



**FACULTAD DE FARMACIA
UNIVERSIDAD COMPLUTENSE**

TRABAJO FIN DE GRADO

**Biomarcadores que apoyan el diagnóstico
y/o pronóstico en enfermedades
neurodegenerativas.**

Autor: CARLOS TAMARIT SILVA

Fecha:

Tutor: ALBERTO GARCÍA REDONDO

ÍNDICE

Resumen	1
Material y metodos	2
Introducción	3
Resultados y conclusiones	5
Alzheimer	5
Parkinson	9
Esclerosis Múltiple	11
Esclerosis Lateral Amiotrófica	14
Bibliografía	18

RESUMEN

EL aumento de la esperanza de vida y el consiguiente envejecimiento de la población produce que las enfermedades neurodegenerativas aumenten su prevalencia y su incidencia. Estas patologías de etiología difusa y no muy conocida son un problema en occidente. En este trabajo vamos a realizar una revisión bibliográfica sobre estas enfermedades, su diagnóstico, pronóstico y el papel que tienen los biomarcadores en ellos.

Los biomarcadores son parámetros medibles y reproducibles que pueden identificar procesos fisiológicos y patológicos, han de ser específicos, fáciles de obtener y reproducibles, algunos son capaces de diagnosticar enfermedades cuando aún no se han descrito síntomas. Es aquí donde radica su utilidad en el diagnóstico de enfermedades neurodegenerativas, ya que estas, cuando presentan sintomatología, el daño neuronal es avanzado y el abordaje terapéutico solo puede retrasar su avance.

Hay muchas enfermedades neurodegenerativas y el uso de biomarcadores aún no ha sido explorado a fondo, solo en algunas enfermedades como el Alzheimer, el Parkinson o la ELA, entre otras se han realizado ensayos clínicos con éxito y se están implantando en la práctica clínica. Lo más avanzado e implantado son los avances en diagnóstico por imagen, con el uso de marcadores. Las líneas de investigación se centran en la búsqueda de paneles de biomarcadores para aumentar su especificidad.

MATERIAL Y MÉTODOS

Este trabajo es una revisión bibliográfica, en la cual se han revisado artículos sobre el diagnóstico de las enfermedades neurodegenerativas y estudios acerca de biomarcadores en las mismas, nos hemos centrado en cuatro enfermedades: Alzheimer, Parkinson, Esclerosis Múltiple y ELA se ha realizado usando motores de búsqueda de bibliografía como el Pubmed y Google académico. Para la parte de la introducción hice una búsqueda general acerca de biomarcadores y enfermedades neurodegenerativas para las características fundamentales. Posteriormente busqué específicamente a cerca de cada enfermedad.

INTRODUCCIÓN

Un biomarcador es cualquier parámetro ya sea bioquímico, antropométrico, biológico, fisiológico... objetivamente mesurables y reproducibles capaz de identificar procesos fisiológicos, patológicos o farmacológicos. Existen diferentes tipos de biomarcadores en función de su utilidad, se pueden usar para diagnóstico, pronóstico, o seguimiento terapéutico. ⁽¹⁾

Estos biomarcadores miden la interacción entre un sistema biológico y un agente químico y físico que da una visión al clínico de diferentes procesos, ya sean fisiológicos o patológicos, a su vez pueden ser utilizados para conocer el pronóstico de una patología o detectarla con prontitud.

Antes de utilizar un biomarcador debe quedar demostrada, y validada su utilidad para la patología a tratar, debe ser preciso, y aportar especificad sobre el proceso a analizar, además el proceso de identificación y obtención debe estar a su vez validado y ofrecer garantías de calidad y ser reproducible. ⁽²⁾ En la siguiente tabla se muestran algunos ejemplos de biomarcadores utilizados en la actualidad. ⁽²⁾

Tabla número 1. Ejemplos de biomarcadores ⁽²⁾

Tipo	Biomarcador	Referencia
Exposición	Excreción de metabolitos en orina	Rodríguez E, García D, Carabias R. 2010 [22]
	Aductos de ADN	Shuker D. 2002 [23]
	Aductos de albúmina	Funk W, He L, Iavarone A, Williams E, Riby J, Rappaport S 2010 [24]
	Aductos de hemoglobina	Richter E, Branner B. 2002 [25]
Efecto	Recuento de eritrocitos, leucocitos y trombocitos	Shankar, A., Mitchell, P, Rohtchina, E., Wang, J.J., 2007 [26]
	Inhibición de enzimas del grupo HEMO	Maiese K, Chong Z, Hou J, an Shang Y 2010 [27]
	Niveles de proteínas en orina	Tambor V, Fuciková A, Lenco J, Kacerovský M, Reháček V, Stulík J, Pudil R 2010 [13]
	Marcadores de citotoxicidad	Lieggi N, A. Edvardsson A, O'Brien J. 2010 [28]
	Niveles de células necróticas	Greystokea A, Hughesa A, b, Ransona M, Divea C, Cummingsa J, Warda T. 2007 [29]
	Niveles de anticuerpos	Whiteaker J, Zhao L, Zhang H, Feng L, Piening L, Anderson L, et al. 2007 [30]
	Susceptibilidad	Polimorfismo de enzimas
Polimorfismo de la glutation-transferasa		Norppa H. 2004 [32]
Polimorfismo genético		Knudsen L, Loft S, Autrup H. 2001 [33]

En enfermedades neurodegenerativas un biomarcador ideal sería aquel que fuera: fácil de cuantificar, con una relación coste-efectividad aceptable, reproducible, debe tener una relación lineal directa o inversa con la evolución o disminución de la enfermedad, debe evaluar la respuesta terapéutica, no estar sujeto a grandes fluctuaciones en la población general y no detectarse ante condiciones no relacionadas o en factores comórbidos, es decir que ha de ser específico.

En dichas enfermedades la obtención de biomarcadores que respondan a todas las exigencias es imposible y lo que es más desalentador es que no se conoce ninguno que detecte la enfermedad antes de la clínica o en fases muy tempranas de la misma. Los resultados más prometedores en cuanto al avance en el conocimiento de biomarcadores en estas enfermedades se dan en Alzheimer y en el deterioro cognitivo leve (DLC).⁽³⁾

En demencia las técnicas aplicadas pueden dividirse en bioquímicas que van a determinar la concentración de determinadas sustancias, en función de qué enfermedad se sospeche, en el líquido céfalo raquídeo (LCR) o fluidos periféricos y por neuroimagen ya sea estructural o funcional. Todavía estas pruebas se encuentran más en el campo de la investigación que de la clínica, cada vez son más los estudios que abalan el uso de estas pruebas para el diagnóstico precoz y el seguimiento y pronóstico de estas enfermedades.⁽⁴⁾

Antes de analizar las enfermedades neurodegenerativas más importantes, en esta introducción vamos a definir qué es una enfermedad neurodegenerativa, posteriormente iremos analizando una a una viendo en qué estado se encuentra su diagnóstico, cuáles son las más prevalentes en la actualidad y el estado del uso de biomarcadores para su diagnóstico y pronóstico, tanto los que se estén utilizando en la práctica clínica, como los que se están investigando.

