



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO  
DIVISION DE ESTUDIOS DE POSGRADO  
FACULTAD DE MEDICINA**

**INSTITUTO MEXICANO DE SEGURO SOCIAL  
UNIDAD MEDICA DE ALTA ESPECIALIDAD  
HOSPITAL DE ESPECIALIDADES  
CENTRO MEDICO NACIONAL SIGLO XXI**

**“MARCADORES MOLECULARES EN ESCLEROSIS MULTIPLE”**

**TESIS QUE PRESENTA  
DRA LUISA MELINA ESPAILLAT SOLANO  
PARA OBTENER DIPLOMA EN LA ESPECIALIDAD DE NEUROLOGIA**

**ASESORES:**

**Dra. Brenda Bertado Cortes  
Médico adscrito al servicio de Neurología  
UMAE Hospital de Especialidades CMN Siglo XXI**

**Dra. Paola García De La Torre  
Investigador adscrito a la UIM en enfermedades neurológicas.  
UMAE Hospital de Especialidades CMN Siglo XXI**

**México, DF**

**Agosto 2013.**



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

---

**Dra Diana G. Menez Díaz**  
**JEFE DE LA DIVISION DE EDUCACION EN SALUD**  
**UMAE HOSPITAL DE ESPECIALIDADES CMN SIGLO XXI**

---

**Dr. Raúl Carrera Pineda**  
**UMAE HOSPITAL DE ESPECIALIDADES CMN SIGLO XXI**

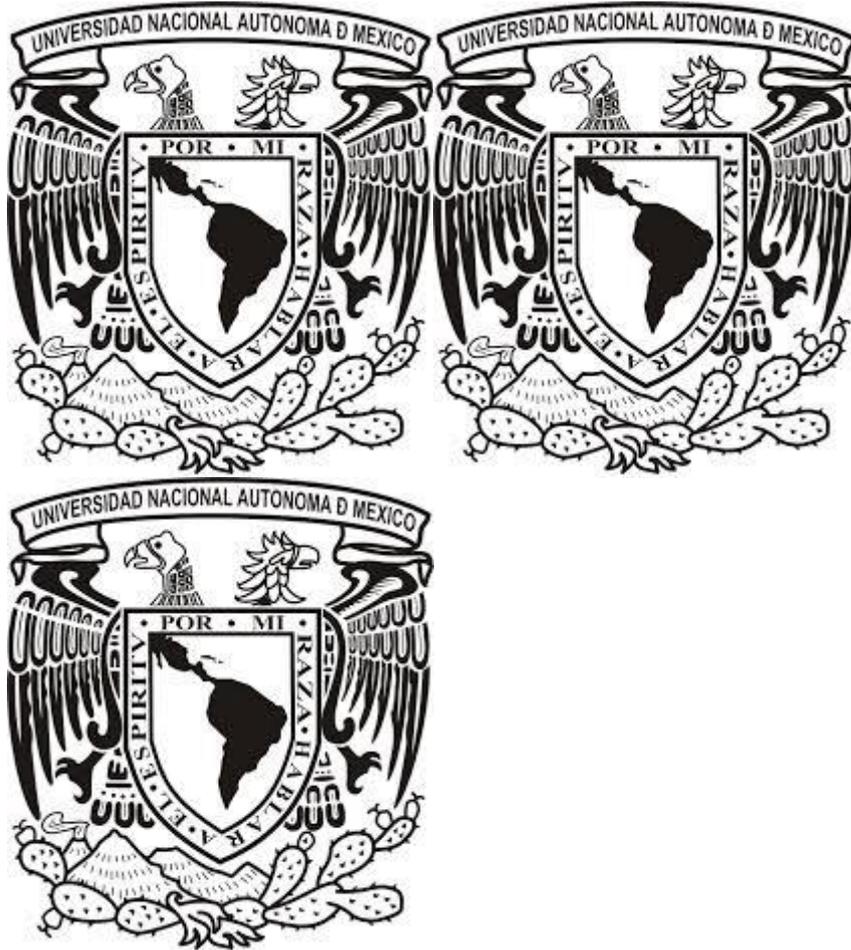
---

**Dra. Brenda Bertado Cortes**  
**MEDICO ADSCRITO AL SERVICIO DE NEUROLOGIA**  
**UMAE HOSPITAL DE ESPECIALIDADES CMN SXXI**

---

## INDICE

CONTENIDO	PAGINA
Resumen	1
Introducción	4
Justificación	15
Planteamiento del problema	16
Pregunta de trabajo	17
Hipotesis	18
Objetivos	19
Material y métodos	20
Consideraciones éticas	22
Resultados	23
Discusión y conclusiones	31



## RESUMEN

**Universidad Nacional Autónoma de México**  
**División de estudios de posgrado**  
**Facultad de Medicina**  
**Instituto Mexicano de Seguro Social**  
**UMAE. Hospital de Especialidades CMN Siglo XXI.**

### **“Biomarcadores moleculares en Esclerosis Múltiple”**

**Tesis que presenta: Dra. Luisa Melina Espailat Solano para obtener el título de la Especialidad de Neurología.**

**Asesores: Dra. Brenda Bertado Cortes, Dra. Paola García De La Torre.**

**UMAE. Hospital de Especialidades CMN Siglo XXI.**

#### **Antecedentes:**

La esclerosis múltiple (EM) es un trastorno inflamatorio, progresivo y degenerativo del sistema nervioso central que afecta principalmente a la sustancia blanca, provocando desmielinización y degeneración axonal, con un curso recurrente-remitente, seguido a menudo por discapacidad progresiva secundaria; conduciendo inevitablemente a deficiencias en las actividades de la vida cotidiana y de la capacidad funcional.

El curso de la EM se ha podido estudiar mediante la presencia y número de lesiones en el cerebro medido por resonancia magnética. La activación del sistema inmune en respuesta a la EM puede predecir el curso de la enfermedad cuando ésta es más agresiva. Además, varias proteínas se han estudiado como potenciales predictores del desarrollo de la enfermedad; estos biomarcadores tienen el potencial de dar información cuantitativa, sensible y confiable acerca de la EM.

Entre estos biomarcadores, se encuentran BDNF y Tau. Tau se ha estudiado como una proteína marcadora de daño axonal, mientras que los cambios en BDNF se han asociado a la neuroprotección. Ambos marcadores son potenciales predictores de la progresión de la EM, sin embargo ningún estudio ha sido contundente y algunos son contradictorios. En este estudio pretendemos asociar los cambios en la concentración de estas proteínas con relación al tratamiento, sexo y/o edad del paciente. El número de pacientes con el que se contará para este estudio otorgará un resultado confiable y el hecho de ser un estudio multidisciplinario ayudará a relacionar todos los aspectos de esta enfermedad neurodegenerativa.

#### **Justificación:**

A la fecha no existen marcadores moleculares que ayuden ya sea al diagnóstico temprano de la Esclerosis Múltiple o que predigan su progresión.

Dado que la progresión de esta enfermedad, al igual que muchas otras, es muy variable dependiendo del paciente resulta indispensable el estudio de uno o varios marcadores que ayuden a definir el pronóstico del paciente.

**Planteamiento del problema:**

- Dado que la progresión de esta enfermedad, al igual que muchas otras, es muy variable dependiendo del paciente resulta indispensable el estudio de uno o varios marcadores que ayuden a definir el pronóstico del paciente.
- Además la proteína BDNF se ha relacionado con la protección neuronal, existe la posibilidad de que pueda servir como marcador de la progresión de la EM.
- Por ello, en este trabajo se pretende estudiar la proteína BDNF, como posible marcador biológico de la progresión de la EM.

**Hipótesis:**

- La proteína BDNF es un marcador molecular para la Esclerosis Múltiple.

