

REVISTA ESPAÑOLA DE

# ESCLEROSIS MÚLTIPLE

## **Calcium dyshomeostasis in multiple sclerosis**

Carlos Matute

*CIBERNED and Departamento de Neurociencias. Facultad de Medicina y Odontología.  
Universidad del País Vasco.  
Leioa (Vizcaya).*

## **Biobancos: una herramienta necesaria para el futuro de la investigación biomédica**

M<sup>a</sup> Isabel García Sánchez, Miguel Ángel Gamero García, Guillermo Izquierdo Ayuso

*Unidad de Gestión Clínica Intercentros de Neurociencias. Unidad de Esclerosis Múltiple.  
Hospital Universitario Virgen Macarena.  
Sevilla.*

## **Is “Benign Multiple Sclerosis” really benign?**

D. J. Rigotti PhD, O. Gonen PhD

*Department of Radiology.  
New York University School of Medicine.  
New York (USA).*

## **Novedades bibliográficas**

Ana M<sup>a</sup> Alonso Torres

*Unidad de Neuroinmunología. Instituto de Neurociencias Clínicas.  
Hospital Regional Universitario Carlos Haya. Málaga.*



# REVISTA ESPAÑOLA DE ESCLEROSIS MÚLTIPLE

# STAFF

## Director:

Óscar Fernández Fernández  
Director Instituto Neurociencias Clínicas  
Jefe de Servicio de Neurología  
Hospital Regional Universitario Carlos Haya. Málaga

## Comité de redacción:

Secretaria de redacción: Celia Oreja Guevara

A. Alonso Torres  
R. Bustamante Toledo  
V. Fernández Sánchez  
M. Guerrero Fernández  
A. León Martín

L. Leyva Fernández  
G. Luque Fernández  
J. A. Tamayo Toledo  
F. Romero Crespo  
A. L. Muñoz Becerra

## Comité asesor:

Jose Carlos Álvarez Cermeño	<i>Madrid</i>	Xavier Montalbán Gairin	<i>Barcelona</i>
Txomin Arbizu Urdain	<i>Barcelona</i>	Fco. Javier Olascoaga Urtaza	<i>San Sebastián</i>
Rafael Arroyo González	<i>Madrid</i>	Jose María Prieto González	<i>Santiago de Compostela</i>
Marina Bujanda	<i>Navarra</i>	Alfredo Rodríguez Antigüedad	<i>Basurto (Vizcaya)</i>
Francisco Coret Ferrer	<i>Valencia</i>	Albert Saiz Hinarejos	<i>Barcelona</i>
J. A. García-Merino	<i>Madrid</i>	Alberto Tuñón Álvarez	<i>Oviedo</i>
Miguel Ángel Hernández Pérez	<i>Sta. Cruz de Tenerife</i>	Clara de Andrés de Frutos	<i>Madrid</i>
Carlos Hernández Lahoz	<i>Oviedo</i>	Purificación de Castro Lorenzo	<i>Pamplona</i>
Guillermo Izquierdo Ayuso	<i>Sevilla</i>	Jordi Matías-Guiu Guía	<i>Madrid</i>

## Comité científico:

Yolanda Aladro Benito	<i>Getafe (Madrid)</i>	Miguel Guerrero Fernández	<i>Granada</i>
Carmen Arnal García	<i>Granada</i>	Jose M <sup>a</sup> Gutiérrez García	<i>Valladolid</i>
Jose Ramón Ara Callizo	<i>Zaragoza</i>	Cristina Iñiguez Martínez	<i>Zaragoza</i>
Joaquín Argente Alcalá	<i>Cádiz</i>	Francisco Lacruz	<i>Navarra</i>
Manuel Arias Gómez	<i>S. de Compostela</i>	José Meca Lallana	<i>Murcia</i>
Julián Benito	<i>Móstoles (Madrid)</i>	Celia Oreja Guevara	<i>Madrid</i>
Wadih Bowakin Dib	<i>Valladolid</i>	Ángel Pérez Sempere	<i>Alicante</i>
Luís Brieva Ruíz	<i>Lleida</i>	Cristina Ramo Tello	<i>Badalona</i>
Inma Bonaventura Ibars	<i>Tarrasa (Barcelona)</i>	Jordi Río Izquierdo	<i>Barcelona</i>
Carmen Durán Herrera	<i>Badajoz</i>	Elena Rodríguez García	<i>Madrid</i>
Joaquín Escudero Torrella	<i>Valencia</i>	Jesús Romero López	<i>Vigo</i>
Ricardo Fernández Bolaños	<i>Sevilla</i>	Jaume Roquer González	<i>Barcelona</i>
Dionisio Fernández Uría	<i>Asturias</i>	Fernando Sánchez López	<i>Córdoba</i>
Jesús Foronda Benoga	<i>Jaén</i>	Mar Tintoré Subirana	<i>Barcelona</i>
Pedro García Ruíz-Espiga	<i>Madrid</i>	Antonio Uclés	<i>Sevilla</i>
Juan Carlos García-Manco	<i>Bilbao</i>	Antonio Yusta Izquierdo	<i>Guadalajara</i>
María Pilar Granés Ibáñez	<i>Lérida</i>	Juan José Zarranz	
Pedro Guardado Santerías	<i>Almería</i>	Imirizaldu	<i>Bilbao</i>

EDITA:  
  
Línea  
de Comunicación

C/ Concha Espina, 8 - 1<sup>o</sup> Dcha.  
28036 Madrid  
Teléfono: 91 411 00 32  
Fax: 91 411 01 46  
E-mail:  
informacion@lineadecomunicacion.com

Depósito Legal: M-24807-2006

ISSN: 1885-7590

© 2010

REVISTA ESPAÑOLA DE  
**ESCLEROSIS  
MÚLTIPLE**  
Volumen II - Nº 14 - Junio de 2010

## **Calcium dyshomeostasis in multiple sclerosis**

Carlos Matute

*CIBERNED and Departamento de Neurociencias. Facultad de Medicina y Odontología.  
Universidad del País Vasco.  
Leioa (Vizcaya).*

5

## **Biobancos: una herramienta necesaria para el futuro de la investigación biomédica**

M<sup>a</sup> Isabel García Sánchez, Miguel Ángel Gamero García, Guillermo Izquierdo Ayuso  
*Unidad de Gestión Clínica Intercentros de Neurociencias. Unidad de Esclerosis Múltiple.  
Hospital Universitario Virgen Macarena.  
Sevilla.*

14

## **Is “Benign Multiple Sclerosis” really benign?**

D. J. Rigotti PhD, O. Gonen PhD

*Department of Radiology.  
New York University School of Medicine.  
New York (USA).*

22

## **Novedades bibliográficas**

Ana M<sup>a</sup> Alonso Torres

*Unidad de Neuroinmunología. Instituto de Neurociencias Clínicas.  
Hospital Regional Universitario Carlos Haya. Málaga.*

32

## **Agenda de congresos**

37

# Calcium dyshomeostasis in multiple sclerosis

CARLOS MATUTE

*CIBERNED and Departamento de Neurociencias. Facultad de Medicina y Odontología. Universidad del País Vasco. Leioa (Vizcaya).*

**ABSTRACT.** Calcium ( $\text{Ca}^{2+}$ ) dyshomeostasis is a major event in the pathophysiology of multiple sclerosis. All cellular components involved in that disease, including macroglial cells and axons, are endowed with membrane  $\text{Ca}^{2+}$ -permeable receptors and channels lodged in the cell membrane. Intracellular  $\text{Ca}^{2+}$  overload resulting from deregulated activity of channels, such as those opened by glutamate and ATP, is deleterious to glia and axons. In this review, I summarize recent advances in understanding of  $\text{Ca}^{2+}$  dyshomeostasis in experimental paradigms which are relevant to multiple sclerosis, and discuss some of the clinical implications of these findings.

**Key words:** *demyelination, excitotoxicity, mitochondria, reactive oxygen species, cell death.*

**RESUMEN.** La dishomeostasis del calcio es un evento importante en la patofisiología de la esclerosis múltiple. Todos los componentes celulares relacionados con esta enfermedad, incluyendo las células macrogliales y los axones, están dotados con receptores y canales de membrana permeables al calcio. La sobrecarga intracelular de calcio como consecuencia de la desregulación de la actividad de canales, tales como los activados por el ácido glutámico y el ATP, daña los oligodendrocitos y los axones. En esta revisión resumiré algunos avances recientes sobre la comprensión de la dishomeostasis del calcio en paradigmas experimentales relevantes a la esclerosis múltiple, y discutiré las implicaciones clínicas de esos hallazgos.

**Palabras clave:** *desmielinización, excitotoxicidad, mitocondria, especies reactivas de oxígeno, muerte celular.*

**T**he main vulnerable cellular elements in multiple sclerosis (MS) are oligodendrocytes, myelin and axons. Oligodendrocytes are the major cell type of CNS white matter which in humans comprises about 50% of brain volume. In addition, oligodendroglia is also present in gray matter, in particular throughout the cerebral cortex.

White matter resembles gray matter more than previously expected, in several aspects which are relevant to disease. Thus, functional synapses between axons and glial progenitors have been reported in the corpus callosum, indicating that axons within white matter are engaged in rapid neuron-glia communication in a manner that may also resemble classical synaptic transmission (Ziskin *et al.*, 2007; Kuckley *et al.*, 2007). In turn, white matter is endowed with the molecular machinery necessary to employ most neurotransmitters in glia- and axon-glia interactions (Stys, 2005; Matute *et al.*, 2006, 2007; Butt, 2006; Constantinou and Fern, 2009; Matute, 2010).

As in neurons, prolonged and excessive elevation of the cytosolic concentration of  $\text{Ca}^{2+}$  can be lethal to white matter glia and directly disrupt axon function and structure. In this review, I briefly summarize some of the major specific processes regulating  $\text{Ca}^{2+}$  homeostasis in glial cells as well as in axons, and how aberrant  $\text{Ca}^{2+}$  signaling can lead to white matter damage in MS.

## □ Characteristics of white matter

White matter is composed of myelinated and unmyelinated axons, astrocytes, oligodendrocytes, microglia and blood vessels. Myelinated axons in the Central Nervous System (CNS) are designed to support rapid and efficient saltatory conduction by means of an insulating myelin sheath which covers 99% of the axon surface and a high density of nodal Na channels and internodal K channels which preserve electrical polarization and stability (Poliak and Peles, 2003).

Astrocytes participate in numerous functions including structural support (the word “glia” is derived from a Greek word meaning “glue”), uptake and release of neurotransmitters, regulation of extracellular cation levels, and metabolic support. Some astrocyte processes contact the blood-brain barrier, which protects the CNS from being exposed to endogenous neurotoxins present in blood. A major mediator of astrocyte signalling is  $\text{Ca}^{2+}$ , which can propagate through the astrocytic syncytium over long distances and thus, modulate activity at a distant location (Jessen and Richardson, 2001). In turn, oligodendrocytes enwrap axons and form the myelin sheaths, which provide electrical insulation around the axon. Oligodendrocyte death results in demyelination, impaired axonal conduction and ultimately axon death.

Microglial cells are the immune cells of the

CNS and are rapidly activated and recruited to sites of infection, neurodegeneration and inflammation. Microglia are stimulated by a variety of cytokines, neurotransmitters, modulators and neurotoxins, as well as by extracellular matrix molecules and proteases present in the areas of the CNS undergoing inflammation (Raivich and Banati, 2004). They are competent antigen presenters of antigen and interact with T cells entering the CNS. Microglial cells also synthesize cytokines, chemokines, complement, cell adhesion proteins, reactive oxygen radicals and neurotrophins which can exert damaging or protective effects on adjacent neurons, axons, oligodendrocytes and myelin (Raivich and Banati, 2004).

## □ Regulation of Ca<sup>2+</sup> signalling in white matter

White matter axons and glial cells control intracellular Ca<sup>2+</sup> levels through a complex interplay between Ca<sup>2+</sup> flux across the plasma membrane, and Ca<sup>2+</sup> release from and sequestration into internal stores (for reviews, see Verkhratsky *et al.*, 1998; Stys, 2005; Alberdi *et al.*, 2005). Two of the major players in Ca<sup>2+</sup> signaling are glutamate and ATP which are released from axons and glial cells. In this section, I will outline recent knowledge about how these two excitatory neurotransmitters exert their effects in white matter.

### Glial cells

White matter glial cells express ligand-gated channels which are permeable to Ca<sup>2+</sup>, including glutamate and ATP receptors. Thus, metabotropic (mGluR) and ionotropic glutamate receptors of the AMPA, kainate and NMDA type are commonly present in astrocytes and oligodendrocytes, as well as in resting and activated microglia (for review, see Verkhratsky and Steinhäuser, 2000; Matute *et al.*, 2006; Butt, 2006; Matute, 2006; Verkhratsky and Kirchhoff, 2007; Bakiri *et al.*, 2009).

Overall, ionotropic glutamate receptors expressed in glial cells have similar properties to their neuronal counterparts. However, the fact that these receptors are edited to a lesser extent in the white matter, and that AMPA receptors in oligodendrocytes do not have GluR2 subunit, suggests that white matter glia are more Ca<sup>2+</sup> permeable (Matute *et al.*, 2006). In turn, NMDA receptors are expressed in white matter oligodendrocytes at all developmental stages and their activation generates a membrane depolarization and a rise in cytosolic Ca<sup>2+</sup> (reviewed in Bakiri *et al.*, 2009). Interestingly, NMDA receptors are expressed in clusters on oligodendrocyte processes and myelin, whereas AMPA and kainate receptors are diffusely located on oligodendrocyte somata (Káradóttir *et al.*, 2005; Salter and Fern, 2005, Micu *et al.*, 2006).

In addition, oligodendrocytes also express all three subtypes of mGluRs, but their levels are developmentally regulated and are very low in mature cells of this lineage (Deng *et al.*, 2004). However, little is still known about the specific properties of ionotropic and metabotropic glutamate receptors expressed on white matter astrocytes and microglia (see Matute *et al.*, 2006).

Prolonged activation of AMPA, kainate and NMDA receptors causes oligodendrocyte death and primary and/or secondary myelin destruction. A central event to this process is Ca<sup>2+</sup> influx upon receptor activation and the ensuing accumulation of this cation within mitochondria, which leads to depolarization of this organelle, increased production of radical oxygen species, and release of proapoptotic factors which activate caspases (Sánchez-Gómez *et al.*, 2003; Matute *et al.*, 2006). The types of oligodendrocyte death induced by activation of AMPA and kainate receptors depend on the intensity and duration of the excitotoxic insult. Notably, the molecular cascades initiated by AMPA and kainate receptors are not identical indicating that different intracellular domains are involved in executing the death program triggered by these receptors (Matute *et al.*, 2007). In particular, insults channeled through kainate receptors activate caspases 9 and 3 leading to apoptosis. In contrast, those activating AMPA receptors induce apoptosis by recruiting caspase 8, which leads to the truncation of the Bid protein. This in turn activates caspase 3 and PARP-1 polymerase, or cause necrosis (Matute *et al.*, 2007). The mechanisms triggered by NMDA receptor-mediated insults to oligodendrocytes have not been studied in detail yet.

Glial cells also express a heterogeneous repertoire of ATP receptor including an ample variety of ionotropic (P2X) and metabotropic (P2Y) purinergic receptor subtypes (Butt, 2006, Verkhratsky *et al.*, 2009). ATP-gated P2X channels are formed by P2X1-P2X7 subunits and have marked Ca<sup>2+</sup> permeability. Activation of P2X1 and P2X3 results in fast, rapidly desensitizing currents. In contrast, P2X7, and also P2X2 and P2X4, are capable of a conformational change which results in larger pore diameter following prolonged exposure to ATP.

Astrocytes express most of the P2X and P2Y receptor subtypes whose activation mediates signaling through the astrocyte syncytium (James and Butt, 2002; Fields and Burnstock, 2006). In particular, activation of P2X7 receptors in astrocytes increases [Ca<sup>2+</sup>], and causes the release of purines. Optic nerve astrocytes also express a variety of P2X receptors, which are highly permeable to Ca<sup>2+</sup>, and of P2Y re-

ceptors which mobilize this cation from intracellular stores (James and Butt, 2002), as reported in grey matter astrocytes.

Cells of the oligodendrocyte lineage are endowed with P2X and P2Y receptors which can act as mediators of axo-oligodendroglial communication implicated in myelination control. In particular, ATP induces a rise in cytosolic  $\text{Ca}^{2+}$  in oligodendrocytes by activating ionotropic P2X7 receptors (James and Butt, 2002; Matute *et al.*, 2007) and metabotropic P2Y receptors (Kirischuk *et al.*, 1995; James and Butt, 2002). Moreover, mature oligodendrocytes of the optic nerve express most of the P2X receptor subtypes, with the P2X7 subtype being the most predominant; this is located in the oligodendrocyte soma and in the myelin sheath; James and Butt, 2002; Matute *et al.*, 2007). P2X receptors with higher affinity may be activated by ATP released during axonal electrical activity and from astrocytes (Butt, 2006). In contrast, the functional significance of lower affinity P2X7 receptors in oligodendrocytes is not known, since unusual high concentrations of ATP in the extracellular space are needed to activate them. However, ATP levels may rise sufficiently upon tissue damage to stimulate P2X7 receptors and therefore they may be relevant to pathologies involving acute and chronic injury to white matter (Matute *et al.*, 2007). Indeed, sustained activation of P2X7 receptors in oligodendrocytes *in vitro* and *in vivo* results in overload of the cytosol with  $\text{Ca}^{2+}$ , caspase-3 activation and chromatin condensation and cell death (Matute *et al.*, 2007).

Microglia expresses several P2X and P2Y receptors which act as sensors of astrocyte activity and trigger cytokine release (Fields and Burnstock, 2006; Färber and Kettenmann, 2006). In particular, microglial P2X7 receptors drive microglial activation and proliferation (Monif *et al.*, 2009) and are functionally linked to the release of several substances including pro-inflammatory cytokines such as interleukin-1 $\beta$ , which influence pathological processes and promote neurodegeneration (Färber and Kettenmann, 2006). Moreover, ATP is a potent immunomodulator controlling microglial recruitment and activation (Davalos *et al.*, 2005; Nimmerjahn *et al.*, 2005) by acting at P2Y12 receptors to induce microglial chemotaxis at early stages of the response to local CNS injury (Haines *et al.*, 2006).

Altogether, the findings discussed above indicate that activation of glutamate receptors and purinoceptors by extracellular glutamate and ATP can cause primary and/or secondary damage to white matter and that signalling by both neurotransmitters is an important component of the glial response to injury in the CNS.

## Axons

Axons and astrocytes release glutamate and ATP during electrical activity, which in turn evoke  $\text{Ca}^{2+}$  signals in nearby glia (Bakiri *et al.*, 2009). In addition, axons are competent sources of neurotransmission within white matter since they form functional synapses with glia (Ziskin *et al.*, 2007; Kuckley *et al.*, 2007; Bakiri *et al.*, 2009). Conversely, astrocytes can release glutamate (Volterra and Meldolesi, 2005) and NG2-expressing glia also are endowed with the synaptic protein synaptophysin which suggests that they may also be capable of vesicular release and bidirectional communication with axons via their cellular contacts (Bakiri *et al.*, 2009). Nevertheless, the details of glutamate and ATP signalling to axons remain scarce.

Electrophysiological recordings of the axon resting potential revealed that axons in the dorsal column of the spinal cord are depolarized via activation of AMPA receptors (Ouardouz *et al.*, 2006). Consistent with these observations, central axons are damaged by activation of AMPA/kainate receptors (Matute, 1998; Fowler *et al.*, 2003), and protected by blockers of these receptors in models of white matter injury (Tekkök and Goldberg, 2001; Pitt *et al.*, 2000). Indeed, recent findings indicate that myelinated spinal cord axons have AMPA receptors formed by the GluR4 subunit and kainate receptors composed of at least GluR5 and GluR6 subunits, which are located in the internodes in all instances (Ouardouz *et al.*, 2009a,b). However, axon demise could also be secondary to oligodendrocyte loss by excitotoxicity and the ensuing demyelination (see above), rather than by activation per se of glutamate receptors in axons.

Axonal AMPA receptors are weakly permeable to  $\text{Ca}^{2+}$ , the entry of which in turn releases further  $\text{Ca}^{2+}$  from the axoplasmic reticulum by opening intracellular calcium channels known as ryanodine receptors (Ouardouz *et al.*, 2009a). In contrast, axonal kainate receptors with the GluR5 subunit are coupled to phospholipase C activation (Ouardouz *et al.*, 2009a). In addition, activation of kainate receptors with the GluR6 subunit induces a small amount of  $\text{Ca}^{2+}$  entry that stimulates nitric oxide synthase, as well as a local depolarization which activates L-type  $\text{Ca}^{2+}$  channels and subsequently ryanodine receptors in the axoplasmic reticulum (Ouardouz *et al.*, 2009b). The functional significance of these signalling mechanisms by glutamate receptors in axons is unknown but they may serve to amplify axonal  $\text{Ca}^{2+}$  signals which seem to be weak because of the limited quantity of cation available in the narrow space (Ouardouz *et al.*, 2009b). In turn, high local concentrations of  $\text{Ca}^{2+}$  generated by these receptors may result in focal swellings and irreversible axonal transactions (Ouardouz *et al.*, 2009b).