Una enfermedad neurodegenerativa es una patología que afecta al sistema nervioso produciendo daño o destruyendo definitivamente las neuronas.

Las neuronas son células incapaces de reproducirse y no se pueden sustituir, el daño o su destrucción conlleva un fallo en las funciones que esta desempeñaba dentro del sistema nervioso, el cual está formado por el encéfalo y la medula espinal. El tratamiento de estas enfermedades va encaminado a mejorar la movilidad, aliviar los síntomas o el dolor, en definitiva, el tratamiento tiene como fin alargar la vida del paciente siempre que sea posible y mejorar su calidad de vida y la de las personas que le rodean.

Estas enfermedades son incurables e imparables y producen la degeneración progresiva de las neuronas y su muerte. Lo que provoca fallos tales como ataxias, fallos en el correcto funcionamiento mental (demencias), hablar, respirar... Las demencias constituyen la mayor carga de la enfermedad, en enfermedades como el Alzheimer casi el 60 o 70 %. Algunas de estas enfermedades son el Alzheimer, Párkinson, Huntington, atrofia muscular espinal, demencia por cuerpos de Lewy...⁽⁵⁾ En neurología es importante categorizar correctamente un conjunto de enfermedades neurodegenerativas, para brindar al paciente un diagnóstico y tratamiento adecuado.

Actualmente, son aplicados enfoques emergentes como el uso de marcadores biológicos (biomarcadores) y, a partir de ellos, realizar el diagnóstico o seguimiento de la evolución en estas patologías. El conocimiento de los procesos fisiopatológicos que producen y cursan con estas enfermedades son fundamentales para la búsqueda de biomarcadores que ayuden a su diagnóstico, preferiblemente de una manera precoz, y una vez diagnosticada a seguir el proceso y conocer el pronóstico de la enfermedad.⁽⁶⁾

En esta imagen se presentan algunas de las principales enfermedades neurodegenerativas



Imagen clasificatoria de las enfermedades neurodegenerativas. Google imágenes. Imagen 2

RESULTADOS Y CONCLUSIONES

A continuación, como se hace referencia en la introducción, analizaremos las principales enfermedades neurodegenerativas, introduciendo la enfermedad, después se expone el estado en el que se encuentra el diagnóstico de la misma, los diferentes marcadores que se usan en clínica o que se están investigando y posteriormente las conclusiones.

ALZHÉIMER:

La enfermedad de Alzheimer (EA), es una enfermedad neurodegenerativa que se caracteriza por presentar deterioro cognitivo y de la conducta de curso progresivo y ocurriendo en la edad adulta y la vejez. En esta enfermedad se produce un deterioro cognitivo y conductual debido, fundamentalmente, al acumulo de proteínas tanto dentro de las neuronas como fuera de ellas. En concreto estas proteínas son tau hiperfosforilada intraneuronal en forma de ovillos neurofibrilares y el péptido beta-amiloide extraneuronal en forma de placas seniles. Se sabe que el deterioro neuronal puede empezar hasta una década antes de la sintomatología clínica, es por esto que encontrar un biomarcador o una serie de biomarcadores capaces de detectar los primeros signos de daño neuronal, para establecer lo antes posible el diagnóstico, es fundamental; con el fin de poder retrasar los síntomas y buscar un mejor tratamiento que mejore a la larga la vida de los pacientes.

Para el diagnóstico de esta patología se requieren unos criterios de diagnóstico que implican una elevada pérdida de neuronas y además demencia. Al no haberse establecido marcadores biológicos con las características antes mencionadas de especificidad y fiabilidad, el diagnóstico sigue unos criterios clínicos definidos en la práctica clínica. Si bien, diagnóstico final requiere una confirmación histopatológica, solamente adquirible mediante una muestra durante la autopsia. Únicamente en el 85% de los pacientes diagnosticados de Alzheimer se confirma su diagnóstico, finalmente, en la autopsia. Esto implica que cuando el paciente es diagnosticado y cumple los criterios, el daño neuronal está muy avanzado, siendo imposible que este se beneficie de tratamientos farmacológicos.

Es fundamental para que puedan beneficiarse de tratamientos que mejoren su calidad de vida y su pronóstico encontrar e investigar biomarcadores fiables y específicos para esta enfermedad que nos permitan diagnosticar a los enfermos en fases prodrómicas de la misma.⁽⁷⁾

Criterio diagnóstico central

A. Presencia de alteración de memoria episódica significativa que incluya las siguientes características:

- Cambio gradual y progresivo de la función mnésica referido por los pacientes o informadores de al menos seis meses de evolución
 - Evidencia objetiva de la alteración significativa de la memoria episódica medida mediante tests que evalúen principalmente el déficit de evocación que no mejore con pistas o en las pruebas de reconocimiento, controlando previamente que la fijación haya sido normal
 - La alteración de memoria episódica puede ser aislada o asociada a otros cambios cognitivos cuando la EA es inicial o conforme ésta avanza
-

Rasgos que apoyan el diagnóstico

B. Presencia de atrofia del lóbulo temporal medial

- Pérdida de volumen hipocampal, córtex entorrinal y amígdala, evidenciada por cambios cualitativos visuales observados en la resonancia magnética (teniendo en cuenta las características de la población de la misma edad) o bien cambios cuantitativos evaluados mediante estudios de volumetría en las regiones de interés (teniendo en cuenta las normas de la población de la misma edad)
-

C. Biomarcador anormal en líquido cefalorraquídeo

- Concentraciones bajas de β -amiloide, concentraciones incrementadas de tau o concentraciones incrementadas de fosfo-tau, o bien una combinación de estas tres
 - Otros biomarcadores futuros si están bien validados
-

D. Patrón específico funcional cerebral mediante tomografía por emisión de positrones

- Reducción del metabolismo en áreas temporoparietales bilaterales
 - Otros ligandos bien validados, incluyendo aquéllos que emergerán en un futuro inmediato, como el componente B de Pittsburgh o el FDDNP
-

E. Mutación autosómica dominante probada con un familiar de primer grado afecto.

Tabla de criterios diagnósticos de fase prodrómica (8). Tabla 3

Se han propuesto nuevos criterios de diagnóstico para la fase prodrómica de la enfermedad, como en la fase sintomática de la enfermedad los síntomas no son lo suficientemente graves como para cumplir los criterios clínicos como tal. Los principales criterios son, una alteración significativa de la memoria episódica y un biomarcador anormal, además de otros posibles criterios complementarios. Además del criterio de la memoria, que se evalúa mediante test neuropsicológicos debe cumplir unos requisitos adicionales, que están basados en la presencia de estos marcadores positivos, que posteriormente se van a exponer y que están basados en la fisiopatología de la enfermedad, se basan en la detección mediante imágenes por resonancia magnética del lóbulo frontal que se encontrará atrofiado en pacientes con Alzheimer, también tendrán concentraciones anormales de la proteína tau y del

péptido β -amiloide, un metabolismo hipocampal claramente disminuido, o detección de β -amiloide que se evaluará mediante pruebas de tomografía por emisión de positrones.

Se ha desarrollado un concepto que es el del Alzheimer preclínico, está basado en el descubrimiento de que las alteraciones moleculares que dan lugar a la fisiopatología de la enfermedad comienzan años antes de la sintomatología, sobre esta fase preclínica existen muy pocos estudios, ya que en esta fase la degeneración neuronal es tan leve que no se produce apenas deterioro cognitivo y no se está cerca de cumplir con los criterios de diagnóstico.