**Objetivo:**

- Determinar la presencia de proteína BDNF en suero de pacientes con Esclerosis Múltiple, y relacionar el contenido con el sexo y edad del paciente.
- Establecer si BDNF en sangre periférica es un buen biomarcador de la progresión de la EM.

**Material y métodos:**

Para este protocolo se pretende reclutar a pacientes con EM y a un número similar de sujetos control (de la misma edad y sexo). Se determinará si tienen esclerosis múltiple basándose en los criterios de McDonald 2010. Previa autorización y firma de consentimiento informado, se extraerá sangre a los participantes para realizar las pruebas moleculares pertinentes a este estudio. Se medirá mediante ELISA, la cantidad de BDNF en sangre periférica. Observaremos si existen diferencias entre los pacientes con EM y los sujetos control, así como la relación de los mismos con el tratamiento.

**Resultados:**

Se procesaron las muestras de sangre periférica de 20 pacientes y 20 controles observándose una menor cantidad de BDNF en los pacientes con Esclerosis Múltiple, así mismo se observó una tendencia a disminución de BDNF en los pacientes mayores de 40 años y una disminución significativa en los pacientes de sexo masculino.

**Discusión y conclusión:**

Los resultados obtenidos coinciden con lo ya reportado observando una disminución de los niveles de BDNF en los pacientes con Esclerosis Múltiple, pero llama la atención que los pacientes de sexo masculino y los de mayor edad tengan mayor alteración de la proteína BDNF lo que puede estar en relación al peor pronóstico y evolución de los pacientes de sexo masculino, así como al tiempo de evolución de la enfermedad. Se necesitan realizar más estudios para tratar de determinar si existe una relación en cuanto al tiempo de evolución con Esclerosis Múltiple, así como la posible relación con el tratamiento.

DATOS DEL ALUMNO (Autor)	Datos del alumno
<b>Apellido paterno:</b> <b>Apellido materno:</b> <b>Nombre:</b> <b>Teléfono:</b> <b>Universidad:</b> <b>Facultad o escuela:</b> <b>Carrera:</b> <b>No. De Cuenta:</b>	<b>Espailat</b> <b>Solano</b> <b>Luisa Melina</b> <b>55 54 02 46 92</b> <b>Universidad Nacional Autónoma de México</b> <b>Facultad de Medicina</b> <b>Especialidad de Neurología</b> <b>510710396</b>
DATOS DEL ASESOR	Datos del asesor
<b>Apellido paterno:</b> <b>Apellido materno:</b> <b>Nombre:</b>	<b>Bertado</b> <b>Cortes</b> <b>Brenda</b>  <b>García</b> <b>De La Torre</b> <b>Paola</b>
DATOS DE LA TESIS	Datos de la tesis
<b>Título:</b> <b>Número de páginas:</b> <b>Año:</b> <b>Número de registro:</b>	<b>Marcadores moleculares en Esclerosis Múltiple</b>  <b>2013</b> <b>R-2012-3601-191</b>

## INTRODUCCION.

La esclerosis múltiple (EM) es un trastorno inflamatorio, progresivo y degenerativo del sistema nervioso central que afecta principalmente a la sustancia blanca, provocando desmielinización y degeneración axonal, con un curso recurrente-remitente, seguido a menudo por discapacidad progresiva secundaria; conduciendo inevitablemente a deficiencias en las actividades de la vida cotidiana y de la capacidad funcional (1, 2).

La frecuencia de la EM tiene evidente variación geográfica; es menos habitual en los países ecuatoriales y se vuelve progresivamente más común conforme a la distancia del ecuador en ambos hemisferios. Aproximadamente un millón de personas de entre 17 y 65 años tiene Esclerosis Múltiple a nivel mundial, considerándose la causa más común de incapacidad neurológica no traumática en adultos jóvenes (3, 4).

La prevalencia de la EM en México ha ido aumentando de 10 a 13 veces; en 1970 se reportó que de cada 100,000 habitantes, 1.6 manifestaban EM mientras que actualmente la prevalencia se ubica en 12 a 15 por cada 100,000 (5). Cabe resaltar que éstas cifras no incluyen a población indígena debido al escaso acceso al sector salud que tienen éstas comunidades, sin embargo, se están llevando estudios en población huichol, cuyos resultados aún se encuentran pendientes de publicación.

En niños y adultos, la Esclerosis Múltiple afecta más a las mujeres con una frecuencia dos veces mayor que a los hombres; esta diferencia aumenta al doble durante la pubertad, entre los 13 y 15 años, lo que sugiere que las hormonas sexuales tienen un papel detonador de la enfermedad (6). En cuanto a la raza, se ha observado que afecta a cada raza de manera distinta, y se ha sugerido que existe un fenotipo diferente para cada una de ellas. Hasta ahora el principal factor de riesgo para desarrollar EM es tener antepasados del norte de Europa (7). Los afroestadounidenses nacidos en cualquier parte de Estados Unidos y que frecuentemente son producto de la mezcla de razas, tienen un riesgo de desarrollar EM relativamente mayor que los nativos de África (8), donde la enfermedad es muy rara. También en Estados Unidos, las personas con ancestros asiáticos tienen menor frecuencia de EM que el resto de la población (9).

### ***Variedades de la EM***

Las lesiones típicas de la EM están representadas por placas de color gris o rosado, en las cuales se evidencia pérdida de mielina y ausencia de oligodendrocitos, en asociación con infiltrados inflamatorios constituidos por células T, células B, células plasmáticas y macrófagos activados o células microgliales (10). La lesión del oligodendrocito representa el evento inicial del proceso desmielinizante y el fenómeno inflamatorio es una consecuencia de este.

El primer evento en la patogenia de la EM es la activación de las células T CD4 auto reactivas fuera del sistema nervioso central (SNC), ya sea a través del reconocimiento de un antígeno específico o por respuestas desencadenadas por semejanza molecular inducidas por infecciones, o bien en forma no específica a través de mecanismos mediados por citosinas u otras células (11). Como consecuencia de su activación, los linfocitos T adquieren la capacidad de clonarse y expandirse, producir diferentes citosinas e incrementar la expresión de moléculas de adhesión o integrinas a su superficie. Esta última alternativa les permite a los linfocitos T interactuar con moléculas complementarias presentes en las células endoteliales, atravesar el espacio perivascular y alcanzar así el SNC (12).

Los linfocitos T activados pueden atravesar la barrera hematoencefálica (BHE) e ingresar en el SNC o en el espacio subaracnoideo independientemente de su especificidad antigénica. Sin embargo, solo las células que encuentran un antígeno específico quedan retenidas en el parénquima encefálico y pueden iniciar un proceso inflamatorio local. Los mecanismos moleculares que conducen a este proceso de migración a través de la BHE involucran una serie de pasos, tales como una adhesión débil de los leucocitos a las células endoteliales a través de

interacciones mediadas por selectinas e hidratos de carbono, la activación de leucocitos a través de quimosinas que estimulan receptores de proteína G y la migración del leucocito a través del endotelio de la BHE (13, 14).

La migración celular a través de la BHE requiere además de la degradación de la membrana basal. Este proceso está mediado por metaloproteinasas, proteasas inducidas por células T involucradas en la remodelación de la matriz extracelular en condiciones fisiológicas y patológicas (15). Por otra parte, las metaloproteinasas participan en el fraccionamiento de moléculas precursoras de citosinas proinflamatorias, daño directo a la vaina de mielina y la inducción de lesión axonal.