**Table I** Mechanisms of Ca<sup>2+</sup> dyshomeostasis in multiple sclerosis

MOG-mediated demyelination	Ca <sup>2+</sup> -dependent MAPK/Akt activation	[58]
Acute and chronic EAE	AMPA receptors	[40, 61, 64, 65]
Microglia activation	Oligodendrocyte excitotoxicity	[67]
Oligodendrocytes in vitro and in situ	Sensitization to excitotoxicity by kainate receptor	[70]
Chronic EAE	P2X7 receptor	[27]

Abbreviations: EAE: experimental autoimmune encephalomyelitis; MOG: myelin oligodendrocyte glycoprotein.

## □ Perturbation of Ca<sup>2+</sup> homeostasis in glial cells and axons in white matter pathology

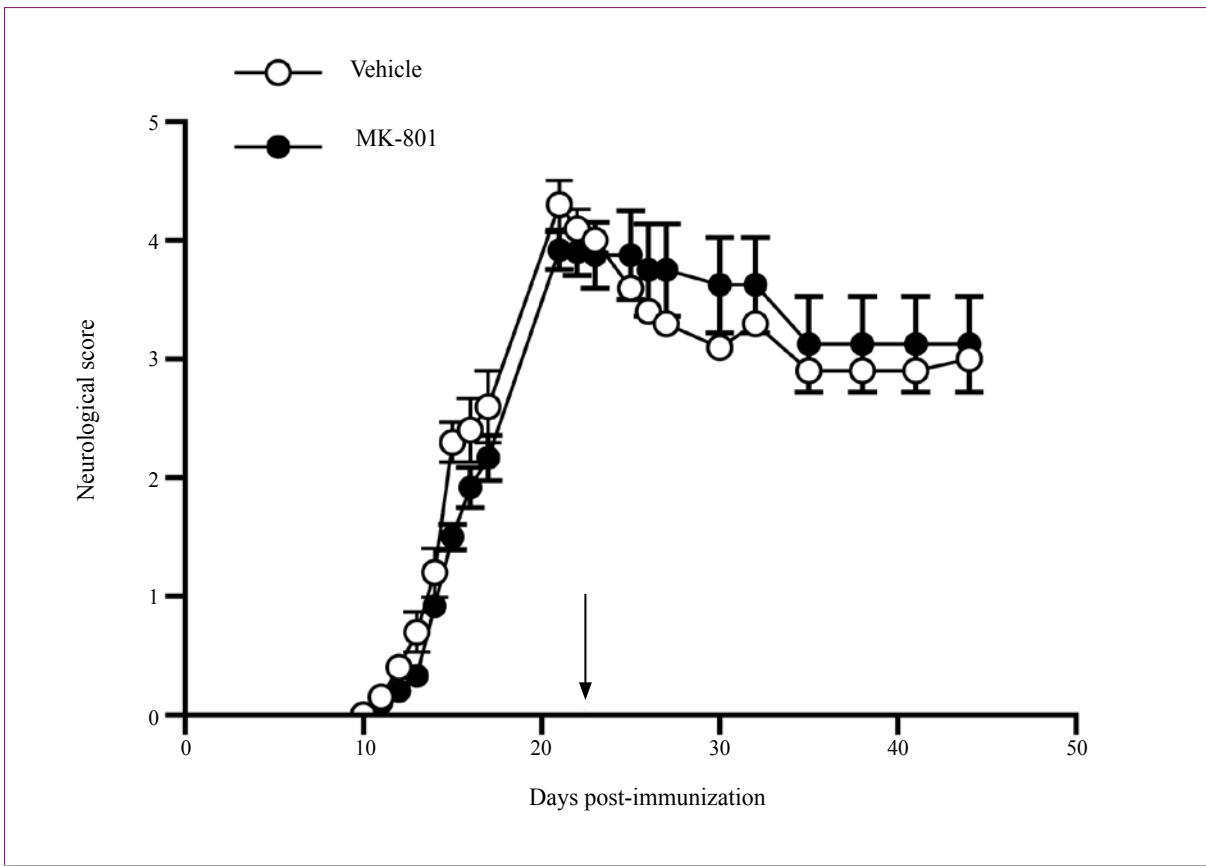
Glial cells and axons, like neurons, are vulnerable to Ca<sup>2+</sup> overload resulting from deregulation of channels and/or pumps. I summarize below current evidence regarding the specific mechanisms linking alterations in Ca<sup>2+</sup> homeostasis to glial cell death and axonal damage, and its relevance to human diseases involving white matter (Table I).

The major demyelinating disease of the CNS is multiple sclerosis (MS) which is the foremost disabling pathology among young adults. MS is a chronic, degenerative disease of the CNS, which is characterized by focal lesions with inflammation, demyelination, infiltration of immune cells, oligodendroglial death and axonal degeneration (Prineas *et al.*, 2002). These cellular alterations are accompanied by neurological deficits such as sensory disturbances, lack of motor coordination and visual impairment. It is widely accepted that the etiology of this illness has autoimmune and inflammatory grounds and that a derailment of the immune system leads to cell- and antibody-mediated attacks on myelin. Notably, treatment of oligodendrocytes with antibodies to myelin-oligodendrocyte glycoprotein (MOG) leads to an increase in Ca<sup>2+</sup> influx and activation of the MAPK/Akt pathways, a signalling cascade relevant to the initial steps of MOG-mediated demyelination (Marta *et al.*, 2005). In turn, breakdown of the blood-brain barrier caused by inflammation allows the entry into the brain parenchyma of blood constituents, which may be deleterious to neurons and glia. Thus, elevated levels of albumin induced a rise in intracellular Ca<sup>2+</sup> in microglia, but not in astrocytes or macrophages, which is mediated via Src tyrosine kinase and phospholipase C. This Ca<sup>2+</sup> response is coupled to microglial proliferation suggesting that this signalling mechanism may play a role in microglial activation in pathological situations involving blood-brain barrier impairment as occurs in multiple sclerosis and in other neurodegenerative diseases (Hooper *et al.*, 2005).

Both genetic and environmental factors contribute to MS susceptibility (Zamvil and Steinman,

2003). Among them, primary and/or secondary alterations in glutamate signalling cause excitotoxicity that contribute to MS pathology. Thus, numerous studies carried out in cellular and animal models of MS as well as in post-mortem brain and in patients indicate that excitotoxicity mediated by Ca<sup>2+</sup>-permeable glutamate receptors contributes to oligodendrocyte death, demyelination and tissue damage in MS (Matute *et al.*, 2001; Srinivasan *et al.*, 2005; Vallejo-Illarramendi *et al.*, 2006). In particular, experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE), an animal model which exhibits the clinical and pathological features of MS, is alleviated by AMPA and kainate receptor antagonists (Pitt *et al.* 2000; Smith *et al.* 2000). Remarkably, blockade of these receptors in combination with anti-inflammatory agents is effective even at an advanced stage of unremitting EAE, as assessed by increased oligodendrocyte survival and remyelination, and corresponding decreased paralysis, inflammation, CNS apoptosis and axonal damage (Kanwar *et al.* 2004). In contrast, blockade of NMDA receptors with MK-801 does not attenuate EAE symptoms (Figure 1), an event that calls into question the proposed relevance of NMDA receptors in demyelinating diseases (Bakiri *et al.*, 2009). EAE experiments carried out in genetically modified mice lacking NMDA receptors specifically in oligodendrocytes may help clarifying this issue.

Glutamate levels are increased in the human brain (Srinivasan *et al.*, 2005) as a consequence of altered glutamate homeostasis (Vallejo-Illarramendi *et al.*, 2006) and thus, trigger excitotoxic destruction of oligodendrocytes and myelin as well as of axons (Domercq *et al.*, 2005). Glutamate dyshomeostasis results from primary and/or secondary inflammation as a consequence of the autoimmune attack to the CNS and/or resulting from ongoing cell damage within the brain and spinal cord. Thus, activated microglia release cytokines and free radicals that diminish glutamate uptake. This in turn elevates the extracellular levels of this transmitter, resulting in over-activation of Ca<sup>2+</sup>-permeable glutamate receptors, which leads to oligodendrocyte excitotoxicity (Domercq *et al.*, 2007). Moreover, activated microg-



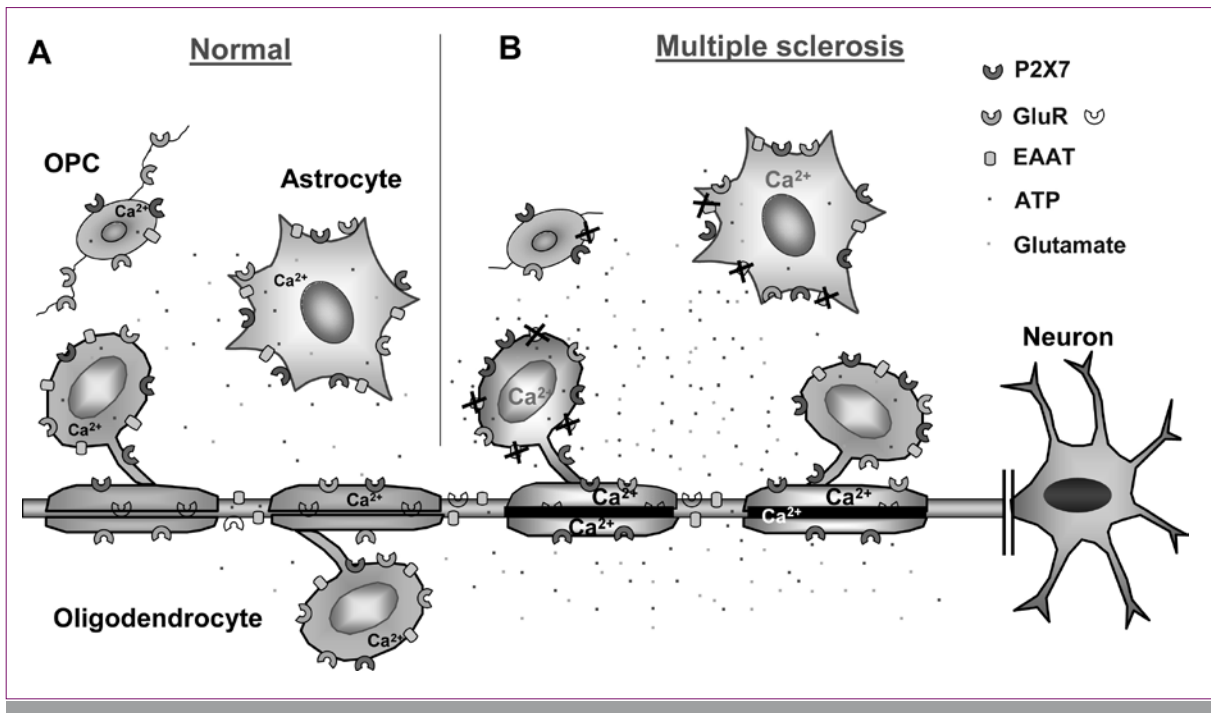
**Figure 1** The NMDA receptor antagonist MK-801 does not ameliorate chronic EAE-associated neurological symptoms. Chronic EAE was induced in C57/BL6 mice by immunization with myelin-oligodendrocyte glycoprotein, and MK-801 (0.5 mg/kg per day and body weight) was administered after 21 days (arrow) of immunization. The clinical score indicates level of motor symptoms as follows from 0-8: 0, no detectable changes in muscle tone and motor behavior; 1, flaccid tail; 2, paralyzed tail; 3, impairment or loss of muscle tone in hindlimbs; 4, hindlimb hemi-paralysis; 5, complete hindlimb paralysis; 6, complete hindlimb paralysis and loss of muscle tone in forelimbs; 7, tetraplegia and 8, moribund.

lia increase their expression of the glutamate-cystine exchanger which contributes further to raising the levels of glutamate and its toxicity (Domercq *et al.*, 2007). Other mechanisms accounting for glutamate dyshomeostasis include genetic variability in the promoter of the major glutamate transporter, EAAT2, which results in lower transporter expression (Pampliega *et al.*, 2008). Finally, an additional component of the genetic background linking MS and deregulation of glutamate signalling and  $Ca^{2+}$ -dyshomeostasis may lie in a polymorphism in the  $Ca^{2+}$ -permeable AMPA receptor subunit GluR3, an abundantly expressed subunit in oligodendrocytes, which is associated with a subgroup of patients responding to interferon beta therapy in MS (Comabella *et al.*, 2009).

Glutamate at non-toxic concentrations (within the micromolar range) can also contribute to demyelinating pathology by inducing  $Ca^{2+}$ -dyshomeostasis and oligodendrocyte death via sensitization of these cells to complement attack (Alberdi *et al.*, 2006). In-

triguingly, complement toxicity is induced by activation of kainate, but not of AMPA, NMDA or metabotropic glutamate receptors. Oligodendrocyte death by complement requires the formation of the membrane attack complex, which in turn increased membrane conductance, induced  $Ca^{2+}$  overload and mitochondrial depolarization as well as a rise in the level of reactive oxygen species (Alberdi *et al.*, 2006). Sensitization to complement attack may initiate MS lesions and thus be a pathophysiological feature of this disease or any of its neuropathological subtypes.

In addition to glutamate, ATP signalling can trigger oligodendrocyte excitotoxicity via activation of  $Ca^{2+}$  permeable P2X7 purinergic receptors expressed by these cells (Matute *et al.*, 2007). Thus, sustained activation of P2X7 receptors in vivo causes lesions which are reminiscent of the major features of MS lesions, i.e. demyelination, oligodendrocyte death and axon damage. In addition, treatment of acute and chronic EAE with P2X7 antagonists reduces demy-



**Figure 2** Glutamate- and ATP-mediated  $\text{Ca}^{2+}$  dyshomeostasis in multiple sclerosis. (A) Astrocytes and oligodendrocytes and their myelin sheaths express highly  $\text{Ca}^{2+}$  permeable glutamate and P2X7 receptors which are critical to  $\text{Ca}^{2+}$  homeostasis in white matter. In addition, axons express glutamate receptors which permeate  $\text{Ca}^{2+}$  and mobilize  $\text{Ca}^{2+}$  from the intracellular stores. Under normal conditions, glutamate is taken up by glutamate transporters which prevent overactivation of glutamate receptors in oligodendrocyte progenitors (OPC), oligodendrocytes, myelin and axons, and the ensuing cell damage by excitotoxicity. (B) In multiple sclerosis, increased extracellular levels of glutamate as a result of oxidative stress, which impairs glutamate uptake (illustrated with an X on the glutamate transporter), can lead to excitotoxic injury to oligodendrocytes, myelin (illustrated in pink) and axons (represented in black), and the release of ATP from destroyed cells. This in turn activates P2X7 receptors on glial cells, including oligodendrocytes which may die by ATP excitotoxicity and thus amplify tissue destruction. Compounding the problem further, enhanced signaling by both glutamate and ATP, particularly in oligodendrocytes, alters  $\text{Ca}^{2+}$  homeostasis and may initiate and/or contribute to secondary white matter damage. EAAT, glutamate transporter; GluR, glutamate receptor; OPC, oligodendrocyte progenitor cell. Elevated levels of cytosolic  $\text{Ca}^{2+}$  are depicted in red. See text for further details.

lination and ameliorates the associated clinical symptoms. Importantly, P2X7 expression is elevated in oligodendrocytes of normal-appearing axon tracts in MS patients, suggesting that signalling through this receptor is enhanced in this disease (Matute *et al.*, 2007). The increased expression of P2X7 receptors in axon tracts before lesions are formed indicates that this feature may constitute a risk factor associated with newly forming lesions in MS; this receptor subunit may thus prove to be a diagnostic and/or prognostic clinical biomarker for MS-type leukoencephalopathy. Finally, blockade of ATP P2X7 receptors protects oligodendrocyte from dying; this property

has enormous therapeutic potential for halting the progression of tissue damage in MS.

## Conclusions

$\text{Ca}^{2+}$  dyshomeostasis in astrocytes, oligodendrocytes and axons leads to white matter demise in multiple sclerosis, and contributes to the severity of symptoms. Glutamate and ATP signalling in white matter are critical to  $\text{Ca}^{2+}$  homeostasis in health and pathology (Figure 2), and drugs attenuating their excitotoxic potential offer great therapeutic promise.

## Acknowledgments

Studies carried out in our laboratory were supported by the Gobierno Vasco, Universidad del País Vasco and Ministerio de Educación y Ciencia and by CIBERNED.

## REFERENCES

- 1.- Ziskin JL, Nishiyama A, Rubio M, Fukaya M, Bergles DE, Vesicular release of glutamate from unmyelinated axons in white matter. *Nat Neurosci* 2007; 10: 321-330.
- 2.- Kuckley M, Capetillo-Zarate E, Dietrich D, Vesicular glutamate release from axons in white matter. *Nat Neurosci* 2007; 10: 311-320.
- 3.- Stys PK. General mechanisms of axonal damage and its prevention. *J Neurol Sci* 2005; 233: 3-13.
- 4.- Matute C, Domercq M, Sánchez-Gómez MV. Glutamate-mediated glial injury: mechanisms and clinical importance. *Glia* 2006; 53: 212-224.
- 5.- Matute C, Alberdi E, Domercq M, *et al.* Excitotoxic damage to white matter. *J Anat* 2007; 210: 693-702.
- 6.- Butt AM. Neurotransmitter-mediated calcium signaling in oligodendrocyte physiology and pathology. *Glia* 2006; 54: 666-675.
- 7.- Constantinou S, Fern R. Conduction block and glial injury induced in developing central white matter by glycine, GABA, noradrenalin, or nicotine, studied in isolated neonatal rat optic nerve. *Glia* 2009; 57: 1168-1177.
- 8.- Matute C. Calcium dyshomeostasis in white matter pathology. *Cell Calcium* 2010; 47 (2): 150-157.
- 9.- Poliak S, Peles E. The local differentiation of myelinated axons at nodes of Ranvier. *Nat Rev Neurosci* 2003; 4: 968-980.
- 10.- Jessen KR, Richardson WD. (Eds.), In: *Glial cell development: basic principles and clinical relevance* (2nd ed.), Oxford, Oxford University Press 2001.
- 11.- Raivich G, Banati R. Brain microglia and blood-derived macrophages: molecular profiles and functional roles in multiple sclerosis and animal models of autoimmune demyelinating disease. *Brain Res Rev* 2004; 46: 261-281.
- 12.- Verkhratsky A, Orkand RK, Kettenmann H. Glial Calcium: Homeostasis and Signaling Function. *Physiol Rev* 1998; 78: 99-141.
- 13.- Alberdi E, Sanchez-Gomez MV, Matute C. Calcium and glial cell death. *Cell Calcium* 2005; 38: 417-425.
- 14.- Verkhratsky A, Steinhäuser C. Ion channels in glial cells. *Brain Res Rev* 32: 2000; 380-412.
- 15.- Matute C. Oligodendrocyte NMDA receptors: a novel therapeutic target. *Trends Mol Med* 2006; 12: 289-292.
- 16.- Verkhratsky A, Kirchhoff F. NMDA Receptors in glia. *Neuroscientist* 2007; 13: 28-37.
- 17.- Bakiri Y, Burzomato V, Frugier G, Hamilton NB, Káradóttir R, Attwell D. Glutamatergic signaling in the brain's white matter. *Neuroscience* 2009; 158: 266-274.
- 18.- Káradóttir R, Cavalier P, Bergersen LH, Attwell D. NMDA receptors are expressed in oligodendrocytes and activated in ischaemia. *Nature* 2005; 438: 1162-1166.
- 19.- Salter MG, Fern R. NMDA receptors are expressed in developing oligodendrocyte processes and mediate injury. *Nature* 2005; 438: 1167-1171.
- 20.- Micu I, Jiang Q, Coderre E, Ridsdale A, Zhang L, Woulfe J, Yin X, Trapp BD, McRory JE, Rehak R, Zamponi GW, Wang W, Stys PK. NMDA receptors mediate calcium accumulation in myelin during chemical ischaemia. *Nature* 2006; 439: 988-992.
- 21.- Deng W, Wang H, Rosenberg PA, Volpe JJ, Jensen FE. Role of metabotropic glutamate receptors in oligodendrocyte excitotoxicity and oxidative stress. *Proc Natl Acad Sci USA* 2004; 101: 7751-7756.
- 22.- Sánchez-Gómez MV, Alberdi E, Ibarretxe G, Torre I, Matute C. Caspase-dependent and caspase-independent oligodendrocyte death mediated by AMPA and kainate receptors. *J Neurosci* 2003; 23: 9519-9528.
- 23.- Verkhratsky A, Krishtal OA, Burnstock G. Purinoceptors on neuroglia. *Mol Neurobiol* 2009; 39: 190-208.
- 24.- James G, Butt AM. P2Y and P2X purinoceptor mediated Ca<sup>2+</sup> signalling in glial cell pathology in the central nervous system. *Eur J Pharmacol* 2002; 447: 247-260.
- 25.- Matute C, Torre I, Perez-Cerdá F, Pérez-Samartin A, Alberdi E, Etxebarria E, Arranz AM, Ravid R, Rodriguez-Antiguedad A, Sánchez-Gómez MV, Domercq M. P2X(7) receptor blockade prevents ATP excitotoxicity in oligodendrocytes and ameliorates experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Neurosci* 2007; 27: 9525-9533.
- 26.- Kirischuk S, Scherer J, Kettenmann H, Verkhratsky A. Activation of P2-purinoreceptors triggered Ca<sup>2+</sup> release from InsP3-sensitive internal stores in mammalian oligodendrocytes. *J Physiol* 1995; 483: 41-57.
- 27.- Fields RD, Burnstock G Purinergic signalling in neuron-glia interactions. *Nat Rev Neurosci* 2006; 7: 423-436.
- 28.- Färber K, Kettenmann H. Purinergic signaling and microglia. *Pflugers Arch* 452: 2006; 615-621.
- 29.- Monif M, Reid CA, Powell KL, Smart ML, Williams DA. The P2X7 receptor drives microglial activation and proliferation: a trophic role for P2X7R Pore. *J Neurosci* 2009; 29: 3781-3791.