En la siguiente imagen se muestra a la izquierda un esquema de un hemisferio sin alteraciones ni daño neuronal producido por el acúmulo de proteínas y péptidos tanto a nivel intracelular como extracelular; a la derecha se muestra el mismo hemisferio una vez avanza la enfermedad, se observa el daño cognitivo producido por la muerte de las neuronas en los ventrículos y en la zona asociada a la memoria y al habla, causantes de la pérdida de memoria esporádica y la demencia, criterios fundamentales para el diagnóstico de Alzheimer prodrómico.

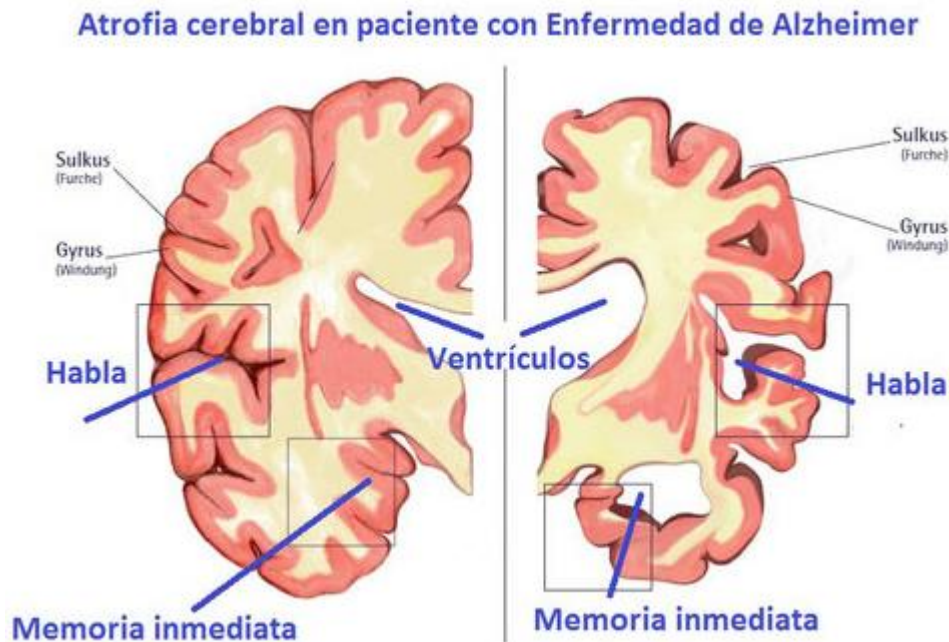


Imagen de los daños cerebrales en una persona con Alzheimer

Al ser los marcadores patológicos los ovillos neurofibrilares intraneuronales de tau hiperfosforilada y las placas seniles extraneuronales de beta-amiloide las lesiones patológicas características de esta enfermedad, se han establecido los niveles de estas moléculas en LCR como principales biomarcadores de la enfermedad.

Se ha relacionado al oligómero $A\beta$ que conduce a la acumulación anormal de tau, con los estadios iniciales de la enfermedad, es por esto que sus niveles en LCR se utilizan como biomarcador, ya que una bajada de niveles es un indicativo de que la enfermedad se encuentra en su fase inicial. Se han encontrado niveles bajos en casi todos los pacientes diagnosticados de EA, incluso varios años antes de la aparición de la sintomatología clínica ⁽⁹⁾

La aparición de la proteína tau en LCR es un indicador de cambios patológicos y se ha asociado a deterioro neuronal, mientras que la proteína Tau fosforilada en LCR nos indica el estado de fosforilación de la misma en el cerebro. El aumento de Tau en LCR se relaciona con la presencia de ovillos neurofibrilares en la autopsia ⁽⁹⁾ y las concentraciones de fosfo-tau (P-tau), y de tau total (t-tau) se relacionan con el grado de afectación clínica. ⁽¹⁰⁾

Muchos estudios han demostrado que la utilización de valores de P-Tau, T-Tau elevados combinados con unos niveles bajos de $A\beta_{1-42}$ tiene un alto valor predictivo en identificar los casos de alzhéimer en pacientes con deterioro cognitivo leve ⁽¹¹⁾.

Los resultados de diferentes estudios multicéntricos han demostrado que los biomarcadores en LCR son una valiosa herramienta de diagnóstico de alzhéimer en personas con deterioro cognitivo. Además, los valores reducidos de $A\beta_{1-42}$ en LCR pueden predecir la evolución de pacientes amnésicos hacia la demencia ⁽¹²⁾ cuando se combinan con niveles de T-Tau y P-tau, dando lugar por tanto, a la identificación de pacientes en periodo prodrómico de la enfermedad.

La capacidad predictiva de estos biomarcadores puede aplicarse incluso en fases previas. Un estudio longitudinal que combinaba marcadores de LCR y de resonancia magnética (RM) mostro que cambios en los niveles e P-Tau se asociaban longitudinalmente con variaciones en el volumen del hipocampo en pacientes con pérdidas de memoria aislada. En cambio, existen ciertas limitaciones en el uso de T-Tau cuando existen demencias debido a un efecto techo. ⁽⁷⁾

Es necesario seguir investigando en nuevas maneras de reducir al máximo posible el tiempo de diagnóstico de esta enfermedad, los nuevos criterios basados en la pérdida de memoria y en los biomarcadores, tanto de carácter bioquímico como los obtenidos por imagen son un avance muy significativo en la lucha para la detección precoz de esta enfermedad. Cuanto antes seamos capaces de diagnosticar, antes podremos empezar a tratar al paciente mejorando significativamente su calidad de vida y reduciendo en todo lo posible su avance.

Los biomarcadores cumplen un papel fundamental en esta lucha, en esta enfermedad se ha avanzado mucho en los últimos años, pero tenemos que seguir mejorando en las técnicas de análisis y obtención, además de mejorar en la comprensión de esta enfermedad, de sus causas etiológicas, con el fin de hallar fármacos que las prevengan o incluso algún día, gracias a una pronta detección podamos llegar a reducir en todo lo posible su avance.

A raíz del concepto del Alzheimer preclínico se abre la puerta a los investigadores para poder combatir la enfermedad mucho antes de que el deterioro cognitivo sea ya imposible de combatir y altere la vida de las personas y sus relaciones tanto con el mundo que les rodea como con las personas cercanas a ellos. La detección precoz de depósitos de β -amiloide en ancianos sanos, puede dar pie a los investigadores a conocer más acerca de las rutas metabólicas alteradas, y esto a su vez animaría a las compañías farmacéuticas a sintetizar nuevas moléculas dirigidas a metabolitos intermediarios en dichas rutas, que sean capaces de reducir el avance de la enfermedad mucho antes de que se den los síntomas propios de la misma.