Las células T que llegan al SNC son reactivadas al reconocer al antígeno específico unido al complejo mayor de histocompatibilidad presente en los atrociitos o en las células de la microglía activadas (16). En un ambiente apropiado, los linfocitos CD4 se diferencian a un patrón Th1 o Th17 y secretan interferón  $\gamma$ , interferón  $\alpha$ , IL-17 e IL-6; esto induce un daño directo a la vaina de mielina, promueven desmielinización mediada por acción celular y activan macrófagos, astrociitos y células microgliales, las cuales expresan el factor de necrosis tumoral alfa en las lesiones activas (17, 18). Además, se han implicado en la patogénesis de la desmielinización a linfocitos B, perforina y calpaina (substancias solubles), así como alteraciones en el metabolismo del glutamato y la presencia de óxido nítrico (19, 20).

La EM se puede incluir dentro de un espectro heterogéneo de enfermedades desmielinizantes inflamatorias del sistema nervioso central que varían de acuerdo con su presentación clínica, número y tamaño de las lesiones, y estudio patológico. No existe un cuadro característico de la EM. La enfermedad puede iniciar desde la

infancia hasta la sexta década de la vida aunque frecuentemente empieza alrededor de los 30 años. Las diferentes formas clínicas pueden variar de una persona a otra.

El curso clínico del a EM tiene dos fenómenos; la exacerbación, que es la aparición o empeoramiento de los síntomas de disfunción neurológica con duración mayor a 24 horas que puede estar asociado a presencia de infecciones, fiebre o stress; y la progresión, que se refiere al deterioro progresivo de 0.5 en la escala de EDSS por un mínimo de seis meses (21).

Según la severidad se puede clasificar la EM como benigna o maligna. En la benigna, el paciente permanece completamente funcional después de 15 años del inicio de la enfermedad mientras que en la maligna, el curso de la enfermedad presenta una rápida progresión con discapacidad significativa de varios sistemas neurológicos o muerte en un corto periodo luego del inicio de la enfermedad (22).

Las variedades de presentación son las siguientes:

1. Esclerosis Múltiple recurrente-remitente (RR): se caracteriza por episodios de disfunción neurológica seguidos de un grado variable de recuperación, sin progresión entre las exacerbaciones. Esta variedad representa el 85% de los casos de EM y puede presentarse como síndrome neurológico aislado con un curso que puede ser variable según las exacerbaciones que presente el paciente. Con el tiempo los periodos de recurrencia se hacen más severos y se asocian a una recuperación menos completa, eventualmente los pacientes presentan una fase más progresiva de la enfermedad en la que hay empeoramiento de los síntomas sin periodos de recuperación (23, 24)
2. Esclerosis Múltiple secundariamente progresiva (SP): tiene un inicio recurrente-remitente, seguido de progresión con o sin exacerbaciones. Esta

variedad se puede presentar luego de un tiempo variable de EMRR, observándose que 3 de cada 4 pacientes a los 25 años del inicio de la enfermedad evolucionan a EMSP.

3. Esclerosis Múltiple primariamente progresiva (PP): hay progresión de la enfermedad desde un inicio. Esta se observa en entre el 7% y el 20% de los pacientes (según la serie consultada). Esta variedad suele presentarse a edades mayores, con presencia de pocas lesiones en imagen de resonancia magnética.
4. Esclerosis Múltiple progresiva-recurrente (PR): su curso es de progresión continua desde el inicio de la enfermedad con exacerbaciones bien definidas, con o sin recuperación completa (25)

### ***Manifestación Clínica***

La manifestación clínica de los síntomas en la EM es de alta complejidad ya que en algún momento de su evolución hay una variabilidad de síntomas que catalogarse en tres niveles. El primario son los síntomas causados directamente por la desmielinización en el encéfalo y medula espinal (fatiga, debilidad, espasticidad, ataxia, temblor, trastornos esfinterianos alteraciones cognoscitivas, disfunción sexual y dolor) los cuales, si no son tratados o son atendidos inadecuadamente, devienen en complicaciones llamados síntomas secundarios, como la manifestación de contracturas, escaras y osteoporosis. Finalmente, los síntomas terciarios son consecuencias sociales y psicológicas de los síntomas primarios y secundarios e incluyen problemas psicoafectivos, laborales, legales etc. (26,27). Investigaciones acerca de las consecuencias sociales de ésta enfermedad señalan, que las alteraciones cognoscitivas y de los síntomas mencionados, ocasionan que un 70%

de la población que padece EM por tiempo prolongado, se encuentre desempleada, divorciada y aislada socialmente (28).

Se han creado múltiples escalas para la medición del deterioro y la discapacidad, siendo la más usada la escala de John F. Kurtzke (EDSS: expanded disability status scale) (26). En esta escala se consideran 10 puntos de valor, según 8 grupos funcionales que incluyen valoración de funciones piramidales, funciones cerebelosas, funciones de tallo, funciones sensitivas, función intestinal y vesical, función visual y óptica, funciones cerebral y mental, y otras funciones, donde se considera la presencia de cualquier otro hallazgo atribuible a la EM. Los puntos se otorgan según el grado de discapacidad en cada sistema funcional, y la capacidad de deambulación, siendo 0 un examen neurológico normal, 2 a 4 grados de discapacidad leve, moderada y severa respectivamente, pero siendo el paciente ambulatorio. A partir del grado 4 las puntuaciones se otorgan según el paciente amerite ayuda para la deambulación; 9 si está confinado a la cama y por último 10 si el paciente fallece por EM.

La EM es una enfermedad polifacética que puede variar desde ser asintomática (20% de los casos) hasta presentarse de forma agresiva fulminante, por lo que el curso de la enfermedad tiende a ser impredecible en la mayoría de los casos. En ocasiones, la enfermedad comienza con un síndrome agudo, monofásico y monorregional que se conocen como síndromes neurológicos aislados, los cuales según las características de presentación, evolucionaran con mayor o menor riesgo de desarrollo de EM.

Los síntomas pueden ser múltiples siendo los más frecuentes de las manifestaciones iniciales (hasta en el 33%) los síntomas sensitivos. Estos se

pueden presentar en forma de parestesias, hormigueos, dolor o signo de Lhermitte, llegando a presentarse hasta en el 90% de los pacientes durante el curso clínico de la enfermedad. Otros síntomas iniciales de la EM son la amaurosis unilateral (16%), el déficit motor lentamente progresivo (9%), el déficit motor agudo (5%), la diplopía (7%) o polisintomático (14%). En cuanto a las alteraciones visuales, se dice que más del 80% de los pacientes presentará durante el curso de la enfermedad, alteraciones visuales y que en el 50% de los casos éstas constituyen la primera manifestación de la enfermedad (29), pudiendo afectar cualquier parte de la vía óptica.

Los síntomas y signos motores por disfunción de la vía corticoespinal son notablemente comunes en la EM, siendo más frecuente la afección de miembros pélvicos por la frecuencia de lesiones en los tractos motores descendentes de la medula espinal. Generalmente, la debilidad en las extremidades y la espasticidad van acompañados de un síndrome piramidal con hiperreflexia y respuesta plantar extensora.

Las alteraciones cerebelosas pueden surgir en cualquier momento de la enfermedad, aunque su aparición en el inicio es poco frecuente. Cuando aparecen, suelen ser persistentes y acompañar el resto del cuadro clínico produciendo mucha discapacidad por las alteraciones funcionales que conlleva.

Además, estos pacientes pueden llegar a presentar alteraciones psiquiátricas, observándose la depresión hasta en un 75% de los casos, siendo el suicidio la causa de muerte hasta en el 15% de los casos. Hay que considerar que las terapias con interferón $\beta$  o esteroides son capaces de producir depresión y labilidad emocional.

