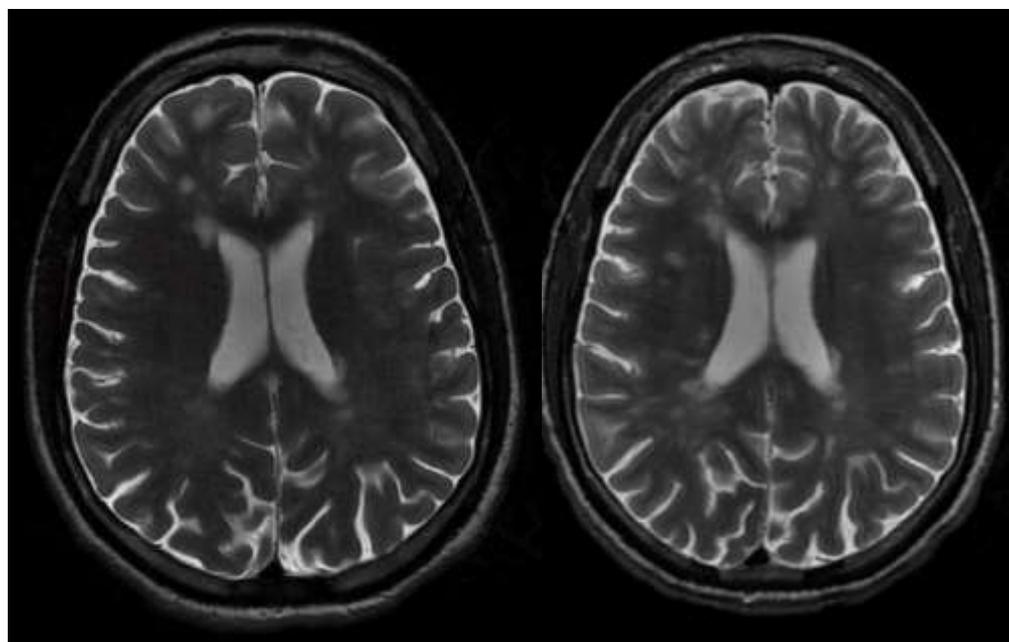
Diversos grupos han demostrado que se producen modificaciones importantes en la ZSV en respuesta a enfermedades neurológicas. La neurogénesis está incrementada en la enfermedad de Alzheimer, Huntington y epilepsia; y disminuida en la enfermedad de Parkinson [150].

En EM existe una especial predisposición a la afectación de la zona periventricular, colindante a la ZSV, donde existe una extensa desmielinización, con remielinización incompleta [181] (figura 4). Dada la degeneración neuronal y desmielinización colindante a la ZSV que ocurre en la EM ha surgido el interés en el estudio del comportamiento de esta zona crítica en esta enfermedad.

Se realizó un trabajo postmortem de cerebros de pacientes con EM dirigido al estudio de la ZSV, para objetivar los posibles cambios que ocurren en esta enfermedad en respuesta a la intensa inflamación y al fallo en la remielinización [182]. El objetivo fue demostrar si en la ZSV se podrían generar nuevas células gliales capaces de contribuir al proceso de remielinización.

Para ello se seleccionó la parte principal de la ZSV, la coincidente con el núcleo caudado tomando como límite la vena estriatal. Esta zona tan precisa fue localizada en 5 controles y 7 pacientes con EM.

Figura 4. Ejemplo de RM cerebral de un paciente de nuestra muestra diagnosticado de EMRR, donde se muestran las lesiones típicas de la enfermedad localizadas fundamentalmente a nivel periventricular.



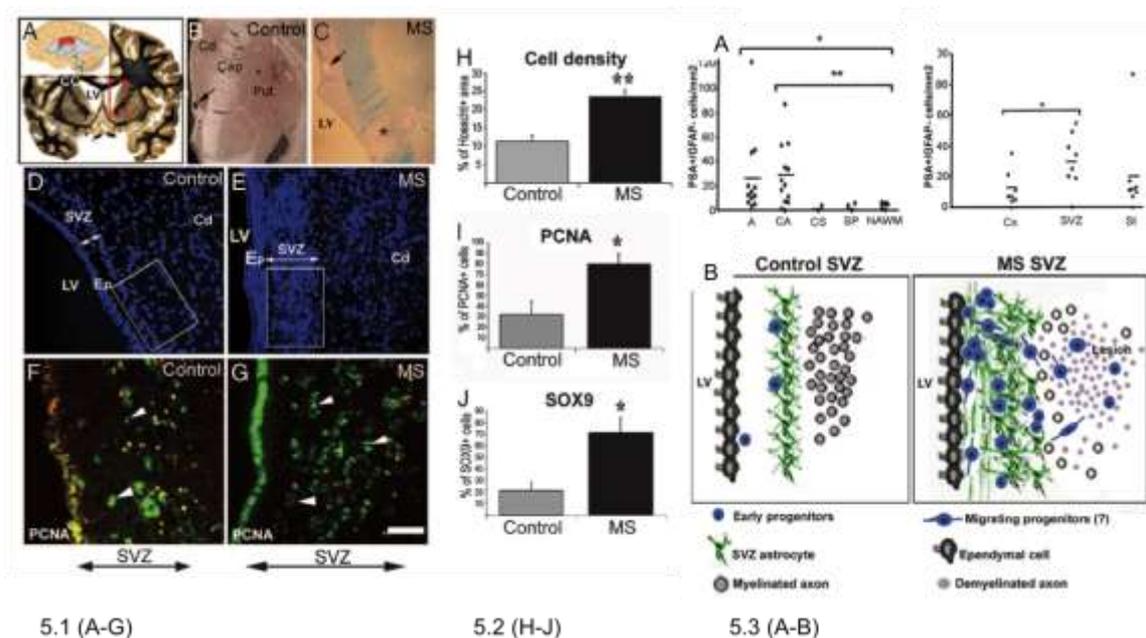
RM: resonancia magnética, EMRR: esclerosis múltiple remitente recurrente.

La estructura de la ZSV, con la zona “GAP” y la capa de células endoteliales estaba preservada en todos los controles. Se confirmó un aumento de grosor de esta zona en los pacientes con EM multiplicando por 2,5 veces su grosor, con aumento significativo de la densidad celular en pacientes con EM respecto a los controles. Se demostró mediante inmunohistoquímica la expresión a ese nivel de marcadores gliales, como GFAP y la forma polisacárida de la molécula de adhesión de célula neuronal (PSA-NCAM), ambas drásticamente elevadas en pacientes con EM respecto a controles.

Además estos progenitores GFAP+ y PSA-NCAM+ mostraban una orientación perpendicular a la pared del ventrículo lateral, lo que podría sugerir su capacidad de migración desde la ZSV, acción que no se pudo demostrar en los controles sanos. También se demostró el aumento de la expresión de factores de transcripción implicados en la oligodendrogénesis, como Sox9, Sox10 y Olig2, respecto a controles. En roedores ya se había demostrado la migración de progenitores PSA-NCAM+ desde la ZSV hasta el lugar de la lesión. En este trabajo de cerebros de pacientes con EM se observó una población celular PSA-NCAM+ sin expresión de GFAP en las zonas lesionadas, en las placas de EM y SB periplaca, con forma redondeada, sugerentes de progenitores PSA-NCAM+. Además, estos progenitores eran cuantitativamente más abundantes en las placas activas y crónicas-activas, respecto a las crónicas silentes y a la SB aparentemente normal. En cuanto a la localización, estos precursores gliales eran más abundantes en las lesiones cercanas a la ZSV respecto a las más remotas, como por ejemplo las localizadas a nivel cortical. Mediante el anticuerpo anti-Ki67 también se observó que algunas células progenitoras PSA-NCAM+ conservaban su capacidad proliferativa y podrían ser capaces de generar nuevos progenitores de oligodendrocitos y astrocitos en lesiones activas y crónicas activas (figura 5).

En resumen, este trabajo muestra una clara expansión y aumento de la proliferación celular en la ZSV en pacientes con EM. Los modelos de EAE muestran que tras insultos inflamatorios repetidos la capacidad proliferativa de la ZSV en EM puede claudicar, esta muestra de pacientes con EM de larga evolución parece demostrar que puede que persista cierta capacidad proliferativa; lamentablemente la limitación en la variabilidad de muestras con distintas edades de pacientes y tiempos de evolución de la enfermedad no permite extraer conclusiones respecto a los cambios evolutivos que puedan ocurrir durante el transcurso de la enfermedad, si esta activación puede verse agotada con el paso del tiempo, contribuyendo con ello al fracaso de la remielinización a largo plazo, con la consiguiente claudicación en la reparación del daño del SN y el acúmulo de discapacidad progresivo que observamos en casi el 35% de los pacientes. Por otro lado, aunque esta activación natural de progenitores neuronales y oligodendrocitos parece no ser suficiente para prevenir la claudicación del SN, su estimulación podría suponer una interesante diana terapéutica para conseguir la reparación del daño de mielina y la neurodegeneración, y con ello intentar cambiar la evolución de los pacientes a largo plazo [179, 183].

Figura 5. Modificado del artículo Nait-Oumesmar B et al. (2007). Activation of the subventricular zone in multiple sclerosis: evidence for early glial progenitors[182]. Figura 5.1 (A-G): Vista macroscópica y microscópica de la ZSV. La ZSV estudiada es la central, colindante al núcleo caudado, hasta la vena estriatal. En controles la ZSV mantiene su estructura, con la capa de células endoteliales adyacente al ventrículo lateral. En los pacientes con EM la capa correspondiente a la ZSV multiplica su grosor por 2,5 veces, mostrado con la doble flecha en controles (5.1.D) y pacientes con EM (5.1.E). Se han detectado células PCNA (células proliferantes), señaladas con punta de flecha, en la ZSV, más abundantes en pacientes con EM (5.1.G) respecto a controles (5.1.F). Figura 5.2 (H-J), aumento de densidad celular en pacientes con EM respecto a controles, con capacidad de proliferación (PCNA) y con expresión de marcadores implicados en oligodendrogénesis (SOX9). Figura 5.3, presencia de progenitores de oligodendrogénesis PSA-NCAM+ en las lesiones de EM, mayor en placas activas (A), seguido de crónicas-activas (CA), crónicas-silentes (CS), placas “shadow” (SP) y sustancia blanca aparentemente normal (NAWM); la presencia de estos precursores es mayor en zonas colindantes al ventrículo lateral, la ZSV y el estriado (St), respecto al córtex (Cx). Figura 5.3B, esquema de la ZSV de controles y pacientes con EM, siendo en pacientes mayor el grosor, la densidad de celular, la presencia de progenitores de oligodendrogénesis, además con disposición perpendicular, con capacidad de migración hacia la lesión circundante.



SVZ: zona subventricular, LV: ventrículo lateral, Ep: epéndimo, Cd: caudado, MS: esclerosis múltiple, PCNA (del inglés, proliferating cell nuclear antigen, célula proliferante), A: activa, CA: crónica-activa, CS: crónica-silente, SP (placa “shadow”), NAWM: del inglés, Normal Appearing White Matter, sustancia blanca aparentemente normal, Cx: córtex, St: estriado.

1.7 Estudio “in vivo” de la zona subventricular

Por razones obvias, el análisis “in vivo” de la neurogénesis y gliogénesis en humanos es difícil de obtener, por tanto, apenas disponemos de información sobre el comportamiento de la ZSV a lo largo de la evolución de las diferentes enfermedades neurodegenerativas.

En la actualidad disponemos de tecnología por RM que nos permite realizar una aproximación “in vivo” al estado estructural de la ZSV, lo que supone un enfoque prometedor para el estudio de las enfermedades neurodegenerativas. Sería posible que cambios microestructurales de la ZSV ocurrieran de forma paralela a la progresión de la patología de las distintas enfermedades, pudiendo constituir un marcador subrogado de progresión de la enfermedad.

Cherubini y cols [184] propusieron un protocolo de RM dirigido hacia la investigación de la zona periventricular en la enfermedad de Alzheimer, con potencial para detectar cambios microestructurales en la ZSV a lo largo de la evolución de la enfermedad.

Para ello se realizó la adquisición de la imagen en una máquina con imán de 3 Tesla con bovina estándar y se obtuvieron las secuencias ponderadas en T1, en corte sagital. Se realizó ajuste de un modelo de tensor de difusión a cada vóxel para obtener los mapas de FA y DM. Con un método de segmentación automatizada (utilizando la herramienta FIRST, del software FSL) se seleccionó en cada sujeto el contorno de los ventrículos laterales, núcleos caudados, tálamos e hipocampos, y se calculó la intersección entre los ventrículos laterales y las otras tres estructuras. Se definió la ZSV como la intersección entre el ventrículo lateral y el núcleo caudado, con un volumen laminar con grosor de 2 milímetros. También se calculó con el mismo volumen la intersección del ventrículo lateral con el tálamo y el hipocampo, para hacer estudios comparativos. Se calcularon los valores de FA y DM de estas tres regiones de interés (ROI), para cada sujeto y para cada hemisferio. En este estudio se demostró que en el área de intersección del ventrículo lateral y el caudado los valores de DM se incrementaban de forma significativa según evolucionaba la enfermedad, siendo menor en los pacientes con deterioro cognitivo ligero y mayores en los pacientes con enfermedad de Alzheimer establecida. En el resto de ROI no se encontraron diferencias. Por tanto, concluyeron que existen cambios en la microestructura de la

ZSV, expresados por incrementos progresivos de la DM, y que éstos podrían reflejar un defecto de la neurogénesis de la ZSV en relación con la progresión de la neurodegeneración existente desde el deterioro cognitivo leve hasta la enfermedad de alzheimer establecida.

En otro estudio de RM se evaluaron cambios estructurales de la ZSV en relación a la edad. Para ello se llevó a cabo el mismo protocolo de RM y se evaluó la ZSV en edad pediátrica, mediana edad y ancianos, en cada sujeto y para cada hemisferio. Se observó un descenso de los valores de FA e incremento de DM en paralelo al aumento de la edad, pero solo en la región correspondiente a la ZSV del lado izquierdo. Por tanto, se puede concluir que existen cambios en la estructura de la ZSV con la edad, que podrían ser reflejo de un fallo en la neurogénesis, responsable asimismo de la pérdida de volumen cerebral y neurodegeneración que sabemos que ocurre asociado al envejecimiento [185].

1.8 Dianas terapéuticas futuras en EM: Terapias neuroprotectoras y de remielinización.

La EM es una enfermedad inflamatoria en la que clásicamente se ha considerado que existe un insulto inicial a través de células T autorreactivas y macrófagos que dañarán directamente a la mielina y a los oligodendrocitos. Por otro lado, también se postula que pueda ocurrir un fallo inicial de los oligodendrocitos y de forma secundaria se desencadene en el daño inflamatorio, ya que se han visto lesiones en estadios iniciales de la enfermedad en las que existe muchos oligodendrocitos apoptóticos y escasos linfocitos T. Es una realidad la heterogeneidad de las lesiones en EM, descritas por Luchinetti, en la que ambos escenarios serían posibles.

La mielina no solo posee propiedades aislantes que mejoran la velocidad y eficacia de conducción axonal, sino que también proporciona un soporte trófico y metabólico necesario para el correcto funcionamiento y supervivencia del axón. En la EM hay un daño precoz de la mielina, lo cual conlleva de forma inexorable a una degeneración axonal difusa.

Se ha demostrado en modelos murinos que existe remielinización eficaz, y que esta se asocia a una recuperación funcional, lo que abre esperanza para el desarrollo de terapias remielinizantes. En la EM, tras ocurrir la remielinización, aparecen las placas “shadow”, con una tinción lipídica intermedia entre la SB normal y la placa desmielinizada, que traduce una mielina reparada, que es más delgada y dispersa respecto a la mielina original [186]. Lo que conocemos de la remielinización en EM es que es extremadamente variable, siendo eficaz en unos pacientes y ausente en otros. Esta variabilidad depende de factores genéticos e inmunológicos. Aproximadamente el 20% de los pacientes con EM presentan una remielinización eficaz, reparando en torno al 60% de sus placas; en contra, cerca de la mitad de los pacientes presentan menos del 10% de placas reparadas [181]. La mayor capacidad de remielinización se asocia a una menor discapacidad, y no solo a nivel de SB, sino también a nivel de SG, cuya recuperación se asocia a mejoría de discapacidad cognitiva y física [187].

En estadios iniciales de la enfermedad el daño desmielinizante se puede reparar de forma eficaz pero conforme evoluciona la enfermedad se ha visto que los mecanismos de reparación fracasan, lo cual se ha correlacionado con un mayor daño axonal secundario y, por tanto, acúmulo progresivo de discapacidad en los pacientes.

Además se debe tener en cuenta que la remielinización es un fenómeno edad-dependiente, que fundamentalmente ocurre en los primeros 10 años de evolución de la enfermedad o cuando el paciente no supera los 55 años de edad [188].

Este fallo en la remielinización se debe fundamentalmente a dos fenómenos, por un lado al fallo a nivel de los precursores de oligodendrocitos, con incapacidad de reclutamiento de nuevos progenitores hacia el lugar de la lesión y de diferenciación a oligodendrocitos maduros y, por otro lado, a la menor capacidad de “limpieza” por fallo en la fagocitosis de los inhibidores de la mielina creados en el ambiente inflamatorio de las lesiones de la enfermedad. Además de estos dos factores también se produce una insuficiencia de factores regeneradores derivados de la respuesta inmunológica que ocurre en la enfermedad [187].

En este sentido, se han desarrollado estrategias para promover la remielinización en EM. Por un lado, con el objetivo de promover el reclutamiento de precursores de oligodendrocitos y su diferenciación a oligodendrocitos maduros en el lugar de la lesión; ejemplos de moléculas ensayadas y que han demostrado promover la

remielinización in vitro o in vivo son: bntropina, quetiapina, clemastina, miconazol o clobetasol. La segunda estrategia es eliminar a los inhibidores de la remielinización presentes en las lesiones, que impiden la diferenciación de precursores de oligodendrocitos. Se trata de una vía compleja dada la existencia de múltiples inhibidores que actúan a distintos niveles en el microambiente lesionado, por lo que es difícil que una única molécula que actúa sobre una única vía pueda ser realmente eficaz [187].

En las últimas décadas se han desarrollado moléculas novedosas como opicinumab, un anticuerpo monoclonal dirigido contra LINGO-1, que es un regulador negativo de la proliferación de oligodendrocitos y la remielinización; se demostró en modelos animales que su inhibición era eficaz para incrementar la diferenciación de precursores de oligodendrocitos y conseguir una remielinización eficaz, pero los resultados en pacientes con EM y neuritis óptica arrojaron resultados controvertidos en este sentido; sí se demostró aumentar los impulsos eléctricos, pero no una mejoría del pronóstico visual, alteración cognitiva ni discapacidad [187, 189]. A destacar que estos ensayos clínicos tienen una duración de 2 años, por lo que quizá sea un periodo corto para poder ver resultados clínicos positivos en este sentido.

También se han estudiado moléculas ya conocidas, como inhibidores de receptor de acetilcolina o dopamina, que también han demostrado promover la remielinización en modelos animales. Clemastina y quetiapina se están explorando en ensayos clínicos en EM. También se está estudiando altas dosis de biotina como posible terapia remielinizante en EM para EMP [187].

Por último, las terapias celulares son prometedoras para facilitar la reparación neurológica en distintas enfermedades degenerativas y en las últimas décadas se han investigado terapias a partir de cultivos celulares de precursores de oligodendrocitos o células madre, con el fin de conseguir nuevas fuentes de oligodendrocitos maduros y remielinización axonal [175, 179, 183].

Dentro de las enfermedades degenerativas del SNC, la EM es buena candidata para realizar terapia celular, porque aunque se trata de una enfermedad con degeneración axonal, es considerada inicialmente como una enfermedad desmielinizante. Crear nueva mielina para recubrir los axones desmielinizados y evitar que sean dañados, supone un escenario más favorable que el de la propia reparación neuronal [190]. El objetivo de la terapia celular en EM es prolongar la remielinización endógena en

estadios crónicos de la enfermedad, promoviendo la supervivencia, migración, diferenciación y duración de las células progenitoras; o la implantación de nuevas células previamente preparadas in vitro, que se conviertan en oligodendrocitos funcionales. Estas estrategias deben implantarse antes de que el daño axonal sea manifiesto. También se plantean estrategias en las que se pueda manipular el ambiente de las lesiones crónicas, haciéndolo de nuevo susceptible para que tenga lugar la remielinización eficaz. Conseguir este objetivo hasta estadios avanzados de la enfermedad sería un mecanismo fundamental para prevenir la discapacidad de los pacientes a largo plazo [191, 192].

Existen células madre pluripotentes residentes en el SNC, las células madre neuronales, con capacidad conocida para generar nuevas neuronas y células gliales. La ZSV es un nicho del SN donde residen estas células, incluido en cerebros de humanos adultos. En cerebros de animales los precursores neuronales migran a través del tracto migratorio rostral hasta el bulbo olfatorio, y, en adultos, fundamentalmente lo hacen hacia el estriado. Los precursores de células gliales migran fundamentalmente hacia el cuerpo calloso [191, 193].

La capacidad de oligodendrogénesis de la ZSV se ve claramente incrementada ante un daño desmielinizante. Este proceso es de alta complejidad y está regulado de forma heterogénea a distintos niveles, con diferencias en la expresión génica a nivel regional e intracelular [194].

Esta capacidad de oligodendrogénesis de la ZSV contribuye de forma significativa a la remielinización tal cual se ha demostrado en diferentes modelos de EAE o modelo de cuprizone [195]. Se ha demostrado mayor densidad de oligodendrocitos derivados de células madre neuronales en áreas del cuerpo calloso cercanas a la ZSV. Sin embargo, pese a la existencia de nuevos oligodendrocitos maduros a partir de células madres pluripotenciales, parece que ante determinado daño inflamatorio, éstos son incapaces de formar una vaina de mielina eficaz.

Las células madre de estirpe neural pueden ser manipuladas como estrategia para incrementar su potencial de oligodendrogénesis. Existen ejemplos con la sobreexpresión viral del factor Olig2, que tras conseguir infectar a las células de la ZSV se observó un gran aumento de migración de oligodendrocitos maduros al cuerpo

calloso o el aumento del número de axones mielinizados también en el cuerpo calloso. Otros estudios más recientes han demostrado mediante otros factores estimulantes la promoción de neurogénesis en la ZSV y el aumento de mielinización [195]. Todos estos factores estimulantes de la neurogénesis y oligodendrogénesis a través de células madres neurales tienen potencial como futuras dianas terapéuticas en enfermedades como la EM.

2. JUSIFICACIÓN DEL ESTUDIO

En base a la información de la que disponemos, podemos concluir que en la EM existe:

- Actividad inflamatoria persistente en el LCR, demostrada por la presencia de BOC.
- Acúmulo progresivo de lesiones desmielinizantes, fundamentalmente localizadas en las áreas bañadas por el LCR (lo supone la afectación de regiones cercanas a la ZSV).
- Daño axonal difuso presente desde el inicio de la enfermedad, con pérdida progresiva de volumen cerebral.
- Evidencia del fracaso de los mecanismos de remielinización a largo plazo.
- Pérdida de la capacidad de compensación funcional del daño a lo largo de la evolución de la enfermedad, dando lugar al acúmulo progresivo de discapacidad en los pacientes.