PARKINSON:

El Parkinson es una enfermedad neurodegenerativa, la segunda más importante en cuanto a la frecuencia. Afecta fundamentalmente al movimiento, ya que causa la muerte de las neuronas dopaminérgicas de la parte compacta de la sustancia negra lo que genera un desequilibrio en la función de los ganglios basales. Las principales manifestaciones clínicas se deben a la hiperactividad del núcleo subtalámico. La muerte de estas neuronas dopaminérgicas es debida a la producción o degradación proteosomal inadecuada de una proteína llamada alfa-sinúcleína, produciendo unos acúmulos que se denominan cuerpos de Lewy. Se sabe que para que los signos clínicos se hagan evidentes es necesaria una pérdida del 80% de las neuronas en las áreas afectadas.

Comúnmente el diagnóstico del Parkinson se considera simple, pero es cierto que alrededor del 25% de los pacientes están mal diagnosticados, al igual que en el Alzheimer, el diagnóstico final se realiza por examen anatomopatológico en la autopsia, debido a que los signos característicos de esta enfermedad, los extrapiramidales, se pueden encontrar también en otras enfermedades, que se denominan parkinsonismos atípicos.

En la siguiente imagen están representados los criterios clínicos para el diagnóstico clínico. Como se puede observar la mayoría de los signos clínicos evidencian que el deterioro cognitivo y el daño neuronal están avanzados y son irreparables y solo se pueden ralentizar. ⁽¹³⁾

Posible	Presencia de al menos dos de los cuatro signos cardinales (de los cuales uno debe ser temblor o bradicinesia)
	Ausencia de síntomas atípicos
	Respuesta al uso de levodopa o dopaminérgicos (o ausencia de un adecuado tratamiento con levodopa o dopaminérgicos)
Probable	Presencia de al menos tres de los cuatro signos cardinales
	Ausencia de síntomas atípicos durante al menos 3 años
	Respuesta al uso de levodopa o dopaminérgicos
Definitiva	Presencia de todos los criterios posibles para el diagnóstico de la enfermedad de Parkinson
	Confirmación con la autopsia

Además del diagnóstico clínico también se puede realizar diagnóstico por imagen, que ha tenido una rápida expansión y ahora ocupan un papel importante en el diagnóstico del Parkinson, bien en confirmar el diagnóstico clínico o el diagnóstico diferencial. La tomografía por emisión de positrones con un marcador como el [F-6] fluorodopa, es capaz de evidenciar los daños sufridos en las neuronas dopaminérgicas. El marcador evidencia la falta de captación de dopamina debida a la muerte de las neuronas dopaminérgicas. Los estudios revelan que cuando la reducción de captación alcanza el 50% empiezan las manifestaciones clínicas; esto quiere decir que cuando empiezan los síntomas y se quiere realizar un diagnóstico clínico basado en la sintomatología,

el daño en las neuronas dopaminérgicas es irreparable, en cambio utilizando la tomografía por emisión de positrones con estos marcadores, se podría diagnosticar la enfermedad en etapas más tempranas, lo cual ayudaría a dirigir mejor el tratamiento farmacológico, mejorando la vida del paciente y el pronóstico de la enfermedad.

En cuanto al diagnóstico genético, no hay muchos estudios excepto en los parkinsonismos monogénicos, los resultados con diferentes técnicas no han arrojado datos relevantes ni específicos de esta enfermedad. Sin embargo, ha permitido a los investigadores avanzar en el conocimiento de las causas y los mecanismos tanto de esta enfermedad como de otras enfermedades neurodegenerativas.

Dentro de los biomarcadores genéticos de la enfermedad de Parkinson encontramos, duplicaciones y triplicaciones del gen *SNCA*, que codifica para la proteína alfa-sinúcleína, también se ha descubierto mutaciones en personas con la enfermedad en los genes que codifican para los enzimas lisosomales como, *GBA* o *ATP13A2*. La importancia de la alfa-sinúcleína ha llevado a los investigadores a identificarla en fluidos biológicos como sangre, plasma, donde es relativamente elevada y más baja en LCR. Recientes estudios han descartado que la presencia de esta sustancia en LCR pueda utilizarse como biomarcador, ya que las diferencias entre pacientes y controles no son estadísticamente significativas ⁽¹⁴⁾. Otros estudios, basados en la técnica ELISA, han demostrado que hay un descenso significativo de esta proteína ⁽¹⁵⁾ y además existe una relación inversamente proporcional entre su concentración y el avance de la enfermedad ⁽¹⁶⁾.

El análisis de alfa-sinúcleína en sangre periferia se realizó en varios grupos, los investigadores demostraron que las concentraciones son abundantes en plaquetas y que el 90% de los eritrocitos la expresan. Diferentes autores observaron que los niveles estaban incrementados en sangre de enfermos de Parkinson respecto a los controles y pacientes con atrofia multisistémica ⁽¹⁷⁾⁽¹⁸⁾.

La alfa-sinúcleína debe ser eliminada por dos vías, mediante ubiquitinación y posterior eliminación por el proteosoma y por enzimas lisosomales. Se han investigado diferentes mutaciones en la expresión de estas enzimas responsables de la eliminación de las proteínas mal plegadas. Los niveles de proteínas lisosomales como catepsina D, LAMP-1, LAMP-2 y Hsc70 se encuentran bajas en muestras post-mortem de enfermos de Parkinson ⁽¹⁹⁾⁽²⁰⁾. Del mismo modo, la expresión génica y la actividad de la enzima lisosomal α -D galactosidasa se encuentran disminuidas en leucocitos de pacientes con EP esporádica ⁽²¹⁾.

En otra línea de investigación, se plantea usar marcadores proteómicos de neuroinflamación, se ha demostrado que la atenuación de la actividad de las células de la microglía puede proteger hasta el 90% de las neuronas dopaminérgicas destinadas a la apoptosis ⁽²²⁾. Se han asociado varios marcadores de inflamación como la fractalquina. Últimamente se ha demostrado que la ratio fractalquina/A β 1-42 se relaciona directamente con la gravedad y la progresión de la enfermedad. ⁽²³⁾

Además, se ha estudiado la aparición de diferentes metabolitos utilizando técnicas de cromatografía acoplada a arrays. Se ha puesto de manifiesto la presencia de proteínas y péptidos modificados, como un aumento de glutatión oxidado, y de otro tipo de compuestos, como aminoácidos N-acetilados, succinil-carnitina y corticosterona ⁽²⁴⁾

Se realizó un estudio de casos-control, llevado a cabo por el servicio navarro de salud, financiado por el gobierno navarro, basado en las crecientes evidencias de la implicación de mecanismos de estrés oxidativo en la enfermedad de Parkinson. Se han descrito en la sustancia negra niveles menores de glutatión (GSH), un aumento de los depósitos de hierro, aumento de los productos derivados de la peroxidación lipídica y alteraciones del complejo I mitocondrial.

Como resultados se encontraron diferencias significativas en los niveles plasmáticos de GSH y de igual modo con una significación menor de los niveles de ácido úrico en plasma en los casos que en los controles. Así mismo no se encontraron diferencias significativas en cuanto a los niveles de, tocoferol, beta-caroteno y licopeno. En cuanto al metabolismo del hierro, en pacientes con enfermedad de Parkinson, se encontró depósitos de ferritina y transferrina significativamente mayores en los controles con un índice de saturación menor. El hierro no mostró cambios significativos.