- 30.- Nimmerjahn A, Kirchhoff F, Helmchen F. Resting microglial cells are highly dynamic surveillants of brain parenchyma in vivo. *Science* 2005; 308: 1314-1318.
- 31.- Davalos D, Grutzendler J, Yang G, Kim JV, Zuo Y, Jung S, *et al.* ATP mediates rapid microglial response to local brain injury in vivo. *Nat Neurosci* 2005; 8: 752-758.
- 32.- Haynes SE, Hollopeter G, Yang G, Kurpius D, Dailey ME, Gan WB, Julius D. The P2Y12 receptor regulates microglial activation by extracellular nucleotides. *Nat Neurosci* 2006; 9: 1463-1464.
- 33.- Volterra A, Meldolesi J. Astrocytes, from brain glue to communication elements: the revolution continues. *Nat Rev Neurosci* 2005; 6: 626-640.
- 34.- Ouardouz M, Malek S, Coderre E, Stys PK. Complex interplay between glutamate receptors and intracellular Ca<sup>2+</sup> stores during ischaemia in rat spinal cord white matter. *J Physiol* 2006; 577: 191-204.
- 35.- Matute C. Characteristics of acute and chronic kainate excitotoxic damage to the optic nerve. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998; 95: 10229-10234.
- 36.- Fowler JH, McCracken E, Dewar D, McCulloch J. Intracerebral injection of AMPA causes axonal damage in vivo. *Brain Res* 2003; 991: 104-112.
- 37.- Tekkök SB, Goldberg MP. AMPA/kainate receptor activation mediates hypoxic oligodendrocyte death and axonal injury in cerebral white matter. *J Neurosci* 21: 2001; 4237-4248.
- 38.- Pitt D., Werner P, Raine CS. Glutamate excitotoxicity in a model of multiple sclerosis. *Nat Med* 2000; 6: 67-70.
- 39.- Ouardouz M, Coderre E, Basak A, Chen A, Zamponi GW, Hameed S, Rehak R, Yin X, Trapp BD, Stys PK. Glutamate receptors on myelinated spinal cord axons: I. GluR6 kainate receptors. *Ann Neurol* 2009; 65: 151-159.
- 40.- Ouardouz M, Coderre E, Zamponi GW, Hameed S, Yin X, Trapp BD, Stys PK. Glutamate receptors on myelinated spinal cord axons: II. AMPA and GluR5 receptors. *Ann Neurol* 2009; 65: 160-166.
- 41.- Goldberg MP, Ransom BR. New light on white matter. *Stroke* 2003; 34: 330-332.
- 42.- Pantoni L, Garcia JH, Gutierrez JA. Cerebral white matter is highly vulnerable to ischemia. *Stroke* 1996; 27: 1641-1646.
- 43.- Stys PK. White matter injury mechanisms. *Current Mol Med* 2004; 4: 113-130.
- 44.- Fern R, Möller MT. Rapid ischemic cell death in immature oligodendrocytes: a fatal glutamate release feedback loop. *J Neurosci* 2000; 20: 34-42.
- 45.- Baltan S, Besancon EF, Mbow B, Ye Z, Hammer MA, Ransom BR. White matter vulnerability to ischemic injury increases with age because of enhanced excitotoxicity. *J Neurosci* 2008; 28: 1479-1489.
- 46.- Baltan S. Ischemic injury to white matter: An age-dependent process. *Neuroscientist* 2009; 15: 126-133.
- 47.- Volpe JJ. Brain injury in premature infants: a complex amalgam of destructive and developmental disturbances. *Lancet Neurol* 2009; 8: 110-124.
- 48.- Back SA, Rivkees SA. Emerging concepts in periventricular white matter injury. *Semin Perinatol* 2004; 28: 405-414.
- 49.- Talos DM, Follett PL, Folkerth RD, Fishman RE, Trachtenberg FL, Volpe JJ, Jensen FE. Developmental regulation of alpha-amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazole-propionic acid receptor subunit expression in forebrain and relationship to regional susceptibility to hypoxic/ischemic injury. II. Human cerebral white matter and cortex. *J Comp Neurol* 2006; 497: 61-77.
- 50.- Follett PL, Deng W, Dai W, Talos DM, Massillon LJ, Rosenberg PA, Volpe JJ, Jensen FE. Glutamate receptor-mediated oligodendrocyte toxicity in periventricular leukomalacia: a protective role for topiramate. *J Neurosci* 2004; 24: 4412-4420.
- 51.- Manning SM, Talos DM, Zhou C, Selip DB, Park HK, Park CJ, Volpe JJ, Jensen FE. NMDA receptor blockade with memantine attenuates white matter injury in a rat model of periventricular leukomalacia. *J Neurosci* 28: 2008; 6670-6678.
- 52.- Wang L-Y, Cai W-Q, Chen P-H, Deng Q-Y, Zhao C-M. Downregulation of P2X7 receptor expression in rat oligodendrocyte precursor cells after hypoxia ischemia. *Glia* 2009; 57: 307-319.
- 53.- Haynes RL, Billiards SS, Borenstein NS, Volpe JJ, Kinney HC. Diffuse axonal injury in periventricular leukomalacia as determined by apoptotic marker fractin. *Ped Res* 2008; 63: 656-661.
- 54.- Alix JJ, Fern R. Glutamate receptor-mediated ischemic injury of premyelinated central axons. *Ann Neurol* 2009 (in the press).
- 55.- Prineas JW, McDonald WI, Franklin RJM. Demyelinating diseases. In: Graham DI, Lantos PL, eds. *Greenfield's Neuropathology*, London, Arnold, 2002: vol 2. pp. 471-550.
- 56.- Marta CB, Montano MB, Taylor CM, Taylor AL, Bansal R, Pfeiffer SE. Signaling cascades activated upon antibody cross-linking of myelin oligodendrocyte glycoprotein: potential implications for multiple sclerosis. *J Biol Chem* 2005; 280: 8985-8993.
- 57.- Hooper C, Taylor DL, Pocock JM. Pure albumin is a potent trigger of calcium signalling and proliferation in microglia but not macrophages or astrocytes. *J Neurochem* 2005; 92: 1363-1376.
- 58.- Zamvil SS, Steinman L. Diverse targets for intervention during inflammatory and neurodegenerative phases of multiple sclerosis. *Neuron* 2003; 38: 685-688.

- 59.- Matute C, Alberdi E, Domercq M, Pérez-Cerdá F, Pérez-Samartín A, Sánchez-Gómez MV. The link between excitotoxic oligodendroglial death and demyelinating diseases. *Trends Neurosci* 2001; 24: 224-230.
- 60.- Srinivasan R, Sailasuta N, Hurd R, Nelson S, Pelletier D. Evidence of elevated glutamate in multiple sclerosis using magnetic resonance spectroscopy at 3 T. *Brain* 2005; 128: 1016-1025.
- 61.- Vallejo-Illarramendi A, Domercq M, Pérez-Cerdá F, Ravid R, Matute C. Increased expression and function of glutamate transporters in multiple sclerosis. *Neurobiol Dis* 2006; 21: 154-164.
- 62.- Smith T, Groom A, Zhu B, Turski L. Autoimmune encephalomyelitis ameliorated by AMPA antagonists. *Nat Med* 2000; 6: 62-66.
- 63.- Kanwar JR, Kanwar RK, Krissansen GW. Simultaneous neuroprotection and blockade of inflammation reverses autoimmune encephalomyelitis. *Brain* 2004; 127: 1313-1331.
- 64.- Domercq M, Etxebarria E, Pérez-Samartín A, Matute C. Excitotoxic oligodendrocyte death and axonal damage induced by glutamate transporter inhibition. *Glia* 2005; 52: 36-46.
- 65.- Domercq M, Sánchez-Gómez MV, Sherwin C, Etxebarria E, Fern R, Matute C. System xc- and glutamate transporter inhibition mediates microglial toxicity to oligodendrocytes. *J Immunol* 2007; 178: 6549-6556.
- 66.- Pampliega O, Domercq M, Villoslada P, Sepulcre J, Rodríguez-Antiguedad A, Matute C. Association of an EAAT2 polymorphism with higher glutamate concentration in relapsing multiple sclerosis. *J Neuroimmunol* 2008; 195: 194-198.
- 67.- Comabella M, Craig DW, Morcillo-Suárez C, Río J, Navarro A, Fernández M, Martín R, Montalban X. Genome-wide scan of 500,000 single-nucleotide polymorphisms among responders and non-responders to interferon beta therapy in multiple sclerosis. *Arch Neurol* 2009; 66: 972-978.
- 68.- Alberdi E, Sánchez-Gómez MV, Torre I, Domercq M, Pérez-Samartín A, Pérez-Cerdá F, Matute C. Activation of kainate receptors sensitizes oligodendrocytes to complement attack. *J Neurosci* 2006; 26: 3220-3228.

# Biobancos: una herramienta necesaria para el futuro de la investigación biomédica

M<sup>a</sup> ISABEL GARCÍA SÁNCHEZ, MIGUEL ÁNGEL GAMERO GARCÍA, GUILLERMO IZQUIERDO AYUSO

*Unidad de Gestión Clínica Intercentros de Neurociencias. Unidad de Esclerosis Múltiple.*

*Hospital Universitario Virgen Macarena.*

*Sevilla.*

**RESUMEN.** La creciente necesidad social de regular la donación, los procedimientos de trabajo, de almacenamiento y de cesión de muestras de origen humano para la investigación, han permitido el desarrollo de nuevas herramientas de ayuda como son los biobancos. La principal función de estos instrumentos de trabajo es la custodia de las muestras en condiciones de calidad óptima así como el desarrollo y la vigilancia en el cumplimiento de la legislación actual en materia de Investigación Biomédica en España.

**Palabras clave:** muestra biológica, biobanco, Ley de Investigación Biomédica, líquido cefalorraquídeo, esclerosis múltiple.

**SUMMARY.** There is a growing social need to legislate donation, work procedures, storage and transfer of human samples for research. These concepts have allowed the development of new support tools such as biobanks. The main function of these tools is to preserve samples under an optimum quality and the development and monitoring according to current legislation on biomedical research in Spain.

**Key words:** biological sample, biobank, Biomedical Research Act, cerebrospinal fluid, multiple sclerosis.

La gran expansión de la investigación biomédica en la última década, se ha traducido en un uso creciente de muestras biológicas de origen humano. Ello implica garantizar a los investigadores, que van a disponer de material suficiente, en un tiempo adecuado y con una alta calidad, que les permita obtener unos resultados reproducibles y extrapolables.

Los hospitales son la principal vía de obtención de muestras biológicas para un investigador. La palabra hospital viene del latín *hospes*, “huésped” o “visita”. De *hospes* se derivó *hospitalia*, “casa para visitas foráneas”. Posteriormente *hospitalia* se transformó en hospital para designar el lugar de auxilio a los ancianos y enfermos. Actualmente un hospital, según el diccionario de la Real Academia Española de la Lengua, es un “establecimiento destinado al diagnóstico y tratamiento de enfermos, donde se practican también la investigación y la enseñanza”. Es decir el concepto de hospital está ligado principalmente a su función asistencial, aunque la docencia y la búsqueda del conocimiento científico también tienen cabida.

En la práctica, hoy en día son muchos los clínicos que dedican parte de su tiempo a la investigación, y los hospitales son considerados centros asistenciales pero con un importante componente investigador y sobre todo traslacional. Desde los hospitales se desarrollan proyectos propios y se fomenta la relación con centros especializados de investigación para realizar proyectos que un clínico no puede llevar a cabo solo, por falta de tiempo, medios o conocimientos.

Los clínicos son una pieza clave en el futuro de la investigación biomédica. La obtención de una muestra y su óptima conservación son los pasos fun-

damentales para comenzar una investigación, pero el mayor potencial de este material de origen hospitalario es la conexión con los datos evolutivos del paciente. Por otra parte el médico puede comprobar en primera persona la veracidad de los resultados obtenidos.

Un importante problema con el que se han encontrado siempre los investigadores es la falta de disponibilidad de gran cantidad de material para desarrollar un proyecto de carácter biomédico. Esto se hace aún más patente en enfermedades de poca o baja prevalencia, en las que las poblaciones de sujetos que se atienden en un sólo centro es pequeña. La importancia actual sobre la veracidad de la información hace que el investigador necesite un número elevado de muestras y deba ser más exigente a la hora de ver cuál es la procedencia y la trazabilidad de las mismas.

En términos estadísticos, la potencia del estudio, entre otros parámetros, se relaciona directamente con el número de muestras utilizadas. Cuanto mayor sea el tamaño del efecto que se desea detectar (sea la búsqueda de un biomarcador o la influencia de un tratamiento), mayor será la probabilidad de obtener hallazgos significativos y, por lo tanto, mayor será el poder estadístico<sup>1,2</sup>. En los estudios en los que se parte de un alto tamaño muestral, la probabilidad y fiabilidad de que los resultados obtenidos se puedan extrapolar a la población total es muy alta. Desde el punto de vista del investigador este dato repercute directamente sobre el impacto bibliográfico de los artículos que de la investigación se deriven.

Otra dificultad con la que cuenta el investigador

es la falta de protocolos estandarizados establecidos para procesar y almacenar cada tipo de muestra. La existencia de estos protocolos asegura que el poder estadístico obtenido por el aumento en el número de muestras no dependa de factores previos al análisis. Además, permite al investigador la reproducibilidad del estudio con muestras distintas a las escogidas inicialmente.

Si desde el lugar donde se conservan las muestras se debe trabajar con la mayor calidad posible, la obligación del investigador, una vez que las recibe, debe ser mantenerlas en óptimas condiciones, sacando todo el provecho posible de las mismas utilizando los procedimientos técnicos adecuados. El investigador no debe olvidar en ningún momento que cada una de las muestras de origen humano que llegan a sus manos pertenece a la persona que ha querido regalar a la ciencia, de manera altruista, un pedacito de sí mismo.

Por su parte, todos los donantes de muestras esperan un beneficio. Un beneficio común que es conocer mejor la enfermedad que padecen y evitar, si se puede, que otros la padezcan en el futuro. Saben que de momento, la única forma de avanzar en este sentido es la investigación.

Puesto que la investigación actual está orientada hacia una relación entre donantes, clínicos e investigadores, se hace imprescindible articular un sistema de almacenamiento y custodia que certifique la calidad de las muestras y que permita una gestión de datos de acuerdo a las normas establecidas por la ley orgánica de protección de datos.

En este contexto aparece el concepto de banco de muestras biológicas.

### **□ Biobanco: herramienta de vanguardia en la investigación biomédica**

La acción de almacenar muestras de carácter biológico de procedencia humana con fines diagnósticos y de investigación, es bastante común desde hace mucho tiempo. A partir de estas colecciones, el investigador conseguía ser partícipe de estas muestras, mediante un contacto directo con el médico o grupo de médicos interesados en el proyecto propuesto por el investigador. Sin embargo, el concepto de biobanco es muy reciente y se aplica a muestras de distinta cualidad, cantidad y finalidad. En particular para los biobancos de muestras de procedencia humana se contempla la calidad, la certeza diagnóstica y la trazabilidad de la muestra, como marca diferencial de estas nuevas herramientas de trabajo para la asistencia sanitaria y para los investigadores biomédicos<sup>3, 4</sup>. En este artículo nos centraremos en este tipo de biobancos.

Según la ley de investigación biomédica (Ley 14/2007 de 3 de julio) (LIB), un biobanco es “un establecimiento público o privado, sin ánimo de lucro, que acoge una colección de muestras biológicas concebida con fines diagnósticos o de investigación biomédica y organizada como una unidad técnica con criterios de calidad, orden y destino”<sup>3</sup>.

Aunque a simple vista la definición pueda parecer sencilla, no es fácil llevar a cabo cada uno de los puntos encerrados en la misma para conseguir que las colecciones ya creadas o que se están generando tengan la categoría de biobanco. Detrás de cada una de las palabras que definen a un biobanco se encierran conceptos claves que diferencian una colección particular de esta novedosa herramienta que pretende ser el principal soporte de los investigadores en biomedicina.

Está por una parte el concepto de gratuidad. Es decir la donación y la utilización de las muestras biológicas en ningún caso deben llevar una compensación monetaria o comercial ni por parte del investigador, ni por parte de la persona donante que “renuncia en ese mismo momento a cualquier derecho de naturaleza económica o de otro tipo sobre los resultados que pudieran derivarse de manera directa o indirecta de las investigaciones que se lleven a cabo con dichas muestras biológicas”<sup>5</sup>.

Por otra parte, tal y como indica su definición, el biobanco no sólo conserva el excedente del material biológico requerido para llegar al diagnóstico del paciente, puede ser también el custodio de muestras extraídas específicamente para un proyecto determinado de investigación biomédica.

En cuanto a “una unidad técnica, con criterios de calidad, orden y destino”, es una frase que encierra la necesidad de unos procedimientos específicos para la conservación del material que garantizan su óptima custodia y que cuenta con un programa de gestión de muestras que permite una organización y localización exacta de las mismas. De esta manera se puede asegurar la trazabilidad de la muestra en cualquier momento.

Aunque parece que explícitamente no está contenido en la definición, el hecho de hablar de destino implica que las muestras no permanecen pasivas. En este término radica la diferencia principal entre un biobanco y una colección personal. Mientras que en el segundo caso la colección sería meramente un depósito de muestras de uso particular, un biobanco se plantea como una plataforma de apoyo a la investigación desde la cual se genera un vínculo entre las personas donantes, los clínicos y los investigadores. La intención fundamental del biobanco es la de garantizar el buen uso de las muestras y ofrecer los datos asociados a las mismas, siguiendo fielmente las nor-

mas contenidas en las leyes vigentes de protección de datos<sup>6-8</sup>.

El biobanco es, por lo tanto, un aval de la calidad de las muestras que posee, preocupándose de mejorar constantemente, intercambiando el material con los investigadores y renovando su contenido en función de la cantidad de muestras que reciba y del periodo de tiempo en que dichas muestras permanecerán en perfectas condiciones para su uso en investigación. De esta manera, el biobanco promueve lo que se denomina una investigación traslacional y permite un enfoque multidisciplinar.

Hay que destacar que si bien la Ley de Investigación Biomédica recoge de manera general todas las normas que desde el punto de vista legal debe de cumplir un biobanco, no están descritas cuestiones específicas para cada tipo de muestra que un biobanco puede llegar a albergar. De hecho se centra especialmente en aspectos referentes a la donación de embriones y fetos humanos y a las muestras de material genético, por el gran impacto social que suponen las revelaciones obtenidas de los proyectos de investigación que usan para su desarrollo el ADN humano. Existía un vacío legal en cuanto a uso y confidencialidad de este tipo de muestras que son estudiadas con técnicas tan novedosas, y aunque con ciertas lagunas aún, la Ley de Investigación Biomédica ha intentado salvar estos problemas, sobre todo los de carácter ético.

Parece obvio pensar que la labor para llegar a consensos en los procedimientos que se deben usar para las diversas muestras de carácter humano, debe ser llevada a cabo en conjunción por los clínicos y los investigadores. Se deben establecer protocolos normalizados de trabajo (PNT) que ofrezcan la información necesaria para realizar el procesamiento de una determinada muestra en condiciones óptimas y en cualquier sitio. Mientras más fiel sea nuestro protocolo al procedimiento de trabajo estandarizado, mayor calidad obtendremos. En esta apuesta conjunta, los clínicos deben aportar la visión más realista sobre cómo introducir estos manuales en la rutina hospitalaria y el investigador debe proponer las necesidades actuales creadas en el ámbito de la investigación biomédica.

En este aspecto, cabe destacar que hay biobancos de material específico muy avanzados en este sentido. Así son, por ejemplo, los bancos de tumores y los bancos de ADN. No sólo hay una gran diversidad de biobancos que almacenan este tipo de muestras, sino que constituyen redes con un nodo central coordinador del grupo de bancos que pertenecen a la red. Éste es el caso de La Red Nacional de Bancos de Tumores promovida y coordinada por el Programa de Patología Molecular del Centro Nacional de Investi-

gaciones Oncológicas (CNIO), la Red de Bancos de Tumores de Andalucía (RBTA) cuyo nodo de coordinación se encuentra en el hospital de San Cecilio (Granada)<sup>9</sup>, o el banco nacional de ADN (BNADN), promovido por genoma España cuyo nodo de coordinación está ubicado en el Centro de Investigación del cáncer de Salamanca con dependencia jurídica de la Universidad de la propia ciudad.