Por otro lado, tenemos suficiente evidencia que la ZSV es una región con capacidad proliferativa en adultos, en base a que:

- Existe producción tanto de nuevas neuronas como de células gliales, con capacidad migratoria.
- Existen cambios en la ZSV en relación al daño producido en enfermedades neurodegenerativas, como la Enfermedad de Alzheimer, Huntington o Parkinson.
- Se ha sugerido que la ZSV está activada en EM, con mayor proliferación y producción de posibles nuevas células gliales, en estudio transversal de cerebros de pacientes.
- Existen cambios progresivos en la ZSV en relación con el empeoramiento del deterioro cognitivo de los pacientes con Enfermedad de Alzheimer, en estudio realizado “in vivo” mediante RM.

Disponemos de tecnología que nos permite estudiar “in vivo” la ZSV (mediante los valores de FA y CDA obtenidos por RM de difusión).

Partiendo de estos fundamentos, sabemos que la degeneración axonal y el acúmulo de lesiones responsables de la discapacidad tardía de los pacientes con EM ya están presentes desde el inicio en la enfermedad, ¿Podría ser entonces que cambios reactivos en la ZSV estuvieran compensando el daño inicial? Y si esto fuera así, ¿A qué se debe

y por qué se pierde la capacidad inicial de compensación del SNC, responsable de progresión de discapacidad tras 10-15 años de evolución de la enfermedad?

Toda esta información nos lleva a plantearnos el presente estudio, diseñado para investigar los cambios producidos en la ZSV a lo largo de la evolución de los pacientes con EM.

Pretendemos investigar la posible correlación entre la progresiva afectación de la ZSV con la pérdida de capacidad para compensar los déficits neurológicos producidos en la EM, secundarios tanto al acúmulo de lesiones desmielinizantes como a la degeneración axonal difusa expresada por la pérdida de volumen cerebral.

Este hallazgo nos permitiría establecer un nuevo escenario con posibilidad de cuantificar procedimientos dirigidos hacia la neuroprotección y la reparación del tejido afecto en la EM.

3. HIPÓTESIS

Existe una destrucción progresiva del tejido del SNC presente desde el principio de la enfermedad en la mayoría de los pacientes con EM, así como la evidencia de mecanismos de compensación que no permiten el diagnóstico de la progresión hasta que esta se manifiesta clínicamente, es decir, cuando ya han pasado muchos años desde las manifestaciones iniciales y los mecanismos de lesión tisular están plenamente establecidos.

La hipótesis de la presente tesis doctoral se basa en la existencia de cambios en la ZSV en los pacientes con EM, que pueden estar en relación con el fallo de los mecanismos de reparación neuronal/glial, expresado por la pérdida de capacidad de compensación funcional del SNC y, en consecuencia, por la aparición de discapacidad progresiva de los pacientes.

La detección de estos cambios en la ZSV supondría un marcador subrogado de pronóstico de discapacidad en EM.

4. OBJETIVOS

1. Establecer si existen cambios en la estructura de la ZSV en los pacientes con EM mediante estudios de RM.
2. Establecer si existe correlación entre los cambios de la ZSV y la aparición de progresión sostenida e irreversible de discapacidad en los pacientes con EM, medida por la escala EDSS.
3. Analizar si existe relación entre la alteración de la ZSV y el acúmulo de volumen de carga de lesiones en los pacientes con EM.
4. Analizar si existe relación entre la alteración de la ZSV y otros parámetros radiológicos de neurodegeneración, como la pérdida de volumen cerebral (estudiando los siguientes parámetros: volumen cerebral global, volumen de sustancia gris, volumen de sustancia blanca, fracción de parénquima cerebral).
5. Establecer si existe relación entre los cambios de la ZSV y el fallo en los mecanismos de compensación en los pacientes con EM, medidos por RM funcional.

5. PACIENTES Y MÉTODOS

5.1. Diseño del estudio

Estudio transversal de la ZSV mediante RM de alta definición en una muestra representativa de pacientes con EM, tanto EMRR como EMSP, con distintos tiempos de evolución de la enfermedad.

Todos los participantes firmaron el consentimiento informado del estudio y el protocolo fue aprobado por el comité de ética del Hospital Universitari i Politècnic La Fe (Valencia).

5.2. Criterios de selección de pacientes

De un total de 1200 pacientes seguidos de forma prospectiva por la Unidad de Esclerosis Múltiple del Hospital Universitari i Politècnic La Fe en 2014, se seleccionó una muestra representativa de pacientes con EM según los siguientes criterios de selección:

- Pacientes mayores de 18 años de edad.
- Pacientes diestros.
- Diagnóstico de EM en base a los criterios de McDonald 2010.
- No estar diagnosticados de EM primaria progresiva.
- Pacientes capaces de entender y firmar el consentimiento informado del estudio.

Se seleccionó una muestra de 40 pacientes consecutivos en base a dichos criterios, tanto EMRR como EMSP, agrupados según el tiempo de evolución de la enfermedad desde el primer brote, en intervalos de 6 años de la siguiente forma:

- Tiempo de evolución de la enfermedad de menor de 6 años: 10 pacientes.
- Tiempo de evolución de la enfermedad entre 7-12 años: 10 pacientes.
- Tiempo de evolución de la enfermedad entre 13-18 años: 10 pacientes.
- Tiempo de evolución de la enfermedad entre 19-24 años: 10 pacientes.

Por otro lado, se seleccionó una muestra de 11 controles sanos, también diestros, emparejados con los pacientes según edad y sexo.

Por tanto, se seleccionó un total de 51 personas a estudiar.

5.3. Recogida de información

Se recogieron las siguientes variables demográficas y clínicas:

- Sexo.
- Fecha del primer brote de la enfermedad.
- Edad al diagnóstico de la enfermedad y en el momento de realizar la RM.
- Estudio de bandas oligoclonales en LCR.
- Número de brotes de la enfermedad sufridos hasta el momento de realizar la RM.
- Tratamientos modificadores de la enfermedad recibidos.
- Tiempo de evolución de la enfermedad en el momento de realizarse la RM.
- Discapacidad medida por EDSS en el momento del diagnóstico y al realizarse la RM.

5.4. Metodología de imagen por resonancia magnética

A todos los sujetos se les realizó una RM en equipo de 3 Tesla (Achieva Philips Cuidado de la Salud, Best, Países Bajos), utilizando una bobina de cabeza de 32 canales. Se adquirió una secuencia por tensor de difusión (DTI, del inglés diffusion tensor imaging) de alta resolución, con los siguientes parámetros (32 direcciones, valor-b=1300, TR=7000ms, TE=75ms, FA=90°, 66 cortes, vóxel 1.58x1.58x2, NEX=1). Paralelamente, y con el fin de disponer de una referencia anatómica de alta resolución para la delimitación de la zona subventricular, se adquirió una secuencia eco de gradiente T1-3D con los siguientes parámetros (TR=11.83ms, TE=5.77ms, FA=8°, 264 cortes, vóxel 0.48x0.48x0.50, NEX=1).

Asimismo, se adquirieron también imágenes de RM funcional con contraste BOLD mientras el paciente realizaba una tarea motora de movimiento de mano (ver descripción del paradigma más adelante). La secuencia de adquisición fue eco-planar, con los siguientes parámetros: 2D multicorte potenciada en T2*, con un TR = 2000 ms, TE = 30 ms, cortes contiguos de 3.5 mm de espesor, ángulo de excitación = 90°, NEX = 1. El tamaño del píxel adquirido fue de 1.61 mm x 1.61 mm. Las imágenes se

obtuvieron con supresión espectral de la grasa para minimizar los artefactos por desplazamiento químico. Cada bloque dinámico de imágenes consistió en 40 cortes transversales con una orientación paralela a la línea comisura anterior-comisura posterior, lo que permitió una cobertura de la totalidad del sistema nervioso central intracraneal con una resolución temporal de 2 segundos. En total, se adquirieron 80 bloques dinámicos con un tiempo de adquisición global de 2 minutos y 40 segundos.

5.4.1. Delimitación de la zona subventricular

Para delimitar la ZSV se usó la imagen T1 de alta resolución, utilizando un método semiautomático. Se realizaron los mapas de segmentación de ventrículos laterales de forma manual en todos los sujetos utilizando el programa MIPAV (Medical Image Processing Analysis and Visualitation; versión 7.0.1) y la delimitación de los núcleos caudados de forma automática mediante los programas FSL (FMRIB Software Library, Universidad de Oxford) y SPM8 (Wellcome Institute, Londres). Siguiendo la metodología de Cherubini y cols [184], se delimitó la ZSV para cada sujeto y para cada hemisferio cerebral, quedando definida como la intersección entre las astas anteriores de los ventrículos laterales y ambos núcleos caudados, utilizando un método de contracción-dilatación con un volumen laminar de grosor de 2 mm y estableciendo como límite posterior la coordenada correspondiente al foramen de Monro.

5.4.2. Cálculo de coeficiente de difusión aparente y fracción de anisotropía de zona subventricular.

Para cada sujeto se calcularon los mapas de FA y CDA mediante la herramienta FDT (del inglés, FMRIB Diffusion Toolbox), del FSL. Posteriormente, se multiplicó cada mapa por la ROI de la ZSV para cada sujeto y cada hemisferio cerebral. Al tratarse de una zona de la SG colindante al LCR y presentar valores de brillo muy dispares, se realizó un análisis con diversos descriptores estadísticos (media, mediana, asimetría de histograma y curtosis del histograma, y todos ellos de forma robusta), eliminando valores espurios (*outliers*), definidos como aquellos valores fuera del rango de 2 veces la desviación estándar (SD, del inglés standard deviation). Figura 6.

5.4.3. Cálculo de volumen de lesiones.

Se realizó una segmentación manual corte a corte de las lesiones de los pacientes utilizando las secuencias T2, mediante el programa MIPAV (Medical Image Processing Analysis and Visualitation; versión 7.0.1), obteniendo la superficie global de las lesiones para posteriormente calcular automáticamente el volumen lesional en milímetros cúbicos (figura 7). Con este mismo programa se creó una máscara de lesiones y posteriormente con la herramienta Lesion Filling se combinaron estas máscaras binarias con las imágenes 3D originales para generar nuevas imágenes 3D con las áreas lesionadas “rellenadas” con intensidades de los vóxeles de sustancia blanca adyacentes.

5.4.4. Cálculo de volumen cerebral.

Se llevó a cabo el flujo de trabajo estándar de una metodología automatizada de obtención de parámetros de atrofia cerebral. Para el cálculo del volumen cerebral total, volumen regional de SG y SB, volumen de LCR y FPC, se utilizó la herramienta CAT (del inglés, Computational Anatomy Toolbox). En la figura 8 se muestra un ejemplo de un paciente de la muestra. Se trata de una extensión del software SPM, que supone un conjunto de funciones y subrutinas basadas en MATLAB. CAT usa la morfometría basada en vóxel para realizar la estimación del volumen de un compartimiento de tejido específico. El método empleado incluye diferentes procesos: registro espacial a un cerebro de referencia, segmentación y clasificación de los tejidos (SB, SG y LCR) y la corrección del bias field (variaciones de intensidad y contraste a causa de artefactos susceptibles o a la no homogeneidad del campo en el momento de realizar la RM). Por último, es necesario obtener los valores de volumen para la imagen original, para ello a la segmentación se le realiza la transformación inversa llevándola del espacio de referencia al espacio original.

5.4.5. Análisis de resonancia funcional.

La tarea realizada por los sujetos fue la flexión-extensión de dedos I-IV de mano derecha de forma rítmica (metrónomo de 1 Hz), llevada a cabo con los ojos cerrados y monitorizados (para observar que no realizaran otros movimientos adicionales). Se utilizó un paradigma motor consistente movimientos simples de la mano derecha para pacientes (todos ellos diestros), dado que este paradigma proporciona valores estables y altos de activación.

Los datos fueron analizados mediante el programa SPM. En un primer paso, las imágenes de RM funcional de cada sujeto se realinearon tomando como referencia el primer dinámico, con el objetivo de corregir los posibles efectos asociados al movimiento involuntario de la cabeza durante el tiempo del estudio.

Posteriormente, con el objetivo de minimizar las diferencias macroscópicas y posibilitar un análisis conjunto de todos los sujetos, las imágenes se transformaron a un espacio estándar mediante la normalización respecto a una plantilla eco-planar (MNI, Montreal Neurological Institute). Seguidamente, y para corregir los desfases temporales entre el primer y último corte de cada dinámico, se aplicó una corrección temporal (slice timing) tomando como referencia el corte central de cada volumen. Finalmente, la intensidad de las imágenes normalizadas se suavizó en base a un núcleo tridimensional gaussiano con una anchura máxima a mitad de altura (Full Width at Half Maximum, FWHM) de 8 x 8 x 8 mm, con el objetivo de optimizar la relación señal-ruido aproximando los datos a una distribución normal y minimizando la potencial variabilidad entre sujetos.

A partir de las imágenes de RM funcional procesadas, para cada región anatómica definida en el atlas AAL (del inglés, Automated Anatomical Labeling) [196] se obtuvo un valor PSC. Este valor corresponde a los incrementos/decrementos porcentuales (relativos) de la señal funcional, con lo que obtenemos un valor único que marca la diferencia de activación de un área en estado de reposo y al realizar la tarea motora. Para evitar valores espurios, de cada región cerebral se obtuvo la media, mediana, desviación, curtosis, asimetría y percentil 95 de los datos. Se calcularon además todos los valores de forma “robusta”, descartando aquellos valores 2 veces por encima/debajo de la media.

Posteriormente se umbralizaron los datos para considerar si un área está activada de forma significativa o no, utilizando dos valores diferentes:

- El valor de 0,1, que es el valor correspondiente a la media de las diferentes medias del porcentaje de activación de cada área, en todos los sujetos estudiados.
- El valor de 0,5, que el valor correspondiente a la media de las diferentes medias del porcentaje de activación de cada área, en todos los sujetos estudiados, más el valor correspondiente a dos desviaciones estándar.

5.5. Análisis estadístico

El análisis estadístico se realizó mediante los programas SPSS v21.0 (Statistical Package for the Social Sciences, Chicago, IL, EEUU) y GraphPad Prism v6.0c (La Jolla, CA, EEUU).

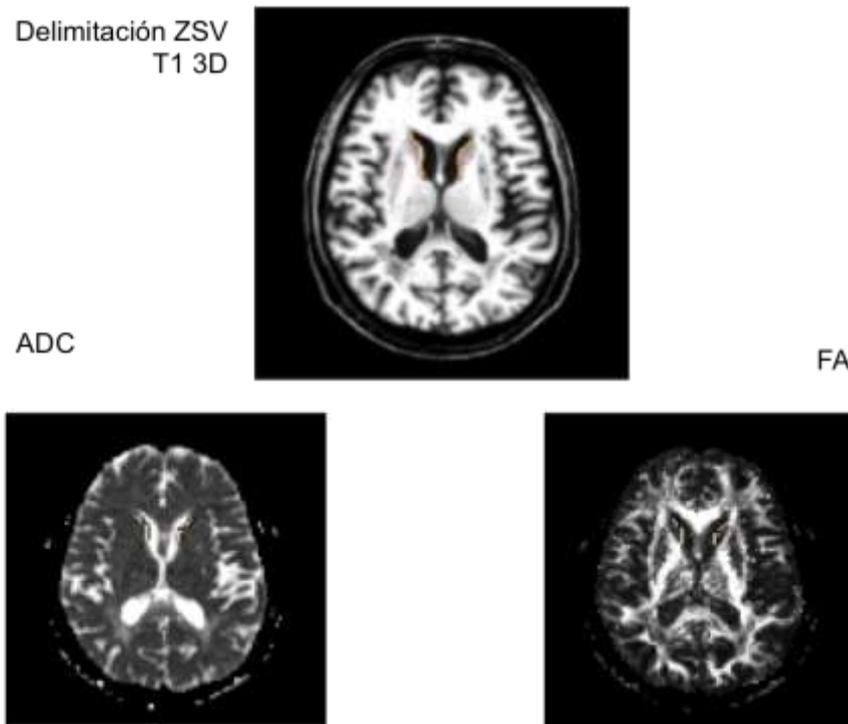
Las variables se compararon mediante tests paramétricos si cumplían con la normalidad. En caso contrario, ante la sospecha de una distribución no normal o para comparaciones de muestras reducidas ($n < 30$ sujetos), se usaron tests no paramétricos. Todos los tests se ajustaron por edad y sexo.

Para las comparaciones intragrupo de CDA y FA de la ZSV se utilizaron los test de U de Mann Whitney y/o Kruskal Wallis en función de las variables a comparar.

Para detectar asociaciones lineales entre CDA y FA con variables de volumen cerebral o carga lesional se utilizó el coeficiente de correlación de Pearson, y para la EDSS el test de rangos de Spearman.

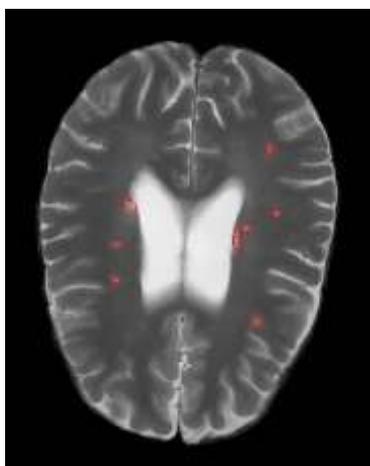
Finalmente se realizó un estudio de regresión lineal multivariante para ajuste de variables explicativas de los cambios observados en los valores de FA de la ZSV.

Figura 6. Estudio de difusión por RM. Delimitación semiautomática del espacio definido como zona subventricular en secuencia T1 3D. Cálculo de parámetros de difusión, CDA y FA para cada hemisferio cerebral.



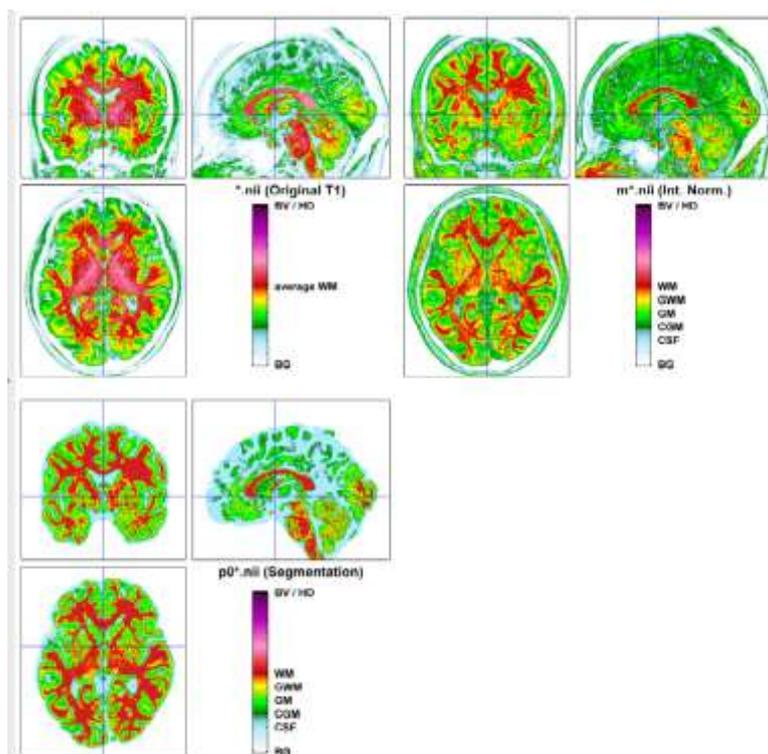
ZSV: zona subventricular; ADC: coeficiente de difusión aparente (del inglés, apparent diffusion coefficient); FA: fracción de anisotropía.

Figura 7. Ejemplo de cálculo de volumen de lesiones en T2 realizado de forma semiautomática con programa MIPAV. En la figura se muestra como se ha señalado de forma manual las lesiones de la enfermedad presentes en un paciente de la muestra.



MIPAV: Medical Image Processing Analysis and Visualitation

Figura 8. Ejemplo de estudio volumétrico cerebral realizado con herramienta CAT (del inglés, Computational Anatomy Toolbox). Estudio de volumen cerebral global, y regional (sustancia blanca, sustancia gris).



6. RESULTADOS

6.1. Características de la cohorte del estudio

Se estudiaron un total de 51 sujetos, 40 pacientes y 11 controles, ajustados por edad y sexo. La muestra se compuso por 34 mujeres (66,7%) y 17 hombres (33,3%), con una edad media al primer brote de 31,5 años (DE: 9,23). La edad media en el momento de realizar la RMN fue de 44,8 años (DE: 8,57), con un tiempo medio de evolución de la enfermedad de 13,26 años (DE: 7,23) en el grupo de pacientes.

Se comprobó que no existían diferencias en cuanto a edad ($p=0,77$) y sexo ($p=0,10$) entre el grupo de pacientes y controles (tabla 1). Las variables demográficas del total de la muestra y divididas en los subgrupos de pacientes en función del fenotipo clínico y los controles quedan expuestas en la tabla 2.

Respecto a las formas clínicas, 29 pacientes correspondieron a forma EMRR y 11 pacientes a forma EMSP. La mediana de número de brotes previos sufridos en el momento de realizar la RMN fue de 3 (RIQ: 2-4). El 86,1% de los pacientes recibió algún TME.

En cuanto a la discapacidad en el momento del diagnóstico de los pacientes, la puntuación mediana en la escala EDSS fue de 2,5 (RIQ: 2,3-3,5) y en el momento de realizar la RMN de 2,5 (RIQ: 1-4).

Se obtuvieron datos de LCR en 23 pacientes (57,4% de la muestra), objetivando la presencia de BOC tipo IgG en el 73,9% y tipo IgM en el 36,4% de los pacientes.

Los pacientes fueron estratificados según el tiempo de evolución en los siguientes grupos:

- 0-6 años: 10 pacientes
- 7-12 años: 10 pacientes
- 13-18 años: 10 pacientes
- 19-24 años: 10 pacientes

Los datos los referentes a los distintos grupos de pacientes agrupados en función del tiempo de evolución en el momento de realizar la RM quedan expuestos en la tabla 3.

Tabla 1. Sexo y edad de los sujetos de la muestra en el momento de realizar la RM. No existieron diferencias estadísticas entre los pacientes y los controles.

	Controles	Pacientes	Valor p
Edad al realizar la RM (DE)	45,6 (14,8)	44,6 (8,6)	0,77
Sexo (H/M); (%mujeres)	5/6 (54,5%)	11/28 (71,8%)	0,10

Valor p: U de Mann Whitney, DE: desviación estándar, H: hombre, M: mujer.

Tabla 2. Variables demográficas del total de la muestra de pacientes y controles. Variables demográficas y clínicas de pacientes divididas en función del fenotipo clínico, EMRR o EMSP.