Las conclusiones a las que llegaron los investigadores fueron que dichos resultados apoyan la teoría de que los mecanismos oxidativos están relacionados con la patogénesis de la enfermedad y a su vez muestran evidentes alteraciones de parámetros en sangre periférica, en concordancia con los encontrados en la sustancia negra. Los resultados de este estudio avalan la posible utilidad de estos biomarcadores junto con otros como método diagnóstico a investigar en el futuro y como método de pronóstico y seguimiento en los tratamientos farmacológicos, también avalan futuros estudios para encontrar nuevas dianas farmacológicas con las que combatir la enfermedad. ⁽²⁵⁾

Es necesaria la búsqueda de biomarcadores que solo o en conjunto puedan ayudar a diagnosticar el inicio precoz de la enfermedad, así como un correcto diagnóstico y distinción de esta patología de otras. Como resultado de la bibliografía revisada, se puede concluir que, debido a la complejidad de esta patología, sea necesario el estudio de varios biomarcadores proteicos junto a biomarcadores de imagen y bioquímicos para que se pueda encontrar un algoritmo que permita el diagnóstico correcto y precoz de la enfermedad para descubrir nuevas estrategias terapéuticas y dianas farmacológicas.

ESCLEROSIS MÚLTIPLE (E.M.):

La esclerosis múltiple (EM) es una enfermedad autoinmune crónica que afecta al sistema nervioso central, el daño neuronal se produce por diferentes procesos inflamatorios, desmielinizantes, se produce también daño axonal y neurodegeneración. La causa no se conoce, algunos estudios hablan de virus, genes dañados y causas ambientales, aunque podría ser una combinación de todas ellas. Las personas con antecedentes familiares tienen más riesgos de padecerla, además de personas que vivan en zonas endémicas. Se conocen tres tipos de EM, remitente-recurrente, primaria progresiva y secundaria progresiva. A falta de biomarcadores específicos, es necesario la aparición de un segundo brote para el diagnóstico de esta enfermedad. ⁽²⁶⁾

Para el diagnóstico de la esclerosis múltiple en 2001 se implantaron los criterios de McDonald, que fueron revisados en 2005. El objetivo de estos criterios como hemos visto en otras enfermedades es poder diagnosticar la patología de forma precoz para conseguir un abordaje terapéutico que mejore lo más posible la vida del paciente.

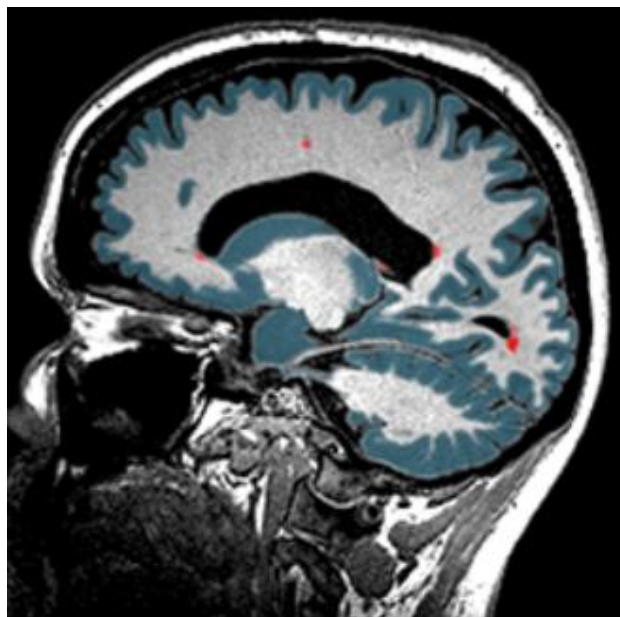
Estos criterios tienen alta especificidad y sensibilidad, estableciendo que para demostrar el diagnóstico es necesario que ocurran eventos separados en el tiempo y el espacio, estos eventos no pueden tener una explicación mejor que la esclerosis múltiple;

El diagnóstico puede basarse también en criterios clínicos e imágenes del sistema nervioso central, los criterios buscan sustituir, parcial o completamente, en algunas ocasiones los demás criterios. Los criterios además de en eventos, se basan en la apreciación de una serie de lesiones en ciertas partes que tienen que estar alejadas entre sí, estos criterios de imagen dependen de cómo se obtengan las imágenes. (27)

Para comprobar el diagnóstico es necesario además de las imágenes un examen físico para comprobar si existen otras causas posibles de las lesiones, los signos en patología no son iguales a los síntomas, los signos más importantes que puede encontrar los médicos son: movimiento ocular alterado, alteración de los reflejos, problemas de coordinación y espasticidad o debilidad en brazos y piernas. Además del examen físico se somete al paciente a unas pruebas diagnósticas con el fin de confirmar el diagnóstico, ya que al igual que pasa en otras enfermedades se sobrediagnóstica.

La prueba más determinante es la resonancia magnética, aunque en un 5% de los pacientes no se encuentran lesiones cerebrales, estas podrían estar en la médula o no ser visibles por la resonancia, para ello se realizan pruebas complementarias. Estas pruebas complementarias pueden ser pruebas eléctricas o determinar algunas proteínas del sistema inmunológico en el líquido cefalorraquídeo (LCR), de las que hablaremos en los siguientes párrafos. (26)

En la siguiente imagen aparecen señaladas en rojo diferentes lesiones desmielinizantes propias de la esclerosis múltiple obtenidas mediante una resonancia magnética. La resonancia magnética no emplea radiación, sino campos magnéticos potentes que interactúan con los átomos de hidrógeno del agua de los tejidos, estos átomos de hidrógeno emiten energía y los ordenadores la traducen a imágenes. (28)



Actualmente se está investigando en distintos tipos de biomarcadores que ayuden a prever el daño neuronal y la neurodegeneración, así como poder diagnosticar con prontitud la enfermedad.

Se están estudiando diferentes biomarcadores tanto en suero y LCR como en sangre periférica. Dado que el daño se produce por inflamación los estudios se están encaminando a la detección de niveles elevados o disminuidos de las moléculas proinflamatorias o moduladoras del sistema inmune, tanto con valor diagnóstico como valor pronóstico.

En el LCR podemos encontrar diferentes biomarcadores que pueden ayudar al diagnóstico diferencial de la enfermedad. Las bandas oligoclonales de Inmunoglobulina G (IgG) fueron el primer biomarcador utilizado descrito en pacientes con EM⁽²⁹⁾. Se encuentran en casi el 90% de los pacientes con EM y pueden indicar una síntesis intracraneal de IgG, sin embargo, no es específico de esta enfermedad, su utilidad se da en pacientes a los que se les ha descartado otra patología inflamatoria craneal.

Actualmente se utiliza de manera habitual, pero queda relegado al tipo de EM primaria progresiva, existen además diferentes determinaciones que van encaminadas a encontrar una alteración en la permeabilidad de la barrera hematoencefálica, pues esta se encuentra comprometida. Estas determinaciones consisten en hallar concentraciones de albúmina e IgG en suero y LCR y establecer un cociente.

En los últimos años se han estudiado los valores de quimiocinas y citocinas en los pacientes con EM, ya que estas moléculas tienen un importante papel en la regulación de los procesos inflamatorios.