Hay otros síntomas que, aunque no pueden clasificarse dentro de los sistemas funcionales, son comunes e importantes en la EM. Entre estos, la fatiga es el síntoma clínico más común descrito por los pacientes, presentándose en el 76-85% de los pacientes y que puede ocasionalmente ser el síntoma de inicio de la enfermedad. Otros síntomas que se asocian de forma menos frecuente al inicio de la enfermedad, y que se han observado en menos del 5% de los pacientes, son los síntomas vesicales, dolor, movimientos anormales, alteraciones de la función cortical y demencia.

Las alteraciones cognoscitivas en la EM se han descrito desde 1877, sin embargo la relevancia de las mismas no se había estudiado hasta fechas recientes ya que se consideraban poco frecuentes y en un estadio avanzado de la enfermedad. La escasa evidencia de lesiones corticales en estos pacientes es otro factor importante que desvía la atención y estimación del diagnóstico cognoscitivo (30).

### ***Tratamiento***

Existen dos tipos de fármacos utilizados para el tratamiento de la EM; fármacos de primera línea (interferones y acetato de glatiramer) y fármacos de segunda línea (mitoxantrona, natalizumab, fingolimod). El interferón forma parte de una extensa familia de proteínas que intervienen en defensa del organismo contra infecciones, regulación de la proliferación celular y modulación de la respuesta inmune (31). Se conocen dos tipos básicos de interferones, el tipo I ( $\alpha$  y  $\beta$ ) que es secretado por leucocitos y fibroblastos respectivamente y que inducen la respuesta a infecciones virales; y el interferón tipo II ( $\gamma$ ) que es sintetizado por linfocitos T o por células NK involucradas en la detección de células infectadas por la presentación de antígenos.

Hay dos formas de interferón  $\beta$  que están en uso desde hace más de una década. El interferón  $\beta 1^a$ , que es producido de las líneas celulares de ovario de hámster chino (32) y es similar al interferón  $\beta$  humano nativo, y el interferón  $\beta 1b$ , que es producido en una línea celular de *Escherichia coli* (33). Ensayos clínicos han demostrado que ambas formas de interferón beta reducen la actividad y la severidad del proceso de la enfermedad de EM (34, 35).

El acetato de glatiramer (AG) es la alternativa principal al interferón  $\beta$  en el tratamiento de la EM y consiste en una mezcla de cuatro aminoácidos (ácido glutámico, lisina, alanina y tirosina). Se considera que el AG cambia el equilibrio del sistema inmunológico de un perfil proinflamatorio o uno antiinflamatorio, siendo este un antígeno para el sistema inmune que induce el cambio de Th1 a Th2 (36, 37).

### ***Biomarcadores en EM***

El curso de la EM se ha podido estudiar mediante la presencia y número de lesiones en el cerebro medido por resonancia magnética. De igual forma, las anomalías de los potenciales evocados en el paciente se han asociado a un incremento en el riesgo de una progresión de la enfermedad. La activación del sistema inmune en respuesta a la EM también se ha visto predice el curso de la enfermedad cuando ésta es más agresiva. Por último, varias proteínas se han estudiado como potenciales predictores del desarrollo de la enfermedad. Estos biomarcadores tienen el potencial de dar información cuantitativa, sensible y confiable acerca de la EM por lo que su estudio es prometedor (38).

## *BDNF*

BDNF (factor neurotrófico derivado de cerebro; *brain derived neurotrophic factor*) es una neurotrofina que, entre otras cosas, promueve la supervivencia neuronal y potencia la proliferación de oligodendrocitos y la mielinización. Los oligodendrocitos mielinizan los axones del sistema nervioso central y con ello aseguran la propagación rápida de las señales eléctricas. La pérdida de oligodendrocitos y de la mielina causa, entre otras patologías, la esclerosis múltiple.

En relación a la EM, Azoulay y su equipo encontraron que las células mononucleares de los pacientes con EM secretan menor cantidad de BDNF. Sugieren entonces que esta disminución se deba a la existencia de un mecanismo deficiente de regulación de la respuesta inmune en estos pacientes ya sea por un estado exhausto de las células inmunes por el intento continuo de reparar y regenerar el tejido neuronal dañado, o por la inhibición de su función neuroprotectora (39). La reducción de los niveles de BDNF en sangre de pacientes con EM puede deberse entonces a una reducción en la protección del tejido por BDNF o a un incremento en el consumo de BDNF por parte del SNC como consecuencia del daño al tejido en este padecimiento (39).

Por otra parte, Linker (40) propone un papel protector endógeno del BDNF en el sistema nervioso con inflamación crónica, con un papel funcional en la protección directamente de los axones. Este grupo encuentra una sobreexpresión de TrkB en los axones desnudos de las lesiones características de la EM en un modelo murino de esta enfermedad, y proponen que la expresión de BDNF y de su receptor TrkB está regulada bajo condiciones neuroinflamatorias. Asimismo, logran disminuir la severidad de la enfermedad en los ratones mediante inyecciones de células T que

sobre-expresan BDNF y sugieren que esto se debe a una protección axonal directa por parte de este factor. Concordantemente, se ha observado un incremento en la mielinización de axones en lesiones de la médula espinal en ratas, mediado por el trasplante de fibroblastos que producen BDNF. Esto mediante la proliferación de oligodendrocitos, probablemente endógenos, que permiten la remielinización de los axones regenerados (41).

En estudios relacionados con los efectos beneficiosos de ciertos medicamentos se ha encontrado un incremento en los niveles de BDNF. Por ejemplo, se atribuye la eficacia de Laquinimod, un medicamento cuya sustancia activa es el linomide, a un incremento en la producción de BDNF (42). Además, los niveles de BDNF de pacientes con EMRR tratados con acetato de glatiramer son similares a los de los controles y elevados comparados con los pacientes tratados con interferón  $\beta$ , sugiriendo que este tratamiento confiere un efecto neuroprotector mediante el incremento de los niveles de BDNF en el sistema inmune (43).

## **JUSTIFICACIÓN**

A la fecha no existen marcadores moleculares que ayuden ya sea al diagnóstico temprano o a la predicción de la progresión de la esclerosis múltiple. Dado que la progresión de esta enfermedad, al igual que muchas otras, es muy variable dependiendo del paciente resulta indispensable el estudio de uno o varios marcadores que ayuden a definir el pronóstico del paciente así como el tratamiento.

## **PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA**

Dado que la progresión de esta enfermedad, al igual que muchas otras, es muy variable dependiendo del paciente resulta indispensable el estudio de uno o varios marcadores que ayuden a definir el pronóstico del paciente así como el tratamiento.

Dado que el decremento de BDNF en sueros de pacientes se ha visto relacionado con una disminución de la protección neuronal, existe la posibilidad de que este pueda servir como marcador de la progresión de la EM.

Por lo que en este trabajo se pretende estudiar a esta proteína en suero de pacientes diagnosticados con EM y compararla con controles para comprobar su posible utilidad como marcador biológico de esta enfermedad.

## **PREGUNTA DE TRABAJO**

¿Puede considerarse a la proteína BDNF como marcador biológico de la progresión de la EM?

## **HIPÓTESIS**

El BDNF es un marcador molecular útil para el diagnóstico de la progresión de la Esclerosis Múltiple.

## **OBJETIVO GENERAL**

Determinar la presencia de BDNF en suero de pacientes con Esclerosis Múltiple en relación a sujetos control.

Establecer si el BDNF en sangre periférica es un buen biomarcador de la progresión de la EM.

## **Objetivos Específicos**

- Determinar la presencia de BDNF en suero de pacientes con Esclerosis Múltiple.
- Comparar la cantidad de BDNF en pacientes con EM contra sujetos control y determinar si hay o no diferencias.
- Analizar si los cambios observados, de haberlos, en la cantidad de BDNF en suero se correlacionan con la edad, el sexo y el tratamiento del paciente.