	Pacientes total (n=40)	EMRR (n= 29)	EMSP (n=11)	P*	Control (n=11)
Edad al Dx, años (DE)	31,6 (9,3)	31,8 (9,7)	31,2 (8,5)	0,86	
Edad a la RM	44,6 (8,6)	42,7 (8,6)	50,2 (6,1)	0,85	45,6 (14,8)
Sexo H/M (% M)	11/28 (71,8%)	9/20 (69%)	2/8 (80%)	0,2	5/6 (54,5%)
BOC IgG, (%positivas)	17/23 (73,9%)	14/19 (73,7%)	3/4 (75%)	0,23	
BOC IgM, %positivas (n)	4/11 (36,4%)	3/8 (37,5%)	1/3 (33,3%)	0,82	
Brotos previos (RIQ)	3 (2-4)	3 (2-4)	3,5 (3-7)	0,08	
TME recibidos (DE)	0,9 (0,3)	0,9 (0,3)	0,6 (0,5)	0,03	
EDSS al diagnóstico	2,5 (1,3-3,5)	2 (1-2,5)	3,5 (3-4,1)	< 0,001	
EDSS a la RM	2,5 (1-4)	2 (1-3,3)	5,0 (4,4-6,8)	< 0,001	
Tiempo de evolución, años (RIQ)	12,5 (6-19,8)	10,6 (5,6-16,2)	20,9 (16,4-23,3)	0,002	
Volumen de lesiones	4755,1 mm ³ (1812,7-10367,4)	3127,3 mm³ (1395,8-5177,8)	12017,5 mm³ (9049,6-26358,5)	< 0,001	
Fracción parénquima cerebral	74,3 (72-76,8)	75,6 (73,8-77,9)	69,6 (67,5-72,7)	0,004	77,9 (74,5-78,5)

EMRR: esclerosis múltiple remitente recurrente, EMSP: esclerosis múltiple secundaria progresiva, Dx: diagnóstico, RM: resonancia magnética, H: hombre, M: mujer, BOC: bandas oligoclonales, RIQ: rango intercuartílico, TME: tratamiento modificador de la enfermedad, DE: desviación estándar, *U de Mann Whitney.

Tabla 3. Variables demográficas y clínicas de pacientes divididas en función del tiempo de evolución de la enfermedad.

	Tiempo evolución 0-6 años (n=10)	Tiempo evolución 7-12 años (n=10)	Tiempo evolución 13-18 años (n=10)	Tiempo evolución 19-24 años (n=10)	P*
Edad al Dx, años (DE)	38,2 (10,6)	33,5 (9,5)	29,6 (5,5)	25,9 (7,7)	0,04
Edad a la RM	41,9 (9,6)	42,8 (10,2)	45,3 (6,2)	48,1 (8,0)	0,54
Sexo H/M (% M)	3/7 (70%)	3/7 (70%)	5/5 (50%)	1/9 (90%)	0,26
BOC IgG, (%positivas)	5/6 (83,3%)	6/7 (85,7%)	1/4 (25%)	5/6 (83,3%)	0,93
BOC IgM, (%positivas)	1/4 (25%)	0/1 (0%)	1/2 (50%)	2/4 (50%)	0,31
Brotos previos (RIQ)	2 (1,5-3)	2 (1,5-3)	4 (3,3-5,5)	4 (3-7)	0,01
TME recibidos (DE)	0,9 (0,4)	1 (0,0)	1 (0,0)	0,6 (0,5)	0,02
EDSS al diagnóstico (RIQ)	2 (1,3-3,3)	2 (1-2,6)	3 (1,3-3,5)	3 (2,1-4,1)	0,34
EDSS a la RM (RIQ)	1 (1-3,3)	2 (1-2,5)	3,3 (1,4-4)	5 (3,5-6,7)	0,03
Forma clínica (EMRR/EMSP)	9/1	10/0	8/2	3/7	0,002
Volumen de lesiones (RIQ)	1955,3 mm ³ (224,5-14741,5)	2661,8 mm ³ (1751,0-5051,8)	4755,1 mm ³ (1844,9-6555,4)	11822,7 mm ³ (4926,3-26358,5)	0,03
Fracción parénquima cerebral (RIQ)	76,7 (75,5-79,1)	74,4 (73,7-78,3)	73,4 (70,4-76,9)	70,9 (67,5-74,3)	0,02

EMRR: esclerosis múltiple remitente recurrente, EMSP: esclerosis múltiple secundaria progresiva, Dx: diagnóstico, RM: resonancia magnética, H: hombre, M: mujer, BOC: bandas oligoclonales, RIQ: rango intercuartílico, TME: tratamiento modificador de la enfermedad, DE: desviación estándar, *H de Kruskal-Wallis.

A todos los sujetos se les realizó la RM con las secuencias previstas. Se adquirieron un total de 51 RM, pero posteriormente se descartaron tres estudios por presentar problemas en las secuencias de DTI, obteniendo valores inconsistentes en la reconstrucción. Por tanto, finalmente dispusimos de estudio de difusión (FA y CDA) en 48 sujetos (38 pacientes y 10 controles).

6.2. Análisis de la zona subventricular

Para cada mapa de FA y CDA se midió la media, desviación estándar, mediana, asimetría y curtosis del histograma. Los valores medios y desviación estándar de FA y CDA correspondiente a la ZSV separados por hemisferios cerebrales (derecho e izquierdo), quedan reflejados en la tabla 4.

Tras analizar los valores del estudio de difusión por RM cerebral, FA y CDA, se objetivaron valores de FA significativamente mayores en la ZSV del hemisferio izquierdo de los pacientes respecto a los controles, en todos los estadísticos descriptivos analizados (Tabla 4 y figura 9).

No se encontraron diferencias significativas en los valores de FA del lado derecho ni en los valores de CDA de ambos hemisferios entre el grupo de pacientes y controles, en ninguno de los estadísticos descriptivos analizados.

Aunque las diferencias no fueron estadísticamente significativas, si que se objetivó una tendencia a presentar distintos valores de FA en función de la forma clínica de la enfermedad, siendo menores los valores en las formas EMRR y mayores en las formas EMSP, lo que implica un incremento de los valores de FA en pacientes con mayor tiempo de evolución de la enfermedad y mayor discapacidad (figura 10).

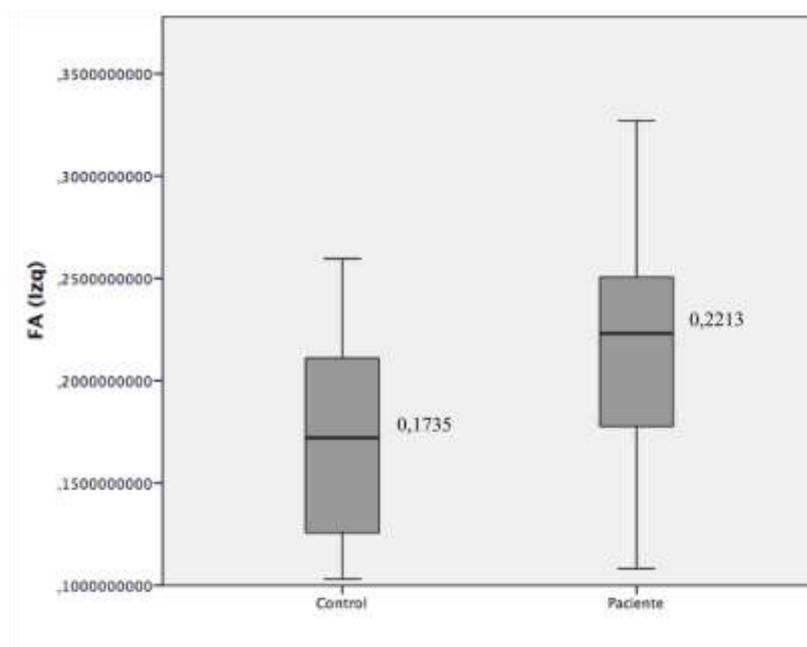
No se pudieron demostrar diferencias estadísticamente significativas entre los valores de FA y CDA de los diferentes grupos de pacientes estratificados según el tiempo de evolución de la enfermedad ni se pudo demostrar la correlación entre los valores de FA y CDA y la discapacidad medida por la escala EDSS.

Tabla 4. Valores medios y desviación estándar del estudio de difusión de la ZSV por RM: CDA y FA, separadas por hemisferios cerebrales (D, derecho; I, izquierdo). Observamos valores significativamente mayores de FA en el hemisferio izquierdo de los pacientes respecto a los controles (en negrita). En el resto de parámetros no existen diferencias significativas.

	ADC-D (DE)	ADC-I (DE)	FA-D (DE)	FA-I (DE)
Controles	9,92 x 10 ⁻⁴ (1,66 x 10 ⁻⁴)	9,28 x 10 ⁻⁴ (2,17 x 10 ⁻⁴)	0,1757 (0,0280)	0,1735 (0,04986)
Pacientes	11,80 x 10 ⁻⁴ (3,55 x 10 ⁻⁴)	8,22 x 10 ⁻⁴ (2,76 x 10 ⁻⁴)	0,1671 (0,0542)	0,2213 (0,0519)
Valor p*	0,112	0,266	0,632	0,013

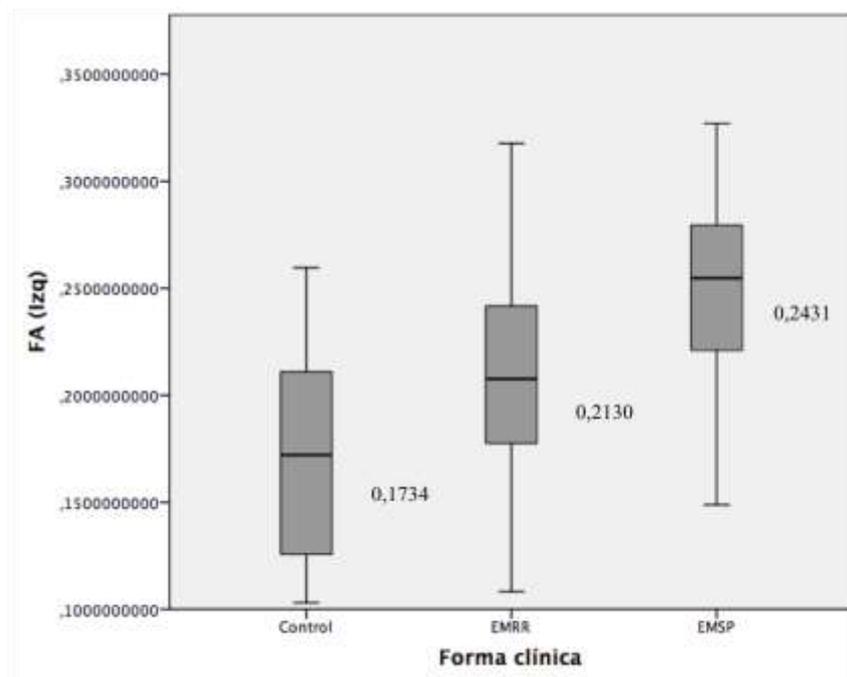
Valor p: U de Mann Whitney, ADC: coeficiente de difusión aparente. D: derecho, I: izquierdo, FA: fracción de anisotropía.

Figura 9. Representación gráfica del aumento significativo del valor de FA de la ZSV correspondiente al hemisferio cerebral izquierdo de pacientes con EM respecto a controles (p=0,013).



FA: fracción de anisotropía, Izq: izquierda

Figura 10. Representación gráfica de la tendencia al aumento del valor de la FA de la ZSV correspondiente al hemisferio cerebral izquierdo de pacientes con EMSP, respecto a pacientes EMRR y controles (diferencias estadísticamente no significativas).



FA: fracción de anisotropía, Izq: izquierda, EMRR: esclerosis múltiple remitente recurrente, EMSP: esclerosis múltiple secundaria progresiva.

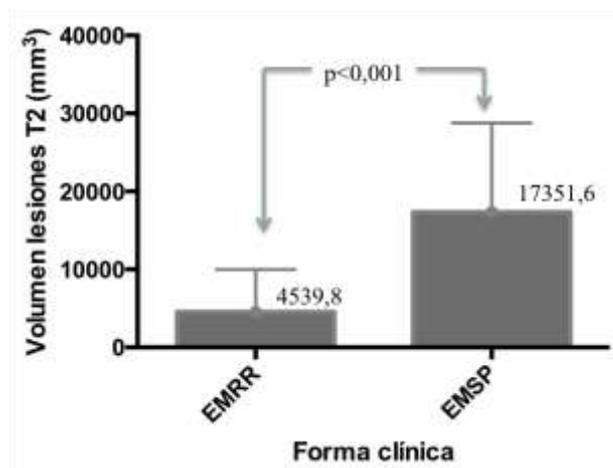
6.3. Análisis de volumetría de lesiones y parénquima cerebral

Se calculó el volumen de lesiones en secuencia T2 en todos los pacientes. La media de volumen lesional en el conjunto global de pacientes fue de 8045,7 mm³, y por separado según la forma clínica, fue de 4827,3 mm³ en el grupo de EMRR y de 17351,6 mm³ en el de EMSP; siendo estas diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,001$). Datos reflejados en la figura 11. También se objetivó un volumen de lesiones significativamente mayor en relación a la mayor discapacidad medida por EDSS (Rho de Spearman 0,73; $p < 0,001$) y al mayor tiempo de evolución de la enfermedad ($p < 0,001$).

En cuanto al volumen cerebral, éste también fue significativamente menor en pacientes respecto a controles, tanto a nivel global como regional, de SG y SB. Según subgrupos, los pacientes SP tuvieron un menor volumen cerebral respecto a los pacientes RR, siendo esta diferencia estadísticamente significativa tanto para el volumen cerebral global, como para el volumen de SG, SB y para la FPC ($p < 0,001$). Los datos quedan reflejados en la tabla 5 y figura 12. La pérdida de volumen cerebral global y regional también fue mayor en los pacientes con mayor discapacidad medida por EDSS (Rho de Spearman -0,75; $p < 0,001$).

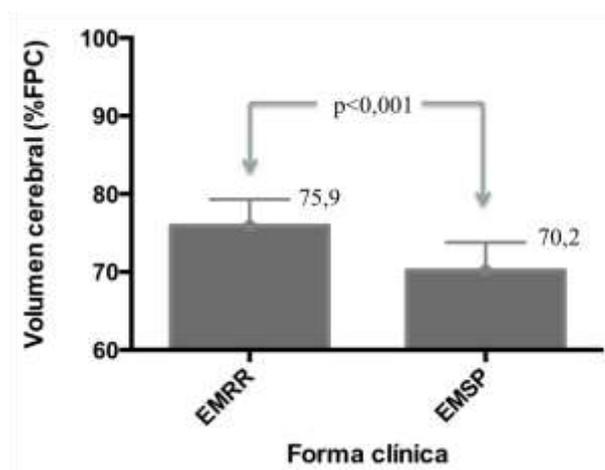
Respecto al análisis de volumetría cerebral entre los distintos subgrupos en función del tiempo de evolución de la enfermedad, se detectó un menor volumen cerebral global y regional, tanto de SG como de SB, y menor FPC en el grupo de mayor tiempo de evolución en comparación con los otros tres grupos. Los datos quedan reflejados en la tabla 6.

Figura 11. Representación gráfica del volumen de lesiones en T2 en función de los fenotipos clínicos. El volumen medio de lesiones fue significativamente superior en los pacientes EMSP respecto a los pacientes EMRR.



EMRR: esclerosis múltiple remitente recurrente, EMSP: esclerosis múltiple secundaria progresiva.

Figura 12. Representación gráfica del volumen cerebral, expresado por la media del valor de FPC, en función de los fenotipos clínicos. La FPC fue significativamente superior en los pacientes EMRR respecto a los pacientes EMSP.



EMRR: esclerosis múltiple remitente recurrente, EMSP: esclerosis múltiple secundaria progresiva.

En cuanto al análisis volumétrico respecto a la ZSV, se observó una correlación positiva entre el incremento de volumen de lesiones y el aumento del valor de la FA en la ZSV en los pacientes con EM (correlación de Pearson de 0,49; $p=0,002$), como queda reflejado en la figura 13.

También se observó una correlación inversa entre el volumen cerebral y el valor de FA, de forma que cuanto mayor es la pérdida del parénquima cerebral (medido por el parámetro FPC) en los pacientes con EM, mayor es el valor de FA en la ZSV (correlación de Pearson de -0,48; $p=0,001$). Los datos se muestran en la figura 14.

Existe una correlación positiva entre el valor de FPC y el volumen cerebral global (correlación de Pearson de 0,43; $p=0,02$), tal como se muestra en la figura 15.

Se realizó un análisis multivariante para explorar variables predictivas de los cambios observados en los valores de FA de la ZSV, ajustando en función de las siguientes variables: edad, sexo, tiempo de evolución de la enfermedad, discapacidad medida por EDSS, volumen de carga de lesiones y FPC.

Tras dicho análisis multivariante podemos concluir que el aumento del volumen de carga de lesiones se correlacionó de forma independiente con el aumento del valor de FA en la ZSV en los pacientes con EM ($p=0,037$). El resto de variables, incluida la FPC, no alcanzaron significación estadística. Los datos quedan reflejados en la tabla 7.

Tabla 5. Datos correspondientes a volumetría, tanto de lesiones en T2 como volumen cerebral, global y regional. Los datos se muestran separados entre controles y el global de pacientes, y divididos entre los distintos fenotipos clínicos, EMRR y EMSP. Los pacientes presentaron un volumen cerebral menor, tanto a nivel global como regional, respecto a los controles sanos. Los pacientes EMSP presentaron mayor volumen de lesiones en T2 y menor volumen cerebral, tanto global como regional, así como medido por FCP, respecto a los pacientes EMRR.

	Controles (n=11)	Pacientes (n=40)	p*	EMRR (n=29)	EMSP (n=11)	p^
Volumen lesiones T2 Mediana (RIQ)	0	4755,1 (1812,8-10367,4)	na	3127,30 (1139,8-5177,8)	12017,48 (9049,6-26358,5)	<0,001
Volumen cerebral (ml) Media (DE)	1063,97 (126,5)	976,46 (140,5)	0,025	1016,63 (132,1)	872,77 (108,5)	0,005
Volumen SG (ml) Media (DE)	603,32 (69,2)	543,45 (67,6)	0,004	560,73 (68,4)	498,53 (41,4)	0,007
Volumen SB (ml) Media (DE)	430,17 (58,0)	378,92 (73,6)	0,024	399,77 (64,6)	324,70 (70,2)	0,006
FCP (%) Media (DE)	76,5 (4,1)	74,4 (4,3)	0,071	75,9 (3,4)	70,2 (3,6)	<0,001

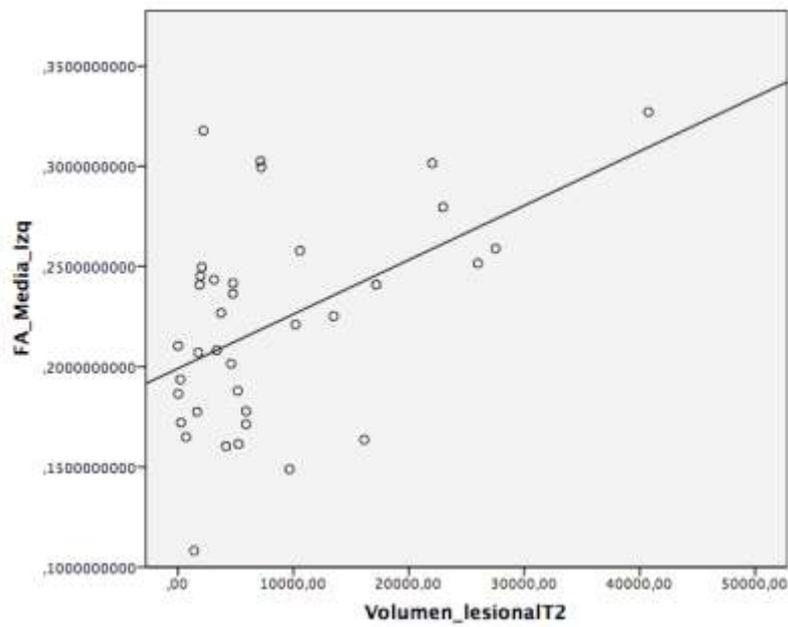
EMRR: esclerosis múltiple remitente recurrente, EMSP: esclerosis múltiple secundaria progresiva, RIQ: rango intercuartílico, DE: desviación estándar, SG: sustancia gris, SB: sustancia blanca, FCP: fracción de parénquima cerebral, p* U de Mann Whitney, comparación entre controles y pacientes, p^ U de Mann Whitney, comparación entre EMRR y EMSP.

Tabla 6. Datos correspondientes a volumetría, tanto de lesiones en T2 como volumen cerebral, global y regional. Los datos se muestran separados entre los distintos grupos estratificados en función del tiempo de evolución de la enfermedad. Los pacientes correspondientes al grupo con mayor tiempo de evolución (19-24 años) presentaron mayor volumen de lesiones en T2 y menor volumen cerebral, tanto global como regional, así como medido por FPC, respecto a los pacientes de los otros tres grupos con menor tiempo de evolución.

	Tiempo evolución 0-6 años (n=10)	Tiempo evolución 7-12 años (n=10)	Tiempo evolución 13-18 años (n=10)	Tiempo evolución 19-24 años (n=10)	p [^]
Volumen lesiones T2 (mm ³) Mediana (RIQ)	1955,3 (224,5-14741,5)	2661,8 (1751,0-5051,8)	4755,1 (1844,9-6555,4)	11822,7 (4926,3-26358,5)	0,03
Volumen cerebral (ml) Media (DE)	1029,3 (117,8)	1016,2 (101,2)	1011,9 (167,9)	849,9 (101,6)	0,02
Volumen SG (ml) Media (DE)	562,1 (57,3)	564,3 (64,6)	553,4 (81,8)	493,8 (44,5)	0,01
Volumen SB (ml) Media (DE)	410,7 (59,7)	394,1 (43,6)	399,8 (86,6)	312,9 (65,1)	0,02
FCP (%) Media (DE)	77,3 (3,2)	75,6 (3,2)	74,0 (4,0)	71,3 (4,5)	0,02

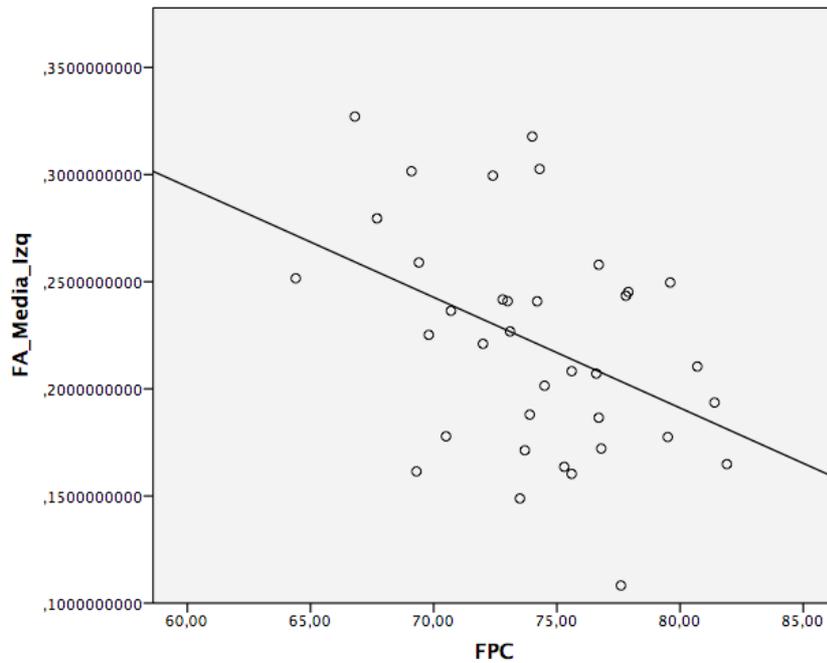
RIQ: rango intercuartílico, DE: desviación estándar, SG: sustancia gris, SB: sustancia blanca, FCP: fracción de parénquima cerebral, p* U de Mann Whitney, comparación entre controles y pacientes, p[^] Kruskal Wallis y U de Mann Whitney para comparar los distintos subgrupos.