La mayoría de los estudios constatan una elevación de las citocinas y quimiocinas que regulan la respuesta Th1 o sus receptores y la disminución o ausencia de cambios en las moléculas y receptores de respuesta Th2. Esta desregulación puede llevar a un proceso inflamatorio encargado de producir las lesiones neuronales y la desmielinización.

Existen además estudios que prueban el valor pronóstico y de respuesta al tratamiento de algunas de estas moléculas, por ejemplo, un aumento de Fas y MIF, es indicativo de un empeoramiento en el daño neurológico asociado con una degeneración neuronal progresiva y TNF-alfa y MCP1/CCL2 podrían ser útiles en la diferenciación de pacientes con la forma clínica primaria progresiva de EM. Una disminución de IL10 o de la expresión del ARNm de la IL10 en suero es indicativo de la respuesta al tratamiento.

Otra de las moléculas de estudiadas, aunque en menor medida son los factores de crecimiento, por su papel en el crecimiento tisular, la remodelación y reparación. El factor de crecimiento vascular A, encargado del crecimiento vascular, la hematopoyesis, formación ósea y desarrollo neural^(30,31,32), es un biomarcador válido

para el diagnóstico de Esclerosis Múltiple, ya que se encuentra disminuido en todas las formas clínicas.

Por otro lado, aunque no son válidos en la práctica clínica hay otros biomarcadores de interés en el estudio de Esclerosis Múltiple: bFGF (factor de crecimiento de fibroblástico básicos), que actúa como regulador del crecimiento, diferenciación, migración y supervivencia de progenitores gliales. Se ha visto aumentada en lesiones producidas por la enfermedad, también se ha visto una disminución del EGF, ⁽³³⁾ factor de crecimiento epidérmico) factor que actúa promoviendo la diferenciación de los oligodendrocitos, neuronas. Tanto estos estudios como los relacionados con la mayoría de las quimiocinas y las citocinas, no han sido válidos y muestran resultados contradictorios. No obstante, suponen un avance en la investigación y permiten establecer nuevas líneas de investigación para el futuro.

La conclusión a la que llegan la mayoría de investigadores es que la búsqueda de biomarcadores que nos permitan un diagnóstico precoz de la enfermedad es esencial para empezar el tratamiento y desarrollar nuevas estrategias terapéuticas. La RMN ha mejorado mucho el manejo de pacientes, ya que permite junto a los criterios de McDonald un diagnóstico precoz, pero es imposible con esta técnica diferenciar entre las formas clínicas, este hecho es crítico ya que las formas progresivas carecen de tratamiento eficaz y los que hay producen efectos adversos en los pacientes.

Por tanto, existen una necesidad de encontrar biomarcadores no invasivos específicos y seguros para diagnosticar con rapidez y predecir el avance con el fin de mejorar los tratamientos y que a su vez se pueda empezar lo antes posible el tratamiento y vaya dirigido específicamente a cada paciente, lo que permitirá reducir las lesiones y la discapacidad de los mismos, aumentando su calidad de vida y sus relaciones con otras personas.

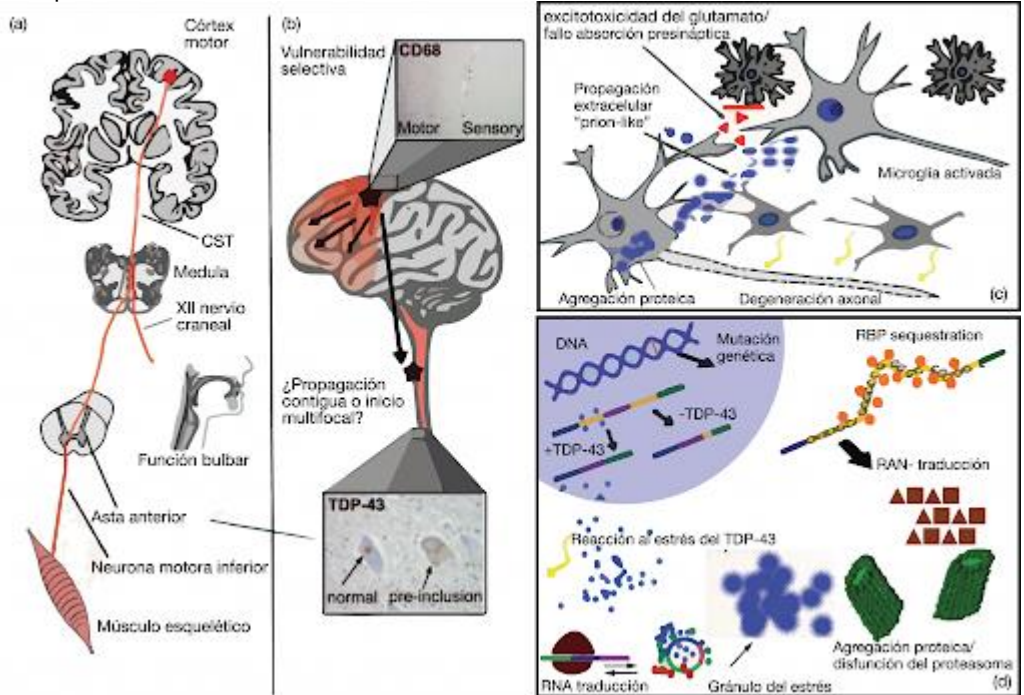
ESCLEROSIS LATERAL AMIOTRÓFICA (ELA)

La esclerosis lateral amiotrófica (ELA) es una de las enfermedades más comunes que afectan a las neuronas motoras. Es una enfermedad compleja y multisistémica en la que intervienen diferentes procesos biológicos.

Se caracteriza por una degeneración progresiva de las neuronas motoras en diferentes zonas del sistema nervioso, corteza cerebral, tronco del encéfalo y medula espinal. Consecuencia de ello se produce una atrofia muscular en diferentes partes del cuerpo que va avanzando debido a la falta de actividad, causada por dicha degeneración neuronal. Amenaza la autonomía motora del paciente, así como el habla, la deglución y finalmente la capacidad respiratoria.

Las investigaciones han concluido que las causas pueden ser exógenas más que genéticas, pero no se ha llegado a la conclusión de cuáles pueden ser dichas causas dietéticas o ambientales que produzcan esta enfermedad. Entre un 5% y 10% de los casos son de ELA familiar, se heredan de forma autosómica y dominante. Las diferencias entre la forma familiar y la forma esporádica, radican en la aparición de la enfermedad en más miembros de la familia, ya que la etiología es la misma. En el caso de la forma familiar suele aparecer de forma más temprana, unos diez años antes que la forma esporádica.

Imagen 7. Esquema de la ELA.



Hospital Universitario de Bellvitge – Aulas de salud

El diagnóstico de la ELA se basa en diversos datos clínicos que se exponen en la tabla adjuntada a continuación, además de estos datos el diagnóstico se completa con pruebas diagnósticas, como resonancia magnética, análisis del LCR, electromiograma... Esta prueba consiste en introducir un electrodo de aguja a través de la epidermis en diferentes músculos, lo que nos aporta datos de la actividad eléctrica cuando los músculos se contraen o están en reposo. También es muy útil realizar un diagnóstico diferencial, para descartar otras patologías como hernias, intoxicación por plomo o sífilis, ya que pueden tener signos y síntomas parecidos.