## MATERIAL Y MÉTODOS

- Diseño experimental:

Se trata de un diseño observacional, cuantitativo y transversal. Las variables independientes son el sujeto control, edad y sexo; las dependientes son la medición del factor BDNF.

- Pacientes

Pacientes del Servicio de Neurología, Hospital de Especialidades, Centro Médico Nacional Siglo XXI, serán incluidos en este estudio. Los pacientes fueron diagnosticados con esclerosis múltiple de acuerdo a los criterios de McDonald 2010 (anexo 1).

Se incluirá en este estudio únicamente a pacientes que acepten participar y que firmen la carta de consentimiento informado de acuerdo a los estatutos establecidos por la comisión de ética de esta institución.

- Criterios de INCLUSIÓN:

- Sujetos con diagnóstico de esclerosis múltiple de acuerdo a McDonald 2010
- Pacientes mayores de 18 y menores de 55 años
- Independiente de tratamiento

- Criterios de EXCLUSIÓN:

- Sujetos con otras patologías autoinmunes

Se incluirá a pacientes controles de edad y sexo pareados sin síntomas o reportes de lesiones primarias en el sistema nervioso central o deterioros cognoscitivos detectados previamente.

- Toma de muestra de sangre.

Se tomarán 5ml de sangre periférica mediante punción venosa y se mantendrán en un tubo BD Vawtainer® con EDTA K2 (7.2mg). Las muestras se centrifugarán a 2000g por 10min y se guardarán a -80°C para su uso futuro.

- Determinación de niveles de BDNF en sangre.

Se realizará la detección mediante ELISA. La sangre, completamente coagulada se centrifugará a 2000g durante 10 minutos, se guardará el suero en un ultracongelador hasta que la muestra sea procesada.

- Estadística

Se utilizará una ANOVA simple para la comparación de cantidad de BDNF en sangre entre grupos. La significancia estadística se considerará cuando el nivel de probabilidad sea menor a 0.05.

## **ASPECTOS ÉTICOS**

Los principios éticos en los que se basa esta investigación están de acuerdo a la legislación nacional e internacional sobre investigación en seres humanos. La extracción de sangre, puede ocasionar algo de dolor o malestar debido a la introducción de la aguja. Cualquier padecimiento ocasionado por la toma de muestras será atendido por el médico especialista.

Se pedirá a cada sujeto involucrado firmar la carta de consentimiento informado (anexo 3) en la que autorizará la toma de muestras biológicas (sangre). Todos los procedimientos están de acuerdo con las normas éticas, con el reglamento de la Ley General de Salud en materia de Investigación para la Salud y con la Declaración de Helsinki de 1975 enmendada en 1989.

## RESULTADOS:

Se incluyeron en el estudio 20 pacientes con diagnóstico de Esclerosis Múltiple y 20 sujetos control. Se realizó una ANOVA simple entre grupos (pacientes y controles) y no se encontraron diferencias significativas ( $F(1,38)=2.36$ ;  $P>0.05$ ), encontrándose una concentración media de BDNF menor en los pacientes con Esclerosis Múltiple de 1.174 Vs 1.502 en los controles (figura 1).

### ANOVA Table for Con. BDNF

Row exclusion: MS.svd

	DF	Sum of Squares	Mean Square	F-Value	P-Value
Categoría	1	1.072	1.072	2.360	.1328
Residual	38	17.263	.454		

Model II estimate of between component variance: .031

### Means Table for Con. BDNF

Effect: Categoría

Row exclusion: MS.svd

	Count	Mean	Std. Dev.	Std. Err.
Esclerosis	20	1.174	.636	.142
Control	20	1.502	.710	.159

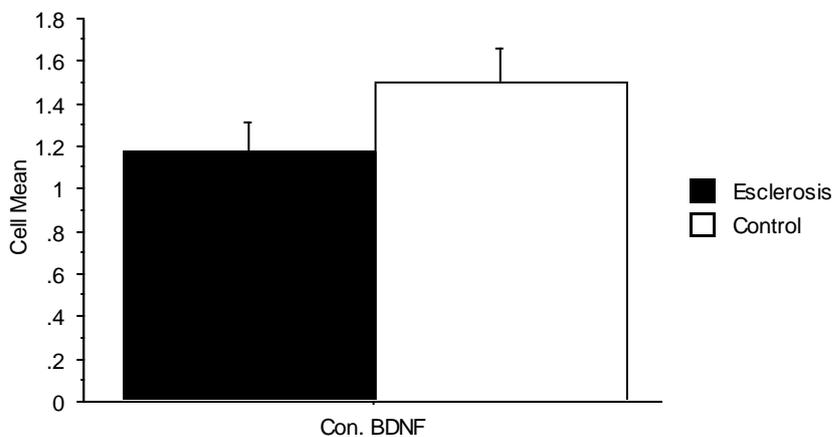


Figura 1. Al comparar a los pacientes (barra negra) con los sujetos control (barra blanca) encontramos que no hay diferencias significativas entre estos.

En relación a la edad, se dividieron los grupos en menores y mayores de 40 años, y no se encontraron diferencias significativas al realizar una ANOVA simple entre grupos ( $F(1,17) = .203$ ;  $P > 0.05$ ), observándose niveles de BDNF en jóvenes de 1.162 y en viejos de 1.047 (Figura 2).

**ANOVA Table for Con. BDNF**

Row exclusion: MS.svd

	DF	Sum of Squares	Mean Square	F-Value	P-Value
GRUPO POR EDAD	1	.058	.058	.203	.6581
Residual	17	4.886	.287		

Model II estimate of between component variance: •

One case was omitted due to missing values.

**Means Table for Con. BDNF**

Effect: GRUPO POR EDAD

Row exclusion: MS.svd

	Count	Mean	Std. Dev.	Std. Err.
JOVEN	7	1.162	.358	.135
VIEJO	12	1.047	.612	.177

One case was omitted due to missing values.

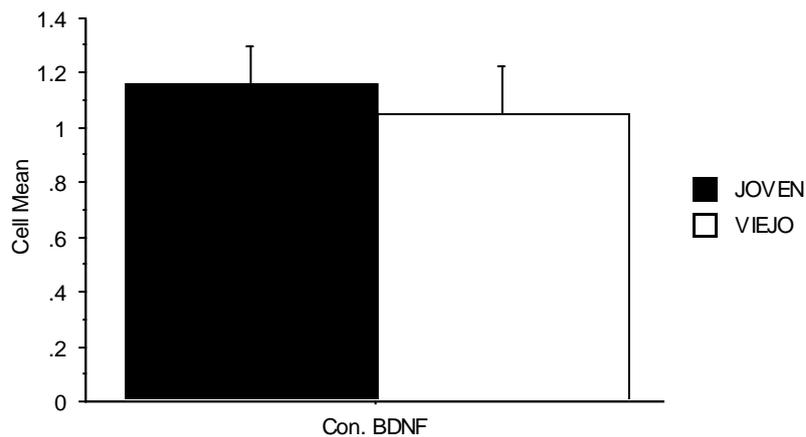


Figura 2: Al comparar grupo joven (barra negra) contra grupo viejo (barra blanca) no se encontraron diferencias significativas.