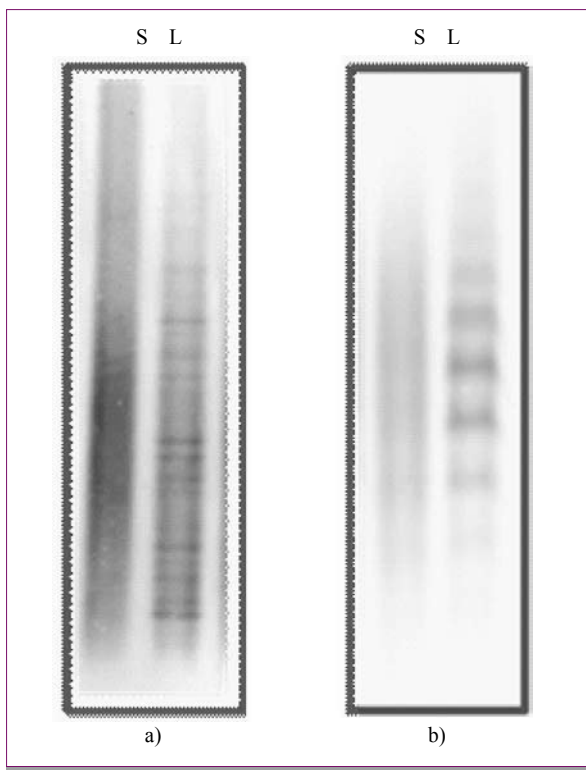
Son redes cooperativas y virtuales en las que se invita a participar a los hospitales y áreas asociadas que lo deseen, pero para formar parte deben demostrar que cumplen los estándares de calidad exigidos.

Existen diversas páginas en internet donde se puede hacer una idea del tipo de muestras que almacenan los biobancos en la actualidad; una de ellas es [www.bbmriportal.eu](http://www.bbmriportal.eu) (Biobanking and Biomolecular Resources Research Infrastructure). En ella podemos ver el panel de biobancos europeos que se han inscrito a esta red virtual, ofreciendo a través de la página las respectivas carteras de servicio para los investigadores. De los 268 biobancos inscritos en el registro, 15 de ellos son españoles. Con certeza, no todos los biobancos están incluidos en el registro, pero la muestra que es elevada nos da una idea del tipo de colecciones que más se conservan en ellos a nivel europeo.

Según esta página web, el panorama que se puede observar en España se puede extrapolar al resto de Europa pues es coincidente. De esta manera el mayor número de muestras almacenadas en los biobancos europeos son muestras de tejido tumoral, le siguen las muestras de ADN, las de suero, plasma, células aisladas de la sangre, sangre entera y en último lugar líneas celulares y fluidos.

En este punto cabe hacer una reflexión. Una muestra biológica, como es el líquido cefalorraquídeo (LCR), tanto por su composición como por su situación en el espacio extracelular dentro del sistema nervioso central (SNC), lo hace ser un preciado fluido para el estudio de ciertas enfermedades, con una enorme información.

En el caso particular de la esclerosis múltiple, el LCR constituye la fuente de información más cercana al sistema nervioso central y como tal la vía para la investigación que mejor refleja los cambios que se producen cuando una persona enferma. El LCR de estos pacientes, por una parte, tiene un poder altamente diagnóstico<sup>10, 11</sup>. Los datos obtenidos de la determinación de inmunoglobulinas, el conteo de células, su aspecto, las relaciones entre las proteínas que lo componen y la determinación de las bandas oligoclonales de IgG, son datos de laboratorio considerados de gran importancia hoy en día para llegar a un diagnóstico definitivo de esclerosis múltiple<sup>12, 13</sup> (Figura 1). Por otra parte, los resultados obtenidos en los últimos años sitúan al LCR como una muestra de



**Figura 1** a) Bandas oligoclonales de IgG: se muestra el patrón positivo obtenido tras la determinación de las bandas oligoclonales de IgG de un paciente con diagnóstico de esclerosis múltiple definida. b) Bandas oligoclonales de IgM: se muestra el patrón positivo que se obtiene en la determinación de las bandas oligoclonales totales de IgM. Tanto en a) como en b), las muestras cargadas son respectivamente el suero y el líquido cefalorraquídeo del paciente.

alto potencial en la búsqueda de biomarcadores de la enfermedad<sup>14-17</sup>.

En la última década el líquido cefalorraquídeo está siendo objeto de gran interés como herramienta diagnóstica y de investigación. El sorprendente desarrollo que ha sufrido la tecnología aplicada a la investigación en los últimos años hace que la capacidad para obtener información de una misma muestra sea enorme. Las nuevas técnicas han aumentado la sensibilidad de las pruebas y han minimizado la cantidad de muestra necesaria para una determinación. Esto permite, entre otras cosas, analizar un gran número de muestras con una inversión mínima de tiempo.

La metabolómica, la proteómica y la genómica son términos que designan a las distintas disciplinas de investigación más utilizadas hoy en día y a las que nos tenemos que acostumbrar pues son la realidad actual de la investigación biomédica en el mundo. El líquido cefalorraquídeo entra en el perfil de muestras con las que mediante las nuevas tecnologías se obtiene información antes impensable<sup>18, 19</sup>.

Desde este punto de vista, aparece como una muestra con un gran interés para ser conservada en los biobancos. Sin embargo según los datos que se pueden obtener de la página web antes mencionada, son muy pocos los biobancos que custodian LCR entre sus muestras. El procedimiento de carácter leve pero invasivo utilizado para su obtención, unido a la inexistencia de unos procedimientos claros para su almacenamiento, son dos puntos clave por los que hasta ahora ha sido sólo custodiada por algunos establecimientos.

En el año 2009 se llegó a un protocolo consenso para la estandarización, almacenamiento e intercambio de muestras de LCR. Este protocolo se obtuvo durante la reunión del grupo de trabajo Europeo de Biomarcadores en esclerosis múltiple (BioMS-eu, marzo de 2007 Londres). Se observaron grandes diferencias entre los protocolos expuestos por los participantes, y tras las discusiones pertinentes se llegó a un consenso que buscó el balance entre la racionalidad científica y la práctica clínica poniendo especial atención en los procedimientos previos al análisis de la muestra.

Toda la información queda recogida en un artículo publicado en la revista *Neurology* de diciembre de 2009<sup>20</sup>. Según los autores el 60% del total de errores que puede cometer un laboratorio a la hora de realizar un análisis está directamente relacionado con errores de gestión y almacenaje de las muestras. Sólo siguiendo todos los mismos procedimientos de tratamiento y custodia de las muestras se puede llegar a una estimación real del valor pronóstico de un marcador que sea candidato.

Otro de los recursos que permiten salvar este obstáculo es la integración en redes, ya que aumenta el rendimiento científico del Banco y permite la homogeneidad de procedimientos y criterios de actuación.

Los consensos establecidos para cada una de las distintas muestras que un biobanco puede albergar deben ser la base para evaluar, por las comisiones correspondientes, la autorización y la acreditación para el reconocimiento de un biobanco.

### □ Estructura organizativa del biobanco

Según la Ley de Investigación Biomédica, “el Biobanco deberá contar con un director científico, un responsable de fichero y estará adscrito a sendos comités externos, uno científico y otro de ética respectivamente, que asistirán al director del biobanco en sus funciones”.

El director tendrá, entre otras funciones, la de velar por el cumplimiento de la legislación vigente y garantizar la calidad, la seguridad y la trazabilidad de los datos y muestras biológicas almacenadas y de

los procedimientos asociados al funcionamiento del biobanco.

El responsable del fichero atenderá las solicitudes de ejercicio de los derechos de acceso, rectificación, cancelación u oposición formuladas por los sujetos fuente, de conformidad con lo dispuesto en la normativa vigente sobre protección de datos de carácter personal.

Los comités científico y ético actúan de manera transversal en el biobanco, ayudando al director en las decisiones que conciernen a la petición de muestras y datos por parte de los diferentes investigadores que presenten un proyecto de investigación.

A partir de este organigrama básico, la estructura del biobanco puede crecer en sentido horizontal, introduciendo niveles de coordinación intermedios para las distintas áreas de trabajo. Así, la figura de un coordinador técnico tendrá una función esencial de apoyo y resolución a los problemas de tipo técnico que se sucedan en el día a día. El banco puede contar con profesionales en gestión administrativa, así como responsables de área para las distintas muestras que se estén custodiando. La necesidad social que vaya surgiendo en torno al almacenamiento y control de cada tipo de muestra biológica será determinante del crecimiento y desarrollo del biobanco en este sentido.

Para llevar a cabo la creación de un biobanco es necesario que todas las personas que estén involucradas en la trazabilidad de la muestra trabajen de manera conjunta, pero es también absolutamente necesario el apoyo institucional. La continua mejora depende directamente de los recursos con que cuente el biobanco, tanto económicos como humanos. Para la creación del biobanco, el responsable debe solicitar una autorización explícita para el establecimiento del mismo, y la institución debe velar por la seguridad de las muestras y el cumplimiento de la normativa legal vigente respecto a las bases de datos asociadas al material biológico almacenado. El compromiso que la dirección del hospital o centro que sirve de acogida adquiera para la creación y mantenimiento del biobanco es el que permitirá un desarrollo con una mayor proyección de futuro del mismo.

### **□ Donación, consentimiento informado y confidencialidad**

Los bancos de muestras biológicas de origen humano deben disponer de una infraestructura adecuada que garantice la total eficacia en la compleja serie de procesos que se inicia con la firma del consentimiento informado por parte del donante y su incorporación a la base de datos del banco, y concluye con la cesión de material a los investigadores. Desde que la muestra pasa a ser parte integrante del banco, el sistema

debe optimizarse para reducir al máximo la pérdida de casos útiles y ofrecer una disponibilidad universal del material a la comunidad científica.

Para la inclusión de una muestra en el banco, el paciente debe ser informado de esta posibilidad, explicándole de manera clara la posibilidad de que pueda ser utilizada posteriormente en investigación. En este sentido la ley establece que la libre autonomía de la persona es el fundamento del que se derivan los derechos específicos a otorgar el consentimiento y a obtener la información previa. Asimismo, establece el derecho a no ser discriminado, el deber de confidencialidad, el principio de gratuidad de las donaciones, y fija los estándares de calidad y seguridad que incluyen la trazabilidad de las muestras de origen humano.

La regulación de todas estas materias en la Ley de Investigación Biomédica contempla lo “previsto en la Ley 41/2002, de 14 de noviembre, básica y reguladora de la autonomía del paciente y de derechos y obligaciones en materia de información y documentación clínica y la Ley Orgánica 15/1999, de 13 de diciembre, de Protección de Datos de Carácter Personal, a las que reconoce su condición supletoria en aquellas cuestiones no reguladas por la propia Ley de Investigación Biomédica”.

Una vez que el paciente firme el consentimiento informado quedará vinculado al banco a través de este documento firmado voluntariamente y que recoge sus datos personales y su firma.

Se dispondrá de consentimientos informados de carácter particular para cada una de las pruebas específicas que sean necesarias para el diagnóstico del paciente y comprometan en alguna medida su integridad física, así como para el uso de la muestra en cualquier proyecto de investigación que se vaya a realizar en el momento de la cesión o bien en el futuro.

Los programas de gestión de muestras asociados al biobanco registran los datos del sujeto y asignan un código establecido internacionalmente para la clasificación de la muestra, pero que permite su localización de manera inmediata. Los procedimientos utilizados en estas herramientas de trabajo deben cumplir la normativa actual conforme a la Ley 14/2007, de 3 de julio, que garanticen el derecho a la intimidad y el respeto a la voluntad del sujeto en materia de información, así como la confidencialidad de los datos de carácter personal.

### **□ Glosario de términos importantes para recordar**

El desarrollo de la Ley 14/2007, de 3 de julio, ha exigido la definición de ciertos términos que están asociados directamente al avance tecnológico y al con-

cepto que integra todas las facetas de la Investigación Biomédica en España.

Se presenta a continuación un pequeño glosario de términos difíciles de asociar en ocasiones con el concepto que encierran. Por este motivo es interesante recordar, y en otros casos conocer, algunas definiciones que el clínico no maneja con asiduidad. Es importante que en la relación entre médicos e investigadores se tenga presente el marco legal en el que se mueve la Investigación Biomédica, para acordar en igualdad de condiciones la forma en que se llevará a cabo la cesión de las muestras y el desarrollo del protocolo de investigación.

### **Términos extraídos de la Ley de Investigación Biomédica**

#### *Comité de Bioética de España*

El órgano competente para la consulta de todos aquellos aspectos con implicaciones éticas y sociales del ámbito de la Medicina y la Biología y está llamado a fijar las directrices y principios generales para la elaboración de códigos de buenas prácticas de investigación científica que desarrollen los Comités de Ética de la Investigación.

#### *Comités de Ética*

Órganos que deben garantizar en cada centro en que se investigue la adecuación de los aspectos metodológicos, éticos y jurídicos de las investigaciones que impliquen intervenciones en los seres humanos o la utilización de muestras biológicas de origen humano.

#### *Comités de Investigación Biomédica*

Instrumentos fundamentales de evaluación y seguimiento de los proyectos de investigación.

#### *Consejo genético*

Procedimiento destinado a informar a una persona sobre las posibles consecuencias para él o su descendencia de los resultados de un análisis o cribado genéticos y sus ventajas y riesgos y, en su caso, para asesorarla en relación con las posibles alternativas derivadas del análisis. Tiene lugar tanto antes como después de una prueba o cribados genéticos e incluso en ausencia de los mismos.

#### *Consentimiento*

Manifestación de la voluntad libre y consciente válidamente emitida por una persona capaz, o por su representante autorizado, precedida de la información adecuada.

#### *Dato anónimo*

Dato registrado sin un nexo con una persona identificada o identificable.

#### *Dato anonimizado o irreversiblemente disociado*

Dato que no puede asociarse a una persona identificada o identificable por haberse destruido el nexo con toda información que identifique al sujeto, o porque dicha asociación exige un esfuerzo no razonable, entendiéndose por tal el empleo de una cantidad de tiempo, gastos y trabajo desproporcionados.

#### *Dato codificado o reversiblemente disociado*

Dato no asociado a una persona identificada o identificable por haberse sustituido o desligado la información que identifica a esa persona utilizando un código que permita la operación inversa.

#### *Dato genético de carácter personal*

Información sobre las características hereditarias de una persona, identificada o identificable obtenida por análisis de ácidos nucleicos u otros análisis científicos.

#### *Estudio observacional*

Estudio realizado sobre individuos respecto de los cuales no se modifica el tratamiento o intervención a que pudieran estar sometidos ni se les prescribe cualquier otra pauta que pudiera afectar a su integridad personal.

#### *Muestra biológica*

Cualquier material biológico de origen humano susceptible de conservación y que pueda albergar información sobre la dotación genética característica de una persona.

#### *Procedimiento invasivo*

Toda intervención realizada con fines de investigación que implique un riesgo físico o psíquico para el sujeto afectado.

#### *Riesgo y carga mínimos*

Los impactos en la salud y las molestias que puedan sufrir los sujetos participantes en una investigación, y cuyos efectos sólo podrán ser de carácter leve y temporal.

#### *Sujeto fuente*

Individuo vivo, cualquiera que sea su estado de salud, o fallecido del que proviene la muestra biológica.

#### *Tratamiento de datos genéticos de carácter personal o de muestras biológicas*

Operaciones y procedimientos que permitan la obtención, conservación, utilización y cesión de datos genéticos de carácter personal o muestras biológicas.

## Trazabilidad

Capacidad de asociar un material biológico determinado con información registrada referida a cada paso en la cadena de su obtención, así como a lo largo de todo el proceso de investigación.

## Conclusión

Los biobancos funcionan como instrumentos de transición entre el donante, el clínico y el investigador. Su nivel de excelencia vendrá marcado por la estandarización de los protocolos que utiliza, el proceso de gestión

de muestras y datos que maneja, el rigor en la guarda y custodia de los consentimientos informados, la cualificación del personal que trabaja en cada área y la actividad de intercambio de sus muestras para la investigación.

En la relación entre clínicos e investigadores van a surgir muchas veces dudas éticas, conceptuales y de procedimiento. En ese momento por encima de todo hay que tener presente que el paciente merece el mayor respeto y protección. Sólo con su ayuda podremos adquirir los conocimientos necesarios para descubrir los mecanismos que llevan al desarrollo de una enfermedad.

## BIBLIOGRAFÍA

- 1.- Argimon Pallás JM, Jiménez Villa J. Métodos de investigación clínica y epidemiológica. 2ª ed. Madrid: Ediciones Harcourt; 2000.
- 2.- Pértega Díaz S, Pita Fernández S. Cálculo del tamaño muestral para la determinación de factores pronósticos. *Cad Aten Primaria* 2002; 9: 30-33.
- 3.- Ley 14/2007, de 3 de julio, de investigación biomédica (BOE núm,159), Título V, capítulo IV.
- 4.- Recommendation Rec (2006) 4 of the Committee of Ministers to member states on Research on biological materials of human origin, 15 de marzo de 2006. Consejo de Europa.
- 5.- Ley 14/2007, de 3 de julio, de investigación biomédica (BOE núm,159, de 4 de julio de 2007), Título I, artículo 7.
- 6.- Ley Orgánica 15/1999, de 13 de diciembre, de Protección de Datos de Carácter Personal (BOE núm.298, de 14 de diciembre de 1999).
- 7.- Real Decreto 994/1999, de 11 de junio por el que se aprueba el reglamento de medidas de seguridad de los ficheros automatizadas que contengan datos de carácter personal.
- 8.- Ley 41/2002, de 14 de noviembre, básica reguladora de autonomía del paciente y de derechos y obligaciones en materia de información y documentación clínica (BOE núm. 274, de 15 de noviembre de 2002).
- 9.- Proceso asistencial red de bancos de tumores de Andalucía. Consejería de salud, 2005 ([www.juntadeandalucia.es](http://www.juntadeandalucia.es)).
- 10.- McDonald WI, Compston A, Edan G, et al. Recommended diagnostic criteria for multiple sclerosis: guidelines from the International Panel on the Diagnosis of Multiple Sclerosis. *Ann Neurol* 2001; 50: 121-127.
- 11.- Polman CH, Reingold SC, Edan G, et al. Diagnostic criteria for multiple sclerosis: 2005 revisions to the "McDonald criteria." *Ann Neurol* 2005; 58: 840-846.
- 12.- Freedman MS, Thompson EJ, Deisenhammer F, et al. Recommended standard of cerebrospinal fluid analysis in the diagnosis of multiple sclerosis: a consensus statement. *Arch Neurol* 2005; 62: 865-870.
- 13.- Link H, Huang YM. Oligoclonal bands in multiple sclerosis cerebrospinal fluid: an update on methodology and clinical usefulness. *J Neuroimmunol* 2006 Nov; 180 (1-2): 17-28.
- 14.- Bielekova B, Martin R. Development of biomarkers in multiple sclerosis. *Brain* 2004;127: 1463-1478.
- 15.- Teunissen CE, Dijkstra CD, Polman CH. Biological markers in CSF and blood for axonal degeneration in multiple sclerosis. *Lancet Neurology* 2005; 4: 32-41.
- 16.- Tumani H, Teunissen C, Süßmuth S, Otto M, Ludolph AC, Brettschneider J. Cerebrospinal fluid biomarkers of neurodegeneration in chronic neurological diseases. *Expert Rev Mol Diagn* 2008 Jul; 8 (4): 479-494.
- 17.- Villar LM, Sádaba MC, Roldán E, Masjuan J, González-Porqué P, Villarrubia N, Espiño M, García-Trujillo JA, Bootello A, Álvarez-Cermeño JC. Intrathecal synthesis of oligoclonal IgM against myelin lipids predicts an aggressive disease course in MS. *J Clin Invest* 2005 Jan; 115 (1): 187-194.
- 18.- Quintana FJ, Fareza MF, Viglietta V, Iglesias AH, Merbl Y, Izquierdo G, Lucas M, Basso AS, Khourya SJ, Lucchinetti CF, Cohen IR, Weiner HL. Antigen microarrays identify unique serum autoantibody signatures in clinical and pathologic subtypes of multiple sclerosis. *Proc Natl Acad Sci USA* 2008 Dec 2; 105 (48): 18889-18894.
- 19.- Comabella M, Fernández M, Martín R, Rivera Vallvé S, Borrás E, Chiva C, Juliá E, Rovira A, Cantó

- E, Álvarez-Cermeño JC, Villar LM, Tintoré M, Montalbán X. Cerebrospinal fluid chitinase 3-like 1 levels are associated with conversion to multiple sclerosis. *Brain* 2010 Apr; 133 (Pt4): 1082-1093.
- 20.- Teunissen CE, Petzold A, Bennet JL, Berven FS, Brundin L, Comabella M, Franciotta D, Frederiksen JL, Fleming JO, Furlan R, Hintzen RQ, Hughes SG, Johnson MH, Krasulova E, Kuhle J, Magnona MC, Rajda C, Rejdak K, Schmidt HK, van Pesch V, Waubant E, Wolf C, Giovannoni G, Hemmer B, Tumani H, Deisenhammer F. A consensus protocol for the standardization of cerebrospinal fluid collection and biobanking. *Neurology* 2009 Dec 1 73; 1914-1922.