Tabla 8. Criterios diagnósticos de la ELA.

El diagnóstico de la ELA requiere la presencia de: (criterios positivos)
<ul style="list-style-type: none"> Las señales de la neurona motora inferior (incluyendo las características EMG en músculos no afectados) Señales de la neurona motora superior Progresión de síntomas y signos
El diagnóstico de ELA requiere la ausencia de (diagnóstico por exclusión):
<ul style="list-style-type: none"> Signos sensoriales Alteraciones del esfínter Alteraciones visuales Funciones autónomas Disfunción del ganglio basal Demencia de tipo Alzheimer Síndromes mímicos de ALS
El diagnóstico de ELA es apoyado por:
<ul style="list-style-type: none"> Fasciculaciones en una o más regiones Cambios neurogénicos en los resultados EMG Conducción normal del motor y del nervio sensorial Ausencia de bloqueo de conducción

EMG: Electromiografía. Fuente: Adaptado de la guía EFNS

Como se puede observar en la tabla y como pasa en casi todas las patologías neurodegenerativas, al necesitarse de unos criterios clínicos, dichos criterios son perceptibles por los médicos cuando el daño ya ha empezado en mayor o menor medida, es por esto que la búsqueda de marcadores que indiquen el estado preclínico de la enfermedad es la primera línea de investigación en la lucha contra estas patologías.

Como posibles marcadores encontramos: la estimulación magnética transcraneal que da una idea de la integridad neuronal de las motoneuronas superiores y diferentes técnicas que se basan en resonancias magnéticas que arroja luz sobre el estado del daño de estas neuronas, aunque aún no han alcanzado relevancia clínica. Es un proceso no invasivo por lo que se debería profundizar en su estudio no solo en esta patología sino en varias otras, ya que para el paciente resulta más cómodo que otros estudios que requieren de punciones.

En el plasma sanguíneo podemos utilizar los niveles de homocisteína, los niveles elevados promueven la muerte celular de diferentes tipos de neuronas. Se ha descrito una fuerte unión entre elevados niveles de esta sustancia en el plasma sanguíneo y la presencia de ELA y se sospecha estén relacionados con una mayor progresión de la enfermedad.⁽³¹⁾

Se ha estudiado también el balance oxidativo-anti oxidativo en los eritrocitos, ya que una menor actividad de enzimas que previenen y neutralizan especies reactivas de oxígeno (ROS) así como la disminución de sustancias antioxidantes como el glutathion se ven disminuidas entre los 6 y 24 meses de progreso de la enfermedad. Es por esto que se ha dedicado mucho tiempo de investigación a poder hallar diferentes biomarcadores que indiquen daño oxidativo y poder relacionarlo con la presencia de la enfermedad, además de conocer por qué estos mecanismos están aumentados y cómo afectan al desarrollo y al comienzo de la enfermedad. Si bien es cierto que estos marcadores resultan inespecíficos ya que se asocian con otras patologías como diferentes tipos de tumores ... lo ideal en estos casos sería asociar estos marcadores en un cuadro específico para la patología cuando se trata de marcadores de daño oxidativo.

En primer lugar, estas especies reactivas del oxígeno (ROS), son un producto del metabolismo celular, especies como el anión superóxido o el peróxido de oxígeno atacan a diferentes componentes celulares oxidándolos y empeorando su función llegando a desencadenar la apoptosis y la muerte celular. Es cierto que fisiológicamente existen mecanismos de defensa antes estas especies, se ha observado que algunos de ellos están alterados por mutaciones a nivel de los genes que las expresan, lo cual puede suponer un marcador de riesgo para sufrir la enfermedad.

Se ha observado que en la ELA se ve aumentado: el daño oxidativo en las proteínas (post-mortem respecto al control), hay un aumento de grupos carbonilo tanto en medula como en la corteza cerebral, (ELA esporádica y SOD1 familiar), aumento de la reactividad a 3-nitrotirosina de la raíz ventral de la medula espinal, aumento de la oxidación lipídica en neuronas motoras y células de la glía y aumento de 8-hidroxi-2'-desoxiguanosina, marcador de daño en el ADN, en médula espinal y sobre todo en la raíz ventral.

Por último se han estudiado diferentes marcadores genéticos que están relacionados con la ELA familiar y con el esporádica, algunos tienen que ver con la defensa frente al estrés oxidativo como SOD1, con el transporte vesicular como la proteína B asociada a VAMP, se ha visto que un aumento de la Alsina truncada, proteína que regula el tráfico endosomal y actividad de proteínas como Rac1, niveles bajos de esta Alsina truncada se asocian a pacientes menos graves; en relación al ELA esporádica se han estudiado mutaciones en el receptor 2 de inositol 1,4,5 trifosfato, una actividad superior entraña riesgo, varios polimorfismos del enzima dipeptidil dipeptidasa 6 se asocian con esta forma de la enfermedad. Otros marcadores genéticos incluyen defectos en genes mitocondriales (COX1, ARNt de la isoleucina), actividad de angiogenina reducida es un factor de riesgo selectivamente en pacientes de Escocia e Irlanda y ciertos polimorfos del VEGF, factor de crecimiento endotelial vascular. Así como el polimorfismo de la subunidad H, que codifica para la fracción pesada de los neurofilamentos. Muchos estudios están referenciando la utilidad de estos neurofilamentos para el diagnóstico de enfermedades como la ELA o la EM, tanto en LCR, aunque es más invasivo como en suero, comparándolo con un suero patrón. Estos neurofilamentos se encuentran exclusivamente en el sistema nervioso y nos ayudan a conocer el estado de la enfermedad y su progresión. ⁽⁶⁾

La esclerosis lateral amiotrófica, es una enfermedad de etiología múltiple sobre la que no se conoce mucho a día de hoy, además de requerir un diagnóstico tanto clínico como diferencial y estar soportado por diferentes pruebas de imagen y eléctricas a nivel muscular, todos estos factores hacen difícil la búsqueda de un solo biomarcador para toda una población, es por ello que los estudios se están centrando en un conjunto de factores que puedan ser específicos de esta enfermedad y ayuden a diagnosticarla de manera clara y prematura, aunque esta tarea sea complicada.

En esta búsqueda bibliográfica, se ha realizado un recorrido por el estado del diagnóstico de diferentes enfermedades neurodegenerativas, empezando por una definición general de la enfermedad, para poder abordar diferentes estudios que se han llevado o se están llevando a cabo sobre biomarcadores, tanto bioquímicos como de imagen para el diagnóstico prematuro y el pronóstico de estas enfermedades. Si bien es cierto que este tema se encuentra todavía en sus inicios, en algunas enfermedades como el Alzheimer, se están dando grandes y prometedores avances. Es muy complejo ya que en muchas enfermedades la etiología no se conoce, están implicadas varias causas y sus síntomas pueden confundirse con las de otras enfermedades.

Es por todas estas razones que encontrar un marcador para cada patología se hace imposible, las líneas de investigación se centran en hallar paneles de biomarcadores que juntos puedan ayudar o diagnosticar directamente estas patologías con el fin de poder abordarlas lo antes posible ofreciendo nuevas dianas terapéuticas, alivio a los enfermos y sus familias.