Se decidió entonces realizar la división de los grupos por sexo, en donde en el grupo de pacientes con Esclerosis Múltiple observamos una mayor disminución de los niveles de BDNF en el sexo masculino en relación al sexo femenino como se observa en la figura 3, se encontraron diferencias significativas al realizar una ANOVA simple entre sexos del grupo EM ( $F(1,18)= 3.879$ ;  $P:0.0645$ )

**ANOVA Table for Con. BDNF**

Row exclusion: MS.svd

	DF	Sum of Squares	Mean Square	F-Value	P-Value
Sexo	1	1.361	1.361	3.879	.0645
Residual	18	6.315	.351		

Model II estimate of between component variance: .102

**Means Table for Con. BDNF**

Effect: Sexo

Row exclusion: MS.svd

	Count	Mean	Std. Dev.	Std. Err.
Femenino	11	1.410	.713	.215
Masculino	9	.886	.391	.130

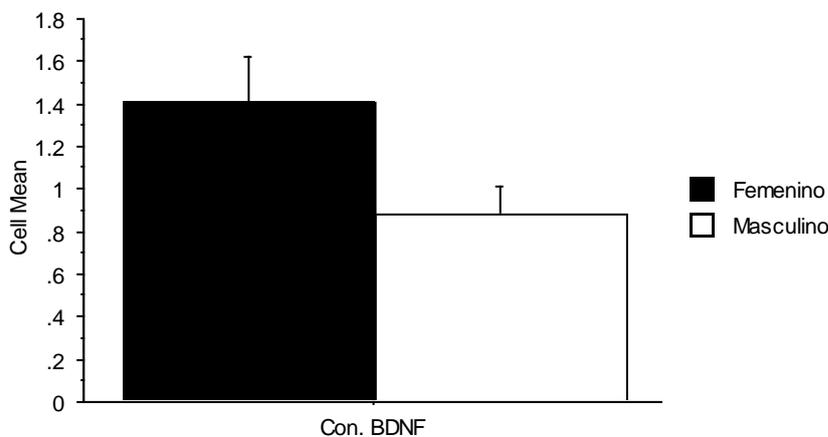


Figura 3. Se observa una diferencia significativa entre el grupo de sexo femenino (barra negra) y el grupo de sexo masculino (barra blanca).

Por el contrario, en el grupo control se observó una relación inversa con menores niveles de BDNF en el sexo femenino (1.258 Vs 2.070), como se observa en la figura 4 observándose significancia estadística en los resultados mediante la realización de una ANOVA simple ( $F(1,18)= 7.317$ ;  $P<0.05$ ).

**ANOVA Table for Con. BDNF**

Row exclusion: MS.svd

	DF	Sum of Squares	Mean Square	F-Value	P-Value
Sexo	1	2.771	2.771	7.317	.0145
Residual	18	6.817	.379		

Model II estimate of between component variance: .285

**Means Table for Con. BDNF**

Effect: Sexo

Row exclusion: MS.svd

	Count	Mean	Std. Dev.	Std. Err.
Femenino	14	1.258	.631	.169
Masculino	6	2.070	.573	.234

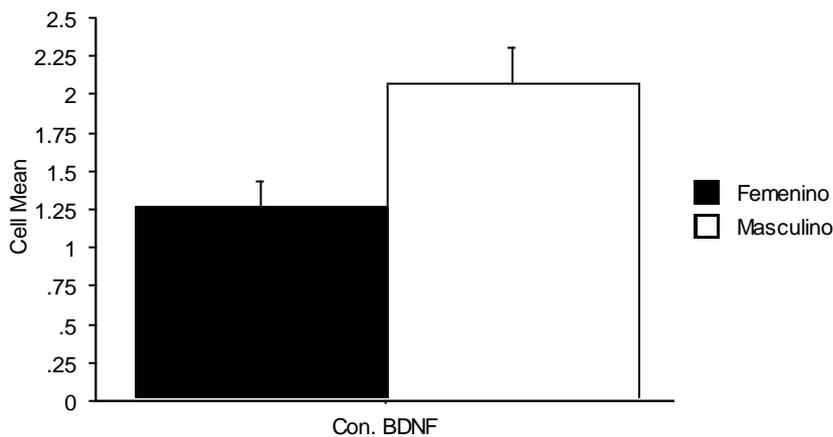
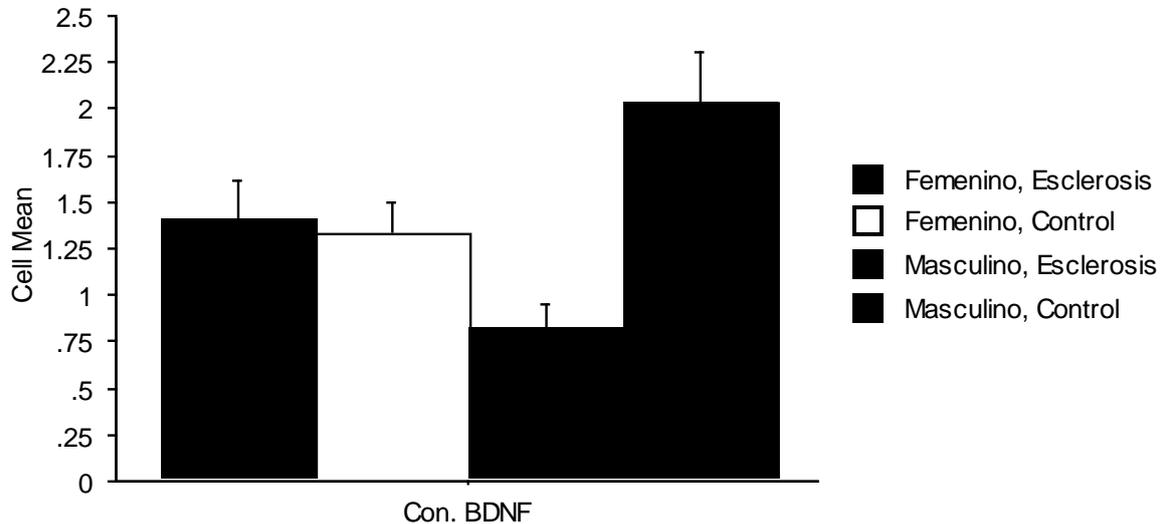


Figura 4. Se observan menores niveles de BDNF en controles de sexo femenino (barra negra) en comparación con controles del sexo masculino (barra blanca).

Al comparar estos resultados entre si, encontramos que hay diferencias en la cantidad de BDNF encontrado en suero de hombres con Esclerosis Múltiple comparado con los sujetos control pero no en las mujeres.



En las comparaciones del sexo masculino se observaron valores menores de BDNF en relación a los sujetos control 0.886 Vs 2.070 (Figura 6) y una ANOVA simple mostro que hay diferencias significativas entre estos grupos ( $F(1,13)= 22.918$ ;  $P<0.05$ ), en tanto que en el sexo femenino se observaron valores similares entre el grupo de pacientes y el grupo control 1.410 Vs 1.258 (Figura 7) y no hubo diferencias entre grupos al aplicar una ANOVA simple a los datos ( $F(1,23)= 0.320$ ;  $P>0.05$ ).