# Is “Benign Multiple Sclerosis” really benign?

D. J. RIGOTTI PhD, O. GONEN PhD

*Department of Radiology.*

*New York University School of Medicine.*

*New York (USA).*

*Supported by NIH Grants EB01015 and NS050520*

**SUMMARY.** Multiple Sclerosis (MS) is the most common demyelinating disease of the central nervous system. Its nonlethal, heterogeneous nature, early onset and lack of cure contribute to an uncertain prognosis and difficult clinical assessment. Approximately 20% of relapsing remitting (RR) MS patients will undergo a benign course, characterized by full functionality after 15 or more years of disease duration. While disease modifying treatments now exist; high cost limits their availability in some countries, prompting neurologists to not administer them to the patients with clinically mild course. Though MR metrics have proven effective in the diagnosis of MS and the monitoring of its evolution, they have produced conflicts and paradoxes that inhibited accurate clinical classification and prognosis. One hypothesis is that the benign course may indicate less overall neuronal damage than other subtypes. This can be specifically addressed with MR proton spectroscopy (<sup>1</sup>H-MRS)-provided biochemical information of several brain metabolites, especially the N-acetylaspartate (NAA) whose global concentration (WBNAA) is considered a specific marker for overall neuronal integrity. This paper will describe the use of WBNAA to study benign MS and the conclusions that the subtype is likely a fortuitous combination of eloquent brain sparing and effective compensatory mechanisms. Since these may not prevent an eventual precipitous clinical decline, benign patients may, therefore, benefit from the same treatment options offered other RR MS patients with more active disease.

**Key words:** brain, N-acetylaspartate (NAA), multiple sclerosis (MS), MR spectroscopy (MRS), whole brain NAA (WBNAA).

**RESUMEN.** La esclerosis múltiple (EM) es la enfermedad desmielinizante más común del sistema nervioso central (SNC). El no ser letal, el ser de naturaleza heterogénea, de comienzo temprano y la inexistencia de tratamiento curativo contribuyen a un pronóstico incierto y a una difícil evaluación clínica. Aproximadamente el 20% de los pacientes con curso remitente-recurrente (EMRR) tiene un curso benigno, caracterizado por una situación funcional normal al cabo de 15 años o más tras el comienzo de la enfermedad. En la actualidad existen tratamientos modificadores de la enfermedad, pero su alto coste limita su disponibilidad en muchos países, lo que impide su utilización por los neurólogos en casos con un curso leve. Aunque las medidas de RM han demostrado su utilidad en el diagnóstico y la monitorización de la evolución de la EM, se han producido paradojas que impiden una clasificación clínica adecuada y el establecimiento del pronóstico con certeza. Hay una hipótesis que sostiene que el curso benigno se asocia con una menor pérdida neuronal que en las otras formas clínicas. Este aspecto puede investigarse de forma directa mediante la espectroscopía de protón por RM (<sup>1</sup>H-ERM), que facilita información bioquímica de varios metabolitos cerebrales, especialmente del N-acetilaspártato (NAA,) cuya concentración global es considerada un marcador específico para la integridad neuronal total. Este trabajo describe el uso de la determinación del NAACT para estudiar la EM benigna y las conclusiones de que el subtipo de enfermedad es probable sean una combinación fortuita de la no afectación de áreas cerebrales elocuentes y la presencia de mecanismos compensatorios efectivos. Puesto que estas condiciones pueden no prevenir un curso clínico eventualmente catastrófico, los pacientes considerados benignos, por lo tanto, pueden beneficiarse de las mismas opciones terapéuticas ofrecidas a otros pacientes con EMRR con una enfermedad más activa.

**Palabras clave:** cerebro, N-acetilaspártato (NAA), esclerosis múltiple (EM), Espectroscopía por Resonancia Magnética (ERM), NAA cerebral total (NAACT).

**M**ultiple sclerosis (MS), the most common demyelinating disease of the central nervous system (CNS), affects over 2 million worldwide and is the leading cause of non-traumatic neurological disability in young and middle-aged adults<sup>1</sup>. Roughly 85% of MS patients, two thirds of whom are young women [average age of onset in the US is 27 years<sup>2</sup>], enter the relapsing-remitting (RR) stage at diagnosis. This is characterized by acute episodes lasting days to weeks followed by partial or complete remission for months to years<sup>3</sup>. The cycles continue and most patients enter the secondary-progressive (SP) stage, where disability accumulates from incomplete remissions. Approximately 20% of patients, however, exhibit a clinically benign course, defined retrospectively, as

full functionality, reflected by an Expanded Disability Status Scale [EDSS<sup>4</sup>] score of 3.0 or less after 15 or more years of disease duration<sup>5,6</sup>.

Since MS has an insignificant impact on life expectancy<sup>7</sup>, it results in many decades of progressively deteriorating quality of life<sup>8,9</sup>. Though incurable, six drugs are currently FDA-approved for MS in the US as disease-modifying agents that can alter its natural history: The intramuscular β-interferon-1a (Avonex), subcutaneous β-interferon-1a (Rebif), subcutaneous β-interferon-1b (Betaseron), glatiramer acetate (Copaxone), and the immunosuppressant Natalizumab (Tysabri), a laboratory-produced monoclonal antibody given by IV infusion. For SP MS the most convincing data favors mitoxantrone (Novantrone)

as most likely to retard progression and delay disability<sup>10-12</sup>. Unfortunately, these are expensive, on average nearly \$50,000/year per patient in the US<sup>13</sup>; and nearly €25,000 in Spain<sup>14</sup>, exclusive of the cost of ancillary care and productivity loss. If cost limits treatment availability, it is expedient that the patients with the mildest course will be the least likely to be treated. Unfortunately, clinical metrics are unreliable and sometimes even deceptive markers for the full burden of disease.

Previous attempts to predict who will have a benign course had only moderate success<sup>6, 15, 16</sup>. Using imaging metrics for this purpose has so far yielded paradoxes such as higher lesion loads and magnetization transfer ratios in benign than in more disabled MS patients<sup>17, 18</sup>, conflicting brain atrophy rates<sup>19-21</sup> and global atrophy similar to SP MS patients of similar disease duration<sup>22, 23</sup>. Various explanations as to why laboratory (in particular, quantitative MR) metrics have fallen short have been reviewed by Rovaris *et al.*<sup>24</sup>. While they provide interesting insights into the nature of the pathological underpinnings of the benign course, they could not identify a reliable diagnostic method that will establish this prognosis<sup>6, 15, 16</sup>.

Most MR studies of benign MS have used conventional imaging that is insensitive to diffuse neurodegeneration. A marker sensitive to axonal damage followed by neuronal cell death, the probable cause of permanent neurological deficits in MS<sup>25-28</sup>, would presumably be useful for determining subclinical damage to normal appearing brain and lesions. This can be assessed directly by proton MR spectroscopy (<sup>1</sup>H-MRS) quantification of the neuron-exclusive metabolite N-acetylaspartate (NAA)<sup>29, 30</sup>. Its two key attributes are that its <sup>1</sup>H-MRS signal at 2.02 ppm is the most prominent *in vivo*; and with the exception of Canavan disease<sup>31</sup>, its concentration is reported to decline in all CNS disorders<sup>32, 33</sup>. Regional declines of NAA in other forms of MS have correlated better with clinical disability than other imaging metrics<sup>34-38</sup>.

Surprisingly, only four papers describing <sup>1</sup>H-MRS studies of the benign phenotype of MS are published<sup>17, 23, 39, 40</sup>. All are cross-sectional and employ single-voxel <sup>1</sup>H-MRS to probe selective small regions of the benign MS brain. Among them they have yielded inconclusive results: The two focusing on chronic lesions showed higher NAA levels than in SP MS patients<sup>39, 40</sup>, whereas the other two report no differences between normal-appearing brain tissue or lesions among benign, SP or RR MS patients<sup>17, 23</sup>.

The results reported in the previous spectroscopy studies may be attributed to the same problems of most of the numerous <sup>1</sup>H-MRS studies to date in other forms of MS. Specifically, that they have used either small (few ml) single-voxels, or larger two-

or three-dimensional volumes-of-interest (VOI)<sup>41-43</sup>. These must be placed away from the skull to avoid the lipid contamination shown in Figure 1a, excluding most of the cortex<sup>44</sup>. These VOIs, therefore, must also be MRI-guided to pathologies. Since MS is diffuse throughout the brain, such small VOIs may lead to confounding extrapolation errors<sup>45</sup>. Localized MRS also suffers (i) VOI repositioning errors in serial studies; (ii) long, ~7 min, acquisition for ample signal-to-noise-ratio (SNR); and (iii) the T<sub>1</sub> and T<sub>2</sub> relaxation times in patients and controls are needed for absolute metabolic quantification<sup>46</sup>.

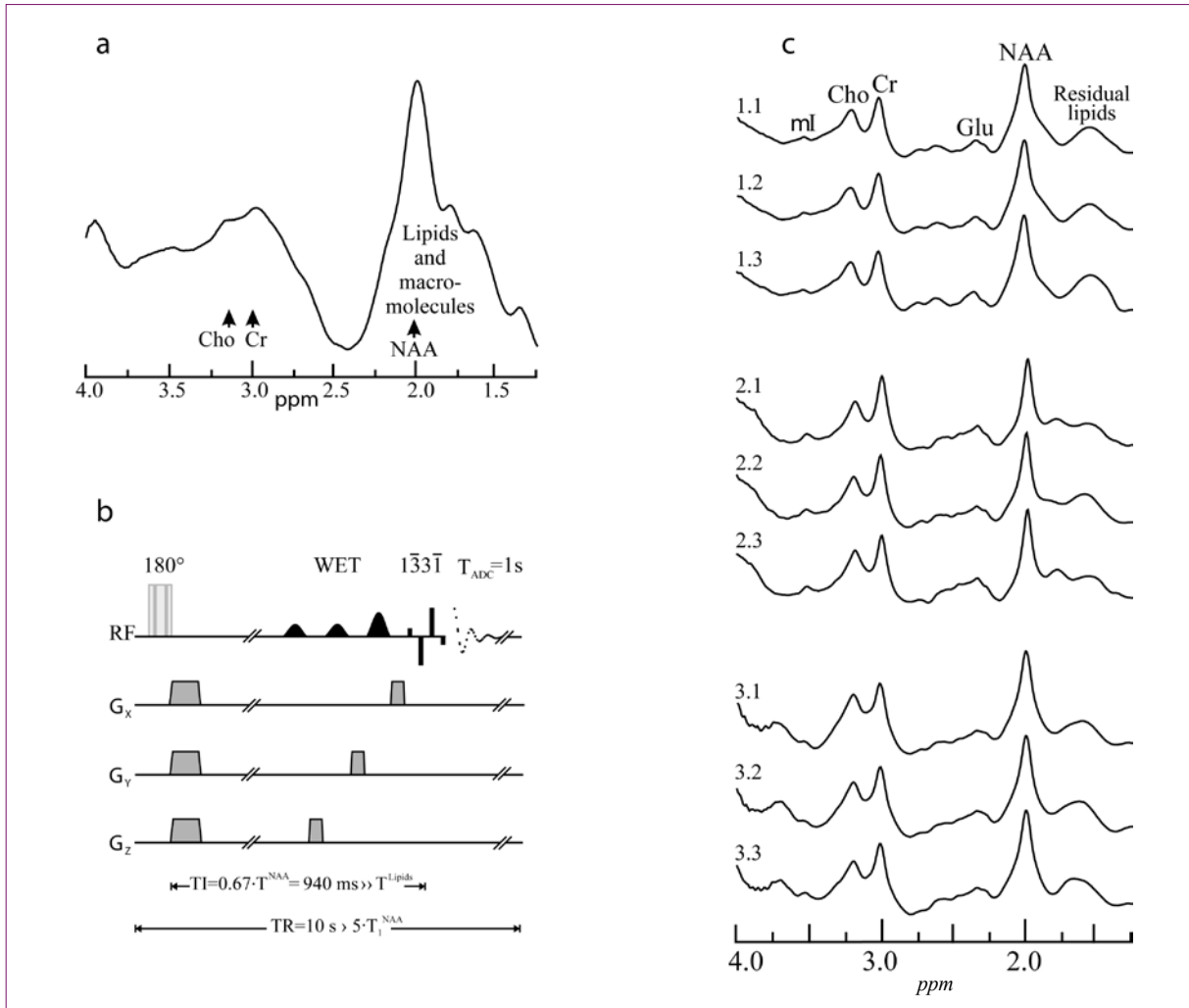
### □ The WBNA method

The above concerns are addressed by WBNA, a non-echo, i.e., non T<sub>2</sub>-weighted, non T<sub>1</sub>-weighted, non localizing <sup>1</sup>H-MRS sequence that acquires the <sup>1</sup>H-MRS signal from the entire head, as shown in Figure 1b<sup>47</sup>. It is a short (~2.5 minutes/scan) and relatively simple sequence that eliminates the lipid contamination (compare Figure 1a and 1c) and avoids the usually unknown, (especially in pathologies) T<sub>1</sub> and T<sub>2</sub>-weighting of the NAA that is inherent in other small-voxel studies. Note that although several peaks are seen in the whole-head spectrum (Figure 1c), only the NAA is implicitly localized to the brain. Since the others, e.g., the creatine+phosphocreatine (Cr), Choline+phosphocholine (Cho), glutamine (Glu) and myo-Inositol (mI), are found in all tissue types unlike the NAA, none of them can be ascribed to a specific region<sup>48</sup>. It is also noteworthy that while other metabolites, particularly macromolecules and other N-acetyl-bearing species also resonate at 2.02 ppm<sup>49</sup>, their contribution to the peak area is less than 10%<sup>50</sup>.

Absolute quantification is done using the phantom-replacement method against a reference 3 L sphere of 1.5×10<sup>-2</sup> mole NAA in water in the same experimental setup after the patients' exams. Subject and reference NAA peak areas, S<sub>S</sub> and S<sub>R</sub>, are then obtained by manual phasing and selection of the NAA peak limits of integration, as shown in Figure 3, by four blinded operators. Any result more than two average standard deviations (for the four readers' over all the patients, ~8%) from the mean for that patient, is rejected. If more than one is rejected than that entire set is excluded as "poor quality". The results are then averaged into  $\overline{S_S}$  and  $\overline{S_R}$  and Q<sub>NAA</sub> estimated as<sup>51</sup>,

$$Q_{\text{NAA}} = 1.5 \times 10^{-2} \cdot \frac{\overline{S_S}}{\overline{S_R}} \cdot \frac{V_S^{180^\circ}}{V_R^{180^\circ}} \text{ moles,} \quad [1]$$

where  $V_R^{180^\circ}$  and  $V_S^{180^\circ}$  are the transmitter voltages for non-selective 1 ms 180° inversion pulses on the ref-



**Figure 1** Top left, a: Whole-head water-suppressed [WET followed by a  $\overline{133I}$  (100  $\mu$ s rectangular pulses, 2 ms delays at 3 T) for a  $90^\circ$  readout] single-acquisition  $^1H$  proton spectrum. Note the extreme lipids contamination from the bone marrow and subcutaneous adipose tissue distorting and obscuring the NAA signal and confounding its quantification. Bottom left, b: The WBNAA sequence comprising a BIR4 adiabatic  $180^\circ$  (every second acquisition) followed by a  $TI=940$  ms to null the NAA signal. WET and a  $\overline{133I}$  (100  $\mu$ s rectangular pulses, 2 ms delays at 3 T) for a  $90^\circ$  readout with acquisition commencing immediately. Each even transient is subtracted from every odd. Since the TR is long, 10 s, and  $TE=0$ , minimal  $T_1$  or  $T_2$  weighting are incurred by the NAA. Right, c: Real part of the whole head  $^1H$  spectra from a male volunteer labeled  $i,j$ , where “ $i$ ” ( $=1..3$ ) is the number of the session in the magnet and “ $j$ ” ( $=1..3$ ) is the number of the back-to-back acquisition (subject at least 10 minutes outside the magnet) in that session. Note the excellent (CV=5.8) intra-session and CV=10.6 inter session reproducibility.

erence and subject, reflecting by reciprocity the relative coil sensitivity.

To normalize for brain size,  $Q_{NAA}$  is divided by the brain parenchyma volume,  $V_B$ , obtained, for example, using the Structural Image Evaluation of Normalized Atrophy (SIENAx) package<sup>52</sup>, Firevoxel<sup>53</sup>, or an SPM variant<sup>54, 55</sup>, to yield the whole-brain NAA concentration:

$$WBNAA = Q_{NAA} / V_B \text{ mM.} \quad [2]$$

Both the back-to-back and serial reproducibility of whole-head  $^1H$  spectra of one individual, are

shown in Figure 1c. The method’s back-to-back coefficient of variation (CV) was shown to be 5.8% and the serial CV, 10.6%<sup>48</sup>, precision suggest a reproducibility suitable for both cross-sectional and serial clinical studies<sup>56</sup>.

Since MS pathology is diffuse throughout the CNS<sup>57</sup>, it is not surprising that WBNAA has also shown substantial deficits in RR MS patients relative to matched controls<sup>44, 58, 59</sup>, that correlate with disease duration<sup>60, 61</sup>. To that end, this paper will describe recent work that has been done using WBNAA to

study benign MS, specifically the recent studies using WBNAA as a marker for diffuse neurodegeneration and how the subtype is likely nothing more than the confluence of fortuitous sparing of eloquent brain regions and effective brain plasticity.

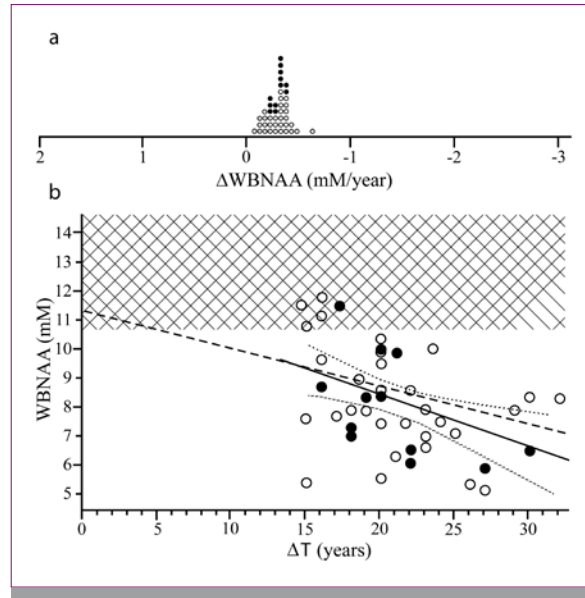
### □ WBNAA in benign MS

The contradictory results from small voxel <sup>1</sup>H-MRS studies of lesion and regional brain matter in benign MS patients led to the assumption that their mild clinical course was the result of minimal global neuronal loss. This assumption, along with the need for reliable criteria to identify patients who will remain mildly disabled over the long term<sup>24, 62</sup> and link between disability and neuronal damage<sup>27, 63</sup>, prompt two hypotheses: (i) that benign patients suffer (characteristic) low global neuronal injury, reflected by WBNAA similar to controls' and (ii) that their WBNAA is significantly higher than in more disabled patients of similar disease duration.

### □ Benign MS versus age-matched controls

To test the first hypothesis (that the global NAA concentration of benign patients will be similar to healthy contemporaries, reflecting minimal neuronal damage) WBNAA was measured in 43 (30F, 13M) benign MS patients (EDSS score  $\leq 3.0$  after 15+ years of disease), with  $21.0 \pm 4.4$  years of disease duration and average EDSS score of 1.9 (range: 0-3). Eleven were on disease-modifying medication (6 on  $\beta$ -interferon and 5 on glatiramer acetate). All had been relapse- and steroid-free for at least three months prior to their clinical exam, which included EDSS rating by the same neurologist. Twenty-four (13 F, 11 M) age-matched healthy controls with no history of neurological disease, underwent the same MR procedure as the patients. The resulting average WBNAA in benign MS patients ( $8.3 \pm 1.8$  mM) was  $\sim 35\%$  less than controls ( $12.8 \pm 1.2$  mM), as shown in Figure 2a. This finding refutes the hypothesis that the mild disability these patients exhibit also reflects in minimal neuronal damage.