Figura 13. Representación gráfica de la correlación positiva entre el volumen de lesiones de los pacientes con EM y el aumento del valor de la FA de la ZSV (Correlación de Pearson de 0,49; $p=0,002$).



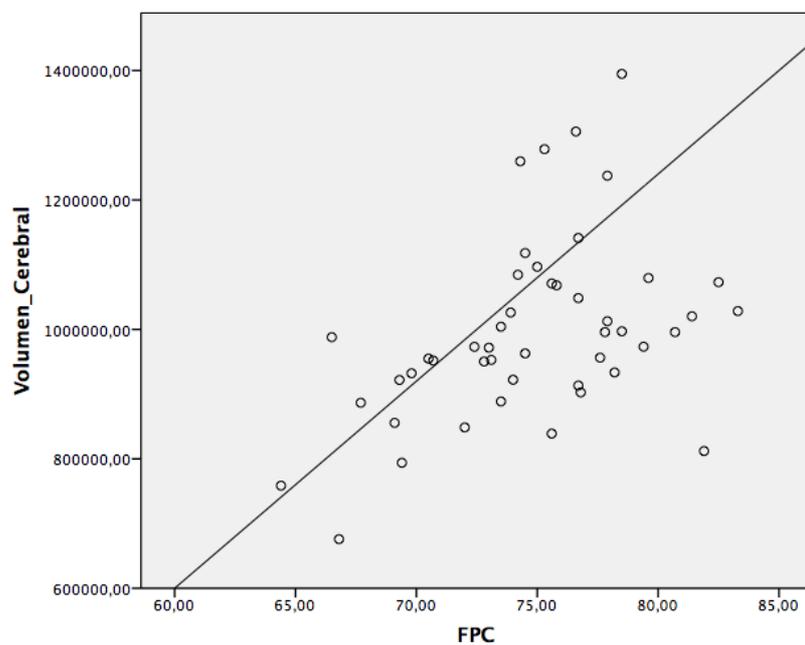
FA: fracción de anisotropía, Izq: izquierda

Figura 14. Representación gráfica de la correlación negativa entre el volumen cerebral de los pacientes con EM y el valor de la FA de la ZSV. A mayor pérdida de fracción de parénquima cerebral (FPC), mayor es el valor de la FA de la ZSV de los pacientes con EM (Correlación de Pearson de - 0,48; $p=0,001$).



FA: fracción de anisotropía, Izq: izquierda, FPC: fracción de parénquima cerebral.

Figura 15. Representación gráfica de la correlación positiva entre el volumen cerebral global y el valor de FPC.



FPC: fracción de parénquima cerebral.

Tabla 7. Análisis multivariante. Variables predictivas de cambios observados en la FA de la ZSV. El aumento de volumen de lesiones en T2 explicó de forma independiente el aumento del valor de la FA de la ZSV. El resto de variables no alcanzaron significación estadística.

Coefficientes^a

Modelo	Coeficientes no estandarizados		Coeficientes tipificados	t	Significación
	B	Error típico	Beta		
(Constante)	0,410	0,305		1,347	0,189
Sexo	-0,022	0,019	-0,189	-1,163	0,255
Edad RM	0,001	0,001	0,079	0,381	0,706
Tiempo evolución	-0,001	0,001	-0,121	-0,640	0,527
EDSS RM	-0,005	0,007	-0,194	-0,719	0,478
Volumen lesiones T2	2,971E-006	0,000	0,537	2,101	0,044
Fracción parénquima cerebral	-0,002	0,004	-0,185	-0,641	0,527

a variable dependiente: fracción de anisotropía izquierda

6.4. Análisis de la resonancia magnética funcional

En respuesta al paradigma motor utilizado, la flexión-extensión de dedos I-IV de mano derecha de forma rítmica, las zonas con mayor porcentaje de activación fueron las correspondientes al cerebelo, sobre todo del lado ipsilateral (hemisferio derecho), que es la estructura principal responsable de la coordinación, y al área motora contralateral (hemisferio izquierdo), como corresponde a un paradigma motor realizado por sujetos diestros. Ante una tarea motora relativamente compleja, como la utilizada en este proyecto, además de activarse el área motora principal, también puede verse una activación más amplia, que implique al área somatomotora (incluye área parietal) y área motora suplementaria [197, 198]. Las principales áreas activadas en la RM funcional, ordenadas en función del porcentaje de señal de activación, fueron las siguientes:

- Área correspondiente a cerebelo derecho, con un valor medio de porcentaje de activación de 0,74 (DE: 0,36).
- Área correspondiente a zona precentral izquierda, con un valor medio de porcentaje de activación de 0,60 (DE: 0,28).
- Área correspondiente a zona postcentral izquierda, con un valor medio de porcentaje de activación de 0,57 (DE: 0,26).
- Área correspondiente a zona del vermis, con un valor medio de porcentaje de activación de 0,56 (DE: 0,32).

La activación de las distintas áreas en respuesta al paradigma motor utilizado quedan resumidas en la tabla 8. Observamos una tendencia a la menor activación del área motora principal, representada por el área precentral del hemisferio izquierdo, en los pacientes con fenotipo EMSP respecto a los pacientes EMRR y los controles ($p=0,06$). Al comparar el porcentaje de activación de las áreas principales entre los diferentes fenotipos clínicos de EM, se observó que la activación es diferente entre los pacientes menos discapacitados, los RR, y los más discapacitados, los SP. [197] La activación fue más intensa en los pacientes RR respecto a los pacientes con fenotipo SP, siendo estas diferencias estadísticamente significativas en las principales áreas esperadas en relación al paradigma utilizado, el área precentral izquierda y el cerebelo derecho, como queda reflejado en la tabla 9 y figura 16. El área postcentral derecha, un área en

la que no sería esperado tener una activación importante dado que todos los pacientes son diestros y el área motora activada debe estar localizada en el hemisferio cerebral izquierdo, se encontró significativamente más activada en EMRR que en EMSP, y ligeramente más activada en EMRR respecto a los controles (diferencias estadísticamente no significativas).

Tabla 8. Valores de señal de activación de las áreas estudiadas en resonancia funcional. Quedan expuestos los datos del total de la muestra y separados entre controles y los distintos fenotipos clínicos de pacientes, EMRR y EMSP. Las áreas se muestran ordenadas en orden descendente de señal de activación. El área con mayor señal de activación fue el cerebelo del lado derecho, seguido del área motora del hemisferio izquierdo. Al comparar la intensidad de señal de activación encontramos una tendencia a la menor activación del área precentral izquierda de los pacientes EMSP respecto a EMRR y controles.

Área	Controles	EMRR	EMSP	Media Total	p*
Cerebelo D	0,84 (0,36)	0,77 (0,37)	0,53 (0,3)	0,74 (0,36)	0,1
Precentral I	0,67 (0,38)	0,65 (0,23)	0,42 (0,21)	0,60 (0,28)	0,06
Postcentral I	0,62 (0,39)	0,59 (0,24)	0,48 (0,18)	0,57(0,26)	0,3
Vermis	0,65 (0,42)	0,55 (0,29)	0,46 (0,26)	0,56 (0,32)	0,6
Parietal Superior I	0,60 (0,48)	0,5 (0,3)	0,41 (0,26)	0,5 (0,33)	0,7
Parietal Inferior I	0,54 (0,39)	0,42 (0,3)	0,45 (0,21)	0,46 (0,3)	0,7
Mot Suplementaria D	0,57 (0,38)	0,46 (0,26)	0,45 (0,28)	0,48 (0,29)	0,7
Precentral D	0,38 (0,34)	0,34 (0,23)	0,21 (0,1)	0,33 (0,24)	0,9
Postcentral D	0,23 (0,32)	0,27 (0,2)	0,14 (0,1)	0,23 (0,69)	0,2
Motora Suplementaria I	0,37 (0,31)	0,31 (0,21)	0,36 (0,17)	0,33 (0,22)	0,6

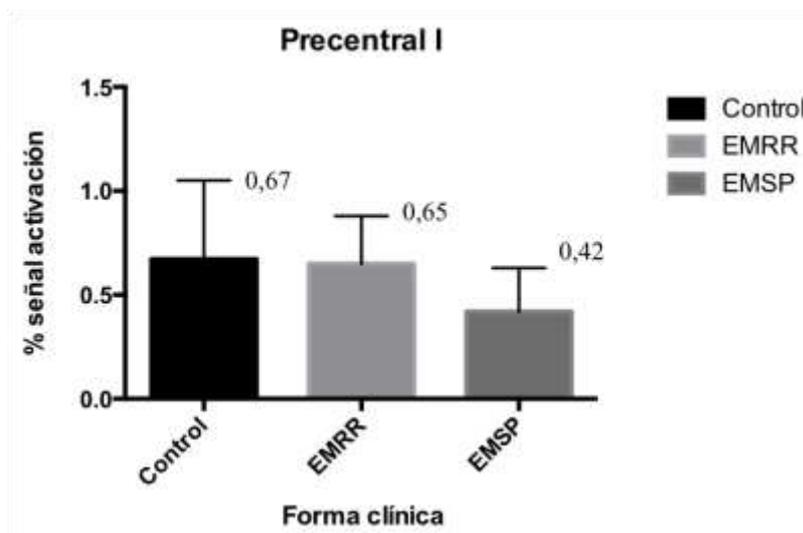
*Prueba de Kruskal-Wallis, EMRR: esclerosis múltiple remitente recurrente, EMSP: esclerosis múltiple secundaria progresiva, D: derecho, I: izquierdo.

Tabla 9. Valores de señal de activación de las áreas estudiadas en resonancia funcional. Quedan expuestos los datos correspondientes a los distintos fenotipos clínicos de pacientes, EMRR y EMSP, por separado. Las áreas se muestran ordenadas en orden descendente de señal de activación. El área con mayor señal de activación fue el cerebelo del lado derecho, seguido del área motora del hemisferio izquierdo. Al comparar la intensidad de señal de activación encontramos mayor señal de activación en los pacientes EMRR respecto a los EMSP. Estas diferencias fueron estadísticamente significativas en las principales áreas, la correspondiente al cerebelo derecho y zona precentral izquierda.

Área	EMRR	EMSP	p*
Cerebelo D	0,77 (0,37)	0,53 (0,3)	0,05
Precentral I	0,65 (0,23)	0,42 (0,21)	0,01
Postcentral I	0,59 (0,24)	0,48 (0,18)	0,12
Vermis	0,55 (0,29)	0,46 (0,26)	0,49
Parietal Sup I	0,5 (0,3)	0,41 (0,26)	0,60
Parietal Inf I	0,42 (0,3)	0,45 (0,21)	0,64
Mot Sup D	0,46 (0,26)	0,45 (0,28)	0,34
Precentral D	0,34 (0,23)	0,21 (0,1)	0,67
Postcentral D	0,27 (0,2)	0,14 (0,1)	0,04
Mot Sup I	0,31 (0,21)	0,36 (0,17)	0,94

*U de Mann Whitney, EMRR: esclerosis múltiple remitente recurrente, EMSP: esclerosis múltiple secundaria progresiva, D: derecho, I: izquierdo.

Figura 16. Representación gráfica de la señal de activación del área motora contralateral (precentral izquierda) correspondiente a controles y pacientes, divididos en función del fenotipo clínico. Se observó una reducción significativa de la activación de dicha área en los pacientes EMSP respecto a EMRR ($p=0,013$).



EMRR: esclerosis múltiple remitente recurrente; EMSP: esclerosis múltiple secundaria progresiva.

Tal como se especifica en el apartado de métodos, las áreas funcionales activadas de forma significativa se definieron en base a que su señal media de activación fuera superior al umbral establecido. Se definió el primer umbral como el correspondiente al valor medio de la señal de activación media de todas las áreas y el segundo umbral, más restrictivo, al valor correspondiente a la media más dos desviaciones estándar.

La media de señal de activación media de todas las áreas fue de 0,1 (DE: 0,2); por tanto el primer umbral considerado fue de 0,1 y el segundo umbral de 0,5.

Al estudiar las áreas activadas de forma significativa en función de presentar un nivel de activación superior al umbral de 0,1, encontramos que las principales áreas, cerebelo ipsilateral y área motora contralateral, fueron activadas de forma significativa en el 100% de los controles y en más del 90% de los pacientes, tanto los EMRR como los EMSP, sin diferencias entre ellos. La única área que se encontró activada en un

porcentaje mayor de pacientes respecto a controles correspondió al área motora suplementaria, tanto del lado ipsilateral como del contralateral (diferencias no estadísticamente significativas). Los datos quedan reflejados en la tabla 10.

Si nos restringimos a las áreas que se activaron de forma diferente entre los controles y los pacientes, o entre los distintos subgrupos de pacientes, podemos destacar los siguientes hallazgos:

- La zona precentral derecha (zona motora ipsilateral) fue activada en un porcentaje mayor de pacientes que de controles, incluso en SP (activada en el 100% de los pacientes).
- La amígdala derecha, parahipocampo derecho y área postcentral derecha fueron activadas en un porcentaje mayor de pacientes RR que de SP.

Dichos datos quedan reflejados en la tabla 11 y figura 17.

Al estudiar las áreas activadas asumiendo un umbral más restrictivo, el superior al valor de 0,5, encontramos una clara reducción del número de áreas que se activaron de forma significativa, siendo las dos áreas principales, cerebelo del lado derecho y motora del hemisferio izquierdo (concretamente el área precentral), las únicas dos áreas activadas por más del 50% de los sujetos. Las áreas con mayor activación se exponen en la tabla 12 y figura 18. Como otros hallazgos, a destacar que:

- No encontramos diferencias significativas entre el porcentaje de controles y pacientes con EMRR en la activación de ninguna de las áreas estudiadas.
- La activación de las dos áreas principales, cerebelo derecho y área precentral izquierda, fue significativamente menor en SP respecto a RR.

Como hallazgos menos esperados, encontramos dos áreas activadas en un porcentaje significativamente mayor de controles respecto a pacientes, la correspondiente al parahipocampo izquierdo (solo para el umbral superior al valor 0,1) y a la región parietal superior derecha (solo para el umbral superior al valor 0,5). Respecto al parahipocampo izquierdo, aunque aproximadamente un 60% de los controles superase el umbral de 0,1, lo hicieron de forma muy ajustada, ya que la señal media de activación fue tan solo de 0,1 (DE:0,2), por lo que la activación global de esta área fue claramente inferior a la obtenida por el resto de áreas esperadas, que todas ellas

superaron el valor de 0,5 en controles. Respecto al área parietal superior derecha (sensitiva ipsilateral), la señal de activación de los controles fue de 0,41, similar a los pacientes RR, que fue 0,37 y superior a los pacientes SP, que fue 0,27 ($p=0,017$). Si nos restringimos al porcentaje de sujetos que superaron el umbral de 0,5, en esta área detectamos diferencias globales entre pacientes y controles ($p=0,023$) y entre controles y pacientes EMSP, con una menor activación en el último grupo ($p=0,02$). Entre controles y pacientes EMRR detectamos una tendencia a la menor activación del último subgrupo, pero no alcanzó significación estadística ($p=0,09$).

Tabla 10. Áreas con mayor activación en función del porcentaje de sujetos que superaron el umbral de 0,1. Se exponen los datos separados entre controles y los distintos fenotipos de pacientes, EMRR y EMSP. Estas áreas fueron activadas por la mayoría de los sujetos, y no detectamos diferencias estadísticas entre los distintos subgrupos. En respuesta a un paradigma motor complejo, se activaron las áreas correspondientes al área motora principal, somatomotora y motora suplementaria del lado contralateral, y el área del cerebelo ipsilateral.

Área	Controles	EMRR	EMSP	p*
Precentral I	100%	96%	90%	ns
Poscentral I	100%	96%	100%	ns
Cerebelo D	100%	93%	90%	ns
Motora suplementaria I	81%	88%	90%	ns
Motora suplementaria D	81%	96%	90%	ns
Parietal inferior I	100%	85%	100%	ns
Parietal inferior D	100%	96%	90%	ns
Parietal superior I	90%	93%	90%	ns

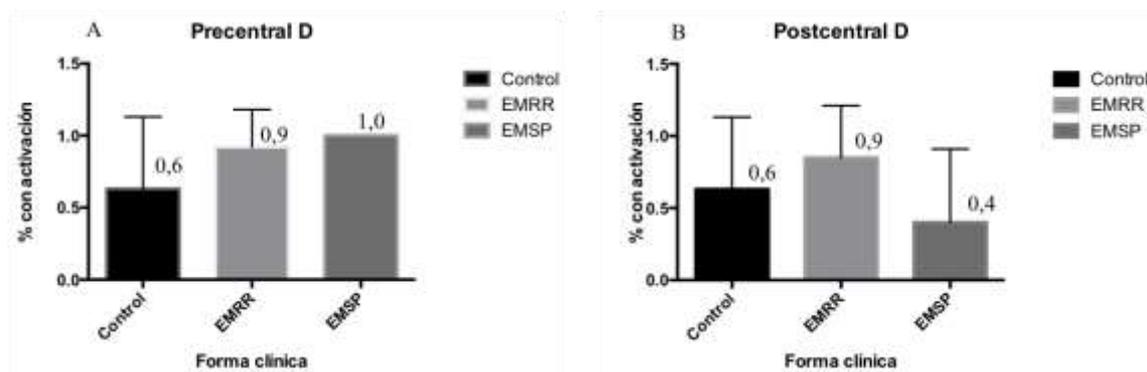
*Prueba de Kruskal-Wallis, EMRR: esclerosis múltiple remitente recurrente, EMSP: esclerosis múltiple secundaria progresiva, D: derecho, I: izquierdo.

Tabla 11. Áreas con diferente activación en función del porcentaje de sujetos que superaron el umbral de 0,1. Se exponen los datos separados entre controles y los distintos fenotipos de pacientes, EMRR y EMSP. En negro se exponen las diferencias entre controles y pacientes SP, en azul cuando además hubo diferencias entre pacientes EMRR y pacientes EMSP; en todos los casos se produjo una mayor activación en la forma RR respecto a la SP. En rojo se señala cuando las diferencias se observaron entre controles y pacientes RR, en el área correspondiente a parahipocampo izquierdo la activación de controles fue superior a la de pacientes RR y en la región precentral D, ocurre a la inversa, la activación es significativamente mayor en pacientes respecto a controles.

Área	Controles	EMRR	EMSP	p*^
Amígdala I	73%	48%	20%	0,05
Amígdala D	54%	56%	0%	0,008
Cerebelo D	72%	55%	40%	0,01
Olfatorio I	72%	37%	10%	0,015
Parahipocampo I	63%	25%	0%	0,006
Parahipocampo D	63%	44%	0%	0,01
Precentral D	63%	92%	100%	0,02
Poscentral D	63%	85%	40%	0,02

*Prueba de Kruskal-Wallis, ^U de Mann Whitney, EMRR: esclerosis múltiple remitente recurrente, EMSP: esclerosis múltiple secundaria progresiva, D: derecho, I: izquierdo.

Figura 17. Representación gráfica de la diferente activación de la zona motora ipsilateral al estímulo realizado en función de sujetos que superan el umbral de 0,1. A) La zona precentral derecha fue activada por un porcentaje de pacientes superior al de controles, tanto por EMRR como por EMSP (RR: $p=0,02$; SP: $p=0,04$). B) El porcentaje de pacientes SP que activaron la zona postcentral derecha fue significativamente menor respecto a los RR ($p=0,007$).



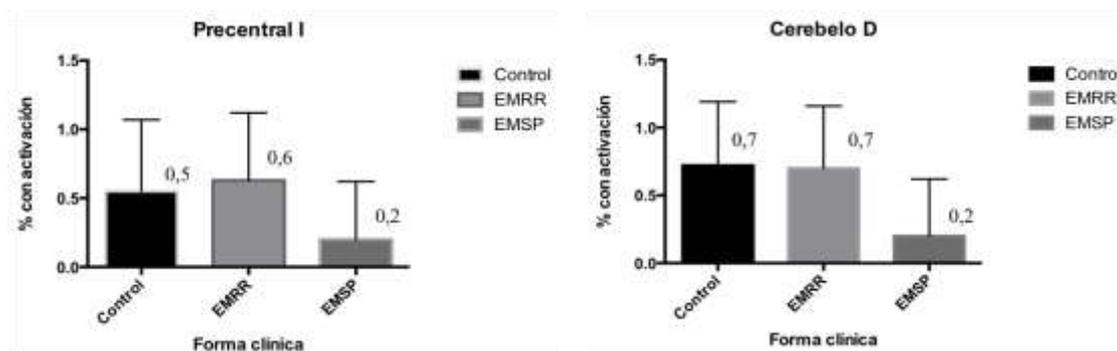
EMRR: esclerosis múltiple remitente recurrente, EMSP: esclerosis múltiple secundaria progresiva, D: derecha.

Tabla 12. Áreas con mayor activación en función del porcentaje de sujetos que superaron el umbral de 0,5. Datos separados entre controles y los distintos fenotipos clínicos, EMRR y EMSP. Las áreas con un mayor porcentaje de activación fueron: área motora principal, somatomotora y motora suplementaria contralateral, y cerebelo ipsilateral y central. En azul se señalan las áreas que fueron activadas por un porcentaje superior de pacientes RR respecto a los SP. Aunque la activación global fue menor, el área parietal superior derecha fue más activada por los controles respecto a pacientes SP.

Área	Controles	EMRR	EMSP	p*
Cerebelo D	72,7%	65,5%	20%	0,015
Precentral I	54,5%	63%	20%	0,07
Postcentral I	45,5%	48,5%	20%	0,29
Parietal Sup I	45,5%	25,9%	20%	0,38
Parietal Sup D	45%	18,5%	0%	0,04
Motora Suplementaria D	45%	29,6%	20%	0,44
Vermis 6	45,5%	29,6%	20%	0,44
Vermis 7	45,5%	22,2%	30%	0,36

*Prueba de Kruskal-Wallis, EMRR: esclerosis múltiple remitente recurrente, EMSP: esclerosis múltiple secundaria progresiva, D: derecho, I: izquierdo.