**ANOVA Table for Con. BDNF**

Row exclusion: MS.svd

	DF	Sum of Squares	Mean Square	F-Value	P-Value
Categoría	1	5.050	5.050	22.918	.0004
Residual	13	2.865	.220		

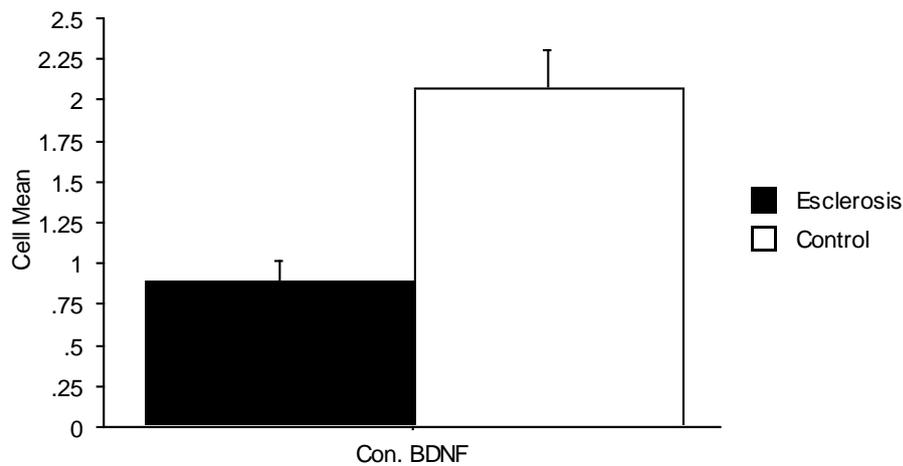
Model II estimate of between component variance: .671

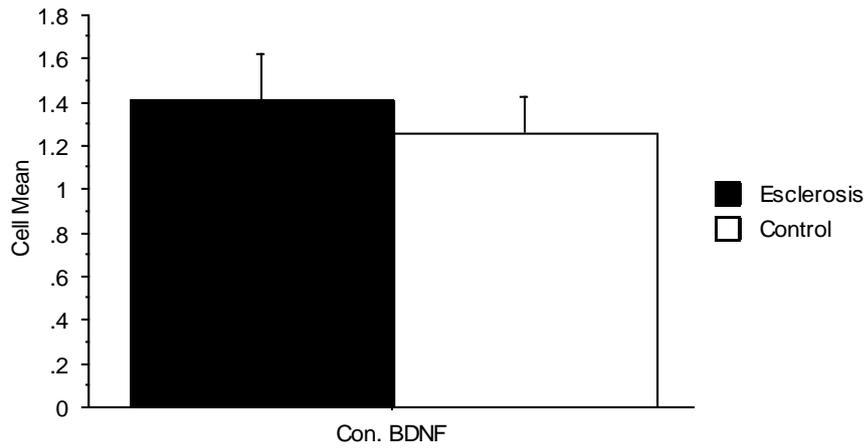
**Means Table for Con. BDNF**

Effect: Categoría

Row exclusion: MS.svd

	Count	Mean	Std. Dev.	Std. Err.
Esclerosis	9	.886	.391	.130
Control	6	2.070	.573	.234





**ANOVA Table for Con. BDNF**

Row exclusion: MS.svd

	DF	Sum of Squares	Mean Square	F-Value	P-Value
Categoría	1	.143	.143	.320	.5773
Residual	23	10.267	.446		

Model II estimate of between component variance: •

**Means Table for Con. BDNF**

Effect: Categoría

Row exclusion: MS.svd

	Count	Mean	Std. Dev.	Std. Err.
Esclerosis	11	1.410	.713	.215
Control	14	1.258	.631	.169

**DISCUSION:**

Los resultados de este estudio muestran que los pacientes con Esclerosis Múltiple tienen en general una cantidad similar de BDNF en suero comparado con sujetos control.

Al realizar una comparación entre edades (mayores y menores de 40 años) no encontramos diferencias en los pacientes con Esclerosis Múltiple, un dato interesante ya que la predisposición de edad si es muy marcada para un grupo de edad en los 15 y 45 años. Al encontrar nosotros que no hay diferencia entre grupo de edad, establece que esta alta incidencia de la enfermedad en gente joven es dependiente posiblemente de este marcador (BDNF), sin embargo dado que el BDNF es una proteína que se ha visto relacionada con protección neuronal (39), existía la posibilidad de encontrar cambios con la edad.

Es bien conocido ya que existen factores pronósticos en la Esclerosis múltiple, tanto clínicos, analíticos, de imagen y genéticos; comentándose el sexo en donde los pacientes de sexo femenino se han relacionado a mejor pronóstico, la edad de inicio en donde el inicio en menores de 35 años se relaciona a mejor pronóstico a diferencia de los pacientes con curso progresivos que suelen iniciar a edades más avanzadas, la evolución clínica en la cual pacientes que inician con afección cerebelosa, motora o esfínteres tienen peor pronóstico y esto en relación a mayor discapacidad y transformación más rápida a una forma progresiva.

Sin embargo los hallazgos más llamativos se observan cuando se diferencian los grupos en femenino y masculino. Al realizar esta separación pudimos observar una disminución de los niveles de BDNF en los pacientes de sexo masculino de una forma significativa. Sin embargo, los pacientes femeninos parecen tener un nivel de BDNF en suero similar a los de sujetos control.

Los resultados encontrados, con mayor alteración en los hombres pueden estar relacionados con lo documentado en la literatura en relación al peor pronóstico en este género, ya que dentro de los factores de mal pronóstico se comenta el sexo masculino, la afección cerebelosa, la edad y la cercanía entre el primer y segundo ataque; en nuestro caso podría corresponder el hecho de encontrar menores cantidades de BDNF en el sexo masculino a diferencia del sexo femenino indicando

una posible causa de la peor evolución que tienen estos pacientes; siendo esto un dato importante sobretodo en tratar de entender la etiología de la enfermedad además de la comentada en la literatura de los factores ambientales, infecciosos genéticos e inmunes que se proponen y pudiendo estos hallazgos entrar en conflicto con el posible papel protector hormonal que se ha descrito ya que observamos que en el sexo femenino los niveles de BDNF fueron similares a los sujetos control por lo que cantidades adecuadas de BDNF podrían ser un factor protector en el sexo femenino que condicione una evolución más benigna de la enfermedad, concordando con la literatura que describe al BDNF como una neurotrofina que promueve la sobrevivencia axonal y potencia la proliferación de oligodendrocitos y la mielinización.

Estos resultados, aunque no son definitivos, son alentadores ya que marcan dos pautas importantes. Una que el BDNF en suero puede ser un marcador del pronóstico de la enfermedad en hombres. En segundo lugar, es de interés el hecho de que existan diferencias entre hombres y mujeres ya que nos habla de que hay una evolución distinta dependiente de sexo de la enfermedad.

Es necesario ampliar el número de muestras para que el estudio tenga una validez mayor y además consideramos pertinente el evaluar más marcadores, ya reportados o no, tanto para ver si está relacionado con el pronóstico de la enfermedad y para seguir en la búsqueda de diferencias entre hombres y mujeres con el fin de determinar si el proceso por el cual la Esclerosis Múltiple evoluciona es diferente dependiendo del sexo, esto abriría las puertas para direccionar los tratamientos dependiendo de los marcadores como se hace ya en otras enfermedades.

## REFERENCIAS

1. Noseworthy JH, Luccinetti C, Rodriguez M, Weinshenker BG. Multiple Sclerosis. *N Engl J Med* 2000; 343: 938-952.
2. Burden of illness of multiple sclerosis: part II: quality of life. The Canadian burden of illness study group. *Can J Neurol Sci* 1998; 25: 31-38.
3. Hirtz D, Thurman DJ, Gwinn-Hardy K, Mohamed M, Chaudhuri AR, Zalutsky R. How common are the “common” neurologic disorders? *Neurology* 2007; 68:326-337.
4. Weinshenker BG. Epidemiology of multiple sclerosis. *Neurol Clin.* 1996; 14: 291-308.
5. Alter M, Olivares L. Multiple sclerosis in Mexico. An epidemiologic study. *Arch Neurol.* 1970; 23(5): 451-459.
6. Ghezzi A. Clinical Characteristics of multiple sclerosis with early onset. *Neurol Sci* 2004; 25: 336-339.
7. Page WF, Kurtzke JF, Murphy FM, Norman JE. Epidemiology of multiple sclerosis in US veterans: V. Ancestry and the risk of multiple sclerosis. *Ann Neurol* 1993; 33: 632-639.
8. Kurtzke JF, Beebe GW, Norman JE Jr. Epidemiology of multiple sclerosis in US veterans: 1. Race, sex, and geographic distribution. *Neurology* 1979; 29: 1228-1235.
9. Detels R, Visscher BR, Malmgren RM, Coulson AH, Lucia MV, Dudley JP. Evidence for lower susceptibility to multiple sclerosis in japanese-americans. *Am J Epidemiol* 1997; 105: 303-310.
10. Lassman H, Wekerle H. the pathology of multiple sclerosis. En Compton A, Confavreaux C, Lassman H, MacDonald I, Miller D, Noseworthy J, Smith K , Wekerle H, eds. *McAlpine’s multiple sclerosis: pathology of the newly forming lesion.* *Ann Neurol* 2004; 55: 458-467.
11. Martino G, Hartung HP. Immunopathogenesis of multiple sclerosis: the role of T cells. *Curr opin Neurol* 1999; 12: 309-321.
12. Archelos JJ, Previtali SC, Hartung HP. The role of integrins in immune mediated diseases of the nervous system. *Trends Neurosci* 1999; 22: 30-38.