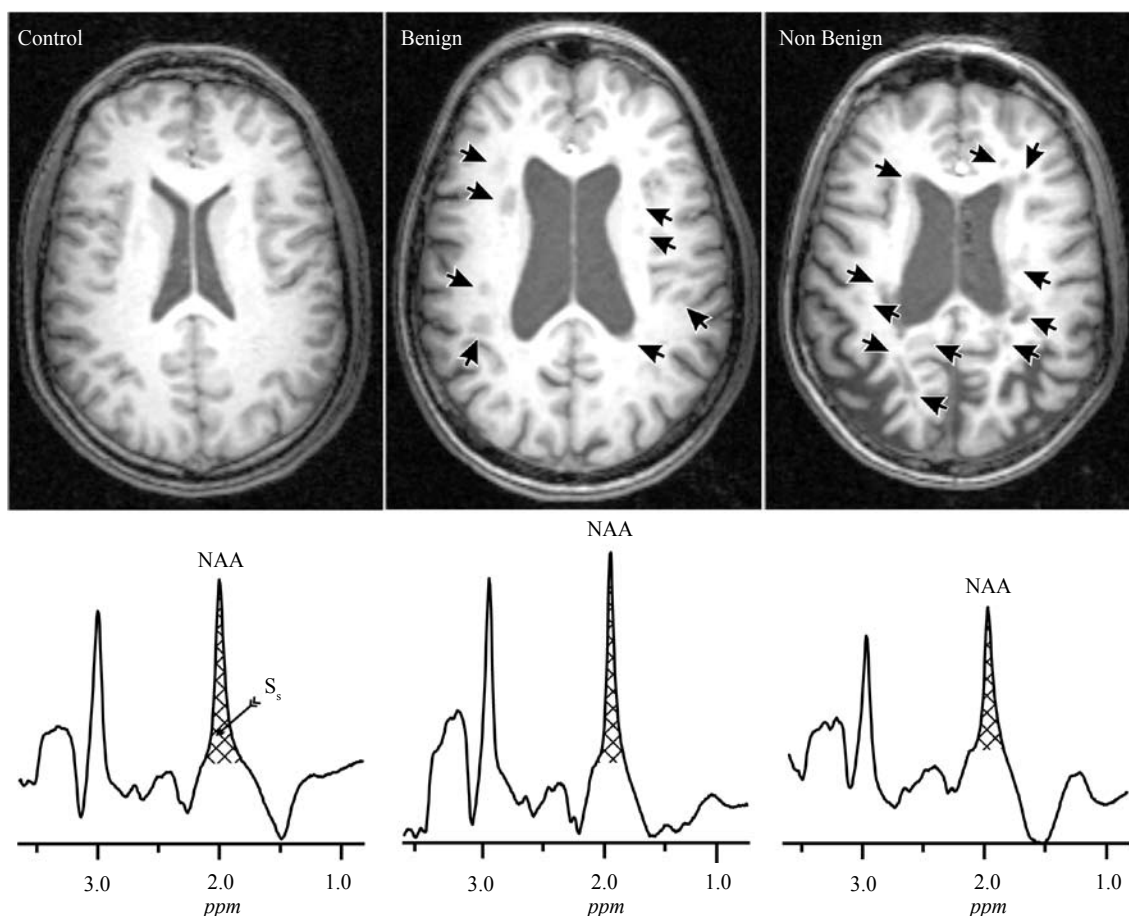
It is noteworthy that although the study was cross-sectional (only one WBNAA point acquired per patient), the average annual projected rate of change in the *i*-th patient can be estimated assuming that: (a) at first symptom, their  $WBNAA_i$  was similar to the  $\overline{WBNAA} = 12.8$  mM average of healthy contemporaries; (b) WBNAA change(s) are monotonic throughout the subsequent years and (c) that the time elapsed from first symptom,  $\Delta T_i$ , years is a good (although admittedly under) estimate of disease duration. The projected rate of decline is then<sup>44</sup>:



**Figure 2** Top, a: Dot plot of the 43 individual benign patients' average rate of WBNAA decline per year of disease duration. Closed circles (●) are patients on disease-modifying treatment at the time of the scan. Note the narrow distribution ( $0.16$  mM/year full-width-at-half-height) and slow decline ( $\Delta WBNAA \approx 0.22$  mM/year) of these benign compared to the  $+1 \dots -3$  mM/year range exhibited by general RR MS patients<sup>60</sup>. Bottom, b: The 43 benign patients WBNAA<sub>*i*</sub> concentration as a function of their disease duration from first symptom  $-\Delta T_i$  (filled circles (●) represent patients on treatment at the time of the study). Also shown are linear prediction previously reported for RR MS patients of shorter (3 - 12 years) disease durations (dashed line), the regression for the benign cohort with its 95% confidence intervals (solid and dotted lines) and the  $\pm 95\%$  confidence interval for the WBNAA of the 24 healthy controls (cross hatch). Note that the regression line for the short duration RR patients falls within the 95% confidence range of the benign MS patients and their significant decline from healthy controls.

$$\Delta WBNAA_i = \frac{WBNAA_i - \overline{WBNAA}}{\Delta T_i} \text{ mM/year.} \quad [3]$$

The average  $\Delta WBNAA_i$  from Eq. [3], was  $-0.22 \pm 0.09$  mM/year ( $\sim 1.7\%$ ), as shown in Figure 2a. Each patient's WBNAA value was also plotted as a function of his or her disease duration in Figure 2b, together with the linear regression and its 95% confidence intervals. Since the WBNAA of non-benign patients of similar disease duration was not available for this study, use of the rate,  $\Delta WBNAA_i$  instead of the WBNAA itself normalizes for different disease duration to allow comparison to MS patients scanned earlier in their disease course. Indeed, the dependence reported before for RR MS patients of shorter disease durations<sup>60</sup>, and controls are shown for comparison in



**Figure 3** Top: Representative axial T1-weighted MP-RAGE brain slices of a healthy 47 year old control; a 45 year old benign and a 48 year old non-benign MS patient, all male. Note the relatively similar atrophy of both patients compared with the control and the higher  $T_1$ -hypointense lesions load of the non-benign patient (marked by arrows). Bottom: These subjects' corresponding whole-head  $^1\text{H}$ -MRS (not normalized for  $V_B$ ) on common intensity and chemical shift scales. Note the NAA peak at 2 ppm, lipids suppression performance and that of all the other metabolite peaks seen in the head spectrum only the NAA is implicitly localized by its biochemistry to just the brain. Subject NAA peak area,  $S_N$ , was obtained by integration for use in Eq. [1].

Figure 2b. The data demonstrates that the benign cohort is similar in terms of projected rate of WBNA decline to “moderate” RR MS patients since the 95% confidence interval for the difference between these rates extends from -0.01 to 0.3 mM/year.

### □ Benign MS versus Age-matched MS patients

To test the second hypothesis (that benign MS patients would have healthier global neural structure than non benign patients of similar disease duration) WBNA was obtained in another cohort of 24 (20F, 4M) benign MS patients with  $23.1 \pm 7.2$  years of disease duration and average EDSS score of 2.1 (range: 0-3). They were compared with an additional 30 (19F, 11M) non-benign MS patients of similar

( $22.9 \pm 5.8$  years) disease duration and EDSS score of 4.7 (range: 3.5-7). Of these patients, 16 exhibited a relapsing-remitting course, 10 were secondary-progressive, 2 progressive-relapsing and 2 were primary-progressive. At the time of MRI all patients underwent a comprehensive clinical assessment including standardized neurological examination by trained and certified physicians (<http://www.neurostatus.net>) and a comprehensive disease history<sup>4</sup>. All patients were clinically stable. Finally, 17 healthy contemporaries (9F, 8M) also underwent the same MR protocol. Informed consent was obtained in writing from all participants, in accordance with the local ethics committee approval.

Representative axial MP-RAGE images from age- and gender-matched control, benign and non-benign MS patients, shown in Figure 3 illustrate the

relative atrophy of the MS patients' brains as well as the relative similarity between the two phenotypes, in extent of tissue loss and  $T_1$ -hypointense lesion loads. Indeed, the fBPV, an index of brain atrophy (see methods below), was highly significantly higher in controls,  $86.2 \pm 3.3\%$ , than in the benign,  $76.4 \pm 6.7\%$  (11%,  $p < 0.0001$ ), and non-benign:  $76.2 \pm 8.4\%$  patients (12%,  $p < 0.0001$ ), with no difference between the patient groups ( $p > 0.6$ ).

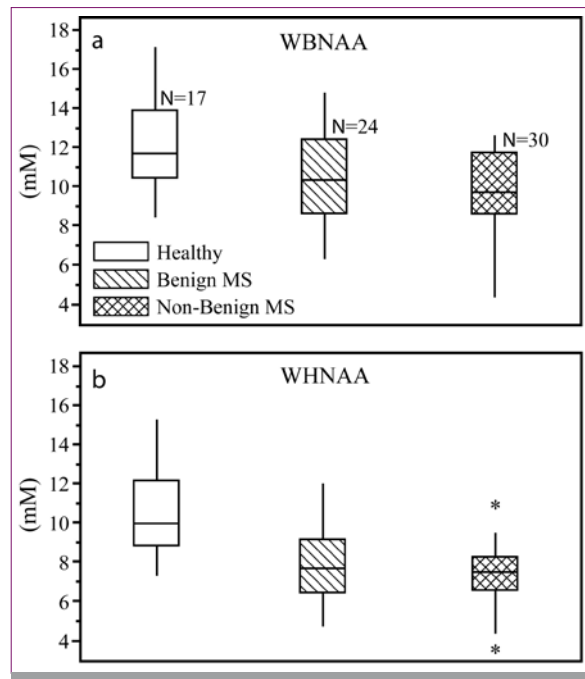
Overall, the controls' WBNAA concentration,  $12.2 \pm 2.3$  mM, was significantly higher than either the  $10.5 \pm 2.4$  mM of benign (14%,  $p = 0.031$ ) or the  $9.7 \pm 2.2$  mM of non-benign MS patients (20%,  $p = 0.002$ ), as shown in Figure 4a. There was, however, no statistical difference between the two patient groups ( $p > 0.2$ ), reflecting similar degree of neural damage in both phenotypes, thereby rejecting the second hypothesis.

Additionally, although there was a significant difference between the groups in their  $T_1$ -hypointense lesion loads, there was none in  $T_2$ -hyperintense lesion load or whole head NAA (WHNAA) concentration, defined as,

$$\text{WHNAA} = Q_{\text{NAA}} / V_{\text{IC}} \text{ mM}, \quad [4]$$

which accounts for both atrophy and decline in the quality of the remaining brain tissue, as shown in Figure 4b. Here  $V_{\text{IC}}$  is the intracranial volume, which does not change throughout the adult life.  $V_{\text{IC}}$  were obtained from the MP-RAGE images using MRIcro, a free downloadable software package: <http://www.mricro.com><sup>64</sup> that employs a brain extraction tool to skull-strip the intracranial surface using a deformable model<sup>65</sup>. The process estimates the threshold between the brain and CSF, determines the head's center of gravity C, constructs a small tessellated surface F (initially a sphere) centered at C and incrementally adjusts the vertices of F to balance its smoothness and the desired signal intensity criteria. A VOI masking the extracted brain was then used to calculate the intracranial volume,  $V_{\text{IC}}$ . The fractional brain parenchyma volume, fBPV was expressed in % as  $V_{\text{B}} / V_{\text{IC}} \times 100$ .

The benign and non-benign patients WBNAA concentrations are plotted against their brain atrophy (fBPV) in Figure 5. Two observations are apparent from that plot: First, there appears to be no predictive relationship between the WBNAA level and fBPV ( $R^2$  values less than 0.1 for either phenotype). Second, the benign and non-benign patients' distributions are similar. These again combine to reject all MR metrics employed ( $T_2$  lesion load, atrophy, WBNAA and WHNAA) as reliable metrics to differentiate benign from non benign patients of otherwise similar disease duration.



**Figure 4** Box plots showing the first, second (median) and third quartiles (box),  $\pm 95\%$  (whiskers) and outliers (\*) of the WBNAA (a); and WHNAA (b) distributions of the 17 controls (solid), 24 benign (hatched) and 30 non-benign MS patients (cross-hatched) groups. Note that both patients groups are significantly lower in WBNAA and WHNAA than the controls but not statistically different from each other.

## Discussion

Despite the need for reliable prognostic measure(s) of a benign MS course, there remains no consensus. Although other conventional and quantitative MR techniques have not delivered an accurate assessment of disease progression, it seemed possible that a marker for global neuronal loss may be uniquely suited. Therefore, it was hypothesized that benign patients would enjoy neural sparing reflected by a WBNAA concentration similar to healthy matched controls and that their WBNAA would also be higher than their more clinically disabled contemporaries. Unfortunately, the significant average WBNAA loss in benign patients compared with controls, their similar disease course extrapolated from RR MS patients of shorter disease duration and their indistinguishability from non-benign patients of similar disease duration leads us to reject both hypotheses.

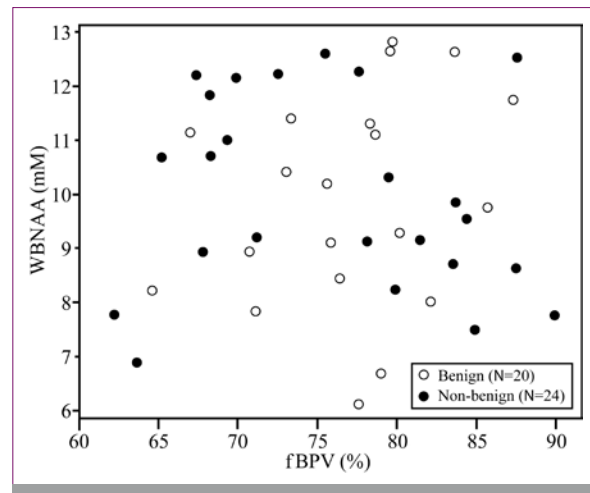
Taken together, these findings may have several implications: First, patients labeled as "benign" are likely RR MS patients who have inherently more effective compensatory mechanisms, such as increased brain plasticity, when dealing with the same amount

of tissue damage. Second, the comparable lesion load that develops in benign MS does so fortuitously in (so far) non-eloquent brain regions. Certainly their spinal cords have been spared, an insult to which would produce a clinically noticeable clinical (EDSS) change without a big lesion load increase. Third, the criterion used to differentiate “benign” from “non-benign” long disease duration patients has a sharp cutoff contingent solely on an  $EDSS \leq 3$ . Thus, for example, of two patients with the same 20 year disease duration, the one with an EDSS score of 3.0 is “benign,” while another with 3.5 is not despite a small 0.5 EDSS unit difference that distinguishes only between “mild disability in three or four functional system” versus “mild disability in five functional systems”<sup>74</sup>.

Unfortunately, these explanations combine to form an unfavorable prediction: that once the compensatory mechanisms are exhausted, or eloquent brain regions begin to be impacted, these patients may experience a precipitous and irreversible clinical decline. Indeed, although serial studies following benign MS patients are very difficult due to the great length of time involved and, consequently, rare, the longest, a 21-year follow-up of 47 such patients, substantiates this prediction<sup>16</sup>. They report that based on EDSS alone only seven (15%) were still considered benign, ten (21%) had died with significant MS-related disability and eight (17%) died of non-MS related causes. The remaining 22 all required ambulatory assistance. This suggests that benign may be an overly optimistic misnomer as only a small fraction of these patients (who initially comprise approximately 20% of the RR MS population) persist in qualifying under the strict criteria and how the rest experienced swift clinical decline.

These results also suggest that since there is effectively no neuropathological difference in benign MS patients from other phenotypes, a mild clinical course should probably not be a determination factor for withholding or deferring treatment. Specifically, although these patients exhibit a stable clinical course they seem to experience typical neural degeneration rates that characterize more active forms of the disease. It is therefore, possible that early intervention may avert or delay the ultimate rapid decline.

Though the previous results were suggestive of WBNAAs temporal sensitivity to an ongoing pathogenesis, they were nevertheless derived from cross-sectional data. This made it impossible to determine when in the disease course the NAA loss actually occurred. As indicated in Figure 2, however, the distribution of WBNAAs decline rates of benign patients is both (i) uniformly narrow, 0.16 mM/year full-width-



**Figure 5** Plot of the benign (○) and non-benign (●) MS patients WBNAAs versus their fBPV. Note that there is no predictive relationship ( $R^2 < 0.1$  for either phenotype) between the WBNAAs level and the fBPV; and that the two patients groups' distributions overlap.

at-half-height; and (ii) slow, 0.22 mM/year. In other words, the rate histogram is only the width of one year's decline; a finding distinct from previous reports in the general RR MS patient populations<sup>44, 60</sup>. This refutes reports that most neuro-axonal damage (NAA loss) accrues early in the disease course<sup>59, 66, 67</sup>, for if it were true, longer disease duration ( $\Delta T_i$  in Eq. [3]) would lead to lower WBNAAs loss rates. Furthermore, the fact that the regression line extrapolated from shorter disease duration patients also describes the WBNAAs benign MS subjects (Figure 2b), indicates a decline that continues even beyond the earlier years. Given the range of disease durations, the narrow distribution of decline rates suggests that the notion that the bulk of the decline is encountered early on in the disease course is probably not the case.

Even though it is cross sectional, there is an estimable WBNAAs decline rate of 1.7%/year (see Figure 2a) assuming average normal concentration at first symptom with monotonic decline. Based on the 6-8% intrinsic precision of each WBNAAs measurement, a longitudinal study would require patients to be scanned at least twenty times, each separated by at least six months, in order to establish statistical significance for such a slow rate. The ten to twenty years that would be required for such a serial study would render it susceptible to research team turnover, patient cohort attrition and several (possibly confounding) MR equipment upgrades, making it prohibitively difficult, and therefore, unlikely.

The WBNAAs approach admittedly trades localization for sensitivity and acquisition speed, incurring two main limitations<sup>58</sup>: First, global changes

smaller than the 6-8% sensitivity threshold remain undetected. Second, potentially severe regional NAA variations, e.g., in T<sub>1</sub>-hypointense lesions, get “averaged out” and are subject to the first limitation. Additionally, the rate decline estimates reported are based on several assumptions about the mechanisms decline, specifically, that it is monotonic and does not only occur at the preclinical stages or later in the disease where inflammation gives way to neuronal loss. In addition, as this is not a longitudinal study, it is impossible to ascertain exactly when in the disease course has the NAA loss occurred. Given the 15+ year disease duration of these patients and uncertainty early on of who will become “benign” 15 years later, however, would make such a serial study extremely difficult and costly. Finally, there was no account for possible effects of medication, the variable duration or the changes in type and dose that the

patients may have experienced in their long disease courses.

## □ Conclusions

Retaining neural function, reflected by a WBNAA similar to healthy contemporaries, does not appear to be a characteristic of benign MS. Since overall neuronal integrity does not correlate with a mild clinical course, benign MS is the likely the result of a combination of fortuitous sparing of clinically eloquent brain regions that influence the EDSS score and adept compensatory mechanisms. The extent of NAA decline in benign MS suggests that clinical presentation is a false indicator for the extent of overall damage and that even these patients should be considered for the same treatment options as their more malignant counterparts.

## REFERENCES

- 1.- Hauser SL. Multiple sclerosis and other demyelinating diseases. In: Isselbacher KJ, Wilson JD, Martin JB, Fauci AS, Kasper DL, eds. *Harrison's Principles of Internal Medicine*. New York: McGraw-Hill, 1994: 2287-2295.
- 2.- Weinshenker BG, Rice GP, Noseworthy JH, Carriere W, Baskerville J, Ebers GC. The natural history of multiple sclerosis: a geographically based study. 4. Applications to planning and interpretation of clinical therapeutic trials. *Brain* 1991; 114:1057-1067.
- 3.- Compston A, Coles A. Multiple sclerosis. *Lancet* 2002; 359: 1221-1231.
- 4.- Kurtzke JF. Rating neurologic impairment in multiple sclerosis: an expanded disability status scale (EDSS). *Neurology* 1983; 33: 1444-1452.
- 5.- Ramsaransing GS, De Keyser J. Benign course in multiple sclerosis: a review. *Acta Neurol Scand* 2006; 113: 359-369.
- 6.- Pittock SJ, McClelland RL, Mayr WT, *et al*. Clinical implications of benign multiple sclerosis: a 20-year population-based follow-up study. *Ann Neurol* 2004; 56: 303-306.
- 7.- Weinshenker BG. Natural-History of Multiple-Sclerosis. *Annals of Neurology* 1994; 36: S6-S11.
- 8.- Wingerchuk DM, Weinshenker BG. Multiple sclerosis: epidemiology, genetics, classification, natural history, and clinical outcome measures. *Neuroimaging Clin N Am* 2000; 10: 611-624,vii.
- 9.- Kantarci OH, Weinshenker BG. Natural history of multiple sclerosis. *Neurol Clin* 2005; 23: 17-38, v.
- 10.- Cree B. Emerging monoclonal antibody therapies for multiple sclerosis. *Neurologist* 2006; 12: 171-178.
- 11.- Hartung HP, Bar-Or A, Zoukos Y. What do we know about the mechanism of action of disease-modifying treatments in MS? *J Neurol* 2004; 251 Suppl 5: v12-v29.
- 12.- Fox EJ. Management of worsening multiple sclerosis with mitoxantrone: a review. *Clin Ther* 2006; 28: 461-474.
- 13.- Kobelt G, Berg J, Atherly D, Hadjimichael O. Costs and quality of life in multiple sclerosis: a cross-sectional study in the United States. *Neurology* 2006; 66: 1696-1702.
- 14.- Kobelt G, Berg J, Lindgren P, *et al*. Costs and quality of life of multiple sclerosis in Spain. *European Journal of Health Economics* 2006;7 Suppl 2: S65-74.
- 15.- Hawkins SA, McDonnell GV. Benign multiple sclerosis? Clinical course, long term follow up, and assessment of prognostic factors.[see comment]. *Journal of Neurology, Neurosurgery & Psychiatry* 1999; 67: 148-152.
- 16.- Costelloe L, Thompson A, Walsh C, Tubridy N, Hutchinson M. Long-term clinical relevance of criteria for designating multiple sclerosis as benign after 10 years of disease. *Journal of Neurology, Neurosurgery & Psychiatry* 2008; 79: 1245-1248.
- 17.- Strasser-Fuchs S, Enzinger C, Ropele S, Wallner M, Fazekas F. Clinically benign multiple sclerosis despite large T2 lesion load: can we explain this paradox? *Mult Scler* 2008; 14: 205-211.
- 18.- Ramsaransing G, Maurits N, Zwanikken C, De Keyser J. Early prediction of a benign course of multiple sclerosis on clinical grounds: a systematic review. *Mult Scler* 2001; 7: 345-347.