Figura 18. Representación gráfica de la activación de las zonas principales en función de los sujetos que superan el umbral de 0,5. El porcentaje de pacientes EMRR que activaron las áreas esperadas fue significativamente superior respecto a pacientes EMSP.



EMRR: esclerosis múltiple remitente recurrente, EMSP: esclerosis múltiple secundaria progresiva, I: izquierda; D: derecha.

7. DISCUSIÓN

En este trabajo hemos estudiado “in vivo” una muestra de controles sanos y pacientes con EM con RM y hemos confirmado que existen cambios estructurales en la región periventricular, y por tanto, en la ZSV de los pacientes respecto a controles sanos. Hemos podido correlacionar los datos clínicos de estos pacientes con los datos obtenidos por neuroimagen (volumen de lesiones, volumen cerebral y RM funcional) y hemos detectado que los cambios referentes a la ZSV son más evidentes en aquellos pacientes en los que existe una mayor destrucción de tejido cerebral.

7.1. Diferencias epidemiológicas y clínicas de los pacientes con EM:

Para entender nuestros resultados hay que tener en cuenta que los pacientes con EM no son todos iguales. Por ello estudiamos una muestra representativa de 40 pacientes con EM con diferentes edades, tiempos de evolución y diferentes fenotipos clínicos, tanto formas RR como formas progresivas de la enfermedad. En el momento de realizar la RM nuestros pacientes se diferenciaban en ciertos aspectos clínicos y epidemiológicos que paso a enumerar. Cuando el tiempo de evolución de la enfermedad era inferior o igual a 12 años, la mayoría de los pacientes, el 94,7%, correspondieron a formas de EMRR; cuando era mayor de 12 años, el 52,3% fueron formas EMRR y el 47,7% formas EMSP. En cuanto a las diferencias entre ambos subtipos, EMRR y EMSP, los primeros habían recibido tratamientos previos en un porcentaje significativamente mayor (90% pacientes RR frente al 60% de SP, $p=0,03$). Y, como es de esperar, los pacientes SP tuvieron un tiempo de evolución mayor y una mayor discapacidad tanto en el momento del diagnóstico como en el momento de iniciar nuestro estudio. Respecto al análisis de los subgrupos de pacientes estratificados en función del tiempo de evolución también encontramos diferencias significativas, en el sentido que los pacientes con un mayor tiempo de evolución fueron diagnosticados a una edad más temprana, recibieron menos tratamientos (probablemente porque había menos tratamientos disponibles aprobados para la enfermedad cuando fueron diagnosticados), tuvieron un mayor número de brotes y la discapacidad fue mayor. Como ya se ha comentado, a mayor tiempo de evolución de la enfermedad mayor fue el porcentaje de pacientes diagnosticados de forma EMSP respecto a los primeros años, donde prácticamente todos los pacientes fueron

diagnosticados de forma RR. Todos estos datos corresponden a la historia natural de la enfermedad que conocemos en función de lo descrito en la literatura; la enfermedad tiene un inicio a brotes y en un porcentaje que puede superar el 50% de los pacientes se produce, tras 15-20 años de evolución, el aumento progresivo de discapacidad independiente de brotes, alcanzando el diagnóstico de EMSP [44]. Los TME de los que disponemos están indicados sólo en la primera fase de la enfermedad, lo que justifica que los pacientes con diagnóstico de EMRR los recibieran en un porcentaje superior [38].

7.2. Diferencias estructurales por neuroimagen entre pacientes con EM y respecto a controles:

Todos los parámetros de volumen cerebral, tanto el volumen cerebral global como el regional, tanto de SB como de SG, así como el volumen cerebral expresado por el valor de FPC, fueron superiores en controles respecto a la muestra global de pacientes y en pacientes RR respecto a los SP y a los que presentaron mayor tiempo de evolución de la enfermedad (mostrado en los pacientes estratificados según los distintos tiempos). Estos datos van en relación a lo que ya se ha descrito ampliamente en la literatura; los pacientes con EM tienen una mayor tasa de pérdida de volumen cerebral respecto a personas sanas, y, aunque la atrofia se pone de manifiesto desde el inicio de la enfermedad, según esta progresa se hace más evidente, sobre todo en aquellos pacientes en los que se pone de manifiesto clínicamente la forma progresiva. Al igual que ocurre en nuestra muestra, la atrofia cerebral se relaciona con el aumento progresivo de discapacidad de los pacientes, por lo que constituye un marcador subrogado de discapacidad cada vez más utilizado en nuestra práctica clínica [84, 87]. Asimismo, el volumen de lesiones en T2 fue superior en pacientes con formas progresivas de la enfermedad respecto a los pacientes RR. Esto se correlacionó de forma inversa con la atrofia cerebral (FPC) hallada en el estudio global. El estudio de volumetría de los distintos grupos divididos en función del tiempo de evolución de la enfermedad mostró hallazgos similares. Aquí hay que tener en cuenta que los pacientes con un mayor tiempo de evolución (más de 18 años) en su mayoría desarrollaron una forma progresiva de la enfermedad y, de forma paralela, presentaron un mayor volumen de lesiones desmielinizantes y una mayor pérdida de volumen

cerebral, tanto global como regional, respecto a los otros tres grupos de menor tiempo de evolución.

Es decir, acorde a lo esperado, los pacientes en los que se ha puesto de manifiesto la forma progresiva de la enfermedad, fruto del fallo en los mecanismos de compensación del daño, mostraron una mayor destrucción del tejido cerebral, con un mayor acúmulo de lesiones propias de la enfermedad y una mayor pérdida de volumen cerebral.

7.3. Diferencias estructurales por RM de difusión de la ZSV en pacientes con EM y su relación con variables clínicas y de neuroimagen:

Con la secuencia de difusión en RM tomando como región de interés la región adyacente a los ventrículos laterales (incluyendo ZV y ZSV) constatamos un valor de anisotropía, medido por FA, mayor en pacientes con EM respecto a controles, ajustando las medidas por edad y sexo. Estudiando ambos hemisferios, estas diferencias sólo fueron significativas en la ZSV correspondiente al izquierdo.

Dentro de la población de pacientes, detectamos que el cambio en la FA de la ZSV tendió a ser mayor en los pacientes SP respecto a los RR, así como en los pacientes con mayor discapacidad medida por EDSS, aunque no encontramos diferencias estadísticamente significativas.

Demostramos una correlación directa del aumento de FA con el aumento del volumen de lesiones de la enfermedad y una relación inversa respecto al volumen cerebral, expresado por el valor de FPC, existiendo una buena correlación directa de este valor con el volumen cerebral global.

En el análisis multivariante para analizar los predictores del cambio de la ZSV, incluyendo la edad, sexo, tiempo de evolución, EDSS, volumen de lesiones y FPC; fue el volumen de lesiones en T2 la única variable que, de forma independiente, explicó los cambios observados en la estructura de la ZSV de los pacientes con EM.

La RM de difusión nos da información sobre la estructura del sistema nervioso, en tanto y cuanto es una medida indirecta del grado de cohesión/ordenación de un tejido,

en este caso de la disposición ordenada de fibras nerviosas. El aumento de FA nos indica que en la zona estudiada existe una restricción de la difusión de las moléculas de agua que se ven obligadas a fluir en una única dirección; por el contrario, el descenso de este valor nos indicaría una desorganización o ausencia de dirección preferencial de las moléculas de agua en el tejido [131].

La RM de difusión ha sido utilizada para el estudio de la ZSV previamente usando la misma metodología que hemos usado en nuestro trabajo [184, 185]. El primero de ellos se realizó en pacientes con demencia tipo Alzheimer (diferentes grados) y detectaron que conforme progresaba el grado de deterioro cognitivo, disminuían los valores de FA (o lo que es lo mismo aumentaba el valor de CDA). Los autores concluyeron que existe una desestructuración de la ZSV que hipotetizaron se asocia al fallo en la función proliferativa de la misma y, secundariamente, produce la degeneración de la enfermedad. En el otro estudio se correlaciona la edad de sujetos control estudiados con la FA de la ZSV obtenida por RM. Detectaron, de igual forma, una disminución de la FA que asocian a un potencial “agotamiento” de la capacidad neurogénica. En este último estudio, los cambios de FA sólo se detectaron en el lado izquierdo, al igual que ocurre en nuestra muestra. En este sentido, destacar que todos los pacientes seleccionados fueron diestros, por lo que sería el hemisferio cerebral dominante siempre el izquierdo, y, por tanto, este concepto pudo haber influido en nuestros resultados.

A diferencia de estos trabajos, en nuestra muestra de pacientes, los cambios detectados en la estructura de la ZSV fueron en dirección opuesta, en el sentido que nosotros detectamos un aumento de la FA en pacientes de EM con mayor edad (diferencias estadísticamente no significativas) y formas más evolucionadas de la enfermedad. Por tanto, en este sentido, nos indicaría que existe en la ZSV de los pacientes de EM una direccionalidad de las fibras que puede ser medida mediante RM, y podría ser de utilidad en estudios clínicos evolutivos o con fines pronósticos. En ausencia de correlación de los datos de ninguno de estos trabajos con estudios de anatomía patológica no es posible determinar cuál es el fenómeno que subyace a los cambios de anisotropía en la ZSV, aunque sugeriremos más adelante algunas hipótesis.

7.4. Diferencias de funcionamiento neuronal mediante RM funcional en pacientes de EM:

Respecto al estudio de RM funcional, como era de esperar ante un estímulo motor coordinado realizado con la mano derecha en pacientes diestros, las zonas con mayor activación, tanto en controles como en pacientes, correspondieron al área motora contralateral (área precentral y postcentral izquierda) y al cerebelo ipsilateral (área cerebelo derecho y vermis) [140]. Estas áreas principales fueron altamente activadas en controles y, de forma similar, en pacientes con forma RR. Tras comparar el porcentaje de activación de dichas áreas entre pacientes RR y SP, observamos que la activación de las dos áreas principales, cerebelo derecho y área precentral izquierda, se realizó de forma más intensa y efectiva en pacientes con forma RR respecto a SP, siendo estas diferencias estadísticamente significativas. También observamos la activación de áreas en pacientes RR, no esperadas ante el estímulo motor realizado, como el área motora ipsilateral (postcentral derecha). En nuestra muestra, esta área inesperada estuvo más activada en pacientes RR respecto a controles y significativamente más activada en pacientes RR respecto a SP.

Estos hallazgos van en consonancia con lo descrito en trabajos de RM funcional en EM, en los que también se observa que los pacientes al inicio de la enfermedad tienen mayor capacidad de activar con más intensidad las áreas esperadas en función de una determinada tarea y, además, de reclutamiento de nuevas áreas no esperadas ante el mismo estímulo. Estos cambios pueden ser reflejo de la capacidad de plasticidad cerebral y mayor compensación funcional que pueden tener los pacientes al inicio de la enfermedad, lo que se traduciría en una mayor adaptación al daño cerebral que se está produciendo como consecuencia de la enfermedad, sin que éste repercuta al inicio a nivel funcional en forma de acúmulo de discapacidad de los pacientes [142, 143].

En la forma SP, la activación de ambas áreas principales, área motora contralateral y cerebelo ipsilateral, fue significativamente menor respecto a los controles sanos y también a los pacientes con forma RR. La activación del resto de áreas estudiadas fue significativamente menor en el grupo de pacientes SP respecto a RR o controles. En este grupo de pacientes no se observó el reclutamiento de ninguna área diferente a las esperadas para la tarea evaluada.

Detectamos un área, el parahipocampo izquierdo, que estuvo significativamente más activada en controles respecto a pacientes, pero esta activación fue insignificante (10%) por lo que no se consideró clínicamente relevante.

Por tanto, conforme evoluciona la enfermedad y los pacientes tienen mayor discapacidad, detectamos una tendencia a la menor proporción de áreas funcionales con activación significativa.

En definitiva, en la misma línea de lo descrito anteriormente en otros estudios de RM funcional en pacientes con EM, en nuestra muestra observamos que los pacientes con fenotipo SP tuvieron menos capacidad para activar las zonas corticales esperadas al realizar una misma tarea y menos capacidad de reclutar nuevas áreas respecto a los pacientes con forma RR. Por lo que, siguiendo esta teoría, esta pérdida de capacidad de activación de las áreas importantes y de reclutamiento de nuevas áreas sería el reflejo de la claudicación del SN que ocurre conforme evoluciona la enfermedad, lo cual lleva asociado el acúmulo progresivo de discapacidad que ocurre a los pacientes en esta fase de la enfermedad [65, 142–144].

Aunque en nuestra muestra observamos una consonancia entre los cambios estructurales objetivados en la ZSV mediante RM de difusión y la pérdida de plasticidad o compensación del daño del SN medida por RM funcional, ya que ambos hallazgos ocurren en el mismo subgrupo de pacientes, no conseguimos demostrar su relación de forma estadística. Es posible que el tamaño de la muestra analizada no fuera suficiente para poder demostrar este hallazgo.

7.5. Posibles mecanismos patogénicos asociados a los cambios microestructurales en la ZSV:

Ante los hallazgos encontrados en relación a que existen cambios en la estructura de la ZSV de los pacientes con EM, proponemos dos hipótesis: que éstos estén en relación a una activación de esta zona o, por el contrario, que sean reflejo de su desestructuración o destrucción.

1. Estimulación de la ZSV en respuesta a un daño inflamatorio/desmielinizante agudo. Existen diversos modelos animales de EAE en los que se objetiva un cambio

en la estructura de la ZSV en respuesta al daño inflamatorio, con activación de la ZSV y mayor producción de neurogénesis/oligodendrogénesis. En estos estudios se concluye que ante un daño agudo de perfil inflamatorio/desmielinizante es evidente un aumento de precursores de oligodendrocitos, incluso en detrimento de la proliferación de neuroblastos que den lugar a nuevas neuronas maduras [154, 164–166]. Estos oligodendrocitos tienen capacidad migratoria, son capaces de llegar a lesiones desmielinizantes circundantes, e incluso a otras más lejanas. Todo ello podría contribuir al proceso de remielinización en enfermedades desmielinizantes como la EM. Los precursores de oligodendrocitos también contribuyen a mantener la integridad de la BHE, estructura clave en la patogenia de la EM [199]. Sabemos que en la inflamación aguda que ocurre en la EM expresada en forma de brotes y lesiones con realce de contraste, la integridad de la BHE se ve dañada y es posible que ello vaya ligado al daño progresivo de la capacidad de oligodendrogénesis. En el análisis multivariante en relación al aumento de FA de la ZSV, el único factor que se relacionó de forma independiente fue el aumento de carga lesional. Por tanto, este hallazgo puede estar en relación con que el daño desmielinizante es el mayor estímulo para la “activación” de la ZSV con mayor capacidad de producción de oligodendrocitos para contribuir a la reparación de SNC/remielinización. En este sentido, los cambios observados en la ZSV de nuestra serie de pacientes pueden ser interpretados como un intento de compensación del daño desmielinizante, y esta dirección preferencial de la ZSV como el aumento celular con predominio de nuevos oligodendrocitos con capacidad migratoria. Esta interpretación viene avalada por el estudio publicado postmortem con cerebros de pacientes con EM, en el que se demuestra la presencia de mayor celularidad interpretada como la activación de precursores de oligodendrocitos, con la finalidad de potenciar nueva oligodendrogénesis [182]. Además se ha señalado en este trabajo, que estos nuevos precursores estarían orientados en dirección a la zona dañada. Esta dirección preferencial o el consecuente aumento de remielinización parcial tras la activación de la oligodendrogénesis, determinarían una dirección de fibras que podría ser medida por estudios de difusión con RM de alta resolución. En este sentido, podríamos decir que si los cambios observados en la ZSV de nuestra muestra son reflejo de una activación de la ZSV con el intento de compensar el daño, éste no es suficiente, ya que no es capaz de prevenir la discapacidad de los pacientes. Por un lado, esto lo podemos explicar porque existe un viraje hacia reparar el daño desmielinizante, ya que la neurogénesis o la aparición de nuevas neuronas maduras

distales a la ZSV se ha visto que es mucho más limitada en los cerebros adultos, y que su estímulo ante un daño inflamatorio también es más limitado. Sabemos que la afectación desmielinizante es fundamental en la enfermedad y que además de los daños que provoca de forma directa también puede contribuir en gran medida a la disfunción axonal subyacente en la EM, ya que deja expuestos a los axones, que estarán en contacto con sustancias tóxicas, tendrán una conducción menos eficaz, con una demanda energética mayor y todo ello conlleva finalmente a un círculo vicioso que desemboca en la disfunción axonal [6, 175]. Pero el daño desmielinizante por sí mismo tal vez no pueda explicar todo el proceso neurodegenerativo que ocurre en la EM. Se ha demostrado en diferentes trabajos que su correlación con la discapacidad a largo plazo de los pacientes con EM es más limitada en comparación con la influencia de la degeneración axonal [43]. Y además, a diferencia de lo que ocurre en la EM, en otras enfermedades desmielinizantes que también pueden cursar de forma recurrente, como la encefalomiелitis aguda diseminada (EMAD) o neuromielitis óptica (NMO), se observan las consecuencias del daño agudo, causando síntomas similares durante los brotes que posteriormente pueden ser reparados y compensados, pero en estas enfermedades no ocurre el proceso degenerativo crónico progresivo posterior que vemos en la EM [175, 179]. También debemos tener en cuenta el carácter multifocal y difuso de afectación de la EM, donde no se produce un daño desmielinizante en una zona concreta, sino que este ocurre de forma generalizada, afectando también a la SBAN [80]. Donde mayor daño existe es en los lugares expresados como lesiones evidentes en la RM, y estas ocurren de forma frecuente a nivel periventricular y cuerpo caloso, localizaciones cercanas a la ZSV, pero también ocurren en zonas más alejadas, como en la región cortical, sobre todo en las formas progresivas de la enfermedad [102]. Estos factores también pueden influir en que la capacidad de reparación del daño desmielinizante que ocurre en esta enfermedad, tan extenso y generalizado, pueda ser más limitada que respecto a otras enfermedades desmielinizantes.

2. Inhibición de la ZSV en respuesta a la inflamación crónica mantenida. Existen otros modelos de EAE, como es el modelo SJL, en el que se estudian los cambios producidos en la ZSV y su capacidad proliferativa ante la presencia de eventos inflamatorios recurrentes e inflamación mantenida expresada por la activación crónica

de la microglía [164]. Este modelo animal es realmente interesante ya que simula con mayor fidelidad la realidad de la EM, tanto en su carácter inicial remitente-recurrente como en la fase de inflamación crónica posterior. Utilizando el modelo SJL se observa una activación de la ZSV, expresada por aumento de Sox2 respecto a controles, tras la provocación de un evento inflamatorio agudo. Cuando éste cesa, los cambios observados se revierten, retornando a los niveles basales; y, tras sucesivos ataques inflamatorios, ya se mantienen en niveles basales, por lo que se produce una inhibición progresiva de la capacidad proliferativa de la ZSV a pesar de que persista el daño inflamatorio recurrente. Estos hallazgos pondrían de manifiesto que la capacidad proliferativa de la ZSV podría ir cambiando acorde con las distintas fases de la enfermedad. En nuestra muestra de pacientes no hemos incluido pacientes durante o inmediatamente tras haber presentado el primer brote de la enfermedad, sino que la mayoría son pacientes que ya habían presentado sucesivos brotes recurrentes (mediana de 3 brotes; RIQ 2-4) y estaban en una fase estable de la enfermedad, por lo que ello podría ser el motivo de que los cambios observados en la ZSV de los pacientes con formas RR sean menos evidentes respecto a controles que los observados en los pacientes con formas más evolucionadas de la enfermedad, e incluso que estos cambios no reflejen una activación de la capacidad proliferativa de la ZSV, ya que cabría esperar que, según este modelo, los cambios producidos al inicio del proceso inflamatorio ya hubieran sido inhibidos o revertidos. En cuanto al estudio de la inflamación crónica, expresada por la microglía persistentemente activada, sobre la capacidad proliferativa de la ZSV, con este mismo modelo experimental se observa que en esta situación el comportamiento de la ZSV es distinto, y es que se ve inhibida tanto su capacidad proliferativa como su capacidad migratoria. Y es más, la desactivación de microglía con minociclina restaura la arquitectura de la ZSV, revierte el daño causado y consigue la mejora de la producción de oligodendrogénesis y oligodendrocitos maduros, mejorando así el pronóstico de los animales a los que se le ha provocado la enfermedad [164]. Por tanto, la microglía persistentemente activada influye directamente en la capacidad de proliferación de la ZSV, provocando su desestructuración e inhibición. En nuestra muestra de pacientes con formas SP, en la que podríamos esperar que los hallazgos correspondientes a la microglía persistentemente activada sean más manifiestos, ya que directamente éstos se han relacionado con la patogenia de esta fase de la enfermedad [20], vemos como los cambios producidos en la estructura de la ZSV son más evidentes respecto a las

formas RR y respecto a los controles sanos. Estos hallazgos nos permiten interpretar que los cambios observados en la estructura de la ZSV en nuestra muestra de pacientes con EM estén en relación con la destrucción o desestructuración de la ZSV más que con la activación de su capacidad proliferativa y migratoria. El aumento de la FA observado sería el reflejo del acúmulo de células progenitoras que han perdido su capacidad migratoria o de células inflamatorias responsables del daño establecido (por ejemplo la microglía crónica activada o astrocitos reactivos) o, incluso, de tejido fibroso que sea capaz también de marcar una dirección preferencial.

7.6. Aplicación clínica y consecuencias de la afectación de la ZSV en pacientes de EM:

La discapacidad a largo plazo de los pacientes depende en mayor medida del daño axonal y la neurodegeneración difusa, y el papel directo de la ZSV en este sentido podría tener un efecto más limitado. La remielinización de los axones desmielinizados es fundamental para reconstituir su correcta funcionalidad y por tanto es un mecanismo primordial de reparación del daño del SNC producido en la EM [179, 190]. Como muestran distintos trabajos, la ZSV tiene un papel importante en esta misión y ante el insulto inflamatorio que ocurre en la EM ésta se ve estimulada, incrementando su capacidad proliferativa, consiguiendo una remielinización eficaz en estadios iniciales, capaz de compensar las consecuencias del daño producido en los primeros años de la enfermedad [154, 191]. Pero sabemos que con el paso del tiempo, con la mayor edad de los pacientes y con el daño acumulado, esta estimulación se ve mermada y se produce un efecto contrario, con el consecuente fracaso de los mecanismos reparadores del SNC [169].