13. Correale J, Villa A. The blood-brain-barrier in multiple sclerosis: functional roles and therapeutic targeting. *Autoimmunity* 2007; 40: 148-160.
14. Ransohoff RM, Kivisakk P, Kidd G. Three or more routes for leukocyte migration into the central nervous system. *Nature Rev Immunol* 2003; 3: 569-81.
15. Hartung HP, Kieseier BC. The role of matrix metalloproteinases in autoimmune damage to the central and peripheral nervous system. *J Neuroimmunol* 2000; 107: 140-147.
16. Becher B, Prat A, Antel JP. Brain immune connection: Immunoregulatory properties of CNS-resident cells. *Glia* 2000; 29: 293-304.
17. Sospedra M, Martin R. Immunology of multiple sclerosis. *Rev Immunol* 2005; 23: 683-747.
18. McFarland H, Martin R. Multiple sclerosis: A complicated picture of autoimmunity. *Nat Immunol* 2007; 25: 821-52.
19. Brosnan CF, Battistini L, Raine CS. Reactive nitrogen intermediates in human neuropathology: an overview. *Dev Neurosci* 1994; 16: 152-61.
20. Werner P, Pitt D, Raine CS. Multiple sclerosis: Altered glutamate homeostasis in lesions correlates with oligodendrocyte and axonal damage. *Ann Neurol* 2001; 50: 169-80.
21. Sandra Vukusic and Christian Confavreux. The natural history of multiple sclerosis. In: Stuart D. Cook. *Handbook of multiple sclerosis*. Third edition, New York: Marcel Dekker, Inc. 2001; 433-447.
22. Lublin F, Reingold S. Defining the clinical course of multiple sclerosis: results of an international survey. *Neurology* 1996; 46: 907-911.
23. [http://www.who.int/mental\\_health/neurology/chapter\\_3\\_a\\_neuro\\_disorders\\_public\\_h\\_challenges.pdf](http://www.who.int/mental_health/neurology/chapter_3_a_neuro_disorders_public_h_challenges.pdf) Accesado el 26 de Enero del 2010
24. Milo R, Kahana E. Multiple Sclerosis: geoepidemiology, genetics and the environment. *Autoimmune Rev* 2010; 9 (5):A387-94.
25. Kurtzke JF. A new scale for evaluating disability in multiple sclerosis. *Neurology* 1955; 5: 580-583.
26. Fernández Liguori, N. y Katz, O. (2008). Manejo sintomático. En A. Villa, J. Correale y O. Garcea (Eds.), *Esclerosis Múltiple. Conceptos básicos y clínicos* (pp.279-300). Buenos Aires: Editorial Dunken.

27. Vanotti S. Evaluación Neuropsicológica en pacientes con Esclerosis Múltiple. *Revista Argentina de Neuropsicología*; 2008; 12; 13-21.
28. Rao SM, Reingold SC, Ron MA, Lyo Caen O, Comi G. Workshop on neurobehavioral disorders in multiple sclerosis. Diagnosis, underlying disease, natural history, and therapeutic intervention. *Arch Neurol*, 1993; 40: 658-62.
29. Leibowitz U, Alter M. Optic nerve involvement and diplopía as initial manifestations of multiple sclerosis. *Acta neurol Scand* 1968; 44: 70-80.
30. Scholl GB, Songs HS, Wray SH. Uhthoff's symptoms in optic neuritis. Relation to magnetic resonance imaging and development of multiple sclerosis. *Ann Neurol*, 1991; 30: 180-184.
31. Came PE, Carter WA (Eds). *Interferons and their applications*. Berlin: Springer-Verlag, 1984.
32. The IFNB multiple sclerosis study group. Interferon beta-1b is effective in relapsing-remitting multiple sclerosis. I. clinical results of a multicenter, randomized, double-blind, placebo-controlled trial. *Neurology*, 1993; 43:655-661.
33. Jacobs LD, Cookfair DL, Rudick RA, Herndon RM, Ritchert JR, Salazar AM et al. intramuscular interferon beta-1a for disease progression in relapsing multiple sclerosis. The multiple sclerosis collaborative research group (MSCRG). *Ann Neurol*, 1996; 39:285-294.
34. Fridkis-Hareli M, Strominger JL. Promiscuous binding of synthetic copolymer 1 to purified HLA-DR molecules. *J Immunol* 1998; 160:4386-4397.
35. Fridkis-Hareli M, teitelbaum D, Arnon R et al. Synthetic copolymer 1 and myelin basic protein do not require processing to binding to class II major histocompatibility complex molecules on living antigen-presenting cells. *Cell immunol* 1995; 163:229-236.
36. Duda PW, Krieger JI, Schmied MC et al. Human and murine CD4 T cell reactivity to a complex antigen: recognition of the synthetic random polypeptide glatiramer acetate. *J Immunol* 2000; 165:7300-7307.
37. Farina C, Weber MS, Meinl E et al. Glatiramer acetate in multiple sclerosis: update on potential mechanisms of action. *Lancet Neurol* 2005; 4:567-575.

38. Gajofatto A, Bongiani M, Zanusso G, Benedetti MD, Monaco S. Are cerebrospinal fluid biomarkers useful in predicting the prognosis of multiple sclerosis patients? *Int. J. Mol. Sci.* 2011; 12:7960-7970.
39. Azoulay D, Urshansky N, Karni A. Low and dysregulated BDNF secretion from immune cells of MS patients is related to reduced neuroprotection. *J. Neuroim.* 2008; 195:186-193.
40. Linker RA, Lee DH, Demir S, Wiese S, Kruse N, Siglienti I, Gerhardt E, Neumann H, Sendtner M, Lühder F, Gold R. Functional role of brain-derived neurotrophic factor in neuroprotective autoimmunity: therapeutic implications in a model of multiple sclerosis. *Brain.* 2010; 133: 2248-2263.
41. McTigue DM, Horner PJ, Stokes BT, Gage FH. Neurotrophin-3 and brain-derived neurotrophic factor induce oligodendrocyte proliferation and myelination of regenerating axons in the contused adult rat spinal cord. *J. Neurosci.* 1998; 18(14): 5354-5365.
42. Thöne J, Ellrichmann G, Seubert S, Peruga I, Lee DH, Conrad R, Hayardeny L, Comi G, Wiese S, Linker RA, Gold R. Modulation of autoimmune demyelination by laquinimod via induction of brain-derived neurotrophic factor. *The American Journal of Pathology.* 2012; 180(1): 267-274.
43. Azoulay D, Vachapova V, Shihman B, Miler A, Karni A. Lower brain-derived neurotrophic factor in serum of relapsing remitting MS: Reversal by glatiramer acetate. *J. Neuroim.* 2005; 167:215-218.