BIBLIOGRAFÍA

1. Biomarcadores y práctica clínica. I. Torres Courchoud y J.I. Pérez Calvo. Servicio de Medicina Interna. Hospital Clínico Universitario "Lozano Blesa". Instituto de Investigación Sanitaria de Aragón (IIS Aragón). Facultad de Medicina. Universidad de Zaragoza.
2. Arango SS. Biomarcadores para la evaluación de riesgo en la salud humana. Rev. Fac. Nac. Salud Pública 2011; 30(1): 75-82
3. Biomarcadores en las enfermedades neurodegenerativas. 15 marzo 2006. Dres. Henley SMD, Bates GP, Tabrizi SJ.
4. Biomarcadores para la Enfermedad de Alzheimer y otras demencias degenerativas. Martínez-Rivera M, Menéndez-González M, Calatayud MT, Pérez-Piñera.
5. <https://www.neurodegenerationresearch.eu/es/acerca-del-jpnd/que-es-una-enfermedad-neurodegenerativa/>
6. <https://www.fundela.es/FilesRepo/O/Y/E/B/RmesjSCaTY-biomarcadoresela.pdf>
7. Jack CR, Knopman DS, Jagust WJ, Shaw LM, Aisen PS, Weiner MW, et al. Hypothetical model of biomarkers of the Alzheimer's pathological cascade. Lancet Neurol 2010; January 9. [Epub ahead of print]. 32. Tapiola T, Overmyer M, Lehtovirta M, Helisalmi S, Ramberg J, Alafuzoff I, et al.
8. The model of cerebrospinal fluid tau correlates with neurofibrillary tangles in Alzheimer's disease. Neuroreport 1997; 8: 3961-3. 3
9. Blennow K, Hampel H, Weiner M, Zetterberg H. Cerebrospinal fluid and plasma biomarkers in Alzheimer disease. Nat Rev Neurol 2010; 6: 131-44.
10. (Blennow K, de Leon MJ, Zetterberg H. Alzheimer's disease. Lancet Neurology 2006; 368: 387-403.
11. Dubois B, Feldman HH, Jacova C, DeKosky ST, BarbergerGateau P, Cummings J, et al. Research model for the diagnosis of Alzheimer's disease: revising the NINCDS-ADRDA model. Lancet 2007; 6: 734-46
- 12.
13. https://scielo.conicyt.cl/scielo.php?pid=S0717-92272011000100008&script=sci_arttext
14. Borghi R, Marchese R, Negro A, Marinelli L, Forloni G, Zaccheo D, et al. Full length α -synuclein is present in cerebrospinal fluid from Parkinson's disease and normal subjects. Neurosci Lett 2000; 287: 65-7.
15. Morgan JC, Mehta SH, Sethi KD. Biomarkers in Parkinson's disease. Curr Neurol Neurosci Rep 2010; 10: 423-30.
16. Tokuda T, Salem SA, Allsop D, Mizuno T, Nakagawa M, Qureshi MM, et al. Decreased model synuclein in cerebrospinal fluid of aged individuals and

- subjects with Parkinson's disease. *Biochem Biophys Res Commun* 2006; 349: 162-6
17. Lee PH, Lee G, Park HJ, Bang OY, Joo IS, Huh K. The plasma α -synuclein levels in patients with Parkinson's disease and multiple system atrophy. *J Neural Transm* 2006; 113: 1435-9.
 18. El-Agnaf OMA, Salem SA, Paleologou KE, Cooper LJ, Court JA, Gibson MJ, et al. Detection of oligomeric forms of α -synuclein protein in human plasma as a potential biomarker for Parkinson's disease. *FASEB J* 2006; 20: 419-25.
 19. Álvarez-Erviti L, Rodríguez-Oroz MC, Cooper JM, Caballero C, Ferrer I, Obeso JA, et al. Chaperone-mediated autophagy markers in Parkinson disease brains. *Arch Neurol* 2010; 67: 1464-72. 57.
 20. Chu Y, Dodiya H, Aebischer P, Olanow CW, Kordower JH. Alterations in α -synuclein and proteasomal markers in Parkinson's disease: relationship to α -synuclein inclusions. *Neurobiol Dis* 2009; 35: 385-98.
 21. Wu G, Huang J, Feng X, Zhang A, Li J, Pang S, et al. Decreased α -galactosidase A gene in sporadic Parkinson's disease. *Neurochem Res* 2011; 36: 1939-44.
 22. Vijitruth R, Liu M, Choi DY, Nguyen XV, Hunter RL, Bing G. Cyclooxygenase-2 mediates microglial activation and secondary dopaminergic cell death in the mouse MPTP model of Parkinson's disease. *J Neuroinflamm* 2006; 27: 3-6. 71. Depboylu C, Schafer MKH, Arias-Carrión O, Oertel WH.
 23. Maetzler W, Berg D, Schalamberidze N, Melms A, Schott K, Mueller JC, et al. Osteopontin is elevated in Parkinson's disease and its absence leads to reduced neurodegeneration in the MPTP model. *Neurobiol Dis* 2007; 25: 473-82.
 24. LeWitt P. Recent advances in CSF biomarkers for Parkinson's disease. *Parkinsonism Relat Disord* 2012; 18 (Suppl 1): S49-51.
 25. ESTUDIO CASO-CONTROL DE MARCADORES DE ESTRÉS OXIDATIVO Y METABOLISMO DEL HIERRO PLASMÁTICO EN LA ENFERMEDAD DE PARKINSON (*) Rosa Larumbe Ilundáin (1), Jose Vicente Ferrer Valls, JJ Viñes Rueda, David Guerrero, Pablo Fraile .
 26. Biomarcadores predictivos en esclerosis múltiple Fernández Paredes L. universidad complutense de Madrid. Directoras Sánchez Ramón S. Pérez de Diego R. Madrid, 2017
 27. Polman C, Reingold S, Banwell B, Clanet M, Cohen J, Filippi M, et al. Diagnostic Criteria for Multiple Sclerosis: 2010 Revisions to the McDonald Criteria. *Ann Neurol*. 2011;69:292-302
 28. <https://fundaciongaem.org/diagnostico-de-la-esclerosis-multiple/>
 29. Noseworthy JH, Lucchinetti C, Rodriguez M, Weinshenker BG. Multiple Sclerosis. *N Engl J Med* [Internet]. 2000;343(13):938–52. Available from: <http://www.nejm.org/doi/full/10.1056/NEJM200009283431307%5Cnhttp://www.nejm.org/doi/pdf/10.1056/NEJM200009283431307>
 30. MSIF. Atlas of MS 2013: Mapping Multiple Sclerosis Around the World. *Mult Scler Int Fed*. 2013;1–28.
 31. WHO. Atlas: Multiple sclerosis resources in the world 2008. World Heal Organ. 2008;51.
 32. McCombe PA, Greer JM, Mackay IR. Sexual dimorphism in autoimmune disease. *Curr Mol Med* [Internet]. 2009 Dec [cited 2016 Feb 2];9(9):1058–79. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19747114>

Este trabajo tiene una finalidad docente. La Facultad de Farmacia y el/la Tutor/a no se hacen responsables de la información contenida en el mismo.