Si se produce un fallo en la remielinización y en la reparación de los axones dañados por el exposición directa a sustancias tóxicas, y eso unido a que probablemente la capacidad natural de producción de nuevas neuronas funcionales a partir de la ZSV es más limitada en el cerebro adulto, el efecto final será el del daño axonal difuso y la neurodegeneración responsable del acúmulo de discapacidad de los pacientes, pese al estímulo de la ZSV y la consecuente remielinización eficaz que ocurre al menos en estadios iniciales de la enfermedad [179, 190]. Por tanto, esta activación de la ZSV con capacidad de oligodendrogénesis se vería agotada y no sería suficiente de forma

natural para prevenir el acúmulo de carga lesional, la atrofia cerebral y, finalmente, la discapacidad de los pacientes (confirmándose nuestra hipótesis). Conociendo el hecho de que los precursores de oligodendrocitos tienen un papel en el mantenimiento de la integridad de la BHE [199], el agotamiento progresivo a este nivel podría tener una implicación en cierre patológico de la BHE que ocurre en la EM y de esta forma, al igual que se impide el paso de linfocitos T y citoquinas proinflamatorias, también se vería limitado el paso a otras citoquinas antiinflamatorias u otros factores de crecimiento, contribuyendo todo ello a la perpetuación de la inflamación crónica atrapada que ocurre en estadios finales de la enfermedad [59].

En este sentido y atendiendo a la segunda hipótesis, los cambios observados en la estructura de la ZSV de esta muestra de pacientes mediante RM de alta resolución podrían reflejar más bien la pérdida de la capacidad de reparación del SNC mediante el fracaso de los mecanismos dirigidos hacia la remielinización y, de forma indirecta, constituir un biomarcador del daño inflamatorio establecido en las formas progresivas de EM.

Toda esta información la debemos interpretar bajo el conocimiento de que no existe un mecanismo único que explique la progresión de discapacidad en la EM y que existen distintos procesos de reparación del SN cuyos mecanismos pueden estar alterados de forma heterogénea [179].

En resumen, los cambios observados en la estructura de la ZSV se corresponde con los pacientes en los que se ha producido un mayor daño derivado de la enfermedad (desarrollo clínico de forma SP, mayor discapacidad, mayor acúmulo de lesiones y mayor pérdida de volumen cerebral), y, por tanto, aquellos en los que han podido fracasar de forma más evidente los mecanismos de reparación/remielinización del SNC. En esta muestra, reflejo de lo que ocurre en la realidad de la enfermedad, estos mecanismos naturales no son suficientes para compensar todo el daño, y ello se refleja en la menor capacidad de compensación cortical del SN observada en la RM funcional y en el mayor grado de discapacidad final de los pacientes.

7.7. Aplicación clínica del estudio de ZSV en EM y perspectivas de terapia en el futuro:

Desde el punto de vista clínico, sabemos que en el momento en el que actualmente somos capaces de diagnosticar la forma progresiva de la enfermedad es tardío, por lo que el daño neurodegenerativo ya está establecido y la discapacidad acumulada por los pacientes es irreversible, ya que en la práctica clínica no disponemos de herramientas terapéuticas eficaces para revertir todo este proceso. Actualmente existen tratamientos de alta eficacia para la enfermedad, capaces de controlar con alta probabilidad el proceso inflamatorio expresado por brotes o actividad en RM. Pero la mayoría de estos fármacos han fracasado en prevenir o retrasar la discapacidad de los pacientes cuando son administrados de forma tardía, en la fase progresiva de la enfermedad. En la actualidad existe una tendencia al cambio en el manejo clínico de la EM, con el objetivo de administrar los fármacos de alta eficacia de forma precoz, al diagnóstico, con el fin de modificar la historia natural de la enfermedad y tratar así, no solo de controlar el proceso inflamatorio, sino también de evitar que se inicie o al menos intentar frenar a largo plazo el proceso neurodegenerativo de la enfermedad [200, 201]. Dado que estas terapias de alta eficacia conllevan un riesgo asociado al mecanismo inmunosupresor más potente, no se pueden administrar de forma general a todos los pacientes, sino que se deben seleccionar aquellos en los que se considere que tienen factores de mal pronóstico y mayor riesgo de discapacidad a largo plazo. Con esta finalidad, se hace imprescindible la necesidad de poder identificar a los pacientes con formas progresivas de la enfermedad de forma precoz, y así poder recibir cuanto antes un tratamiento individualizado, de alta eficacia o dirigido a controlar el proceso neurodegenerativo. Para ello, actualmente existe un compromiso en el desarrollo de investigación con el objetivo de desarrollar biomarcadores que nos permitan detectar desde el inicio, ante el primer brote clínico, qué pacientes son los que presentan una forma progresiva de la enfermedad, que se pondrá de manifiesto con el paso de los años, en forma de acúmulo progresivo e irreversible de discapacidad, cuando ya hayan fracasado los mecanismos de compensación del SNC y el proceso neurodegenerativo sea clínica y radiológicamente manifiesto.

Entre las herramientas usadas con esta finalidad, destaca el estudio de atrofia cerebral mediante RM, ya que ha sido el más ampliamente estudiado, y nos permite predecir la

evolución de los pacientes desde el primer brote de la enfermedad. Sin embargo, debemos interpretar los valores con cautela, dado que las técnicas disponibles miden el volumen tisular cerebral, ya sea a nivel global o regional, y no miden de forma concreta el daño neuroaxonal. Por ello hemos de tener en cuenta el resto de cambios, ya sean fisiológicos (estado de hidratación), secundarios a la EM (pérdida neuroaxonal, pero también edema por inflamación aguda, gliosis, desmielinización o procesos de remielinización) o secundarios a los distintos TME (reducción del edema agudo provocado por las lesiones, citotoxicidad). Por tanto, debemos distinguir entre atrofia, que supone la pérdida real e irreversible de parénquima cerebral, y pseudoatrofia, que hace referencia a la pérdida transitoria de volumen cerebral secundaria a la pérdida de agua (por ejemplo por resolución del edema en la inflamación) [87, 127].

Poder detectar en qué pacientes se produce un daño y desestructuración de la ZSV nos podría ayudar a identificar cuáles son los pacientes con EM que presentan una alteración más evidente de los mecanismos de remodelación del SN y, por tanto, podrían tener más riesgo de desarrollar la forma progresiva de la enfermedad. Con esta perspectiva futura, el estudio de los cambios de la ZSV mediante RM de difusión podría constituir otro biomarcador de daño establecido a nivel de SNC en EM. El poder realizar esta aproximación a la estructura de la ZSV mediante estudios de RM, nos permitiría realizar in vivo estudios evolutivos para ayudar a comprender los cambios que se producen en esta estructura crítica a nivel de regulación del SN a lo largo de la evolución de los pacientes con EM. En nuestra muestra estudiada hemos detectado que el valor de la FA de la ZSV tiende a ser mayor en las formas progresivas respecto a las formas RR y también existe una correlación significativa entre el aumento del valor de FA y la mayor atrofia cerebral. La muestra de pacientes con EMRR seleccionada para este estudio son pacientes con diagnóstico de forma RR en los que no se ha desarrollado la forma progresiva de la enfermedad tras más de 10 años de media de evolución y pasar los 40 años de edad, por lo tanto se trata probablemente de pacientes con EM que no desarrollarán la forma progresiva de la enfermedad. En este sentido, sería interesante estudiar pacientes desde el primer brote con criterios de mal pronóstico para el desarrollo de forma la forma progresiva de la enfermedad, por ejemplo presentar atrofia cerebral u otros biomarcadores de daño axonal elevados, como la chitinasa o los neurofilamentos de cadena ligera, desde el

inicio. Estudiar si en este tipo de pacientes ya existen cambios en la estructura de la ZSV desde el inicio de la enfermedad nos podría ayudar a identificar a los pacientes con formas progresivas de forma precoz, y así ser un marcador más para poder aplicar una estrategia terapéutica más individualizada.

En cuanto a las herramientas terapéuticas, con las TME actuales podemos controlar la actividad inflamatoria, tanto los brotes como la aparición de nuevas lesiones o lesiones activas con realce de contraste en la RM, de la mayor parte de los pacientes con EM [201]. Ante un primer evento desmielinizante y en estadios iniciales de la enfermedad, el proceso de remielinización que se produce de forma espontánea, aunque es parcial, resulta inicialmente eficaz, lo cual se traduce en la mejoría clínica de los pacientes. Sabemos que conforme se suceden más eventos desmielinizantes la nueva mielina formada es más susceptible a la inflamación y que, por otro lado, el proceso de remielinización natural dependiente del estímulo de la ZSV también se va agotando ante un estado de inflamación repetido. En este sentido, el uso desde el inicio de la enfermedad de TME de alta eficacia capaces de prevenir en un alto porcentaje los eventos desmielinizantes han demostrado mejorar a largo plazo el pronóstico de los pacientes [202]. Quizá este tipo de tratamientos sean capaces de eliminar en gran medida la inflamación y por tanto prevenir la desestructuración de la ZSV y con ello el agotamiento de su capacidad proliferativa.

El único subgrupo de fármacos que utilizamos en la actualidad para el tratamiento progresivo de la enfermedad son los anticuerpos monoclonales dirigidos contra la proteína cd20, el rituximab, usado por uso compasivo en pacientes jóvenes con formas SP activas y el ocrelizumab, aprobado por ficha técnica para pacientes jóvenes con formas PP activas [203, 204]. Ambos fármacos han demostrado gran eficacia para prevenir la actividad inflamatoria de la enfermedad, pero su beneficio en formas progresivas puras sin actividad en cuanto a prevenir o disminuir el riesgo de progresión a largo plazo es más limitado, sobre todo si lo administramos de forma tardía, en pacientes con mayor edad o formas más evolucionadas de la enfermedad. El mecanismo exacto por el cual pueden ser eficaces en las formas progresivas no es del todo conocido.

Pese a que disponemos cada vez de más TME, para poder influir sobre el componente progresivo de la enfermedad actualmente es prioritaria la búsqueda de nuevos

fármacos o herramientas terapéuticas que puedan tener un mecanismo más neuroprotector, que puedan prevenir o influir sobre los mecanismos subyacentes a la degeneración axonal o ayudar a estimular los mecanismos de remielinización.

Existe un amplio escenario de posibles dianas terapéuticas para la reparación/neuroprotección, y hasta ahora las dianas que parecen más factibles son aquellas que promueven la remielinización. Otra diana terapéutica con gran perspectiva dado el papel fundamental que posee en la regulación de la capacidad proliferativa de la ZSV son los inhibidores de microglía. Éstos suponen agentes potenciales para el tratamiento de la EM, sobre todo para prevenir la degeneración en la fase progresiva de la enfermedad. Pese al concepto teórico beneficioso y que se han investigado algunas moléculas en este sentido [171], actualmente no disponemos en la práctica clínica habitual terapias orientadas fundamentalmente a inhibir la microglía. En este sentido, sólo disponemos de fármacos que parte de su efecto neuroprotector podría ser a través de la inhibición de esta microglía crónica activada, como el dimetilfumarato, usado en la forma RR de la enfermedad o el rituximab, que puede ser usado en la forma progresiva, ya que es uno de los pocos fármacos que ha demostrado su beneficio en esta fase de la enfermedad [177, 178].

El hallazgo de que la ZSV sufre cambios durante la evolución de la EM abre la posibilidad a investigar sobre nuevas dianas terapéuticas, como podría ser la estimulación de los mecanismos de reparación naturales de la ZSV, para hacerlos más potentes y que de esta forma si sean suficientes para compensar el daño de la enfermedad a largo plazo y evitar la inexorable desmielinización, neurodegeneración y acúmulo progresivo de discapacidad que ocurre en los pacientes, fundamentalmente en los que se hace evidente a nivel clínico el fenotipo SP tras los años de evolución.

En este sentido la terapia celular propone estrategias para mejorar la remielinización espontánea, evitar su fracaso y con ellos restablecer la estructura normal del SNC.

Podemos aproximarnos mediante reclutamiento in vivo de células endógenas o mediante trasplante de células exógenas. Las células precursoras de la ZSV se consideran una fuente celular adecuada para el trasplante neuronal. Su efecto beneficioso no sólo reside en la habilidad para generar nuevas neuronas u

oligodendrocitos, sino en otras capacidades neuroprotectoras, como soporte neurotrófico, inmunomodulación o mecanismos de reparación endógenos.

Se han ensayado distintos abordajes terapéuticos basados en la estimulación de los progenitores residentes en la ZSV en modelos animales de EM. También se plantean estrategias en las que se pueda manipular el ambiente de las lesiones crónicas, haciéndolo de nuevo susceptible (como el de las lesiones agudas) para que tenga lugar la remielinización eficaz. Son terapias altamente complejas ya que las células trasplantadas deben sobrevivir al microambiente hostil, diferenciarse en el fenotipo maduro apropiado, incorporarse al complejo circuito del huésped y conseguir reconstruirlo. Los oligodendrocitos derivados de la ZSV se desarrollan desde estadios iniciales hasta llegar al fenotipo maduro capaz de formar nueva mielina y de volver a cubrir axones desmielinizados en modelos animales [183, 205, 206]. Actualmente se están haciendo esfuerzos en la manipulación in vitro de estos progenitores para mejorar el pronóstico de los trasplantes de células de la ZSV. El trasplante de células con factores promotores de la supervivencia y la remielinización, o la manipulación genética para producción de estos factores, que probablemente se hayan perdido en estadios tardíos de la enfermedad. El carácter multifocal y difuso de la EM supone un reto para estas prometedoras terapias.

8. CONCLUSIONES

En cuanto a la implicación de la ZSV en la progresión de discapacidad en EM, de la presente tesis doctoral derivan las siguientes conclusiones:

1. Existen cambios en la estructura de la ZSV en los pacientes con EM respecto a controles sanos y estos pueden ser medidos por estudios de RM de difusión.
2. Los cambios de la estructura de la ZSV son más evidentes en las formas más evolucionadas de la enfermedad, pero, desde el punto de vista estadístico, no hemos podido establecer su correlación con la aparición de progresión sostenida de discapacidad de los pacientes con EM medida por la escala EDSS.
3. La alteración de la estructura de la ZSV está en relación con el mayor acúmulo de volumen de carga de lesiones en los pacientes con EM.
4. La alteración de la estructura de la ZSV está en relación con la mayor pérdida de volumen cerebral en los pacientes con EM.
5. Aunque los cambios de la ZSV son más evidentes en las formas más evolucionadas de la enfermedad y en este subgrupo de pacientes sí hemos observado que se produce un fallo en los mecanismos de compensación medidos por RM funcional, no hemos podido demostrar su relación desde el punto de vista estadístico.

9. LIMITACIONES DEL TRABAJO

Se trata de un estudio transversal con una muestra limitada. Sería de interés realizar dicho estudio longitudinal con un diseño prospectivo a medio y largo plazo y con una muestra mayor, de forma que pudiéramos obtener información más precisa sobre los cambios que ocurren en la ZSV a lo largo de la evolución de los pacientes con EM. Al realizar la medición de los cambios de la ZSV “in vivo” mediante estudios de RM estos estudios evolutivos serían más factibles.

Por otro lado, los hallazgos observados en la ZSV de los pacientes con EM sólo son evidentes de forma significativa en la ZSV correspondiente al hemisferio del lado izquierdo. Como explicación a este fenómeno, destacar que podría tener una explicación en el hecho de que todos los pacientes seleccionados son diestros, y el hemisferio izquierdo sería el dominante. Como trabajo añadido, se podría plantear medir la carga lesional separada por hemisferios en cada paciente, para ver si ésta fuera diferente y, por tanto, el distinto estímulo lesional pudiera ser una causa de la activación diferencial de la oligodendrogénesis en la ZSV de cada hemisferio.

Aunque el estudio de difusión por RM es una técnica que nos ofrece gran información complementaria respecto al sustrato patogénico subyacente al daño que ocurre en la EM, debemos tener en cuenta que la especificidad de la técnica puede verse limitada ante el estudio de regiones con microestructuras complejas, como puede ser la región definida como ZSV. La falta de correlación con estudios de anatomía patológica nos impide conocer de forma definitiva qué cambios ocurren exactamente en la ZSV a lo largo de la evolución de la EM.

10. FUTURAS LÍNEAS DE INVESTIGACIÓN

De la presente tesis doctoral surgen futuras líneas de investigación que se desarrollarán en la Unidad de Neuroinmunología Central del IIS La Fe.

1) Estudio de BHE en EM.

Los cambios en la permeabilidad de la BHE son cruciales en la patogenia de la EM, y estos cambian en función del estadio evolutivo de la enfermedad.

En las formas progresivas de EM, por mecanismos hoy en día no del todo conocidos, se produce un cierre de la BHE, lo cual conlleva al atrapamiento de distintas células inflamatorias que producen una inflamación crónica y mantenida, probablemente responsable del proceso degenerativo de la enfermedad.

Sabemos que los precursores de oligodendrocitos contribuyen a la integridad de la BHE. Al inicio de la enfermedad, ante el daño inflamatorio agudo, se produce un incremento de estos precursores, que podrían contribuir al cierre posterior de la BHE y que como consecuencia de ello se impida el paso de células antiinflamatorias y factores de crecimiento con intención reparadora desde la periferia. Ello, unido al fracaso propio de la capacidad proliferativa de la ZSV en la EM, contribuiría al daño progresivo e irreversible consecuente de la inflamación atrapada bajo este cierre irreversible de la BHE.

Referencias bibliográficas

1. Dyment DA, Ebers GC, Sadovnick AD (2004) Genetics of multiple sclerosis. *Lancet Neurol* 3:104–10.
2. Handel AE, Giovannoni G, Ebers GC, Ramagopalan S V. (2010) Environmental factors and their timing in adult-onset multiple sclerosis. *Nat Rev Neurol* 6:156–166. doi: 10.1038/nrneurol.2010.1
3. Ebers G (2013) Interactions of environment and genes in multiple sclerosis. *J Neurol Sci* 334:161–163. doi: 10.1016/j.jns.2013.08.018
4. Noseworthy JH, Lucchinetti C, Rodriguez M, Weinshenker BG (2000) Multiple Sclerosis. *N Engl J Med* 343:938–952. doi: 10.1056/NEJM200009283431307
5. Lassmann H (2018) Multiple Sclerosis Pathology. *Cold Spring Harb Perspect Med* 8:a028936. doi: 10.1101/cshperspect.a028936
6. Mahad DH, Trapp BD, Lassmann H (2015) Pathological mechanisms in progressive multiple sclerosis. *Lancet Neurol* 14:183–193. doi: 10.1016/S1474-4422(14)70256-X
7. Koudriavtseva T, Mainero C (2016) Neuroinflammation, neurodegeneration and regeneration in multiple sclerosis: intercorrelated manifestations of the immune response. *Neural Regen Res* 11:1727–1730. doi: 10.4103/1673-5374.194804
8. Kobelt G, Thompson A, Berg J, u.c. (2017) New insights into the burden and costs of multiple sclerosis in Europe. *Mult Scler J* 23:1123–1136. doi: 10.1177/1352458517694432
9. Pugliatti M, Sotgiu S, Rosati G (2002) The worldwide prevalence of multiple sclerosis. *Clin Neurol Neurosurg* 104:182–91.
10. Pugliatti M, Rosati G, Carton H, u.c. (2006) The epidemiology of multiple sclerosis in Europe. *Eur J Neurol* 13:700–722. doi: 10.1111/j.1468-1331.2006.01342.x
11. Kingwell E, Leray E, Zhu F, u.c. (2019) Multiple sclerosis: effect of beta interferon treatment on survival. *Brain*. doi: 10.1093/brain/awz055
12. Lucchinetti C, Brück W, Parisi J, u.c. (2000) Heterogeneity of multiple sclerosis lesions: implications for the pathogenesis of demyelination. *Ann Neurol* 47:707–17.
13. Baranzini SE, Oksenberg JR (2017) The Genetics of Multiple Sclerosis: From 0

- to 200 in 50 Years. *Trends Genet* 33:960–970. doi: 10.1016/j.tig.2017.09.004
14. Van Kaer L, Postoak JL, Wang C, u.c. (2019) Innate, innate-like and adaptive lymphocytes in the pathogenesis of MS and EAE. *Cell Mol Immunol*. doi: 10.1038/s41423-019-0221-5
 15. Gholamzad M, Ebtekar M, Ardestani MS, u.c. (2019) A comprehensive review on the treatment approaches of multiple sclerosis: currently and in the future. *Inflamm Res* 68:25–38. doi: 10.1007/s00011-018-1185-0
 16. Hemmer B, Nessler S, Zhou D, u.c. (2006) Immunopathogenesis and immunotherapy of multiple sclerosis. *Nat Clin Pract Neurol* 2:201–211. doi: 10.1038/ncpneuro0154
 17. Sospedra M, Martin R (2005) Immunology of multiple sclerosis. *Annu Rev Immunol* 23:683–747. doi: 10.1146/annurev.immunol.23.021704.115707
 18. Häusser-Kinzel S, Weber MS (2019) The Role of B Cells and Antibodies in Multiple Sclerosis, Neuromyelitis Optica, and Related Disorders. *Front Immunol* 10:201. doi: 10.3389/fimmu.2019.00201
 19. Beltrán E, Hernández A, Lafuente EM, u.c. (2012) Neuronal antigens recognized by cerebrospinal fluid IgM in multiple sclerosis. *J Neuroimmunol* 247:63–9. doi: 10.1016/j.jneuroim.2012.03.013
 20. Gandhi R, Laroni A, Weiner HL (2010) Role of the innate immune system in the pathogenesis of multiple sclerosis. *J Neuroimmunol* 221:7–14. doi: 10.1016/j.jneuroim.2009.10.015
 21. Du L, Zhang Y, Chen Y, u.c. (2017) Role of Microglia in Neurological Disorders and Their Potentials as a Therapeutic Target. *Mol Neurobiol* 54:7567–7584. doi: 10.1007/s12035-016-0245-0
 22. Filippi M, Rocca MA, Ciccarelli O, u.c. (2016) MRI criteria for the diagnosis of multiple sclerosis: MAGNIMS consensus guidelines. *Lancet Neurol* 15:292–303. doi: 10.1016/S1474-4422(15)00393-2
 23. Filippi M, Rocca MA, Barkhof F, u.c. (2012) Association between pathological and MRI findings in multiple sclerosis. *Lancet Neurol* 11:349–360. doi: 10.1016/S1474-4422(12)70003-0
 24. Miller DH, Grossman RI, Reingold SC, McFarland HF (1998) The role of magnetic resonance techniques in understanding and managing multiple sclerosis. *Brain* 121 (Pt 1):3–24.
 25. Poser CM, Paty DW, Scheinberg L, u.c. (1983) New diagnostic criteria for