- 19.- Traboulsee A, Dehmeshki J, Peters KR, *et al.* Disability in multiple sclerosis is related to normal appearing brain tissue MTR histogram abnormalities. *Multiple Sclerosis* 2003; 9: 566-573.
- 20.- Ceccarelli A, Rocca MA, Pagani E, *et al.* The topographical distribution of tissue injury in benign MS: a 3T multiparametric MRI study. *Neuroimage* 2008; 39: 1499-1509.
- 21.- Rovaris M, Riccitelli G, Judica E, *et al.* Cognitive impairment and structural brain damage in benign multiple sclerosis. *Neurology* 2008; 71: 1521-1526.
- 22.- Thompson AJ, Miller DH, MacManus DG, McDonald WI. Patterns of disease activity in multiple sclerosis.[comment]. *BMJ* 1990; 301: 44-45.
- 23.- Brass SD, Narayanan S, Antel JP, Lapiere Y, Collins L, Arnold DL. Axonal damage in multiple sclerosis patients with high versus low expanded disability status scale score. *Canadian Journal of Neurological Sciences* 2004; 31: 225-228.
- 24.- Rovaris M, Barkhof F, Calabrese M, *et al.* MRI features of benign multiple sclerosis: toward a new definition of this disease phenotype. *Neurology* 2009; 72: 1693-1701.
- 25.- Ferguson B, Matyszak MK, Esiri MM, Perry VH. Axonal damage in acute multiple sclerosis lesions. *Brain* 1997; 120: 393-399.
- 26.- Lexa FJ, Grossman RI, Rosenquist AC. MR of wallerian degeneration in the feline visual system: Characterization by magnetization transfer rate with histopathologic correlation. *American Journal of Neuroradiology* 1994; 15: 201-212.
- 27.- Trapp BD, Peterson J, Ransohoff RM, Rudick R, Mork S, Bo L. Axonal transection in the lesions of multiple sclerosis. *N Engl J Med* 1998; 338: 278-285.
- 28.- Trapp BD, Ransohoff R, Rudick R. Axonal pathology in multiple sclerosis: relationship to neurologic disability. *Curr Opin Neurol* 1999; 12: 295-302.
- 29.- Narayanan S, Fu L, Pioro E, *et al.* Imaging of axonal damage in multiple sclerosis: Spatial distribution of magnetic resonance imaging lesions. *Annals of Neurology* 1997; 41: 385-391.
- 30.- De Stefano N, Narayanan S, Matthews PM, Francis GS, Antel JP, Arnold DL. In vivo evidence for axonal dysfunction remote from focal cerebral demyelination of the type seen in multiple sclerosis. *Brain* 1999; 122: 1933-1939.
- 31.- Baslow MH. A review of phylogenetic and metabolic relationships between the acylamino acids, N-acetyl-L-aspartic acid and N-acetyl-L-histidine, in the vertebrate nervous system. *J Neurochem* 1997; 68: 1335-1344.
- 32.- Danielsen EA, Ross B. Magnetic Resonance Spectroscopy Diagnosis of Neurological Diseases. New York: Marcel Dekker, Inc., 1999.
- 33.- Ross B, Bluml S. Magnetic resonance spectroscopy of the human brain. *Anat Rec* 2001; 265: 54-84.
- 34.- Arnold DL, De Stefano N, Narayanan S, Matthews PM. Axonal injury and disability in multiple sclerosis: magnetic resonance spectroscopy as a measure of dynamic pathological change in white matter. In: Comi G, ed. Magnetic resonance spectroscopy in Multiple Sclerosis. Milan: Springer-Verlag Italia, 2001: 61-67.
- 35.- Benarroch EE. N-acetylaspartate and N-acetylaspartylglutamate: neurobiology and clinical significance. *Neurology* 2008; 70: 1353-1357.
- 36.- Mainero C, De Stefano N, Iannucci G, *et al.* Correlates of MS disability assessed in vivo using aggregates of MR quantities. *Neurology* 2001; 56: 1331-1334.
- 37.- Mathiesen HK, Jonsson A, Tscherning T, *et al.* Correlation of global N-acetyl aspartate with cognitive impairment in multiple sclerosis. *Arch Neurol* 2006; 63: 533-536.
- 38.- Enzinger C, Ropele S, Strasser-Fuchs S, *et al.* Lower levels of N-acetylaspartate in multiple sclerosis patients with the apolipoprotein E epsilon4 allele. *Arch Neurol* 2003; 60: 65-70.
- 39.- Falini A, Calabrese G, Filippi M, *et al.* Benign versus secondary-progressive multiple sclerosis: the potential role of proton MR spectroscopy in defining the nature of disability. *AJNR Am J Neuroradiol* 1998; 19: 223-229.
- 40.- Davie CA, Silver NC, Barker GJ, *et al.* Does the extent of axonal loss and demyelination from chronic lesions in multiple sclerosis correlate with the clinical subgroup? *Journal of Neurology Neurosurgery and Psychiatry* 1999; 67: 710-715.
- 41.- Brooks WM, Friedman SD, Stidley CA. Reproducibility of 1H-MRS in vivo. *Magn Reson Med* 1999; 41: 193-197.
- 42.- Marshall I, Wardlaw J, Cannon J, Slattery J, Sellar RJ. Reproducibility of metabolite peak areas in 1H MRS of brain [see comments]. *Magn Reson Imaging* 1996; 14: 281-292.
- 43.- Bokde AL, Teipel SJ, Zebuhr Y, *et al.* A new rapid landmark-based regional MRI segmentation method of the brain. *J Neurol Sci* 2002; 194: 35-40.
- 44.- Inglese M, Ge Y, Filippi M, Falini A, Grossman RI, Gonen O. Indirect evidence for early widespread gray matter involvement in relapsing-remitting multiple sclerosis. *Neuroimage* 2004; 21: 1825-1829.
- 45.- De Stefano N, Narayanan S, Francis SJ, *et al.* Diffuse axonal and tissue injury in patients with multiple sclerosis with low cerebral lesion load and no disability. *Arch Neurol* 2002; 59: 1565-1571.
- 46.- Zaaraoui W, Fleysher L, Fleysher R, Liu S, Soher BJ, Gonen O. Human brain-structure resolved T(2) relaxation times of proton metabolites at 3 Tesla. *Magn Reson Med* 2007; 57: 983-989.

- 47.- Rigotti DJ, Inglese M, Gonen O. WBNAAs as a Surrogate Marker of Multiple Sclerosis Neurodegeneration. *Revista Española de Esclerosis Múltiple* 2007; 1: 29-39.
- 48.- Hovener JB, Rigotti DJ, Amann M, et al. Whole-brain N-acetylaspartate MR spectroscopic quantification: performance comparison of metabolite versus lipid nulling. *AJNR Am J Neuroradiol* 2008; 29: 1441-1445.
- 49.- Behar KL, Rothman DL, Spencer DD, Petroff OA. Analysis of macromolecule resonances in 1H NMR spectra of human brain. *Magn Reson Med* 1994; 32: 294-302.
- 50.- Baslow MH. N-acetylaspartate in the vertebrate brain: metabolism and function. *Neurochem Res* 2003; 28: 941-953.
- 51.- Gonen O, Viswanathan AK, Catalaa I, Babb J, Udupa J, Grossman RI. Total brain N-acetylaspartate concentration in normal, age-grouped females: quantitation with non-echo proton NMR spectroscopy. *Magn Reson Med* 1998; 40: 684-689.
- 52.- Smith SM, Zhang Y, Jenkinson M, et al. Accurate, robust, and automated longitudinal and cross-sectional brain change analysis. *Neuroimage* 2002; 17: 479-489.
- 53.- Mikheev A, Nevsky G, Govindan S, Grossman R, Rusinek H. Fully automatic segmentation of the brain from T1-weighted MRI using Bridge Burner algorithm. *J Magn Reson Imaging* 2008; 27: 1235-1241.
- 54.- Ashburner J, Friston K. Multimodal image coregistration and partitioning--a unified framework. *Neuroimage* 1997; 6: 209-217.
- 55.- Ashburner J, Friston KJ. Voxel-based morphometry--the methods. *Neuroimage* 2000; 11: 805-821.
- 56.- Benedetti B, Rigotti DJ, Liu S, Filippi M, Grossman RI, Gonen O. Reproducibility of the Whole-Brain N-Acetylaspartate Level across Institutions, MR Scanners, and Field Strengths. *AJNR Am J Neuroradiol* 2007; 28: 72-75.
- 57.- Miller DH, Thompson AJ, Filippi M. Magnetic resonance studies of abnormalities in the normal appearing white matter and grey matter in multiple sclerosis. *J Neurol* 2003; 250: 1407-1419.
- 58.- Gonen O, Catalaa I, Babb JS, et al. Total brain N-acetylaspartate: a new measure of disease load in MS. *Neurology* 2000; 54: 15-19.
- 59.- Filippi M, Bozzali M, Rovaris M, et al. Evidence for widespread axonal damage at the earliest clinical stage of multiple sclerosis. *Brain* 2003; 126: 433-437.
- 60.- Gonen O, Moriarty DM, Li BS, et al. Relapsing-remitting multiple sclerosis and whole-brain N-acetylaspartate measurement: evidence for different clinical cohorts initial observations. *Radiology* 2002; 225: 261-268.
- 61.- Gonen O, Oberndorfer TA, Inglese M, Babb JS, Herbert J, Grossman RI. Reproducibility of three whole-brain N-acetylaspartate decline cohorts in relapsing-remitting multiple sclerosis. *AJNR Am J Neuroradiol* 2007; 28: 267-271.
- 62.- Sayao AL, Devonshire V, Tremlett H. Longitudinal follow-up of "benign" multiple sclerosis at 20 years. *Neurology* 2007; 68: 496-500.
- 63.- Bjartmar C, Kidd G, Mork S, Rudick R, Trapp BD. Neurological disability correlates with spinal cord axonal loss and reduced N-acetyl aspartate in chronic multiple sclerosis patients. *Annals of Neurology* 2000; 48: 893-901.
- 64.- Rorden C, Brett M. Stereotaxic display of brain lesions. *Behav Neurol* 2000; 12: 191-200.
- 65.- Smith SM. Fast robust automated brain extraction. *Hum Brain Mapp* 2002; 17: 143-155.
- 66.- Chard DT, Griffin CM, McLean MA, et al. Brain metabolite changes in cortical grey and normal-appearing white matter in clinically early relapsing-remitting multiple sclerosis. *Brain* 2002; 125: 2342-2352.
- 67.- De Stefano N, Narayanan S, Francis GS, et al. Evidence of axonal damage in the early stages of multiple sclerosis and its relevance to disability. *Arch Neurol* 2001; 58: 65-70.

DRA. ANA M<sup>a</sup> ALONSO TORRES

Unidad de Neuroinmunología. Instituto de Neurociencias Clínicas.  
Hospital Regional Universitario Carlos Haya. Málaga.

## Etiopatogenia

### ► **Clinico-pathological evidence that axonal loss underlies disability in progressive multiple sclerosis**

Tallantyre EC, Bø L, Al-Rawashdeh O, Owens T, Polman CH, Lowe JS, Evangelou N.

*Multiple Sclerosis* 2010 April; 16 (4): 406-411

Las evidencias previas sugieren que la causa de la discapacidad crónica e irreversible en los pacientes con esclerosis múltiple es la degeneración axonal más que la desmielinización. Pero no se ha descrito aún la relación directa entre la discapacidad medida in vivo con las mediciones *post mortem* de la patología axonal. En este trabajo se investiga la relación entre la discapacidad motora acumulada en los pacientes durante su vida con el grado de daño axonal en su tracto motor descendente tras su muerte. Se realizó un análisis de la medula espinal de la autopsia de 45 pacientes con EM, revisando las revisiones médicas previas para determinar el grado de déficit motor. Aquellos pacientes que presentaban un mayor grado de discapacidad motora tenían menos axones corticoespinales supervivientes. La discapacidad motora no siempre se relacionaba con el grado de desmielinización. En este estudio se presenta por primera vez evidencia directa clínico-patológica de que el daño axonal es el sustrato patológico de la discapacidad establecida en la EM.

### ► **Increased blood vessel density and endothelial cell proliferation in multiple sclerosis cerebral white matter**

Holley JE, Newcombe J, Whatmore JL, Gutowski NJ.

*Neuroscience letters* 2010 February; 470 (1): 65-70.

La esclerosis múltiple se considera una enfermedad inflamatoria desmielinizante, pero actualmente el papel circulatorio en la patogenia está en discusión. Las lesiones de EM aparecen con frecuencia a lo largo de los vasos sanguíneos, y las alteraciones en la barrera hematoencefálica son rasgos patológicos en la enfermedad. En este estudio se analiza la densidad de vasos sanguíneos y la proliferación de células endoteliales en muestras de pacientes con EM, respecto a tejido control para valorar la presencia de angiogénesis en la EM. Se encuentra un aumento de la densidad de vasos en los pacientes con EM, especialmente en las lesiones subagudas.

Empleando un anticuerpo contra un marcador de proliferación endotelial, característicos de la angiogénesis, encontramos que los vasos con células endoteliales proliferativas son más frecuentes en todos los tejidos examinados de los pacientes con EM (sustancia blanca de aspecto normal y lesiones agudas, subagudas y crónicas) respecto a controles, especialmente en la sustancia blanca de aspecto normal. Estos hallazgos sugieren que la angiogénesis puede tener un papel en la progresión de las lesiones, el fracaso en la reparación y la formación de cicatrices.

### ► **Internal jugular vein morphology and hemodynamics in patients with multiple sclerosis**

Al-Omari MH, Rousan LA.

*International Angiology* 2010 April; 29 (2): 115-120.

Se emplea ecografía modo-B y Doppler color para examinar las venas yugulares internas de 25 pacientes con EM y 25 controles, en posición sentada y supina. La presencia de al menos dos criterios de Zamboni en el mismo paciente se considera positivo para insuficiencia venosa crónica cerebroespinal. El 92% de los pacientes presentaban hallazgos anormales y el 84% un diagnóstico positivo. Solo el 24% de los controles presentaban algún hallazgo patológico, pero ninguno cumplía criterios de insuficiencia venosa.

### ► **Is chronic fatigue the symptom of venous insufficiency associated with multiple sclerosis? A longitudinal pilot study**

Malagoni AM, Galeotti R, Menegatti E, Manfredini F, Basaglia N, Salvi F, Zamboni P.

*International Angiology* 2010 April; 29 (2): 176-182.

La fatiga crónica es un síntoma que afecta de forma importante a los pacientes con EM, pero su patogenia aún no está aclarada. En pacientes de EM con insuficiencia venosa crónica cerebroespinal, se analiza el efecto de la dilatación con balón de las lesiones estenosantes en las venas extracraneales principales. Se realiza el procedimiento a 31 pacientes consecutivos, realizando para la evaluación la *Fatigue Severity Scale* y la *Modified Fatigue Impact Scale basales* y tras 1, 6 y 12 meses. Tras el restablecimiento del retorno venoso cerebral, la percepción de la fatiga se redujo de forma importante.

■> **Hemodynamic patterns of chronic cerebrospinal venous insufficiency in multiple sclerosis. Correlation with symptoms at onset and clinical course**

Bartolomei I, Salvi F, Galeotti R, Salviato E, Alcanterini M, Menegatti E, Mascalchi M, Zamboni P.  
*International Angiology* 2010 April; 29 (2): 183-188.

La insuficiencia venosa crónica cerebro-espinal se ha asociado con la esclerosis múltiple. Su presencia se detecta mediante doppler color de alta resolución transcraneal y extracraneal y venografía. Pueden identificarse cinco tipos de malformación venosa y cuatro patrones hemodinámicos. En este trabajo se pretende correlacionar estos patrones con los síntomas de inicio y el curso clínico en los pacientes con esclerosis múltiple. Los distintos patrones están repartidos de forma desigual respecto al inicio y el curso de la EM. En concreto, los tipos A y B son comunes en pacientes con neuritis óptica al inicio, pero poco frecuentes en aquellos con comienzo medular, que suelen presentar el tipo D. Además, los patrones A y B son más frecuentes en las formas RR que en las SP, y casi inexistentes en las PP. El patrón C no aparece en los pacientes con PP, que con frecuencia presentan patrón tipo D.

■> **Chronic cerebrospinal venous insufficiency and iron deposition on susceptibility-weighted imaging in patients with multiple sclerosis: a pilot case-control study**

Zivadnov R, Schirda C, Dwyer MG, Haacke ME, Weinstock-Guttman B, Menegatti E, Heininen-Brown M, Magnano C, Malagoni AM, Wack DS, Hojnacki D, Kennedy C, Carl E, Bergsland N, Hussein S, Poloni G, Bartolomei I, Salvi F, Zamboni P.  
*Internal Angiology* 2010 April; 29 (2): 158-175.

La insuficiencia venosa crónica cerebroespinal es un fenómeno descrito recientemente en la esclerosis múltiple que se caracteriza por estenosis que afectan a la salida por las principales venas extracraneales y por una elevada tasa de reflujo venoso que puede conducir a un aumento del depósito de hierro en el cerebro. En este trabajo se pretende relacionar los parámetros venosos hemodinámicos y la concentración de hierro en las estructuras de la sustancia gris profunda y en las lesiones. Los hallazgos de este estudio sugieren que la insuficiencia venosa puede ser un importante mecanismo relacionado con el depósito de hierro en el parénquima cerebral en los pacientes con EM.

## Clínica

■> **Relationship of cortical atrophy to fatigue in patients with multiple sclerosis**

Pellicano C, Gallo A, Li X, Ikonomidou VN, Evangelou IE, Ohayon JM, Stern SK, Ehrmantraut M, Cantor F, McFarland HF, Bagnato F.  
*Archives of Neurology* 2010 April; 67 (4): 447-453

La fatiga es un síntoma común y muy discapacitante en los pacientes con esclerosis múltiple. En estudios anteriores se ha demostrado su relación con la afectación del circuito corticoestriado-talamocortical. Se presenta un trabajo caso-control para evaluar la relación entre la fatiga y la atrofia de la sustancia gris cortical regional y subcortical. Se realizan RMN de 3.0 T. y evaluaciones de fatiga y depresión a 24 pacientes de EM y 24 controles pareados. Los pacientes presentaban mayores índices de fatiga que los controles, incluso tras ajustar para evitar los efectos de la depresión. Los resultados en la Escala Modificada del Impacto de la Fatiga se correlacionaron con el espesor cortical del lóbulo parietal. El córtex parietal posterior fue la única área parietal con una asociación significativa con las puntuaciones de fatiga. La atrofia cortical del lóbulo parietal presenta relación más fuerte con la fatiga. Ya que el córtex parietal posterior está implicado en la planificación motora y la integración de diferentes fuentes de información, estos resultados sugieren que la alteración en aspectos superiores de la función motora pueden resultar determinantes en la fatiga debida a la EM.

## Diagnóstico

■> **A 3-year magnetic resonance imaging study of cortical lesions in relapse-onset multiple sclerosis**

Calabrese M, Rocca MA, Atzori M, Mattisi I, Favaretto A, Perini P, Gallo P, Filippi M.  
*Annals of Neurology* 2010 March; 67 (3): 376-383.

Este trabajo documenta la presencia, extensión y frecuencia de formación de las lesiones corticales en pacientes con esclerosis múltiple recurrente-remitente y secundaria progresiva, y su relación con la atrofia cortical y la progresión de la discapacidad. Se realiza un estudio prospectivo longitudinal con 107 pacientes durante 3 años evaluando RMN y discapacidad. En la evaluación basal presentaban

lesiones corticales un 64,4% de las formas RR y un 74,2% de las PS. Durante el seguimiento aparecieron 132 lesiones corticales nuevas en 44 RR pacientes, y 61 en 15 pacientes PS. De todos estos pacientes, sólo 31 presentaban, al menos, una lesión nueva en sustancia blanca. El aumento en el número y volumen de las lesiones corticales fue mayor en los 52 pacientes que presentaron empeoramiento clínico respecto a los que no ( $P < 0.001$ ). El volumen basal de lesiones de sustancia gris se correlacionaba con la EDSS basal y con el cambio de la EDSS en el tiempo. Este volumen fue un predictor independiente de la acumulación de EDSS y el cambio de volumen de la sustancia gris en el seguimiento en ambos grupos de pacientes. En los pacientes con forma SP, el volumen lesional de sustancia blanca en T2 también resultó un predictor del empeoramiento de la EDSS. En la EM de inicio en brotes, la acumulación de lesiones corticales a lo largo del tiempo se asocia con la progresión de la discapacidad. La cuantificación de las lesiones corticales puede suponer una herramienta paraclínica adicional útil para monitorizar la evolución de la EM.

► **Brain atrophy and lesion load measures over 1 year relate to clinical status after 6 years in patients with clinically isolated syndromes**

Di Filippo M, Anderson VM, Altmann DR, Swanton JK, Plant GT, Thompson AJ, Miller DH.  
*Journal of Neurology, Neurosurgery and Psychiatry* 2010 February; 81 (2): 204-208.