- multiple sclerosis: Guidelines for research protocols. *Ann Neurol* 13:227–231. doi: 10.1002/ana.410130302
26. Thompson AJ, Banwell BL, Barkhof F, u.c. (2018) Diagnosis of multiple sclerosis: 2017 revisions of the McDonald criteria. *Lancet Neurol* 17:162–173. doi: 10.1016/S1474-4422(17)30470-2
 27. Schwenkenbecher P, Wurster U, Konen FF, u.c. (2019) Impact of the McDonald Criteria 2017 on Early Diagnosis of Relapsing-Remitting Multiple Sclerosis. *Front Neurol* 10:188. doi: 10.3389/fneur.2019.00188
 28. Swanton JK, Fernando K, Dalton CM, u.c. (2006) Modification of MRI criteria for multiple sclerosis in patients with clinically isolated syndromes. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 77:830–3. doi: 10.1136/jnnp.2005.073247
 29. Swanton JK, Rovira A, Tintore M, u.c. (2007) MRI criteria for multiple sclerosis in patients presenting with clinically isolated syndromes: a multicentre retrospective study. *Lancet Neurol* 6:677–86. doi: 10.1016/S1474-4422(07)70176-X
 30. Polman CH, Reingold SC, Banwell B, u.c. (2011) Diagnostic criteria for multiple sclerosis: 2010 revisions to the McDonald criteria. *Ann Neurol* 69:292–302. doi: 10.1002/ana.22366
 31. Bermel RA, Weinstock-Guttman B, Bourdette D, u.c. (2010) Intramuscular interferon beta-1a therapy in patients with relapsing-remitting multiple sclerosis: a 15-year follow-up study. *Mult Scler* 16:588–96. doi: 10.1177/1352458509360549
 32. Comi G, Filippi M, Wolinsky JS (2001) European/Canadian multicenter, double-blind, randomized, placebo-controlled study of the effects of glatiramer acetate on magnetic resonance imaging--measured disease activity and burden in patients with relapsing multiple sclerosis. European/Canadian Glatiramer Acetate Study Group. *Ann Neurol* 49:290–7.
 33. Hauser SL, Bar-Or A, Comi G, u.c. (2017) Ocrelizumab versus Interferon Beta-1a in Relapsing Multiple Sclerosis. *N Engl J Med* 376:221–234. doi: 10.1056/NEJMoa1601277
 34. Kappos L, Radue E-W, O'Connor P, u.c. (2010) A placebo-controlled trial of oral fingolimod in relapsing multiple sclerosis. *N Engl J Med* 362:387–401. doi: 10.1056/NEJMoa0909494
 35. Havrdova E, Galetta S, Hutchinson M, u.c. (2009) Effect of natalizumab on

- clinical and radiological disease activity in multiple sclerosis: a retrospective analysis of the Natalizumab Safety and Efficacy in Relapsing-Remitting Multiple Sclerosis (AFFIRM) study. *Lancet Neurol* 8:254–60. doi: 10.1016/S1474-4422(09)70021-3
36. Gold R (2011) Oral Therapies for Multiple Sclerosis. *CNS Drugs* 25:37–52. doi: 10.2165/11539820-000000000-00000
 37. Giovannoni G, Cook S, Rammohan K, u.c. (2011) Sustained disease-activity-free status in patients with relapsing-remitting multiple sclerosis treated with cladribine tablets in the CLARITY study: a post-hoc and subgroup analysis. *Lancet Neurol* 10:329–37. doi: 10.1016/S1474-4422(11)70023-0
 38. Hartung H-P, Aktas O (2011) Evolution of multiple sclerosis treatment: next generation therapies meet next generation efficacy criteria. *Lancet Neurol* 10:293–295. doi: 10.1016/S1474-4422(11)70043-6
 39. Coles AJ, Fox E, Vladic A, u.c. (2012) Alemtuzumab more effective than interferon -1a at 5-year follow-up of CAMMS223 Clinical Trial. *Neurology* 78:1069–1078. doi: 10.1212/WNL.0b013e31824e8ee7
 40. Cohen JA, Coles AJ, Arnold DL, u.c. (2012) Alemtuzumab versus interferon beta 1a as first-line treatment for patients with relapsing-remitting multiple sclerosis: a randomised controlled phase 3 trial. *Lancet (London, England)* 380:1819–28. doi: 10.1016/S0140-6736(12)61769-3
 41. Sormani MP, Muraro PA, Schiavetti I, u.c. (2017) Autologous hematopoietic stem cell transplantation in multiple sclerosis. *Neurology* 88:2115–2122. doi: 10.1212/WNL.0000000000003987
 42. Lublin FD, Baier M, Cutter G (2003) Effect of relapses on development of residual deficit in multiple sclerosis. *Neurology* 61:1528–32.
 43. Cree BAC, Hollenbach JA, Bove R, u.c. (2019) Silent Progression in Disease Activity–Free Relapsing Multiple Sclerosis. *Ann Neurol* ana.25463. doi: 10.1002/ana.25463
 44. Confavreux C, Vukusic S, Moreau T, Adeleine P (2000) Relapses and progression of disability in multiple sclerosis. *N Engl J Med* 343:1430–8. doi: 10.1056/NEJM200011163432001
 45. Leray E, Yaouanq J, Le Page E, u.c. (2010) Evidence for a two-stage disability progression in multiple sclerosis. *Brain* 133:1900–13. doi: 10.1093/brain/awq076

46. Tremlett H, Yousefi M, Devonshire V, u.c. (2009) Impact of multiple sclerosis relapses on progression diminishes with time. *Neurology* 73:1616–1623. doi: 10.1212/WNL.0b013e3181c1e44f
47. Scott TF (2017) Understanding the impact of relapses in the overall course of MS; refinement of the 2 stage natural history model. *J Neuroimmunol* 305:162–166. doi: 10.1016/j.jneuroim.2017.02.011
48. Brown JW, Coles A, Horakova D, u.c. (2019) Association of Initial Disease-Modifying Therapy With Later Conversion to Secondary Progressive Multiple Sclerosis. *JAMA* 321:175. doi: 10.1001/jama.2018.20588
49. Coret F, Pérez-Miralles FC, Gascón F, u.c. (2018) Onset of secondary progressive multiple sclerosis is not influenced by current relapsing multiple sclerosis therapies. *Mult Scler J - Exp Transl Clin* 4:205521731878334. doi: 10.1177/2055217318783347
50. Miller D, Barkhof F, Montalban X, u.c. (2005) Clinically isolated syndromes suggestive of multiple sclerosis, part I: natural history, pathogenesis, diagnosis, and prognosis. *Lancet Neurol* 4:281–288. doi: 10.1016/S1474-4422(05)70071-5
51. Lublin FD, Reingold SC (1996) Defining the clinical course of multiple sclerosis: results of an international survey. National Multiple Sclerosis Society (USA) Advisory Committee on Clinical Trials of New Agents in Multiple Sclerosis. *Neurology* 46:907–11.
52. Lublin FD, Reingold SC, Cohen JA, u.c. (2014) Defining the clinical course of multiple sclerosis: The 2013 revisions. *Neurology* 83:278–286. doi: 10.1212/WNL.0000000000000560
53. Paz Soldan MM, Novotna M, Abou Zeid N, u.c. (2015) Relapses and disability accumulation in progressive multiple sclerosis. *Neurology* 84:81–88. doi: 10.1212/WNL.0000000000001094
54. Keegan BM, Kaufmann TJ, Weinshenker BG, u.c. (2016) Progressive solitary sclerosis. *Neurology* 87:1713–1719. doi: 10.1212/WNL.0000000000003235
55. Tutuncu M, Tang J, Zeid NA, u.c. (2013) Onset of progressive phase is an age-dependent clinical milestone in multiple sclerosis. *Mult Scler* 19:188–98. doi: 10.1177/1352458512451510
56. Zeydan B, Kantarci OH (2018) Progressive Forms of Multiple Sclerosis: Distinct Entity or Age-Dependent Phenomena. *Neurol Clin* 36:163–171. doi: 10.1016/j.ncl.2017.08.006

57. Kantarci OH (2019) Phases and Phenotypes of Multiple Sclerosis. *Contin Lifelong Learn Neurol* 25:636–654. doi: 10.1212/CON.0000000000000737
58. Confavreux C, Vukusic S, Adeleine P (2003) Early clinical predictors and progression of irreversible disability in multiple sclerosis: an amnesic process. *Brain* 126:770–82.
59. Lassmann H, van Horssen J, Mahad D (2012) Progressive multiple sclerosis: pathology and pathogenesis. *Nat Rev Neurol* 8:647–56. doi: 10.1038/nrneurol.2012.168
60. Frischer JM, Bramow S, Dal-Bianco A, u.c. (2009) The relation between inflammation and neurodegeneration in multiple sclerosis brains. *Brain* 132:1175–89. doi: 10.1093/brain/awp070
61. Tremlett H, Yousefi M, Devonshire V, u.c. (2009) Impact of multiple sclerosis relapses on progression diminishes with time. *Neurology* 73:1616–23. doi: 10.1212/WNL.0b013e3181c1e44f
62. Eriksson PS, Perfilieva E, Björk-Eriksson T, u.c. (1998) Neurogenesis in the adult human hippocampus. *Nat Med* 4:1313–1317. doi: 10.1038/3305
63. Scalfari A, Neuhaus A, Degenhardt A, u.c. (2010) The natural history of multiple sclerosis: a geographically based study 10: relapses and long-term disability. *Brain* 133:1914–29. doi: 10.1093/brain/awq118
64. Jokubaitis VG, Spelman T, Kalincik T, u.c. (2016) Predictors of long-term disability accrual in relapse-onset multiple sclerosis. *Ann Neurol* 80:89–100. doi: 10.1002/ana.24682
65. Rocca MA, Filippi M (2006) Functional MRI to study brain plasticity in clinical neurology. *Neurol Sci* 27:s24–s26. doi: 10.1007/s10072-006-0541-y
66. Filippi M, Rocca MA (2009) Functional MR Imaging in Multiple Sclerosis. *Neuroimaging Clin N Am* 19:59–70. doi: 10.1016/j.nic.2008.08.004
67. Kremenutzky M, Rice GPA, Baskerville J, u.c. (2006) The natural history of multiple sclerosis: a geographically based study 9: observations on the progressive phase of the disease. *Brain* 129:584–94. doi: 10.1093/brain/awh721
68. Tutuncu M, Tang J, Zeid NA, u.c. (2013) Onset of progressive phase is an age-dependent clinical milestone in multiple sclerosis. *Mult Scler J* 19:188–198. doi: 10.1177/1352458512451510
69. Koch M, Mostert J, Heersema D, De Keyser J (2007) Progression in multiple sclerosis: Further evidence of an age dependent process. *J Neurol Sci* 255:35–

41. doi: 10.1016/j.jns.2007.01.067
70. Koch M, Kingwell E, Rieckmann P, u.c. (2010) The natural history of secondary progressive multiple sclerosis. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 81:1039–1043. doi: 10.1136/jnnp.2010.208173
71. Kurtzke JF (1983) Rating neurologic impairment in multiple sclerosis: an expanded disability status scale (EDSS). *Neurology* 33:1444–52.
72. Sadeghian M, Mastrolia V, Rezaei Haddad A, u.c. (2016) Mitochondrial dysfunction is an important cause of neurological deficits in an inflammatory model of multiple sclerosis. *Sci Rep* 6:33249. doi: 10.1038/srep33249
73. Rajda C, Pukoli D, Bende Z, u.c. (2017) Excitotoxins, Mitochondrial and Redox Disturbances in Multiple Sclerosis. *Int J Mol Sci* 18:353. doi: 10.3390/ijms18020353
74. Gandhi R, Laroni A, Weiner HL (2010) Role of the innate immune system in the pathogenesis of multiple sclerosis. *J Neuroimmunol* 221:7–14. doi: 10.1016/j.jneuroim.2009.10.015
75. Tüzün E (2018) Immunopathological Factors Associated with Disability in Multiple Sclerosis. *Noro Psikiyatr Ars* 55:S26–S30. doi: 10.29399/npa.23303
76. Rahn AC, Köpke S, Stellmann J-P, u.c. (2019) Magnetic resonance imaging as a prognostic disability marker in clinically isolated syndrome: A systematic review. *Acta Neurol Scand* 139:18–32. doi: 10.1111/ane.13010
77. Barkhof F (2002) The clinico-radiological paradox in multiple sclerosis revisited. *Curr Opin Neurol* 15:239–45.
78. Filippi M, Paty DW, Kappos L, u.c. (1995) Correlations between changes in disability and T2-weighted brain MRI activity in multiple sclerosis: a follow-up study. *Neurology* 45:255–60.
79. Tintore M, Rovira À, Río J, u.c. (2015) Defining high, medium and low impact prognostic factors for developing multiple sclerosis. *Brain* 138:1863–74. doi: 10.1093/brain/awv105
80. Enzinger C, Barkhof F, Ciccarelli O, u.c. (2015) Nonconventional MRI and microstructural cerebral changes in multiple sclerosis. *Nat Rev Neurol* 11:676–686. doi: 10.1038/nrneurol.2015.194
81. Filippi M, Horsfield MA, Morrissey SP, u.c. (1994) Quantitative brain MRI lesion load predicts the course of clinically isolated syndromes suggestive of multiple sclerosis. *Neurology* 44:635–41.

82. Swanton JK, Fernando KT, Dalton CM, u.c. (2009) Early MRI in optic neuritis: the risk for disability. *Neurology* 72:542–50. doi: 10.1212/01.wnl.0000341935.41852.82
83. Wattjes MP, Rovira À, Miller D, u.c. (2015) Evidence-based guidelines: MAGNIMS consensus guidelines on the use of MRI in multiple sclerosis-- establishing disease prognosis and monitoring patients. *Nat Rev Neurol* 11:597–606. doi: 10.1038/nrneurol.2015.157
84. Vidal-Jordana A, Sastre-Garriga J, Pareto D, u.c. (2018) Brain atrophy 15 years after CIS: Baseline and follow-up clinico-radiological correlations. *Mult Scler* 24:721–727. doi: 10.1177/1352458517707070
85. De Stefano N, Giorgio A, Battaglini M, u.c. (2010) Assessing brain atrophy rates in a large population of untreated multiple sclerosis subtypes. *Neurology* 74:1868–76. doi: 10.1212/WNL.0b013e3181e24136
86. Filippi M (2015) MRI measures of neurodegeneration in multiple sclerosis: implications for disability, disease monitoring, and treatment. *J Neurol* 262:1–6. doi: 10.1007/s00415-014-7340-9
87. Sastre-Garriga J, Pareto D, Rovira À (2017) Brain Atrophy in Multiple Sclerosis: Clinical Relevance and Technical Aspects. *Neuroimaging Clin N Am* 27:289–300. doi: 10.1016/j.nic.2017.01.002
88. Lansley J, Mataix-Cols D, Grau M, u.c. (2013) Localized grey matter atrophy in multiple sclerosis: a meta-analysis of voxel-based morphometry studies and associations with functional disability. *Neurosci Biobehav Rev* 37:819–30. doi: 10.1016/j.neubiorev.2013.03.006
89. Sastre-Garriga J, Ingle GT, Chard DT, u.c. (2005) Grey and white matter volume changes in early primary progressive multiple sclerosis: a longitudinal study. *Brain* 128:1454–60. doi: 10.1093/brain/awh498
90. Vidal-Jordana A, Sastre-Garriga J, Pérez-Miralles F, u.c. (2016) Brain Volume Loss During the First Year of Interferon-Beta Treatment in Multiple Sclerosis: Baseline Inflammation and Regional Brain Volume Dynamics. *J Neuroimaging* 26:532–8. doi: 10.1111/jon.12337
91. Pérez-Miralles F, Sastre-Garriga J, Tintoré M, u.c. (2013) Clinical impact of early brain atrophy in clinically isolated syndromes. *Mult Scler* 19:1878–86. doi: 10.1177/1352458513488231
92. Dalton CM (2004) Early development of multiple sclerosis is associated with

- progressive grey matter atrophy in patients presenting with clinically isolated syndromes. *Brain* 127:1101–1107. doi: 10.1093/brain/awh126
93. Fisniku LK, Chard DT, Jackson JS, u.c. (2008) Gray matter atrophy is related to long-term disability in multiple sclerosis. *Ann Neurol* 64:247–54. doi: 10.1002/ana.21423
 94. Jacobsen C, Hagemeyer J, Myhr K-M, u.c. (2014) Brain atrophy and disability progression in multiple sclerosis patients: a 10-year follow-up study. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 85:1109–15. doi: 10.1136/jnnp-2013-306906
 95. Di Filippo M, Anderson VM, Altmann DR, u.c. (2010) Brain atrophy and lesion load measures over 1 year relate to clinical status after 6 years in patients with clinically isolated syndromes. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 81:204–208. doi: 10.1136/jnnp.2009.171769
 96. Amato MP, Hakiki B, Goretti B, u.c. (2012) Association of MRI metrics and cognitive impairment in radiologically isolated syndromes. *Neurology* 78:309–14. doi: 10.1212/WNL.0b013e31824528c9
 97. Haider L, Simeonidou C, Steinberger G, u.c. (2014) Multiple sclerosis deep grey matter: the relation between demyelination, neurodegeneration, inflammation and iron. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 85:1386–95. doi: 10.1136/jnnp-2014-307712
 98. Popescu V, Agosta F, Hulst HE, u.c. (2013) Brain atrophy and lesion load predict long term disability in multiple sclerosis. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 84:1082–91. doi: 10.1136/jnnp-2012-304094
 99. Bernitsas E, Bao F, Seraji-Bozorgzad N, u.c. (2015) Spinal cord atrophy in multiple sclerosis and relationship with disability across clinical phenotypes. *Mult Scler Relat Disord* 4:47–51. doi: 10.1016/j.msard.2014.11.002
 100. Casserly C, Seyman EE, Alcaide-Leon P, u.c. (2018) Spinal Cord Atrophy in Multiple Sclerosis: A Systematic Review and Meta-Analysis. *J Neuroimaging* 28:556–586. doi: 10.1111/jon.12553
 101. Magliozzi R, Howell O, Vora A, u.c. (2006) Meningeal B-cell follicles in secondary progressive multiple sclerosis associate with early onset of disease and severe cortical pathology. *Brain* 130:1089–1104. doi: 10.1093/brain/awm038
 102. Kutzelnigg A, Lucchinetti CF, Stadelmann C, u.c. (2005) Cortical demyelination and diffuse white matter injury in multiple sclerosis. *Brain*

- 128:2705–2712. doi: 10.1093/brain/awh641
103. Magliozzi R, Howell OW, Reeves C, u.c. (2010) A Gradient of neuronal loss and meningeal inflammation in multiple sclerosis. *Ann Neurol* 68:477–93. doi: 10.1002/ana.22230
 104. Kawachi I, Lassmann H (2017) Neurodegeneration in multiple sclerosis and neuromyelitis optica. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 88:137–145. doi: 10.1136/jnnp-2016-313300
 105. Mitsdoerffer M, Peters A (2016) Tertiary Lymphoid Organs in Central Nervous System Autoimmunity. *Front Immunol* 7:451. doi: 10.3389/fimmu.2016.00451
 106. Khalil M, Teunissen C, Langkammer C (2011) Iron and neurodegeneration in multiple sclerosis. *Mult Scler Int* 2011:606807. doi: 10.1155/2011/606807
 107. Haider L, Simeonidou C, Steinberger G, u.c. (2014) Multiple sclerosis deep grey matter: the relation between demyelination, neurodegeneration, inflammation and iron. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 85:1386–95. doi: 10.1136/jnnp-2014-307712
 108. Giannetti P, Politis M, Su P, u.c. (2014) Microglia activation in multiple sclerosis black holes predicts outcome in progressive patients: an in vivo [(11)C](R)-PK11195-PET pilot study. *Neurobiol Dis* 65:203–10. doi: 10.1016/j.nbd.2014.01.018
 109. Ozakbas S, Cinar BP, Özcelik P, u.c. (2017) Intrathecal IgM index correlates with a severe disease course in multiple sclerosis: Clinical and MRI results. *Clin Neurol Neurosurg* 160:27–29. doi: 10.1016/j.clineuro.2017.05.026
 110. Magraner MJ, Bosca I, Simó-Castelló M, u.c. (2012) Brain atrophy and lesion load are related to CSF lipid-specific IgM oligoclonal bands in clinically isolated syndromes. *Neuroradiology* 54:5–12. doi: 10.1007/s00234-011-0841-7
 111. Bosca I, Villar L, Coret F, u.c. (2010) Response to interferon in multiple sclerosis is related to lipid-specific oligoclonal IgM bands. *Mult Scler J* 16:810–815. doi: 10.1177/1352458510371961
 112. Cai L, Huang J (2018) Neurofilament light chain as a biological marker for multiple sclerosis: a meta-analysis study. *Neuropsychiatr Dis Treat* 14:2241–2254. doi: 10.2147/NDT.S173280
 113. Siller N, Kuhle J, Muthuraman M, u.c. (2019) Serum neurofilament light chain is a biomarker of acute and chronic neuronal damage in early multiple sclerosis. *Mult Scler* 25:678–686. doi: 10.1177/1352458518765666

114. Kuhle J, Kropshofer H, Haering DA, u.c. (2019) Blood neurofilament light chain as a biomarker of MS disease activity and treatment response. *Neurology* 92:e1007–e1015. doi: 10.1212/WNL.0000000000007032
115. Modvig S, Degn M, Sander B, u.c. (2016) Cerebrospinal fluid neurofilament light chain levels predict visual outcome after optic neuritis. *Mult Scler* 22:590–8. doi: 10.1177/1352458515599074
116. Harris V, Tuddenham J, Sadiq S (2017) Biomarkers of multiple sclerosis: current findings. *Degener Neurol Neuromuscul Dis* Volume 7:19–29. doi: 10.2147/DNND.S98936
117. Petzold A, Steenwijk MD, Eikelenboom JM, u.c. (2016) Elevated CSF neurofilament proteins predict brain atrophy: A 15-year follow-up study. *Mult Scler* 22:1154–62. doi: 10.1177/1352458516645206
118. Trentini A, Comabella M, Tintoré M, u.c. (2014) N-acetylaspartate and neurofilaments as biomarkers of axonal damage in patients with progressive forms of multiple sclerosis. *J Neurol* 261:2338–43. doi: 10.1007/s00415-014-7507-4
119. de Flon P, Gunnarsson M, Laurell K, u.c. (2016) Reduced inflammation in relapsing-remitting multiple sclerosis after therapy switch to rituximab. *Neurology* 87:141–147. doi: 10.1212/WNL.0000000000002832
120. Martínez MAM, Olsson B, Bau L, u.c. (2015) Glial and neuronal markers in cerebrospinal fluid predict progression in multiple sclerosis. *Mult Scler* 21:550–61. doi: 10.1177/1352458514549397
121. Cantó E, Tintoré M, Villar LM, u.c. (2015) Chitinase 3-like 1: prognostic biomarker in clinically isolated syndromes. *Brain* 138:918–931. doi: 10.1093/brain/awv017
122. Gajofatto A, Calabrese M, Benedetti MD, Monaco S (2013) Clinical, MRI, and CSF markers of disability progression in multiple sclerosis. *Dis Markers* 35:687–99. doi: 10.1155/2013/484959
123. Martinez-Lapiscina EH, Arnow S, Wilson JA, u.c. (2016) Retinal thickness measured with optical coherence tomography and risk of disability worsening in multiple sclerosis: a cohort study. *Lancet Neurol* 15:574–584. doi: 10.1016/S1474-4422(16)00068-5
124. Alonso R, Gonzalez-Moron D, Garcea O (2018) Optical coherence tomography as a biomarker of neurodegeneration in multiple sclerosis: A review. *Mult Scler*

- Relat Disord 22:77–82. doi: 10.1016/j.msard.2018.03.007
125. Dalton CM, Chard DT, Davies GR, u.c. (2004) Early development of multiple sclerosis is associated with progressive grey matter atrophy in patients presenting with clinically isolated syndromes. *Brain* 127:1101–7. doi: 10.1093/brain/awh126
 126. Miller DH, Barkhof F, Frank JA, u.c. (2002) Measurement of atrophy in multiple sclerosis: pathological basis, methodological aspects and clinical relevance. *Brain* 125:1676–95.
 127. Vrenken H, Jenkinson M, Horsfield MA, u.c. (2013) Recommendations to improve imaging and analysis of brain lesion load and atrophy in longitudinal studies of multiple sclerosis. *J Neurol* 260:2458–71. doi: 10.1007/s00415-012-6762-5
 128. Geurts JJG, Rosendaal SD, Calabrese M, u.c. (2011) Consensus recommendations for MS cortical lesion scoring using double inversion recovery MRI. *Neurology* 76:418–424. doi: 10.1212/WNL.0b013e31820a0cc4
 129. Ashburner J, Friston K (1997) Multimodal image coregistration and partitioning--a unified framework. *Neuroimage* 6:209–17. doi: 10.1006/nimg.1997.0290
 130. Smith SM, Zhang Y, Jenkinson M, u.c. (2002) Accurate, robust, and automated longitudinal and cross-sectional brain change analysis. *Neuroimage* 17:479–89.
 131. Bammer R, Skare S, Newbould R, u.c. (2005) Foundations of advanced magnetic resonance imaging. *NeuroRx* 2:167–96. doi: 10.1602/neurorx.2.2.167
 132. Schmierer K, Wheeler-Kingshott CAM, Boulby PA, u.c. (2007) Diffusion tensor imaging of post mortem multiple sclerosis brain. *Neuroimage* 35:467–77. doi: 10.1016/j.neuroimage.2006.12.010
 133. Rovaris M, Filippi M (2007) Diffusion Tensor MRI in Multiple Sclerosis. *J Neuroimaging* 17:27S-30S. doi: 10.1111/j.1552-6569.2007.00133.x
 134. Filippi M, Charil A, Rovaris M, u.c. (2014) Insights from magnetic resonance imaging. No: *Handb Clin Neurol*. lpp 115–149
 135. Kolind SH, Laule C, Vavasour IM, u.c. (2008) Complementary information from multi-exponential T2 relaxation and diffusion tensor imaging reveals differences between multiple sclerosis lesions. *Neuroimage* 40:77–85. doi: 10.1016/j.neuroimage.2007.11.033
 136. Kolasa M, Hakulinen U, Brander A, u.c. (2019) Diffusion tensor imaging and

- disability progression in multiple sclerosis: A 4-year follow-up study. *Brain Behav* 9:e01194. doi: 10.1002/brb3.1194
137. Ogawa S, Lee TM, Kay AR, Tank DW (1990) Brain magnetic resonance imaging with contrast dependent on blood oxygenation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 87:9868–72.
 138. Ogawa S, Tank DW, Menon R, u.c. (1992) Intrinsic signal changes accompanying sensory stimulation: functional brain mapping with magnetic resonance imaging. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89:5951–5.
 139. Bandettini PA, Wong EC, Hinks RS, u.c. (1992) Time course EPI of human brain function during task activation. *Magn Reson Med* 25:390–7.
 140. Piñeiro R, Matthews PM, Maestú C, Bardasano JL [Functional magnetic resonance and the cerebral cortex. 1: Group analysis]. *Rev Neurol* 32:1101–6.
 141. Pantano P, Mainero C, Caramia F (2006) Functional Brain Reorganization in Multiple Sclerosis: Evidence from fMRI Studies. *J Neuroimaging* 16:104–114. doi: 10.1111/j.1552-6569.2006.00029.x
 142. Rocca MA, Filippi M (2007) Functional MRI in Multiple Sclerosis. *J Neuroimaging* 17:36S-41S. doi: 10.1111/j.1552-6569.2007.00135.x
 143. Rocca MA, Absinta M, Valsasina P, u.c. (2009) Abnormal connectivity of the sensorimotor network in patients with MS: a multicenter fMRI study. *Hum Brain Mapp* 30:2412–25. doi: 10.1002/hbm.20679
 144. Fox RJ, Beall E, Bhattacharyya P, u.c. (2011) Advanced MRI in Multiple Sclerosis: Current Status and Future Challenges. *Neurol Clin* 29:357–380. doi: 10.1016/j.ncl.2010.12.011
 145. Pantano P, Mainero C, Lenzi D, u.c. (2005) A longitudinal fMRI study on motor activity in patients with multiple sclerosis. *Brain* 128:2146–53. doi: 10.1093/brain/awh549
 146. Enzinger C, Pinter D, Rocca MA, u.c. (2016) Longitudinal fMRI studies: Exploring brain plasticity and repair in MS. *Mult Scler* 22:269–78. doi: 10.1177/1352458515619781
 147. Ming G, Song H (2005) ADULT NEUROGENESIS IN THE MAMMALIAN CENTRAL NERVOUS SYSTEM. *Annu Rev Neurosci* 28:223–250. doi: 10.1146/annurev.neuro.28.051804.101459
 148. Lim DA, Alvarez-Buylla A (2016) The Adult Ventricular–Subventricular Zone (V-SVZ) and Olfactory Bulb (OB) Neurogenesis. *Cold Spring Harb Perspect*

- Biol 8:a018820. doi: 10.1101/cshperspect.a018820
149. Bergmann O, Spalding KL, Frisén J (2015) Adult Neurogenesis in Humans. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 7:a018994. doi: 10.1101/cshperspect.a018994
 150. Curtis M a, Faull RLM, Eriksson PS (2007) The effect of neurodegenerative diseases on the subventricular zone. *Nat Rev Neurosci* 8:712–723. doi: 10.1038/nrn2216
 151. Picard-Riera N, Nait-Oumesmar B, Baron-Van Evercooren A (2004) Endogenous adult neural stem cells: limits and potential to repair the injured central nervous system. *J Neurosci Res* 76:223–31. doi: 10.1002/jnr.20040
 152. Gil-Perotín S, Duran-Moreno M, Cebrián-Silla A, u.c. (2013) Adult Neural Stem Cells From the Subventricular Zone: A Review of the Neurosphere Assay. *Anat Rec* 296:1435–1452. doi: 10.1002/ar.22746
 153. Doetsch F (2003) The glial identity of neural stem cells. *Nat Neurosci* 6:1127–1134. doi: 10.1038/nn1144
 154. Xing YL, Roth PT, Stratton JAS, u.c. (2014) Adult Neural Precursor Cells from the Subventricular Zone Contribute Significantly to Oligodendrocyte Regeneration and Remyelination. *J Neurosci* 34:14128–14146. doi: 10.1523/JNEUROSCI.3491-13.2014
 155. Ponti G, Obernier K, Alvarez-Buylla A (2013) Lineage progression from stem cells to new neurons in the adult brain ventricular-subventricular zone. *Cell Cycle* 12:1649–1650. doi: 10.4161/cc.24984
 156. Sanai N, Tramontin AD, Quiñones-Hinojosa A, u.c. (2004) Unique astrocyte ribbon in adult human brain contains neural stem cells but lacks chain migration. *Nature* 427:740–4. doi: 10.1038/nature02301
 157. Quiñones-Hinojosa A, Sanai N, Soriano-Navarro M, u.c. (2006) Cellular composition and cytoarchitecture of the adult human subventricular zone: A niche of neural stem cells. *J Comp Neurol* 494:415–434. doi: 10.1002/cne.20798
 158. Mirzadeh Z, Merkle FT, Soriano-Navarro M, u.c. (2008) Neural Stem Cells Confer Unique Pinwheel Architecture to the Ventricular Surface in Neurogenic Regions of the Adult Brain. *Cell Stem Cell* 3:265–278. doi: 10.1016/j.stem.2008.07.004
 159. Menn B, Garcia-Verdugo JM, Yaschine C, u.c. (2006) Origin of oligodendrocytes in the subventricular zone of the adult brain. *J Neurosci*

- 26:7907–18. doi: 10.1523/JNEUROSCI.1299-06.2006
160. Sanai N, Nguyen T, Ihrie RA, u.c. (2011) Corridors of migrating neurons in the human brain and their decline during infancy. *Nature* 478:382–386. doi: 10.1038/nature10487
161. Benner EJ, Luciano D, Jo R, u.c. (2013) Protective astrogenesis from the SVZ niche after injury is controlled by Notch modulator Thbs4. *Nature* 497:369–373. doi: 10.1038/nature12069
162. Ernst A, Alkass K, Bernard S, u.c. (2014) Neurogenesis in the striatum of the adult human brain. *Cell* 156:1072–83. doi: 10.1016/j.cell.2014.01.044
163. Pluchino S, Muzio L, Imitola J, u.c. (2008) Persistent inflammation alters the function of the endogenous brain stem cell compartment. *Brain* 131:2564–78. doi: 10.1093/brain/awn198
164. Rasmussen S, Imitola J, Ayuso-Sacido A, u.c. (2011) Reversible neural stem cell niche dysfunction in a model of multiple sclerosis. *Ann Neurol* 69:878–91. doi: 10.1002/ana.22299
165. Picard-Riera N, Decker L, Delarasse C, u.c. (2002) Experimental autoimmune encephalomyelitis mobilizes neural progenitors from the subventricular zone to undergo oligodendrogenesis in adult mice. *Proc Natl Acad Sci* 99:13211–13216. doi: 10.1073/pnas.192314199
166. Nait-Oumesmar B, Decker L, Lachapelle F, u.c. (1999) Progenitor cells of the adult mouse subventricular zone proliferate, migrate and differentiate into oligodendrocytes after demyelination. *Eur J Neurosci* 11:4357–66.
167. Naruse M, Shibasaki K, Shimauchi-Ohtaki H, Ishizaki Y (2018) Microglial Activation Induces Generation of Oligodendrocyte Progenitor Cells from the Subventricular Zone after Focal Demyelination in the Corpus Callosum. *Dev Neurosci* 40:54–63. doi: 10.1159/000486332
168. Pourabdolhossein F, Gil-Perotín S, Garcia-Belda P, u.c. (2017) Inflammatory demyelination induces ependymal modifications concomitant to activation of adult (SVZ) stem cell proliferation. *Glia* 65:756–772. doi: 10.1002/glia.23124
169. Rasmussen S, Wang Y, Kivisäkk P, u.c. (2007) Persistent activation of microglia is associated with neuronal dysfunction of callosal projecting pathways and multiple sclerosis-like lesions in relapsing--remitting experimental autoimmune encephalomyelitis. *Brain* 130:2816–29. doi: 10.1093/brain/awm219

170. Ransohoff RM, Perry VH (2009) Microglial physiology: unique stimuli, specialized responses. *Annu Rev Immunol* 27:119–45. doi: 10.1146/annurev.immunol.021908.132528
171. Gupta N, Shyamasundar S, Patnala R, u.c. (2018) Recent progress in therapeutic strategies for microglia-mediated neuroinflammation in neuropathologies. *Expert Opin Ther Targets* 22:765–781. doi: 10.1080/14728222.2018.1515917
172. Du L, Zhang Y, Chen Y, u.c. (2017) Role of Microglia in Neurological Disorders and Their Potentials as a Therapeutic Target. *Mol Neurobiol* 54:7567–7584. doi: 10.1007/s12035-016-0245-0
173. Matarredona ER, Talaverón R, Pastor AM (2018) Interactions Between Neural Progenitor Cells and Microglia in the Subventricular Zone: Physiological Implications in the Neurogenic Niche and After Implantation in the Injured Brain. *Front Cell Neurosci* 12:268. doi: 10.3389/fncel.2018.00268
174. Imitola J, Côté D, Rasmussen S, u.c. (2011) Multimodal coherent anti-Stokes Raman scattering microscopy reveals microglia-associated myelin and axonal dysfunction in multiple sclerosis-like lesions in mice. *J Biomed Opt* 16:021109. doi: 10.1117/1.3533312
175. Hollingsworth E, Khouri J, Imitola J (2017) Endogenous repair and development inspired therapy of neurodegeneration in progressive multiple sclerosis. *Expert Rev Neurother* 17:611–629. doi: 10.1080/14737175.2017.1287564
176. Du L, Zhang Y, Chen Y, u.c. (2017) Role of Microglia in Neurological Disorders and Their Potentials as a Therapeutic Target. *Mol Neurobiol* 54:7567–7584. doi: 10.1007/s12035-016-0245-0
177. Paraiso HC, Kuo P-C, Curfman ET, u.c. (2018) Dimethyl fumarate attenuates reactive microglia and long-term memory deficits following systemic immune challenge. *J Neuroinflammation* 15:100. doi: 10.1186/s12974-018-1125-5
178. Anthony DC, Dickens AM, Seneca N, u.c. (2014) Anti-CD20 inhibits T cell-mediated pathology and microgliosis in the rat brain. *Ann Clin Transl Neurol* 1:659–69. doi: 10.1002/acn3.94
179. Chamberlain KA, Nanescu SE, Psachoulia K, Huang JK (2016) Oligodendrocyte regeneration: Its significance in myelin replacement and neuroprotection in multiple sclerosis. *Neuropharmacology* 110:633–643. doi:

10.1016/j.neuropharm.2015.10.010

180. Naruse M, Shibasaki K, Shimauchi-Ohtaki H, Ishizaki Y (2018) Microglial Activation Induces Generation of Oligodendrocyte Progenitor Cells from the Subventricular Zone after Focal Demyelination in the Corpus Callosum. *Dev Neurosci* 40:54–63. doi: 10.1159/000486332
181. Patrikios P, Stadelmann C, Kutzelnigg A, u.c. (2006) Remyelination is extensive in a subset of multiple sclerosis patients. *Brain* 129:3165–72. doi: 10.1093/brain/awl217
182. Nait-Oumesmar B, Picard-Riera N, Kerninon C, u.c. (2007) Activation of the subventricular zone in multiple sclerosis: evidence for early glial progenitors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104:4694–9. doi: 10.1073/pnas.0606835104
183. Grade S, Bernardino L, Malva JO (2013) Oligodendrogenesis from neural stem cells: perspectives for remyelinating strategies. *Int J Dev Neurosci* 31:692–700. doi: 10.1016/j.ijdevneu.2013.01.004
184. Cherubini A, Spoletini I, Péran P, u.c. (2010) A multimodal MRI investigation of the subventricular zone in mild cognitive impairment and Alzheimer's disease patients. *Neurosci Lett* 469:214–218. doi: 10.1016/j.neulet.2009.11.077
185. Munivenkatappa A, Bagepally BS, Saini J, Pal PK (2013) In vivo Age-related Changes in Cortical, Subcortical Nuclei, and Subventricular Zone: A Diffusion Tensor Imaging Study. *Aging Dis* 4:65–75.
186. BLAKEMORE WF (1974) Pattern of remyelination in the CNS. *Nature* 249:577–578. doi: 10.1038/249577a0
187. Plemel JR, Liu W-Q, Yong VW (2017) Remyelination therapies: a new direction and challenge in multiple sclerosis. *Nat Rev Drug Discov* 16:617–634. doi: 10.1038/nrd.2017.115
188. Frischer JM, Weigand SD, Guo Y, u.c. (2015) Clinical and pathological insights into the dynamic nature of the white matter multiple sclerosis plaque. *Ann Neurol* 78:710–721. doi: 10.1002/ana.24497
189. Cadavid D, Mellion M, Hupperts R, u.c. (2019) Safety and efficacy of opicinumab in patients with relapsing multiple sclerosis (SYNERGY): a randomised, placebo-controlled, phase 2 trial. *Lancet Neurol* 18:845–856. doi: 10.1016/S1474-4422(19)30137-1
190. Verden D, Macklin WB (2016) Neuroprotection by central nervous system remyelination: Molecular, cellular, and functional considerations. *J Neurosci*

Res 94:1411–1420. doi: 10.1002/jnr.23923

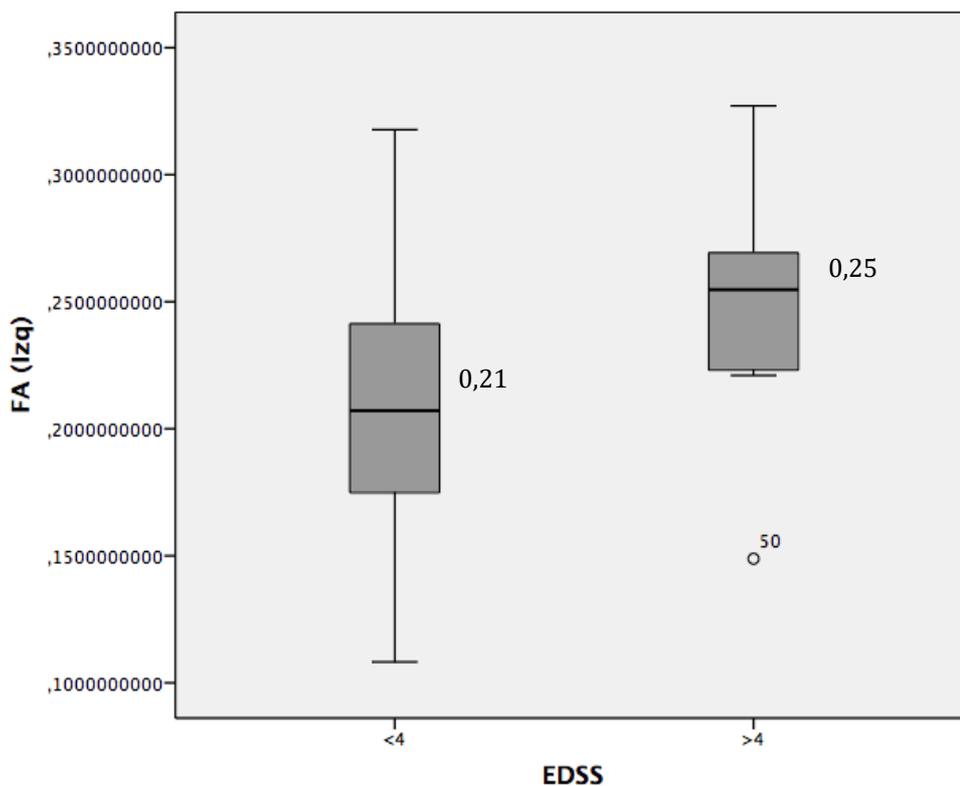
191. Akkermann R, Beyer F, Küry P (2017) Heterogeneous populations of neural stem cells contribute to myelin repair. *Neural Regen Res* 12:509–517. doi: 10.4103/1673-5374.204999
192. Michailidou I, de Vries HE, Hol EM, van Strien ME (2014) Activation of endogenous neural stem cells for multiple sclerosis therapy. *Front Neurosci* 8:454. doi: 10.3389/fnins.2014.00454
193. Seri B, Herrera DG, Gritti A, u.c. (2006) Composition and organization of the SCZ: a large germinal layer containing neural stem cells in the adult mammalian brain. *Cereb Cortex* 16 Suppl 1:i103-11. doi: 10.1093/cercor/bhk027
194. El Waly B, Macchi M, Cayre M, Durbec P (2014) Oligodendrogenesis in the normal and pathological central nervous system. *Front Neurosci* 8:145. doi: 10.3389/fnins.2014.00145
195. Hillis JM, Davies J, Mundim MV, u.c. (2016) Cuprizone demyelination induces a unique inflammatory response in the subventricular zone. *J Neuroinflammation* 13:190. doi: 10.1186/s12974-016-0651-2
196. Tzourio-Mazoyer N, Landeau B, Papathanassiou D, u.c. (2002) Automated Anatomical Labeling of Activations in SPM Using a Macroscopic Anatomical Parcellation of the MNI MRI Single-Subject Brain. *Neuroimage* 15:273–289. doi: 10.1006/nimg.2001.0978
197. Jack CR, Thompson RM, Butts RK, u.c. (1994) Sensory motor cortex: correlation of presurgical mapping with functional MR imaging and invasive cortical mapping. *Radiology* 190:85–92. doi: 10.1148/radiology.190.1.8259434
198. Rao SM, Binder JR, Bandettini PA, u.c. (1993) Functional magnetic resonance imaging of complex human movements. *Neurology* 43:2311–2311. doi: 10.1212/WNL.43.11.2311
199. Seo JH, Maki T, Maeda M, u.c. (2014) Oligodendrocyte precursor cells support blood-brain barrier integrity via TGF- β signaling. *PLoS One* 9:e103174. doi: 10.1371/journal.pone.0103174
200. Merkel B, Butzkueven H, Traboulsee AL, u.c. (2017) Timing of high-efficacy therapy in relapsing-remitting multiple sclerosis: A systematic review. *Autoimmun Rev* 16:658–665. doi: 10.1016/j.autrev.2017.04.010
201. Giovannoni G (2018) Disease-modifying treatments for early and advanced

- multiple sclerosis. *Curr Opin Neurol* 31:233–243. doi:
10.1097/WCO.0000000000000561
202. McCarthy CL, Giovannoni G, Coles AJ (2015) Timing is everything in the treatment of multiple sclerosis. *BMJ Case Rep*. doi: 10.1136/bcr-2014-208960
203. Hawker K, O'Connor P, Freedman MS, u.c. (2009) Rituximab in patients with primary progressive multiple sclerosis: Results of a randomized double-blind placebo-controlled multicenter trial. *Ann Neurol* 66:460–471. doi:
10.1002/ana.21867
204. Montalban X, Hauser SL, Kappos L, u.c. (2017) Ocrelizumab versus Placebo in Primary Progressive Multiple Sclerosis. *N Engl J Med* 376:209–220. doi:
10.1056/NEJMoa1606468
205. Cayre M, Bancila M, Virard I, u.c. (2006) Migrating and myelinating potential of subventricular zone neural progenitor cells in white matter tracts of the adult rodent brain. *Mol Cell Neurosci* 31:748–58. doi: 10.1016/j.mcn.2006.01.004
206. Akiyama Y, Honmou O, Kato T, u.c. (2001) Transplantation of clonal neural precursor cells derived from adult human brain establishes functional peripheral myelin in the rat spinal cord. *Exp Neurol* 167:27–39. doi:
10.1006/exnr.2000.7539

Anexos:

Aunque no encontramos correlación entre el aumento del valor de FA en la región definida como ZSV y la discapacidad medida por la escala EDSS (Rho Spearman 0,23; $p=0,17$), si detectamos que los pacientes más discapacitados (definidos por presentar EDSS superior a 4) tendieron a presentar un valor de FA en la ZSV superior a los pacientes menos discapacitados (aquellos con EDSS igual o inferior a 4), tal como se muestra en la figura 19.

Figura 19. Representación gráfica de la FA en función de la discapacidad de los pacientes con EM, pacientes con EDSS igual o inferior a 4 respecto a pacientes con EDSS superior a 4.



FA: fracción de anisotropía; Izq: izquierda.