Las medidas de RMN convencional sólo predice modestamente la discapacidad a largo plazo en algunos pacientes con síndrome clínico aislado. La atrofia cerebral representa pérdida axonal en los pacientes con esclerosis múltiple, pudiendo reflejar la progresión de la enfermedad mejor que las medidas lesionales. En este estudio se analiza la capacidad de la atrofia cerebral y la carga lesional durante el primer año en los pacientes con un SCA para predecir la evolución (desarrollo de EM y discapacidad) tras 6 años. La tasa de atrofia basal ( $p = 0.005$ ) y la carga lesional basal en T2 ( $p < 0.001$ ) predecían de forma independiente el desarrollo de EM. La tasa de atrofia cerebral predice la evolución de la EDSS. Los hallazgos de este trabajo confirman la presencia de atrofia cerebral en el primer año, y muestran que la tasa de atrofia entre la evaluación basal y el primer año puede ayudar a predecir la situación clínica 6 años después del primer episodio, mejor que medidas de volumen lesional o cerebral en la RMN basal.

## Tratamiento

► **Daclizumab in active relapsing multiple sclerosis (CHOICE study): a phase 2, randomised, double-blind, placebo-controlled, add-on trial with interferon beta**

Wynn D, Kaufman M, Montalban X, Vollmer T, Simon J, Elkins J, O'Neill G, Neyer L, Sheridan J, Wang C, Fong A, Rose JW; CHOICE investigators.  
*Lancet Neurology* 2010 April; 9 (4): 381-390.

Daclizumab es un anticuerpo monoclonal humanizado que ha mostrado eficacia reduciendo la actividad de la esclerosis múltiple en ensayos no randomizados. En este artículo se presentan los datos obtenidos en un ensayo fase II, randomizado, doble-ciego, controlado con placebo realizado en 51 centros (EEUU, Canadá, Alemania, Italia y España). Se reclutaron pacientes con EM recurrente remitente que estuviesen en tratamiento con interferón beta y presentasen actividad de la enfermedad. Se randomizaron para recibir además del interferón daclizumab subcutáneo 2 mg/kg de peso cada 2 semanas, 1 mg/kg de peso cada 4 semanas o placebo, durante un total de 24 semanas. El objetivo primario fue el número total de lesiones con captación de gadolinio nuevas o con aumento de tamaño en RMN cerebrales realizadas cada 4 semanas entre las semanas 8 y 24. Se seleccionaron 288 pacientes, de los que se randomizaron 230. Se encontró diferencia significativa entre las lesiones captantes en los pacientes del grupo interferón-placebo y el grupo interferón-alta dosis de daclizumab (diferencia 72%,  $p < 0.004$ ). No se encontró diferencia significativa entre dosis ni entre placebo y dosis baja. Se realizó un subestudio farmacodinámico en el cual la única diferencia fue en los niveles de células natural killer CD56, cuyo valor era 7 u 8 veces mayor en los grupos con daclizumab. Los efectos adversos fueron similares en los tres grupos. El tratamiento añadido con Daclizumab subcutáneo reduce el número de lesiones con captación de gadolinio comparado con el interferón beta solo. La terapia de combinación puede reducir más la actividad de la enfermedad.

► **Ibudilast in relapsing-remitting multiple sclerosis: a neuroprotectant?**

Barkhof F, Hulst HE, Drulovic J, Uitdehaag BM, Matsuda K, Landin R.  
*Neurology* March 2010; 74 (13): 1033-1040.

Ibudilast es un inhibidor de la fosfodiesterasa que interviene en la inflamación y la neurodegeneración.

ción en la esclerosis múltiple. Este estudio evalúa la seguridad, tolerabilidad y efectos sobre los parámetros de RMN de dos dosis diferentes de Ibudilast en pacientes con EM recurrente remitente. Se trata de un ensayo clínico multicéntrico, doble ciego, fase II, en el cual pacientes con lesiones con captación de gadolinio en RMN se asignan para recibir ibudilast 30 mg, 60 mg o placebo cada día durante 12 meses. El objetivo primario es el número acumulado de lesiones activas nuevas objetivadas en RMN bimensuales durante estos 12 meses. Los objetivos secundarios son la tasa de brotes, el cambio en la EDSS, el volumen lesional en T1 y T2 y el cambio de volumen cerebral. Durante el año de tratamiento no aparecieron diferencias en el número de lesiones activas ni la tasa de brotes. El cambio en el volumen cerebral fue menor en el grupo de 60 mg respecto a placebo. El número de lesiones activas que evolucionaron a agujeros negros fue menor en los dos grupos de tratamiento activo respecto a placebo. Tras dos años, en estos grupos hubo menos pacientes con progresión en la EDSS. El tratamiento fue seguro y bien tolerado. El estudio concluye que el Ibudilast no muestra efecto en la tasa de lesiones activas ni en los brotes. Aún así, existen evidencias preliminares que indican, a partir de dos medidas independientes de RMN, un posible papel neuroprotector, junto con un supuesto efecto beneficioso sobre la progresión de la discapacidad.

■> **Atorvastatin combined to interferon to verify the efficacy (ACTIVE) in relapsing-remitting active multiple sclerosis patients: a longitudinal controlled trial of combination therapy**

Lanzillo R, Orefice G, Quarantelli M, Rinaldi C, Prinster A, Ventrella G, Spitaleri D, Lus G, Vacca G, Carotenuto B, Salvatore E, Brunetti A, Tedeschi G, Brescia Morra V. *Multiple Sclerosis* 2010 April; 16 (4): 450-454.

Junto con su capacidad para reducir el colesterol, las estatinas presentan una acción anti-inflamatoria. Se realiza un estudio para valorar la eficacia, seguridad y tolerabilidad de la combinación de dosis bajas de atorvastatina junto con interferón beta 1-a a dosis altas en pacientes con EM recurrente-remitente con respuesta pobre al interferón. Se randomizan 45 pacientes para recibir 20 mg/día de atorvastatina junto con interferón beta 1-a 44 microgramos tres veces por semana (n = 21) o interferón solo (n = 24). Se realizaron análisis de sangre y evaluaciones de EDSS cada 3 meses y RMN al inicio, a los 12 meses y a los 24. El objetivo pri-

mario es el número de lesiones con captación de gadolinio, y los secundarios el número de brotes, la variación de la EDSS y la seguridad en los análisis. En el grupo de tratamiento activo con atorvastatina el número de lesiones con captación a los 24 meses fue significativamente menor que en la evaluación basal (p = 0.007) y presentaron menos brotes que en los dos años pre-randomización (p <0.001). El tratamiento con dosis bajas de atorvastatina pudiera ser beneficioso como terapia añadida en pacientes con pobre respuesta al interferón beta 1-a a dosis altas.

■> **Effects of escitalopram on stress-related relapses in women with multiple sclerosis: an open-label, randomized, controlled, one-year follow-up study**

Mitsonis CI, Zervas IM, Potagas CM, Mitropoulos PA, Dimopoulos NP, Sfagos CA, Papadimitriou GN. *European Neuropsychopharmacology* 2010 February; 20 (2):123-131.

Cada vez es mayor la evidencia de la asociación entre los eventos estresantes de la vida diaria y el aumento del riesgo de presentar una recaída en los pacientes con esclerosis múltiple. En este estudio prospectivo a un año se investigan los efectos del tratamiento con escitalopram sobre los brotes relacionados con el estrés en 48 mujeres con EM recurrente-remitente. Se randomizan para recibir 10 mg/día de escitalopram o su tratamiento habitual como grupo control. Se recogen los eventos estresantes mediante un diario, clasificándolos según su impacto psicológico, según lo interpreta el paciente. El riesgo acumulado de presentar un brote es 2,9 veces mayor en los controles. En el grupo tratado con escitalopram sólo se encontró influencia sobre los brotes de los eventos con más impacto emocional. Estos datos presentan una evidencia preliminar de que el escitalopram puede suponer un tratamiento seguro y bien tolerado para prevenir la aparición de brotes relacionados con el estrés en mujeres con EM.

■> **Acquired pendular nystagmus in multiple sclerosis: an examiner-blind cross-over treatment study of memantine and gabapentin**

Starck M, Albrecht H, Pöllmann W, Dieterich M, Straube A. *Journal of Neurology* 2010 March; 257 (3): 322-327.

Se presenta en este trabajo un estudio para comparar la eficacia del tratamiento con memantina (40-60 mg/día) y gabapentina (1200 mg/día) para el nistagmo pendular adquirido en 11 pacientes con

esclerosis múltiple. Se documenta la presencia de nistagmo pendular en 20 ojos mediante electrooculografía. El objetivo es reducir al menos en un 50% la amplitud o la frecuencia del nistagmus comparado con los niveles basales. Esto se consiguió en 17 de 20 ojos con memantina y en 11 con gabapentina. Ambos tratamientos demuestran ser seguros y eficaces en estos pacientes.

### ■> A placebo-controlled trial of oral cladribine for relapsing multiple sclerosis

Giovannoni G, Comi G, Cook S, Rammohan K, Rieckmann P, Soelberg Sørensen P, Vermersch P, Chang P, Hamlett A, Musch B, Greenberg SJ; CLARITY Study Group. *New England Journal of Medicine* 2010 February; 362 (5): 416-426.

En este artículo se presentan los resultados de un ensayo fase III de 96 semanas con un ciclo corto de cladribina oral en pacientes con EM recurrente remitente. Se randomizaron 1.326 pacientes para recibir una o dos dosis acumuladas de cladribina oral (3,5 o 5,25 mg por kilogramo de peso) o placebo, administrado en dos o cuatro ciclos cortos en las primeras 48 semanas y dos más de la semana 48 a la 52 (un total de 8 a 20 días al año). El objetivo fundamental era la tasa de brotes a las 96 semanas. Los grupos de tratamiento activo respecto al placebo presentaban una tasa anualizada de brotes menor, una tasa mayor de pacientes libres de brotes, un menor riesgo de progresión sostenida durante 3 meses de la discapacidad y una reducción significativa del número de lesiones en RMN. Los efectos adversos fueron más frecuentes en el gru-

po de tratamiento con cladribina, incluyendo linfopenia y herpes zóster.

### ■> A placebo-controlled trial of oral fingolimod in relapsing multiple sclerosis

Kappos L, Radue EW, O'Connor P, Polman C, Hohlfeld R, Calabresi P, Selmaj K, Agoropoulou C, Leyk M, Zhang-Auberson L, Burtin P; FREEDOMS Study Group. *New England Journal of Medicine* 2010 February; 362 (5): 387-401.

Se presentan los datos de un ensayo clínico doble ciego, randomizado a 24 meses en pacientes con EM recurrente remitente con actividad clínica que recibieron fingolimod oral (0,5 mg o 1,25 mg) o placebo. El objetivo primario fue la tasa anual de brotes y el secundario el tiempo para la progresión de la discapacidad. 1.033 de los 1.272 pacientes incluidos completaron el estudio. La tasa de brotes anualizada fue de 0,18 con 0,5 mg de fingolimod, 0,16 con 1,25 mg y 0,4 con placebo. Ambas dosis de fingolimod redujeron el riesgo de progresión de la discapacidad a los 24 meses respecto a placebo (17,7%, 16,6% y 24,1%, respectivamente). Los parámetros de RMN resultaron mejores en ambos grupos de tratamiento. Las causas de abandono del estudio y los efectos adversos debidos al fingolimod incluyeron bradicardia y bloqueo A-V al iniciar el tratamiento, edema macular, elevación de enzimas hepáticas e hipertensión leve. Comparado con placebo, el tratamiento con fingolimod en ambas dosis mejora la tasa de brotes y reduce el riesgo de progresión de la discapacidad y los resultados de RMN.

## JUNIO

### ■> The 14th International Congress of Parkinson's Disease and Movement Disorders

Ciudad: Buenos Aires (Argentina).

Fecha: 13-17 junio, 2010.

Más información: <http://www.movementdisorders.org/congress/congress10>

### ■> 20th Meeting of the European Neurological Society

Ciudad: Berlín (Alemania).

Fecha: 19-23 junio 2010.

Más información: <http://www.congrex.ch/ens2010>

### ■> 14th International Aphasia Rehabilitation Conference

Ciudad: Montreal (Canadá).

Fecha: 27-29 junio 2010.

Más información: <http://www.iarc2010.org>

### ■> Basal Ganglia Speech Disorders and Deep Brain Stimulation

Ciudad: Aix-en-Provence (Francia).

Fecha: 29 junio - 1 julio 2010.

Más información: <http://aune.lpl.univ-aix.fr/~dbs-speech-symposium2010>

## JULIO

### ■> 7th FENS Forum of European Neuroscience

Ciudad: Amsterdam (Países Bajos).

Fecha: 3-7 julio 2010.

Más información: <http://fens2010.neurosciences.asso.fr>

### ■> 3rd Annual MDS European Section Summer School for Young Neurologists

Ciudad: Nijmegen (Países Bajos).

Fecha: 9-11 julio 2010.

Más información: [http://www.movementdisorders.org/regional\\_sections/es/summer\\_school/2010](http://www.movementdisorders.org/regional_sections/es/summer_school/2010)

### ■> Alzheimer's Association International Conference on Alzheimer's Disease 2010 (ICAD)

Ciudad: Honolulu, Hawaii (USA).

Fecha: 10-15 julio 2010.

Más información: <http://www.alz.org/icad/>

### ■> XII International Congress on Neuromuscular Diseases 2010

Ciudad: Nápoles (Italia).

Fecha: 17-22 julio 2010.

Más información: <http://www.icnmd2010naples.org>

### ■> 20th Annual Course - A Comprehensive Review of Movement Disorders for the Clinical Practitioner

Ciudad: Aspen (USA)

Fecha: 26-29 julio 2010.

Más información: <http://www.columbiacme.org/brochures/fileQHRGU.pdf>

## AGOSTO

### ■> 6º Congreso Latinoamericano de Epilepsia

Ciudad: Cartagena de Indias (Colombia).

Fecha: 1-4 agosto 2010.

Más información: [http://www.revneurolog.com/img/eventos/349\\_Programa%20Definitivo%206%20congreso%20lat%20epilepsia.pdf](http://www.revneurolog.com/img/eventos/349_Programa%20Definitivo%206%20congreso%20lat%20epilepsia.pdf)

### ■> 12th European Congress on Epilepsy and Society

Ciudad: Porto (Portugal).

Fecha: 25-27 agosto 2010.

Más información: <http://www.epilepsyandsociety.org>

### ■> 23rd European College of Neuropsychopharmacology (ECNP) Congress

Ciudad: Amsterdam (Países Bajos).

Fecha: 28 agosto - 1 septiembre 2010.

Más información: <http://www.ecnp.eu/emc.asp?pageId=332>

## SEPTIEMBRE

### ■> Tissue Engineering & Regenerative Medicine International Society TERMIS AP 2010

Ciudad: Sydney (Australia).

Fecha: 15-17 septiembre 2010.

Más información: <http://www.termis.org/ap2010>

### ■> The 14th Congress of the European Federation of Neurological Societies (EFNS 2010)

Ciudad: Génova (Suiza).

Fecha: 25-28 septiembre 2010.

Más información: <http://www.kenes.com/efns2010>

### ■> The 23rd Scientific Meeting of the International Society of Hypertension

Ciudad: Vancouver (Canadá).

Fecha: 26-30 septiembre 2010.

Más información: <http://www.vancouverhypertension2010.com>

■> **World Parkinson Congress 2010**

Ciudad: Glasgow (Reino Unido).  
Fecha: 28 septiembre - 1 octubre 2010.  
Más información: <http://www.worldpdcongress.org>

■> **20th Alzheimer Europe Conference**

Ciudad: Luxemburgo (Luxemburgo).  
Fecha: 30 septiembre - 2 octubre 2010.  
Más información: <http://www.alzheimer-europe.org/Conferences/Luxembourg-2010>

## OCTUBRE

■> **Brain, Blood and Iron: Joint International Symposium on Neuroacanthocytosis and Neurodegeneration with Brain Iron Accumulation**

Ciudad: Bethesda (USA).  
Fecha: 1-2 octubre 2010.  
Más información: <http://www.checkorphan.org/grid/event/brain-blood-and-iron-joint-international-symposium-on-neuroacanthocytosis-and-neurodegeneration-with-brain-iron-accumulation>

■> **The 7th World Stroke Congress**

Ciudad: Seúl (Corea del Sur).  
Fecha: 13-16 octubre 2010.  
Más información: <http://www2.kenes.com/Stroke/Pages/Home.aspx>

■> **International Danube Symposium for Neurological Sciences and Continuing Education**

Ciudad: Zagreb (Croacia).  
Fecha: 21-24 octubre 2010.  
Más información: <http://www.docguide.com/crc.nsf/congresses/C65A1E-DEE3E004A28525764D003B0F58>

■> **10º Congreso bianual de Neuroinmunología de la Sociedad Internacional de Neuroinmunología**

Ciudad: Sitges, Barcelona (España).  
Fecha: 26-30 octubre 2010.  
Más información: <http://www.isni2010.org>

■> **The 4th World Congress on Controversies in Neurology (CONy)**

Ciudad: Barcelona (España).  
Fecha: 28-31 octubre 2010.  
Más información: <http://comtecmed.com/cony/2010>

■> **New Therapies for Advanced Parkinson's Disease**

Ciudad: Durham (USA).  
Fecha: 29 octubre 2010.  
Más información: <http://www.movementdisorders.org/education>

## Envío de manuscritos

1.- Los trabajos deberán ser enviados para su publicación a Revista Española de Esclerosis Múltiple. Editorial Línea de Comunicación, calle Concha Espina, 8º, 1º derecha, 28036 Madrid. Los trabajos se remitirán por correo electrónico (informacion@lineadecomunicacion.com) o en soporte digital junto con una copia impresa, indicando el procesador de textos utilizado.

2.- Los trabajos serán evaluados para su publicación siempre en el supuesto de no haber sido ya publicados, aceptados para publicación o simultáneamente sometidos para su evaluación en otra revista. Los originales aceptados quedarán en propiedad de la revista y no podrán ser reimpresos sin permiso de Revista Española de Esclerosis Múltiple.

3.- La Secretaría acusará recibo de los originales e informará de su aceptación. Asimismo, y cuando lo estime oportuno el Consejo Editorial, serán propuestas modificaciones, debiendo los autores remitir el original corregido en un plazo de 15 días a partir de la recepción del citado informe.

## Secciones de la revista

**REVISIONES:** trabajos amplios sobre un tema de actualidad, donde el autor estudia el tema y revisa la bibliografía escrita hasta la fecha sobre éste.

**ORIGINALES:** trabajos de tipo prospectivo, de investigación clínica, farmacológica o microbiológica, y las contribuciones originales sobre etiología, fisiopatología, anatomía patológica, epidemiología, diagnóstico y tratamiento de las enfermedades. La extensión máxima del texto será de 15 folios y se admitirán 8 figuras y/o tablas, equivalente a 6 páginas de revista incluyendo figuras, tablas, fotos y bibliografía.

**ORIGINALES BREVES (NOTAS CLÍNICAS):** trabajos originales de experiencias o estudios clínicos, ensayos terapéuticos o casos clínicos de particular interés, cuya extensión no debe superar 5 folios y 4 figuras y/o tablas.

**CARTAS AL DIRECTOR:** comentarios relativos a artículos recientes de la revista, así como observaciones o experiencias que, por su extensión o características, puedan ser resumidas en un texto breve; se admite una tabla y/o figura y un máximo de 10 citas bibliográficas.

**OTRAS SECCIONES:** crítica de libros: textos breves (una página de 2.000 espacios) de críticas de libros para su publicación. Asimismo, se publicarán en la sección agenda los congresos, cursos y reuniones relacionados que se remitan.

## Presentación y estructura de los trabajos

Los originales deberán ser mecanografiados a doble espacio (30 líneas, 60 pulsaciones), en DIN-A4 por una sola cara, con un margen no inferior a 25 mm, y con las páginas numeradas correlativamente.

**ESTRUCTURA:** el trabajo, en general, deberá estar estructurado en diversos apartados: Introducción, Material y métodos, Resultados y Discusión. En trabajos especialmente complejos podrán existir subapartados que ayuden a la comprensión del estudio.

**PRIMERA PÁGINA:** en la primera página figurarán en el orden que se citan:

- 1.- Título: debe ser conciso e informativo.
- 2.- Nombre completo -sin abreviaturas- y apellidos del autor o autores.
- 3.- Centro y Departamento en que se realizó el trabajo.
- 4.- Dirección de correspondencia, teléfono, e-mail.
- 5.- Título corto, inferior a 40 caracteres.

**RESUMEN CON PALABRAS CLAVE:** se acompañará un resumen en castellano de unas cuatro líneas y el mismo traducido al inglés, con palabras clave (10 máximo) también en ambos idiomas.

**BIBLIOGRAFÍA:** las citas se presentarán según el orden de aparición en el texto, con numeración correlativa en superíndices, vaya o no acompañada del nombre de los autores en el texto.

Las citas se comprobarán sobre los originales y se ordenarán según las normas de Vancouver disponibles en <http://www.icmje.org>

**ILUSTRACIONES:** se podrán publicar en blanco y negro, o a dos colores; si se utilizan fotografías de personas identificables, es necesario tener la autorización para su publicación. Las microfotografías deben incluir escala de medidas.

Si las ilustraciones son originales sobre papel o transparencia, las fotos han de ser de buena calidad, bien contrastadas. No remita fotocopias.

**ILUSTRACIONES DIGITALES:** si puede aportar las ilustraciones en formato digital, es recomendable utilizar formato bmp, jpg o tiff, con un mínimo de 300 puntos por pulgada.

Si las figuras no son originales, aun cuando cite la procedencia o las modifique, debe obtener permiso de reproducción del autor o de la editorial donde se publicó originalmente.

Con la colaboración de:

