

Curso 2006/07  
**CIENCIAS Y TECNOLOGÍAS/21**  
I.S.B.N.: 978-84-7756-768-4

**M.<sup>a</sup> ASCENSIÓN ZEA SEVILLA**

**Polimorfismos genéticos,  
alteraciones del sistema fibrinolítico  
y la enfermedad desmielinizante**

**Directores**  
**FRANCISCO CARRILLO PADILLA**  
**RAFAEL MÉNDEZ MEDINA**



**SOPORTES AUDIOVISUALES E INFORMÁTICOS**  
**Serie Tesis Doctorales**

## *Agradecimientos:*

A los pacientes por su paciencia y colaboración.

Al Dr. D. Francisco Carrillo Padilla, que me dio la idea inspiradora y posteriormente me prestó su inestimable ayuda para llevar a cabo este proyecto. Gracias por haber sido pieza clave en mi formación, por ser un gran maestro, pero a la vez por ser también un gran compañero.

Y al Dr. D. Rafael Méndez Medina, tutor de los primeros años de esta nueva etapa académica y posteriormente, codirector de este proyecto.

Mi gratitud para la Sección de coagulación del Servicio de Hematología del Hospital Universitario de Canarias, pues me permitieron hacer las determinaciones plasmáticas de todos los factores de la coagulación objeto del estudio; así como a la Unidad de Investigación Clínica de la Facultad de Medicina de la Universidad de La Laguna, y su equipo de trabajo, por su inestimable ayuda para la realización de las determinaciones genéticas, uno de los grandes pilares de esta tesis.

Estoy también en deuda con la Dra. Trinidad Rufinos y con el Dr. Domingo Marrero quienes me ayudaron con el complejo mundo de la estadística.

A la Dra. Pilar de Juan, porque, sin duda, ha sido una pieza clave no sólo en mi formación como médico, sino también, en mi formación como persona. Gracias, por su apoyo, sus consejos y su sincera preocupación en los momentos difíciles.

A la Dra. M<sup>a</sup> Luisa Fernández Sanfiel, porque con su ayuda, este proyecto vio la luz en foros internacionales.

También al Dr. Nicolás Martínón, un gran ejemplo a imitar, como profesional y como persona.

No puedo olvidar en este apartado al Dr. Jesús Pérez Labajos, por su cercanía y por su incondicional ayuda, así como al resto de los compañeros del Servicio de Neurología.

Una especial mención debo realizar al Dr. José Hernández Peña, al Dr. Domingo Navajas, al Sr. Jorge Clavijo y al Sr. Higinio Marrero, miembros del equipo de Neurofisiología, por su ayuda en la realización cuidadosa de los estudios neurofisiológicos. Gracias compañeros.

A Nina, por su paciencia con cada uno de nosotros y por estar siempre dispuesta a escucharnos y a facilitarnos las tareas.

A Cristina Guerra, y a las familias Terrón y Palomo, por haberme ofrecido su amistad desde mi llegada a Tenerife, y hacer que me sintiera siempre como en familia. Gracias por cada uno de los momentos compartidos.

A mi tío Mariano, por estar siempre ahí, por sus sabios consejo, y por hacer que la distancia no existiera con su apoyo incondicional en los buenos y malos momentos.

Por último, y no por ello menos importante, dedicar también este trabajo a mi hermano Emilio. Gracias por estos años que hemos compartido.

*A las personas más significativas de mi vida, mis padres, y muy especialmente a mi padre, pues tener estas páginas entre sus manos es una ilusión cumplida.*

# ÍNDICE

## INTRODUCCIÓN

### A. *ESCLEROSIS MÚLTIPLE*

|   |    |
|---|----|
| Definición .....                        | 20 |
| Epidemiología .....                     | 20 |
| Fisiopatogenia .....                    | 21 |
| Genética de la Esclerosis Múltiple..... | 26 |

### B. *FACTORES DE LA COAGULACIÓN IMPLICADOS EN LA INFLAMACIÓN*

|     |  |    |
|-----|--|----|
| B.1 | Generalidades .....  | 32 |
| B.2 | Sistema fibrinolítico :  | 37 |
|     | 1.- Fibrinógeno .....  | 39 |
|     | 2.- Plasminógeno .....   | 39 |
|     | 2.1: Factores activadores del plasminógeno:                          | 39 |
|     | 2.1.1: activador tisular del plasminógeno (t-PA) .....               | 40 |
|     | 2.1.2: activador del plasminógeno tipo urokinasa (u-PA) .....        | 41 |
|     | 2.2: Factores inhibidores del plasminógeno                           | 41 |
|     | 2.2.1: inhibidor del activador del plasminógeno tipo 1 (PAI-1).....  | 41 |
|     | 2.2.2: inhibidor del activador del plasminógeno tipo 2 (PAI-2) ..... | 45 |
|     | 2.2.3: antiplasmina .....  | 45 |

|   |   |           |
|---|---|-----------|
| B.3   | Homocisteína .....  | <b>46</b> |
| <b>C. SISTEMA DEL FIBRINÓGENO Y SISTEMA NERVIOSO CENTRAL</b>  |   |           |
|   | Receptores de Fibrin(ógeno).....  | <b>49</b> |
|   | a). Proteínas ligantes del Fibrin(ógeno) .....  | <b>50</b> |
|   | b). Interrelación entre el sistema del fibrinógeno, el TNF- $\alpha$ y las<br>endotoxinas: Actuación sobre la microglía ..... | <b>53</b> |
|   | c). El fibrin(ógeno) en los procesos inflamatorios-desmielinizantes del<br>Sistema Nervioso Central (SNC) .....               | <b>57</b> |
| <b>D. SISTEMA DEL PLASMINÓGENO Y SISTEMA NERVIOSO CENTRAL</b> |   |           |
| D.1   | El plasminógeno.....  | <b>59</b> |
| D.2   | El activador tisular del plasminógeno (tPA).....  | <b>62</b> |
|   | a). Receptores lipoproteínicos de baja densidad (LRP) .....   | <b>65</b> |
|   | b). Receptor N-metil-D-aspartato (NMDA) .....   | <b>68</b> |
|   | c). Anexina II .....  | <b>68</b> |
| <b>E. SISTEMA DEL PLASMINÓGENO Y ESCLEROSIS MÚLTIPLE</b>      |   |           |
| E.1   | La implicación del tPA en la Encefalomiелitis Autoinmune Experimental<br>(EAE) .....  | <b>69</b> |
| E.2   | Modificación de los niveles de tPA/PAI en el LCR en pacientes afectados<br>de Esclerosis Múltiple .....                       | <b>72</b> |
| E.3   | Actividad del sistema fibrinolítico en las placas desmielinizantes .....  | <b>73</b> |
| E.4   | Activadores del plasminógeno y metaloproteinasas de la matrix:<br>mediadores de la desmielinización .....                     | <b>75</b> |

|   |  |           |
|---|--|-----------|
| E.5   | Polimorfismos del tPA-PAI y Esclerosis Múltiple .....  | <b>78</b> |
| <b>F. SISTEMA FIBRINOLÍTICO Y PATOLOGÍA NEUROLÓGICA</b> |  |           |
| F.1   | Relación entre el sistema del tPA-plasmina/y la patología cerebrovascular  | <b>79</b> |
| F.2   | Relación entre el sistema de tPA-plasmina y el dopaminérgico .....   | <b>85</b> |
| F.3   | Relación entre el sistema de tPA-plasmina y el abuso de fármacos y alcohol .....   | <b>85</b> |
| F.4   | Relación entre el sistema de tPA y los cuadros de ansiedad- stress .....   | <b>88</b> |
| F.5   | Relación entre el sistema del tPA-plasmina y la proteína amiloide (demencia de Alzheimer y la encefalopatía familiar con cuerpos de inclusión de neuroserpina) ..... | <b>89</b> |
| F.6   | Relación entre el sistema del tPA-plasmina y las crisis comiciales .....   | <b>90</b> |
| F.7   | Relación entre el sistema del tPA-plasmina y el sistema cerebeloso (aprendizaje) .....   | <b>92</b> |
| F.8   | Relación entre el sistema del tPA-plasmina y el Sistema Nervioso Periférico .....  | <b>93</b> |
| F.9   | Relación entre el sistema del tPA-plasmina/placas de desmielinización e infección por herpes virus en el Sistema Nervioso Central .....                              | <b>94</b> |
| G.  | <b>HOMOCISTEINA Y SISTEMA NERVIOSO CENTRAL</b> .....   | <b>95</b> |

## **OBJETIVOS**

## **MATERIALES Y MÉTODO**

|   |            |
|---|------------|
| 1.- Población de estudio: casos y controles ..... | <b>103</b> |
|---|------------|

|  |            |
|--|------------|
| 2.- Tamaño de la muestra .....                                       | <b>104</b> |
| 3.- Recogida de datos .....  | <b>104</b> |
| 4.- Variables a estudiar y su análisis: .....                        | <b>105</b> |
| a.- Variables descriptivas y análisis de la evaluación clínica ..... | <b>105</b> |
| b.- Análisis por neuroimagen .....                                   | <b>106</b> |
| c.- Estudio neurofisiológico .....                                   | <b>106</b> |
| d.- Estudio en sangre periférica .....                               | <b>106</b> |
| e.- Estudios en líquido cefalorraquídeo .....                        | <b>106</b> |
| f.- Estudio de trombofilia .....                                     | <b>106</b> |
| g.- Estudio genético .....   | <b>107</b> |
| 5.- Estudio estadístico .....  | <b>108</b> |

## ***ANEXOS***

|  |            |
|--|------------|
| 1.- Consentimiento informado del paciente .....                          | <b>113</b> |
| 2.- Criterios de Poser .....   | <b>115</b> |
| 3.- Criterios diagnósticos: Revisión de los criterios de McDonalds ..... | <b>116</b> |
| 4.- Formas clínicas .....  | <b>120</b> |
| 5.- Escalas de disfunción neurológica: EDSS, MSFC y SCRIPP .....         | <b>121</b> |
| 6.- Estudios de Neuroimagen (RMN).....                                   | <b>128</b> |
| 7.- Estudios de laboratorio (Líquido cefalorraquídeo) .....              | <b>129</b> |

|  |            |
|--|------------|
| 8.- Estudios neurofisiológicos: Potenciales evocados ..... | <b>130</b> |
|--|------------|

## *RESULTADOS*

|                                  |            |
|----------------------------------|------------|
| 1.- Análisis descriptivo .....   | <b>133</b> |
| 2.- Análisis univariante .....   | <b>139</b> |
| 3.- Análisis bivariante .....    | <b>153</b> |
| 4.- Análisis multivariante ..... | <b>177</b> |

## *DISCUSIÓN*

|   |            |
|---|------------|
| 1.- Sobre el análisis descriptivo .....               | <b>193</b> |
| 2.- Sobre el sistema plasminógeno (tPA y PAI-1) ..... | <b>194</b> |
| 3.- Sobre la homocisteína .....                       | <b>207</b> |
| 4.- Sobre otros factores de la coagulación            |            |
| a) Antitrombina III.....                              | <b>209</b> |
| b) Proteína C .....                                   | <b>210</b> |
| c) Proteína S.....                                    | <b>211</b> |
| d) Trombomodulina.....                                | <b>212</b> |

## *CONCLUSIONES*

## *BIBLIOGRAFÍA*

# *INTRODUCCIÓN*

Muchos de los factores y cofactores de la coagulación son constitutivos del Sistema Nervioso. Hasta la fecha, gran parte de los estudios recientes se han centrado en la relación entre el sistema fibrinolítico y la enfermedad cerebrovascular, máxime tras la aprobación del activador tisular del plasminógeno recombinado (rt-PA) como tratamiento del ictus isquémico en la fase aguda del infarto cerebral. Sin embargo, junto a ello, otros factores y cofactores de la coagulación, a través de su interacción sobre receptores críticos, participan en el desarrollo de procesos cerebrales esenciales, estando estrechamente relacionados tanto con procesos neurobiológicos como con la cascada inflamatoria.

Aunque a priori pudiera parecer que la relación entre el sistema de la coagulación y la Esclerosis Múltiple es inexistente, esto dista mucho de la realidad, pues existe una estrecha relación de algunos de los factores de la coagulación con receptores celulares de la importancia de los antagonistas del receptor N-metil-D-aspartato (NMDA), con citocinas de la relevancia de la TNF- $\alpha$  ó la IL-1, ó con metaloproteinasas de la matriz extracelular. También esta relación es estrecha por la localización de estos factores o cofactores en grupos celulares, neuronas y astrogía. Todo ello explica el porqué los factores de la coagulación llevan a cabo en el Sistema Nervioso una función independiente de la que habitualmente tiene en el torrente sanguíneo.

Un esfuerzo especial se está realizando para conocer cuáles serían los factores genéticos que predisponen al desarrollo de la Esclerosis Múltiple. En este sentido, la naturaleza en sí multifactorial de la Esclerosis Múltiple implica que un fenotipo clínico puede ser determinado por una multitud de mecanismos patogénéticos, y que en su desarrollo varios polimorfismos dentro de un locus pueden afectar a los niveles de producción de una determinada proteína relacionada con la inflamación. Por tanto, cabría preguntarse si la expresión de un determinado polimorfismo de los factores implicados en el sistema fibrinolítico pudiera favorecer el desarrollo de esta enfermedad. Así lo sugieren estudios preliminares (Luomala et al. 2000), si bien se carece de otros resultados que contrasten hallazgos obtenidos por dichos autores en otras poblaciones. De ahí que nuestro interés y esfuerzo se haya encaminado en dilucidar la

implicación de los factores y cofactores de la coagulación y de los polimorfismos del activador e inhibidor del activador del plasminógeno en la Esclerosis Múltiple.

### ***A. ESCLEROSIS MÚLTIPLE.***

La Esclerosis Múltiple, es una enfermedad crónica del Sistema Nervioso Central (SNC), que se caracteriza por la pérdida de la vaina de mielina que rodea a los axones neuronales en la sustancia blanca del cerebro y de la médula espinal, y cuya incidencia y prevalencia varía en relación al paralelo terrestre; con máxima incidencia entre latitudes 40° - 60° del hemisferio norte y la mínima a nivel del ecuador. Son muchos los estudios que han sido realizados con el fin de determinar que factores de riesgo podrían inducir o activar dicha enfermedad y, a partir de los conocimientos adquiridos mediante los estudios epidemiológicos, se han generado dos hipótesis complementarias referentes a la/s causas que originan la Esclerosis Múltiple:

1.- ***Hipótesis ambiental:*** Se presenta con mayor frecuencia en el sexo femenino, en la raza blanca, en ambientes urbanos, en grupos sociales con un nivel socioeconómico medio o alto. En función a la distancia del ecuador, tanto en el hemisferio norte como sur, se han determinado cuatro zonas de riesgo:

a) *Zona de alto riesgo:* cuando la prevalencia es mayor o igual a 30 casos por 100.000 habitantes. Dicha zona estaría comprendida entre las latitudes 43-65 grados latitud norte (que incluye poblaciones del norte de Europa y EEUU y Canadá), y entre 33-44 grados latitud sur (que incluye poblaciones de Australia y Nueva Zelanda).

b) *Zona de riesgo medio:* cuando la prevalencia es de 5-29 casos por 100.000 habitantes, y corresponde al sureste de EEUU, sur de Europa y zona meridional de Australia.

c) *Zona de bajo riesgo:* que corresponde a prevalencias de menos de 5 casos por 100.000 habitantes, e incluye a Asia, América Latina, África y regiones próximas al Ecuador.

España se incluiría en una *zona de riesgo medio-alto* (prevalencias de 53 a 65 por 100.000 habitantes). En la España insular se han completado cinco estudios, dos de ellos antiguos, realizados en la provincia de Las Palmas de Gran Canaria y en Lanzarote. Así, en la década de los ochenta, Sosa Enríquez (1983), halló una prevalencia 6 casos/100.000 habitantes.

Estas cifras bajas de prevalencia eran similares a las de la España continental de la época. Los tres estudios más recientes, sin embargo, han detectado prevalencias similares a las del continente: uno en las islas Baleares (Menorca), y los otros dos en las islas Canarias. En la isla de La Palma, Hernández MA., encontró una prevalencia de 42 casos/100.000 habitantes (Hernández 2002), y en las Palmas de Gran Canaria, Aladro Y. halló una prevalencia de 74 casos /100.000 habitantes (Aladro et al. 2005).

2.- **Hipótesis genética:** Los estudios genéticos de ligamiento y asociación, en realidad estudios caso-control, han identificado como un determinante genético para la Esclerosis Múltiple al complejo mayor de histocompatibilidad (CMH). Se localiza en el brazo corto del cromosoma 6. Este complejo codifica los antígenos del sistema de histocompatibilidad (HLA) que presentan los antígenos peptídicos a las células T.

La región clase II de este sistema, se asocia fuertemente con la Esclerosis Múltiple, en particular con el alelo DR2 y su correspondiente haplotipo (DRB1\*1501, DQA1\*0102, DQB1\*0602). Aparte de la región HLA, algunos estudios han identificado otros genes. Se incluye el gen en el receptor de la célula T (TCR) en el cromosoma 7; el locus de la cadena pesada de la inmunoglobulina en el cromosoma 19; y, en población fina, un gen ligado a la proteína básica de mielina en el cromosoma 18.

La **FISIOPATOGENIA** de la Esclerosis Múltiple es aún desconocida (**figura 1**). Los pero los estudios epidemiológicos y de laboratorio sugieren que es una enfermedad autoinmune, iniciada posiblemente por un agente infeccioso (un virus), que induce una respuesta inmune mediada por linfocitos T, en un individuo con una susceptibilidad genética (Noseworthy JH et al. 2000).

La desmielinización se produce cuando el sistema inmunitario es incapaz de impedir la activación de linfocitos T autoreactivos dirigidos frente a antígenos asociados a la mielina. La respuesta inflamatoria se activa cuando los receptores de los linfocitos T “helper”, forman un complejo trimolecular con las moléculas MHC de clase II en la superficie de una célula presentadora de antígeno y un péptido antigénico (un componente de la proteína de mielina). El complejo trimolecular activa al linfocito T “helper” iniciándose la secreción de interleucinas (IL) proinflamatorias (IL-2, TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ ) (Steinman et al. 1996; Rodríguez et al. 1996).

Se asume que la Esclerosis Múltiple es una enfermedad autoinmune porque en las lesiones desmielinizantes agudas aparecen linfocitos T colaboradores (CD4+), expresión anómala de los antígenos CMH clase II (macrófagos y astrocitos); así como la activación de las células B, demostrada por la presencia de inmunoglobulinas sintetizadas en el SNC, que dan lugar al hallazgo característico de bandas oligoclonales en el líquido cefalorraquídeo (LCR).

En la respuesta inflamatoria desmielinizante interviene el sistema inmune adaptativo, celular y humoral, que de forma somera describiremos.

En la Esclerosis Múltiple la predisposición hereditaria, combinada con un factor ambiental desconocido, establecen o mantienen a los linfocitos T autoreactivos. Éstos, tras un período de latencia de 10-20 años, serán activados por un factor sistémico o local (infección vírica, puerperio, etc.), mediante un mecanismo de mimetismo molecular. Así intervienen epítomos compartidos por la mielina y posibles agentes infecciosos (Trapo et al. 1998), o una estimulación a través de superantígenos víricos o bacterianos.

Los superantígenos son proteínas bacterianas o víricas que son capaces de unirse a la molécula HLA de la célula presentadora de antígenos fuera de la hendidura de unión antigénica, tal como describieron Prineas et al. (1993). Una vez activados, estos linfocitos T pasan selectivamente la barrera hematoencefálica (BHE), y al ser expuestos de nuevo a su autoantígeno, inician una reacción inflamatoria mediada por linfocitos Th-1. Además, se produce la amplificación epitópica (Lassmann y Wekerle 2006), consistente en que inicialmente los linfocitos T reconocen un epítomo de un antígeno. Con el paso del tiempo estas células reconocen, y, por tanto, se activan, además con otros epítomos del mismo antígeno, e incluso con otros antígenos.

El mecanismo por el cual los linfocitos T sistémicos penetran en el SNC es un proceso secuencial. Inicialmente, las citocinas proinflamatorias, interleucina-1 (IL-1), factor de necrosis tumoral  $\alpha / \beta$  (TNF  $\alpha / \beta$ ) e interferón  $\gamma$  (IFN  $\gamma$ ), inducen un aumento de la expresión de las moléculas de adhesión endotelial, E-selectina, molécula de adhesión intracelular (ICAM -1), y molécula de adhesión vascular (VCAM-1).

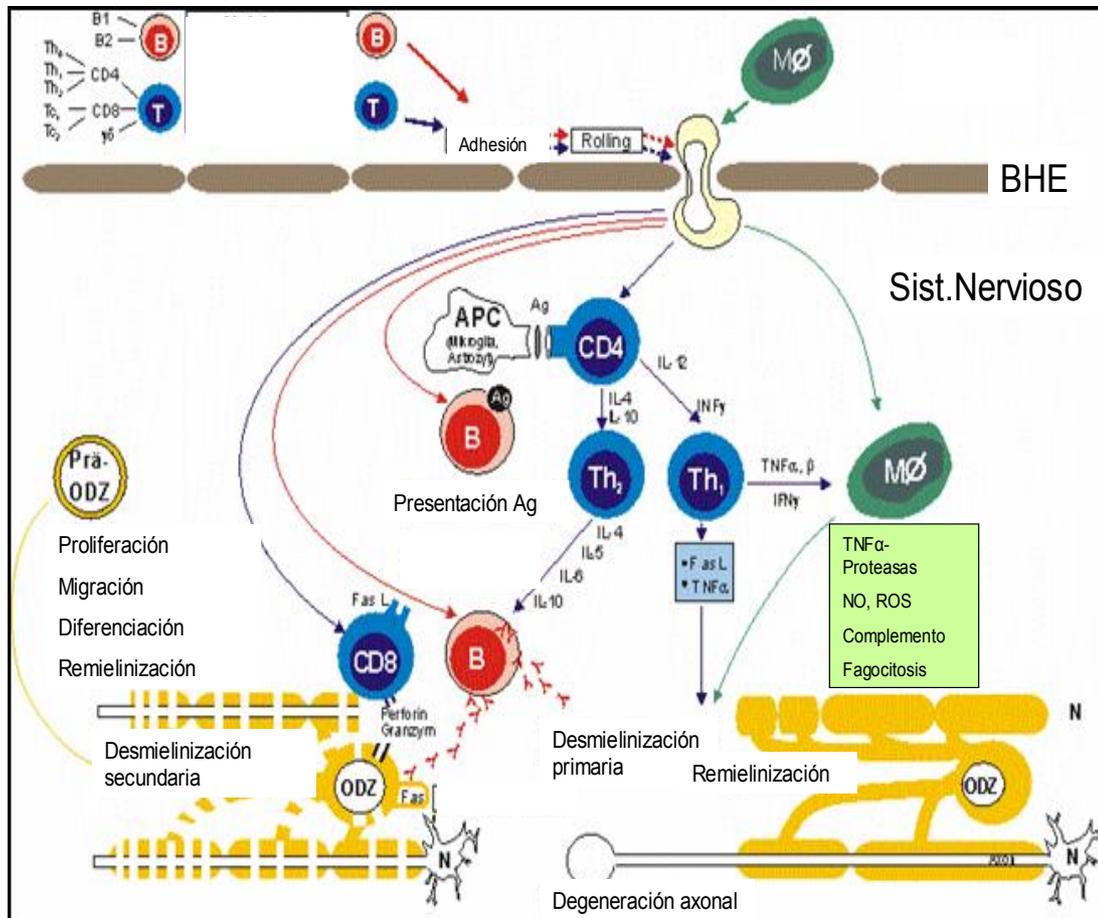
Las selectinas endoteliales establecen enlaces débiles con ligandos leucocitarios que hacen a los leucocitos rodar sobre la pared vascular en la dirección de la corriente sanguínea. El deslizamiento permite la activación y cambio conformacional de las integrinas leucocitarias, antígeno asociado a la función linfocitaria (LFA-1) y antígeno muy tardío (VLA-4). Así, las integrinas se unirán a sus respectivos ligandos (ICAM-1 y VCAM-1) mediante enlaces estables.

Entonces las células se deforman y atraviesan el endotelio. La extravasación ocurre, bien a través del endotelio, bien a través de las uniones celulares. Requieren la interacción de ICAM-1/LFA-1, así como la de otras moléculas de adhesión, y la producción linfocitaria de proteasas que degraden la matriz extracelular (metaloproteasas de la matriz o MMP-gelatinasa A o MMP-2, y la gelatinasa B o MMP9). En este momento desempeñan un papel importante las quimiocinas, citocinas quimioatrayentes, que son responsables del reclutamiento selectivo de células inflamatorias.

Una vez en el SNC, el linfocito T autorreactivo encontrará a una célula presentadora de antígeno (macrófago o microglía). Ésta expresa en su superficie el antígeno responsable de la Esclerosis Múltiple, en el contexto de una molécula HLA clase II y de las moléculas coestimuladoras, reactivándose. Las proteínas mielínicas del SNC implicadas en la autoreactividad de los linfocitos T incluyen: PBM (proteína básica de la mielina), MAG (glucoproteína asociada a la mielina), PLP (proteína proteolipídica), B-cristalina, transaldolasa, fosfodiesterasas, y otras proteínas no mielínicas, como las HSP (proteínas de choque térmico; Giovannoni y Hartung 1996), los antígenos astrocitarios (proteína S100), algunos antígenos endoteliales, y factores nucleares.

Así constituido el complejo trimolecular (receptor del linfocito T o TCR, el antígeno y la molécula HLA clase II), las células T reactivadas, que son de fenotipo colaborador CD4 tipo 1 (Th1), producen citocinas proinflamatorias (interferón  $\gamma$ , TNF  $\alpha$ , IL-1, IL-2, IL-12) y quimiocinas. Éstas inducen proliferación clonal del linfocito T y atraen a los macrófagos y a la microglía, activándolos, con lo que se pone en marcha la inflamación. Por otro lado, los linfocitos T colaboradores tipo 2 (Th2) liberan citocinas antiinflamatorias (IL4, IL-6, IL10, TGF) que tienden a regular a la baja el estado proinflamatorio del sistema inmune. Además inducen la proliferación de células B y la consecuente elaboración de anticuerpos por éstas.

**Fig. 1:** Fisiopatología de la Esclerosis Múltiple.



El equilibrio entre las distintas citocinas y de sus concentraciones determina en gran medida el sentido de la reacción inmune de todo el proceso. Además, los linfocitos T supresores (CD8+), y las células T que expresan el receptor "asesino natural", producen la disminución de la proliferación de los linfocitos T colaboradores (respuesta antiertotípica), así como inhibición de su activación (respuesta antiidiotípica). Contribuyen de este modo a la contrarregulación de la inflamación (Navikas y Link 1996; Martino y Hartung 1999).

La desmielinización puede producirse por diversos mecanismos. Incluyen los mecanismos de inflamación celular y humoral específica, mecanismos moleculares, así como mecanismos específicos de las células productoras de mielina, los oligodendrocitos.

Entre los mecanismos celulares destaca el ataque directo a los oligodendrocitos por los linfocitos T citotóxicos (TCR) que no tienen restricción CMH, y que están presentes en las lesiones (Lucchinetti et al. 1996; Lassmann et al. 1997; Storch y Lassmann 1997). Los oligodendrocitos son dañados gradualmente, como espectadores inocentes, por especies reactivas de oxígeno y de nitrógeno, excitotoxinas (glutamato), proteasas, y por la activación del sistema perforina/granzima. Otra posibilidad lesional es a través de mecanismos de apoptosis por medio de receptores de muerte celular CD45 (Fas) y TNF-R1.

Por otro lado, la inmunidad humoral también está presente en la patogenia de la Esclerosis Múltiple. La alteración de la barrera hematoencefálica permitiría el paso de anticuerpos circulantes al SNC (anticuerpos antiPBM, antiMOG, antiMAG, etc.). Éstos producirían desmielinización mediante la citotoxicidad mediada bien por células antígeno dependiente; bien mediante la activación del complemento, que pondría en marcha el complejo de ataque a la membrana; bien a través de la opsonización de la mielina, que promueve la fagocitosis mediante los macrófagos; o por último, mediante la atracción de los macrófagos y microglía que liberarían sustancias mielinotóxicas.

En cuanto a la remielinización de las placas agudas destacar que ésta se realizaría fundamentalmente a partir de las células progenitoras del oligodendrocito (OA2). La remielinización es incompleta debido, bien a que los episodios repetidos de desmielinización producirían la depleción de OA2, bien a que se produciría la muerte de los mismos por falta de factores de crecimiento específicos. Por último, también a que la hiperplasia astrocitaria podría inhibir la migración de los OA2.

Se han descrito la existencia de mediadores moleculares del daño a los oligodendrocitos: independientes de receptor y dependientes de receptor (Gonsette R. 2001). Entre los primeros destacan: a) especies reactivas de oxígeno (ROS) y de nitrógeno (RNS) tales como: el OH (radical hidróxilo libre), O<sub>2</sub><sup>-</sup> (anión superóxido), ONOO (peroxinitrito) y NO (óxido nitroso); b) excitotoxinas (glutamato); c) proteasas; d) sistema perforina/granzima. Entre los mediadores dependientes de receptor destacan los receptores de muerte: CD95 (Fas) y TNF-R1.

Por último, mencionar que los mecanismos patogénicos de la destrucción axonal presente en la Esclerosis Múltiple no se conocen bien; se sabe que puede ocurrir en fases tempranas de la

enfermedad y que estaría relacionada con la intensidad del proceso inflamatorio en las lesiones activas de desmielinización. Sin embargo, la lesión axonal podría ser en parte independiente de la actividad desmielinizante y estar involucrados mecanismos patogénicos diferentes (Gonsette R. 2001).

## **GENÉTICA DE LA ESCLEROSIS MÚLTIPLE**

La susceptibilidad a la Esclerosis Múltiple es compleja. Existen varias evidencias que sustentan la existencia de un componente genético. Así lo apoyaría la mayor incidencia de la enfermedad en nórdicos europeos en relación a poblaciones indígenas de la misma localización geográfica; la presencia de agregación familiar; y la carencia de un exceso de Esclerosis Múltiple en pacientes adoptados en el seno de una familia con la enfermedad. También lo apoya el que entre gemelos monocigóticos se haya sugerido la existencia de un riesgo en torno al 25-30%, y que éste sólo sea del 3-5% entre los gemelos dicigóticos o, únicamente, del 2-4% entre los pacientes con un familiar de primer grado afecto (Kantarci y Wingerchuk 2006).

Cinco grupos de genes han sido implicados:

1. Genes de los antígenos de las Células T humanas (HLA).
2. Genes de los Receptores de células T.
3. Genes de las moléculas accesorias que participan en la presentación de Antígenos.
4. Genes de las Citocinas.
5. Genes de los Autoantígenos.

### **1. Genes de los Antígenos de célula T humanas (HLA).**

La única asociación genética, consistente y convincente, observada en la Esclerosis Múltiple es con los alelos y haplotipos del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC) localizado en el cromosoma 6p21. Existen 3 tipos de HLA que se expresan en la región cromosoma (Cr.) 6p21.3.

Los HLA I presentan canales  $\alpha$  y  $\beta$ 2 microglobulina (acoplados en Cr.15) y a su vez los canales  $\alpha$  presentan 3 locus (HLA-A, HLA-B, HLA-C). Los HLA de clase II son también canales  $\alpha$  y  $\beta$  (HLA-DP, HLA-DQ, HLA-DR). Se han descrito las siguientes asociaciones:

***HLA-DR2 y Esclerosis Múltiple.***

Existen múltiples estudios que asocian los HLA-DR2 con la Esclerosis Múltiple en la población caucásica (Rasmussen et al. 2001; Ebers et al. 1996) y muy específicamente con determinadas regiones (DRB1\*1501, DRB5\*0101, DQA1\*0102 y DQB1\*0602). Rasmussen (2001), a través de un metaanálisis (europeo), observó la existencia de un efecto aditivo con el haplotipo DRB1\*1501, frente al efecto protector independiente a la asociación DR2 del haplotipo DR1 (Francis et al. 1991), del DR6 (Haegert et al. 1996; Laaksonen et al. 2002) y del DR7 (Haegert et al. 1996). Otros estudios en poblaciones como la asiática no han revelado relación entre el alelo DRB1\*1501 y la Esclerosis Múltiple. Estos datos hablan a favor de la diferente patogenia en función de las razas (Kira et al. 1996), e incluso de la existencia de diferencias en sujetos de la misma población. Estos estudios han revelado que los sujetos con haplotipo DR4 tienen mayor susceptibilidad de padecer una Esclerosis Múltiple, y sugieren la existencia de diferencias inmunogenéticas entre las diferentes poblaciones.

***HLA-III y Esclerosis Múltiple.***

El HLA-III tiene un punto de unión al gen del TNF- $\alpha$ . Este gen parece participar muy activamente en la susceptibilidad y severidad de presentar Esclerosis Múltiple. Sin embargo, existen hallazgos a favor (Kira et al. 1997) y en contra (Fugger et al. 1990; García-Merino 1996; He et al. 1995) de su participación. Junto a los anteriores existe también un estudio a favor de la existencia de una mayor susceptibilidad independiente del HLA DRB1\*1501 del promotor polimórfico del TNF-376 (Fernández-Arquero et al. 1999).

En todo caso, el consorcio internacional de genética en Esclerosis Múltiple (IMSGC 2005), analizó más de 4500 polimorfismos en 730 familias, y de los datos extraídos, reciente meta-análisis, sólo resultó ser significativo el HLA DRB1\*1501.

## **2. Genes de los Receptores de células T (TCR).**

Los genes de los TCR- $\alpha$  están situados en el cromosoma 14 y los TCR- $\beta$  en el cromosoma 7q35. Presentan marcadores polimórficos que pueden influir sobre la función de los TCR y son potencialmente un impulso de las células T autoreactivas. Aunque numerosos estudios sobre los polimorfismos de los TCR conducen a la susceptibilidad a padecer Esclerosis Múltiple en relación a los TCR-  $\alpha$  y  $\beta$  (Seboun et al. 1999; Martínez-Naves 1993; Buhler et al. 2000), existen discrepancias (Wei et al. 1995; Vandevyver et al. 1994; Droogan et al. 1996) muy probablemente en base a factores étnicos y genéticos.

## **3. Genes de las moléculas accesorias que participan en la presentación del Antígeno.**

a) El gen de la molécula ICAM-1 se localiza en el cromosoma 19. Aunque en 1998 el estudio de Mycko et al. sobre el riesgo de Esclerosis Múltiple en una población polaca puso de manifiesto una relación estrecha entre ésta y la molécula de adhesión ICAM-1, sin embargo, estos resultados no han sido reproducidos en población germánica (Killestein et al. 2000) ni en nórdica.

b) El gen del CTLA-4 está localizado en el cromosoma 2q33. En población nórdica se ha relacionado con una mayor susceptibilidad de Esclerosis Múltiple (Harbo et al. 1999; Ligers et al. 1999).

c) El gen que codifica el CD45 (proteína tirosin-fosfatasa transmembrana) que participa de la unión entre el receptor de Linfocito T y la célula presentadora de Ag. también se ha visto implicado en la susceptibilidad para la Esclerosis Múltiple (Jacobsen et al. 2000). Dicha susceptibilidad a su vez aumenta en sujetos que presentan también una sobreexpresión del CTLA-4, pues la disregulación sobre la respuesta de las células T es mayor y, por tanto, mayor la susceptibilidad y la agresividad de la Esclerosis Múltiple.

## **4. Genes de las Citocinas.**

En los sujetos afectos de Esclerosis Múltiple existe un aumento en la producción de citocinas Th1 y Th2 en el LCR (Calabresi et al. 1998; Monteyne et al. 1998) y en las lesiones (Baranzini et al. 2000; Connella et al. 1995). Por ello el gen implicado en la expresión de IL-1 se

ha relacionado con la mayor susceptibilidad y severidad de la Esclerosis Múltiple (De la Concha et al. 1997). Dicha implicación no es tan tácita en otras publicaciones (Niino et al. 2001).

Un estudio con Esclerosis Múltiple e IL-4 puso de manifiesto que las modificaciones en esta última modificaba la edad de inicio de Esclerosis Múltiple (Fedetz et al. 2001), por lo que el gen implicado en la secreción de dicha proteína podía influir en el curso y severidad de la enfermedad (Vandenbroek et al. 2000).

Por último, un estudio con el gen del IFN- $\gamma$ , encontró asociación entre la Esclerosis Múltiple y las variantes DR3/DR4 (-), pero no fue así en sujetos nórdicos (Milterski et al. 1999). También hubo una relación significativa entre Esclerosis Múltiple y INF- $\alpha$  (Milterski et al. 1999) y el TGF- $\beta$ 1 (Green et al. 2001).

## **5. Genes de los Autoantígenos.**

Los propios componentes protéicos que componen la mielina, a veces, pueden comportarse como autoantígenos en la Esclerosis Múltiple. La proteína básica de la mielina (PBM), es el mayor componente protéico de la mielina en el SNC y es el mayor candidato a comportarse como autoantígeno. El gen de la PBM, está en el cromosoma 18q22-23, y la expresión de esta se ha implicado, en múltiples estudios, con el riesgo y severidad de Esclerosis Múltiple (Boylan et al. 1990; Tienari et al. 1998; Guerini et al. 2000).

La glucoproteína mielínica oligodendrocítica (MOG) es, por el contrario, la menor de las proteínas que constituyen la mielina y, aunque también pudiera comportarse como autoantígeno en la Esclerosis Múltiple, los estudios existentes no muestran asociación entre Esclerosis Múltiple y la MOG (Rodríguez 1997).

## **6. Futuros genes.**

Junto a los datos existentes existen muchos estudios genéticos que intentan relacionar determinados genes con la susceptibilidad, la progresión y la severidad de la Esclerosis Múltiple. La Apolipoproteína (Apo) E, es una molécula implicada en múltiples e importantes procesos biológicos. La Apo E tiene tres formas alélicas apoE4, E3, E2 pero es la primera, la apoE4, la que se asocia con el incremento del riesgo de aterotrombosis, de desarrollar una enfermedad de

Alzheimer y con la Esclerosis Múltiple. Parece que su presencia es un factor de mal pronóstico (Fazekas et al. 2001; Schmidt et al. 2002) y, aunque su mecanismo de acción aún es incierto, pudiera estar en relación en la reducción de la capacidad de remielinización.

Dos estudios sugieren que también el gen del promotor de las IL-1 $\beta$  determina el pronóstico de la Esclerosis Múltiple (Kantarci y Wingerchuk 2000; Schrijver et al. 1999), pero otros no han determinado una asociación significativa con su severidad, y, muestra de ello son los estudios realizados con los genes de B7, CTLA-4, IL-10 e IL-4.

*Tabla 1. Estudios de susceptibilidad genética (Tabla resumen).*

| <b>Genes</b>                          | <b>Cromosoma</b> | <b>Población</b> | <b>Resultados (-)</b>   | <b>Resultados (+)</b> |
|---------------------------------------|------------------|------------------|-------------------------|-----------------------|
| <b><i>Activación linfocitaria</i></b> |                  |                  |                         |                       |
| HLA DR2                               | 6p21.3           | Caucásica        |                         | Rasmussen et al 2000  |
| TCR $\beta$                           | 7q35             | Americana        |                         | Beall et al. 1989     |
|                                       |                  | Americana        |                         | Seboun et al. 1989    |
|                                       |                  | Danesa           | Fugger et al. 1990      |                       |
|                                       |                  | Sueca            | Hiller et al. 1991      |                       |
|                                       |                  | Americana        | Lynch et al. 1991       | Beall et al. 1993     |
|                                       |                  | Española         |                         | Martinez et al. 1993  |
|                                       |                  | Belga            | Vandevyver et al. 1994  |                       |
|                                       |                  | Americana        | Wei et al. 1995         |                       |
|                                       |                  | Germana          |                         | Epplen et al. 1997    |
|                                       |                  | Finlandesa       | Wansen et al. 1997      |                       |
| CTLA-4                                | 2q33             | Australiana      |                         | Buhler et al. 2000    |
|                                       |                  | Sueca            |                         | Ligers et al. 1999    |
|                                       |                  | Noruega          |                         | Harbo et al. 1999     |
| B7-1                                  | 3q13.3-q21       | Americana        | Weinshenker et al. 2000 |                       |
| ICAM-1                                | 19p13.3-p13.2    | Polaca           |                         | Mycko et al. 1998     |
|                                       |                  | Sardinia         | Marrosu et al. 2000     |                       |
| CD45                                  | 1q31-q32         | Germana          |                         | Jacobsen et al. 2000  |

| <b>Genes</b>                           | <b>Cromosoma</b> | <b>Población</b> | <b>Resultados (-)</b>    | <b>Resultados (+)</b>   |
|--|------------------|------------------|--------------------------|-------------------------|
| <b><i>Quimiotaxis leucocitaria</i></b> |                  |                  |                          |                         |
| CCR                                    | 3p21-24          | Australiana      | Bennetts et al. 1997     |                         |
|  |                  | Caucásica        | Barcellos et al. 2000    |                         |
| MCP-3                                  | 17q11.2          | Sueca            |                          | Fiten et al. 1999       |
| <b><i>Citocinas</i></b>                |                  |                  |                          |                         |
| IL-1RA                                 | 2q14-q21         | Sueca            | Huang et al. 1996        |                         |
|  |                  | Española         |                          | De la Concha et al.1997 |
|  |                  | Finlandesa       | Cansen et al. 1997       |                         |
|  |                  | Italiana         |                          | Sciacca et al. 1999     |
|  |                  | Británica        | Feakes et al. 2000       |                         |
|  |                  | Americana        | Kantarci et al. 2000     |                         |
| IL-1 $\beta$                           | 2q14-q21         | Finlandesa       | Wansen et al. 1997       |                         |
|  |                  | Británica        | Feakes et al. 2000       |                         |
|  |                  | Americana        | Kantarci et al. 2000     |                         |
| IL-2                                   | 4q26-21          | Sueca            | He et al. 1998           |                         |
|  |                  | Francesa         | Reboul et al. 2000       |                         |
|  |                  | Británica        | Feakes et al. 2000       |                         |
| IL-4                                   | 5q23-31          | Sueca            | He et al. 1998           |                         |
|  |                  | Francesa         | Reboul et al. 2000       |                         |
| IL-6                                   | 7p21             | Italiana         | Vandenbroeck et al. 2000 |                         |
|  |                  | Germana          | Schmidt et al. 2000      |                         |
|  |                  | Francesa         | Reboul et al. 2000       |                         |
| IL-10                                  | 1q31-q32         | Sueca            | He et al. 1998           |                         |
|  |                  | Caucasica        | Pickard et al. 1999      |                         |
|  |                  | Germana          | Maurer et al. 2000       |                         |
| Interferón- $\beta$                    | 9p21             | Germana          | Miterski et al. 1999     |                         |
| Interferón- $\alpha$                   | 9p21             | Germana          | Miterski et al. 1999     |                         |
| Interferón- $\gamma$                   | 12q14-15         | Sueca            | He et al. 1998           |                         |

| Genes                                | Cromosoma   | Población  | Resultados (-)        | Resultados (+)     |
|--------------------------------------|-------------|------------|-----------------------|--------------------|
| <b><i>Actividad proteolítica</i></b> |             |            |                       |                    |
| Gelatinasa B                         | 20q11.2-q13 | Sueca      | Nelissen et al. 2000  |                    |
|                                      |             | Sardinia   | Nelissen et al. 2000  |                    |
| TIMP-3                               | 22q12       | Británica  | Chataway et al. 1999  |                    |
| <b><i>Autoantígenos</i></b>          |             |            |                       |                    |
| MPB                                  | 18q22-q23   | Canadiense |                       | Boylan et al. 1990 |
|                                      |             | Caucásica  | Barcellos et al. 1997 |                    |
|                                      |             | Sueca      | He et al. 1998        |                    |
|                                      |             | Caucásica  | Seboun et al. 1999    |                    |
|                                      |             | Francesa   | Coppin et al. 2000    |                    |
|                                      |             | Italiana   |                       | Guerini et al 2000 |
| MAG                                  | 19q13.1     | Británica  | Chataway et al. 1999  |                    |

*TCR*: receptor de LT, *CTLA-4*: Ag linfocitario citotóxico T, *ICAM-1*: molécula de adhesión, *IL-1*: interleucina 1, *CCR5*: receptor de quimiocina 5, *MPC-3*: proteína quimiotáctica de monocitos, *TIMP*: inhibidor tisular de las metaloproteinasas, *MPB*: proteína básica de la mielina, *MAG*: glicoproteína asociada a la mielina.

## ***B. FACTORES DE LA COAGULACIÓN SANGUÍNEA IMPLICADOS EN LA INFLAMACIÓN.***

### **B.1 GENERALIDADES.**

La coagulación y la fibrinólisis forman parte del sistema de defensa biológico celular al actuar a través de receptores de superficie y receptores plasmáticos. Activan reacciones en cascada enzimáticas y regulan con ello algunas interacciones célula-célula y célula-matriz extracelular. Los mecanismos que intervienen en el proceso de la fibrinólisis no sólo participan en la coagulación sanguínea, sino que también actúan en otros procesos vitales, tales como la angiogénesis, la migración celular, la ovulación, la inflamación, la reparación tisular y la

cicatrización; e incluso, median en procesos fisiopatológicos como la aterosclerosis y la metastatización tumoral.

La homeostasis, definida por Virchow en el siglo pasado, es el resultado del perfecto equilibrio de un elevado número de interacciones entre los componentes de la sangre y las paredes de los vasos sanguíneos.

Cuatro son los componentes de la homeostasis:

1. El endotelio y subendotelio vascular.
2. Las plaquetas y células sanguíneas.
3. La coagulación y anticoagulación.
4. La fibrinólisis y antifibrinólisis.

Y, a su vez, los componentes de este frágil y delicado equilibrio, pueden también dividirse de forma secuencial siguiendo a Standinger et al. (1996) en:

1. Hemostasis primaria: que comprende la interacción con la pared del vaso, plaquetas y algunos factores de la coagulación, dando lugar a la formación del coágulo.
2. Coagulación: proceso enzimático que se desarrolla sobre la pared del vaso o sobre las superficies celulares, bajo la influencia de distintas acciones reguladoras y que finaliza con la formación de un trombo hemostático de fibrina.
3. Cicatrización: mediante la proliferación de fibroblastos y sistemas de colágeno.
4. Fibrinólisis: proceso enzimático por el que se eliminan los trombos de fibrina, facilitando la recanalización vascular y que se desarrolla también bajo la influencia de distintas acciones reguladoras.

La fase plasmática de la coagulación consiste en un conjunto de reacciones proteolíticas cuya finalidad es transformar el fibrinógeno (factor I) en fibrina insoluble, mediante la acción de la enzima trombina (factor II).

Según la iniciación del proceso se distingue una vía intrínseca, desencadenada por el contacto del plasma con el endotelio vascular alterado o una superficie extraña. Y una vía extrínseca, o activada por la rotura de continuidad de la superficie endotelial o el paso de sustancias tromboplásticas.

Existen sustancias endógenas que tienden a autolimitar el proceso coagutivo, siendo el más conocido el de antitrombina III (AT-III), proteína que inactiva, entre otros, los factores II activado (IIa) y X activado (Xa) (Standinger et al. 1996).

Pero para que la fibrina insoluble se forme a partir del fibrinógeno, se precisa la actuación de su enzima específica, la trombina, que circula de forma inactiva como protrombina, y cuya activación la producen conjuntamente los factores V y X activados, junto con el calcio y el factor plaquetario 3.

#### **Vía extrínseca de la coagulación:**

La coagulación in vivo es iniciada por el factor tisular o tromboplastina tisular, una glicoproteína transmembrana presente en la superficie de muchos tipos celulares (vasculares), que se localiza fundamentalmente en la pared de los vasos vertiéndose a la sangre tras la lesión de estos. Estudios recientes también han demostrado que ciertas citocinas pueden inducir dicha expresión sin que medie daño en el endotelio vascular (Poskitt TR y Poskitt PK 1985; Csako et al. 1988).

Cuando en el torrente circulatorio aparece la tromboplastina tisular procedente de tejidos lesionados, ésta se une al factor VII en presencia de calcio, activándola. Dicho complejo en presencia de calcio y fosfolípidos aniónicos (PL), permitirá, al igual que en la vía intrínseca, la activación del factor X.

#### **Vía intrínseca de la coagulación:**

La coagulación sanguínea se inicia al activarse el factor XII estimulado por distintas sustancias o por complejos antígeno-anticuerpo, bajo la coacción de la calicreína y el quiminógeno de elevado peso molecular. Y se continúa al activarse sucesivamente los factores

XI, IX, VIII, en presencia de calcio, y utilizando como fosfolípido el factor 3 plaquetario (Baker y Levin 1998).

**Vía común de la coagulación:**

Se inicia con la activación del factor X que puede producirse por el complejo IXa-VIIIa-Ca-PL (vía intrínseca) o el complejo tromboplastina tisular-VIII-Ca-PL (vía extrínseca).

De uno u otro origen, la formación de tromboplastina concluye una vez alcanzada la activación del factor Stuart Power, el cual, junto con el factor V, y en presencia de Ca y PL, constituye el detonante para la producción de trombina.

**La trombinoformación :**

La protrombina circulante (factor II) permanece inactiva mientras no recibe la orden proveniente del factor X activado a través de la vía común, para convertirse en trombina. Una vez formada la trombina ya es imparable el fenómeno de la coagulación.

Igualmente, de forma paralela, la trombina también dispara el proceso de anticoagulación. De esta forma, se alcanza el equilibrio hemostático entre la fluidez sanguínea y el trombo autocontrolado.

**La fibrinomodulación:**

El factor I, fibrinógeno, es un homodímero de un heterotrímero que contiene dos cadenas  $A\alpha$ , dos  $B\beta$  y dos  $\gamma$ , que sufrirá su transformación en una red soluble de fibrina, que encierra entre mallas los elementos formes de la sangre. El paso de fibrinógeno a fibrina ocurre específicamente bajo el control de la trombina. Este potente procoagulante, en presencia de calcio, también es el activador del factor XIII; el cual, una vez activado, convierte el coágulo de fibrina en un trombo ya estable capaz de detener de forma definitiva la hemorragia (Baker y Levin 1998).

---

**La autorregulación de la coagulación:**

Si no existiesen mecanismos fisiológicos de anticoagulación, el potente efecto fibrinoformador de la trombina sería imparable. Y, a diferencia de los factores anticoagulantes patológicos, que actúan sobre factores no activados, los anticoagulantes naturales son específicos de los factores activados. Destacaremos aquellos factores relacionados con nuestro estudio.

**a) Antitrombina III (AT-III).**

La Antitrombina III, también llamada cofactor I de la heparina, está codificada por un gen localizado en el cromosoma 1q23-25. Actúa frente a la trombina formando complejos 1:1, en los cuales el centro activo del enzima queda inactivado. También puede actuar sobre otras serinas proteasas y otros factores de la coagulación como el XII, XI, X, IX activados.

**b) Sistema de las Proteínas S y C.**

La acción anticoagulante de la proteína C y S está dirigida frente a los factores V y VIII activados, pero también poseen actividad fibrinolítica al contrarrestar al inhibidor del activador tisular del plasminógeno (PAI-1).

La proteína C se activa por acción de la trombina, para lo cual se necesita que ésta esté unida a la trombomodulina, receptor de la trombina en la célula endotelial.

La proteína S es una glicoproteína, vitamina K dependiente, sintetizada en el hígado, células endoteliales y megacariocitos, que circula unida a la proteína C4b en un 60%, mientras que el 40% restante constituye la forma funcionalmente activa que actúa como cofactor de la proteína C. Por ello las alteraciones en este sistema originan un estado de hipercoagulabilidad, aumentando el riesgo de trombosis (Pedersen-Bjergaard et al. 1997).

**c) Trombomodulina.**

La trombomodulina es una glicoproteína asociada a la membrana de las células vasculares. Está codificada por un gen localizado en el cromosoma 20. Actúa como receptor que internaliza a la trombina por endocitosis. Tiene dos efectos diferentes de inhibición de la coagulación. Por un lado, inhibiendo la capacidad de la trombina de convertir enzimáticamente

---

el fibrinógeno en fibrina, y por otro, la conversión del zimógeno de la proteína C en una proteína C activada.

*d) Otros anticoagulantes naturales.*

Entre ellos, y de nuestro interés, mencionaremos a las nexinas 1 y 2. Las nexinas (Kappa et al. 1987) pertenecen a la familia de las serpinas, que actúan como inhibidores endógenos de las serinas-proteasas, ejerciendo también efectos sobre la coagulación.

El papel fisiopatológico de la nexina 1 parece estar en relación con la protección de la matriz extracelular frente a la degradación por la urokinasa y el activador del plasminógeno (Kappa et al. 1987). La nexina 2, a diferencia, sólo ejerce un papel en la regulación de la coagulación.

## **B.2 SISTEMA FIBRINOLÍTICO.**

El sistema fibrinolítico podemos definirlo como un mecanismo de defensa natural del organismo, que elimina la formación de coágulos, asegurando así la fluidez circulatoria. Su activación se lleva a cabo por la acción coordinada de activadores e inhibidores, manteniendo un equilibrio dinámico con el sistema de coagulación para asegurar la permeabilidad vascular (Bick et al. 1992). De la fibrinólisis/antifibrinólisis depende la fluidez de la sangre. Su importancia fisiopatológica deriva de las alteraciones que condicionan un exceso de activación, que implicaría tendencia al sangrado; como se ha observado en individuos con deficiencia de antiplasmina o del inhibidor del activador tisular del plasminógeno (PAI-1), ya que ambos son inhibidores del sistema (Schorr et al. 1997). Sin embargo, es más frecuente encontrar un defecto de la misma, como ocurre por un déficit de plasminógeno, o de su activador, o un exceso de PAI-1; que llevaría a una tendencia trombótica desmesurada. No obstante, hoy sabemos que la destrucción de la fibrina es tan sólo una de las diversas funciones del sistema fibrinolítico, cuyos principales componentes mostramos en la siguiente tabla:

**Tabla 2.** Composición y síntesis de los componentes relacionados con el sistema fibrinolítico.

| Componente         | Concentración           | Síntesis          |
|--------------------|-------------------------|-------------------|
| Plasminógeno       | 1-1,5 $\mu\text{mol/L}$ | Hígado            |
| tPA activo         | 10 $\text{pmol/L}$      | Endotelio         |
| scuPA              | $\zeta$                 | Riñón             |
| Antiplasmina       | 1 $\mu\text{mol/L}$     | Hígado            |
| PAI-1              | 0,3 $\text{nmol/L}$     | Múltiples órganos |
| PAI-2              | No aplicable            | Placenta          |
| Vibronectina       | 3-4 $\mu\text{mol/L}$   | Hígado            |
| uPAR               | $\zeta$                 | Múltiples órganos |
| Receptor de manosa | No aplicable            | Hígado            |
| LRP                | No aplicable            | Hígado            |

tPA: activador tisular del plasminógeno; scuPA: prourokinasa; PAI-1: inhibidor 1 del activador del plasminógeno; PAI-2: inhibidor 2 del activador del plasminógeno; uPAR: receptor del activador del plasminógeno urokinasa; LPR: receptor de las lipoproteínas de baja densidad;  $\zeta$  desconocido.

Otra de las actividades del sistema fibrinolítico es la activación de las metaloproteinasas. Éstas, a su vez, poseen la capacidad de degradar las matrices extracelulares, siendo éste un mecanismo importante en el remodelado de los tejidos (ej. cicatrización), en los mecanismos implicados en la migración celular (Kobrinisky et al. 1984) y en el crecimiento invasivo.

En los últimos años se ha realizado un gran esfuerzo en desentrañar en que grado contribuyen los factores genéticos y ambientales en la variación interindividual de los niveles plasmáticos de estos factores hemostáticos. Así, se ha estimado en un estudio español compuesto de 397 individuos de 21 pedigrees una influencia genética para el tPA y PAI-1 del  $0.27 \pm 0.07$  y

0.30 ± 0.80 respectivamente (Souto et al. 2000). Por contra, la influencia genética para estos factores en gemelos se ha estimado del 0.62 para el tPA y del 0.60 para el PAI-1 (de Lange et al. 2001). La razón para esta diferencia está en la mayor similitud en ambos genes y en los factores ambientales entre gemelos cuando se comparan con aquellos observados entre familias.

A continuación describiremos los principales componentes del sistema:

### ***1. Fibrinógeno.***

Es una proteína soluble de 340 kDa, que posee tres subunidades monoméricas en sus tres canales polipeptídicos A $\alpha$ , B $\beta$ , y  $\gamma$ . Se sintetiza en el hígado, y, como otras proteínas, es secretada al plasma, donde circula a concentraciones bajas en torno a los 1,5-4 mg/ml, aumentando en condiciones patológicas (Kamath y Lip 2003). Su papel está muy bien delimitado en la coagulación y circulación sanguínea, pero en condiciones de BHE rota deja la circulación periférica, se extravasa, y entra en el parénquima cerebral donde altera la composición de la matriz extracelular neurovascular.

### ***2. Plasminógeno.***

Es el componente principal del sistema fibrinolítico. Es una glicoproteína monocatenaria de 92 kDa, sintetizada en el hígado y codificada en un gen localizado en el cromosoma 6. Actúa como una proenzima de la plasmina, y es responsable de la degradación proteolítica de la fibrina. Su concentración plasmática es de 2mM (20mg/dl) y su vida media es de 2.2 días. Por la acción de sus activadores se convierte en una molécula bicatenaria de plasmina. Una vez activa ésta ejerce su capacidad proteolítica, no sólo sobre la fibrina sino también sobre los factores V y VIII, algunos componentes del complemento, ACTH, glucagón, GH... (Janson PA et al. 1980).

#### ***2.1. Factores activadores del plasminógeno:***

Los activadores fisiológicos del sistema fibrinolítico son los factores XII y XI activados (activación intrínseca), el tPA (activador tisular del plasminógeno), y el uPA (activador urokinasa del plasminógeno), aunque éste último parece ser relativamente más importante en la proteólisis celular y pericelular.

**2.1.1 El activador tisular del plasminógeno (tPA)**, en su forma nativa es una proteasa serínica monocatenaria constituida por 530 aminoácidos y un peso molecular de 68000 daltons. Es convertida en una molécula de doble cadena por la plasmina. La cadena pesada A (1-278aa) es la que contiene los dominios “fingers” o “kringles” homólogos a otras proteínas como son la fibronectina, el factor de crecimiento epidérmico, el plasminógeno..., mientras que su centro activo se localiza en la cadena ligera B (279-530aa) y contiene los aminoácidos serina, histidina y ácido aspártico; de forma semejante a otras proteasas como la trombina, la plasmina y la elastasa.

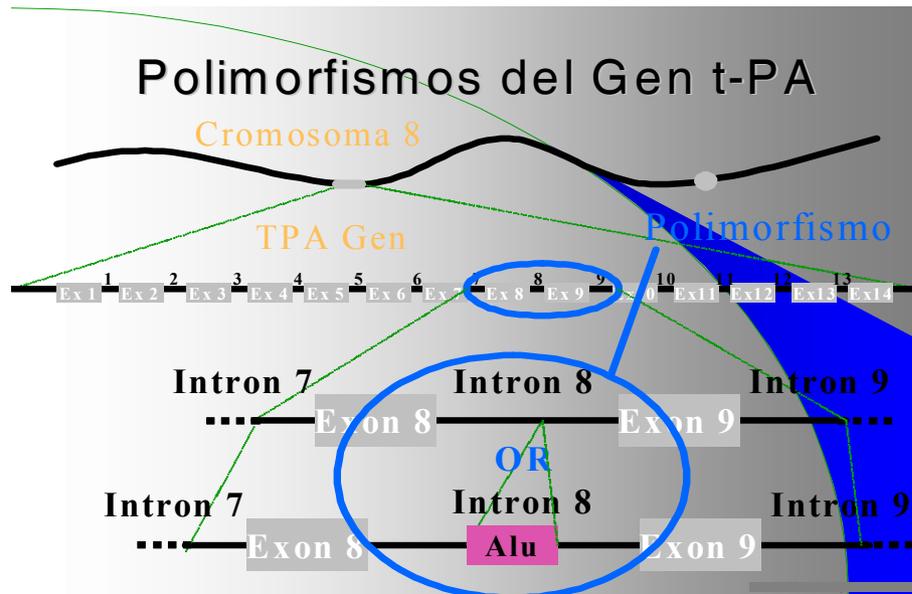
Es sintetizado por las células endoteliales y liberado a la circulación por estímulos tales como el estrés, el ejercicio físico, la oclusión venosa o administración de fármacos vasoactivos. Éstos favorecen la liberación de tPA desde el endotelio vascular, mientras que los corticoides (dexametasona) y citocinas como la IL-1 ó el factor de necrosis tumoral, disminuyen su liberación. Su concentración plasmática oscila entre 1 y 6 ng/ml, su vida media es de 5 minutos, y su principal vía de eliminación es la hepática.

Se codifica por un gen localizado en el cromosoma 8p12-p11.2. Se han descrito tres variantes del polimorfismo Alu (II, ID, DD), siendo el genotipo ID (inserción de una repetición Alu en el intrón 8, que afecta directamente a la función del alelo I), de especial interés pues los individuos heterocigotos para el alelo I presentan mayor riesgo protrombótico (Ludwing et al. 1992, Landenvall et al. 2000) (**Figura 2**). La variante genotípica II del tPA se ha postulado que interfiere en la secreción de tPA (Jern et al. 1999). Se han observado altos niveles de secreción del tPA en sujetos homocigóticos para el alelo de inserción comparándolo con los procesados por el alelo delección. En el estudio Róterdam el alelo de inserción de este polimorfismo se ha asociado con el riesgo de infarto de miocardio (Van der Bom et al. 1997), aunque esta asociación no se ha confirmado en otros estudios.

Recientemente se han descrito 8 polimorfismos nucleótido-individuales, tres de ello se asocian con la secreción de tPA (-7351C>T, 20 099T>C en el exón 6, 27 445T>A en el intrón 10), siendo el 7351T el que se ha relacionado con el riesgo de infarto de miocardio (Van der Bom et al. 1997) y, más recientemente, con el incremento del riesgo de sufrir un ictus, que ya se había relacionado previamente con el polimorfismo TT del tPA.

El promotor del gen tPA presenta 2 terminales (SP1) de inicio, TATA-independientes, que median en el inicio de la transcripción, así por ejemplo, la transición de citosina a timina en el codón -7351 altera el core en uno de los SP1 y con ello la transcripción y las interacciones.

**Figura 2.** Polimorfismo Alu del gen del tPA.



**2.1.2 El activador de la urokinasa plasminógeno (uPA),** como el tPA, posee un centro con actividad serina-proteasa y ejerce su misma función.

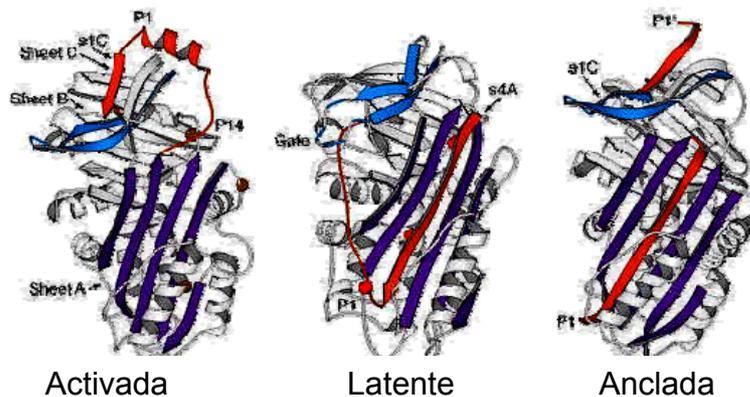
## 2.2. Factores inhibidores del plasminógeno:

Se conocen varios inhibidores de las serinas-proteasa (serpinas), tales como la antiplasmina, el PAI-1 y PAI-2, implicados en la regulación de la actividad del sistema fibrinolítico.

### 2.2.1. El inhibidor del activador del plasminógeno (PAI-1)

Denominada recientemente SERPINA E1, pertenece también a la superfamilia de las serpinas. Posee una masa molecular de 52 kDa, está constituida por 379 aminoácidos y contiene un 13% de carbohidratos (**Figura 3**).

**Figura 3.** Estructura tridimensional de la molécula PAI-1



Fuente: Hekman C et al.1985.

En condiciones normales es producido por varios tipos celulares, incluyendo células endoteliales, hepatocitos, células musculares lisas, adipositos y plaquetas. En condiciones patológicas existen otros tejidos capaces de secretar PAI-1, siendo éste el caso de estirpes de células tumorales y de las células endoteliales en respuesta a citocinas inflamatorias, como se ha observado en la diabetes mellitus, en el infarto de miocardio o en la trombosis venosa.

En plasma circula unido a la fibronectina y actúa tanto sobre el tPA como sobre el uPA.

Las concentraciones plasmáticas de PAI-1 son muy bajas ( $25\mu\text{g/L}$ ), pero superiores a las de los activadores del plasminógeno, lo que unido a su gran reactividad con ellos, hacen del PAI-1 un importante regulador de la fibrinólisis. Su síntesis (**Tabla 3**) y concentración en plasma se caracteriza por:

a) Tener fluctuaciones. Los niveles diurnos son mayores y presentan variaciones en relación con la ingesta de carbohidratos y de cafeína.

b) Al ser un reactante de fase aguda, aumenta su actividad de forma significativa tras sufrir un infarto agudo de miocardio, un traumatismo, en la coagulación intravascular

diseminada, en la trombosis venosa profunda, y tras una intervención de cirugía mayor. Sin embargo, esta actividad disminuye hasta valores prácticamente normales tras la primera semana del evento, comportándose como el reactante cuyas cifras plasmáticas retornan más rápidamente a la normalidad después de la elevación inicial.

c) Aumentar gradualmente su concentración durante el embarazo y descender a niveles normales tras el parto. Así como aumentar en las enfermedades hepáticas, en la obesidad, en la hipertrigliceridemia (Hong et al. 1997, Henry et al. 1997), en la fibrosis pulmonar, en las glomerulonefritis, y en la aterosclerosis, stress físico y con la hipoxia.

d) Aumentar en relación con la insulina, con la adrenalina, con la angiotensina II, con la administración de corticoides (dexametasona) y con el aumento de citocinas como la IL-1 (Dawson et al. 1993) y el factor de necrosis tumoral.

Existen dos pools de PAI-1, uno de ellos estaría constituido por el que se encuentra en estado de libre circulación por el plasma; y el otro estaría contenido en los gránulos de las plaquetas, siendo indistinguible inmunológica y estructuralmente de aquél.

Su principal función es participar en la fibrinólisis bloqueando la conversión de plasminógeno a plasmina, al participar en el control de la activación de las metaloproteinasas (MMPs). También interviene en otras funciones, como por ejemplo en el ciclo celular, por su relación íntima con el p53; y, recientemente, se ha implicado en la fisiopatología de procesos inflamatorios, degenerativos y neoplásico, al participar en la migración celular, en los procesos de proteólisis celular, al favorecer la infiltración de polimorfonucleares e intervenir en la migración microglial.

Se codifica en el cromosoma 7, y comprende 9 exones y 8 intrones. Su transcripción genética es activada por citocinas inflamatorias, especialmente por IL- $\beta$ , TNF- $\alpha$  y TGF- $\beta$ , y activadores no proteín-kinasa C; y todo lo contrario, inhibida por el TNF- $\gamma$ , el óxido nítrico, factores natriuréticos y por drogas hipolipemiantes.

**Tabla 3:** Factores que influyen en la síntesis de PAI-1.

|                  | <b>In vitro</b> | <b>In vivo</b>      |
|------------------|-----------------|---------------------|
| Trombina         | Aumenta         | N.D                 |
| IL-1 $\alpha$    | Aumenta         | N.D                 |
| TGF- $\beta$     | Aumenta         | N.D                 |
| Glucocorticoides | Aumenta         | N.D                 |
| Insulina         | Aumenta         | N.D.                |
| Glucosa          | Aumenta         | No efecto           |
| Triglicéridos    | Aumenta         | No efecto           |
| TNF- $\alpha$    | Aumenta         | Aumenta             |
| Endotelina 1     | Aumenta         | N.D                 |
| Testosterona     | N.D.            | Disminuye           |
| Estrógenos       | N.D.            | Aumenta             |
| Angiotensina II  | Aumenta         | Aumenta             |
| Tabaco           | N.D.            | No efecto o aumenta |
| Ejercicio físico | N.D             | Disminuye           |

*TGF*: factor de crecimiento, *TNF*: factor de necrosis tumoral, *N.D*: no disponible

Se han descrito tres variantes polimórficas del gen del PAI-1 (4G/4G, 4G/5G y 5G/5G), siendo el genotipo 4G/4G de la región protomérica de especial interés, pues los individuos homocigotos para el alelo 4G presentan un 25% más de concentraciones plasmáticas y plaquetarias de PAI-1 que las de los sujetos con alelo 5G. Estudios in vitro han confirmado mayores niveles de transcripción asociados con el alelo 4G y diferencias en la unión a proteínas nucleares. Ambos alelos se unen a un activador transcripcional, mientras que el alelo 5G también se une a una proteína represora, resultando en una disminución de la transcripción del alelo 5G en comparación con el alelo 4G (Dawson et al. 1993). Este hallazgo que se ha relacionado con un mayor riesgo protrombótico. Por otro lado, el genotipo 5G/5G parece ser un bajo productor de PAI-1 (Eriksson et al. 1995). También se ha sugerido que el promotor del PAI-1 responde a la interleucina 1-a (IL-1a) de una manera específica alélica, incrementándose la producción de PAI-1 en las células incubadas con interleucina 1-a que contenían el alelo 4G en comparación con cultivos no estimulados (Dawson et al. 1993), aunque estos resultados no han sido confirmados (Eriksson et al. 1995).

**2.2.2. El inhibidor-2 del activador del plasminógeno (PAI-2)** o SERPINA B2, es una serpina producida por la placenta y los macrófagos que inhibe la formación preferentemente del uPA, aunque su papel en la regulación de la fibrinólisis es clara, es aún incierta.

**2.2.3. La antiplasmina**, es una glicoproteína de 70 kDa, presente tanto en el plasma como en las plaquetas, que parece tener un efecto inhibitor específico de la plasmina. Su reacción con ésta es extremadamente rápida, formando un complejo que la inhibe irreversiblemente, para lo cual requiere que tanto el centro activo como los sitios de unión de la lisina de la plasmina estén libres.

La antiplasmina se produce en el hígado y su concentración plasmática es de 70 mg/L. Una pequeña porción de ella queda unida a la fibrina por medio del factor XIIIa (Kobriniski NL et al. 1984).

---

### **B.3 HOMOCISTEÍNA.**

La homocisteína es un aminoácido, intermediario del metabolismo de la metionina, y convertido de vuelta en ésta por la metil-n-tetra-hidrofolato reductasa o por la homocisteína metiltransferasa. Alteraciones en ambas vías genera el aumento de los niveles plasmáticos de homocisteína, por ello podemos decir, que las concentraciones extracelulares de homocisteína son un indicador de la actividad enzimática y de la biodisponibilidad de cofactores y sustratos involucrados en su metabolismo: vitamina B6, B12 y ácido fólico. Otras causas de hiperhomocisteinemia son el fallo renal crónico, el hipotiroidismo, la diabetes mellitus, tratamientos farmacológicos, etc...

Las concentraciones plasmáticas, en ayunas, oscilan entre 5 y 16  $\mu\text{mol/l}$ , siendo la vida media de la homocisteína en sangre de 12 a 24 horas. Elevadas concentraciones son tóxicas para las células endoteliales, incitando a una reacción trombótica y aterosclerótica, tanto en el territorio arterial como en el venoso.

### ***C. SISTEMA DEL FIBRINÓGENO Y SISTEMA NERVIOSO CENTRAL.***

Las neuronas y los astrocitos, dada su proximidad a las células endoteliales, poseen la propiedad de participar en la regulación de la homeostasis vascular y la microcirculación cerebral. Estas interacciones neurovasculares y gliovasculares determinan la gran mayoría de las funciones nerviosas: el desarrollo neuronal, la actividad sináptica, el intercambio metabólico, la neurogénesis adulta, etc... Entre ambos sistemas existe una barrera natural, la llamada barrera hematoencefálica (BHE) (Abbot et al. 2002), que regula la entrada de proteínas y demás componentes circulantes por el torrente sanguíneo sistémico.

La BHE es de base celular y molecular compleja. Su ruptura es punto de partida de múltiples entidades patológicas del SNC: patología tumoral, como en el glioblastoma cerebral (Seitz y Wechsler 1987; Roberts et al. 2000); procesos infecciosos como en la encefalitis por el virus de la inmunodeficiencia adquirida (HIV) o en la meningitis bacteriana (Langford y Masliah 2001); en procesos isquémicos cerebrales (Wang y Lo 2003); en procesos neurodegeneración como la enfermedad de Alzheimer (Berzin et al. 2000; Giri et al. 2000); en enfermedades

desmielinizantes como la Esclerosis Múltiple (Minagar y Alexander 2003); y en el daño medular espinal (Popovich et al. 1996).

Un común denominador en todas ellas es el paso de los componentes de la sangre, y por ende, del fibrinógeno, al parénquima cerebral, provocando el edema, la inflamación, la isquemia, la hemorragia, etc... En definitiva, generando el daño y lesión de las células nerviosas.

El fibrinógeno, en condiciones de BHE rota, abandona la circulación periférica, se extravasa y entra en el parénquima cerebral, donde altera la composición de la matriz extracelular neurovascular por su actividad procoagulante local (Friedmann et al. 1999). Así se genera la conversión de fibrinógeno a fibrina por la acción de factores tisulares perivasculares (Thomas et al 1993). Existe además, en el sistema nervioso central, cuya localización reflejamos en la **Tabla 4**, una amplia variedad de proteínas relacionadas con la fibrina.

La actividad del fibrinógeno se vehiculiza a través de los receptores y las proteínas ligantes del fibrinógeno.

**Tabla 4.** *Proteínas relacionadas con la fibrina en el SNC.*

| <b>Proteínas relacionadas con la Fibrina</b> | <b>Localización y función en Sistema Nervioso</b> | <b>Referencias</b> |
|--|---|--------------------|
|--|---|--------------------|

***Vía de la Coagulación***

|                              |   |  |
|------------------------------|---|--|
| Protrombina                  | Neuronas dopaminérgicas                         | Weinstein et al. 1995                                |
| Trombina                     | Neuronas  | Dihanich et al. 1991                                 |
| Receptor de Trombina         | Neuronas dopaminérgicas                         | Weinstein et al. 1995                                |
| Factor tisular<br>Proteína C | Astrocitos<br>N. piramidales y Células Purkinje | Eddleston et al. 1993<br>Yamamoto y Losutoff<br>1998 |
| Trombomodulina               | Astrocitos                                      | Pindon et al. 1997                                   |

***Vía Fibrinolítica***

|               |   |   |
|---------------|---|---|
| Plasminógeno  | Microglía y Neuronas                    | Nakajima et al. 1992<br>Basham y Seeds 2001         |
| Neuropsinas   | Oligodendrocitos                        | Chen et al. 1995<br>He et al. 2001                  |
| tPA           | Microglía, Neuronas, Cel Schwann        | Sapinno et al. 1993<br>Tirska 1997<br>Gingrich 2000 |
| uPA           | Microglía                               | Hastings et al. 1997                                |
| Neuroserpinas | Neuronas                                | Yong et al. 1998                                    |
| MMPs          | Microglía, Astrocitos, Oligodendrocitos |   |

***Receptores de Fibrina***

|                    |  |  |
|--------------------|--|--|
| $\alpha v \beta 3$ | Oligodendrocitos<br>Astrocitos<br>Células Schwann y leucocitos | Milner et al 1996<br>Blaschuk 2000<br>Milner et al. 2001 |
| $\alpha 5 \beta 1$ | Oligodendrocitos   | Relvas et al. 2001                                       |
| ICAM-1             | Astrocitos, células endoteliales                               | Lee et al. 2000  |
| VE-Cadherina       | Células endoteliales   | Navratil et al. 1997                                     |
| Calreticulina      | Neuronas   | Hossain et al. 2000                                      |
| Mac-1              | Microglía, macrófagos  | Perry et al. 1985  |

***Moléculas marcadoras de la fibrina y factores de transcripción***

|            |                           |                               |
|------------|---------------------------|-------------------------------|
| Rho GTPasa | Neuronas, Células Schwann | Luo 2000<br>Cheng et al. 2000 |
|------------|---------------------------|-------------------------------|

|            |                                   |                                     |
|------------|-----------------------------------|-------------------------------------|
| ERK1/2     | Células Schwann, Oligodendrocitos | Birmingham 2001<br>Stariha 1997     |
| PI3-kinasa | Oligodendrocitos, Células Schwann | Ebner et al. 2000<br>Li et al. 2001 |
| NF-KB      | Neuronas, Células Gliales         | Mattson y Camandola 2001            |

### *Matriz Extracelular*

|              |   |   |
|--------------|---|---|
| Laminina     | Crecimiento neuronal,<br>Mielinización/ inflamación | Luckenbill-Edds 1997<br>Cheng and Strickland 1997 |
| Tenascina-R  | Adhesión neuronal y diferenciación                  | Pesheva y Probstmeier<br>2000                     |
| Fibronectina | Neuronas, Astrocitos                                | Pires Neto et al. 1999                            |
| Fibrina      | Exacerbación del daño axonal<br>Exacerbación de EAE | Akassoglou et al. 2000<br>Inoue et al. 1996       |

### **Receptores de Fibrin (ógeno):**

El fibrinógeno exhibe una gran habilidad para activar receptores con una amplia expresión tisular (integrinas:  $\alpha 5\beta 1$ ,  $\alpha M\beta 2$ ,  $\alpha IIB\beta 3$ ,  $\alpha V\beta 8$ ... y no integrinas: ICAM-1, VE-cadherina... (**Tabla 5**), que expresan en su superficie leucocitos, macrófagos y monocitos, siendo dicha interacción la que pone en marcha los procesos adhesión, migración y activación de procesos tan dispares como la coagulación, la angiogénesis, la inflamación y la propagación de infecciones (**Figura 4**). Su interacción más conocida es con los receptores de las integrinas (Adams et al. 2004).

**Tabla 5: Receptores del fibrinógeno.**

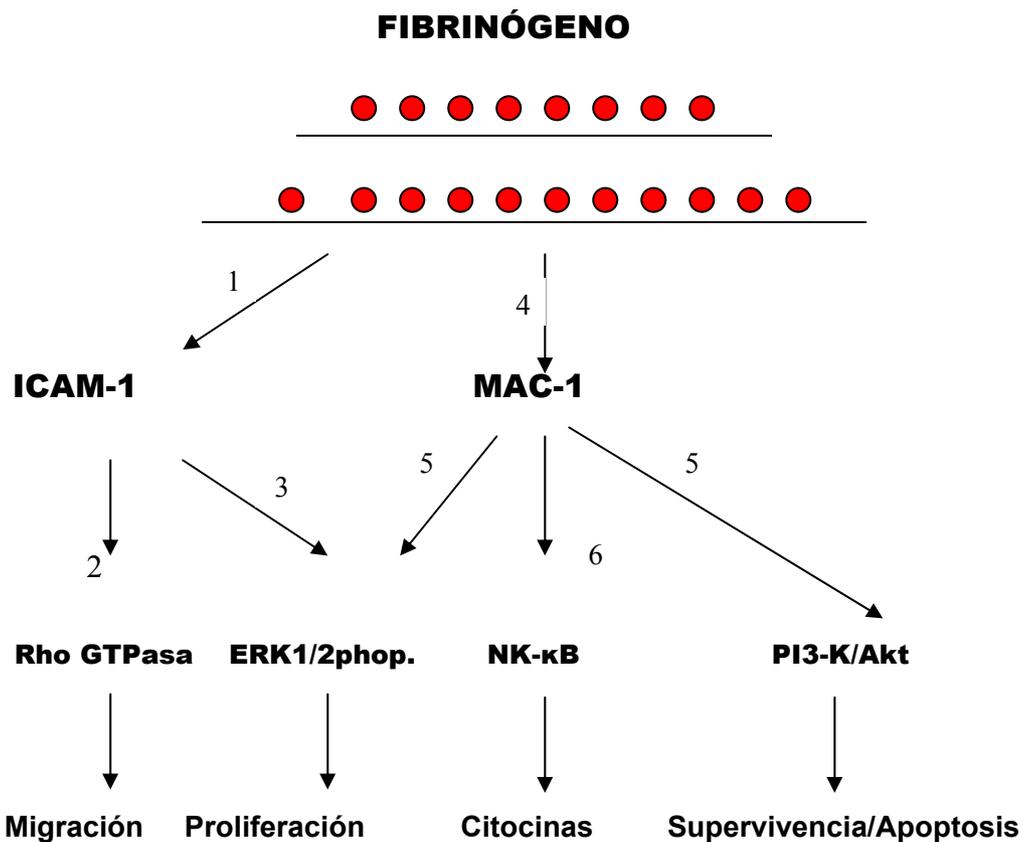
| Receptores           | Células de unión                                  | Vía activación | Función                                |
|----------------------|---|----------------|--|
| <b>INTEGRINAS</b>    |   |                |  |
| $\alpha 5\beta 1$    | Leucocitos<br>Células endoteliales                |                | Migración<br>Adhesión                  |
| $\alpha M\beta 2$ ,  | Neutrófilos                                       | NF-KB          | Adhesión<br>Migración                  |
| $\alpha IIB\beta 3$  | Plaquetas<br>Megacariocitos                       | PLC            | Adhesión                               |
| $AV\beta 3$          | Células endoteliales<br>Fibroblastos              | PLC            | Adhesión                               |
| $\alpha V\beta 8$    | Células de Schawnn                                | ERK1/2         | Adhesión<br>Proliferación              |
| <b>NO INTEGRINAS</b> |   |                |  |
| ICAM-1               | Leucocitos<br>Neutrófilos<br>Células endoteliales | Rho<br>ERK1/2  | Adhesión<br>Migración<br>Supervivencia |
| VE-caherina          | Células endoteliales                              |                | Proliferación<br>Migración             |

*NF-KB*: factor nuclear Kappa B, *PI3K*: Kinasa fosfoinositada 3, *ERK1/2*: Kinasa de regulación extracelular 1 y2, *PLC*: fosfolipasa, *ICAM-1*: Molécula de adhesión celular tipo1.

#### a). Proteínas ligantes del Fibrin(ógeno):

El fibrinógeno, al interactuar con diferentes proteínas fijadoras (**Tabla 6**), participa en múltiples funciones fisiológicas y patológicas. Así, la interacción entre la matriz extracelular (ej. fibronectina) y el fibrinógeno regula la adhesión y migración de los fibroblastos (Engvall et al. 1978; Grinnell et al. 1980).

**Figura 4.** Unión del fibrinógeno a sus receptores y funciones derivadas de ello.(Akassoglou K y Strickland S. 2002).



1. Altieri et al. 1995.
2. Sans et al. 2001.
3. Pluskota y D'Souza 2005.
4. Altieri et al. 1988.
5. Whitlok et al. 2000.
6. Pérez et al. 1999.

**Tabla 6. Proteínas ligantes del fibrinógeno.**

| <b>Proteínas ligadoras</b> | <b>Células/lugar de interacción</b> | <b>Función</b> |
|----------------------------|-------------------------------------|----------------|
|----------------------------|-------------------------------------|----------------|

***Proteínas Mamíferos***

|              |                               |               |
|--------------|-------------------------------|---------------|
| Fibronectina | Fibroblastos                  | Adhesión      |
| IGFBP-3      | Estroma celular               | Migración     |
| bFGF (FGF-2) | Células endoteliales          | Proliferación |
| VEGF         | Células endoteliales          | Proliferación |
| Trombina     | Plasma                        | Coagulación   |
| Plasminógeno | Plasma                        | Fibrinólisis  |
| tPA          | Células endoteliales y Plasma | Fibrinólisis  |
| Gelsolina    | Plasma                        | Coagulación   |

***Proteínas Bacterianas***

|                                       |                       |                               |
|---------------------------------------|-----------------------|-------------------------------|
| ClfA, ClfB, FnbpA,<br>FnbpB adhesinas | Staphylococcus aureus | Adhesión,<br>Anti-coagulación |
| Map/Eap, Efb, Emp                     | Staphylococcus aureus | Anticoagulación               |
| M1, M5                                | Group A streptococo   | Supervivencia                 |

*IGFBP-3*: factor de crecimiento insulín-like 3; *bFGF*: factor de crecimiento fibroblástico; *VEGF*: factor de crecimiento del endotelio vascular; *tPA*: activador tisular del plasminógeno; *ClfA*: factor de unión A; *ClfB*: factor de unión B; *FnbpA*: proteína de unión a la fibronectina A; *FnbpB*: proteína de unión a la fibronectina B; *Map/Eap*: proteína análoga del complejo mayor de histocompatibilidad clase II / proteína de adhesión extracelular; *Efb*: proteína de adhesión extracelular del fibrinógeno; *Emp*: proteínas de unión a la matriz extracelular; M1 y M5 (receptores de proteínas y factores de virulencia).

También, durante la cicatrización de las heridas, la gelsolina (proteína plasmática), al unirse con el fibrinógeno, estabiliza el coágulo (Smith et al. 1987); y, la unión del fibrinógeno a factores de crecimiento insulín-like (IGFBP-3) favorece tanto la coagulación como la unión a factores de crecimiento de fibroblastos (ej. bFGF y FGF-2), estimulando la proliferación de las células endoteliales (Sahni et al. 1998; Campbell et al. 1999). La activación de las plaquetas y la formación de fibrina durante la coagulación, se acompaña de la traslocación de proteinkinasa A (PKA), vitronectina y PAI-1 en las fibras de fibrina, generando la fosforilación de la vitronectina e iniciando con ello el proceso fibrinolítico (Morgenstern et al. 2001; Ponnura et al. 2003). Junto a lo anterior, la fibrina(nógeno) también puede intervenir en la patogénesis microbiana, pues muchas bacterias como estafilococos y estreptococos expresan proteínas que pudieran unirse al fibrinógeno. Un ejemplo de ello lo encontramos en el estafilococo aureus que secreta proteínas solubles que se unen a la fibrina y previenen la coagulación, o en el estreptococo del grupo A que expresan proteínas de superficie M1 a M5 con gran afinidad por la fibrina, favoreciendo la supervivencia bacteriana (Ponnura et al. 2003; Ringdahl et al. 2000).

### **b.1) Interrelación entre el sistema del fibrinógeno, el TNF- $\alpha$ y las endotoxinas:**

Las proteínas procoagulantes necesarias para la formación de fibrina están presentes en el parénquima cerebral, y de su concentración depende el daño neuronal. Junto a ellas, existen factores neurodegenerativos y neuroprotectores que exhiben una función reguladora en el Sistema Nervioso (**Tabla 7**). El ya referido sistema fibrinolítico (Kerschensteiner et al. 2003), el factor de necrosis tumoral- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) y las endotoxinas. En condiciones inflamatorias los tipos celulares más afectados por la extravasación del fibrinógeno son las células de Schwann en el Sistema Nervioso Periférico y los macrófagos en el Sistema Nervioso Central.

El TNF- $\alpha$  y las endotoxinas, además de la función proinflamatoria, contribuyen a la formación de fibrina, incrementando la expresión de moléculas claves en la activación de la cascada de la coagulación (Esmon et al. 2000). Al actuar sobre los astrocitos, en condiciones inflamatorias, son capaces de favorecer la extravasación del fibrinógeno, que altera-rompe las uniones de las células endoteliales (Kirk et al. 2003).

**Tabla 7.** Factores neurodegenerativos y neuroprotectores que exhiben una función reguladora en la Sistema Nervioso (Kerschensteiner et al. 2003).

***Factores Pro-inflamatorios y Neurotóxicos***

Metaloproteinasas de la matriz (MMP)

Activadores del plasminógeno

Citocina Th1 ( Linfocito T helper)

Factor de necrosis tumoral (TNF)

Interleukina (IL)-1

Osteopontina

Leucotrienos

Glutamato

Oxido nitroso

Neurotrofinas (vía p75NTR)

***Factores Anti-inflamatorios y Neuroprotectores:***

Factor neurotrófico ciliar

Citocinas Th2 (Linfocito T helper)

Factor de crecimiento

Receptor TNF soluble

TNF- $\beta$

Receptor IL-1 soluble

Prostaglandinas

Lipoxinas

Inhibidor tisular de las metaloproteinasas

Antitrombina III

Neurotrofinas:

- Factor neurotrófico cerebral
- Factor de crecimiento nervioso
- Neurotrofina (NT)-3
- NT-4/5
- Factor neurotrófico derivado de la célula glial
- Factor inhibidor de la leucemia

### **b.2) Actuación sobre la microglía:**

La microglía, es considerada como las células fagocitarias del cerebro, son las verdaderas células “inmunes” del SNC (macrófagos titulares). Cuando la microglía detecta un daño en el cerebro migra a las zonas de lesión, prolifera localmente y se activa, sufriendo una serie de transformaciones (Kreutzberg 1995). La microglía activada está ligada a entidades neurodegenerativas, isquémicas e inflamatorias-autoinmunes: ej. Esclerosis Múltiple/Encefalitis Aguda Experimental (Dickson et al. 1993; London et al. 1996).

En la Esclerosis Múltiple /Encefalitis Aguda Experimental, la microglía se cree contribuye a la proliferación de citocinas proinflamatorias, proteasas y radicales libres (Benveniste, 1997). En estas circunstancias la microglía expresa factores de crecimiento tales como el factor de crecimiento insulín-like 1, el factor de crecimiento plaquetario, factor de crecimiento de fibroblastos (Diemel et al. 1998); sustancias inmunosupresoras tales como TGF- $\beta$  1, que se relaciona con la remisión clínica en Esclerosis Múltiple/Encefalitis Aguda Experimental (Kiefer et al. 1998); y sustancias procoagulantes como el tPA. El tPA se expresa en la microglía. En la Encefalitis Aguda Experimental la erradicación de la microglía se correlaciona con un decremento sustancial de la actividad inflamatoria. La **Tabla 8**, muestra la lista de moléculas disreguladas en microglía y astrocitos en pacientes con Esclerosis Múltiple.

**Tabla 8.** Moléculas que disregulan la microglía y los astrocitos en la Esclerosis Múltiple.

### *Microglía*

| <b><i>1.- Incrementan</i></b> | <b><i>Función</i></b>                                 |
|-------------------------------|---|
| iNOS                          | Stress Oxidativo                                      |
| GRM8                          | Inducen no neurotoxicidad microglial                  |
| CXCL1                         | Atracción de LT por quimiotaxis                       |
| CXCR2                         | Movilización de activación microglial                 |
| GRM2                          | Receptor glutamatergico                               |
| mGluR1                        | Neuroprotección y secreción BDNF                      |
| IL-10, IL-10R, IL-4R          | Anti-inflamación                                      |
| Oncostatin M                  | Citocina Proinflamatoria                              |
| IL-6                          | Inducen la neurodegeneración                          |
| CCR2, CCR3, CCR5              | Migración   |
| Leucotrieno A2                | Proinflamatoria                                       |
| MCPI                          | Migración   |
| TNF- $\alpha$                 | Citotoxicidad,<br>Inducen la muerte neuronal in vitro |
| Anexina 2                     | Apoptosis   |
| NgR                           | Activación de la mielinólisis                         |
| <b><i>2.- Disminuyen</i></b>  |   |
| IGFBP-2                       | Factor de Crecimiento                                 |

***Astroцитos***

| <b><i>1. Aumentan</i></b>   |  |
|-----------------------------|--|
| 14-3-3 proteína             | Progresión rápida en neurodegeneración |
| mGluR4 y mGluR8             | Excitotoxicidad                        |
| Sincitina                   | Toxicidad oligodendrocitaria           |
| IL-10, IL-4, IL10R          | Th2 citocinas, Proinflamatoria         |
| iNOS                        | Inducen el stress oxidativo            |
| Oncostatina M               | Molécula proinflamatoria               |
| IL-8                        | Migración                              |
| CCR5                        | Migración                              |
| IL-6                        | Neurotoxicidad                         |
| Alfa Beta cristalina        | Inmunomodulación                       |
| MHC-II                      | Presentación antigénica                |
| IGF-1                       | Factor de crecimiento                  |
| C5a                         | Complemento asociado a inflamación     |
| Anexina II                  | Apoptosis                              |
| BAFF                        | TNF- regulados                         |
| Tenascina C                 | Matriz extracelular                    |
| TNF alfa                    | Citotoxicidad                          |
| <b><i>2. Disminuyen</i></b> |  |
| Neuroregulina               | Supervivencia axonal                   |

**c). El fibrin(ógeno) en los procesos inflamatorios-desmielinizantes del Sistema Nervioso Central (SNC):**

Algunos datos relevantes en modelos animales de Encefalitis Aguda Experimental ponen de manifiesto el rol del fibrin(ógeno) en los procesos inflamatorios-desmielinizantes del Sistema Nervioso Central. Así:

1.- En la encefalitis aguda experimental (EAE) se ha observado un incremento en la actividad de la coagulación, que precede a la sintomatología de la encefalitis (Inaba et al. 2001).

2.- La depleción farmacológica de la fibrina en la EAE disminuye los síntomas clínicos (Inoue et al. 1996). Además, la inhibición en la formación de fibrina, disminuye la formación y activación de la trombina. Ello, se ha visto, disminuye la lesión del nervio óptico.

3.- La fibrina permanece en las placas aún siendo éstas inactivas. Esto sugiere la incapacidad del Sistema Nervioso Central para degradar la fibrina. De los estudios en Encefalitis Aguda Experimental se desprende que los depósitos de fibrina preceden, y regulan el inicio de la demielinización. La fibrina es por tanto el mayor componente-derivado sanguíneo que interviene en los procesos inflamatorios del Sistema Nervioso Central. Su mecanismo de acción es mediado mediante la activación de los macrófagos y la liberación de citocinas proinflamatorias y quimiocinas que desencadenan la respuesta inmune citotóxica responsable de la degradación de la mielina.

4.- Pero el daño que genera la fibrinólisis tiene su base en el tPA. Estudios en ratones, (Raine et al. 1980), ratas (Ackermann et al. 1981) y cerdos de guinea (Sobel et al. 1988) con Encefalitis Aguda Experimental han mostrado que la severidad clínica y la disfunción neurológica esta en relación a un déficit de tPA. En los ratones con Encefalitis Aguda Experimental y déficit de tPA el inicio clínico es más tardío, pero la sucesión de brotes y severidad es mayor (Akassoglou et al. 2000; Akassoglou et al. 2002).

Pero junto a lo anterior, la fibrina no sólo media en la interacción leucocitaria con las células endoteliales, y en la liberación de citocinas proinflamatorias, sino que mediante la activación de los macrófagos, interviene en la reacción inflamatoria inicial de la desmielinización (Wakefield et al. 1994; Gay et al. 1997).

Debemos añadir que la actividad descrita de la fibrina no sólo tiene implicación en el SNC, sino que también la tiene en el sistema nervioso periférico, donde la actividad fibrinolítica y la degradación post-fibrina se correlacionan con el daño y la posterior regeneración nerviosa (Horner y Cage 2000). Los estudios anátomo-patológicos en humanos han puesto de manifiesto la presencia de depósitos de fibrina tanto en las áreas desmielinizantes (Kwon y Prineas 1994), como en las zonas de daño axonal (Gveric et al. 2001).

Todo lo anterior lleva por tanto a la formación de acúmulos perivasculares de fibrina, que a su vez pueden contribuir a la desmielinización por un cuádruple efecto. 1) Inflamatorio: pues los acúmulos se encuentran estrechamente relacionados con el aumento de células inflamatorias. 2) Con el paso de proteínas al espacio perivascular, al aumentar la permeabilidad microvascular y/o por la rotura de la BHE (Claudio et al. 1995). 3) Por efecto dispersor glial. 4). Por último, por efecto favorecedor del daño axonal; pues no en vano, el fibrinógeno se colocaliza con neurofilamentos no fosforilados en axones dañados de la médula espinal en el ratón tPA<sup>-/-</sup>. La innata habilidad para la degradación de la fibrina acumulada en las placas desmielinizantes pudiera representar un mecanismo para la reparación del daño y la regeneración, de ahí la hipótesis de que la degradación de la fibrina pudiera convertirse en posible diana terapéutica en la Esclerosis Múltiple, terapia que iría directamente a disolver los acúmulos de fibrina de las placas desmielinizantes con sustancias anticoagulantes (Anton et al. 1994; Chen y Strickland 2003).

#### ***D. SISTEMA PLASMINÓGENO Y SISTEMA NERVIOSO CENTRAL.***

Pero junto al fibrinógeno y la fibrina existen otros componentes del sistema fibrinolítico que están relacionados-implicados en la fisiopatología de los procesos neuroinflamatorios. Destacamos entre ellos, el plasminógeno, sus activadores (tPA, uPA) y sus inhibidores (PAI y antiplasmina).

##### ***D.1. El plasminógeno:***

El plasminógeno, una serinproteasa zymógena, y su sistema activador-inhibidor, juegan un papel muy importante en la regulación de procesos fisiológicos y/o patológicos. Entre estos últimos, y aunque los más conocidos son los procesos vasculares (isquémicos), también recientemente se han relacionado con otros procesos de etiología y fisiopatología muy diversa, tanto sistémicos como nerviosos (Gingrich et al. 2000; Teesalu et al. 2002; Melchor et al. 2003; Lo et al. 2004). El plasminógeno ha sido considerado tradicionalmente el mayor sustrato de la tPA para iniciar la cascada proteolítica. Sin embargo, este efecto también puede ser desencadenado por otros sustratos de la plasmina. Así se incluyen la laminina de la matriz

extracelular, la molécula de adhesión neuronal (NCAM), clave para la remielinización axonal, así como el tPA, que interactúa sobre la subunidad NR1 del receptor NMDA.

El plasminógeno ha sido detectado por algunos investigadores en el cerebro de ratones adultos (Sappino et al. 1993), y en el humano. A menudo se colocaliza con el tPA en compartimentos vesiculares de las neuronas (Teesalu et al. 2002).

El sistema del plasminógeno está integrado por un conjunto de proteínas enzimáticas que reaccionan en cadena hasta desembocar en la síntesis de plasmina. Para ésta como para el activador tisular del plasminógeno, existen en condiciones fisiológicas otro conjunto de moléculas que las modifican de forma específica, provocando su inhibición. Entre éstas cabe destacar el PAI y la antiplasmina (Tsirka et al. 1996, Tsirka et al. 1997).

Mención especial se debe realizar de las lipoproteínas y de la reelina. Dentro de las lipoproteínas destacaremos la Apo(a) proteína (Lp(a)) de gran peso molecular (200-700 kDa) que comparte estructura, por similitud, con el plasminógeno. Ambas, hasta en un 80% comparten idénticas secuencias. Así, presentan múltiples dominios en común, hecho que permite, por tanto, a la Lp(a) unirse a las moléculas que interaccionan con el plasminógeno (Miles y Plow 1990; Hoover-Plow et al. 1993). Ello le permite intervenir en funciones propias del mismo como son: activar los receptores del plasminógeno, intervenir en la proteólisis de la fibrina, actuar en la activación de TGF- $\beta$  por la plasmina, y unirse a células como lo haría el plasminógeno. No es de extrañar pues que la Lp(a) pueda ejercer una competitividad con el plasminógeno (Edelberg et al. 1989; Miles et al. 1989; Hajjar et al. 1989; Kojima et al. 1991; Scanu 1992). En cuanto a la reelina, ésta tiene actividad proteasa intrínseca y se comporta como sustrato del activador del plasminógeno y de la plasmina (Smalheiser et al. 2001). Los activadores del plasminógeno convierten a la reelina en una proteína de cadena única (310 kDa). Siendo ésta el mayor fragmento reelina-inmunoreactiva que se expresa en la sangre. La reelina se une a los receptores VLDL, el tPA y la uPA por tener gran especificidad por ella. Este hecho queda demostrado por su acción directa sobre un puñado de proteínas (plasminógeno y factores hepatocitarios de crecimiento), y por su participación en la regulación de la migración neuronal (Impagnatiello et al. 1998; Guidotti A et al. 2000), en la plasticidad sináptica (Knable et al. 2001; Persico et al. 2001), y en los mecanismos de potenciación. Actualmente a la reelina se la ha relacionado con

tres entidades patológicas como son el retraso mental, con la psicosis esquizofrénica y con el trastorno bipolar (Guidotti et al. 2000), y el autismo (Fatemi et al. 2002); pero aún se precisa de más estudios.

En cuanto a los receptores del plasminógeno mencionar que las células endoteliales tienen la capacidad de modular la expresión de dichos receptores, y esa capacidad está regulada por el propio sistema del plasminógeno y su actividad funcional. Podemos hablar por tanto de que la expresión de los receptores del plasminógeno es altamente maleable. Dentro de los estimuladores de los receptores del plasminógeno están la trombina (Miles et al. 1986), la plasmina, hormonas como los glucocorticoides (dexametasona), y la fibronectina, vitronectina o la laminina, presentada por los monocitos (Kim et al. 1992).

Por último, en el Sistema Nervioso, el eje plasminógeno-plasmina ha sido implicado en:

- 1.- El desarrollo del cono de crecimiento neuronal (Krystosek y Seeds 1981).
- 2.- La degeneración walleriana y regeneración neuronal (Bignami et al. 1982; Salles et al. 1990).
- 3.- La migración de las neuronas cerebelosas.
- 4.- En la potenciación a largo plazo (LTP) (Frey et al. 1996; Huang et al. 1996).
- 5.- En la depresión a largo plazo (Calabresi et al. 2000).
- 6.- La remodelación sináptica (Baranes et al. 1998; Neuhoff et al. 1999).
- 7.- La transmisión nerviosa mediada por receptores NMDA (Nicole et al. 2001).
- 8.- Situaciones patológicas como la excitotoxicidad (Tsirka et al. 1995; Chen y Strickland 1997) y el daño del nervio periférico (Akassoglou et al. 2000).
- 9.- La degradación por la plasmina de la proteína básica de la mielina (Cammer et al. 1978).

### ***D.2. El activador tisular del plasminógeno (tPA):***

En cuanto al tPA, si bien su principal fuente de producción es el endotelio vascular, también es una proteína constitutiva del SNC. En el endotelio vascular cerebral exhibe menores niveles que en otros endotelios (Levin et al. 1997), mientras que en el cerebro, existe variación de su expresión según la especie. En el ratón se exhibe en las células ectodérmicas del hipocampo (vía de las fibras musgosas que conducen a CA3), hipotálamo y amígdalas cerebelosas (Friedmann y Seeds 1994; Strickland et al. 2001); en el cerebro del hámster y el jerbo existen altos niveles de tPA en la vía de las fibras musgosas del hipocampo (Sallés y Strickland 2002); mientras que en cerebros humanos Teesalu et al. (2002), encuentran expresión neuronal de tPA, desde el primer mes postnatal hasta los 78 años, localizada en el manto neocortical, tálamo, amígdala, neuronas piramidales del hipocampo, motoneuronas del asta anterior y en neuronas del ganglio de la raíces dorsales; y sólo, en algunos cerebros, la apreciaron en áreas micro y astrogliales. La expresión de tPA y serpinas en el SNC la hemos resumido en la **Tabla 9**.

**Tabla 9.** *Expresión de tPA y Serpinas en el Sistema Nervioso.*

|                      | <b>Neuronas</b> | <b>Astroцитos</b> | <b>Microglía</b> | <b>Células Epéndimo</b> | <b>Oligo-dendrocitos</b> | <b>Células Schawann</b> |
|----------------------|-----------------|-------------------|------------------|-------------------------|--------------------------|-------------------------|
| <b>tPA</b>           | + (1,5)         | +/- (2,3)         | + (4)            |                         |                          | + (5)                   |
| <b>PAI-1</b>         | +/- (6,2)       | +(2)              | -                |                         |                          |                         |
| <b>Neuroserpinas</b> | +               | +(7)              | +/- (2)          | -                       | + (7)                    |                         |
| <b>PNI</b>           | + (8,9)         | +                 | -                | +                       | +                        | +                       |

*tPA*: activador tisular del plasminogeno, *PAI-1*: inhibidor tisular del plasminogeno-1, *PNI*: proteasa nexina I.

- 1) Krystosek y Seeds 1981; 2) Docagne et al. 1999; 3) Rogister et al. 1999;
- 4) Krystosek y Seeds 1981; 5) Osterwalder et al. 1996; 6) Hastings et al. 1997;
- 7) Reinhard et al. 1994; 8) Blasi y Carmeliet 2002; 9) Mulligan et al. 1991.

El tPA constitutivo juega no sólo un papel en la neurogénesis y morfogénesis, sino que también hay evidencias de su participación en la modulación sináptica y plasticidad neuronal, y muy posiblemente participe en los siguientes procesos:

1.- En los mecanismos relacionados con el aprendizaje y la memoria (Calabresi et al. 2000). Así, el tPA, por activación de la proteólisis extracelular por la plasmina, convierte el precursor del factor neurotrópico derivado cerebral (BDNF) en la forma madura (mBDNF), conversión que interviene en los fenómenos de potenciación neuronal, y estos a su vez, intervienen en la memoria a largo plazo (Petti et al. 2002).

2.- En los procesos vasculares cerebrales (Tabrizi et al. 1999; Kilic et al.1999).

3.- En la generación de crisis comiciales mediante la potenciación a largo plazo (LTP) (Qian et al. 1993).

4.- En procesos neurodegenerativos y tumorales (Sciacca et al. 2004).

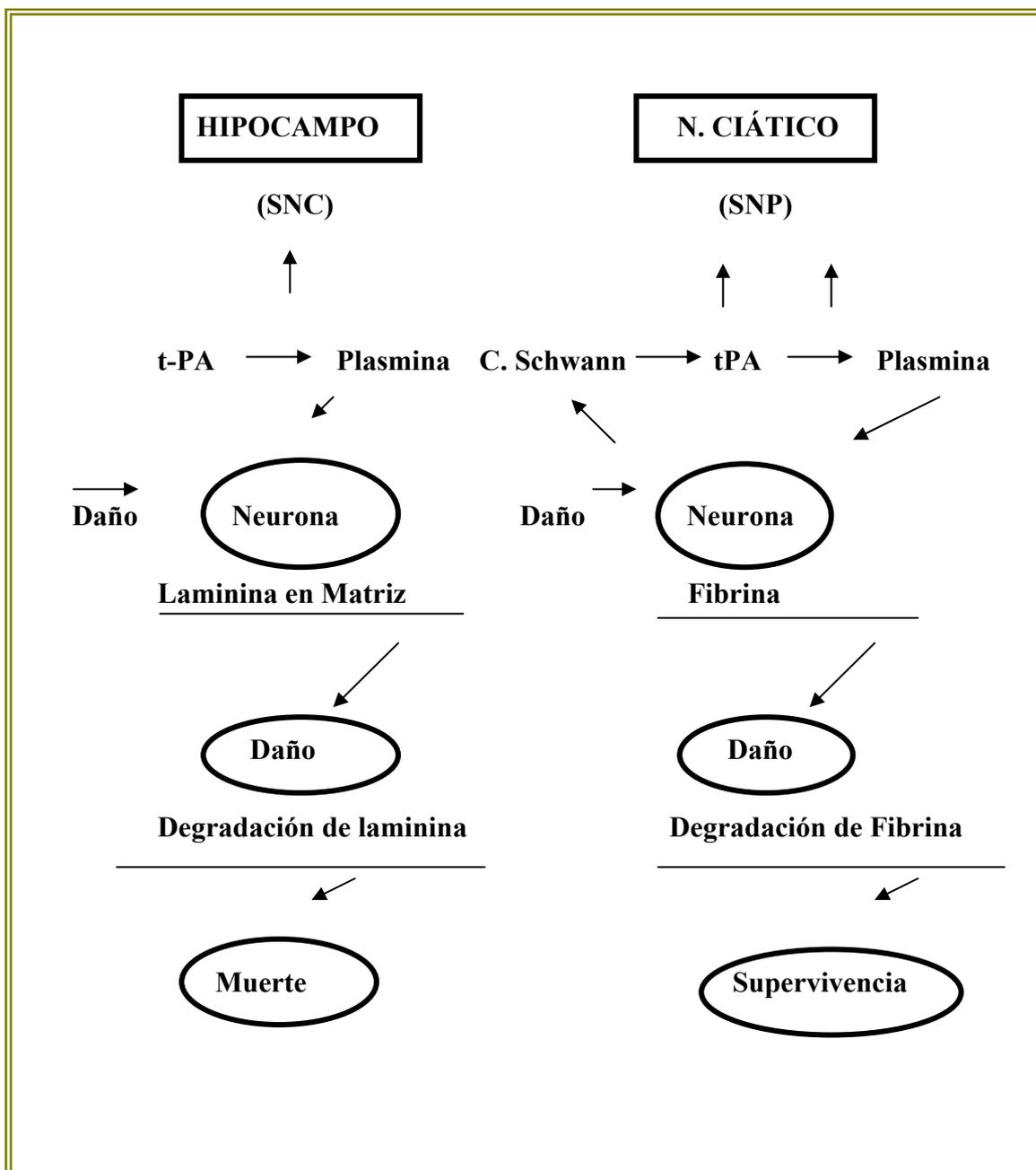
5.- Durante el crecimiento neurítico (García-Rocha et al. 1994).

6.- Neuroprotector del nervio periférico al eliminar los acúmulos de fibrina después de una lesión mecánica (Akssoglouk et al. 2000).

7.- En enfermedades inflamatorias-desmielinizantes, mediante la inducción de la muerte neuronal por excitotoxicidad (mediados por zinc) y/o la activación proteolítica de la matriz extracelular neuronal. (Tsirka et al. 1995; Chen y Strickland 1997)

El gen responsable de la tPA se localiza en cromosoma 8p12-p11.2, contiene 14 exones y presenta 3 variables genómicas Alu (II/DD/ID).

En suma, el tPA actúa a nivel tanto del Sistema Nervioso Central como Periférico, con funciones neurodegenerativas y neuroprotectoras, de forma que la expresión de tPA en neuronas y microglía degrada la laminina y otros sustratos protectores de la matriz (**Tabla 10**), haciendo más vulnerable a la neurona para la muerte celular. En el SNP, la expresión de tPA en la célula de Schwann, genera plasmina, que utiliza en este caso fibrina como sustrato, favoreciendo la supervivencia neuronal.

**Tabla 10:** Papel del tPA y la Plasmina en el Sistema Nervioso (Strickland S. 2001)

El control de la expresión de tPA parece ser primariamente transcripcional, y en algunos casos es almacenada en vesículas intracelulares (Teesalu et al. 2002). La actividad del tPA está regulada por diferentes mecanismos (Collen 1999), destacando la liberación del mismo por parte de las paredes de los vasos sanguíneos, su rápido aclaramiento del plasma por el hígado o la interacción selectiva con las moléculas de fibrina ligadas al plasminógeno. Sin embargo, su activación puede no requerir la presencia de la activación del plasminógeno, como lo ha sugerido

su activación: 1) a nivel de la microglía (Rogove et al. 1999), 2) en el desarrollo de las fibras musgosas a nivel hipocampal (Wu 2000), y 3) en la activación mediada por el t-PA de la señal del receptor NMDA (Nicole et al. 2001).

A continuación describiremos aquellos receptores en el SNC relacionados con el tPA.

***a.) Receptores lipoproteínicos de baja densidad (LRP):***

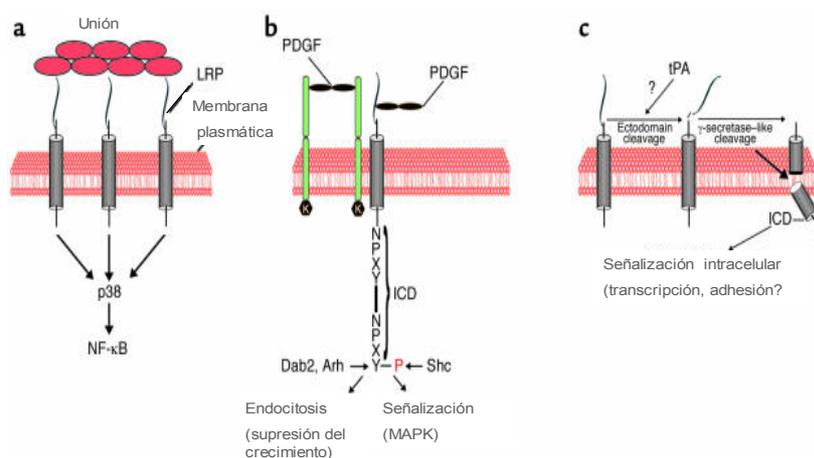
Los receptores lipoproteínicos de baja densidad (LRP), tienen gran expresividad en el cerebro humano, en las neuronas (Tooyama et al. 1995), en la microglía y en los astrocitos (Marzolo et al. 2000). Los LRP forman parte de un grupo de receptores endocíticos, localizados en la mayoría de las células y con capacidad de unirse a diferentes ligandos, encontrándose entre ellos el tPA (Bu et al. 1992) y la MMP-9 (Hahn-Dantona et al. 2001). Entre sus funciones está el participar en procesos de transporte transendotelial a través de la barrera hematoencefálica (**Figura 5**), en procesos mediados entre la pared vascular y el SNC (Zhuo et al. 2000; Boucher et al. 2003). En suma, su función es modular la actividad proteasa en el cerebro. Median en la internalización celular a través de las neuroserpinas o a través de los complejos neuroserpinas-tPA (Makarova et al. 2003).

La interacción entre el tPA y el LRP regula la transcripción de la metaloproteinasa de matriz tipo 9 (MMP-9) (Wang et al. 2003) y la subsiguiente apoptosis. En los fibroblastos intersticiales renales se ha observado también que tPA actúa como una citocina que se une a los receptores de membrana LRP-1, induce la fosforilación de la tirosina y ponen en marcha la transducción de la señal intracelular y la expresión genética específica de la MMP-9 (Hu y Ivashkiv 2006). También se ha observado que la matriz neurovascular puede ser degradada bien directamente por el efecto proteolítico del t-PA o vía MMP9 mediada a través de la LPR (Wang et al. 2003, Yepes y Lawrence 2003).

Cao C et al. 2006, proponen la importancia en los pasos de la migración magrofágica de la mediación de 3 sistemas: las integrinas, el sistema de la coagulación-fibrinólisis y la endocitosis, es donde tendría su papel los receptores LRP-1 (**Figura 6**).

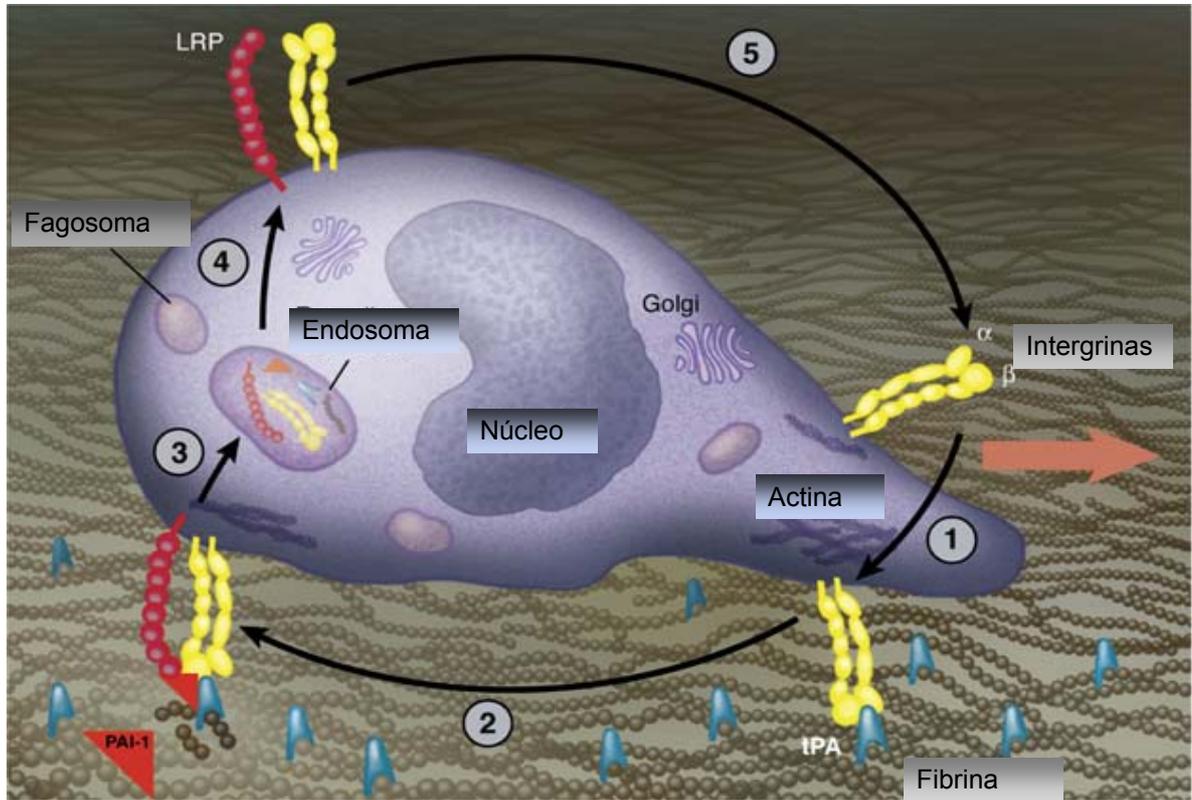
**Figura 5: Migración macrofágica y sistema de la coagulación-fibrinólisis.**

La migración de los macrófagos activados es esencial para la fase aguda de la inflamación y la iniciación de la inmunidad adaptativa. Esta migración depende del reconocimiento en la Mac-1 de un complejo binomio entre la fibrina y el tPA. La neutralización posterior del tPA por el PAI-1, al unirse al receptor endocítico LRP, dispara el cambio en las células de adhesión. La inactivación genética de la Mac-1, tPA, PAI-1 o LRP impide la migración del macrófago (Cao C et al. 2006).



- (a) Señalización a través del agrupamiento homotípico.
- (b) Formación del heterocomplejo de LRP con el receptor tirosin-kinasa de la membrana (PDGFR $\beta$ ) que a su vez modula la señalización PDGFR y controla la proliferación de VSMCs.
- (c) Procesamiento proteolítico del LRP por el tPA o por un mecanismo dependiente de tPA.

En esquema se representa en la siguiente figura (**Figura 6**):



**Figura 6:** tPA/ PAI-1 y su unión al receptor endocítico LRP.

Paso 1: Ataque de los macrófagos activados a la matriz extracelular por la vía de la formación de complejos binarios tPA/Fibrina.

Paso 2: La fibrina es degradada parcialmente por el tPA. El tPA es neutralizado por el PAI-1 y se unen a la LRP.

Paso 3: Unión por la LRP a las moléculas de adhesión e internalización de las integrinas.

Paso 4: Internalización del complejo Mac-1/LRP.

Paso 5: Movimiento hacia el borde células.

**b.) *Receptor N-metil-D-aspartato (NMDA):***

El tPA también interactúa en otros receptores como N-metil-D-aspartato (NMDA) (Koenig H et al. 1992; Cuzner y Opdenakker 1999). Se fija en el dominio amino-terminal de la subunidad NR-1 en la arginina 260, y a la subunidad NR2B. Sin embargo, el mecanismo por el que el tPA modula el receptor de NMDA es desconocido. Nicole et al. (2001), han postulado que el tPA potencia la señal mediada por los receptores glutaminérgicos en los cultivos de neuronas de corteza cerebral, interactuando con la subunidad NR1 del receptor NMDA. Así mismo, ellos han sugerido que esta interacción entre el tPA y la subunidad NR1 del NMDA se previene con el pre-tratamiento con PAI-1 recombinante, que bloquea el sitio catalítico del tPA. Se ha observado que la unión del tPA a la subunidad NR1 no está mediada por la plasmina (Fernández-Monreal et al. 2004).

**c.) *Anexina II:***

La anexina II (AII), forma parte la familia de las proteínas fosfolipídicas calcio-dependientes (Hajjar y Krishnan 1999). Aunque en condiciones basales (cerebro humano “sano”) tiene poca expresión (Reeves et al. 1992), en condiciones patológicas, como por ejemplo en tumoraciones cerebrales (Nygaard et al. 1998), aumenta su expresividad.

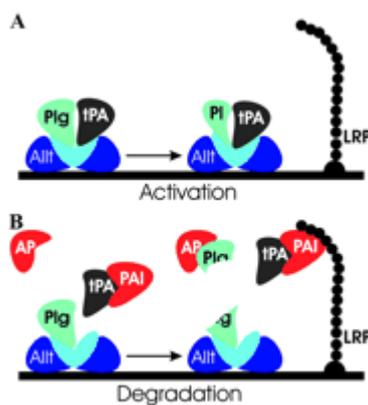
A través de su unión con la fibrina y la proteína de matriz extracelular denominada Tenascina C, la anexina II puede inducir directamente la actividad plasminolítica, dando lugar a la fibrinólisis, a la remodelación de la matriz extracelular y a la producción de factores angiogénicos (Siever y Erickson 1997; Ling et al. 2004). En los macrófagos y células tumorales esta es la vía más desarrollada, pues disminuyen las uniones locales y aumentan la capacidad invasiva (Falcone et al. 2001; Brownstein et al. 2004).

En el SNC la anexina II ha sido implicada en la activación microglial mediada por la tPA (Siao y Tsirka 2002), y es requerida para el ensamblaje de los filamentos ácido-proteicos en los astrocitos (Garbuglia et al. 1995).

En ausencia de AII-unida al tPA, como se muestra en la figura siguiente (**Figura 7**), la degradación del plasminógeno ocurre por pequeñas reacciones catabólicas que son inhibidas por anti-plasminas.

Recientemente Gveric et al. (2005) han inmunocolocalizado receptores LRP y anexina II en macrófagos y astrocitos de las lesiones agudas de Esclerosis Múltiple. Sus resultados muestran una disponibilidad limitada de t-PA en la lesión desmielinizante, a causa de la formación de complejos PAI-1/tPA, reduciéndose así la capacidad fibrinolítica en las lesiones activas. Este hecho conduce probablemente a el daño axonal.

**Figura 7:** Receptor Anexina II.



A: Activación del plasminógeno en plasmina en presencia de AII unida al tPA.

B: En ausencia de AII-unida al tPA la degradación del plasminógeno ocurre por pequeñas reacciones catabólicas que son inhibidas por antiplasminas.

Plg:plasminógeno;Pl:plasmina;  
AP:anti-plasmina.;AII:receptor  
anexina II

Fuente : Gveric et al. 2005

## ***E. SISTEMA DEL PLASMINÓGENO Y ESCLEROSIS MÚLTIPLE.***

Hallazgos cada vez más frecuentes evidencian la relación entre el sistema tPA/PAI con la desmielinización (Lu et al. 2002); así lo sustenta:

### ***E.1 La implicación del tPA en la Encefalomiелitis Autoinmune Experimental (EAE).***

a) El tPA promueve la desmielinización. La plasmina puede degradar directamente la proteína básica de la mielina (PBM) (Cammer et al. 1978), a través de la activación de la cascada de las metaloproteinasas de la matriz (MMPs) y romper las membrana (Cuzner y Opdenakker 1999).

b) El tPA puede alterar las reacciones inflamatorias en el SNC e incrementar la permeabilidad de la barrera hematoencefálica (Paterson et al. 1987).

c) El tPA puede promover la muerte celular por excitotoxicidad. Juega un papel en los estadios iniciales de Esclerosis Múltiple al contribuir a la muerte neuronal a través de la activación de la vía glutamatergica de los oligodendrocitos (Pitt et al. 2000).

d) El tPA puede contribuir a la regeneración neuronal al disminuir los depósitos de fibrina local (Herbert et al. 1996; Akassoglou et al. 2000), y al promover la migración de los progenitores de los oligodendrocitos a través de la matriz extracelular (Uhm et al. 1998).

Estos hallazgos confieren al tPA, en la EAE, un doble papel neuroprotector y neurotóxico, sustentado en:

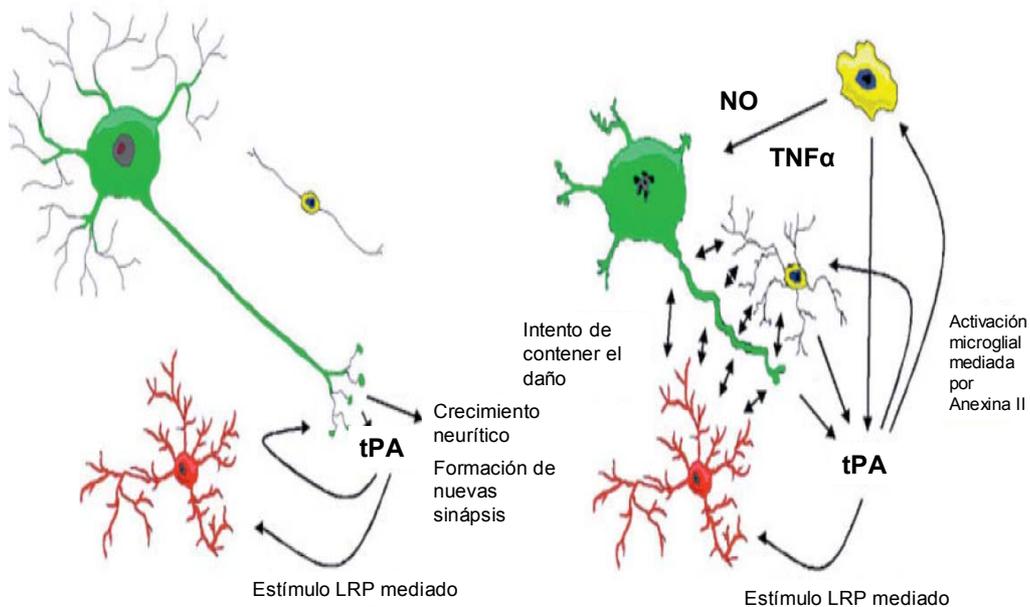
1.- EAE en ratones tPA<sup>-/-</sup>: El polimorfismo tPA<sup>-/-</sup> se ha relacionado con inicio más precoz, con brotes más severos y con una mayor progresión de la enfermedad. Ello implica recuperaciones parciales e incrementos del déficit neurológico comparado con ratones de otros polimorfismos genéticos.

2.- Desmielinización y patología axonal: El fibrinógeno en la fase aguda de la enfermedad se colocaliza con los neurofilamentos no-fosforilados en los axones de ratones tPA<sup>-/-</sup>, y ello, se relaciona con inicio más precoz del proceso desmielinizante y con una mayor cronicidad.

3.- La fibrina(-ógeno) y el plasminógeno están significativamente más elevados en los ratones tPA<sup>-/-</sup> en los brotes agudos de EAE. Utilizando anticuerpos específicos frente al fibrinógeno y productos de degradación de la fibrina como el Dímero D se hallaron acúmulos en regiones perivasculares afectas y en los axones inflamados. Estos datos apoyan el posible mecanismo patogénico de los mismos en la desmielinización (Akassoglou y Strickland 2002). El aumento de fibrina se ha relacionado con la inflamación mediante la activación y modulación de las células de adhesión, la migración celular y la expresión de citocinas (Smiley et al. 2001). Mostramos en la **figura 8** un esquema aproximado de la relación entre el tPA y la función glial en condiciones normales y patológicas del SNC (Gravanis y Tsirka 2005).

4.- La plasmina y uPA son capaces de romper la laminina (Chen y Strickland 1997) y la fibronectina respectivamente y, posiblemente, otros componentes de la matriz extracelular de los axones. El uPAR puede activar otras proteasas extracelulares de la familia de las metaloproteinasas de la matriz (MMPs), conocidas por tener efectos neuroinflamatorios, y en especial la MMP-9 que es capaz de degradar la mielina (Cuzner y Opdenakker 1999).

**Figura 8.** *tPA y función glial en la salud y la enfermedad.* El tPA remodela la matriz extracelular, permitiendo a las neuronas la formación de nuevas sinapsis y el crecimiento neurítico. En la enfermedad, la sobreexpresión de tPA conduce a la activación de la microglia (amarilla) alterando la capacidad buffering astrocitaria (roja). La microglia perineuronal trata de contener el daño -efecto neuroprotector- (flecha de dos puntas), mientras más distalmente puede secretar mediadores tóxicos y amplificar la neurodegeneración. Fuente: (Gravanis y Tsirka 2005).



En conclusión podemos decir, que tanto el tPA como el uPAR están implicados en la inflamación, desmielinización y neurodegeneración que se produce en la EAE, hallazgos que abren una posible nueva puerta terapéutica.

**E.2.- Modificación de los niveles de tPA/PAI en el LCR en pacientes afectados de EM.**

Tanto en LCR como en plasma las concentraciones de PAI-1 en pacientes afectados de Esclerosis Múltiple son contradictorias. Rao J et al. en 1993 presentó datos a favor de la existencia de bajas concentraciones de PAI-1 en sujetos afectados de Esclerosis Múltiple frente a las concentraciones halladas en sujetos sanos. En contra de los resultados citados, Onodera H et al. (1999), encontraron niveles plasmáticos de PAI-1 en 15 pacientes (2 varones y 13 mujeres) afectados de EM-RR seis veces mayores que los hallados en los controles. Por otro lado, Azkenami et al. (1996) y Teesalu et al. (2002), estudiando la concentración de tPA en LCR en pacientes afectados de Esclerosis Múltiple obtuvieron niveles superiores en esta patología a los hallados en otras condiciones inflamatorias agudas como la encefalitis y meningitis. A continuación mostramos los niveles de tPA en distintas patologías y en las placas desmielinizantes.

*Azkenami et al. (1996)*, obtuvieron en LCR niveles de tPA más altos en los sujetos afectados de Esclerosis Múltiple ( $p < 0.0001$ ), de Leucemia ( $p < 0.001$ ) y de encefalitis ( $p < 0.0001$ ) que en los sujetos del grupo control.

**Tabla 11.** Niveles de tPA en LCR.

| Grupos estudio          | tPA ( $\mu$ IU/ml)   |
|-------------------------|----------------------|
| Grupo referencia (n=20) | 43.7                 |
| E.M. (n=7)              | 497 ( $p < 0.0001$ ) |
| Leucemia (n=9)          | 275 ( $p < 0.001$ )  |
| Encefalitis (n=21)      | 245 ( $p < 0.0001$ ) |
| Meningitis (n=3)        | 63.5                 |
| Parálisis facial (n=3)  | 199                  |
| Poliradiculitis (n=1)   | 51.7                 |

*Teesalu et al. (2002)*, publicaron la existencia de un aumento significativo de los niveles de tPA y fibrina-Dímero D en las placas desmielinizantes de sujetos con Esclerosis Múltiple, y en el LCR, como se muestra en la siguiente tabla:

**Tabla 12.** Niveles en placas desmielinizantes de factores de la coagulación.

| Parámetros                      | EM          | Controles   | p (valor) |
|---------------------------------|-------------|-------------|-----------|
| tPA (ml/IU/ml)                  | 360+/-24    | 43.7+/-6    | <0.0001   |
| PAI-1 (ng/ml)                   | 0.65+/-0.1  | 0.31+/-0.1  | <0.05     |
| uPA (mIU/ml)                    | 5.6+/-1.6   | <0.01       | <0.0001   |
| Plasminógeno (%)                | 0.40+/-0.03 | 0.67+/-0.12 | <0.01     |
| Plasmina                        | Negativa    | Negativa    | -         |
| Plasmina- $\alpha$ 2antiplasmin | 58+/-7.5    | 29+/-8      | <0.05     |
| $\alpha$ 2-antiplasmina (%)     | 7.37+/-0.31 | 7.08+/-0.1  | NS        |
| $\alpha$ 2-macroglobulina (%)   | 0.42+/-0.01 | 0.44+/-0.01 | NS        |
| $\alpha$ 2-antitripsina (%)     | 4.95+/-0.04 | 5.04+/-0.07 | NS        |

### ***E.3.- Actividad del sistema fibrinolítico en las placas desmielinizantes.***

Se ha observado que uno de los signos más precoces de la inflamación de la sustancia blanca en la Esclerosis Múltiple es el incremento de la expresión de activadores del plasminógeno en los monocitos perivasculares (Cuzner et al. 1996), y del receptor de uPA en las células endoteliales (Dore-Duffy et al. 1994). El aumento y unión al receptor del activador del plasminógeno, favorece la proteólisis pericelular e induce el inicio de la cascada de activación de las MMPs.

Gveric et al. (2001), estudiaron secciones de tejido cerebral normal frente a placas desmielinizante en fase aguda y crónica. Encontraron tPA en los axones y en las paredes de los vasos mediante inmunolocalización de tPA con anticuerpos SMI-32 y mediante técnicas de inmunofluorescencia (neurofilamentos no-fosforilados). En los acúmulos perivasculares de la sustancia blanca aparentemente normal las células mononucleares expresaban tPA, mientras que en los bordes de las lesiones agudas desmielinizantes los acúmulos de tPA se localizaban tanto en los axones de gran diámetro como en los macrófagos. Por el contrario, en las lesiones crónicas fueron hallados predominantemente en las paredes de los vasos sanguíneos, desapareciendo de los axones desmielinizados del parénquima dañado.

Los valores encontrados por Gveric D. de tPA, MMP-9 y TIMP-1 fueron los siguientes:

**Tabla 13.** Niveles de tPA (antígeno y actividad), MMP-9 y TIMP-1 en las lesiones.

| Antígeno                 | NCWM          | NAWM         | AL           | SAL          | CL           |
|--------------------------|---------------|--------------|--------------|--------------|--------------|
| tPA (ng/mg)<br>(Ag)      | 38.87+/-28.97 | 19.37+/-7.12 | 19.09+/-5.94 | 18.69+/-6.65 | 27.93+/-10.9 |
| tPA(U/mg)<br>(Actividad) | 10.48+/-8.32  | 4.70+/-0.84  | 4.50+/-1.31  | 6.63+/-1.17  | 5.85+/-3.23  |
| MMP-9                    | 0.55+/-0.42   | 0.87+/-0.44  | 1.70+/-0.88  | 1.28+/-0.77  | 1.50+/-0.81  |
| TIMP-1                   | 6.44+/-1.78   | 9.62+/-4.73  | 19.11+/-4.69 | 15.80+/-8.50 | 11.70+/-4.59 |

NCWM: sustancia blanca normal de controles. NAWM: sustancia blanca aparentemente normal. AL: lesiones agudas. SAL: lesiones subagudas. CL: lesiones crónicas. MMP-9: metaloproteinasa de la matriz 9. TIMP-1: inhibidor tisular de metaloproteinasa 1.

Junto a lo anterior, también hallaron altas concentraciones de urokinasa PA (uPA), de receptor de la urokinasa PA (uPAR) y de PAI-1 en los macrófagos perivasculares de las lesiones desmielinizantes agudas (Gveric et al. 2001). En cuanto a la MMP-9 y al inhibidor tisular de la MMP-1 (TIMP-1), su aumento no sólo lo encontraron en la fase aguda, sino que también permanecían elevadas en la fase crónica.

En 2003, el mismo grupo de autores (Gveric D. et al), utilizando muestras de tejido cerebral (lesiones desmielinizantes agudas en sustancia blanca de pacientes con Esclerosis

Múltiple y controles sanos), observaron que se presenta una menor actividad fibrinolítica en las placas desmielinizantes, al parecer en el contexto de un aumento en dichas placas de proteasas inhibitoras del plasminógeno. Datos iniciales aportados mediante ELISA y Western Blot han sugerido un incremento de la actividad del PAI-1 en las placas de Esclerosis Múltiple, así como una reducción de la actividad de la enzima tPA. Sin embargo, no existe una clara evidencia de degradación del tPA, pues el decremento del potencial fibrinolítico podría explicarse por la formación de complejos PAI-1/tPA. El estudio mostró, así mismo, que la inhibición del tPA se debía al PAI-1 y no a otras neuroserpinas, y que existían péptidos de la degradación de la fibrina en las lesiones. Gveric D. et al. especulan sobre un posible doble mecanismo que podría contribuir a la reducción de la actividad fibrinolítica en estos pacientes: 1) la interacción del tPA con fibrina unida a PAI-1, generaría la disociación del PAI-1 y la formación de complejos (Vanmeijer et al. 1994) que son rápidamente internalizados por los macrófagos y, 2) por la mediación de las neuroserpinas que son coexpresadas con el tPA en las neuronas de la sustancia gris y axones, y que son reguladoras de la actividad del tPA in vivo.

#### ***E.4.- Activadores del plasminógeno y metaloproteinasas de la matriz: mediadores de la desmielinización:***

El plasminógeno actúa en la activación de la cascada de las metaloproteinasas (MMPs). Las metaloproteinasas son una familia de proteasas que intervienen en el funcionamiento normal de las células, pero también en procesos patológicos; ejemplo de ello lo observamos en la metastatización tumoral, en la destrucción artrítica, en la aterosclerosis y en la neuroinflamación.

En el Sistema Nervioso Central, las MMPs se han relacionado con la degradación de componentes de la lámina basal y con la ruptura de la BHE, contribuyendo así a la neuroinflamación, responsable de muchas patologías neurológicas.

Las neuronas expresan de forma constitutiva e inducible MMPs como respuesta al estrés celular. Secretadas como enzimas inactivas, requieren de otras proteasas, (Desrivieres et al. 1993; Fridman et al. 1995; Imai et al. 1995; Mazzieri et al. 1997; Fang et al. 1997; Knauper et al. 1997; Von Bredow et al. 1998; Davis et al. 2001) y radicales libres para su activación, y una vez activadas contribuyen a la supervivencia neuronal. Tienen sus propios inhibidores (TIMPs),

inhibidores endógenos que regulan el funcionamiento de las MMPs. De los fallos en esta regulación se favorecen múltiples patologías: la EAE, la isquemia cerebral, la hemorragia intracerebral, las infecciones víricas y bacterianas...etc.

Existen varias clases de MMPs, pudiéndose clasificar en:

- I. Colagenasas intersticiales: Colagenasa-1 (MMP-1), colagenasa I, II, III, VII, VIII, X, agrecanas, serpinas.
- II. Estromelisinias: Estromelisina -1 (MMP-3), colagenasa IV, V, IX, X, fibronectina, elastina, laminina, agrecanas, fibrilina, osteonectina, matrilisina (MMP-7), tenascina, versicana.
- III. Gelatinasas: Gelatinasa A (MMP-2), colagenasa I, II, V, VII, X, gelatinasa B (MMP-9)
- IV. Metaloproteinasas tipo membrana (MT1).

La microglía es un importante lugar de procedencia de MMPs (**figura 9**), como muestran los cultivos microgliales, donde tras estimulación con lipopolisacáridos (LPs), se producen un aumento de síntesis y expresión (Rosenberg et al. 2001). Recientemente estudios en ratas han demostrado que las células endoteliales, al ser estimuladas por LPs, producen MMPs, al contrario que al recibir corticoides (Harkness et al. 2000).

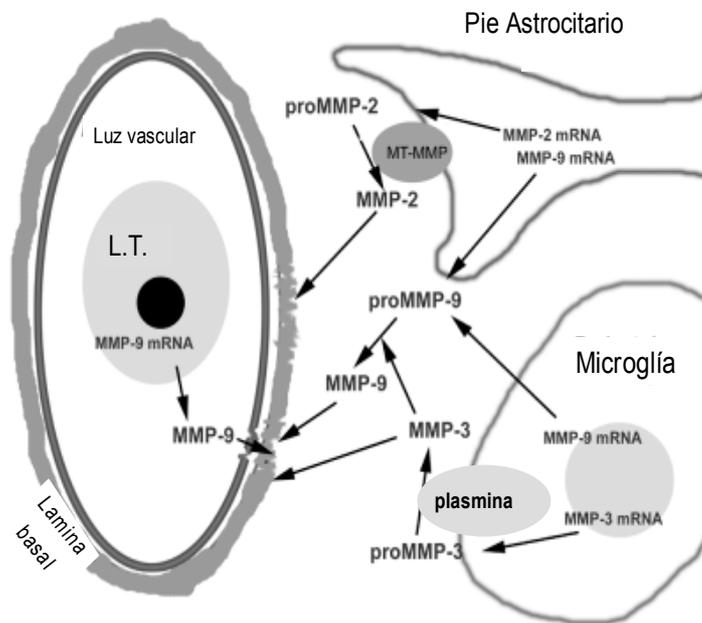
Estudios de tejido cerebral de lesiones desmielinizantes e isquémicas en la fase aguda han demostrado la presencia de Ac frente a la MMP-9, una proteasa de gran peso molecular, 92 kDa, que condiciones normales se encuentra a bajas concentraciones en los vasos sanguíneos y en los neutrófilos. Sin embargo, en las lesiones crónicas existe una mayor presencia de MMP-2 y MMP-7 en los astrocitos periventriculares, en la superficie pial y en los vasos sanguíneos (Rosenberg et al 2001). También se han observado niveles más bajos de MMP-9 en ratones tPA knockout que en controles, después de una isquemia cerebral focal (Wang et al. 2003)

En la fase aguda de la EAE se ha mostrado un aumento en la expresión y secreción de MMPs, pero con la evolución de la enfermedad, por la acción de los inhibidores-TIMPs- (en especial el GM6001), dicha expresión disminuye, recuperándose la integridad de la BHE y con

ello mejorando las condiciones clínicas (Gijbels et al. 1994). Estudios con otros inhibidores también mostraron resultados similares (Hewson et al. 1995, Liedtke et al. 1998).

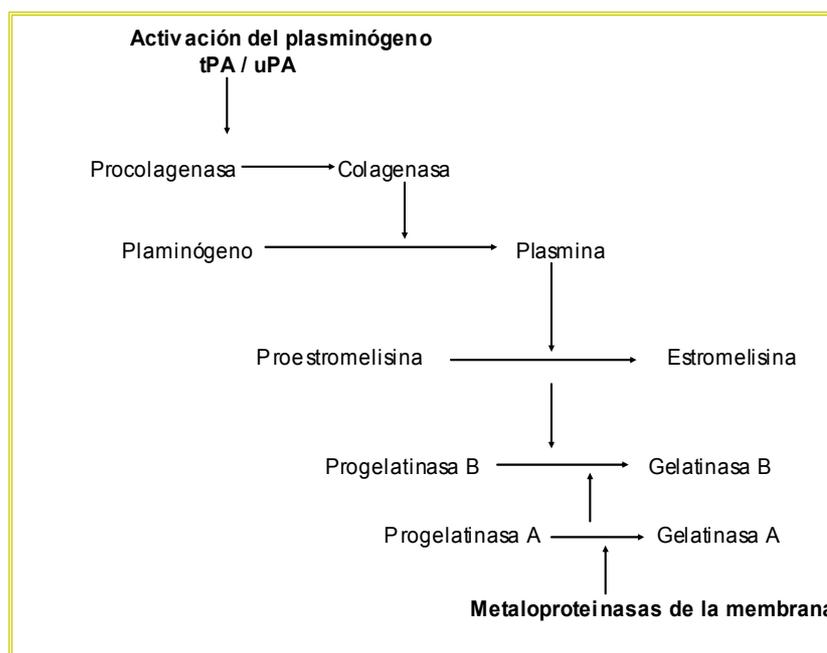
De los estudios existentes se puede extraer que el brote agudo de Esclerosis Múltiple se asocia a un aumento en la expresión libre de MMP-9 (LCR y suero) (Gijbels et al. 1992), y ésta a su vez con la rotura de la BHE. Así, Rosenberg et al. 1996, pusieron de manifiesto la reducción dramática de los niveles de MMPs en LCR, la reconstitución de la BHE (disminuye la captación de gadolinio) y la mejoría clínica, tras la administración de metilprednisolona intravenosa. También el tratamiento con Interferón Beta reduce los niveles de MMPs (RNAm) en suero (Galboiz et al. 2001).

**Figura 9:** Relación entre las MMP, plasmina, linfocitoT, microglía y astrocitos.



Mostramos la cascada de activación de las MMP por el sistema del plasminógeno.

**Figura 10 :** Plasminógeno y metaloproteinasas de la matriz (Cuzner y Opdenakker 1999).



### ***E.5. Polimorfismos del tPA-PAI y Esclerosis Múltiple:***

Tomando como base la relación existente, tanto in vitro como in vivo, entre el genotipo 5G-5G y baja producción de PAI-1, Luomala et al. 2000, realizaron un estudio para determinar la posible relación existente entre el polimorfismo 5G-5G del PAI-1 y el desarrollo de EM en la población finlandesa. Analizaron los polimorfismos y los niveles plasmáticos de PAI-1 en 104 pacientes afectados de EM y en 111 controles sanos, y los resultados mostraron en las mujeres con el polimorfismo 5G-5G un incremento del riesgo de desarrollar una EM (OR 2.3). También mostraron que este genotipo se relacionaba con niveles plasmáticos de PAI-1 menores que los que mostraban los otros polimorfismos.

---

## ***F. SISTEMA FIBRINOLÍTICO Y PATOLOGÍA NEUROLÓGICA.***

En los últimos años, múltiples estudios han demostrado la relación entre el sistema fibrinolítico y varias enfermedades neurológicas tales como la enfermedad cerebrovascular isquémica, crisis comiciales, enfermedades neurodegenerativas como la enfermedad de Alzheimer, enfermedades inflamatorias como la Esclerosis Múltiple, procesos tumorales primarios del Sistema Nervioso Central... etc. Realizaremos una sucinta revisión de la patología más relevante.

### ***f.1.- Relación entre el sistema del tPA-plasmina y patología cerebrovascular.***

#### ***1- tPA /PAI e ictus: aspectos fisiopatológicos***

La cascada del sistema plasminógeno/tPA es la vía proteolítica más importante de trombolisis (Collen 1999). La infusión de activadores del plasminógeno (tPA recombinante) y sus derivados, es utilizado para romper el coágulo y restituir el flujo tanto en el miocardio como en el cerebro. Pero aunque el tPA es utilizado como tratamiento del ictus, en su utilización hay que respetar criterios previos, pues el riesgo de efectos secundarios importantes es alto al poder generar daño neuronal (por edema) o hemorragia cerebral.

El tPA favorece la trombolisis y con ello la recuperación del tejido cerebral isquémico al restablecer el flujo sanguíneo. Sin embargo, la rotura de la BHE permite el paso al SNC de múltiples factores entre ellos el tPA. Éste en condiciones de BHE rota pasa en altas concentraciones, favoreciendo la formación del trombo y el daño en el parénquima cerebral. La inhibición del tPA en el SNC, genera el efecto contrario, pues induce la expresión de TGF $\alpha$  y del PAI-1 (expresado en los astrocitos), permitiendo cambios excitocitóxicos y la apoptosis celular (Yepes et al. 2000).

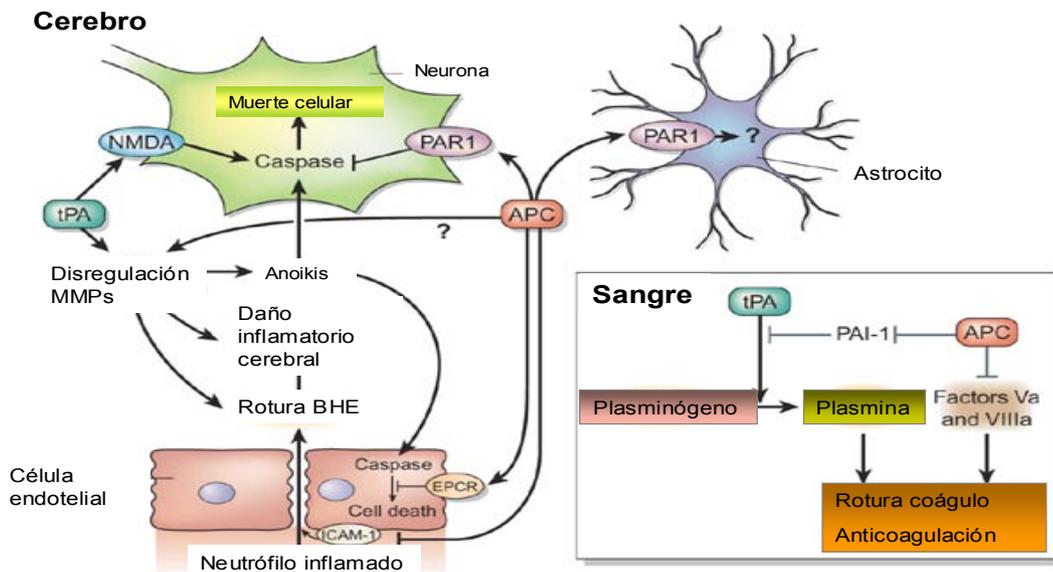
La isquemia cerebral afecta a todas las células de la unidad neurovascular (neuronas, astrocitos, células endoteliales y oligodendrocitos de la sustancia blanca). Se conoce que la proteína C activada puede simultáneamente tener por objetivo los componentes tanto vasculares como parenquimatosos de la unidad neurovascular. Debido a ello es por lo que Liu et al. (2004) proponen que la combinación entre el tPA y la proteína C activada pudiera ser una buena

combinación terapéutica, al combinar los efectos de reperfusión del tPA y la disminución de los efectos neurotóxicos por la proteína C activada. Y ello es debido a que la proteína C activada puede mejorar la perfusión uniéndose al PAI-1 e inactivando el Factor Va y VIIIa, aminorando la inflamación, al disminuir la regulación de las moléculas de adhesión como son el ICAM-1, VCAM, y E-selectina.

La proteína C activada también puede contrarrestar los efectos del tPA, al disminuir el NMDA que media en la neurotoxicidad, y la caspasa que media en la muerte de las células endoteliales a través de la activación de la proteasa activadora del receptor 1 (PAR1) y de la proteína C del receptor endotelial (EPCR). La proteína C activada, por otro lado, al inducir la disregulación de las MMPs, el tPA puede degradar la matriz neurovascular y romper la BHE, generando posibles complicaciones como son el edema y la hemorragia (en los pacientes que sufren un ictus). Un esquema de lo referido se muestra a continuación (**Figura 11**):

**Figura 11.** Mecanismo de acción del tPA y la proteína C activada en el ictus cerebral.

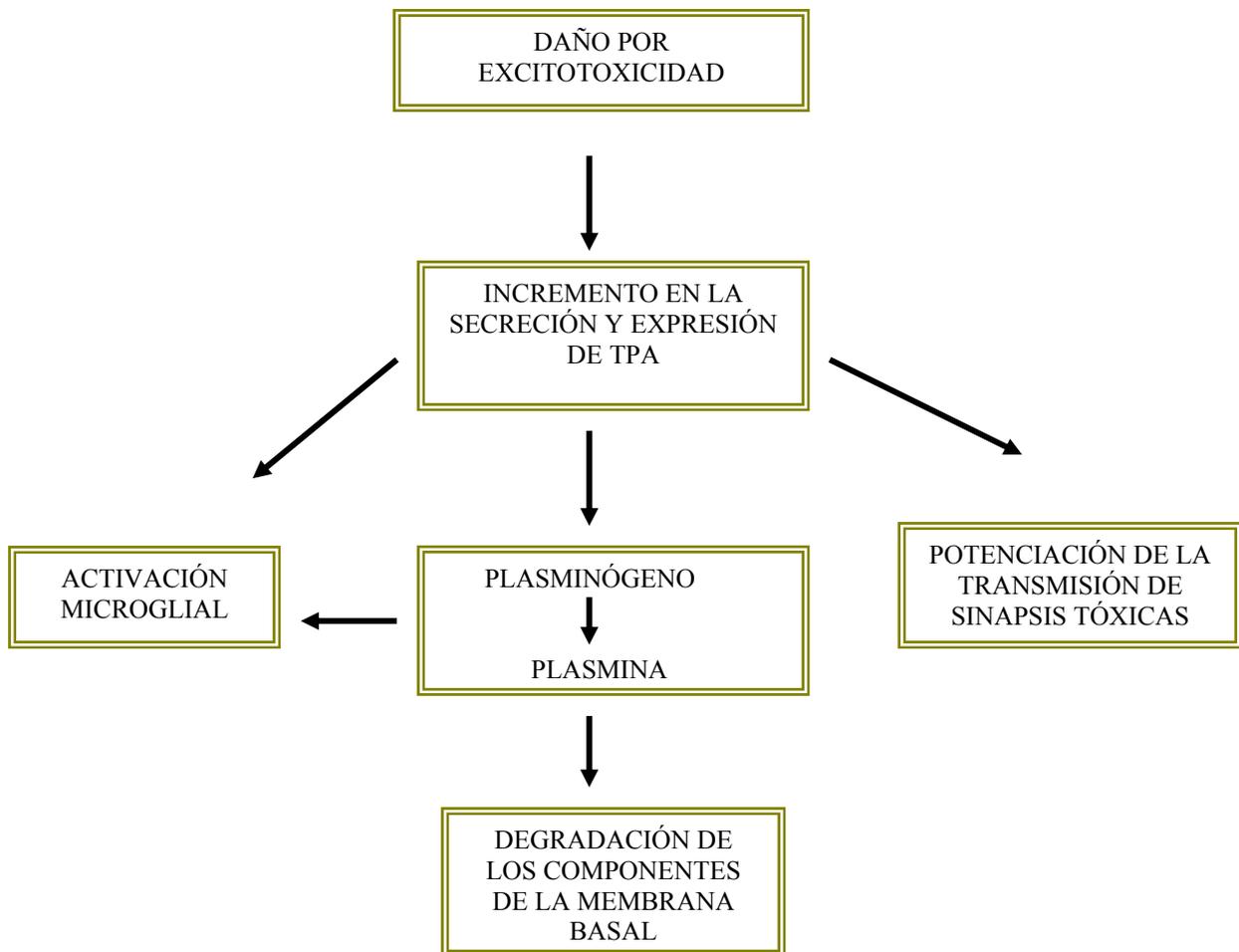
Fuente: Lo EH. 2004.



APC: proteína C activada, tPA: Activador tisular del plasminógeno, PAR1: receptor tipo 1 de la proteasa activadora, NMDA: Receptor N-metil-D-aspartato, MMPs: metaloproteinasas de la matriz, ICAM-1: molécula de adhesión (ICAM-1).

Junto a lisis del coágulo, el tPA puede tener una acción pleocitócica en el cerebro. Incluyen la vasoactividad, la unión al receptor N-metil-D-aspartato (NMDA) en la subunidad NR1, la amplificación de la conductancia intracelular de calcio, y la activación de otras proteasas extracelulares de la matriz (MMP) ej. MMP-9. Estos efectos pueden incrementar la excitotoxicidad, generar más daño en la BHE, y agravar el edema y la hemorragia cerebral. Si el tPA es efectivo y revierte la isquemia precozmente, la BHE se mantendrá intacta y el tPA permanecerá en el espacio vascular. Si el tPA es inefectivo y la isquemia prolongada, hay mayor riesgo de extravasación de tPA y por tanto de daño tanto de la unidad neurovascular como del parénquima cerebral. Métodos de neuroprotección, que prevengan la toxicidad del tPA o mecanismos adicionales pudieran ser una nueva puerta en el tratamiento de la enfermedad cerebrovascular. Un esquema (**figura 12**) de la función excitotóxica del t-PA se muestra a continuación.

*Figura 12: Daño por excitotoxicidad.*



## ***2.- tPA /PAI e ictus: aspectos clínicos-genéticos.***

Las anomalías en los principales reguladores del sistema fibrinolítico (tPA y PAI-1) se han asociado a un mayor riesgo de ictus en diversos estudios prospectivos, en los que se ha comprobado que las alteraciones de la actividad del PAI-1 y de las cifras del antígeno tPA, así como el tiempo de lisis de los coágulos de fibrina predicen los acontecimientos vasculares futuros (Ridker 1997). La asociación independiente entre las concentraciones plasmáticas elevadas de tPA de los varones aparentemente sanos, y el riesgo elevado de ictus futuro, induce a pensar que la alteración del sistema fibrinolítico precede en varios años a la aparición de la primera oclusión arterial, y constituye un marcador de arteriosclerosis preclínica. El aumento de los niveles plasmáticos del antígeno tPA guarda una asociación independiente con un mayor riesgo de ictus isquémico (Smith et al. 1997; Catto et al. 1997; Carter et al. 1998; Macko et al. 1999). Esta elevación puede explicarse por un aumento de los complejos tPA/PAI-1 plasmáticos, que también se asocian independientemente a la aparición del primer ictus (Johansson et al. 2000).

Recientemente, no sólo se ha relacionado al polimorfismo 4G/5G en la región promotora del gen del PAI-1 con los niveles circulantes del PAI-1 (Eriksson et al. 1995, Granchas et al. 1999), y al alelo 4/G con una expresión circadiana más pronunciada matutina del PAI-1 (Van der Bom et al. 2002), sino también al genotipo I/I del polimorfismo del t-PA con los niveles plasmáticos del PAI-1 en pacientes con infarto de miocardio (Lacoviello et al. 1996), y al alelo D del tPA con aumento de riesgo de ictus criptogénicos en pacientes jóvenes (Austin et al. 2002).

Sin embargo, al igual que sucede con el paciente con infarto de miocardio (Boekholdt et al. 2001; Yamada et al. 2002, Peters y Boekholdt, 2002), sigue siendo controvertido el papel que desempeña el sistema fibrinolítico y los polimorfismos del PAI-1 y tPA en el desarrollo del ictus, de tal forma que, según la población analizada, o bien no se ha establecido una relación entre el genotipo del PAI con el riesgo de ictus isquémico en adultos (Catto et al. 1997, Matsubara et al. 1999, Austin et al. 2002) o niños (Nowak-Göttl et al. 2001), o esta es protectora - 4G/4G - (Endler et al. 2000; Elbaz et al. 2001), o, por lo contrario, supone un factor de riesgo de ictus aterotrombótico -4G/4G- (Cha-Ok et al. 2001) o hemorrágico -5G/5G- (Reiner et al. 2001).

### ***3.- Genotipo del PAI-1 y enfermedad cerebrovascular.***

El gen del PAI-1 se localiza en la región q21.3-q22 del cromosoma 7 (Klinger et al. 1991). El promotor del polimorfismo 4G/5G del PAI-1 exhibe una mayor respuesta transcripcional a IL-1 en las células HepG2 con mayor síntesis de PAI-1 que en las células que contienen el genotipo 4G/4G (Dawson et al. 1993). Es triglicérido-dependiente (Mansfield et al. 1995). Se ve afectado por el sexo, citocinas y trombina (Takada et al. 1994). Exhiben un mayor nivel de PAI-1 los sujetos con el genotipo del PAI-1 4G/4G y elevadas concentraciones de triglicéridos (Kain et al. 2002). Y, por último, aunque los niveles de PAI-1 en portadores homocigóticos 4G es 25% más alto que en 5G/5G (Ye et al. 1995), el mayor determinante de los niveles de PAI-1 es la resistencia a la insulina. Estudios recientes no han encontrado diferencias significativas entre los niveles de PAI-1 o tPA entre el grupo de ictus y los controles, y aunque durante la fase aguda del ictus se han observado tanto niveles altos de PAI-1 (Lindgren et al. 1996), como valores normales (Fisher y Francis 1990).

La relación de los polimorfismos del PAI-1 con el riesgo de desarrollar ictus no está bien establecida y los resultados son dispares (Catto et al. 1997; Matsubara et al. 1999; Endler et al. 2000; Nowak-Göttl et al. 2001; Elbaz et al. 2001; Cha-Ok et al. 2001; Reiner et al. 2001; Austin et al. 2002). Los hallazgos de Roest (Roest et al. 2000) sugieren, aunque sus casos no estuvieran confirmados mediante TAC Craneal; que el homocigótico 4G/4G exhibe una reducción del riesgo de morir de ictus comparándolos con los homocigóticos 5G/5G; por lo que, sorprendentemente, el alelo relacionado al incremento en la transcripción del PAI-1 es el que asociaba con la reducción del riesgo.

Hallazgos similares los obtuvo Elbaz (Elbaz et al. 2001), quien realizó un análisis de todos los estudios publicados hasta entonces sobre la relación entre el genotipo PAI-1 e ictus, mostró que para una distribución genotípica en los 1133 casos de ictus: 4G/4G, 296 (26,1%); 4G/5G, 559 (49.3%); y 5G/5G, 278 ( 24.5%) frente a los 1144 controles: 4G/4G, 344 (30.1%); 4G/5G, 587 (51.3%); y 5G/5G, 213 (18.6%), y usando el 5G/5G como grupo de referencia, el OR para el homocigótico 4G/4G era de 0.66 (95% CI, 0.52 a 0.84) y de 0.73 (95% CI, 0.59 a 0.90) para el heterocigótico 4G/5G. Sin embargo estos datos no son reproducidos en el estudio sobre infarto de miocardio e ictus en mujeres jóvenes de Hindorff (Hindorff et al. 2002), para quien ser portador del alelo 4G ni se asocia a ictus (isquémicos como hemorrágicos) ni a infarto

de miocardio. Recientemente Yamada et al. 2002, examinando 112 polimorfismos de 71 genes potencialmente asociados a infarto de miocardio, encuentra que el alelo 5G del PAI-1 era un factor de riesgo para infarto de miocardio en mujeres.

Puesto que el polimorfismo 4G del PAI-1 es responsable del incremento de la transcripción del PAI-1 y del aumento de su producción, el exceso de PAI-1, no sólo conduciría a una reducción de la activación del plasminógeno a plasmina, sino que también podría contribuir al desarrollo enfermedad arteriosclerótica a través de la activación del sistema de las metaloproteinasas de la matriz extracelular (Lijnen y Collen 1999).

Sin embargo a pesar de todos los estudios publicados a favor de la relación entre el alelo 4G del PAI-1 y el riesgo de enfermedad cerebrovascular y cardiovascular siguen apareciendo estudios que siguen sembrando la controversia. Estudios muy recientes, van Goor et al. (2005) y Jood et al. (2005) no hallaron relación significativa entre ningún polimorfismo del PAI-1 y el mayor riesgo de enfermedad cerebrovascular, sin embargo Jood et al. (2005), si halló efecto protector de los polimorfismo 4G/4G del PAI-1 y el polimorfismo II del tPA.

#### ***4. Genotipo de tPA y enfermedad cerebrovascular***

El gen tPA, se localiza en el cromosoma 8p12-p11.2 y contiene 14 exones. Aunque el polimorfismo Alu I/D en este gen se ha asociado a infarto de miocardio (Van der Bom et al. 1997), hay resultados dispares (Lacoviello et al. 1996). En dos estudios prospectivos, se ha asociado el aumento de la actividad del tPA con el incremento de la actividad fibrinolítica y de ictus (Ridker et al. 1994; Smith et al. 1997). Se ha sugerido que la concentración de tPA y del complejo tPA/PAI es un factor predictivo para un futuro infarto cerebral, siendo la correlación más pronunciada en caso de hemorragia cerebral, y que ello refleja una disfunción endotelial más severa (Johansson et al. 2000).

Austin et al. (2002), en una población con ictus de origen criptogénico encuentran que, independientemente del sexo, el alelo D del tPA era ligeramente más común que en los ictus no criptogénicos, y que el riesgo de ictus se acercaba al doble cuando se llevaba al menos un alelo D (RR, 1.8; 95% CI, 1.1, 2.8; P=0.01); sin embargo, no encuentran, o es escasa, la asociación entre los genotipos del PAI-1 para todos los tipos de ictus. A pesar de ello, los niveles de tPA

plasmáticos no se han relacionado con el genotipo tPA en el IM o tromboembolismo (Hooper et al. 2000).

### ***f.2.- Relación entre el sistema de tPA-plasmina y el dopaminérgico.***

El plasminógeno incrementa en cultivos neuronales la recaptación de dopamina y el contenido de ésta (Nagata et al. 1993) y, recientemente, se ha descubierto la existencia de una estrecha relación entre el sistema activador del plasminógeno y la remodelación y estimulación psicomotriz. Se ha observado que este sistema regula la liberación y síntesis de morfina-dopamina en el Núcleo Acumbens (NAc) del estriado ventral. Esta relación se puso de manifiesto al realizar microinyecciones de PAI-1, t-PA y plasmina en el NAc dando como resultado los siguientes hallazgos:

- a. El tratamiento con morfina incrementa los niveles de PAI-1 en el NAc.
- b. Las microinyecciones de PAI-1 (dosis dependiente) reducen los niveles de dopamina y la hiperlocomoción.
- c. Las inyecciones de tPA por el contrario potencian la síntesis de dopamina y la hiperlocomoción.
- d. Por último las microinyecciones de plasmina, inducen el aumento de dopamina pero no inducen la hiperlocomoción.

De todo ello surge la hipótesis de que el sistema tPA-plasmina está involucrado en la regulación-producción de dopamina. Sin embargo, el sistema tPA-plasmina no interviene en los efectos anti-nociceptivos de la morfina, pues la inyección intracerebroventricular de PAI-1, tPA y plasmina a altas dosis no tiene efectos sobre la actividad antinociceptiva de la morfina (Nagai et al. 2005).

### ***f.3.- Relación entre el sistema de tPA-plasmina y el abuso de fármacos y alcohol.***

Existe también relación entre el sistema mesolímbico y el sistema fibrinolítico:

---

### ***1.- Morfina y meta-anfetaminas:***

El tPA a través de la plasmina juega un importante papel en la potenciación y dependencia (efectos) derivados del consumo crónico de morfina y anfetaminas. Se conoce que algunas citocinas, como el TNF, y factores neurotróficos, incluyendo el factor de crecimiento de fibroblastos y el tPA, generan efectos pro-adictivos (Nakajima et al. 2004).

El mecanismo es aún incierto, pero parece estar en relación con la menor expresión de RNAm tPA en el cortex frontal, NAc, N. Estriado e hipocampo derivado del tratamiento crónico con morfina, y con ello la reducción de proteínas ligantes (CREBP ó response element-binding protein).

La vía mesolímbica dopaminérgica se proyecta desde el núcleo ventral del tálamo al NAc y es, a este nivel, donde parecen actuar tanto los estímulos eléctricos como los fármaco-tóxicos, poniendo en marcha los mecanismos de dependencia–adicción. Los datos electrofisiológicos y bioquímicos sugieren que el tPA interacciona con el receptor D1 dopaminérgico (Nagai et al. 2004, 2005), degradando proteínas de la matriz extracelular, entre ellas la laminina.

La laminina en la sinápsis se colocaliza en las zonas activas de los canales de calcio induciendo el incremento de los niveles de calcio en las neuronas de los ganglios ciliares, y son estos cambios los que pudieran determinar alteraciones en el calcio celular, lo que favorecería la disminución de la despolarización evocada por la dopamina.

En definitiva el sistema tPA-plasmina pudiera intervenir en la adicción a fármacos y drogas a través del papel que el tPA juega en la plasticidad sináptica. De esta forma el tratamiento crónico con morfina u otras sustancias como las meta-anfetaminas inducirían un aumento de expresión de tPA RNAm en el NAc, hecho que se asociaría a un aumento de la actividad enzimática (Iwata et al. 2004).

**Tabla 15:** Cambios inducidos por las metaanfetaminas y la morfina en los biomarcadores y en el comportamiento en ratones tPA -/-.

|                               | <b>Metanfetamina</b> | <b>Morfina</b> |
|-------------------------------|----------------------|----------------|
| <b>RNA<sub>m</sub> - tPA</b>  |                      |                |
| Simple                        | +/-                  | Aumenta (++)   |
| Repetido                      | Aumenta (++)         | Aumenta (+)    |
| <b>Brote de Dopamina</b>      |                      |                |
| Forma nativa                  | Aumenta              | Aumenta        |
| tPA -/-                       | N.D                  | Disminuye      |
| tPA -/- + tPA                 | N.D                  | Aumenta (+)    |
| <b>Hiperlocomoción</b>        |                      |                |
| Forma nativa                  | Aumenta (+)          | Aumenta (+)    |
| tPA -/-                       | Aumenta (+)          | Disminuye      |
| tPA -/- + tPA                 | Aumenta (+)          | Aumenta (+)    |
| <b>Sensibilización motora</b> |                      |                |
| Forma nativa                  | Aumenta              | Aumenta        |
| tPA -/-                       | Disminuye            | Disminuye      |
| tPA -/- + tPA                 | Aumenta              | N.D.           |

Recientemente, Iwata N et al. (2004) estudiaron en 185 pacientes con abuso/psicosis por metaanfetaminas los genes del sistema tPA/plasminógeno, sin encontrar una relación significativa de ninguno de los polimorfismos.

En la **Tabla 15** (Nagai et al. 2005) mostramos los cambios en los biomarcadores (dopamina y t-PA mRNA) y en el comportamiento motor inducidos por la morfina y la meta-anfetamina en ratones t-PA -/-.

### ***2.-Alcohol:***

La dependencia al etanol es una forma de adaptación de la plasticidad neuronal (hipotálamo, amígdalas...), mediada por un amplio sistema de receptores, entre los que destacan los receptores NMDA, en especial la subunidad NR2B, y a los que se une el tPA (Nicole et al. 2001). El tPA extracelular interaccionaría con el receptor NMDA modulando a su vez las propiedades de la subunidad NR2B. Un estudio reciente (Nicole et al. 2005) ha revelado que la subunidad NR2B probablemente se activa a partir de la NR1. En todo caso, la acción del etanol sobre el cerebro es muy compleja por sus efectos (las alucinaciones, las crisis comiciales, el temblor...) y por las vías que a ello evocan, pues múltiples son los neurotransmisores y receptores implicados. En lo que nos concierne, la sobreestimulación de los receptores de NMDA genera la despolarización neuronal y por tanto la liberación de tPA. El tPA promovería a su vez un efecto “feed-back” sobre los receptores NMDA, generando la fosforilación de la subunidad NR2B y activando a la kinasa ERK1/2 (Pawlak et al. 2005). Lo contrario, la supresión brusca de alcohol, incrementaría la producción de receptores mediados por el tPA, lo que probablemente desencadenaría gran parte de los síntomas que genera la deprivación alcohólica.

### ***f.4.- Relación entre el sistema de tPA- plasmina y los cuadros de ansiedad-stress.***

Como hemos mencionado tanto en las amígdalas cerebelosas como en el hipocampo se expresa profusamente el tPA. En el denominado trastorno de stress postraumático, los sentimientos de temor y ansiedad están mediados por la amígdala. Actualmente se ha demostrado la implicación del tPA amigdalino como promotor del stress y de la ansiedad, al activar el factor corticotrópico (CRF), y así mediar en la plasticidad neuronal y en la neuromodulación.

Los ratones con déficit de tPA responden al tratamiento con CRF con una disminución en la amígdala de la expresión de c-fos, un indicador de la activación neuronal, y se correlaciona

con un comportamiento menos ansioso. Este efecto, sin embargo, no es inducido por el plasminógeno (Matys et al. 2004). Por otro lado, se ha observado que el stress crónico hay una disminución de los receptores NMDA y las espinas dendríticas en CA1, CA3 y giro dentado del hipocampo. Estos cambios se co-localizan con una generación acelerada de plasmina, dando lugar a una alteración en el aprendizaje espacial, alteración que se ve atenuada en los ratones en los que se ha modificado genéticamente la expresión del tPA y plasminógeno (Pawlak et al. 2005).

***f.5.- Relación entre el sistema del tPA-plasmina y la proteína amiloide (demencia de Alzheimer y la encefalopatía familiar con cuerpos de inclusión de neuroserpina).***

El activador tisular del plasminógeno tipo urokinasa (uPA) interviene en la conversión del plasminógeno en plasmina (Finckh et al. 2003). La activación de la cascada proteolítica mediada por la plasmina se ha implicado recientemente con la eliminación de proteína amiloide. En esta cascada, el uPA, tras activarse por unión con agregados de fibrina y otros sustratos como los A $\beta$  agregados (Tucker et al. 2000), favorece la activación del plasminógeno y éste, a su vez, la producción de proteasas serínicas activas, capaces de proteolizar la fibrina y otros sustratos. Estudios in vivo e in vitro, han implicado al uPA con procesos formativos de la proteína precursora de amiloide, la proteína  $\beta$ -amiloide -A $\beta$ 42, (Belorgey et al. 2004; Ertekin-Taner et al. 2005) cuya presencia esta bien documentada en la enfermedad de Alzheimer. De hecho, una mutación en el codón 141 (Citosina/Timina-C/T por Citosina/Citosina-C/C) del gen PLAU, codificador de uPA y localizado en el cromosoma 10q 22.2 , se ha visto relacionado con el inicio más tardío de la enfermedad de Alzheimer. Ser en el codón 141 C/C confiere un riesgo frente al ser C/T.

Por otro lado, estudios in vitro han mostrado que el péptido amiloide (A $\beta$ ), el principal componente de las placas seniles, pueden estimular la expresión de RNAm y la actividad del tPA (Kingston et al. 1995; Wnendt et al. 1997; Tucker et al. 2000a), aumentando con ello la producción de plasmina y la subsiguiente degradación del A $\beta$  (Ledesma et al. 2000; Tucker et al. 2000a, 2000b). Recientemente, la relación del sistema tPA-plasmina en el aclaramiento del A $\beta$  también se ha demostrado in vivo (Melchor et al. 2003). Estos hallazgos sugieren que el tPA, a

través de la generación de plasmina, pudiera aportar beneficios en el tratamiento de la enfermedad de Alzheimer.

Muchas son las enfermedades neurodegenerativas que tienen relación con el sistema tPA-plasmina y las neuroserpinas a través de la formación de agregados proteicos. Así, en la encefalopatía familiar con cuerpos de inclusión de neuroserpinas (FENIB), que se caracteriza por una demencia progresiva y epilepsia, con fallecimiento al cabo de unos 10 años de evolución, se ha observado que los cuerpos de inclusión intraneuronales se deben a la polimerización de una neuroserpina mutante (Davis et al. 1999; Belorgey et al. 2004).

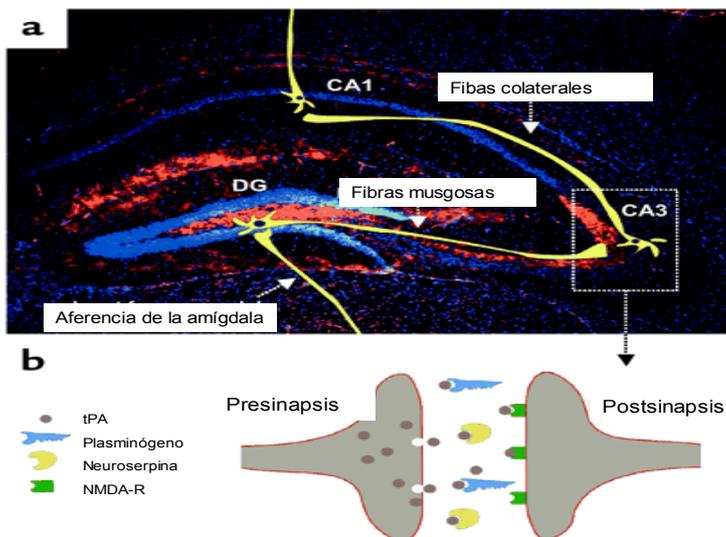
### ***f.6.- Relación entre el sistema del tPA-plasmina y las crisis comiciales.***

En 1993, Qian et al., mostraron en cerebro de ratón, que una hora después de provocar una crisis, por la administración de pentylenetetrazol, se inducía la expresión de tPA en hipocampo. Una década después, Yepes y Lawrence (2004), mostraron que a los 10 minutos de inyectar en la amígdala kainato, un análogo potente del glutamato que genera una masiva despolarización y muerte neuronal, aumentaba la actividad del tPA y de las neuroserpinas, desarrollándose crisis y su generalización. Sin embargo, al inyectar sobre el hipocampo neuroserpinas, previa a la administración del kainato, se bloqueaba la progresión y generalización de las crisis. Este hallazgo ha llevado a pensar que el tPA participa de la generalización pero no de la inducción de las crisis epilépticas.

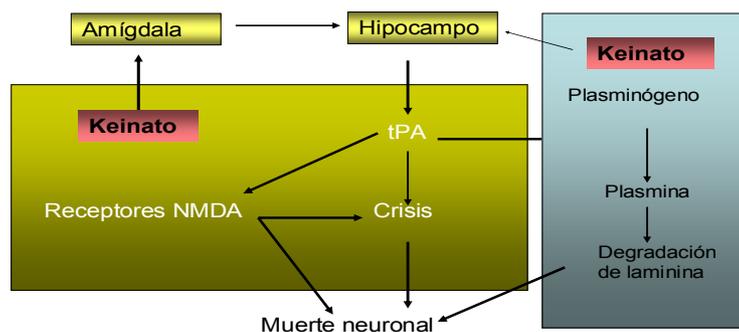
En éste caso el mecanismo de acción de la tPA es también muy similar al desarrollado en la dependencia alcohólica, pues está mediado a través de la subunidad NR2B del receptor NMDA.

En la **figura 13**, se muestra la distribución del tPA en el hipocampo, el esquema de las aferencias desde la amígdala, y las tres sinapsis del circuito neuronal hipocampal. En este sistema, que mostramos en el esquema posterior, el tPA actúa como sustrato diferente al plasminógeno, y observamos que los efectos de las neuroserpinas en la progresión de las crisis y la supervivencia de las neuronas están mediado por la inhibición del tPA (Yepes et al. 2002, 2004) (**figura 14**).

**Figura 13.:** Representación esquemática de una sinopsis hipocampal. El tPA es liberado en la terminal presináptica con la despolarización neuronal y se une a los receptores NMDA postsinápticos. El tPA puede también unirse e inhibir las neuroserpinas, atenuando las crisis comiciales y la muerte celular.



**Figura 14:** Mecanismo de acción del tPA en la progresión de las crisis epilépticas y en la supervivencia neuronal (Yepes et al. 2002).



---

***f.7.- Relación entre el sistema del tPA-plasmina y el sistema cerebeloso (aprendizaje).***

El tPA se presenta a altos niveles durante la etapa embrionaria y neonatal, especialmente en las células cerebelosas de Purkinje, que son muy vulnerables a tóxicos, a la hipoxia, a los cambios vasculares, etc.; habiéndose observado, en esta etapa, que las neuronas granulares que expresan tPA realizan una migración 51% más rápida que las neuronas granulares de ratón tPA -/-, otorgándole al tPA un papel directo en la facilitación de la migración neuronal.

Se ha observado que en la etapa postnatal, en condiciones de actividad motora, hay una sobreexpresión de tPA mRNA y un aumento y remodelación de las sinapsis celulares en el cortex cerebeloso. De las regiones relacionadas con el aprendizaje, el cerebelo y el hipocampo presenta una amplia expresión del tPA. También es conocido que la memoria a largo plazo requiere la síntesis de nuevas proteínas que intervengan en cambios estructurales de las conexiones sinápticas (Bailey y Kandel 1993). Así, Black et al. (1990), observaron el aumento de las sinapsis entre las células de Purkinje en la corteza cerebelosa de las ratas, y que ésta estaba en relación con el aprendizaje de respuestas motoras. Por tanto, la expresión de tPA aumenta en el cerebelo de las ratas durante la acción motora (Seeds et al. 1995), como en el hipocampo durante la potenciación a largo plazo (Qian et al. 1993).

Puesto que la adquisición del complejo motor está asociada a un aumento en la actividad cerebelosa y a la remodelación sináptica en el cortex cerebeloso, Hesslow et al. (1999), demostraron que la vía aferente de las fibras musgosas a los gránulos cerebelosos se activaba y determinaba el “almacenaje de la memoria” durante el aprendizaje motor.

Y aunque el papel preciso del tPA es aún desconocido parecer estar implicado en la consolidación de la fase del aprendizaje en el ratón (lo contrario los ratones con déficit de tPA que tienen problemas de aprendizaje), así como en la actividad proteolítica implicada en las acciones motoras.

---

### ***f.8.- Relación entre el sistema del tPA-plasmina y el Sistema Nervioso Periférico.***

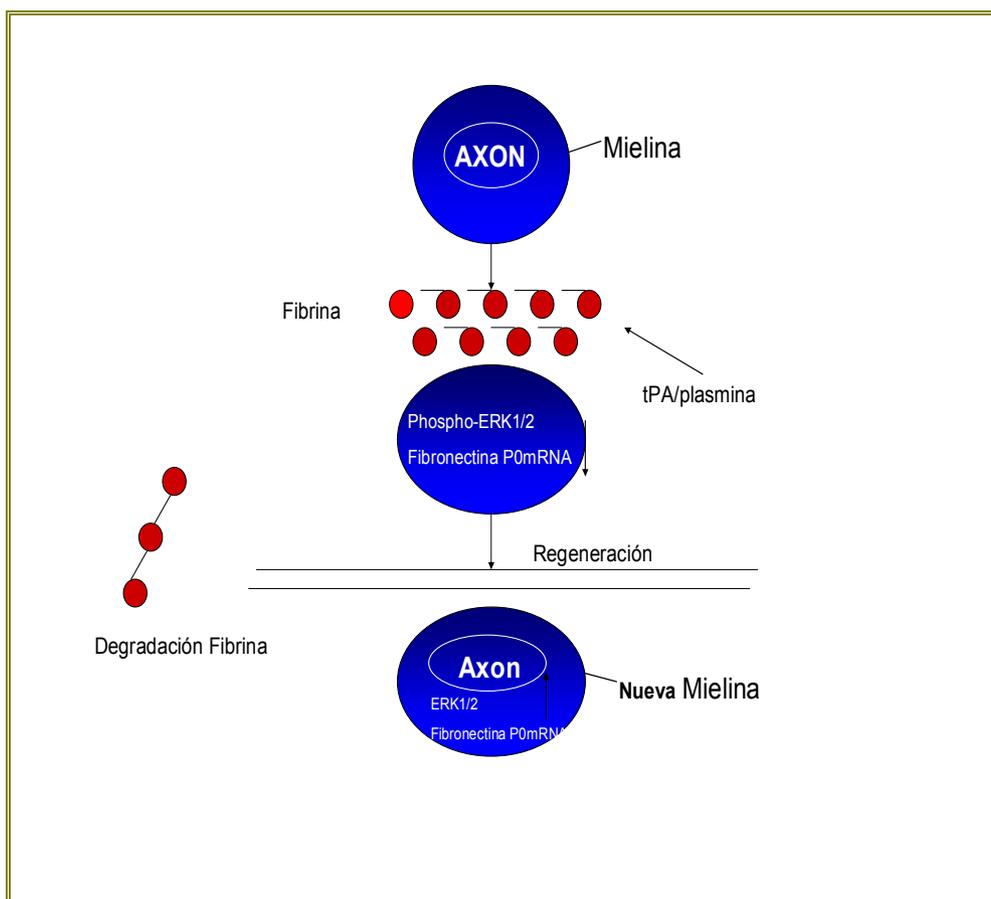
Estudios recientes han puesto de manifiesto la estrecha relación entre las proteínas de la matriz extracelular, el crecimiento versus regeneración del nervio periférico (Silver y Miller 2004) y las propiedades biológicas de las células de Schwann.

Entre los factores capaces de activar la proliferación de las células de Schwann destacan aquellos derivados de las proteínas de la matriz extracelular (Jessen y Mirsky 1999), preferentemente, la laminina (Anton et al. 1994; Chen y Strickland 2003) y los receptores integrinas-laminina  $\beta 1$  (Fernández-Valle et al. 1994; Feltri et al. 2002). Por ello se comprende que cambios en el fibrinógeno y alteraciones en las proteínas de la matriz extracelular sean inherentes al daño axonal.

Cuando un nervio sufre una agresión, la vascularización se altera generando la extravasación de fibrinógeno desde los alrededores del vaso, dando lugar a depósitos de fibrina (Akassoglou et al. 2002). Mientras que los depósitos de fibrina en el SNP se relacionan con la degeneración nerviosa (en tiempo y espacio), la eliminación de dichos depósitos en el nervio ciático (una actividad plasmino-dependiente) se relaciona con la regeneración (Akassoglou et al. 2000; Strickland 2001; Akassoglou et al. 2002) (**figura 15**). En las formas experimentales se aprecia un aumento de tPA y de la actividad proteolítica en dichas lesiones. Por tanto, en el SNP el tPA media la fibrinólisis como un mecanismo protector en la lesión (Akassoglou et al. 2002).

La fibrina interviene en el proceso de regeneración/remielinización del nervio a través de la proliferación de las células de Schwann, por la vía de la fosforilación extracelular (Kinasa 1 y 2 –ERK1/2), y al regular la expresión de fibronectina y del receptor de neurotropina p75 en dicha célula. Así pues, la porción distal del axón dañado, degenerado y eliminado por los macrófagos, las células de Schwann migran a través de las proteínas de la matriz extracelular (integrinas) (Milner et al. 1997). Mientras que en la proximidad de los nuevos axones, posteriormente proliferan y se diferencian, mielinizando el axón (Kioussi y Gruss 1996; Chernousov y Carey 2000).

**Figura 15:** Remielinización del nervio periférico por efecto de la fibrina ( Adams et al. 2004).



Por otro lado, también se ha visto, que tras el daño en el nervio periférico (ciático) se produce un aumento de tPA, de uPA y de la actividad proteolítica del ganglio dorsal de la médula espinal (Yamanaka et al. 2004). La inyección intratecal de un inhibidor del tPA, y la estimulación eléctrica en las neuronas del ganglio dorsal, disminuye la hiperalgesia térmica que se sucede a la lesión del nervio ciático, hallazgo que sugiere que el aumento del tPA en el ganglio dorsal media en la hipersensibilidad, y por tanto, podría representar un posible mecanismo del dolor neuropático.

### ***f.9.- Relación entre el sistema del tPA-plasmina/placas de desmielinización e infección por herpes virus en el Sistema Nervioso Central.***

Estudios recientes han puesto de manifiesto al analizar placas desmielinizantes la existencia de una co-localización, en las mismas, del antígeno para el virus herpes humano-6 y el

tPA. Este hallazgo no se interpreta en el sentido de que la infección por VHH-6 induzca la síntesis de tPA en el tejido nervioso; sino que dicha infección genera una respuesta inmunitaria que induce la activación del sistema del plasminógeno, el aumento del tPA, y en consecuencia, la destrucción tisular. Este hallazgo aporta un dato más a favor de la posible etiología viral de la Esclerosis Múltiple (Virtanen et al. 2005).

## **G. HOMOCISTEÍNA Y SISTEMA NERVIOSO CENTRAL.**

En el cerebro la homocisteína se localiza predominantemente en las células gliales (Benz et al. 2004), y, al ser un agonista endógeno de los receptores glutamatérgicos N-metil-D-aspartato (NMDA) causante de la elevación del  $Ca^{2+}$  intracelular, de la activación de proteínas proapoptóticas y de la muerte celular, participa en la neurotransmisión excitatoria, corroborando su papel como un “gliotransmisor”.

Se han descrito otras acciones en el SNC: 1) desarrollo de microangiopatía cerebral; 2) disfunción endotelial y stress oxidativo (Seshadri et al. 2002); 3) daño en el DNA neuronal, favoreciendo la apoptosis (Kruman et al. 2000); 4) disminución de la hidrofobicidad de la proteína básica de la mielina por hipometilación de la misma (la homocisteína es un donador importante en muchos procesos bioquímicos) (Kim et al. 1997) y, por último, 5) formación de proteínas N-homocisteína tras la acumulación de homocisteína-tiolactona, que actúan como neo-auto antígenos, induciendo así una respuesta inmune (Jakubowski 2005).

La homocisteína, en todo caso, induce la modulación del t-PA, uniéndose a su receptor de membrana celular sin aumentar su concentración. Por otro lado, la homocisteína ejerce sobre la expresión del gen del PAI-1 un aumento de la secreción vascular del mismo (Midorikawa et al. 2000).

En pacientes afectados de Esclerosis Múltiple se han observado niveles elevados de homocisteína (Ramsaransing et al 2006). Sin embargo, Ramsaransing et al. (2006), no objetivan diferencias en los niveles plasmáticos de homocisteína entre las formas benignas de Esclerosis Múltiple y aquellas con curso progresivo, ni encuentran correlación entre éstos niveles y las concentraciones séricas de IL-12, TNF $\alpha$  así como la producción de óxido nítrico leucocitario. Su implicación en la patogenia de la Esclerosis Múltiple es aún desconocida.

# *OBJETIVOS*

## ***Objetivos:***

Basándonos en todo lo anteriormente expuesto al introducir este trabajo, hemos diseñado un estudio con los siguientes objetivos:

- 1.- Evaluar la posible asociación entre el riesgo de desarrollar una Esclerosis Múltiple y aquellos factores del sistema de la coagulación: tPA, PAI-1, plasminógeno, antitrombina III, proteína C, proteína S, trombosmodulina y homocisteína, cuya presencia ha sido descrita en variados procesos fisiológicos y patológicos del Sistema Nervioso Central.
- 2.- Analizar si las variaciones en la actividad plasmática del tPA y del PAI-1 se correlacionan con el desarrollo y con la severidad de los brotes clínicos en la Esclerosis Múltiple.
- 3.- Estudiar la posible asociación entre la presencia en el genoma de determinadas variaciones polimórficas - el alelo de inserción (Alu I) en el intrón “h” del gen del tPA y las formas 4G/4G, G4/G5 y 4G/5G para el promotor del gen del PAI-1, y el riesgo de padecer una Esclerosis Múltiple.
- 4.- Estudiar la relación entre los niveles de homocisteína y las variaciones genotípicas en los genes del tPA y PAI-1 en la Esclerosis Múltiple.

# *MATERIAL Y MÉTODO*

## **Tipo de estudio:**

Para la consecución de nuestros objetivos, diseñamos un estudio epidemiológico observacional de tipo Casos-Controles.

### ***1.- Población de estudio: Casos y controles.***

La muestra se seleccionó en función de la presencia (casos) o ausencia de la enfermedad (controles), y se determinaron las variables de exposición en el mismo momento.

#### **1. a) Población de casos:**

Seleccionamos una muestra de 100 pacientes jóvenes (entre 18 y 57 años) residentes en el área norte de la provincia de Santa Cruz de Tenerife y afectados de Esclerosis Múltiple remitente-recurrente (criterios de Poser y McDonalds) que acudieron a consulta externa o ingresaron en planta de hospitalización entre el 1 de enero del 2003 y el 31 de diciembre de 2004.

Realizamos dos grupos de estudio:

- a.) Pacientes en los que el diagnóstico de Esclerosis Múltiple remitente recidivante se realizó en el período de inclusión, durante el brote clínico que permitió su diagnóstico.
- b.) Pacientes ya diagnosticados de Esclerosis Múltiple y que se encontraban en seguimiento y control por nuestra consulta. Éstos, a su vez, se clasificaron según el momento de la valoración, en:

- 1.) Pacientes en brote clínico.

- 2.) Pacientes en seguimiento rutinario.

En todos ellos el diagnóstico de la enfermedad, Esclerosis Múltiple, se realizó en base a criterios clínicos (ANEXOS 2, 3 y 4); de neuroimagen (ANEXO 6); de laboratorio (ANEXO 7); y neurofisiológicos (ANEXO 8); cumpliéndose así, en el

---

momento de su inclusión, los criterios de Poser (ANEXO 2) y los criterios de McDonalds (ANEXO 3).

Se clasificaron según la forma clínica en: forma clínica remitente-recidivante (RR), y formas progresivas. Éstas últimas, a su vez, se subdividieron en la forma primariamente progresivas (PP), la secundariamente progresiva (SP), y la puramente progresiva desde su inicio (P). Estas variantes clínicas se definieron según criterios al uso, (Confavreux y Compston 2006) (ANEXO 4).

Y a todos se les informó de su participación en un estudio de investigación y se les presentó un consentimiento informado que firmaron voluntariamente (ANEXO 1).

### **1. b) La población control:**

La constituyen sujetos que acudían a las Consultas Externas del Servicio de Neurología del Hospital Universitario de Canarias por patologías no relacionadas con el factor de exposición en estudio (cefalea tensional, enfermedad neuromuscular,...) y sujetos voluntarios sanos, trabajadores en el centro hospitalario en su mayoría (residentes médicos, personal de enfermería, estudiantes de medicina...). Dichos sujetos, recogidos en el mismo período de tiempo, eran comparables a los expuestos a la patología de estudio, en edad y sexo.

Tanto los casos como los controles residían en el área norte de la provincia de Santa Cruz de Tenerife.

### **2.- *Tamaño de la muestra:***

El Cálculo del tamaño de la muestra se basa en los hallazgos de Van der Bom et al. (1995).

### **3.- *Recogida de datos:***

Durante 24 meses reclutamos los casos y los controles. Todos los casos fueron sometidos a una exhaustiva exploración neurológica, y se les sometió a las escalas de evaluación clínica: EDSS, COMPOSITE y SCRIPP (ANEXO 5), para documentar su situación clínica. Aquellos en los que la inclusión se efectuó en el momento del diagnóstico fueron sometidos a una prueba de neuroimagen (ANEXO 6), estudio del

LCR (ANEXO 7) y un estudio neurofisiológico (ANEXO 8). En el resto de casos, las variables clínicas y los resultados de las pruebas complementarias se recogieron de forma retrospectiva. Junto a lo anterior, tanto en el grupo control como en el de casos, durante la fase de inclusión, se realizó analítica general, estudio protrombótico y estudio de determinación genética de los polimorfismos del PAI-1 y tPA, para lo se extrajo su ADN a partir de una muestra sanguínea de aproximadamente 6 c.c.

#### ***4.- Variables a estudiar y su análisis:***

Las variables objeto de nuestro estudio de investigación, fueron principalmente el estudio de trombofilia y el estudio genético de los polimorfismos del PAI-1 y tPA, pero junto a ellas se analizaron otras muchas variables que a continuación especificaremos:

##### **a) Variables descriptivas y análisis de la evaluación clínica.**

Se recogieron variables descriptivas como la edad, el sexo, el peso, la talla, los antecedentes personales (HTA, diabetes mellitus, patología tiroidea, consumo de tóxico Ej. tabaco, alcohol...), y los antecedentes familiares (de Esclerosis Múltiple u otras enfermedades autoinmunes).

Todos los pacientes fueron sometidos a una exhaustiva exploración neurológica, y evaluados, y valorados, por medio de tres escalas validadas para Esclerosis Múltiple complementarias entre si (ANEXO 5):

1.-Kurtzke Expanded Disability Status Scale -EDSS-: Valora desproporcional- mente la discapacidad para la deambulación, pero no mide adecuadamente ni la disfunción en miembros superiores ni el deterioro cognitivo, que contribuyen sustancialmente a la discapacidad.

2.-Multiple Sclerosis Functional Composite -MSFC-: Atiende a las deficiencias de la escala EDSS, pues valora apropiadamente la disfunción cognitiva y la capacidad motora de miembros superiores. Se correlaciona muy bien, con la calidad de vida.

3.- Neurologic Rating Scale –SCRIPP-: Escala muy descriptiva y mas subjetiva, dependiente por ello más del clínico.

### **b) Análisis por neuroimagen:**

Todos los casos fueron sometidos a un estudio de neuroimagen por Resonancia Magnética (ANEXO 6). A toda la muestra se les realizó estudio cerebral, y en un elevado número de casos se le hizo un estudio combinado cerebral-medular (General Electric® 1.5 teslas).

Las secuencias realizadas en todos los casos fueron el T1, el T2, la secuencia FLAIR, y la conocida como densidad protónica; y junto a ellas, en los pacientes que se encontraban en un brote clínico, también se le hizo secuencia T1 con contraste (Gadolinio –Gd).

### **c) Estudio neurofisiológico:**

A todos los pacientes se realizó un estudio de potenciales evocados (ANEXO 8): visuales -PEV-, troncoencefálicos -PEATC-, y somatosensoriales -PESS-.

### **d) Estudios en sangre periférica:**

Analizamos las determinaciones bioquímicas que pudieran influir en los niveles plasmáticos de factores de la coagulación como son la glucosa y los lípidos, y adicionalmente se solicitaron hemograma, monograma, hormonas tiroideas, parámetros de funcionamiento renal y hepático, ANA, ANCA, anticoagulante lúpico y Ac. antifosfolípidos.

### **e) Estudios en líquido ceforraquídeo (LCR):**

Analizamos aspecto, celularidad, la relación glucoprotéica y la identificación versus presencia de bandas oligoclonales (BOG) y proteína básica de la mielina. (ANEXO 7).

### **f) Estudio de trombofilia:**

Los parámetros de trombofilia estudiados fueron: Plasminógeno, activador tisular del plasminógeno (tPA) y su principal inhibidor (PAI-I), proteína S, proteína C,

resistencia a la proteína C, homocisteína, trombomodulina, antitrombina III, así como el INR y el tiempo de protrombina. La extracción se realizó a primera hora de la mañana, entre las 7,30 y 8,30h, para evitar la influencia de las variaciones circadianas de algunas determinaciones (p. ej. PAI-1).

Las determinaciones se realizarán utilizando tres tipos de técnicas:

- a. Coagulativas (resistencia a la proteína C).
- b. Cromogénicas (antitrombina III, proteína S, proteína C, trombomodulina, plasminógeno, antiplasmina, activador tisular del plasminógeno (tPA), inhibidor del activador tisular (PAI-1), anticuerpos antifosfolípidos, y resistencia a la proteína C.
- c. ELISA (anticuerpos antifosfolípido, trombomodulina, proteína S libre).

#### **g) Estudio genético:**

Se determinaron los polimorfismos Alu D/D, I/D, I/I, para el tPA y los polimorfismos 5G/5G, 4G/5G, 4G/4G para el PAI-1, a través del equilibrio de Hardy-Weinberg (verificado para test poblacionales).

#### **Tipaje genómico:**

Se llevó a cabo utilizando DNA purificado a partir de muestras de sangre periférica, mediante digestión con proteinasa K y ulterior precipitación con sales de guanidinio.

Aproximadamente 0.1 gr. de dicho DNA se sometió a un proceso de amplificación por medio de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) en torno a las secuencias polimórficas, en condiciones optimizadas para cada pareja de “primers”, y utilizando concentraciones finales de 1.5 mM MgCl<sub>2</sub>, 100 M. DNTPs, 0.5 M. de cada “primer” y 1 U Taq polimerasa.

Una fracción del producto de PCR fue digerida con el enzima de restricción apropiado y el RFLP resultante se analizó en geles de acrilamida al 5%.

| Gen   | Primers               | Temp. | Enzima | Tamaño  |
|-------|-----------------------|-------|--------|---------|
| TPA   | AGAGTTCCGTAACAGGACAG  | 60    | -      | 500 vs. |
|       | AGAAGGAGACTCAGTCAACC  |       |        | 188     |
| PAI-1 | CACGAGAGAGTCTGGCCACGT | 60    | Bsl1   | 98 vs.  |
|       | CCAACAGAGGACTCTTGGTCT |       |        | 77+22   |

### ***5.- Análisis estadístico:***

En todas las poblaciones testadas se verificó el equilibrio de Hardy-Weinberg.

#### ***Análisis univariante:***

Se realizó un análisis descriptivo de las variables, estimando medidas de tendencia central (media, mediana, moda, percentiles...), y de dispersión (desviación típica), así como sus respectivos gráficos en el caso de variables cuantitativas (histogramas, diagramas de caja,..). Para las variables categóricas, se resumieron los datos mediante distribución de frecuencias, y sus respectivos diagramas de sectores o barras, en caso necesario.

#### ***Análisis bivariante:***

Se compararon las medias de las variables cuantitativas, entre casos y controles, mediante el test T- de Student, dada la naturaleza normal de su distribución. La valoración estadística de las tasas de exposición encontradas se efectuó mediante la aplicación del test de Chi cuadrado de Pearson, de comparación de proporciones, que determinó si la diferencia existente pudo o no ser explicada por el azar (H0), o por la presencia de la variable independiente en estudio (H1). Se estimó asimismo la magnitud de la asociación mediante el cálculo de la odds-ratio (OR) bruta, y posteriormente, mediante el test de Mantel y Haenszel; ajustando esta OR por estratos. Se obtuvieron los respectivos intervalos de confianza del 95% (IC 95%), para un nivel de significación alfa del 5%. Para la comparación de los niveles sanguíneos de PAI-1, t-PA,

homocisteína y con los diferentes polimorfismos del PAI-1 y t-PA se utilizó el test de ANOVA (análisis de la varianza).

### *Análisis multivariante:*

Por último, dada la naturaleza dicotómica de la variable principal o dependiente (presencia o ausencia de Esclerosis Múltiple), y con la finalidad de predecir el comportamiento de esta variable de respuesta, en función de otras predictoras o independientes, se realizó un análisis multivariante mediante regresión logística no condicional. Utilizamos el “método introducir”; en un principio, incluyendo todas aquellas variables predictoras que mostraron asociación estadísticamente significativa, y no significativa, con la variable dependiente, y probando aquellas interacciones posibles. En el caso de que la interacción no fuese significativa, y siempre y cuando cada una de las variables que la compusiesen tampoco lo fuese, se sacaba del modelo.

Para los cálculos se ha utilizado el programa informático SPSS para Windows, versión 12.0, SPSS Chicago. Para la estimación de los intervalos de confianza del 95% de las OR en el análisis bivariado se utilizó el programa Epidat.

# *ANEXOS*

---

## ***ANEXO 1: CONSENTIMIENTO INFORMADO DEL PACIENTE***

El Proyecto de Investigación titulado: "Polimorfismos genéticos, alteraciones del sistema fibrinolítico y la enfermedad desmielinizante", pretende demostrar qué alteraciones en el sistema de la coagulación sanguínea podrían tener consecuencias negativas en la etiopatogenia, evolución clínica y respuesta terapéutica en los sujetos afectados de Esclerosis Múltiple. Lo que finalmente buscamos es detectar estas alteraciones y el daño que producen en el paciente afecto de Esclerosis Múltiple, y así poder aplicar medidas preventivas. Le anticipamos que las alteraciones que detectemos en este estudio serán tratadas según el conocimiento actual.

Existen sospechas fundadas de que una predisposición genética es precisa para desarrollar Esclerosis Múltiple. Por ejemplo, los pacientes con antecedentes familiares de enfermedades autoinmunes, los que pertenecen a determinadas razas, sufren estas alteraciones con más frecuencia. Nosotros pretendemos estudiar el ADN, con el fin de detectar cambios en su secuencia que nos indiquen qué enfermos tienen mayor riesgo de desarrollar enfermedad desmielinizante. Su colaboración puede ser útil para definir esos factores genéticos, lo que permitiría en un futuro detectar los enfermos que tienen más riesgo de desarrollar una enfermedad desmielinizante y sobre todo prever complicaciones evolutivas, y respuesta terapéutica.

Si usted acepta participar, solo se precisa una muestra de sangre de 6 cc extraída de una vena periférica en una visita de rutina y la firma de la presente autorización. Es posible que experimente una ligera formación de hematoma, coloración de la piel, enrojecimiento o tumefacción en el lugar de la punción cuando se extraiga la sangre. De esa muestra de sangre se extraerá el ADN. Esta prueba no tiene carácter diagnóstico sino solo investigador, y usted tiene total libertad para participar. Además le garantizamos que:

1. El ADN será utilizado exclusivamente para los fines del estudio, es decir, "definir polimorfismos genéticos que confieran predisposición a desarrollar "Esclerosis Múltiple". No podrá ser utilizado para ningún otro estudio sin autorización expresa del paciente, y quedará custodiado y etiquetado de manera anónima en la Unidad de Investigación del Hospital Universitario de Canarias (La Laguna, Tenerife).

2. La información que se derive del análisis es confidencial, y no podrá ser utilizada con otros fines diferentes al del estudio.

3. Si usted lo solicita sus muestras de sangre así como de ADN serán destruidas. En ese caso se le informará adecuadamente y en su momento de la fecha de destrucción del material.

4. Bajo ningún concepto y en ningún momento las muestras serán motivo de lucro directo o transacción comercial, bien sea por la venta del material o de los derechos para realizar estudios sobre los mismos.

5. Al material custodiado se le aplicarán las normativas vigentes, nacionales o europeas que procedan.

Yo. \_\_\_\_\_, **AUTORIZO** la extracción de ADN a partir de una muestra de sangre periférica, con el único fin de analizar polimorfismos genéticos de interés para el estudio mencionado.

En La Laguna a de de

D. \_\_\_\_\_

D. \_\_\_\_\_

**ANEXO 2. CRITERIOS DE POSER** (Poser et al. 1983).

| Categorías  | Brotos | Evidencia clínica | Evidencia paraclínica | LCR IgG/BO |
|---|--------|-------------------|-----------------------|------------|
| <b>EM clínicamente definida (EMCD)</b>              |        |                   |                       |            |
| EMCD A1   | 2      | 2                 | y 1                   |            |
| EMCD A2   | 2      | 1                 |                       |            |
| <b>EM definida con apoyo de laboratorio (EMDAL)</b> |        |                   |                       |            |
| EMDAL B1  | 2      | 1                 | ó 1                   | +          |
| EMDAL B2  | 1      | 2                 |                       | +          |
| EMDAL B3  | 1      | 1                 | y 1                   | +          |
| <b>EM clínicamente probable (EMCP)</b>              |        |                   |                       |            |
| EMCP C1   | 2      | 1                 |                       |            |
| EMCP C2   | 1      | 2                 |                       |            |
| EMCP C3   | 1      | 1                 | y 1                   |            |
| <b>EM probable con apoyo de laboratorio (EMPAL)</b> |        |                   |                       |            |
| EMPAL D1  | 2      |                   |                       | +          |

---

### ***ANEXO 3. CRITERIOS DIAGNÓSTICOS: REVISIÓN DE LOS CRITERIOS DE MCDONAL (Polman et al. 2005).***

#### ***Criterios originales***

1. Si la primera exploración con Resonancia Magnética Nuclear (RMN) se lleva a cabo tres meses o más después del inicio del episodio clínico, la presentación de una lesión que capte gadolinio es suficiente para poner de manifiesto la diseminación cronológica, siempre y cuando no se encuentre en el lugar implicado en el episodio clínico original. Si no se observa ninguna lesión que capte contraste en ese momento, es necesario la práctica de una nueva exploración de seguimiento. Se recomienda ésta última a los tres meses, aunque el momento de su obtención no es crucial. La presencia de una nueva placa visible en T2 o que capte gadolinio en ese momento cumple con el criterio de diseminación en el tiempo.
  
2. Si la primera RMN se lleva a cabo antes de que haya transcurrido tres meses a partir del inicio del episodio clínico, la aparición de una lesión captante de gadolinio en una segunda exploración realizada al cabo de los tres meses o más del episodio clínico, es suficiente para afirmar que existe diseminación en el tiempo. No obstante, si no se observa ninguna lesión captante en esta segunda RMN, la presencia de una nueva placa visible en T2 o que capte gadolinio en una nueva exploración llevada a cabo antes de que hayan transcurrido tres meses a partir de la primera será suficiente.

#### ***Revisiones 2005***

Se puede poner de manifiesto la existencia de diseminación cronológica mediante técnicas de obtención de imágenes de dos maneras:

- a. Detección de una lesión captante de gadolinio por lo menos tres meses después del inicio del primer episodio clínico, siempre y cuando su localización no se corresponda con el citado episodio inicial.
  
- b. Detección de una nueva lesión visible en T2 que haya aparecido en cualquier momento en comparación con una exploración de referencia

llevada a cabo como mínimo 30 días después del inicio del primer episodio clínico.

### ***Crterios originales***

Tres de los siguientes:

1. Por lo menos una lesión que capte gadolinio o en su ausencia, nueve lesiones hiperintensas en T2.
2. Por lo menos una lesión infratentorial.
3. Por lo menos una lesión yuxtacortical.
4. Por lo menos tres lesiones periventriculares.

Nota: Una lesión en la médula espinal puede sustituir a una lesión cerebral.

### ***Revisiones 2005***

Tres de los siguientes:

1. Por lo menos una lesión que capte gadolinio o en su ausencia nueve lesiones hiperintensas en T2.
2. Por lo menos una lesión infratentorial.
3. Por lo menos una lesión yuxtacortical.
4. Por lo menos tres lesiones periventriculares.

Nota: Se puede considerar que una lesión en la médula espinal es equivalente a una lesión infratentorial: una lesión de la médula espinal captante sería equivalente a una lesión cerebral captante, y las lesiones individuales de la médula espinal se pueden sumar a las cerebrales para llegar a las nueve lesiones necesarias en T2.

### ***Criterios originales***

1. Resultados positivos en los análisis del LCR y,
2. Diseminación en el espacio dictaminado por la presencia de nueve o más lesiones cerebrales visibles en T2 en la RMN, ó presencia de dos o más lesiones en la médula espinal, ó presencia de entre cuatro a ocho lesiones cerebrales y una lesión en la médula espinal, ó PEV positivos con presencia de menos de cuatro lesiones cerebrales más una lesión en médula espinal y ,
3. Diseminación en el tiempo según la RMN ó progresión continuada durante un año.

### ***Revisiones 2005***

1. Progresión del cuadro durante un año (según determinación retrospectiva o prospectiva).
2. Más dos de los siguientes:
  - a. Positividad en la exploración cerebral mediante RMN (nueve lesiones visibles en T2, o cuatro o más lesiones visibles en T2 con PEV positivos)
  - b. Positividad en la exploración de la médula espinal mediante RMN (dos lesiones focales visibles en T2)
  - c. Resultados positivos en el análisis del LCR (detección de BOG de IgG mediante técnica de isoelectroenfoque, observación de un aumento del índice de IgG, o ambas).

| <b>Presentación clínica</b>   | <b>Datos adicionales para el diagnóstico</b>   |
|---|--|
| Dos o más brotes, signos clínicos objetivos de la presencia de dos ó más lesiones.  | Ninguno  |
| Dos o más brotes, signos clínicos objetivos de la presencia de una lesión.  | Diseminación en el espacio por:<br>-RMN ó<br>-Detección de 2 o más lesiones compatibles con EM en la exploración mediante RMN más positividad en el LCR ó<br>-Esperar a la aparición un brote adicional que implique la afectación de un sitio diferente.  |
| Un brote, signos clínicos objetivos de la presencia de dos ó más lesiones.  | Diseminación en el tiempo por:<br>-RMN ó<br>-Aparición de un segundo brote.  |
| Un brote, signos clínicos objetivos de la presencia de una lesión<br><br>(presentación monosintomática; síndrome aislado clínico) | Diseminación en el espacio por:<br>- RMN<br>- Detección de dos o más lesiones compatibles con EM en la exploración mediante RMN más positividad de LCR y<br><br>Diseminación en el tiempo, puesta de manifiesto por:<br>- RMN ó<br>- Aparición de un segundo brote.  |
| Progresión neurológica insidiosa que sugiera una EM.  | Progresión del cuadro durante 1 año y<br>Dos de los siguientes:<br>- Positividad en la exploración cerebral mediante RMN ( 9 lesiones en T2 o 4 o más en T2 y PEV positivos).<br>- Positividad en las exploraciones de la médula espinal mediante RMN (dos lesiones focales visibles en T2).<br>- Resultados positivos en el análisis del LCR. |

---

**ANEXO 4. FORMAS CLÍNICAS** (Confavreux y Compstom 2006).

***Esclerosis Múltiple de brotes, con recaídas y remisiones sucesivas.*** Pacientes cuya clínica se presenta en “brotes”o episodios de disfunción neurológica con una duración de más de 24 horas. Los episodios paroxísticos no constituyen un brote, salvo que persistan más de 24 horas. Los brotes se desarrollan de forma aguda, y evolucionan a lo largo de días o semanas, experimentando posteriormente una recuperación que, a veces, pero no siempre, puede ser completa. Entre los brotes clínicos, el paciente permanece neurológica y sintomáticamente estable.

***Esclerosis Múltiple secundariamente progresiva:*** es la forma que comienza como una esclerosis en brotes y recaídas, pero el número de ataques se reduce y genera un deterioro continuo. Afecta preferentemente a pacientes varones, con síntomas predominantemente motores o tempranamente cerebelosos, con ataques frecuentes, deficiencias residuales después de cada ataque, mayores lesiones observadas en las imágenes de resonancia, y con discapacidad moderada después de cinco años de enfermedad.

***Esclerosis Múltiple primariamente progresiva:*** los pacientes afectados con esta variante, experimentan un declive constante de sus funciones desde el comienzo y nunca padecen ataques agudos.

***Esclerosis Múltiple progresiva:*** forma con curso progresivo, aunque los pacientes experimentan ataques ocasionales que se superponen al curso progresivo de la enfermedad.

---

## ***ANEXO 5. ESCALAS DE DISFUNCIÓN NEUROLÓGICA.***

La exploración neurológica convencional constituye la primera aproximación del médico al paciente con Esclerosis Múltiple, mediante la cual no sólo establecerá el diagnóstico de la enfermedad, sino que también efectuará el seguimiento del curso de la misma, pero de forma poco estandarizada y escasamente comparable entre los distintos evaluadores del paciente. Dada la inexistencia de un marcador subrogado biológico o morfológico preciso, han sido propuestas diversas escalas clínicas de valoración de la disfunción neurológica en Esclerosis Múltiple, como la EDSS (*Expanded Disability Status Scale de Kurtzke*) que puntúa la disfunción de 0 (normal) a 10 (fallecido), con intervalos de 0,50 puntos. Otras escalas empleadas son la *Neurological Ranking Scale* (NRS) o *SCRIPP*, y la más reciente denominada Escala Funcional Compuesta de Esclerosis Múltiple, *MSFC (Multiple Sclerosis Functional Composite Scale)*.

### ***5.1. - Expanded Disability Status Scale (EDSS) (Kurtzke JF. 1983)***

#### **Piramidal**

1. Normal.
2. Signos anormales sin incapacidad.
3. Incapacidad mínima.
4. Paraparesia o hemiparesia leve o moderada. Monoparesia grave.
5. Paraparesia o hemiparesia grave. Monoplejía o cuadriparesia moderada.
6. Paraplejía o hemiplejía. Cuadriparesia intensa.
7. Cuadriplejía.

#### **Cerebelo**

1. Normal.
2. Signos anormales sin incapacidad.
3. Ligera ataxia.
4. Moderada ataxia de los miembros o del tronco.
5. Ataxia intensa de todas las extremidades.
6. Incapaz de realizar movimientos coordinados por ataxia.

+ añadir tras cada puntuación en caso de debilidad grado 3 que dificulte la prueba.

### **Tronco del encéfalo**

1. Normal.
2. Solamente signos.
3. Nistagmus moderado o cualquier otro tipo de incapacidad.
4. Nistagmus intenso, parálisis extraocular intensa o moderada incapacidad por otros pares.
5. Disartria intensa o cualquier otro tipo de incapacidad.
6. Incapacidad para tragar o hablar.

### **Sensibilidad**

1. Normal.
2. Alteración de la vibratoria o grafoestesia en una o dos extremidades.
3. Disminución ligera de la sensibilidad táctil o dolorosa, o de la posicional y/o disminución ligera de la vibratoria en uno o dos miembros o vibratoria (ó grafoestesia) en 3 o 4 miembros.
4. Disminución. moderada, incluida alteración propioceptiva en 3 ó 4 miembros.
5. Disminución intensa, o bien grave alteración propioceptiva en más de 2 miembros.
6. Pérdida de la sensibilidad en una o dos extremidades o bien disminución del tacto o dolor y/o pérdida del sentido posicional en más de dos miembros.
7. Pérdida de sensibilidad prácticamente total por debajo de la cabeza.

### **Vejiga e intestino**

Añadir un punto más en la puntuación de 1-4 vesical si se usa autocateterismo vesical. Puntúe la situación peor del modo siguiente: (Redefinición de Goodkin et al. 1992)

### **Vejiga**

1. Función normal.
2. Ligero titubeo, urgencia o retención.
3. Moderado titubeo, urgencia o retención tanto del intestino como de la vejiga, o incontinencia urinaria poco frecuente.

4. Incontinencia < semanal.
5. Incontinencia > semanal.
6. Incontinencia diaria.
7. Catéter vesical.

### **Intestino**

1. Función normal.
2. Estreñimiento de < diario, sin incontinencia.
3. Estreñimiento de menos de a diario pero no incontinencia.
4. Incontinencia < semanal.
5. Incontinencia > semanal pero no a diario.
6. Ningún control intestinal.
7. Grado 5 intestinal más grado 5 de disfunción vesical.

### **Visión**

1. Normal.
2. Escotoma con agudeza visual (corregida) superior a 20/30.
3. El ojo que está peor con un escotoma tiene de agudeza entre 30/30 y 20/59.
4. El ojo peor (por escotoma o alteración de campo) con agudeza máxima entre 20/60 y 20/99.
5. Disminución entre 20/100 y 20/200; igual un grado 3 más máxima agudeza en el mejor ojo de 20/60 o inferior.
6. Disminución en el ojo peor con agudeza inferior a 20/200; o bien grado 4 más máxima agudeza en el ojo mejor de 20/60 o menos.
7. + añadir tras la puntuación en los grados 0-5 si existe palidez temporal.

### **Funciones mentales**

1. normal.
2. alteración del estado de ánimo únicamente (no afecta a la puntuación EDSS).
3. ligera alteración cognitiva.
4. moderada alteración cognitiva.
5. marcada alteración cognitiva.
6. demencia o síndrome cerebral crónico.

---

## Expanded Disability Status Scale (EDSS)

0= examen neurológico normal (todos los ítems de FS son de cero).

1.0= ninguna incapacidad pero signos mínimos solamente en un apartado de la FS.

1.5= ninguna incapacidad pero signos mínimos en más de un apartado de la FS.

2.0= incapacidad mínima en un apartado de la FS (al menos uno con puntuación de 2).

2.5= incapacidad mínima (dos apartados de la FS puntuando 2).

3.0= incapacidad moderada en un FS (un FS puntúa 3 pero los otros entre 0 y 1). El paciente deambula sin dificultad.

3.5= deambula sin limitaciones pero tiene moderada incapacidad en una FS (una tiene un grado 3) o bien tiene una o dos FS que puntúan un grado 2 o bien dos FS puntúan un grado 3 o bien 5 FS tienen un grado 2 aunque el resto estén entre 0 y 1.

4.0= deambula sin limitaciones, es autosuficiente, y se mueve de un lado para otro alrededor de 12 horas por día pese a una incapacidad relativamente importante de acuerdo con un grado 4 en una FS (las restantes entre 0 y 1). Capaz de caminar sin ayuda o descanso unos 500 metros.

4.5= deambula plenamente sin ayuda, va de un lado para otro gran parte del día, capaz de trabajar un día completo, pero tiene ciertas limitaciones para una actividad plena, o bien requiere un mínimo de ayuda. El paciente tiene una incapacidad relativamente importante, por lo general con un apartado de FS de grado 4 (los restantes entre 0 y 1) o bien una combinación alta de los demás apartados. Es capaz de caminar sin ayuda ni descanso alrededor de 300 metros.

5.0= camina sin ayuda o descanso en torno a unos 200 metros; su incapacidad es suficiente para afectarle en funciones de la vida diaria, Ej. trabajar todo el día sin medidas especiales. Los equivalentes FS

habituales son uno de grado 5 solamente, los otros entre 0 y 1 o bien combinaciones de grados inferiores por lo general superiores a un grado 4.

5.5= camina sin ayuda o descanso por espacio de unos 100 metros; la incapacidad es lo suficientemente grave como para impedirle plenamente las actividades de la vida diaria. El equivalente FS habitual es de un solo grado 5, otros de 0 a 1, o bien una combinación de grados inferiores por encima del nivel 4.

6.0= requiere ayuda constante, bien unilateral o de forma intermitente (bastón, muleta o abrazadera) para caminar en torno a 100 metros, sin o con descanso. Los equivalentes FS representan combinaciones con más de dos FS de grado 3.

6.5= ayuda bilateral constante (bastones, muletas o abrazaderas) para caminar unos 20 metros sin descanso. El FS habitual equivale a combinaciones con más de dos FS de grado 3+.

7.0= incapaz de caminar más de unos pasos, incluso con ayuda, básicamente confinado a silla de ruedas y posibilidad de trasladarse de ésta a otro lugar, o puede manejarse para ir al lavabo durante 12 horas al día. El equivalente FS habitual son combinaciones de dos o más de un FS de grado 4+. Muy raramente síndrome piramidal grado 5 solamente.

7.5= incapaz de caminar más de unos pasos. Limitado a silla de ruedas. Puede necesitar ayuda para salir de ella. No puede impulsarse en una silla normal pudiendo requerir un vehículo motorizado. El equivalente FS habitual son combinaciones con más de un FS de grado 4+.

8.0= básicamente limitado a la cama o a una silla, aunque puede dar alguna vuelta en la silla de ruedas, puede mantenerse fuera de la cama gran parte del día y es capaz de realizar gran parte de las actividades de la vida diaria. Generalmente usa con eficacia los brazos. El equivalente FS habitual es una combinación de varios sistemas en grado 4.

8.5= básicamente confinado en cama la mayor parte del día, tiene un cierto uso útil de uno o ambos brazos, capaz de realizar algunas

actividades propias. El FS habitual equivale a combinaciones diversas generalmente de un grado 4+.

9.0= paciente inválido en cama, puede comunicarse y comer. El equivalente FS habitual son combinaciones de un grado 4+ para la mayor parte de los apartados.

9.5= totalmente inválido en cama, incapaz de comunicarse o bien comer o tragar. El equivalente FS habitualmente son combinaciones de casi todas las funciones en grado 4+.

10= muerte por esclerosis múltiple.

### ***5.2.-Escala funcional compuesta de Esclerosis Múltiple (MSFC) .***

Escala que se calcula sumando las puntuaciones Z obtenidas al estandarizar:

- a) El tiempo empleado en recorrer 7,5 metros (25 pasos) y a través del cual valoramos la movilidad.
- b) 9 HPT o prueba de los 9 palitos en su agujero, que mide el tiempo empleado en introducir cada palito en su agujero y, con ello, la destreza en miembros superiores.
- c) PASAT-3, o prueba de 3 segundos de audición seriada de una serie numérica, que el paciente debe sumar correlativamente, valorando con ello la capacidad cognitiva. (La puntuación Z es el número de desviaciones estándar que un paciente tiene por encima o por debajo de la media de la población comparable).

### ***5.3.-Neurological ranking Scale (NRS) o SCRIPP .***

Se basa en la exploración neurológica, como la EDSS, pero puntúa de forma independiente las funciones motoras y sensitivas de las cuatro extremidades. La máxima

puntuación es de 100 (corresponde a una exploración neurológica normal). Puntuando cada variable sobre cuatro puntos.

Variables a estudio:

- a) Estado de ánimo.
- b) Pares craneales.
- c) Motor (cuatro extremidades).
- d) Babinski.
- e) Sensorial (cuatro extremidades).
- d) Cerebelo.
- e) Marcha.
- f) Tronco.
- g) Equilibrio.
- h) Disfunción vesical, intestinal o sexual

---

## ***ANEXO 6. NEUROIMAGEN (RMN).***

Todos los sujetos afectados de EM fueron sometidos a un estudio de neuroimagen por Resonancia Magnética Nuclear (General Electric® Signa® Horizon™ pantalla de plasma 1,5 teslas). En toda la muestra se realizó estudio cerebral, y un elevado número de casos se hizo combinado con el estudio medular. Las secuencias realizadas en todos los casos fueron el T1, el T2, la secuencia FLAIR, la conocida como densidad protónica, y junto a ellas, en los pacientes que se encontraban con un brote clínico, también se le realizó secuencia T1 con contraste (Gadolinio–Gd)

Criterios diagnósticos (Paty et al. 1994, Fazekas et al. 1998, Barkhof et al. 1997).

- a) 1 lesión que capte Gadolinio (Gd) o 9 lesiones hiperintensas en T2 si no existe una lesión captante.
- b) 1 o más lesiones infratentoriales.
- c) 1 o más lesiones yuxtacorticales.
- d) 3 o más lesiones periventriculares.

(Una lesión medular puede sustituir a una lesión cerebral)

Junto a los datos anteriores, consideramos la existencia de diseminación temporal, criterio diagnóstico de EM, a la presencia de:

- a) 1 lesión captante de Gd objetivada en una exploración realizada tras haber transcurrido al menos 3 meses desde el comienzo del brote, en una localización diferente a la del brote, ó
- b) En ausencia de lesiones cantantes de Gd en la exploración a los 3 meses, aparición de una lesión captante de de Gd o una lesión nueva en T2 en una exploración adicional transcurridos 3 meses o más.

---

## ***ANEXO 7. ESTUDIOS DE LABORATORIO (LÍQUIDO CEFALORRAQUÍDEO - LCR).***

El aspecto macroscópico del LCR en la Esclerosis Múltiple es normal, transparente, incoloro y la presión normal. El número de células, las proteínas y la albúmina es normal, pero un hallazgo característico es la elevación relativa de las Ig, sobre todo IgG:

$$\text{Índice IgG} = \frac{\text{IgG (LCR)} / \text{albúmina (LCR)}}{\text{IgG (suero)/albúmina (suero)}}$$

(Se considera un índice normal < 0.66).

Junto a la elevación de IgG, existe la presencia de bandas oligoclonales (BOC), producidas por uno o más clones celulares de células plasmáticas. Para detectarlas se utiliza el isoelectroenfoque en gel de policrilamida. Su ausencia no excluye la enfermedad y existen falsos positivos, pues pueden aparecer en otras enfermedades (panencefalitis esclerosante subaguda, infecciones virales, síndrome de Guillain-Barré etc.)

A todos nuestros pacientes se le practicó una punción lumbar y en el LCR se analizó: la celularidad, la gluco y proteinorraquia, la presencia de IgG, la presencia de proteína básica de mielina (PBM) y de BOC (también analizadas en suero sanguíneo).

## ***ANEXO 8. ESTUDIO NEUROFISIOLÓGICO: POTENCIALES EVOCADOS.***

Son utilizados para la valoración de la función de las vías nerviosas visuales (PEV), acústicas (PEATC), somatosensoriales (PESS) y motoras, pues proporcionan una medida fiable de la desmielinización .

En los criterios de Poser, se utilizan como evidencia paraclínica para el diagnóstico definitivo de Esclerosis Múltiple. En los de McDonalds sólo los potenciales visuales (PEV) se incluyen como criterio.

Se considera un PEV patológico, aquel que presenta una latencia P100 prolongada y diferencia de la P100 interocular mayor a 100 ms. Un PEATC es anormal cuando presenta una disminución o abolición de las respuestas IV y V, ó prolongación de los intervalos entre las ondas. Y un PESS patológico se considera aquel que presenta una respuesta cortical p39 de latencia prolongada.

A todos nuestros pacientes les realizamos potenciales visuales, troncoencefálicos y somatosensoriales (Oxford instruments modelo Synergy).

# *RESULTADOS*

## 1.) ANALISIS DESCRIPTIVO

### A. COMPARABILIDAD DE CASOS RESPECTO A CONTROLES

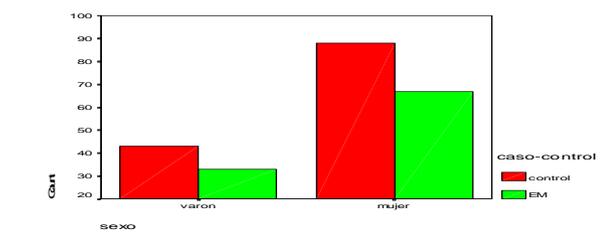
Valorar el perfil demográfico de los pacientes con Esclerosis Múltiple

#### 1.- Según el sexo:

De todos los varones, el 43.4 % estaban afectados de Esclerosis Múltiple, frente a 56.6% que resultaron ser controles.

De todas las mujeres que analizamos en nuestro estudio el 43.2 % estaban afectas de Esclerosis Múltiple frente al 56.8 % que no lo estaban ( $p= 0.97$ ) (**Figura 16**)

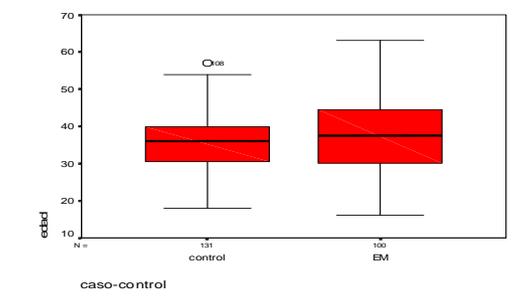
*Fig. 16. Diferencias por el sexo.*



#### 2.- Según la edad:

En ambos grupos en el grupo de casos la edad media de los sujetos fue de 37,6 años (DT 10,49) frente a los 35,45 años (DT 8,29) de los controles con  $p= 0,08$  (**Figura 17**)

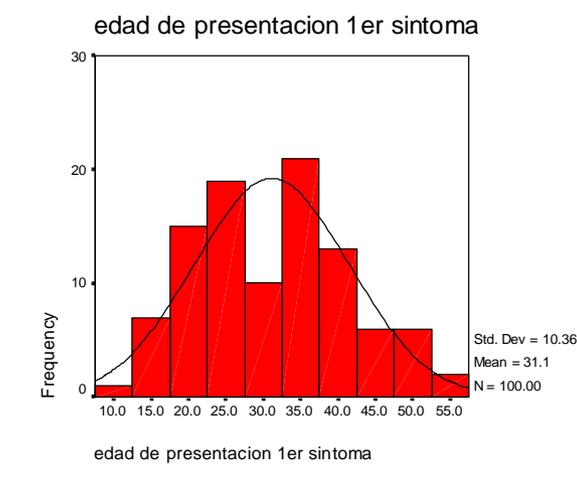
*Fig. 17. Diferencias por la edad.*



## ***B. DESCRIPCIÓN CLÍNICO-DIAGNÓSTICA DE LOS PACIENTES CON ESCLEROSIS MÚLTIPLE.***

1.- La edad media de los pacientes cuando presentaron el primer síntoma de la enfermedad fue de 31.1 años (DT 10.36) con un valor mínimo de 11 años y máximo de 57 años, percentil 25 de 23 años, percentil 50 de 30.5 años y percentil 75 de 38 años. **(Figura 18)**

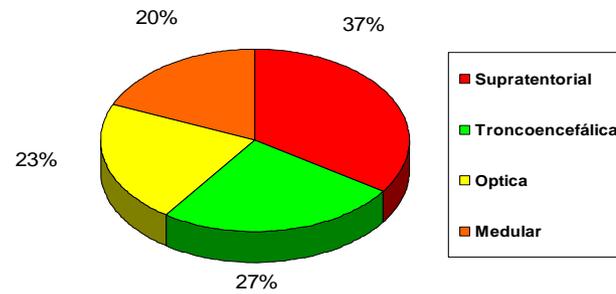
**Fig. 18.** Edad del primer síntoma.



2.- El tiempo transcurrido desde que los pacientes sufrieron el primer síntoma y fueron diagnosticados de Esclerosis Múltiple fue de 22.85 meses de media (DT 38.36) con un mínimo de 1 mes y un máximo de 204 meses; siendo los percentiles (P25, P50 y P75) de 4, 12 y 19.75 respectivamente.

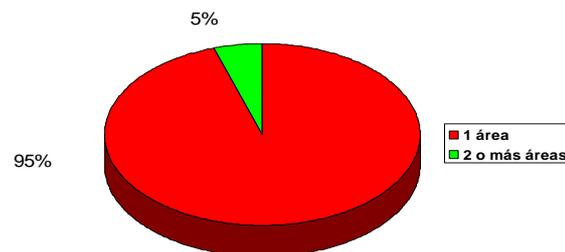
3.- Otra variable analizada fue el primer síntoma de manifestación de la enfermedad, y obtuvimos que en el 37% de los sujetos afectados de Esclerosis Múltiple el primer síntoma fue un síntoma supratentorial, frente al 27% que presentaron síntomas troncoencefálicos, al 23% que tuvieron afectación óptica y al 20% que debutaron con afectación medular. **(Figura 19)**

**Fig. 19.** Manifestación clínica del primer síntoma



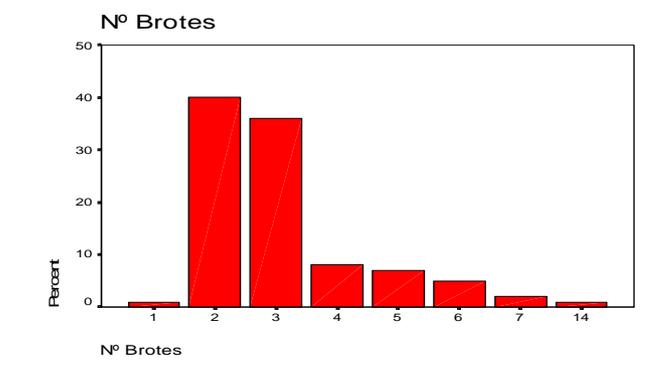
En relación al número de áreas afectas (supratentorial, troncoencefálica, vía óptica, médula), en la presentación inicial, obtuvimos que el 95% de los sujetos con Esclerosis Múltiple, debutaron con afectación de un solo área, siendo el 5% restante afectados en 2 o más áreas en el brote inicial. **(Figura 20)**

**Fig. 20.** Áreas afectas en la presentación inicial.



4.- El número de brotes sufridos por los pacientes diagnosticados de Esclerosis Múltiple en seguimiento por consulta fue de 3.14 (DT 1.67) brotes de media, con un mínimo de 1, un máximo de 14. **(Figura 21)**

**Fig. 21.** Número de brotes.



Y ¿Cómo fueron los brotes? :

El 85% de los sujetos presentaron al menos un brote motor.

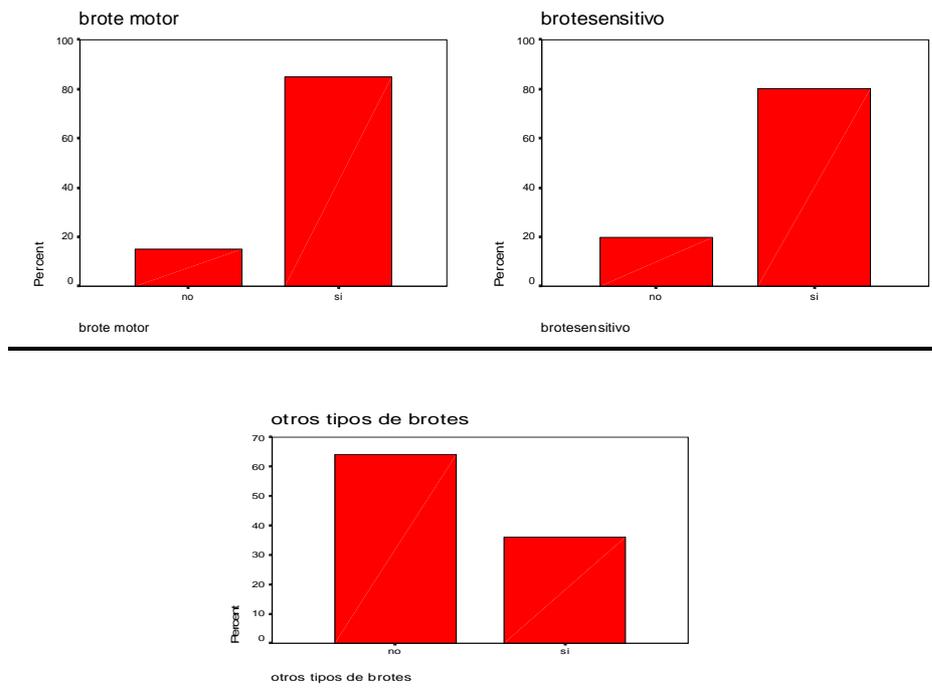
El 80% presentaron al menos un brote de tipo sensitivo en el transcurso de su enfermedad.

Y sólo el 36% presentaron clínica no sensitiva y/o motora como brote (de localización troncoencefálica, medular, de vías ópticas...) **(Figura 22-24)**

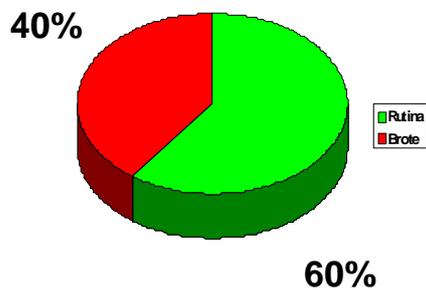
5.- La raza de nuestros pacientes fue en el 100% de los casos caucásica.

6.- El motivo de la visita a nuestra consulta fue en el 60 % de los casos en el contexto de las revisiones periódicas a las que son sometidos nuestros pacientes frente al 40% que se encontraban en el contexto de un brote de actividad de la enfermedad. **(Figura 25)**

**Fig. 22-24.** Características de los brotes clínicos.

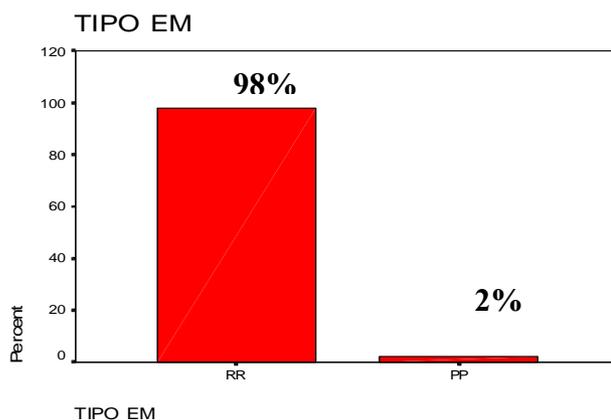


**Fig. 25.** Motivo de la visita



7.- También analizamos la forma clínica que presentaban nuestros pacientes y hallamos que en el 98 % los casos presentaban una Esclerosis Múltiple en la forma Remitente-Recurrente y sólo en un 2% la forma clínica era Primariamente-Progresiva. **(Figura 26)**

**Fig. 26. Formas clínicas**



8.- En el grado de de discapacidad medido por las escalas: EDSS, SCRIPP, COMPOSITE, los resultados fueron los siguientes:

#### 8.1.- **EDSS**

- El 39,8% de los sujetos afectados de EM presentaban una EDSS de 0.
- El 65,3% de los sujetos afectados de EM presentaban una EDSS menor o igual a 1.
- El 70,4% de los sujetos afectados de EM presentaban una EDSS menor o igual a 2.0.
- El 78,6% de los sujetos afectados de EM presentaban una EDSS menor o igual a 2.5.
- El 82,7% de los sujetos afectados de EM presentaban una EDSS menor o igual a 3.0.
- El 87,8% de los sujetos afectados de EM presentaban una EDSS menor o igual a 3.5.

## 8.2.- *SCRIPP*

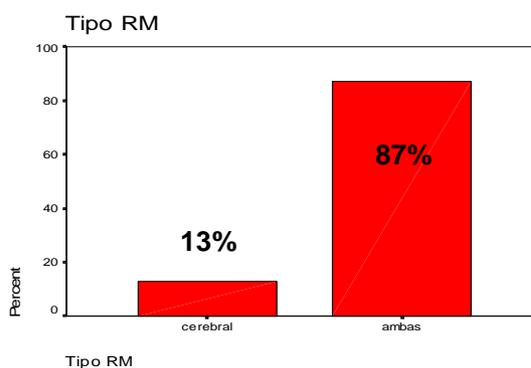
El 80% de los sujetos presentaban una afectación leve del estado de ánimo, el 93% afectación leve de los pares craneales, el 66% exhibían una forma leve de síntomas motores, el 87% mostraban signo de Babinski (leve), el 74% afectación sensorial, el 85% afectación cerebelosa, el 84% síntomas mentales, troncoencefálicos y del equilibrio y el 92% afectación esfinteriana y/o sexual (todos en estadio leve).

## 8.3.- *COMPOSITE*

- a) En la ejecución de la prueba de “9 Holes” el grupo de casos empleó en la ejecución de la prueba una media de 12.5 segundos (DT 4.19) con la mano derecha y 14 segundos (DT 4.69).
- b) En caminar 25 pasos el grupo de pacientes empleó como media 6.2 segundos (DT 2.88).
- c) Y en la prueba del PASAT nuestros pacientes mostraron una media de respuestas numéricas correctas de 27.5 (DT 8.65)

9.- Analizando los estudios de neuroimagen hallamos que el 87% de los pacientes fueron sometidos a un estudio doble: cerebral y medular frente al 13% que sólo fueron sometidos al estudio cerebral. **(Figura 27)**

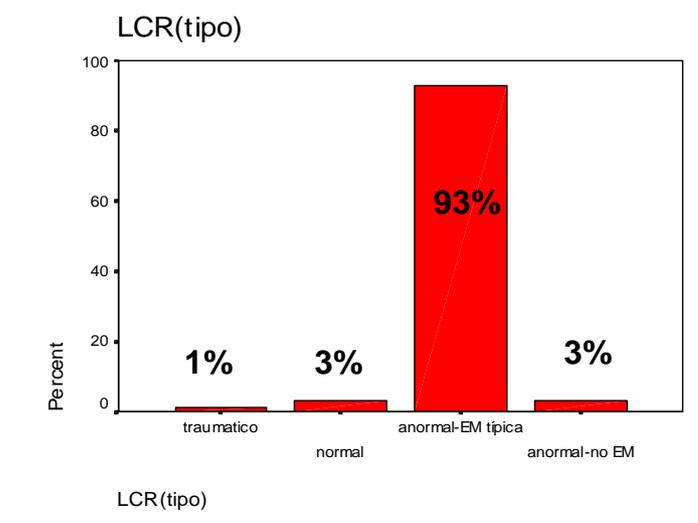
**Fig. 27.** Neuroimagen.



10.- Todos los pacientes (100% casos) fueron sometidos a la extracción de una muestra de Líquido cefalorraquídeo siendo las características del mismo las siguientes:

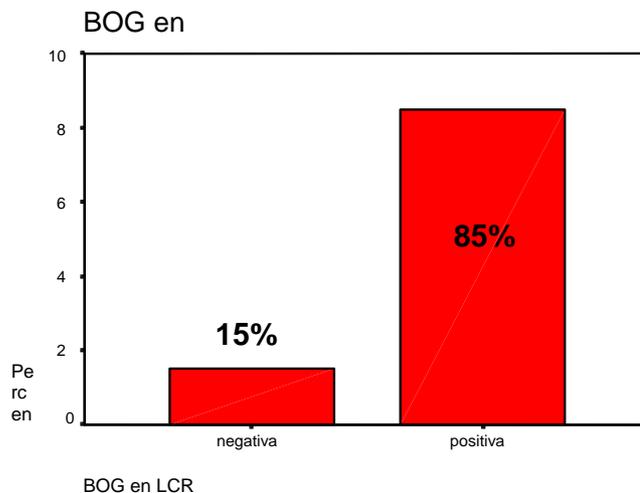
- En el 93% de los casos presentaron un líquido anormal compatible con Esclerosis Múltiple “típica”
- En un 3% el líquido fue anormal pero no “típico de Esclerosis Múltiple”
- En otro 3% el líquido extraído fue normal
- Y en un 1% la muestra extraída fue traumática (**Figura 28**).

**Fig. 28.** Análisis de LCR.



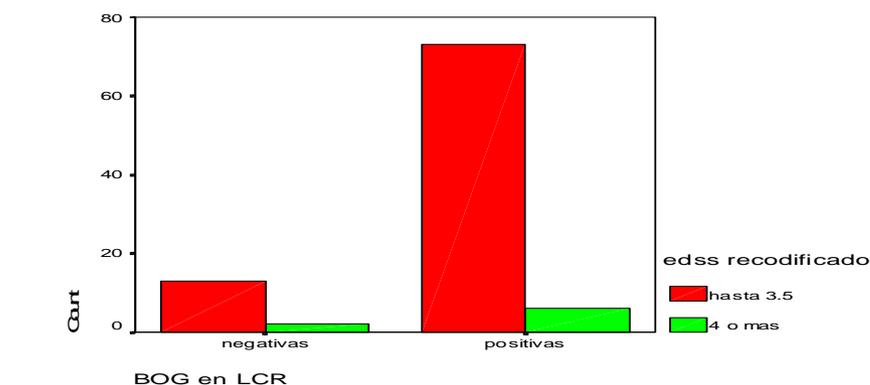
11.- A todos los casos se les solicitó estudio de Bandas Oligoclonales en el LCR y encontramos positividad para estas en el 85% de los sujetos frente a un 15% en que fueron negativas. (**Figura 29**)

**Fig. 29.** Presencia de bandas oligoclonales en LCR.



12.- Otra variable analizada fue si la presencia de Bandas Oligoclonales (BOC) se asociaba a un mayor grado de discapacidad (EDSS), pero no encontramos asociación significativa entre ambas variables pues el 86,7% de los sujetos sin BOC presentaban una EDSS menor o igual 3.5 pero el 92.4% de los que si presentaban BOC también tenían una EDSS menor o igual a 3.5 ( $p= 0.465$ ). (**Figura 30**)

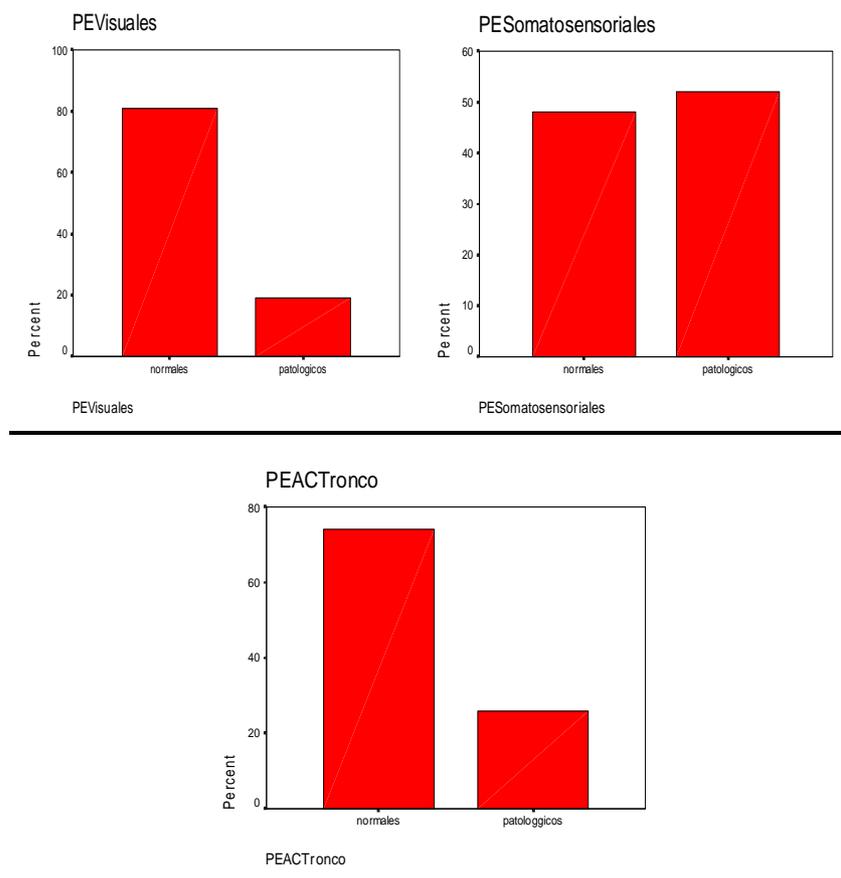
**Fig. 30.** Relación entre grado de discapacidad y presencia de bandas oligoclonales.



13.- A todos los pacientes se les realizó estudio neurofisiológico que constaba de potenciales evocados visuales, troncoencefálicos y somatosensoriales, obteniendo los siguientes resultados:

- El 19% de los sujetos presentaron unos potenciales evocados visuales patológicos.
- El 26% de los pacientes presentaron un estudio de potenciales troncoencefálicos patológicos.
- El 52% de los sujetos afectados de Esclerosis Múltiple presentaban potenciales evocados somatosensoriales patológicos. (**Figura 31-33**).

**Fig. 31-33.** Estudio neurofisiológico.



## 2.) ANALISIS UNIVARIANTE.

### A. NIVELES PLASMÁTICOS DE LOS FACTORES DE LA COAGULACIÓN Y POLIMORFISMOS DEL PAI-1 y DEL tPA EN LOS PACIENTES AFECTOS DE ESCLEROSIS MÚLTIPLE.

#### A.1) ESTUDIO PROTROMBÓTICO:

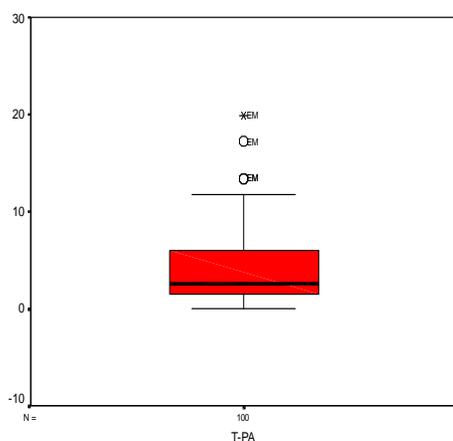
##### 1. Activador tisular del plasminógeno ( tPA)

El análisis mostró una media de 4,24 mg/dl con (DT 3,85) con un mínimo de 0,00 mg/dl y un valor máximo de 19,98 mg/dl. (*Figura 34*)

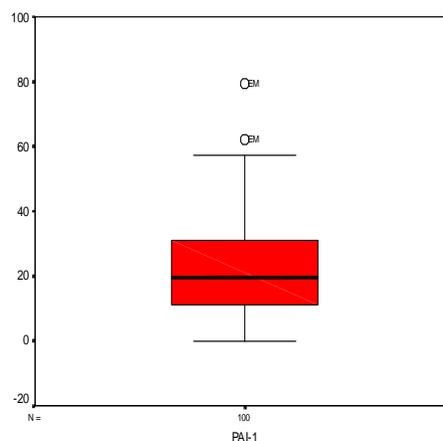
##### 2.- Inhibidor del activador del plasminógeno (PAI-1)

La media del inhibidor en los casos fue de 22,26 UA/ml (DT 14,20) con un mínimo de 0,00 UA/ml y un máximo de 79,50 UA/ml. (*Figura 35*)

*Fig. 34 Niveles plasmáticos de tPA*



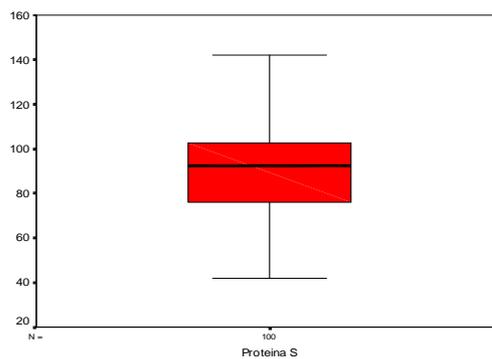
*Fig. 35. Niveles plasmáticos de PAI-1*



### **3.-Proteína S**

Al analizar los niveles plasmáticos de Proteína S hallamos una media de 89,94% (DT 21,66) con un valor mínimo de 42% y un máximo de 142%. **(Figura 36).**

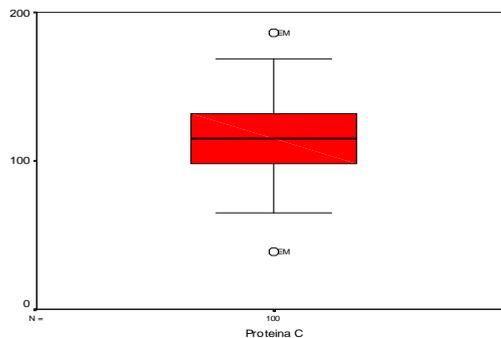
*Fig. 36 Niveles plasmáticos de Proteína S.*



### **4. Proteína C**

El análisis de este parámetro de la coagulación, mostró un valor medio de 116,63% (DT 25,21), con un mínimo de 100.64 % y un máximo de 186% respectivamente. **(Figura 37)**

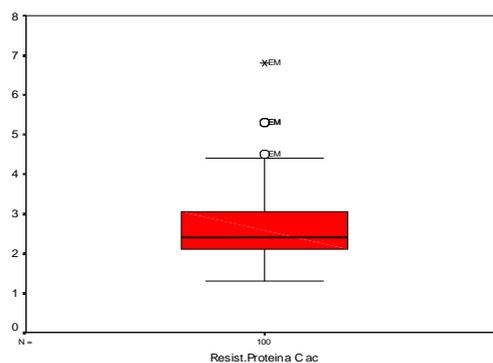
*Fig. 37. Niveles plasmáticos de Proteína C.*



### 5. Resistencia a la Proteína C Activada (RPCa)

El valor medio para los niveles de RPCa fue de 2,64 (DT 0,82) con un mínimo de 1,30 y un máximo de 6,80. **(Figura 38).**

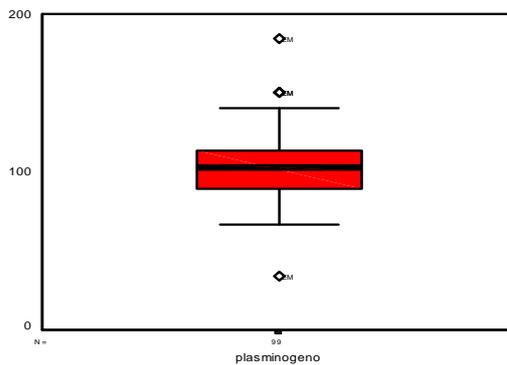
*Fig. 38. Niveles plasmáticos de RPCa.*



### 6. Plaminógeno

El análisis de frecuencias para este parámetro fue de 102,19% (DT 20,36) con valores mínimo de 34,40% y máximo de 184%. **(Figura 39).**

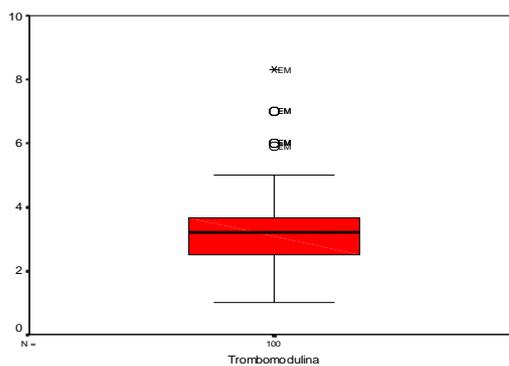
*Fig. 39. Niveles plasmáticos de plasminógeno.*



## 7. Trombomodulina

La media hallada para este parámetro fue de 3,25 ng/ml (DT 1,25) con valores extremos de 1,00 ng/ml y de 8,30 ng/ml. (**Figura 40**).

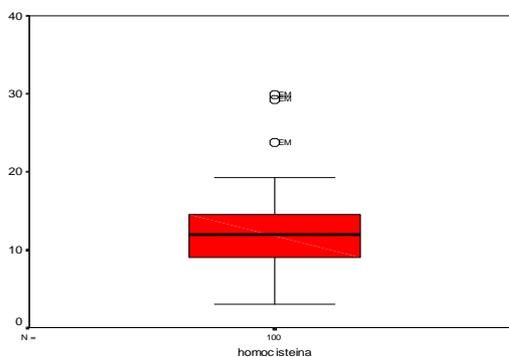
*Fig. 40. Niveles plasmáticos de trombomodulina*



## 8. Homocisteína

El análisis estadístico de los niveles de homocisteína mostró unos niveles medios fue de 12,25 ng/dl (DT 4,52) con un mínimo de 3,00 ng/dl y un máximo de 29,90 ng/dl. (**Figura 41**).

*Fig. 41. Niveles plasmáticos de homocisteína.*



### 9. Tiempo de Protrombina (T.P.)

El valor de la media para el tiempo de protrombina en los casos fue de 91,08% (DT 8,87) con un máximo de 10% y un mínimo de 48,50 %. (*Figura 42*).

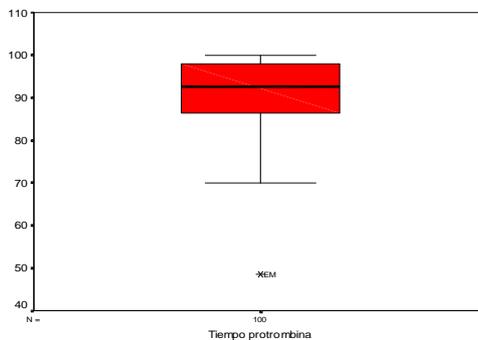
### 10. I.N.R.

En el grupo de pacientes afectados de Esclerosis Múltiple, la media para el INR fue de 1.03 (DT 0,12) con un mínimo de 0,83 y un máximo de 1,70. (*Figura 43*).

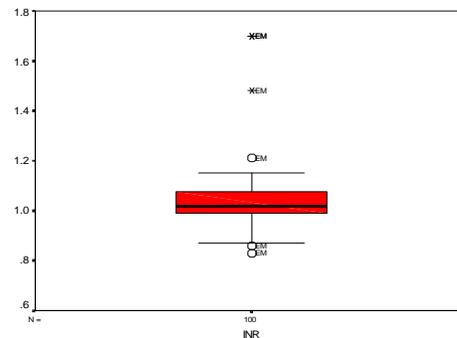
### 11. Antitrombina III (A.III)

La media fue de 107.53% ( DT 14.28) y con un mínimo de 71.50% y un máximo de 160.70%. (*Figura 44*).

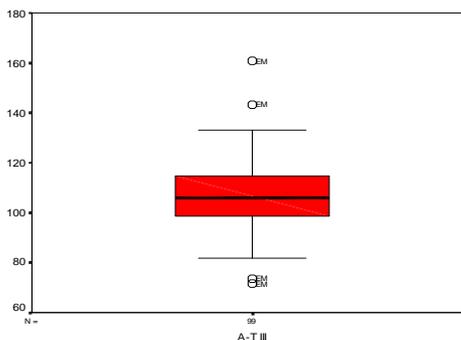
*Fig. 42. Tiempo de protrombina*



*Fig. 43. I.N.R.*



*Fig. 44. AIII*



## A.2) POLIMORFISMOS GENÉTICOS DEL PAI-1 Y tPA.

### 1. Polimorfismos del PAI-1

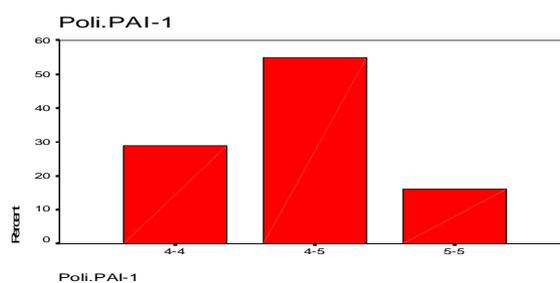
El análisis univariante mostró las siguientes frecuencias genotípicas:

4G-4G en el 29% de los casos.

4G-5G en el 55 % de los casos.

5G-5G en el 16 % restante.

**Figura 45.** Polimorfismos genéticos del PAI-1.



### 2. Polimorfismos del tPA

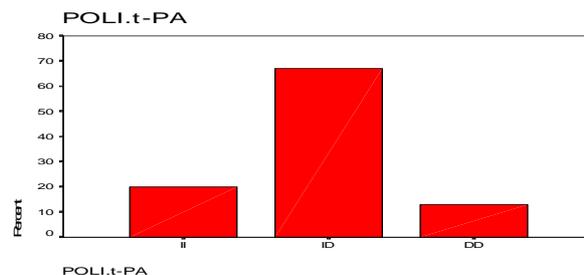
Las variantes polimórficas para el tPA fueron según frecuencia las siguientes:

II en un 20% de los casos.

ID en un 67% de los casos.

DD en tan sólo un 13% de los sujetos.

**Figura 46.** Polimorfismos genéticos del tPA



## ***B. NIVELES PLASMÁTICOS DEL tPA Y PAI-1 EN LOS SUJETOS AFECTOS DE ESCLEROSIS MÚLTIPLE SEGÚN EL POLIMORFISMO GENÉTICO.***

### ***B.1. Polimorfismo del PAI-1 variante 5G-5G y niveles plasmáticos de PAI-1***

Entre los afectados de Esclerosis Múltiple, 16 sujetos presentaban el polimorfismo 5G-5G, y los niveles plasmáticos de PAI-1 fueron de valor medio 21.63 UA/ml (DT 7.75). (**Figura 47**).

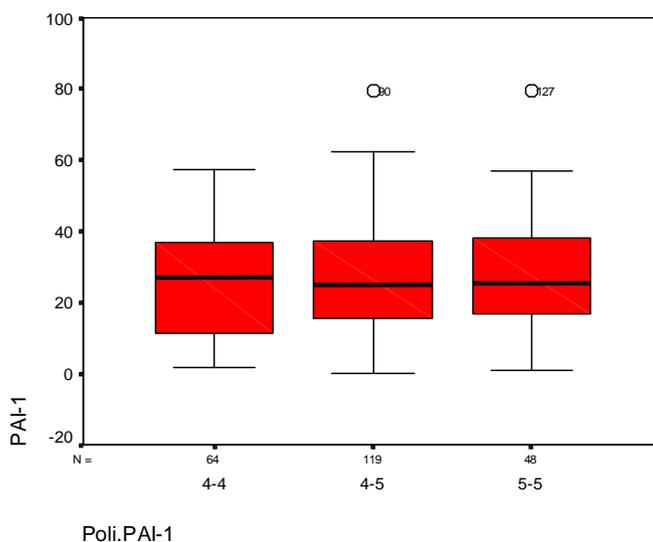
### ***B.2. Polimorfismo del PAI-1 variante 4G-5G y niveles plasmáticos de PAI-1***

En los 55 pacientes afectados de Esclerosis Múltiple con el polimorfismo 4G-5G, los niveles medios de PAI-1 en sangre fueron de 21,70 UA/ml (DT 14,85). (**Figura 47**)

### ***B.3. Polimorfismo del PAI-1 variante 4G-4G y niveles plasmáticos de PAI-1***

En nuestra serie encontramos 29 pacientes con el polimorfismo 4G-4G, y la media de los niveles plasmáticos de PAI-1 fue de 23.69 UA/ml (DT 15.88). (**Figura 47**)

**Figura 47.** *Relación entre las variantes polimórficas del PAI-1 y los niveles plasmáticos de PAI-1.*



#### **B.4. Polimorfismo del t-PA variante II y niveles plasmáticos de t-PA**

En nuestro grupo de estudio (Esclerosis Múltiple) encontramos 20 pacientes con el polimorfismo II para el gen del t-PA y los niveles plasmáticos (valor de la media) fueron 3.81 ng/ml (DT 4.33) (**Figura 48**).

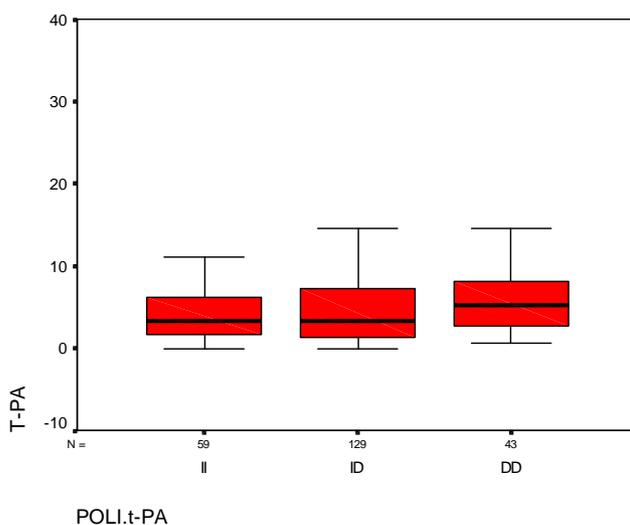
#### **B.5. Polimorfismo del t-PA variante ID y niveles plasmáticos de t-PA**

Entre nuestros pacientes afectados de Esclerosis Múltiple, la variante polimórfica ID para el gen de t-PA estaba presente en 67 sujetos, y el valor medio de los niveles plasmáticos de t-PA fue 4,15 ng/ml (DT 3.5). (**Figura 48**).

#### **B.6. Polimorfismo del t-PA variante DD y niveles plasmáticos de t-PA**

En el grupo de casos de nuestro estudio, el polimorfismo DD para el gen del t-PA estaba presente en 13 sujetos y los niveles plasmáticos presentaban un valor medio de 5,41ng/ml (DT 4,42) (**Figura 48**).

**Fig. 48.** Relación entre las variantes polimórficas del tPA y los niveles plasmáticos de tPA.



---

### ***C. NIVELES PLASMÁTICOS DE t-PA Y PAI-1 SEGÚN TIPO DE VISITA Y POLIMORFISMOS EN EL GRUPO CASOS.***

#### ***1. Polimorfismo II del t-PA y niveles Plasmáticos según tipo de visita***

En las visitas de rutina de los sujetos afectados de Esclerosis Múltiple con el polimorfismo II para el tPA (n=16), presentaron una media para los niveles plasmáticos de t-PA de 2.95 ng/ml (DT 2.32), frente a los sujetos que acudieron durante un brote clínico (n=4) que presentaron una media de 7.22 ng/ml (DT 8.51), con valor  $p=0.077$ . (**Figura 49**).

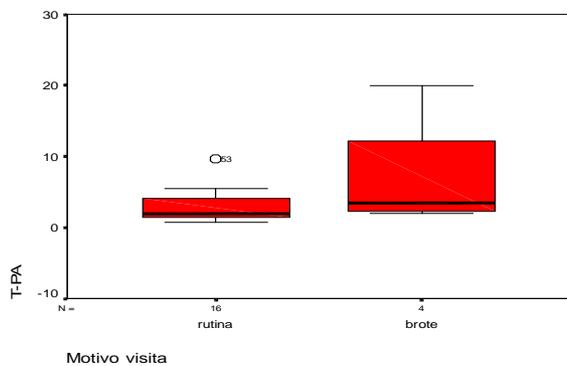
#### ***2. Polimorfismo DD del t-PA y niveles plasmáticos según tipo de visita***

En los pacientes con el polimorfismo DD para el t-PA (n=9), obtuvimos en las visitas rutinarias, una media para los niveles de t-PA plasmático de 3.87 ng/ml (DT 1.93), , frente a los que acudieron en brote clínico (n=4) que presentaron una media de 8.87 ng/ml (DT 6.72), con una  $p=0.055$ . (**Figura 50**).

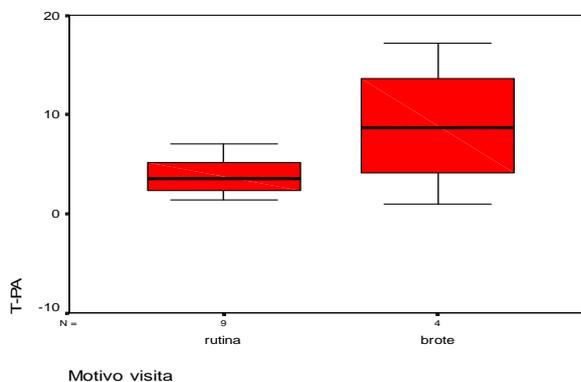
#### ***3. Polimorfismo ID del t-PA y niveles plasmáticos según tipo de visita***

En las visitas de rutina los sujetos afectados de Esclerosis Múltiple con el polimorfismo ID para el tPA (n=35), presentaron unos niveles medios para el t-PA de 4.36 ng/ml ( DT 4.05), frente a los sujetos que acudieron en un brote (n=32), en los que hallamos una media de 3.91 ng/l (DT 3.07), con una  $p=0.608$ . (**Figura 51**)

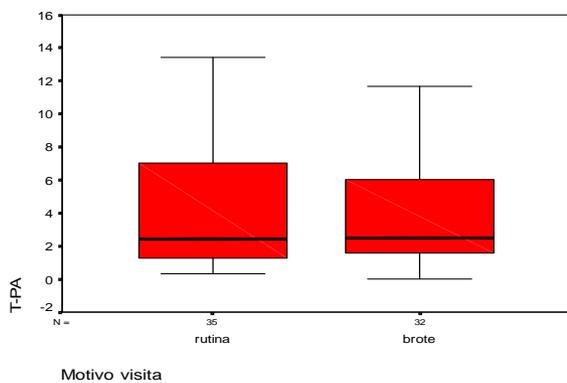
**Fig. 49.** Polimorfismo II del tPA y niveles plasmáticos de tPA según tipo de visita.



**Fig. 50** Polimorfismo ID del tPA y niveles plasmáticos de tPA según tipo de visita.



**Fig. 51** Polimorfismo DD del tPA y niveles plasmáticos de tPA según tipo de visita.



---

#### **4. Polimorfismo 4G-4G para el PAI-1 y niveles plasmáticos de PAI-1 según tipo de visita**

Los sujetos afectados de Esclerosis Múltiple y con el polimorfismo 4G-4G para el PAI-1 (n=17), presentaron en las visitas de rutina unos niveles medios para el PAI-1 plasmático de 26.04 UA/ml (DT 18.25), frente a la media de 20.37 UA/ml (DT 11.70), que exhibían los sujetos afectados de Esclerosis Múltiple que acudieron en fase un brote de actividad (n=12). El valor de  $p=0.35$ . (**Figura 52**).

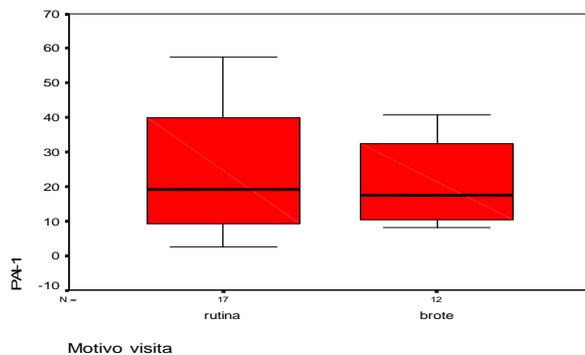
#### **5. Polimorfismo 4G-5G del PAI-1 y niveles plasmáticos de PAI-1 según el tipo de visita**

Los sujetos con Esclerosis Múltiple y forma polimórfica 4G-5G y acudían en una visita de rutina para el PAI-1 (n=33), presentaron unos niveles plasmáticos medios de PAI-1 de 20.54 UA/ml (DT 12.98), frente al valor medio de 23.43 UA/ml (DT 17.48), que presentaron los sujetos afectados de Esclerosis Múltiple que acudieron en fase de brote (n=22). El valor de  $p=0.48$ . (**Figura 53**).

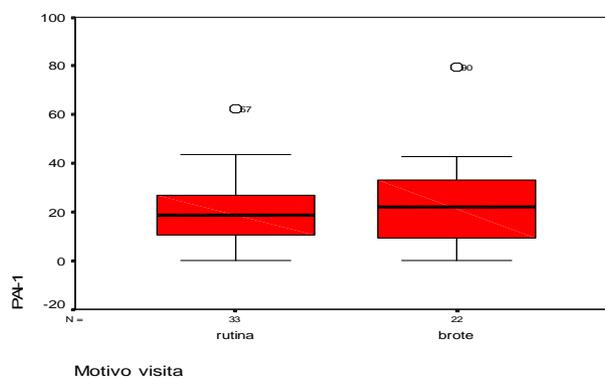
#### **6. Polimorfismo 5G-5G del PAI-1 y niveles plasmáticos según tipo de visita**

En las visitas rutinarias los sujetos afectados de Esclerosis Múltiple que presentaron la variante polimórfica 5G-5G para el PAI-1 (n=10), presentaron una media para los niveles sanguíneos de PAI-1 de 20.08 UA/ml (DT 7.09), frente a la media de 24.23 UA/ml (DT 8.77) que presentaron los afectados de Esclerosis Múltiple que acudieron en brote clínico (n=6). El valor de  $p=0.316$ . (**Figura 54**).

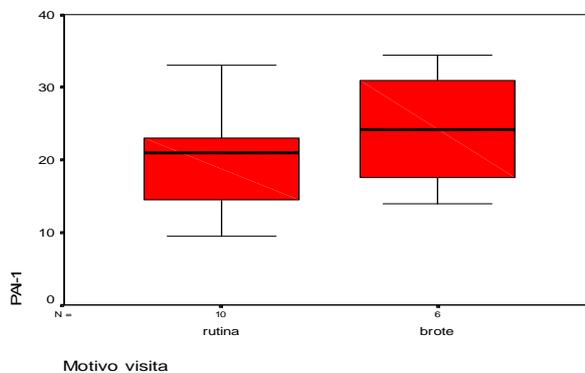
**Fig. 52.** Polimorfismo 4G-4G del PAI-1 y niveles plasmáticos de PAI-1 según tipo de visita.



**Fig. 53.** Polimorfismo 4G-5G del PAI-1 y niveles plasmáticos de PAI-1 según tipo de visita.



**Fig. 54** Polimorfismo 5G-5G del PAI-1 y niveles plasmáticos de PAI-1 según tipo de visita.



***D. POLIMORFISMOS DEL PAI / tPA Y GRADO DE DISCAPACIDAD (EDSS)  
EN LOS SUJETOS CON ESCLEROSIS MÚLTIPLE.***

***1.- Polimorfismos del PAI-1 y EDSS***

Ningún polimorfismo del PAI-1 guarda una relación significativa con el grado de discapacidad funcional (EDSS)

| <u>* Polimorfismo</u> | <u>EDSS <math>\geq 3.5</math></u> | <u><math>\geq 4</math></u> |
|-----------------------|-----------------------------------|----------------------------|
| G4-G4 (n=29)          | 27 (93.1%)                        | 2 (6.9%)                   |
| G4-G5 (n=51)          | 51 (92.2%)                        | 4 (7.3%)                   |
| G5-G5 (n=16)          | 14 (87.5%)                        | 2 (12.5%)                  |

**(p=0.768)**

***2.- Polimorfismos del tPA y EDSS***

Ningún polimorfismo del t-PA guarda una relación significativa con el grado de discapacidad funcional (EDSS)

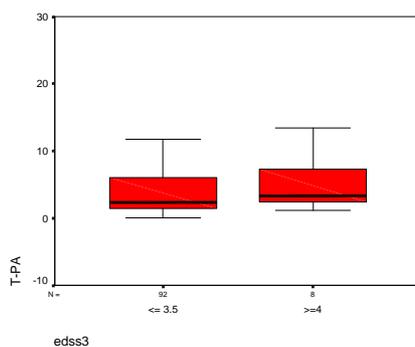
| <u>* Polimorfismo</u> | <u>EDSS <math>\leq 3.5</math></u> | <u><math>\geq 4</math></u> |
|-----------------------|-----------------------------------|----------------------------|
| II (n=20)             | 17 (85%)                          | 3 (15%)                    |
| ID (n=67)             | 62 (92.5%)                        | 5 (7.5%)                   |
| DD (n=13)             | 13 (100%)                         | 0 (0%)                     |

**(p=0.288)**

### ***E. NIVELES PLASMÁTICOS DE PAI-1/tPA Y GRADO DE DISCAPACIDAD (EDSS) EN LOS SUJETOS CON ESCLEROSIS MÚLTIPLE.***

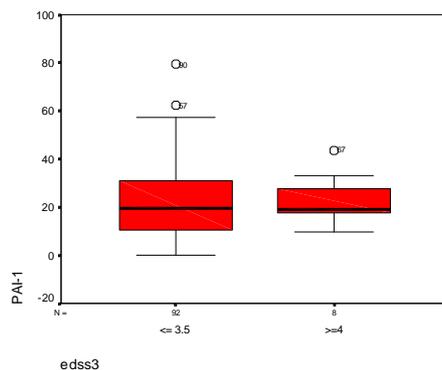
Analizando los niveles plasmáticos de tPA en los sujetos con Esclerosis Múltiple y estratificando por el grado de discapacidad (EDSS  $\leq 3.5$  vs  $\geq 4.0$ ), hallamos unos niveles medios para el primer grupo de 4.175 ng/ml y el segundo de 5.075 ng/ml, pero la diferencia no era estadísticamente significativa ( $p= 0.529$ ). (**Figura 55**).

**Fig. 55.** Grado de discapacidad y niveles plasmáticos de tPA.



Analizando los niveles plasmáticos de PAI-1 en los sujetos con Esclerosis Múltiple y estratificando por el grado de discapacidad (EDSS  $\leq 3.5$  vs  $\geq 4.0$ ), hallamos unos niveles medios para el primer grupo de 22.22 ng/ml y el segundo de 22.76 ng/ml, pero la diferencia no era estadísticamente significativa ( $p= 0.91$ ). (**Figura 56**).

**Fig 56.** Grado de discapacidad y niveles plasmáticos de PAI-1.



### 3.) ANÁLISIS BIVARIANTE.

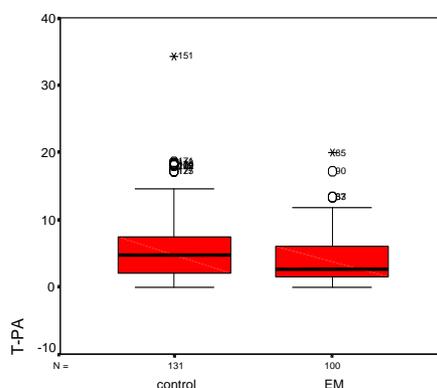
#### A.1. ESTUDIO PROTROMBÓTICO.

##### 1. Activador tisular del plasminógeno (tPA)

Encontramos diferencias estadísticamente significativas al comparar los niveles de tPA en ambos grupos. En el grupo de los casos (Esclerosis Múltiple) los valores hallados fueron en todos los parámetros analizados (p50, mediana, moda....) inferiores a los hallados en el grupo control. La media fue los casos de 4.24 ng/dl (DT 3.85) frente a los controles que tenían 5.90 ng/dl de media (DT 5.33) con  $p= 0.009$ .

**Fig. 57a - 57b.** Análisis bivalente de los niveles plasmáticos de tPA.

| <b>Caso-Control (tPA)</b> | <b>N</b> | <b>Media</b> | <b>DT</b> |
|---------------------------|----------|--------------|-----------|
| Control                   | 131      | 5.907        | 5.336     |
| E M                       | 130      | 4.247        | 3.850     |



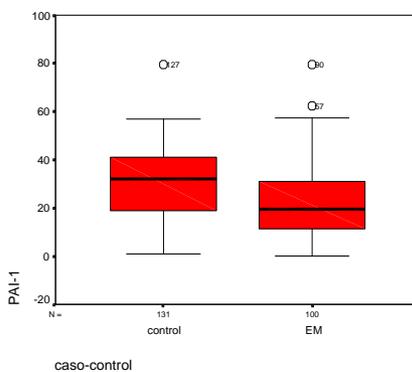
**p=0.009**

## 2. Inhibidor del activador del plasminógeno tipo 1 (PAI-1)

Al analizar los niveles plasmáticos del PAI-1 y comparar ambos grupos, encontramos diferencias estadísticamente significativas. Para los casos, los niveles medios fueron de 22.26 UA/ml (DT 14.20) frente a 30.03 UA/ml (DT14.63), valores medios para los controles, con  $p= 0.0001$ . Los valores encontrados en el grupo de los casos fueron significativamente inferiores a los hallados en el grupo control.

**Fig. 58a - 58b.** Análisis bivariante de los niveles plasmáticos de PAI-1.

| Caso-Control (PAI-1) | N   | Media | DT    |
|----------------------|-----|-------|-------|
| Control              | 131 | 30.03 | 14.63 |
| EM                   | 100 | 22.26 | 14.20 |



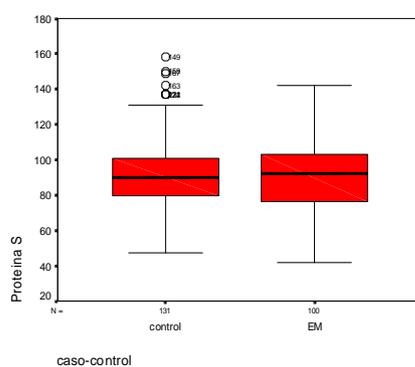
**p=0.001**

## 3. Proteína S

En los sujetos con Esclerosis Múltiple, los niveles de Proteína S fueron inferiores que los hallados en el grupo control, con valores para la media de 89.94 % en el grupo de afectos de Esclerosis Múltiple y de 93.26% en el grupo control, pero las diferencias no fueron estadísticamente significativas (**Figura 59a - 59b**).

**Fig. 59a - 59b.** Análisis bivariante de los niveles plasmáticos de Proteína S.

| Caso-Control (Prot S) | N   | Media | DT    |
|-----------------------|-----|-------|-------|
| Control               | 131 | 93.26 | 19.63 |
| EM                    | 100 | 89.94 | 21.66 |



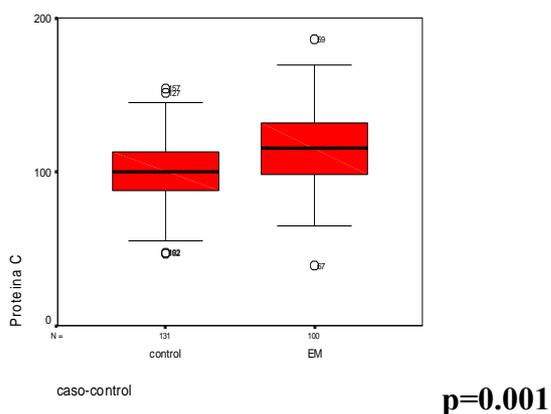
p=0.224

#### 4. Proteína C

Al analizar los niveles plasmáticos de Proteína C, encontramos significación estadística. En el grupo de casos los niveles de dicha proteína fueron mayores que los encontrados en el grupo control. Las medias fueron de 124.41% (DT 103.46) y 100.64 % (DT 19.79) respectivamente. (Figura 60a -60b).

**Fig. 60a - 60b.** Análisis bivariante de los niveles plasmáticos de Proteína C .

| Caso-Control (Prot C) | N   | Media  | DT    |
|-----------------------|-----|--------|-------|
| Control               | 131 | 100.64 | 19.79 |
| EM                    | 100 | 116.63 | 25.21 |

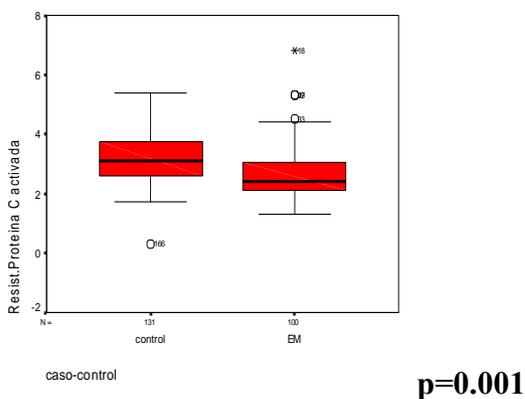


### **5. Resistencia a la Proteína C Activada (RPCa)**

Encontramos diferencias significativas al cuantificar los niveles plasmáticos de RPCa, en los afectos de Esclerosis Múltiple, la media de la RPCa fue de 2.64 (DT 0.82) frente a 3.16 (DT 0.81) encontrada en los controles.

**Fig. 61a - 61b.** Análisis bivalente de los niveles plasmáticos de RPCa .

| <b>Caso-Control (RPCa)</b> | <b>N</b> | <b>Media</b> | <b>DT</b> |
|----------------------------|----------|--------------|-----------|
| Control                    | 131      | 3.16         | 0.81      |
| EM                         | 100      | 2.63         | 0.82      |

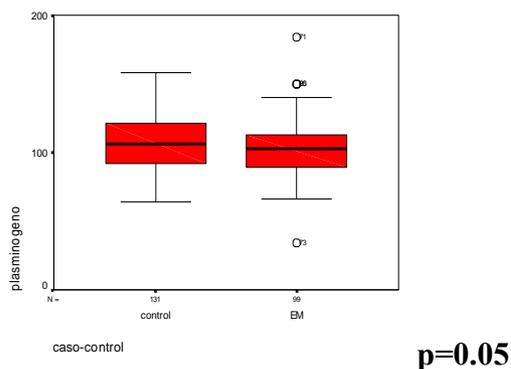


## 6. Plasminógeno

En los casos la media del plasminógeno plasmático fue significativamente menor que la encontrada en los controles, 102.19 % (DT 20.36) frente a 107.30 % (DT 19.01) respectivamente. El valor de  $p=0.05$ .

**Fig. 62a - 62b.** Análisis bivariante de los niveles plasmáticos del plasminógeno.

| Caso-Control (Plasminógeno) | N   | Media  | DT    |
|-----------------------------|-----|--------|-------|
| Control                     | 131 | 107.30 | 19.01 |
| EM                          | 100 | 102.19 | 20.36 |

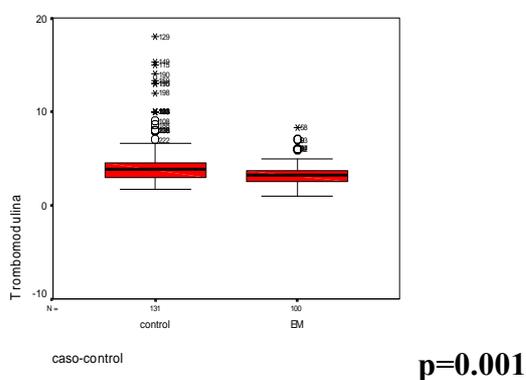


## 7. Trombomodulina

Analizando los niveles plasmáticos de trombomodulina hallamos significación estadística a favor de los afectados de Esclerosis Múltiple, donde los valores fueron significativamente menores, la media fue de 3,25 ng/ml (DT 1.25) frente a 4.78 ng/ml (DT 3.05) (**Figura 63a-63b**).

**Fig. 63a - 63b.** Análisis bivariante de los niveles plasmáticos de trombomodulina.

| Caso-Control (TM) | N   | Media | DT   |
|-------------------|-----|-------|------|
| Control           | 131 | 4.78  | 3.05 |
| EM                | 100 | 3.25  | 1.25 |

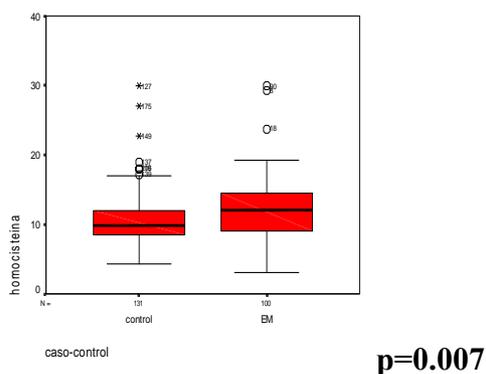


### 8. Homocisteína (Hc)

Encontramos una diferencia estadísticamente significativa en los niveles de homocisteína del grupo de pacientes afectados de Esclerosis Múltiple. En los sujetos con Esclerosis Múltiple, la media de los niveles plasmáticos de homocisteína fue de 12.25 ng/dl (DT 4.52) frente a 10.79 ng/dl (DT 3.64) encontrada en los controles (**Figura 64a-64b**).

**Fig. 64a - 64b.** Análisis bivariante de los niveles plasmáticos de homocisteína.

| Caso-Control (Homocisteína) | N   | Media | DT   |
|-----------------------------|-----|-------|------|
| Control                     | 131 | 10.79 | 3.64 |
| EM                          | 100 | 12.25 | 4.52 |

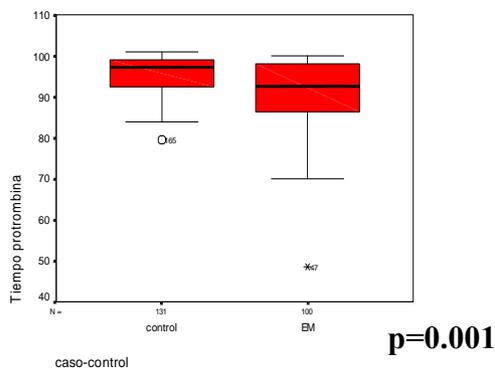


### 9. Tiempo de Protrombina

En el grupo de los casos (Esclerosis Múltiple) la media para el tiempo de protrombina fue de 95.50% (DT 4.60) frente a 91.08% (DT 8.87) hallada en los controles, diferencia estadísticamente significativa.

**Fig. 65a - 65b.** Análisis bivariante de los niveles plasmáticos del Tiempo Protrombina

| Caso-Control (T.P.) | N   | Media | DT   |
|---------------------|-----|-------|------|
| Control             | 131 | 95.50 | 4.60 |
| EM                  | 100 | 91.08 | 8.87 |

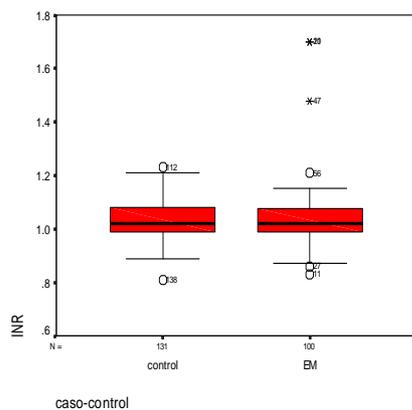


### 10. I.N.R.

En los sujetos afectados de Esclerosis Múltiple, el valor medio del INR fue de 1.03 ( DT 0.12) frente al valor 1.02 ( DT 0.13) de los controles.

**Fig. 66a - 66b.** Análisis bivariante de los niveles plasmáticos de I.N.R..

| Caso-Control (INR) | N   | Media | DT   |
|--------------------|-----|-------|------|
| Control            | 131 | 1.02  | 0.12 |
| EM                 | 100 | 1.03  | 0.13 |



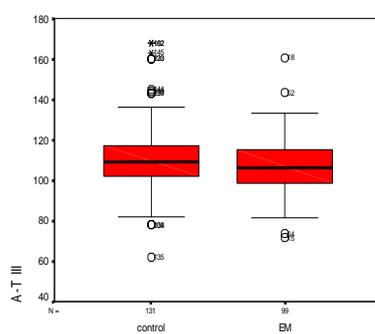
**p=0.506**

### 11. Antitrombina III

Los niveles plasmáticos de antitrombina III en los casos fueron 110.32% de media (DT 17.25) frente a los 107.53% (DT 14.28) de los controles. El estudio comparativo no mostró significación estadística.

**Fig. 67a - 67b.** Análisis bivalente de los niveles plasmáticos de antitrombina III.

| Caso-Control (AIII) | <i>N</i> | <i>Media</i> | <i>DT</i> |
|---------------------|----------|--------------|-----------|
| Control             | 131      | 110.32       | 17.25     |
| EM                  | 100      | 107.53       | 14.28     |



caso-control

**p=0.19**

*Tabla 16. Factores de la coagulación.*

|                         | $\beta$ | S.E.  | Sig.  | Exp $\beta$ |
|-------------------------|---------|-------|-------|-------------|
| <b>Edad</b>             | 0.024   | 0.014 | 0.085 | 1.025       |
| <b>Sexo</b>             | -0.008  | 0.282 | 0.977 | 0.992       |
| <b>t-PA</b>             | -0.081  | 0.032 | 0.011 | 0.921       |
| <b>PAI-1</b>            | -0.038  | 0.010 | 0.000 | 0.962       |
| <b>Proteína S</b>       | -0.008  | 0.006 | 0.224 | 0.992       |
| <b>Proteína C</b>       | 0.032   | 0.006 | 0.000 | 1.03        |
| <b>Plasminógeno</b>     | 0.013   | 0.007 | 0.053 | 0.986       |
| <b>RPCA</b>             | -0.845  | 0.192 | 0.000 | 0.429       |
| <b>Trombomodulina</b>   | -0.440  | 0.112 | 0.000 | 0.644       |
| <b>Homocisteína</b>     | 0.091   | 0.035 | 0.009 | 1.095       |
| <b>Antitrombina-III</b> | -0.011  | 0.086 | 0.019 | 0.989       |
| <b>T. Protrombina</b>   | -0.105  | 0.239 | 0.000 | 0.900       |
| <b>INR</b>              | 0.961   | 1.374 | 0.484 | 2.616       |

## B.2. ESTUDIO GENÉTICO.

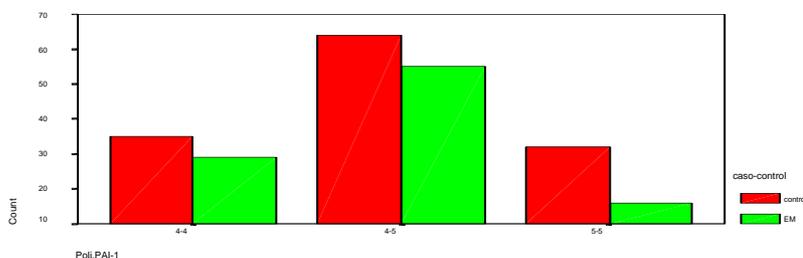
Evaluar en dicha población, la posible asociación entre la presencia en el genoma de determinadas variaciones polimórficas - el alelo de inserción (Alu I) en el intrón “h” del gen del tPA y las formas 4G/4G, G4/G5 y 4G/5G para el promotor del gen del PAI-1 - y el riesgo de enfermedad desmielinizante.

### 1. Polimorfismo del PAI-1

- El 45.3% de los sujetos con el polimorfismo 4G-4G padecían Esclerosis Múltiple.
- El 46.2% de los sujetos con el polimorfismo 4G-5G sufrían de Esclerosis Múltiple.
- El 33,3% de los sujetos con el polimorfismo 5G-5G padecían Esclerosis Múltiple.

**Fig. 68a – 68b:** Análisis bivalente de las variantes polimórficas del PAI-1

| Poli. PAI-1  | Control              | Esclerosis Múltiple | Total                |
|--------------|----------------------|---------------------|----------------------|
| <b>4G-4G</b> | 35<br>54.7%<br>26.7% | 29<br>45.3%<br>29%  | 64<br>100%<br>27.7%  |
| <b>4G-5G</b> | 64<br>53.8%<br>48.9% | 55<br>46.2%<br>55%  | 119<br>100%<br>51.5% |
| <b>5G-5G</b> | 32<br>66.7%<br>24.4% | 16<br>33.3%<br>16%  | 48<br>100%<br>20.8%  |
| <b>Total</b> | 131<br>100%          | 100<br>100%         | 231<br>100%          |

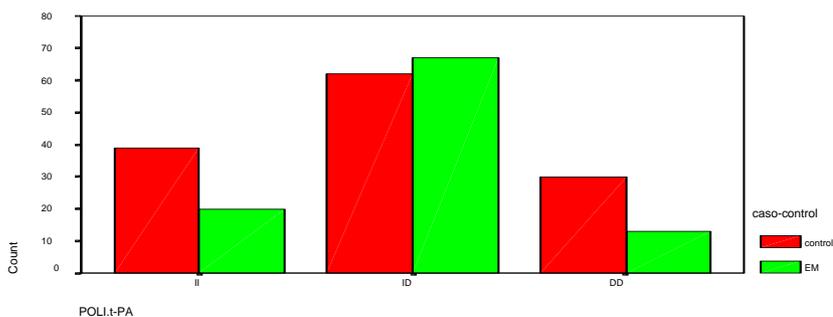


## 2. Polimorfismo del tPA

- El 33.9% de los sujetos que presentaban el polimorfismo II estaban afectados de Esclerosis Múltiple.
- El 51.9% de los sujetos que presentaban el polimorfismo ID padecían una Esclerosis Múltiple.
- El 30.2% de los sujetos que presentaban el polimorfismo DD estaban afectados de Esclerosis Múltiple.

**Fig. 69a – 69b:** Análisis bivariante de las variantes polimórficas del tPA.

| Poli. tPA    | Control              | Esclerosis Múltiple | Total                |
|--------------|----------------------|---------------------|----------------------|
| <b>II</b>    | 39<br>66.1%<br>29.8% | 20<br>33.9%<br>20%  | 59<br>100%<br>25.5%  |
| <b>ID</b>    | 62<br>48.1%<br>47.3% | 67<br>51.9%<br>67%  | 129<br>100%<br>55.8% |
| <b>DD</b>    | 30<br>69.8%<br>22.9% | 13<br>30.2%<br>13%  | 43<br>100%<br>18.6%  |
| <b>Total</b> | 131<br>100%          | 100<br>100%         | 231<br>100%          |



**C.3.TABLAS DE CONTINGENCIA DE LOS POLIMORFISMOS PAI-1 SEGÚN EL SEXO (Análisis de Mantel-Haenszel)**

**Tabla 17:** Tabla de contingencia de las variantes polimórficas del PAI-1 y el sexo.

| <b>Poli. PAI-1</b> | <b>OR</b> | <b>IC (95.0%)</b> | <b>P</b> |
|--------------------|-----------|-------------------|----------|
| <b>4G-4G</b>       | 1.12      | 0.62,2.00         | 0.70     |
| <b>4G-5G</b>       | 1.27      | 0.75,2.15         | 0.35     |
| <b>5G-5G</b>       | 0.58      | 0.30,1.14         | 0.11     |

**OR:** odds ratio, **IC:** intervalo de confianza al 95%, **P:** valor de P

**Tabla 18:** TABLA DE CONTINGENCIA – VARIANTE POLIMÓRFICA PAI-1 5G-5G

|                     | <b>Casos</b> | <b>Controles</b> | <b>Total</b> |
|---------------------|--------------|------------------|--------------|
| <b>Expuestos</b>    | 16           | 32               | 48           |
| <b>(%)</b>          | 33.3%        | 66.6%            | 100          |
| <b>No expuestos</b> | 84           | 99               | 183          |
| <b>(%)</b>          | 45.9%        | 54.09%           | 100          |
| <b>Total</b>        | 100          | 131              | 231          |

**Tabla 19:** TABLA DE CONTINGENCIA VARONES Y POLIMORFISMO 5G-5G del PAI-1

| <b>Varones</b>      | <b>Casos</b> | <b>Controles</b> | <b>Totales</b> |
|---------------------|--------------|------------------|----------------|
| <b>Expuestos</b>    | 6            | 9                | 15             |
| <b>No expuestos</b> | 27           | 34               | 61             |
| <b>Total</b>        | 33           | 43               | 76             |

O.R: 0.839 IC (95%): 0.265-2.651 p=0.765.

*Tabla 20: TABLA DE CONTINGENCIA MUJERES Y POLIMORFISMO 5G-5G del PAI-1*

| Mujeres        | Casos     | Controles | Totales    |
|----------------|-----------|-----------|------------|
| Expuestos      | 10        | 23        | 33         |
| No Expuestos   | 57        | 65        | 122        |
| <b>Totales</b> | <b>67</b> | <b>88</b> | <b>155</b> |

OR: 0.495 IC (95%): 0.217-1.129 p= 0.091

*Tabla 21: TABLA DE CONTINGENCIA -VARIANTE POLIMÓRFICA PAI-1 4G-5G*

|              | Casos      | Controles  | Total      |
|--------------|------------|------------|------------|
| Expuestos    | 55         | 64         | 119        |
| (%)          | 46.2%      | 53.7%      | 100        |
| No expuestos | 45         | 67         | 112        |
| (%)          | 40.1%      | 59.8%      | 100        |
| <b>Total</b> | <b>100</b> | <b>131</b> | <b>231</b> |

*Tabla 22: TABLA DE CONTINGENCIA VARONES Y POLIMORFISMO 4G-5G del PAI-1*

| Varones      | Casos     | Controles | Totales   |
|--------------|-----------|-----------|-----------|
| Expuestos    | 20        | 20        | 40        |
| No expuestos | 13        | 23        | 36        |
| <b>Total</b> | <b>33</b> | <b>43</b> | <b>76</b> |

OR: 1.769 IC (95%): 0.704-4.440 p=0.22

*Tabla 23: TABLA DE CONTINGENCIA MUJERES Y POLIMORFISMO 4G-5G del PAI-1*

| Mujeres        | Casos     | Controles | Totales    |
|----------------|-----------|-----------|------------|
| Expuestos      | 35        | 44        | 79         |
| No Expuestos   | 32        | 44        | 76         |
| <b>Totales</b> | <b>67</b> | <b>88</b> | <b>155</b> |

OR: 1.093 IC (95%): 0.579-2.065 p=0.782

*Tabla 24. TABLA DE CONTINGENCIA – VARIANTE POLIMÓRFICA PAI-1 4G-4G*

|                     | Casos       | Controles   | Total      |
|---------------------|-------------|-------------|------------|
| Expuestos<br>(%)    | 29<br>45.3% | 35<br>54.6% | 64<br>100  |
| No expuestos<br>(%) | 71<br>42.5% | 96<br>57.4% | 167<br>100 |
| <b>Total</b>        | <b>100</b>  | <b>131</b>  | <b>231</b> |

*Tabla 25: TABLA DE CONTINGENCIA VARONES Y POLIMORFISMO 4G-4G del PAI-1*

| Varones      | Casos     | Controles | Totales   |
|--------------|-----------|-----------|-----------|
| Expuestos    | 7         | 14        | 21        |
| No expuestos | 26        | 29        | 54        |
| <b>Total</b> | <b>33</b> | <b>43</b> | <b>76</b> |

OR: 0.557 IC (95%): 0.195-1.594 p=0.272

**Tabla 26: TABLA DE CONTINGENCIA MUJERES Y POLIMORFISMO 4G-4G del PAI-1.**

| Mujeres      | Casos | Controles | Totales |
|--------------|-------|-----------|---------|
| Expuestos    | 22    | 21        | 43      |
| No Expuestos | 45    | 67        | 112     |
| Totales      | 67    | 88        | 155     |

OR: 1.55 IC (95%): 0.768-3.163 p=0.216

#### **D.4.TABLAS DE CONTINGENCIA DE LOS POLIMORFISMOS tPA SEGÚN EL SEXO**

**Tabla 27: Tabla de contingencia de las variantes polimórficas del tPA y el sexo.**

| Poli. tPA | OR    | IC (95.0%)   | P     |
|-----------|-------|--------------|-------|
| DD        | 0.503 | 0.247, 1.024 | 0.055 |
| ID        | 2.259 | 1.317, 3.876 | 0.002 |
| II        | 0.589 | 0.319, 1.092 | 0.091 |

**Tabla 28: TABLA DE CONTINGENCIA – VARIANTE POLIMÓRFICA tPA ID.**

|              | Casos | Controles | Total |
|--------------|-------|-----------|-------|
| Expuestos    | 67    | 62        | 129   |
| (%)          | 51.9% | 48.06%    | 100   |
| No expuestos | 33    | 69        | 102   |
| (%)          | 32.3% | 67.6%     | 100   |
| Total        | 100   | 131       | 231   |

*Tabla 29. TABLA DE CONTIGENCIA VARONES Y POLIMORFISMO ID del tPA.*

| <b>Varones</b>      | <b>Casos</b> | <b>Controles</b> | <b>Totales</b> |
|---------------------|--------------|------------------|----------------|
| <b>Expuestos</b>    | 23           | 20               | 43             |
| <b>No expuestos</b> | 10           | 23               | 33             |
| <b>Total</b>        | 33           | 43               | 76             |

OR:2.645 IC (95%): 1.018- 6.867 p=0.043

*Tabla 30. TABLA DE CONTIGENCIA MUJERES Y POLIMORFISMO ID del tPA.*

| <b>Mujeres</b>      | <b>Casos</b> | <b>Controles</b> | <b>Totales</b> |
|---------------------|--------------|------------------|----------------|
| <b>Expuestos</b>    | 35           | 44               | 79             |
| <b>No Expuestos</b> | 32           | 44               | 76             |
| <b>Totales</b>      | 67           | 88               | 155            |

OR: 1.093 IC (95%): 0.579-2.065 p= 0.026

*Tabla 31. TABLA DE CONTINGENCIA – VARIANTE POLIMÓRFICA tPA DD*

|                         | <b>Casos</b> | <b>Controles</b> | <b>Total</b> |
|-------------------------|--------------|------------------|--------------|
| <b>Expuestos (%)</b>    | 13<br>30.23% | 30<br>69.7%      | 43<br>100    |
| <b>No expuestos (%)</b> | 87<br>46.2%  | 101<br>53.72%    | 188<br>100   |
| <b>Total</b>            | 100          | 131              | 231          |

*Tabla 32. TABLA DE CONTINGENCIA VARONES Y POLIMORFISMO DD del tPA.*

| <b>Varones</b>      | <b>Casos</b> | <b>Controles</b> | <b>Totales</b> |
|---------------------|--------------|------------------|----------------|
| <b>Expuestos</b>    | 4            | 9                | 13             |
| <b>No expuestos</b> | 29           | 34               | 63             |
| <b>Total</b>        | 33           | 43               | 76             |

OR:0.521 IC (95%): 0.145- 1.869 p=0.312

*Tabla 33. TABLA DE CONTINGENCIA MUJERES Y POLIMORFISMO DD del tPA.*

| <b>Mujeres</b>      | <b>Casos</b> | <b>Controles</b> | <b>Totales</b> |
|---------------------|--------------|------------------|----------------|
| <b>Expuestos</b>    | 9            | 21               | 30             |
| <b>No Expuestos</b> | 58           | 67               | 125            |
| <b>Totales</b>      | 67           | 88               | 155            |

OR: 0.49 IC (95%): 0.21-1.165 p= 0.103

*Tabla 34. TABLA DE CONTINGENCIA – VARIANTE POLIMÓRFICA tPA II*

|                     | <b>Casos</b> | <b>Controles</b> | <b>Total</b> |
|---------------------|--------------|------------------|--------------|
| <b>Expuestos</b>    | 20           | 39               | 59           |
| <b>(%)</b>          | 33.8%        | 66.1%            | 100          |
| <b>No expuestos</b> | 80           | 92               | 172          |
| <b>(%)</b>          | 46.5%        | 53.4%            | 100          |
| <b>Total</b>        | 100          | 131              | 231          |

*Tabla 35. TABLA DE CONTIGENCIA VARONES Y POLIMORFISMO II del tPA.*

| <b>Varones</b>      | <b>Casos</b> | <b>Controles</b> | <b>Totales</b> |
|---------------------|--------------|------------------|----------------|
| <b>Expuestos</b>    | 6            | 14               | 20             |
| <b>No expuestos</b> | 27           | 29               | 51             |
| <b>Total</b>        | 33           | 43               | 76             |

OR:0.482 IC (95%): 0.159-1.453 p=0.190

*Tabla 36. TABLA DE CONTIGENCIA MUJERES Y POLIMORFISMO II del tPA.*

| <b>Mujeres</b>      | <b>Casos</b> | <b>Controles</b> | <b>Totales</b> |
|---------------------|--------------|------------------|----------------|
| <b>Expuestos</b>    | 14           | 25               | 39             |
| <b>No Expuestos</b> | 53           | 63               | 116            |
| <b>Totales</b>      | 67           | 88               | 155            |

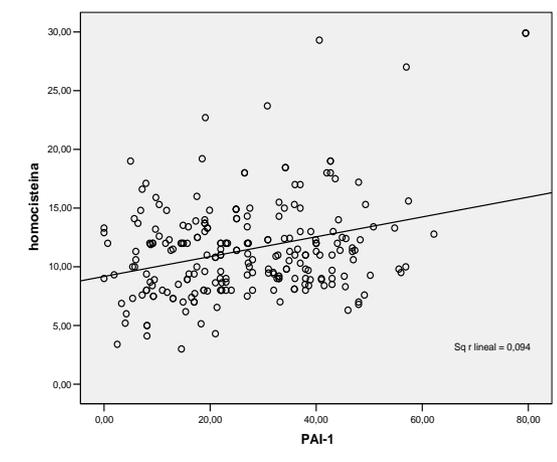
OR: 0.665 IC (95%): 0.314-1.408 p= 0.285

## **E. NIVELES PLASMÁTICOS DE PAI-1, tPA, POLIMORFISMOS GENÉTICOS Y Y HOMOCISTEÍNA.**

En el grupo de los casos (n=100), la media de los niveles de homocisteína en sangre fue de 12,25 ng/dl (DT 3,64) frente a 10,79 ng/dl (DT 4,52) que encontramos en los sujetos del grupo control (n=131), elevación muy significativa, en el grupo de pacientes con Esclerosis Múltiple (p=0.007)

### ***E.1. PAI-1 Y HOMOCISTEÍNA.***

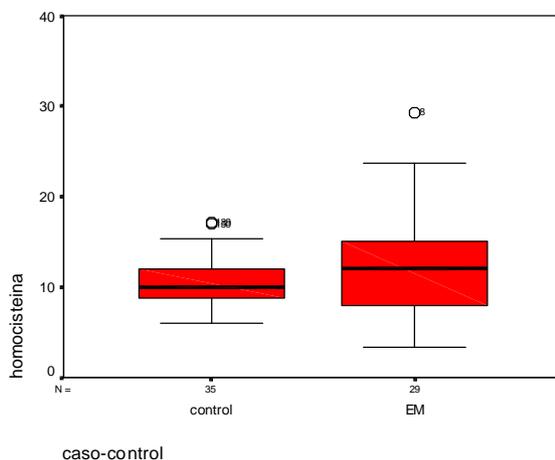
*Fig. 70. Relación entre los niveles plasmáticos de PAI-1 y homocisteína*



#### ***E.1.1. NIVELES DE HOMOCISTEÍNA PLASMÁTICA Y POLIMORFISMO 4G-4G DEL PAI-1.***

En el grupo Esclerosis Múltiple y genotipo 4G-4G para el PAI-1 (n=29) encontramos un valor medio de homocisteína en plasma de 12,49ng/dl ( DT 5.83), frente a un valor medio de 10.48 ng/dl( DT 2.66) encontrado en el grupo control ( n=35) . Valor de p=0.071.

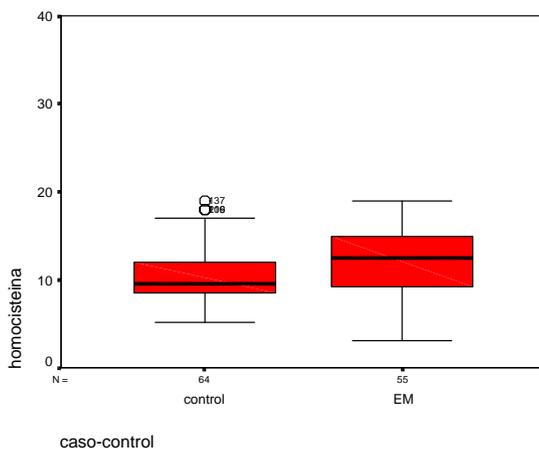
**Fig. 71.** Niveles plasmáticos de homocisteína en pacientes con polimorfismo 4G-4G del PAI-1.



### E.1.2. NIVELES DE HOMOCISTEÍNA PLASMÁTICA Y POLIMORFISMO 4G-5G DEL PAI-1.

En el grupo de estudio (n=55) el valor de la media para la homocisteína plasmática fue de 12.46 ng/dl (DT 4.29), frente a 10.76 ng/dl (DT 3.80), valor encontrado en el grupo control (n=64). Valor de p=0.024.

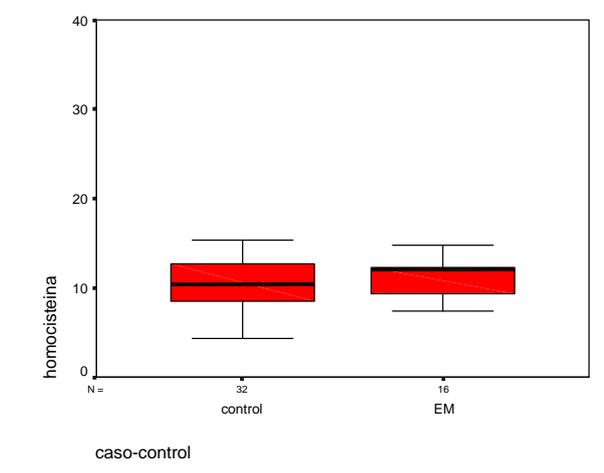
**Fig. 72:** Niveles plasmáticos de homocisteína en pacientes con polimorfismo 4G-5G del PAI-1.



### E.1.3. NIVELES DE HOMOCISTEÍNA PLASMÁTICA Y POLIMORFISMO 5G-5G DEL PAI-1.

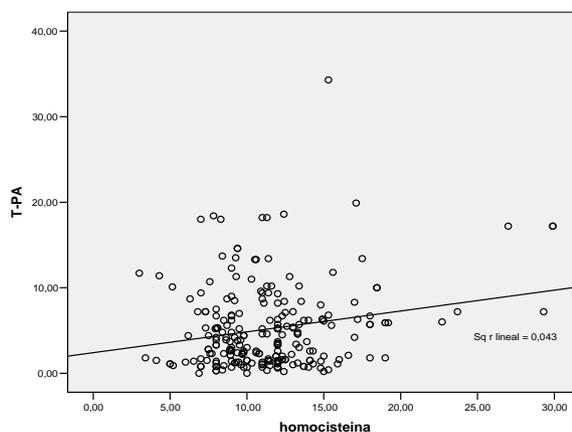
Entre los sujetos afectados de Esclerosis Múltiple y polimorfismo 5G-5G del PAI-1 (n=16), los niveles plasmáticos medios de homocisteína fueron de 11,15 ng/dl (DT 1.92) frente a 11.20 ng/dl ( DT 4.26) encontrado en el grupo control (n=32). Valor de p=0.965.

**Fig. 73** Niveles plasmáticos de homocisteína en pacientes con polimorfismo 5G-5G del PAI-1.



### E.2 TPA Y HOMOCISTEÍNA

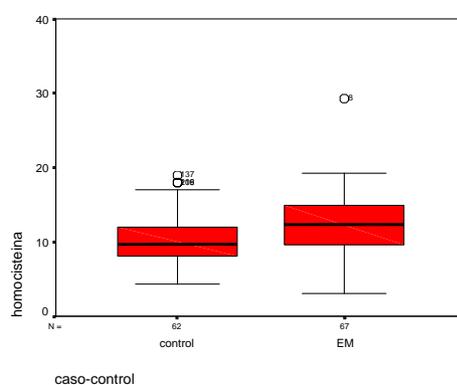
**Fig. 74.** Relación entre los niveles plasmáticos de tPA y homocisteína.



### **E.2.1. NIVELES DE HOMOCISTEÍNA PLASMÁTICA Y POLIMORFISMO II DEL tPA.**

En el grupo afecto de Esclerosis Múltiple y con polimorfismo II para el tPA (n=20) encontramos unos niveles medios de homocisteína plasmática de 11.61 ng/dl (DT 3.43), frente a los 10.96 ng/dl (DT 3.93) encontrados en el grupo control con el mismo polimorfismo (n=39). Valor de p=0.535.

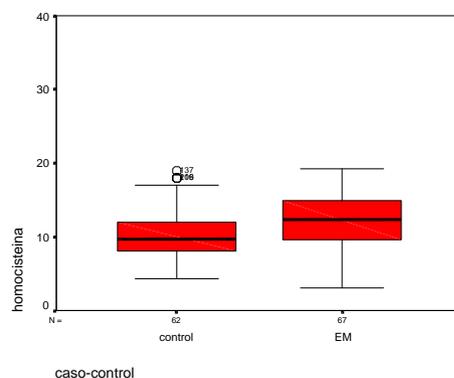
**Fig. 75** Niveles plasmáticos de homocisteína en pacientes con polimorfismo II del tPA.



### **E.2.2. NIVELES DE HOMOCISTEÍNA PLASMÁTICA Y POLIMORFISMO ID DEL tPA.**

En el grupo de los casos con polimorfismo ID para el gen del t-PA (n=67), hallamos unos valores medios de homocisteína plasmática de 12.28 ng/dl (DT 4.36), frente a 10.97 ng/dl (DT 3.99), valor encontrado en el grupo control con el mismo polimorfismo (n=62). Valor de p=0.079.

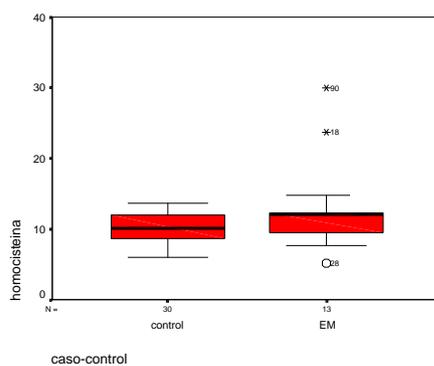
**Fig. 76.** Niveles plasmáticos de homocisteína en pacientes con polimorfismo ID del tPA



### E.2.3. NIVELES DE HOMOCISTEÍNA PLASMÁTICA Y POLIMORFISMO DD DEL tPA.

En el grupo afecto de Esclerosis Múltiple y con polimorfismo DD para el tPA (n=13) encontramos unos niveles medios de homocisteína plasmática de 13.14 ng/dl (DT 6.65), frente a los 10.18 ng/dl (DT 2.27) encontrados en el grupo control con el mismo polimorfismo (n=30). Valor de  $p=0.0035$ .

**Fig. 77.** Niveles plasmáticos de homocisteína en pacientes con polimorfismo DD del tPA



#### 4.) ANÁLISIS MULTIVARIANTE.

*Tabla 37: Tabla de agrupación de variables (polimorfismos del PAI-1 , tPA y sexo)*

|                   |              | <i>Frecuencia</i> | <i>(1)</i>   | <i>(2)</i>   |
|-------------------|--------------|-------------------|--------------|--------------|
| <i>Poli tPA</i>   | <i>II</i>    | <i>59</i>         | <i>.000</i>  | <i>.000</i>  |
|                   | <i>ID</i>    | <i>127</i>        | <i>1,000</i> | <i>.000</i>  |
|                   | <i>DD</i>    | <i>43</i>         | <i>.000</i>  | <i>1,000</i> |
| <i>Poli PAI-1</i> | <i>G4-G4</i> | <i>64</i>         | <i>.000</i>  | <i>.000</i>  |
|                   | <i>G4-G5</i> | <i>117</i>        | <i>1,000</i> | <i>.000</i>  |
|                   | <i>G5-G5</i> | <i>48</i>         | <i>.000</i>  | <i>1,000</i> |
| <i>Sexo</i>       | <i>Varón</i> | <i>75</i>         | <i>.000</i>  |              |
|                   | <i>Mujer</i> | <i>154</i>        | <i>1,000</i> |              |

A continuación realizaremos la regresión múltiple con todas los factores de la coagulación estudiados (tPA, PAI-1, Proteína C, Proteína S, Trombomodulina, Plasminógeno, Resistencia a Proteína C activada, Antitrombina III, INR, Tiempo Protrombina), las variantes polimórficas PAI-1 (Poli PAI-1 0,1,2 ver Tabla 37), las variantes polimórficas tPA (Poli tPA -0,1,2- ver Tabla 37), y las interacciones entre los niveles plasmáticos de PAI-1 y tPA para cada polimorfismo del PAI-1 y del tPA (poli PAI-1 x PAI-1 o poli tPA x tPA).

**Tabla 38.** Factores de la coagulación, polimorfismos e interacciones entre los polimorfismos del PAI-1 y tPA y sus niveles plasmáticos.

| VARIABLES              | Puntuación | GI | Sig   |
|------------------------|------------|----|-------|
| tPA                    | 6.348      | 1  | 0.012 |
| PAI-1                  | 14.428     | 1  | 0.000 |
| Proteína S             | 1.530      | 1  | 0.216 |
| Proteína C             | 26.462     | 1  | 0.000 |
| R. proteína C activada | 20.223     | 1  | 0.000 |
| Plasminógeno           | 3.776      | 1  | 0.052 |
| Trombomodulina         | 20.112     | 1  | 0.000 |
| Homocisteína           | 7.190      | 1  | 0.007 |
| T. Protrombina         | 21.689     | 1  | 0.000 |
| INR                    | 0.073      | 1  | 0.787 |
| Antitrombina III       | 1.568      | 1  | 0.210 |
| Poli PAI-1             | 2.221      | 2  | 0.329 |
| PoliPAI-1 (1)          | 0.613      | 1  | 0.434 |
| Poli PAI-1 (2)         | 2.221      | 1  | 0.136 |
| Poli tPA               | 8.328      | 2  | 0.016 |
| Poli tPA (1)           | 8.191      | 1  | 0.004 |
| PolitPA (2)            | 3.413      | 1  | 0.065 |
| PAI-1 x poliPAI-1      | 10.772     | 2  | 0.005 |
| PAI-1 x poliPAI (1)    | 1.818      | 1  | 0.178 |
| PAI-1 x poliPAI (2)    | 5.406      | 1  | 0.020 |
| Poli tPA x tPA         | 4.082      | 2  | 0.130 |
| Poli tPA (1) x tPA     | 0.025      | 1  | 0.874 |
| Poli tPA (1) x tPA     | 3.705      | 1  | 0.054 |
| Estadísticos globales  | 106.336    | 19 | 0.000 |

**Tabla 39.** Factores de la coagulación, polimorfismos e interacciones entre los polimorfismos del PAI-1 y tPA y sus niveles plasmáticos.

| Variables             | B      | ET    | Wald   | gl | Sig.  | Exp (B)  |
|-----------------------|--------|-------|--------|----|-------|----------|
| tPA                   | -0.143 | 0.110 | 1.683  | 1  | 0.195 | 0.867    |
| PAI-1                 | -0.021 | 0.025 | 0.71   | 1  | 0.413 | 0.980    |
| Proteína S            | -0.016 | 0.012 | 1.811  | 1  | 0.178 | 0.984    |
| Proteína C            | 0.060  | 0.013 | 21.466 | 1  | 0.000 | 1.062    |
| R.Proteína C activada | -1.164 | 0.276 | 17.818 | 1  | 0.000 | 0.312    |
| Plasminógeno          | -0.039 | 0.012 | 11.116 | 1  | 0.001 | 0.962    |
| Trombomodulina        | -0.672 | 0.197 | 11.649 | 1  | 0.001 | 0.511    |
| Homocisteína          | 0.207  | 0.059 | 12.373 | 1  | 0.000 | 1.229    |
| T. Protrombina        | -0.133 | 0.037 | 12.745 | 1  | 0.000 | 0.876    |
| INR                   | -4.254 | 2.622 | 2.634  | 1  | 0.105 | 0.014    |
| Antitrombina III      | -0.007 | 0.014 | 0.249  | 1  | 0.618 | 0.993    |
| Poli PAI-1            |        |       | 0.381  | 2  | 0.826 |          |
| PoliPAI-1 (1)         | -0.495 | 1.023 | 0.234  | 1  | 0.628 | 01.641   |
| Poli PAI-1 (2)        | 0.759  | 1.343 | 0.319  | 1  | 0.572 | 2.136    |
| Poli tPA              |        |       | 1.507  | 2  | 0.471 |          |
| Poli tPA (1)          | 0.747  | 0.744 | 1.009  | 1  | 0.315 | 2.111    |
| Poli tPA (2)          | 1.146  | 1.048 | 1.195  | 1  | 0.274 | 3.145    |
| PAI-1 x poliPAI-1     |        |       | 2.465  | 2  | 0.292 |          |
| PAI-1 x poliPAI (1)   | -0.022 | 0.33  | 0.459  | 1  | 0.498 | 0.978    |
| PAI-1 x poliPAI (2)   | -0.071 | 0.045 | 2.462  | 1  | 0.117 | 0.931    |
| Poli tPA x tPA        |        |       | 1.122  | 2  | 0.571 |          |
| Poli tPA (1) x tPA    | 0.075  | 0.121 | 0.386  | 1  | 0.535 | 1.078    |
| Poli tPA (1) x tPA    | -0.046 | 0.149 | 0.094  | 1  | 0.759 | 0.955    |
| Estadísticos globales | 20.550 | 6.276 | 10.722 | 1  | 0.001 | 8.4E+008 |

Extrayendo las interacciones entre los niveles plasmáticos de PAI-1 y tPA y las diferentes variantes polimórficas del PAI-1 y tPA del modelo estadístico:

**Tabla 40** Factores de la coagulación y polimorfismos del PAI-1 y del tPA

| <b>Variables</b>       | <b>Puntuación</b> | <b>gl</b> | <b>Sig</b> |
|------------------------|-------------------|-----------|------------|
| tPA                    | 6.348             | 1         | 0.012      |
| PAI-1                  | 14.428            | 1         | 0.000      |
| Proteína S             | 1.530             | 1         | 0.216      |
| Proteína C             | 26.462            | 1         | 0.000      |
| R. Proteína C activada | 20.223            | 1         | 0.000      |
| Plasminógeno           | 3.776             | 1         | 0.052      |
| Trombomod.             | 20.112            | 1         | 0.000      |
| Homocisteína           | 7.190             | 1         | 0.007      |
| T. Protrombina         | 21.689            | 1         | 0.000      |
| INR                    | 0.073             | 1         | 0.787      |
| Antitrombina III       | 1.568             | 1         | 0.210      |
| Poli PAI-1             | 2.221             | 2         | 0.329      |
| PoliPAI-1 (1)          | 0.613             | 1         | 0.434      |
| Poli PAI-1 (2)         | 2.221             | 1         | 0.136      |
| Poli tPA               | 8.328             | 2         | 0.016      |
| Poli tPA (1)           | 8.191             | 1         | 0.004      |
| PolitPA (2)            | 3.413             | 1         | 0.065      |
| Estadísticos globales  | 108.444           | 18        | 0.000      |

*Tabla 41. Factores de la coagulación y polimorfismos del PAI-1 y del tPA.*

|                               | <b>B</b> | <b>ET</b> | <b>Wald</b> | <b>gl</b> | <b>Sig.</b> | <b>Exp (B)</b> |
|-------------------------------|----------|-----------|-------------|-----------|-------------|----------------|
| <b>tPA</b>                    | -0.103   | 0.063     | 3.727       | 1         | 0.054       | 0.902          |
| <b>PAI-1</b>                  | -0.045   | 0.016     | 8.049       | 1         | 0.005       | 0.956          |
| <b>Proteína S</b>             | -0.013   | 0.011     | 1.346       | 1         | 0.246       | 0.988          |
| <b>Proteína C</b>             | 0.058    | 0.012     | 22.139      | 1         | 0.000       | 1.060          |
| <b>R. proteína C activada</b> | -1.140   | 0.267     | 18.187      | 1         | 0.000       | 0.320          |
| <b>Plasminógeno</b>           | -0.039   | 0.012     | 11.444      | 1         | 0.001       | 0.962          |
| <b>Trombomodulina</b>         | -0.644   | 0.188     | 11.673      | 1         | 0.001       | 0.525          |
| <b>Homocisteína</b>           | 0.185    | 0.055     | 11.281      | 1         | 0.001       | 1.203          |
| <b>T. Protrombina</b>         | -0.126   | 0.036     | 12.178      | 1         | 0.000       | 0.882          |
| <b>INR</b>                    | -4.882   | 2.571     | 3.604       | 1         | 0.058       | 0.008          |
| <b>Antitromina III</b>        | -0.002   | 0.013     | 0.032       | 1         | 0.857       | 0.998          |
| <b>Poli PAI-1</b>             |          |           | 4.641       | 2         | 0.098       |                |
| <b>PoliPAI-1 (1)</b>          | -0.189   | 0.468     | 0.164       | 1         | 0.685       | 0.827          |
| <b>Poli PAI-1 (2)</b>         | -1261    | 0.622     | 4.113       | 1         | 0.043       | 0.283          |
| <b>Poli tPA</b>               |          |           | 5.950       | 2         | 0.051       |                |
| <b>Poli tPA (1)</b>           | 1.168    | 0.479     | 5.944       | 1         | 0.015       | 3.215          |
| <b>Poli tPA (2)</b>           | 0.804    | 0.608     | 1.753       | 1         | 0.186       | 2.235          |
| <b>Estadísticos globales</b>  | 20.590   | 6.077     | 11.481      | 1         | 0.001       | 8.8E+008       |

Extrayendo la Proteína S del análisis estadístico:

**Tabla 42** Factores de la coagulación y polimorfismos del PAI-1 y tPA.

| <b>Variables</b>             | <b>Puntuación</b> | <b>gl</b> | <b>Sig</b>   |
|------------------------------|-------------------|-----------|--------------|
| tPA                          | 6.348             | 1         | 0.012        |
| PAI-1                        | 14.428            | 1         | 0.000        |
| Proteína C                   | 26.462            | 1         | 0.000        |
| R. proteína C activada       | 20.223            | 1         | 0.000        |
| Plasminógeno                 | 3.776             | 1         | 0.052        |
| Trombomodulina               | 20.112            | 1         | 0.000        |
| Homocisteína                 | 7.190             | 1         | 0.007        |
| T. Protrombina               | 21.689            | 1         | 0.000        |
| INR                          | 0.073             | 1         | 0.787        |
| Antitrombina III             | 1.568             | 1         | 0.210        |
| Poli PAI-1                   | 2.221             | 2         | 0.329        |
| PoliPAI-1 (1)                | 0.613             | 1         | 0.434        |
| Poli PAI-1 (2)               | 2.221             | 1         | 0.136        |
| Poli tPA                     | 8.328             | 2         | 0.016        |
| Poli tPA (1)                 | 8.191             | 1         | 0.004        |
| PolitPA (2)                  | 3.413             | 1         | 0.065        |
| <b>Estadísticos globales</b> | <b>107.645</b>    | <b>17</b> | <b>0.000</b> |

*Tabla 43 Factores de la coagulación y polimorfismos del PAI-1 y del tPA.*

| <b>Variabes</b>        | <b>B</b> | <b>ET</b> | <b>Wald</b> | <b>gl</b> | <b>Sig.</b> | <b>Exp (B)</b> |
|------------------------|----------|-----------|-------------|-----------|-------------|----------------|
| tPA                    | -0.112   | 0.054     | 4.350       | 1         | 0.037       | 0.894          |
| PAI-1                  | -0.047   | 0.016     | 8.776       | 1         | 0.003       | 0.954          |
| Proteína C             | 0.058    | 0.012     | 23.070      | 1         | 0.000       | 1.059          |
| R. proteína C activada | -1.135   | 0.264     | 18.534      | 1         | 0.000       | 0.322          |
| Plasminógeno           | -0.040   | 0.011     | 12.172      | 1         | 0.000       | 0.961          |
| Trombomodulina         | -0.616   | 0.182     | 11.493      | 1         | 0.001       | 0.540          |
| Homocisteína           | 0.175    | 0.054     | 10.498      | 1         | 0.001       | 1.191          |
| T. Protrombina         | -0.123   | 0.036     | 11.677      | 1         | 0.001       | 0.884          |
| INR                    | -4.548   | 2.578     | 3.111       | 1         | 0.078       | 0.011          |
| Antitrombina III       | -0.001   | 0.13      | 0.004       | 1         | 0.952       | 0.999          |
| Poli PAI-1             |          |           | 4.126       | 2         | 0.104       |                |
| PoliPAI-1 (1)          | -0.229   | 0.463     | 0.245       | 1         | 0.621       | 0.795          |
| Poli PAI-1 (2)         | -1.249   | 0.615     | 4.126       | 1         | 0.042       | 0.287          |
| Poli tPA               |          |           | 6.061       | 2         | 0.048       |                |
| Poli tPA (1)           | 1.177    | 0.478     | 6.058       | 1         | 0.014       | 3.245          |
| PolitPA (2)            | 0.800    | 0.607     | 1.736       | 1         | 0.188       | 2.226          |
| Estadísticos globales  | 18.921   | 5.861     | 10.423      | 1         | 0.001       | 1.6E+008       |

Extrayendo el I.N.R. del modelo estadístico:

**Tabla 44** Factores de la coagulación y polimorfismos del PAI-1 y del tPA.

| <b>Variables</b>             | <b>Puntuación</b> | <b>gl</b> | <b>Sig</b>   |
|------------------------------|-------------------|-----------|--------------|
| tPA                          | 6.348             | 1         | 0.012        |
| PAI-1                        | 14.428            | 1         | 0.000        |
| Proteína C                   | 26.462            | 1         | 0.000        |
| R. proteína C activada       | 20.223            | 1         | 0.000        |
| Plasminógeno                 | 3.776             | 1         | 0.052        |
| Trombomodulina               | 20.112            | 1         | 0.000        |
| Homocisteína                 | 7.190             | 1         | 0.007        |
| T. Protrombina               | 21.689            | 1         | 0.000        |
| Antitrombina III             | 1.568             | 1         | 0.210        |
| Poli PAI-1                   | 2.221             | 2         | 0.329        |
| PoliPAI-1 (1)                | 0.613             | 1         | 0.434        |
| Poli PAI-1 (2)               | 2.221             | 1         | 0.136        |
| Poli tPA                     | 8.328             | 2         | 0.016        |
| Poli tPA (1)                 | 8.191             | 1         | 0.004        |
| Poli tPA (2)                 | 3.413             | 1         | 0.065        |
| <b>Estadísticos globales</b> | <b>107.645</b>    | <b>17</b> | <b>0.000</b> |

**Tabla 45** Factores de la coagulación y polimorfismos del PAI-1 y del tPA.

| <b>VARIABLES</b>       | <b>B</b> | <b>ET</b> | <b>Wald</b> | <b>gl</b> | <b>Sig.</b> | <b>Exp (B)</b> |
|------------------------|----------|-----------|-------------|-----------|-------------|----------------|
| tPA                    | -0.125   | 0.052     | 5.739       | 1         | 0.017       | 0.883          |
| PAI-1                  | -0.046   | 0.016     | 8.624       | 1         | 0.003       | 0.955          |
| Proteína C             | 0.059    | 0.012     | 24.326      | 1         | 0.000       | 1.061          |
| R. proteína C activada | -1.117   | 0.262     | 18.120      | 1         | 0.000       | 0.327          |
| Plasminógeno           | -0.040   | 0.011     | 12.206      | 1         | 0.000       | 0.961          |
| Trombomodulina         | -0.576   | 0.175     | 10.784      | 1         | 0.001       | 0.562          |
| Homocisteína           | 0.177    | 0.054     | 10.881      | 1         | 0.001       | 1.194          |
| T. Protrombina         | -0.091   | 0.031     | 8.752       | 1         | 0.001       | 0.913          |
| Antitrombina III       | -0.002   | 0.013     | 0.021       | 1         | 0.886       | 0.998          |
| Poli PAI-1             |          |           | 4.393       | 2         | 0.114       |                |
| PoliPAI-1 (1)          | -0.199   | 0.462     | 0.186       | 1         | 0.666       | 0.819          |
| Poli PAI-1 (2)         | -1.208   | 0.612     | 3.892       | 1         | 0.049       | 0.299          |
| Poli tPA               |          |           | 6.557       | 2         | 0.038       |                |
| Poli tPA (1)           | 1.214    | 0.474     | 6.553       | 1         | 0.010       | 3.367          |
| PolitPA (2)            | 0.823    | 0.599     | 1.887       | 1         | 0.169       | 2.277          |
| Estadísticos globales  | 10.961   | 3.446     | 10.117      | 1         | 0.001       | 57593.01       |

Finalmente eliminando del análisis la Antitrombina III obtenemos la ecuación final:

**Tabla 46** Factores de la coagulación, polimorfismos del PAI-1 y del tPA.

| Variables              | Puntuación | GI | Sig   |
|------------------------|------------|----|-------|
| tPA                    | 6.488      | 1  | 0.011 |
| PAI-1                  | 15.006     | 1  | 0.000 |
| Proteína C             | 26.089     | 1  | 0.000 |
| R. proteína C activada | 20.345     | 1  | 0.000 |
| Plasminógeno           | 3.802      | 1  | 0.051 |
| Trombomodulina         | 20.345     | 1  | 0.000 |
| Homocisteína           | 7.237      | 1  | 0.007 |
| T. Protrombina         | 22.636     | 1  | 0.000 |
| Poli PAI-1             | 2.336      | 2  | 0.311 |
| PoliPAI-1 (1)          | 0.731      | 1  | 0.393 |
| Poli PAI-1 (2)         | 2.336      | 1  | 0.127 |
| Poli tPA               | 8.680      | 2  | 0.013 |
| Poli tPA (1)           | 8.544      | 1  | 0.003 |
| Poli tPA (2)           | 3.540      | 1  | 0.060 |
| Estadísticos globales  | 108,390    | 16 | 0.000 |

**Tabla 47** Factores de la coagulación y polimorfismos del PAI-1 y del tPA.

| VARIABLES              | B      | ET    | Wald   | GI | Sig.  | Exp (B)   |
|------------------------|--------|-------|--------|----|-------|-----------|
| tPA                    | -0.124 | 0.051 | 5.804  |    | 0.016 | 0.884     |
| PAI-1                  | -0.046 | 0.016 | 8.695  | 1  | 0.003 | 0.955     |
| Proteína C             | 0.059  | 0.012 | 24.414 | 1  | 0.000 | 1.061     |
| R. proteína C activada | -1.126 | 0.258 | 19.066 | 1  | 0.000 | 0.324     |
| Plasminógeno           | -0.040 | 0.011 | 12.706 | 1  | 0.000 | 0.961     |
| Trombomodulina         | -0.574 | 0.174 | 10.907 | 1  | 0.001 | 0.563     |
| Homocisteína           | 0.176  | 0.053 | 10.997 | 1  | 0.001 | 1.193     |
| T. Protrombina         | -0.092 | 0.031 | 9.002  | 1  | 0.003 | 0.912     |
| Poli PAI-1             |        |       | 4.436  | 2  | 0.109 |           |
| PoliPAI-1 (1)          | -0.197 | 0.462 | 0.181  | 1  | 0.671 | 0.822     |
| Poli PAI-1 (2)         | -1.212 | 0.612 | 3.918  | 1  | 0.048 | 0.298     |
| Poli tPA               |        |       | 6.979  | 2  | 0.031 |           |
| Poli tPA (1)           | 1.232  | 0.466 | 6.978  | 1  | 0.008 | 3.427     |
| PolitPA (2)            | 0.831  | 0.598 | 1.929  | 1  | 0.165 | 2.296     |
| Estadísticos globales  | 10.894 | 3.304 | 10.870 | 1  | 0.001 | 53865,091 |

---

Tras la realización del análisis multivariante, la interpretación de los resultados obtenidos, y que se muestran en la **Tabla 47**, es la siguiente:

1. Para las variables edad y sexo, los valores del coeficiente no son interpretables dados los criterios de selección de comparabilidad de los controles .
2. El riesgo de presentar una Esclerosis Múltiple, se reduce en 0.12 por cada unidad de aumento de los valores de tPA en plasma, a igualdad del resto de variables analizadas.
3. El riesgo de padecer Esclerosis Múltiple, se reduce en 0.046 por cada unidad de aumento del PAI-1 en sangre, controlando por el resto de variables
4. Por cada unidad que aumente la Proteína C, se incrementa el riesgo de presentar la enfermedad un 0.059 controlando por el resto de variables.
5. Por el aumento de cada unidad de la resistencia la proteína C activada, el riesgo de padecer Esclerosis Múltiple se reduce en 1.12 ajustando por el resto de factores.
6. Por cada unidad que aumenta la plasminógeno en sangre, el riesgo de padecer Esclerosis Múltiple se reduce en 0.040, controlando el resto de las variables.
7. Por cada unidad de aumento de la trombomodulina el riesgo de presentar Esclerosis Múltiple se reduce en 0.57, ajustando por el resto de factores.
8. Al aumentar en una unidad de la homocisteína, el riesgo de presentar Esclerosis Múltiple se eleva en 0.17, ajustando por el resto de factores.
9. Un sujeto que presente el polimorfismo del tPA del Alu tipo ID, presenta 3.42 veces más riesgo de desarrollar una Esclerosis Múltiple que otro que

presente la categoría de referencia (genotipo II para el tPA) a igualdad de resto de variables.

10. Un sujeto que presente la variante polimórfica del PAI-1 5G/5G, tiene una reducción en el riesgo de presentar la enfermedad de un 71% (OR. 0.29) con respecto a otro con la variante polimórfica 4-4, ajustando para el resto de variables.

# *DISCUSIÓN*

---

### ***1.- Discusión sobre el análisis descriptivo.***

La Esclerosis Múltiple es la enfermedad neurológica crónica más frecuente en adultos jóvenes en Europa y Norteamérica (Compston y Confavreux 2006). Conocemos que la prevalencia en las Islas Canarias, con una latitud en torno a los 28° 40', oscila entre 42/100.000 habitantes (Hernández 2002) y 78/100.000 habitantes (Aladro et al. 2005); muy similar a la del sur de la España peninsular. Nuestros pacientes, pertenecientes a ésta área geográfica, presentaban una edad media de 37,6 años de edad, con una media para el primer síntoma de 31,14 años; acorde con lo publicado (Miller et al. 1992, Kantarci et al. 1998, Confavreux y Vukusic 2002). También predominaba el sexo femenino (56,6%).

Nuestra muestra no difiere de la bibliografía ni en el tiempo transcurrido desde el primer síntoma hasta el diagnóstico de la enfermedad, que fue de 22,88 meses; muy similar a los 21 meses entre el primer y segundo brote clínico en la serie de Confavreux et al. (2003). Ni difieren en la distribución en el encéfalo y médula del primer síntoma, siendo éste en un 37% de localización supratentorial, en un 27% troncoencefálica, en un 23% óptica y, por último, en un 20% medular (Confavreux y Vukusic 2005).

En cuanto a la severidad clínica, nuestra población exhibía un número medio de brotes de 3.14, siendo estos de carácter motor en el 85% de los casos. También presentaban un brote sensitivo en su evolución al menos en un 80% de los casos. Sólo el 40 % de los sujetos fueron analizados durante un brote activo de la enfermedad.

En cuanto a la forma clínica, en conjunto el 98% exhibían una forma remitente – recidivante y un 2% primariamente progresiva.

El grado de afectación de esta población, según la escala EDSS fue, en el 87% de los casos, menor o igual a 3.5%. Presentaban, así mismo, según la escala SCRIPP, y la escala MSFC (“9 Holes”: mano derecha 12.5 segundos y mano izquierda 14 segundos/media; caminar 25 pasos: 6.2 segundos; PASAT: 27,5 respuestas numéricas acertadas) una afectación leve en todos los dominios analizados.

En cuanto a los estudios complementarios mencionar que en las pruebas neurofisiológicas, el 52 % de los pacientes exhibían un estudio patológico en los potenciales evocados somatosensoriales; frente al 26%, y el 19%, que mostraban potenciales patológicos troncoencefálicos y visuales respectivamente. Y en cuanto al LCR, la determinación de bandas oligoclonales dieron positivas en el 85% de los pacientes, sin que se obtuviera asociación estadísticamente significativa entre la presencia de las bandas oligoclonales y el mayor grado de discapacidad. En conjunto, nuestros pacientes, no diferían ni en edad, ni en el sexo, ni en las características clínicas, ni en los resultados de las pruebas complementarias de las poblaciones afectas de Esclerosis Múltiple descritas para la misma latitud y etnia.

## ***2.- Discusión sobre el sistema plasminógeno (PAI-1 y t-PA).***

Uno de los objetivos centrales de esta tesis era el estudiar la participación del sistema del plasminógeno en el desarrollo y grado de discapacidad de la Esclerosis Múltiple. Específicamente, se buscó la posible relación entre los niveles plasmáticos del PAI-1 y del tPA y sus polimorfismos genéticos, y la enfermedad desmielinizante.

Conocemos que el PAI-1 y el tPA son serinas, y éstas, como proteasas, se reconocen por su papel en la coagulación sanguínea y en el sistema fibrinolítico. Pero también hay evidencia, como hemos mostrado en la introducción, de su participación en funciones proteolíticas del Sistema Nervioso (Gingrich y Traynelis 2000); destacando entre ellas: la migración celular, el crecimiento neurítico, la comunicación intercelular, los fenómenos de remodelación sináptica, la excitabilidad celular y la supervivencia neuronal y glial (Moonen et al. 1982; Monard E. 1988; Liu et al. 1994a; Houenou et al. 1995; Tsirka et al. 1995; Tsirka et al. 1997). Estos eventos están mediados, en parte, por la habilidad de dichas proteasas para poner en marcha la cascada de señales intracelulares. Activan proteínas precursoras de factores de crecimiento, degradan componentes de la matriz extracelular y se unen a receptores de superficie celular.

También conocemos que la actividad de estas serinas está estrechamente vigilada y controlada por proteínas inhibitoras, por lo que alteraciones en su equilibrio y regulación

derivan en daños y lesiones implícitas en patologías del Sistema Nervioso Central (Tsirka et al. 1995,1997). De ahí la importancia del conocimiento de cómo se expresan estas moléculas en los pacientes afectados de Esclerosis Múltiple.

A pesar de éstas importantísimas funciones biológicas y de la amplia bibliografía sobre diversos aspectos relacionados con la Esclerosis Múltiple, son escasos los estudios sobre la participación del sistema de neuroserpinas en dicha entidad. Previamente a lo que exponemos sólo se ha publicado un estudio clínico sobre la implicación de uno de los componentes de dicho sistema, los polimorfismos del PAI-1, sobre el riesgo de padecer esta enfermedad (Luomala et al. 2000), careciéndose de información sobre la influencia de los polimorfismos del tPA. También son escasísimos los estudios histopatológicos e inmunohistoquímicos de la presencia de tPA, u-PA, PAI-1, dímero-D y productos de la degradación de la fibrina en placas de desmielinización (Gveric et al. 2001, 2003). A continuación discutiremos por separado los hallazgos de los polimorfismos y de los niveles plasmáticos del activador e inhibidor del plasminógeno.

### ***2.a) Polimorfismos genéticos del activador tisular del plasminógeno (tPA).***

El gen del tPA se localiza en el cromosoma 8p12-p11.2. Entre sus polimorfismos, destacaremos el que se ha encontrado en la secuencia Alu, la repetición ID, en el intrón 8 (h106) del gen (Tishkoff et al 1996). Probablemente este polimorfismo surgió de forma precoz en la evolución humana, dando ésta lugar a poblaciones dimórficas en función a su presencia o ausencia (Novick et al. 1998). Aunque este polimorfismo no se ha relacionado con la síntesis de t-PA en el endotelio basal (van den Eijnden et al. 1995), ni con los niveles plasmáticos, sí se ha hecho con el riesgo del desarrollo de un infarto de miocardio (van der Bom et al. 1997). En nuestro estudio de los polimorfismos genéticos del activador tisular del plasminógeno (tPA) hemos encontrado la existencia de una asociación estrecha entre la variante polimórfica del tPA (genotipo ID) y la Esclerosis Múltiple. En nuestra población la presencia de dicho polimorfismo genético aumentaría el riesgo de padecer una Esclerosis Múltiple hasta en 3.4 veces (OR.:3.42). Esta asociación no ha sido descrita en ningún estudio previo, pues Luomala et al. (2000) sólo analizan los polimorfismos del PAI-1, en una población femenina finlandesa.

En la bibliografía encontramos resultados escasos y dispares sobre la posible asociación de la presencia o ausencia de este polimorfismo y el riesgo en diversas enfermedades.

La gran mayoría de los resultados con los que podemos comparar son con patología no neurológica. Concretamente, con el riesgo de desarrollar enfermedades vasculares, en especial con el infarto de miocardio, aunque los resultados varían con la etnia estudiada. Así, Van der Bom et al. (1997), estudiando una población germánica (121 superviviente de infarto agudo de miocardio frente a 250 controles sanos) hallaron que el polimorfismo de repetición Alu inserción/delección (I/D) en el gen del tPA se asociaba con un riesgo aumentado para sufrirlo (OR 2.2, IC 1.1-4.5). Sin embargo, recientemente, Hopper et al. (2000), no confirmaron esta asociación en afro-americanos. Más discrepantes aún son los resultados de Ridker et al. (1997), quienes analizando los polimorfismos del tPA en 369 pacientes con infarto agudo de miocardio frente a 369 controles no obtienen significación en los resultados (OR 1.0, IC 0.7-1.1,  $p=0.8$ ), considerando tanto una transmisión dominante (OR 1.0, CI 0.7-1.1,  $p = 0.8$ ) como recesiva (OR 1.1, CI 0.8-1.0). O los resultados de Steeds et al. (1998), quienes al estudiar 529 pacientes (raza caucásica y nacionalidad británica) afectados de infarto agudo de miocardio y 525 controles sanos, no hallaron tampoco significación (OR 1, IC 0.6-1.4,  $p=0.56$ ).

Por otro lado, y en segundo lugar, en otras patologías vasculares, tampoco los hallazgos son uniformes. Así, Hopper et al. (2000), hallaron asociación entre el alelo D del polimorfismo I/D para el tPA y el desarrollo de tromboembolismo venoso. Mientras que en la hipertensión arterial, Kang BY y Kang OL. (2003), no hallan una relación significativa entre las variantes polimórficas del tPA (en especial la forma ID del gen del tPA) y la hipertensión en la población coreana estudiada ( $\chi^2$ - test independiente; para la distribución genotípica,  $df=2$ ,  $P=0.6810$ ; para la distribución alélica  $df=1$ ,  $P=0.4249$ , ni en su población). De igual forma que Wang et al. (2002), tampoco hallaron significación al analizar los polimorfismos en población china normotensa e hipertensa.

En cuanto a patología neurológica se refiere, existen estudios que relacionan el ictus cerebral y algunas de las variantes polimórficas descritas del tPA. Así Jannes et al. (2004) mostraron un incremento en el riesgo de ictus en relación con el alelo D del polimorfismo

---

Alu, a través del desequilibrio funcional con el polimorfismo tPA -7351C>T. Y en un reciente estudio australiano, donde se estudiaron 182 sujetos con ictus frente a 301 controles sanos, sólo evidenciaron un mayor riesgo para el subgrupo de ictus lacunares en la variante polimórfica TT (en comparación con la forma CC). Sin embargo, otros estudios no corroboran dicha asociación. Así, Jood et al. (2005), analizando la posible relación entre las variantes polimórficas Alu del tPA y el riesgo de presentar dicha patología, en una población nórdica de 322 sujetos con una distribución polimórfica del tPA de CC 50.8%, CT 39.2% y TT 10.0%, no encontraron asociación significativa entre el riesgo de presentar un ictus y el polimorfismo tPA -7351C>T.

En cuanto a la relación de los polimorfismos del tPA y la Esclerosis Múltiple subrayar, como hemos mencionado, que no existen otras casuísticas con las que poder establecer una comparación.

En todo caso, éstas discrepancias de la literatura podrían explicarse por varias razones:

a) En primer lugar razones dependientes de la localización de la expresión del tPA. Así, en la patología citada no neurológica (infarto agudo de miocardio, tromboembolismo venoso, hipertensión arterial...), debemos recalcar que el papel tromboprotector del tPA es mayor en la vasculatura sistémica que en la vasculatura cerebral, por lo que los resultados en el ictus frente a la patología vascular sistémica pueden ser dispares. Por otro lado, en cuanto a la patología neurológica se refiere (ictus cerebral vs Esclerosis Múltiple), es esencial considerar que el tPA es una sustancia constitutiva del cerebro y que el patrón de expresión del promotor tPA también es dispar. Así, un fragmento de 9.5- kb del tPA promotor se expresa más notablemente en el gyrus dentado, colículo superior, hipocampo, tálamo y corteza piriforme, mientras que otro fragmento de 3.0- kb del tPA promotor lo hace en la corteza e hipocampo; expresión cerebral que también difiere de la del fragmento de 1.4- kb del tPA promotor que selectivamente se expresa en la habénula medial (Nagamine et al. 2005). Esto último implica que como la expresión en el cerebro es dispar y su acción difiere francamente de la del sistema fibrinolítico vascular. En el ictus y en la Esclerosis Múltiple la expresión del tPA en la barrera hematoencefálica y su expresión en

---

las neuronas y en la microglía también es diferente. Este hecho provoca que el daño excitotóxico neuronal y la activación de la proteólisis extracelular también sea dispar. Así no es de extrañar que el tPA pueda desempeñar un papel dual, tanto neurodegenerativo como reparador.

b) En segundo lugar razones geográficas/étnicas, constatándose, por ejemplo, que la frecuencia de genotipos de los polimorfismos del I/D de tPA, y el 4G/5G del PAI-1, varían entre afroamericanos y caucasianos. También por un aumento del desequilibrio entre el alelo I/I y el locus de la enfermedad entre las poblaciones. Por tanto, la heterogeneidad genética puede ser la responsable de la variabilidad de resultados al estudiar diferentes poblaciones.

c) En tercer lugar por el diferente peso en la población estudiada de las condiciones que incrementan el riesgo para eventos tales como la hipertensión arterial, insuficiencia renal crónica, el tabaquismo etc, y que se asocian a una marcada alteración de la capacidad de liberación de tPA.

d) En cuarto lugar, por la existencia de nuevos polimorfismos del tPA que se asocian a una mayor o menor secreción vascular de tPA in vivo (Ladenvall et al. 2000, 2001) y que no han sido estudiados.

e) Finalmente, por la expresión endógena cerebral del tPA que se incrementa en eventos que requieren plasticidad neuronal, tales como la remodelación sináptica, en la potenciación a largo plazo, o en mecanismos relacionados con el aprendizaje y la memoria (Pawlak y Strickland 2002).

A nuestro hallazgo de que el polimorfismo genético ID del tPA aumentaría el riesgo de padecer una Esclerosis Múltiple hasta en 3.4 veces, hay que añadir que hemos encontrado unos niveles plasmáticos de tPA bajos tanto en la fase de brote agudo como en el período interbrote de la enfermedad, en comparación con los controles (casos 4.24, controles 5.90;  $p=0.009$ ). Esto estaría acorde con los hallazgos en el ratón tPA  $-/-$  con encefalitis aguda experimental, en los que se ha observado un inicio más precoz, unos brotes más severos y una mayor progresión de la enfermedad. No hemos estudiado los

---

niveles de tPA en LCR, y, muy probablemente no sea representativo, por su baja casuística al sólo estudiar 7 pacientes afectados de Esclerosis Múltiple, el hallazgo de niveles altos en LCR obtenido por Akenami et al. (1996).

Si como sostenemos el polimorfismo ID del tPA incrementa el riesgo de desarrollar una Esclerosis Múltiple, cabría preguntarse si esta modificación del riesgo está mediado por la modificación de los niveles plasmáticos de tPA. Sin embargo, se conoce que no siempre los polimorfismos en el gen del tPA se asocian con modificaciones de los niveles plasmáticos, al menos en la patología cerebrovascular. Un ejemplo de ello es que el polimorfismo Alu I/D no se ha correlacionado con los niveles plasmáticos ni el la patología coronaria ni cerebrovascular, aunque sí con en el tromboembolismo venoso, pues Sartori et al. (2003), observaron que los niveles de antígeno tPA, tras efectuar una oclusión venosa, eran considerablemente más altos en los pacientes del grupo tPA que exhibían el alelo I/D que en los controles, frente a los sujetos que exhibían sólo el alelo D/D. Sin embargo, otro polimorfismo del tPA -7351C>T, sólo lo hace en la fase aguda del infarto agudo de miocardio, pero no en el ictus cerebral, aumentado tanto su secreción como en su actividad (Jood et al. 2005).

Si el aumento de riesgo no se puede explicar suficientemente mediante una correlación directa entre el polimorfismo y los niveles plasmáticos, si cabría pensar en la existencia de otros mecanismos, entre los que creemos podrían encontrarse la probable interacción gen-gen, la posible respuesta específica alélica a ciertas interleucinas y la formación de complejos tPA-PAI-1.

1.-Probable interacción gen-gen: Así, Jood K. et al. (2005) hallaron como los pacientes que presentaba la combinación polimórfica tPA CC / PAI-1 4G/4G tenían un menor riesgo de presentar un ictus isquémico. Se ha sugerido que la presencia del polimorfismo Alu I/D podría alterar la estabilidad del tPA mRNA y/o su ensamblaje. Tampoco se puede excluir que la repetición del polimorfismo Alu podría influir sobre otros locis genéticos que regulan la síntesis, almacenamiento y secreción de tPA. Por último, la expresión del tPA también está sujeta a una regulación transcripcional y post-transcripcional, donde muchos de los cis y trans-elementos aún no han sido identificados.

---

La complejidad de esta regulación aumenta si, como se ha sugerido, al menos el 10% de los genes que codifican proteínas son dianas de micro RNAs (John et al. 2004).

2.-La presencia del polimorfismo I/D del tPA, podría regular el nivel transcripcional de interleucinas, y éstas a su vez modificar la regulación del proceso inflamatorio de la Esclerosis Múltiple, modificar la expresión de moléculas de HLA de clase II, inhibir o activar células presentadoras de antígenos, la función macrofágica y la síntesis de citocinas por las células Th1.

3.-Formación de complejos tPA/PAI-1: El efecto neurotóxico del tPA por aumento de la expresión del tPA puede ser neutralizado simultáneamente por el aumento de la expresión del PAI-1 en el SNC, o por el papel de otras neuroserpinas también inhibidoras del mismo. Este hallazgo que no tiene correlación con la expresión en el compartimento intravascular. Así, la sobrerregulación del tPA por el PAI-1 y la formación de complejos tPA-PAI-1 en los tejidos desmielinizados disminuye la cantidad de enzima activa y la capacidad fibrinolítica, contribuyendo a la formación de depósitos de fibrina y al daño axonal.

¿Cual sería el mecanismo a través del cual estaría el tPA implicado en la fisiopatología de la Esclerosis Múltiple?

Un primer mecanismo, estaría mediado por la actuación del tPA sobre varios de los mecanismos implicados en la desmielinización, tanto a nivel de la barrera hematoencefálica como en la activación de receptores en neuronas y células gliales. En cuanto a la barrera hematoencefálica, hay suficientes evidencias de que el tPA actuaría mediante una actividad degradante directa de la matriz neurovascular, favoreciendo tanto el transporte endotelial a través de la barrera, como la migración leucocitaria, ó mediante una acción favorecedora de la transcripción de MMP-9. Al mismo tiempo, en condiciones inflamatorias con ruptura de barrera hematoencefálica se ha demostrado que puede también desempeñar un papel protector al remover la fibrina que exacerba el daño axonal.

Por otro lado, el tPA actuaría a través de su interacción con los receptores lipoproteínicos de baja densidad (LRP), la subunidad NR1 del receptor NMDA y con la

---

anexina II, pues mediante esa interacción exhibe múltiples funciones no relacionadas con su actividad fibrinolítica, y por tanto tendría una actuación independiente de la presencia de plasminógeno. Son funciones complejas que conducen a una modificación excesiva de la matriz con la consecuente muerte neuronal. Este hallazgo ha sido puesto de manifiesto en experimentos que muestran que la pérdida de tPA y plasminógeno confieren protección neuronal después de un daño excitotóxico (Tsirka et al. 1995) o tras un daño isquémico cerebral (Wang et al. 1998). Esta actividad podría estar complementada por la existencia de una vía intracelular por la cual el tPA actuaría sobre la activación de las cinasas (Medina et al. 2005), y también por su capacidad de actuar sobre los receptores Erk1/2, mediante la cual activaría la vía catalítica, (independientemente de su acción de activación sobre los receptores NMDA).

Un segundo mecanismo implicaría al tPA sobre varios de los mecanismos críticos en la remielinización. Sabemos que en pacientes con Esclerosis Múltiple una de las estrategias para favorecer la remielinización endógena consiste en estimular la supervivencia a largo plazo de las células precursoras de los oligodendrocitos, y en estimular su proliferación y diferenciación en oligodendrocitos remielinizantes. Este papel no debe ser extraño para el tPA puesto que se ha implicado en los mecanismos de migración y proliferación.

Así, y puesto que se ha observado que la migración neuronal se encuentra enlentecida en ratones carentes del gen tPA (Seeds et al. 1999), y que las proteasas de la matriz favorecerían la migración de las células inflamatorias, es muy probable la participación del tPA sobre la migración de las células progenitoras desde la región subependimaria (células pluripotenciales) o desde el parénquima nervioso (glía/células progenitoras de la mielina) en las lesiones desmielinizantes. Por otro lado se ha demostrado que la plasmina, resultante de la activación del plasminógeno, es un componente que sirve como factor de proliferación (Kalderón 1982).

Por último, un tercer mecanismo del tPA en la Esclerosis Múltiple, vendría dado por su acción sobre los mecanismos implicados en el efecto del tratamiento inmunomodulador (interferones) empleados en ésta enfermedad. Como sabemos el tPA pone en marcha la activación de la cascada de las cuatro clases de metaloproteinasas de la matriz: colagenasas,

---

estromelisin, metaloproteinasas de la matriz, y gelatinasas, destacando la MMP-9 o gelatinasa B y la matrilisina o MMP-7, relacionadas con las placas desmielinizantes en humanos, y con las lesiones en animales con Encefalitis Aguda Experimental. En la Esclerosis Múltiple se produce un aumento en la producción de MMP-9, relacionada a su vez con la alteración de la barrera hematoencefálica, con ruptura de la proteína básica de la mielina y con la producción de fragmentos encefalitogénicos, hallazgos que han determinado que la MMP-9 sea una posible diana terapéutica. Así, Liu et al. (2005), observaron, in vivo, la relación entre la cascada del plasminógeno y las MMPs, en especial con MMP-9/gelatinasa B. Mediante esta relación, entre otras, es por las que el interferón beta, utilizado en el tratamiento frente a la Esclerosis Múltiple, podría disminuir la actividad proteolítica y contrarrestar las citocinas. Efecto que es aún mayor sobre la proteólisis al combinar IFN- $\beta$ -1b con IFN- $\beta$ -1<sup>a</sup> (Nelissen et al. 2003).

En resumen la actuación del sistema del tPA en la Esclerosis Múltiple vendría mediada por los siguientes efectos:

1.- El tPA podría promover la desmielinización, porque la plasmina (generada por la acción del tPA sobre el plasminógeno) puede degradar directamente la proteína básica de la mielina (Cammer et al. 1978). La plasmina es la llave de activación de la cascada de las MMPs, activación que juega un importante papel en la degradación de la mielina (Cuzner and Opdenakker 1999).

2.- El tPA podría también alterar las reacciones inflamatorias en el SNC al incrementar la permeabilidad de la BHE (Paterson et al. 1987).

3.- El tPA promovería la muerte celular por excitotoxicidad, y así participaría en las etapas iniciales de la EM al contribuir al daño a los oligodendrocitos (por la vía glutamérgica) y al desarrollo de la cascada de muerte neuronal (Pitt et al. 2000).

4.- El tPA ha demostrado, in vitro, tener un efecto anti-apoptótico en relación con la caspasa-3, efecto que es independiente a su actividad enzimática (Liot et al. 2006).

5.- El tPA, por último participaría en la regeneración neuronal al reducir los depósitos locales de fibrina (Herbert et al. 1996; Akassoglou et al. 2000) o al promover la

---

migración de los progenitores oligodendrocitarios a través de la matriz extracelular (Uhm et al. 1998).

En definitiva, el tPA desempeñaría en la Esclerosis Múltiple un papel complejo y dual, nocivo y protector.

### ***2.b) Polimorfismos genéticos del inhibidor del activador tisular del plasminógeno (PAI-1).***

Existen múltiples estudios encaminados a relacionar los polimorfismos del PAI-1 y la enfermedad vascular cerebral pero escasos son los estudios con respecto a la enfermedad desmielinizante. Debemos recalcar que el PAI-1 4G/5G es un polimorfismo “funcional” interesante porque la variación en la expresión del PAI-1 es mediada alélicamente. El alelo 4G del polimorfismo del PAI-1 4G/5G carece del sitio de unión para la proteína represora transcripcional, que si lo presenta el alelo 5G. Por ello, el alelo 4G es el expresor más alto del PAI-1, y el alelo 5G es el expresor más bajo. Sujetos que son homocigóticos para el alelo 4G tienen unas concentraciones plasmáticas de PAI-1 25% mayores que los sujetos homocigóticos para el alelo 5G (Roest y Banga 2003).

Con respecto a los estudios sobre la enfermedad vascular cerebral los resultados obtenidos han sido dispares. En general se ha considerado, merced a varios estudios, que el incremento genéticamente mediado del PAI-1 protege contra el ictus. Así, Jood et al. (2005), si bien no hallaron una significación estadística entre los polimorfismo 4G/5G del PAI-1 y el ictus, si obtuvieron una relación protectora con el polimorfismo 4G/4G del PAI-1, (OR: 0.8; 95% IC:0.6 a 1.1). Resultados muy similares se obtuvieron en el estudio GENIC (Elbaz et al. 2001), en los que la protección era aún mayor cuando existía la combinación de los polimorfismos 4G/4G del PAI-1 y CC del tPA (OR: 0.7; 95% IC: 0.5 a 1.0). Otros dos estudios, algo más antiguos, también atribuían al genotipo 4G/4G un factor protector (Hoekstra et al. 2003). Sin embargo, si bien son múltiples los estudios que muestran un aumento del antígeno del PAI-1 en pacientes afectos de ictus isquémico (Lindgren et al. 1996; Carter et al. 1998; Johansson et al. 2000), en ausencia de relación con los niveles plasmáticos (Jood et al. 2005), no siempre es así (Eriksson et al. 1995; Catto et al. 1997; Matsubara et al. 1999; Hoekstra et al. 2003). Una explicación plausible que podría

---

explicar dichos hallazgos la daría el que el PAI-1, sintetizado en el SNC por parte de los astrocitos (Benchenane et al. 2004), y no en el compartimento intravascular, contrarrestaría el efecto neurotóxico del tPA.

Si estos son los hallazgos en la enfermedad cerebrovascular, en pacientes con enfermedad vascular coronaria -infarto agudo de miocardio- es al polimorfismo 4G/4G del PAI-1 al que se le atribuye un incremento del riesgo, al contrario de lo que ocurre como hemos descrito en el ictus.

Las bases para sospechar que el sistema del PAI-1 podría estar implicado en la patogénesis de la Esclerosis Múltiple las han puesto los estudios histopatológicos de Gveric D. y el genético de Luomala ML.

Gveric et al. (2001), en su estudio neuropatológico, hallaron altas concentraciones de urokinasa PA (uPA), de receptor de la urokinasa PA (uPAR) y de PAI-1 en los macrófagos perivasculares de las lesiones desmielinizantes agudas. También obtuvieron en esas lesiones elevadas cantidades de MMP-9 e inhibidor tisular de la MMP-1 (TIMP-1), tanto en la fase aguda como en la fase crónica de la enfermedad. Así mismo, en el 2003, el mismo autor, utilizando muestras de tejido cerebral de lesiones desmielinizantes agudas en sustancia blanca de pacientes con Esclerosis Múltiple y controles sanos, observaron que se presenta una menor actividad fibrinolítica en las placas desmielinizantes, al parecer en el contexto de un aumento en dichas placas de proteasas inhibitoras del plasminógeno. También, con los datos aportados mediante ELISA y Western Blot, han sugerido que en las placas de pacientes afectados de Esclerosis Múltiple existe tanto un incremento de la actividad del PAI-1 como una reducción de la actividad de la enzima tPA. Sin embargo, parece no existir una clara evidencia de degradación del tPA. El decremento encontrado del potencial fibrinolítico lo explican por la formación de complejos PAI-1/tPA, con la consiguiente menor cantidad de tPA libre. El estudio mostró, así mismo, que la inhibición del tPA se debía al PAI-1 y no a otras neuroserpinas, y que existían péptidos de la degradación de la fibrina en las lesiones. Gveric D. et al. especularon sobre un posible doble mecanismo que podría contribuir a la reducción de la actividad fibrinolítica en estos pacientes: por un lado, la interacción del tPA con fibrina unida a PAI-1, generaría la disociación del PAI-1 y la formación de complejos (Van Meijer et al. 1994), que son

rápidamente internalizados por los macrófagos; y, por otro lado, la reducción de la actividad fibrinolítica también sería mediada a través de las neuroserpinas que son co-expresadas con el tPA en las neuronas de la sustancia gris y axones, y que son reguladoras de la actividad del tPA in vivo.

Luomala M. et al. 2000, en un estudio clínico sobre polimorfismos en 104 pacientes finlandeses afectos de Esclerosis Múltiple, 59 mujeres y 45 hombres con una edad media de  $46 \pm 10$  años y  $47 \pm 10$  años respectivamente, y en 111 sujetos controles, observó la existencia de una relación entre la Esclerosis Múltiple y los polimorfismos del PAI-1.

El análisis de los resultados puso de manifiesto que el polimorfismo 5G/5G estaba presente en 32 de 104 pacientes frente a 22 de 111 sujetos sanos, y el alelo 5G en 116 de 208 pacientes frente 104 de 222 sujetos sanos. Sólo estratificó por el sexo, hallando que la mayor frecuencia de la variante polimórfica 5G/5G estaba en el sexo femenino (OR: 2.34;  $p=0.037$ ). Y correlacionó dicho hallazgo con una disminución en la transcripción de niveles basales de PAI-1. Sin embargo otro estudio (Vandenbroeck et al. 2002) no pudo reproducir dichos resultados.

En nuestra tesis, como en el estudio de Luomala et al. (2000), los niveles plasmáticos de PAI-1 fueron significativamente inferiores en el grupo de afectos de Esclerosis Múltiple. Contrastando con los resultados previos de Onodera et al. (1999) quienes, estudiando únicamente 15 pacientes con una forma remitente-recurrente, encontraron niveles elevados.

Cuando analizamos conjuntamente las variantes polimórficas y los niveles plasmáticos del PAI-1 obtuvimos que la variante 5G-5G se encontraba presente en 16 pacientes y que los niveles plasmáticos medios de PAI-1 eran de 21,63 UA/ml (DT 7,75); que el polimorfismo 4G-5G lo presentaban 55 pacientes y mostraban unos niveles medios de PAI-1 en sangre de 21,70 UA/ml (DT 14,85); y finalmente que 29 pacientes exhibían el polimorfismo 4G-4G, y la media de los niveles plasmáticos de PAI-1 era de 23,69 UA/ml(DT 15.88). Estos resultados obtuvieron significación estadística entre la variante polimórfica 4G/5G y 5G/5G y niveles plasmáticos bajos de PAI-1. Hallazgos que estarían en consonancia con el conocimiento de que el alelo 5G del polimorfismo del PAI-1 posee

---

sitio de unión para la proteína represora transcripcional, confiriéndole ser un expresor más bajo del PAI-1 que el alelo 4G. También estaría acorde con nuestro hallazgo de que los sujetos que presentan la variante polimórfica del PAI-1 G5/G5, tienen una reducción en el riesgo de presentar la enfermedad del 71% (OR: 0.29) con respecto a otros con la variante polimórfica G4/G4, ajustando para el resto de variables.

Sin embargo, en el análisis estratificado según el sexo de los niveles plasmáticos de PAI-1 y las variantes polimórficas, como realizaron en su estudio Luomala et al. 2000, no mostraron significación estadística. Tampoco, se obtuvo significación al analizar los niveles plasmáticos según la fase clínica de actividad de la enfermedad (brote clínico o control rutinario).

Debemos ser cuidadosos con la interpretación de éstos resultados pues existen al menos dos consideraciones a tener en cuenta. Por un lado, que si para la mayoría de los factores hemostáticos existe una amplia variación interindividual de sus niveles plasmáticos, la mayor variación interindividual se observa precisamente con el PAI-1, y que los polimorfismos actualmente identificados se cree que sólo condicionan un 5% de esta variación. Por otro lado, que las variaciones plasmáticas del tPA y del PAI-1 dependen de los niveles de estrógeno, del sistema de la renina-angiotensina, de los niveles de lipoproteínas de baja densidad (VLDL), del contenido de ácidos grasos insaturados, de moléculas insulina-like, y de citocinas proinflamatorias (Kohler y Grant 2000), factores dependientes que no se han estudiado en esta tesis.

En resumen la actuación del sistema del PAI-1 en la Esclerosis Múltiple vendría mediada, entre otros, por los siguientes efectos:

- 1.- Por una función protectora del PAI-1 mediante su actuación sobre los mecanismos de regulación de las MMPs. Bien actuando sobre su transcripción, sobre la activación de MMPs latentes, o sobre la activación de MMPs inhibidas por los inhibidores titulares (TIMPs), favoreciendo la inhibición de la activación de las enzimas que degradan la matriz; muy probablemente limitando la elevación de MMP-9 en dichas placas. Esta actuación del PAI-1 sobre las interleucinas podría efectuarse de una manera específicamente alélica (Dawson et al. 1993).

2.- Mediante su actuación sobre los macrófagos, pues la inactivación genética del tPA-PAI-1 impide la migración de los mismos (Cao C et al. 2006).

3.- También mediante la interacción entre el PAI-1 y la proteína p53, pues el promotor PAI-1 presenta en la región -160 a -139 una unión para la p53, sitio identificado como responsable de la estimulación de la transcripción del PAI-1. El análisis in situ de las lesiones desmielinizantes revela un aumento de la expresión de p53 en los oligodendrocitos de las lesiones, y con ello, su relación con la apoptosis y la muerte celular.

4.- Por último, un cuarto mecanismo del PAI-1 en la Esclerosis Múltiple, vendría dado por su acción sobre los mecanismos implicados en el efecto del tratamiento esteroideo empleado en ésta enfermedad. Por una parte, porque los efectos de la dexametasona sobre el nivel de mRNA PAI-1 pueden ser explicados, al menos parcialmente, por un incremento de la transcripción del gen PAI-1 (Riccio et al. 1988) y, por otra, porque los glucocorticoides aumentan la síntesis del PAI-1 in vitro (**Tabla 3**).

### ***3.- Discusión sobre la homocisteína.***

Es conocida la relación que tiene la homocisteína con los factores de la coagulación y con el metabolismo celular de los componentes de la pared vascular, ya que altera la función de células endoteliales por la expresión de factores tisulares y factor V, o por la reducción en la producción de proteína C activada, en la actividad de la trombomodulina, el factor de von Willebrand, la anti-trombina III y la unión al factor tisular del plasminógeno. Además la homocisteína incrementa la afinidad de la Apolipoproteína (a) por la fibrina y, en las células musculares lisas, tiene un efecto positivo sobre la transcripción del gen de la ciclina A, estimulando la proliferación de las células musculares que a su vez es antesala del mecanismo arterioesclerótico. Los niveles plasmáticos elevados de homocisteína son el resultado de la pobre reconversión de la metionina, donante del grupo metil que interviene en múltiples procesos bioquímicos.

Menos conocida es la relación entre la homocisteína y otras enfermedades neurológicas, si bien, existen algunos indicios que la han relacionado con la patogénesis de

---

enfermedades neurodegenerativas como la enfermedad de Alzheimer y del inicio y progresión de la enfermedad de Parkinson. También se ha sugerido que la combinación de niveles altos de homocisteína y el fallo en el sistema fibrinolítico son un potencial factor de riesgo cardiovascular y del ictus cerebral. En la Esclerosis Múltiple la hipometilación de la proteína básica de la mielina hace inestable a dicha proteína y favorece su degeneración.

En nuestro estudio los niveles plasmáticos de homocisteína en los sujetos afectados de Esclerosis Múltiple fueron mayores que los obtenidos en el grupo control. Valores muy similares han sido obtenidos previamente en otros estudios (Vrethem et al. 2003, Ramsaransing et al. 2006). Cabría preguntarse cuál puede ser el significado de este hallazgo en la Esclerosis Múltiple y su relación con el sistema fibrinolítico. Estudios previos (Midorikawa et al. 2000) han mostrado que la homocisteína induce la modulación del tPA, uniéndose a su receptor de membrana celular sin aumentar su concentración. Este hallazgo difiere del aumento en la expresión del gen del PAI-1 y de la secreción vascular del mismo, que sí se encuentran aumentadas.

En nuestros pacientes también encontramos que los niveles de homocisteína eran aún más altos en los sujetos afectados de Esclerosis Múltiple portadores tanto del polimorfismo 4G/5G para el PAI-1 ( $p < 0.024$ , OR 1.21) como del polimorfismo D/D del tPA ( $p < 0.001$ ), por lo que una posible interacción gen-gen podría influir sobre locis genéticos que regularían la síntesis, almacenamiento y secreción de homocisteína.

Sin embargo, Ramsaransing et al. (2006), no encontraron relación entre estos niveles plasmáticos elevados de homocisteína y el stress oxidativo, ni con los niveles de citocinas proinflamatorias (de IL-12 y TNF- $\alpha$ ) relacionadas con la actividad inmune de la Esclerosis Múltiple. Con lo que sí parece existir una relación es con la actividad de los astrocitos, pues la homocisteína está producida y secretada por estas células en el Sistema Nervioso Central. En la Esclerosis Múltiple se reconoce una sobreactivación astrocitaria que favorece la ruptura de la barrera hematoencefálica, lo que también explicaría el aumento de la proteína astrogial S100B en el suero de estos enfermos. Carecemos aún de una explicación fiable de porqué la homocisteína plasmática está elevada, aunque

---

Ramsaransing et al. (2006) sugieren que la homocisteína astrocitaria pudiera contribuir a la elevación de la homocisteína plasmáticas en éstos sujetos.

En nuestro estudio la media de los niveles plasmáticos de homocisteína fue de 12.25  $\mu\text{mol/l}$  en los pacientes con Esclerosis Múltiple frente a 10.75  $\mu\text{mol/l}$  en el grupo control, habiendo excluido que dicho incremento estuviera relacionado ni con la edad, a diferencia de los hallazgos encontrados por Nygard et al. 1995, ni con el sexo, más altos en el hombre que las mujeres en el estudio de Boushey et al. 1995, ni con la severidad y progresión de la enfermedad.

Cuando quisimos estudiar la posible relación entre el sistema del plasminógeno y la homocisteína, obtuvimos que en el análisis de los polimorfismos del PAI-1 y tPA y la homocisteína existía una relación significativa entre los niveles plasmáticos más elevados de homocisteína y el polimorfismo 4G/5G del PAI-1, así como con el polimorfismo D/D del t-PA. Este hallazgo, junto a la existencia de niveles más bajos de PAI-1 en estos sujetos, nos hace pensar en la implicación de ambos en la producción de un mayor daño a la barrera hematoencefálica, en el incremento de la excitotoxicidad, en la mayor unión a los receptores NMDA y en el incremento en la homocisteinilación de las proteínas, modificando con ello su función y confiriéndoles actividad autoinmunogénica.

Este hallazgo, relevante en esta tesis, no podemos confrontarlo con la literatura debido a la ausencia de trabajos en esta línea.

#### ***4.- Discusión sobre otros factores de la coagulación.***

##### ***4.a) Antitrombina III.***

Ya en 1991 Deschepper et al., evidenciaron en cultivos cerebrales y astrogliales la presencia de antitrombina III, proponiéndole un papel modulador del crecimiento y diferenciación celular cerebral.

Kirichuk y Streknev (2003), estudiando 42 pacientes con Esclerosis Múltiple remitente-recurrente, y 17 pacientes con forma secundariamente progresivas, observaron

que niveles normales de antitrombina III y plasminógeno eran marcadores de las formas benignas de Esclerosis Múltiple y que la evolución de la Esclerosis Múltiple era moderada cuando la actividad de la antitrombina III era alta. Este hallazgo les sugería un posible efecto neuroprotector de la antitrombina III que era independiente a su efecto en la anticoagulación. Por otro lado no observaron cambios significativos en la actividad del anticoagulante lúpico, el factor V activado y la resistencia a la proteína C activada.

En nuestro estudio los niveles medios de antitrombina III fueron por el contrario discretamente menores en el grupo de los sujetos afectados de Esclerosis Múltiple frente al grupo control, pero no estadísticamente significativos. Aunque en la literatura se ha relacionado a la antitrombina III más que con el riesgo, con el tipo de progresión de la enfermedad, en esta tesis no pudimos establecer dicha relación pues nuestra muestra fundamentalmente estaba compuesta de enfermos de la forma clínica remitente-recurrente.

#### ***4.b) Proteína C.***

La proteína C juega un papel fundamental en la fisiopatología del daño endotelial al bloquear las reacciones inflamatorias y el daño secundario tras la liberación de péptidos inflamatorios durante la coagulación, fibrinólisis y activación del complemento. La proteína C es activada cuando la trombina se une a la trombomodulina en el endotelio vascular y actúa sobre los receptores endoteliales de la proteína C localizados en el endotelio vascular. La proteína C activada es un potente anticoagulante del plasma humano al inhibir la actividad de los cofactores V y VIII activados, reduce la producción de IL-1, IL-6 y TNF- $\alpha$  por los monocitos y tiene propiedades profibrinolíticas al inactivar al PAI-1. También bloquea la apoptosis mediada por la vía de la p53-caspasa en el endotelio cerebral humano isquémico comportándose como un neuroprotector, independientemente de su actividad anticoagulante (Cheng T et al. 2006). La proteína C activada puede prevenir la apoptosis mediada por receptores NMDA y la anoikisis mediada por MMPs, en neuronas y células endoteliales. También altera el flujo de calcio citosólico del endotelio cerebral (Dömötör et al. 2003) y ejerce una actividad directa vascular y neuroprotectora actuando sobre los receptores PAR-1 e inhibiendo la transformación hemorrágica inducida por el tPA (Cheng et al. 2006).

Kirichuk y Streknev (2003) estudiando 57 pacientes con Esclerosis Múltiple encontraron niveles bajos de proteína C activada sin relación con la actividad del anticoagulante lúpico ni la resistencia del factor V a la proteína C. En nuestro estudio, en donde sólo estudiamos la Proteína C, y no la Proteína C activada, los niveles plasmáticos eran significativamente más elevados en el grupo afecto de Esclerosis Múltiple, lo cual tendría un efecto profibrinolítico al inactivar al PAI-1, y como hemos ya mencionado, favoreciendo la presencia de tPA, podría promover la desmielinización y también alterar las reacciones inflamatorias en el SNC al incrementar la permeabilidad de la BHE. Por último, si en nuestros pacientes los niveles de Proteína C los encontramos aumentados, y los de trombosmodulina disminuidos, es muy probable que también estén alterados los niveles de Proteína C activada. Aunque, como hemos reseñado, no fueron determinados en ésta tesis.

#### ***4.c) Proteína S.***

La proteína S, expresada por el gen PROS localizado cerca del centrómero del cromosoma 3 (región 3q11.2), bloquea la formación de trombina al inhibir la actividad de los factores Xa/Va y actuar como un cofactor de la proteína C activada en la inactivación proteolítica del factor Va y VIIIa. La expresión de proteína S en neuronas (Stitt et al. 1995), células osteoides y células linfocitarias sugiere una función más allá de la actividad anticoagulante. Varios autores (Hancock et al. 1992; Grey et al. 1994) han sugerido que la proteína S suprime la producción de factor de necrosis tumoral  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) por los monocitos y que es inducible por la IL-4 pudiendo así regular la respuesta inmunológica celular (Smiley et al. 2001).

Liu et al. (2003), demostraron en modelo animal de ratón con isquemia cerebral que la proteína S tenía efectos neuroprotectores, antitrombóticos y antiinflamatorios; y un efecto protector neuronal directo en cultivos neuronales corticales in vivo e in vitro. En este modelo, la proteína S, redujo significativamente el déficit neurológico motor, el volumen del infarto y del edema. Los mismos autores demostraron una reducción en los depósitos de fibrina así como una reducción en la infiltración leucocitaria del tejido cerebral en relación con la proteína S. La proteína S también podría tener un efecto antiapoptótico, lo cual limitaría el desarrollo de la inflamación y la enfermedad autoinmune, vía un mecanismo

---

que podría involucrar a la proteína S unida al receptor C4b, pues aproximadamente el 60% de la proteína S del plasma circula unida a la proteína C4b, y este complejo actuaría como puente entre la coagulación y la inflamación en base a su capacidad de regular la activación del complemento. La unión a la proteína S estimula la fagocitosis sugiriendo que los macrófagos expresan receptores específicos para la proteína S. La proteína S pudiera favorecer la opsonización de las células apoptóticas para la fagocitosis mediada por Mer, un miembro de la familia de receptores tirosin-quinasa Axl/Mer/Tyro3 (Ishimoto et al. 2000). En todo caso el papel de estos receptores es controvertido y el receptor neuronal de proteína S es aún desconocido. También se ha descrito que la deficiencia de proteína S podría provocar una respuesta hiperinflamatoria (Kasuno et al. 1997).

En nuestro estudio en los afectos de Esclerosis Múltiple encontramos niveles de proteína S inferiores a los hallados en el grupo control, pero el valor no fue estadísticamente significativo.

#### ***4.d) Trombomodulina.***

La trombomodulina es una glicoproteína de la membrana de la célula endotelial que actúa como receptor de superficie celular para la trombina, y que al unirse con ella convierte su forma procoagulante en anticoagulante. La trombomodulina, aunque inicialmente se identificó como un cofactor de las células endoteliales, posteriormente se ha documentado su presencia en las células sinoviales, en astrocitos, en células meníngeas, en las células del músculo liso, en macrófagos y en plaquetas (Soff et al. 1991). Adicionalmente, se le ha atribuido una actividad antifibrinolítica interfiriendo en la generación de plasmina (De Munk et al. 1991).

Su presencia en células vasculares y no vasculares no sólo se encuentra en sujetos adultos, sino que también esta presente en la fase embrionaria (Isermann et al. 1996).

La trombomodulina es detectable en plasma y suero tras producirse un daño endotelial, como se muestra en diversas patologías tales como el lupus eritematoso, la artritis reumatoide y la Esclerosis Múltiple. Así, cabe destacar que se han encontrado niveles altos en el 7.1% de los pacientes con lupus eritematoso y con afectación cerebral del

---

tipo de la vasculitis y con lesión parenquimatosa cerebral (Witte et al. 1999). Lo mismo ocurre en las distintas formas evolutivas de Esclerosis Múltiple, donde existen estudios que independientemente de la situación evolutiva del paciente revelan un aumento en los niveles plasmáticos de trombomodulina. Así, esto se ha puesto de manifiesto en pacientes con Esclerosis Múltiple en brotes agudos y en las formas crónicas progresivas (Tsukada et al. 1995); sólo en brotes agudos (Califano et al. 2000); y en formas progresivas (Frigerio S et al. 1998). En contraposición, ni Kohriyama et al. (1997), estudiando 26 pacientes con Esclerosis Múltiple recurrente-recidivante, ni en nuestra tesis, con un número muy superior de pacientes, los hallazgos anteriores fueron reproducidos. En nuestra casuística de 100 pacientes, los niveles plasmáticos de trombomodulina fueron significativamente menores que en los controles. Este resultado no nos extraña pues debemos recordar que la trombomodulina funciona como una molécula anti-inflamatoria a varios niveles. Como cofactor crítico en la activación de la proteína C, la trombomodulina tiene un papel obligado en la regulación de las propiedades anti-inflamatorias de la proteína C activada. También, su dominio lecitín-like tipo C, puede jugar un papel directo en la modulación de la inflamación, ya que estudios recientes han sugerido que ese dominio de la trombomodulina es importante para el mantenimiento de la integridad de las interacciones célula-célula, y en la trans migración leucocitaria (Huang et al. 2003; van de Wouwer et al. 2004).

Actualmente carecemos de conocimientos que nos pudieran clarificar que factores genéticos alterando o incrementando el riesgo de padecer Esclerosis Múltiple, modifican la expresión y función de estas proteínas involucradas en el complejo sistema de la coagulación-inflamación.

# *CONCLUSIONES*

- 1.- Existe una asociación estrecha entre la variante polimórfica de repetición Alu inserción/delección del gen del activador tisular del plasminógeno y la Esclerosis Múltiple, de modo que la presencia de dicho polimorfismo genético aumenta en nuestra población el riesgo de padecer una Esclerosis Múltiple. Así mismo, los niveles plasmáticos del activador tisular del plasminógeno mostraron una tendencia significativa a estar más disminuidos en los pacientes con Esclerosis Múltiple que en el grupo control.
- 2.- En nuestro estudio, la presencia de la variante polimórfica del inhibidor del activador del plasminógeno 5G/5G, se asoció con una reducción en el riesgo de presentar la enfermedad. Los pacientes presentaban niveles plasmáticos bajos del inhibidor del activador del plasminógeno, que eran especialmente significativos, en las variantes polimórficas G4/G5 y G5/G5.
- 3.- No hallamos correlación entre el grado de discapacidad funcional, medida mediante la escala EDSS, y las diferentes variantes polimórficas del PAI-1 y del tPA. Tampoco encontramos relación entre las diferentes variantes polimórficas estudiadas del PAI-1 y tPA, sus niveles plasmáticos y el desarrollo de un brote agudo de Esclerosis Múltiple.
- 4.- Los niveles plasmáticos de homocisteína en los sujetos afectados de Esclerosis Múltiple se encontraban elevados, y se correlacionaban, en nuestra población, con un mayor riesgo de padecer una Esclerosis Múltiple. Los niveles de homocisteína más elevados pertenecían a los sujetos afectados de Esclerosis Múltiple con los polimorfismos 4G/5G para el PAI-1 y D/D del tPA.

- 5.- En la Esclerosis Múltiple encontramos niveles plasmáticos elevados de Proteína C y bajos de trombomodulina, indicándonos una descoordinación en un sistema biológico con implicaciones en la modulación de la inflamación.
- 6.- No encontramos relación entre los niveles plasmáticos de Proteína S y Antitrombina III y el riesgo de padecer una Esclerosis Múltiple.

# *BIBLIOGRAFÍA*

Abbott N.J. Astrocyte-endothelial interactions and blood-brain barrier permeability. *J Anat.* 2002;200:629–638.

Ackermann HP, Ulrich J, Heitz PU. Experimental allergic encephalomyelitis. Exudate and cellular infiltrates in the spinal cord of Lewis rats. *Acta Neuropathol.* 1981; 54:49-152.

Adams RA, Passino M, Sachs BD, Nuriel T, Akassoglou K. Fibrin mechanisms and functions in nervous system pathology. *Mol Interv.* 2004; 4:163-76.

Akassoglou K, Kombrinck KW, Degen JL, Strickland S. Tissue plasminogen activator-mediated fibrinolysis protects against axonal degeneration and demyelination after sciatic nerve injury. *J Cell Biol* 2000; 149:1157-1166.

Akassoglou K, Strickland S. Nervous system pathology: the fibrin perspective. *Biol Chem* 2002;383:37-45.

Akassoglou K, Yu W-M, Akpinar P, Strickland S. Fibrin inhibits peripheral nerve regeneration by arresting Schwann cell differentiation. *Neuron* 2002; 33:861–875

Akassoglou K, Akpinar P, Murray S, Strickland S. Fibrin is a regulator of Schwann cell migration after sciatic nerve injury in mice. *Neurosci. Lett.* 2003; 338:185–188.

Akenami FO, Siren V, Koskiniemi M, Siimes MA, Teravainen H, Vaheri A. Cerebrospinal fluid activity of tissue plasminogen activator in patients with neurological diseases. *J Clin Pathol* 1996; 49:577-580.

Akenami FO, Koskiniemi M, Farkkila M, Vaheri A. Cerebrospinal fluid plasminogen activator inhibitor-1 in patients with neurological disease. *J Clin Pathol* 1997, 50:157-160.

Aladro Y, Alemany MJ, Pérez Vieitez et al. Prevalence and incidence of multiple sclerosis in Las Palmas, Canary Islands, Spain. *Neuroepidemiology* 2005; 24:70-75.

Altieri DC, Bader R, Mannucci PM. Oligospecificity of the cellular adhesion receptor Mac 1 encompasses an inducible recognition specificity for fibrinogen. *J. Cell. Biol* 1988; 107:1893-1900.

Altieri DC, Duperray A, Plescia J. Structural recognition of a novel fibrinogen gamma chain sequence (117-133) by intracellular adhesion molecule-1 mediates leukocyte-endothelium interaction. *J. Biol Chem.* 1995; 270:696-699

Anton ES, Sandrock AW, Matthew WD. Merosin promotes neurite growth and Schwann cell migration in vitro and nerve regeneration in vivo: Evidence using an antibody to merosin, ARM- 1. *Dev. Biol.* 1994; 164:133–146.

Antony JM, van Marle G, Opii W, Butterfield DA, Mallet F, Yong VW, Wallace JL, Deacon RM, Warren K, Power C. Human endogenous retrovirus glycoprotein-mediated induction of redox reactants causes oligodendrocyte death and demyelination. *Nat Neurosci*. 2004; 7:1088–1095.

Ascheron RA. The catastrophic antiphospholipid syndrom. *J. Rheum* 1992; 19:508.

Austin H, Chimowitz MI, Hill HA, Chaturvedi S, Wechsler LR, Wityk RJ, Walz E, Wilterdink JL, Coull B, Sila CA, et al. Cryptogenic stroke in relation to genetic variation in clotting factors and other genetic polymorphisms among young men and women. *Stroke*. 2002; 33:2762–2768.

Bailey CH, Kandel ER. Structural changes accompanying memory storage. *Annu Rev Physiol* 1993; 55:397-426.

Baker GR, Levin J. Transient thrombocytopenia produced by administration of macrophage colony-stimulating factor investigations of the mechanism *Blood* 1998; 89-91.

Baranes D, Lederfein D, Huang YY, Chen M, Bailey CH, Kandel ER. Tissue plasminogen activator contributes to the late phase of LTP and to synaptic growth in the hippocampal mossy fiber pathway. *Neuron* 1998; 21:813-25.

Baranzini SE, Elfstrom C, Chang SY, Butunoi C, Murray R, Higuchi R, Oksenberg JR. Transcriptional analysis of multiple sclerosis brain lesions reveals a complex pattern of cytokine expression. *J Immunol*. 2000; 165:6576-82.

Barcellos LF, Thomson E, Carrington M, Schafer J, Begovich AB, Lin P, Marti D, Klitz W. Chromosome 19 single-locus and multilocus haplotype associations with multiple sclerosis. Evidence of a new susceptibility locus in caucasian and chinese patients. *JAMA* 1997; 278:1256-61.

Barcellos LF, Schito Am, Rimmler JB, Vittinghoff S, Shih A, Lincoln R, Callier S, Goodkin DE, Haines JL, Pericak-Vance Ma, Hauser SL, Oksenberg JR. CC-chemokine receptor 5 polymorphism and age of onset in familial multiple sclerosis. *Multiple sclerosis Genetics Group. Immunogenetics* 2000; 51:281-8.

Barkhof F. Imaging of remyelination. *Mult Scler*. 1997;3:129-32.

Barkhof F, Filippi M, van Waesberghe JH, Molyneux P, Rovaris M, Lycklama a Nijeholt G, Tubridy N, Miller DH, Yousry TA, Radue EW, Ader HJ. Improving interobserver variation in reporting gadolinium-enhanced MRI lesions in multiple sclerosis. *Neurology*. 1997; 49:1682-8.

Basham M, Seeds NW. Plasminogen expression in the neonatal and adult mouse brain. *J. Neurochem*. 2001; 77:318 – 325.

- Beall SS, Concannon P, Charmley P, McFarland HF, Gatti RA, Hood LE, Biddison WE. The germline repertoire of T cell receptor beta-chain genes in patients with chronic progressive multiple sclerosis. *J. Neuroimmunol* 1989; 21:59-66.
- Beall SS, Biddison WE, McFarlin DE, McFarland HF, Hood LE. Susceptibility for multiple sclerosis is determined, in part, by inheritance of a 175-kb region of the TcR V beta chain locus and HLA class II genes. *J Neuroimmunol* 1993; 45:53-60.
- Belorgey D, Sharp LK, Crowther DC, Onda M, Johansson J, Lomas DA. Neuroserpin Portland (Ser52Arg) is trapped as an inactive intermediate that rapidly forms polymers: implications for the epilepsy seen in the dementia FENIB. *Eur J Biochem* 2004; 271:3360–3367.
- Benchenane K, Lopez-Atalaya JP, Fernandez-Monreal M, Touzani O, Vivien D. Equivocal roles of tissue-type plasminogen activator in stroke-induced injury. *Trends Neurosci.* 2004; 27:155-60.
- Bennetts BH, Teutsh SM, Buhler MM, Heard RN, Stewart GJ. The CCR5 deletion mutation fails to protect against multiple sclerosis. *Hum Immunol* 1997; 58:52-9.
- Benveniste E. Role of macrophages/microglia in multiple sclerosis and experimental allergic encephalomyelitis. *J Mol Med* 1997; 75:165-173.
- Benz B, Grima G, Do K. Q. Glutamate-induced homocysteic acid release from astrocytes: possible implication in glia-neuron signaling. *Neuroscience* 2004; 124:377-386.
- Bermingham, J. R., Jr., Shumas, S., Whisenhunt, T., Rosenfeld, M. G., and Scherer, S. S. Modification of representational difference analysis applied to the isolation of forskolinregulated genes from Schwann cells. *J. Neurosci. Res.* 2001; 63:516 – 524.
- Berzin TM, Zipser BD, Rafii MS, Kuo-Leblanc V, Yancopoulos GD, Glass DJ, Fallon JR, Stopa E.G. Agrin and microvascular damage in Alzheimer's disease. *Neurobiol.* 2000; 21:349–355
- Bick RL, Ucar K. Hypercoagulability and thrombosis. *Hematol Oncol Clin North Am.* 1992; 6:1421-31.
- Bick RL. Platelet function defects: a clinical review. *Semin Thromb Haemost* 1992; 18:167.
- Bignami A, Cella G, Chi NH. Plasminogen activators in rat neural tissues during development and in Wallerian degeneration. *Acta Neuropathol* 1982; 58:224-8.

Bjartmar C, Trapp B Axonal and neuronal degeneration in multiple sclerosis: mechanisms and functional consequences. *Curr Opin Neurol* 2001;14:271-278.

Black JE, Isaacs KR, Anderson BJ, Alcantara AA, Greenough WT. Learning causes synaptogenesis, whereas motor activity causes angiogenesis, in cerebellar cortex of adult rats. *Proc Natl Acad Sci*. 1990;87:5568-5572.

Blasi F, Carmeliet P. uPAR: a versatile signalling orchestrator. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2002; 3:932-43.

Blaschuk KL, Frost EE, affrench-Constant C. The regulation of proliferation and differentiation in oligodendrocyte progenitor cells by alphaV integrins. *Development* 2000; 27:1961 – 1969.

Boekholdt SM, Bijsterveld NR, Moons AH, Levi M, Buller HR, Peters RJ. Genetic variation in coagulation and fibrinolytic proteins and their relation with acute myocardial infarction: a systematic review. *Circulation* 2001; 104:3063-3068.

Boucher P, Gotthardt M, Li WP, Anderson RG, Herz J. LRP: role in vascular wall integrity and protection from atherosclerosis. *Science*. 2003; 300:329-332.

Boushey CJ, Beresford SA, Omenn GS, Motulsky AG. A quantitative assessment of plasma homocysteine as a risk factor for vascular disease. Probable benefits of increasing folic acid intakes. *JAMA*. 1995; 274:1049-57.

Boylan KB, Takahashi N, Paty DW, Sadovnick AD, Diamond M, Hood LE, Prusiner SB. DNA length polymorphism 5' to the myelin basic protein gene is associated with multiple sclerosis. *Ann Neurol*. 1990; 27(3):291-7.

Brownstein C, Deora AB, Jacovina AI, Weintraub R, Gertler M, Khan KMF, Falcone DJ, Hajjar KA. Annexin II mediates plasminogen-dependent matrix invasion by human monocytes: enhanced expression by macrophages. *Blood* 2004; 103:317-324.

Bu G, Williams S, Strickland DK, Schwartz AL. Low density lipoprotein receptor-related protein/alpha 2-macroglobulin receptor is an hepatic receptor for tissue-type plasminogen activator. *Proc. Natl. Acad. Sci*. 1992; 15:7427-7431.

Bu GJ, Rennke S: Receptor-associated protein is a folding chaperone for low density lipoprotein receptor-related protein. *J Biol Chem* 1996; 271: 22218-22224.

Buhler MM, Bennetts BH, Heard RN, Stewart GJ. T cell receptor beta chain genotyping in Australian relapsing-remitting multiple sclerosis patients. *Mult Scler*. 2000; 6:140-7.

Cacquevel, Fabienne Dulin, Jean-Pierre Le Caer, Jean Rossier, Anne-Charlotte Jarrige Eric T. MacKenz, Nathalie Colloc'h, Carine Ali, and Denis Vivien Signaling *J. Biol. Chem*. 2004; 279:50850-50856.

Calabresi PA, Tranquill LR, McFarland HF, Cowan EP. Cytokine gene expression in cells derived from CSF of multiple sclerosis patients. *J Neuroimmunol* 1998; 89:198-205.

Calabresi P, Gubellini P, Centonze D, Picconi B, Bernardi G, Chergui K, Svenningsson P, Fienberg AA, Greengard P. Dopamine and cAMP-regulated phosphoprotein 32 kDa controls both striatal long-term depression and long-term potentiation, opposing forms of synaptic plasticity. *J Neurosci* 2000; 20:8443-51

Calabresi P, Napolitano M, Centonze D, Marfia GA, Gubellini P, Teule MA, Berretta N, Bernardi G, Frati L, Tolu M, Gulino A. Tissue plasminogen activator controls multiple sclerosis forms of synaptic plasticity and memory. *Eur J. Neuroscie* 2000; 12:1002-1012.

Califano F, Giovanniello T, Pantone P, Campana E, Parlapiano C, Alegiani F, Vincentelli GM, Turchetti P. Clinical importance of thrombomodulin serum levels. *Eur Rev Med Pharmacol Sci.* 2000; 4:59-66.

Cammer W, Bloom BR, Norton WT, Gordon S. Degradation of basic protein in myelin by neutral proteases secreted by stimulated macrophages: a possible mechanism of inflammatory demyelination. *Proc Natl Acad Sci.*1978; 75:1554-8

Campbell P.G, Durham S.K, Hayes J.D, Suwanichkul A, Powell D.R. Insulin-like growth factor-binding protein-3 binds fibrinogen and fibrin. *J. Biol. Chem.* 1999; 274: 30215–30221

Cao C, Lawrence DA, Li Y, Von Arnim CA, Herz J, Su EJ, Makarova A, Hyman BT, Strickland DK, Zhang L. Endocytic receptor LRP together with tPA and PAI-1 coordinates Mac-1-dependent macrophage migration. *EMBO J.* 2006;25:1860-70.

Carmeliet P, Schoonjans L, Kieckens L, Ream B, Degen J, Bronson R, De Vos R, van den Oord J, Collen D, Mulligan R. Physiological consequences of loss of plasminogen activator gene function in mice. *Nature* 1994; 368:419-424.

Carter AM, Catto AJ, Grant PJ. Determinants of tPA antigen and associations with coronary artery disease and acute cerebrovascular disease. *Thromb Haemost.* 1998; 80:632–636.

Catto AJ, Carter AM, Stickland M, Bamford JM, Davies JA, Grant PJ. Plasminogen activator inhibitor-1 (PAI-1) 4G/5G promoter polymorphism and levels in subjects with cerebrovascular disease. *Thromb Haemost.* 1997; 77:730-4.

Cesarman GM, Guevara CA, Hajjar KA: An endothelial cell receptor for plasminogen tissue plasminogen activator (t-PA). 2. Annexin II-mediated enhancement of t-PA-dependent plasminogen activation. *J Biol Chem* 1994; 269: 21198-21203.

Cha-Ok B, Hyung-Kook P, Moo-Young A, Hyun-Kil S, Kyu-Yoon H, Sae-Yong H. 4G/5G polymorphism of plasminogen activator inhibitor gene and insertion/deletion polymorphism of the tissue-type plasminogen activator gene in atherothrombotic stroke. *Cerebrovasc Dis* 2001; 11:294-299.

Chataway J, Sawcer S, Faekes R, Coraddu F, Broadley S, Jones HB, Goodfellow PN, Compston A. A screen of candidates from peaks of linkage: evidence for the involvement of myeloperoxidase in multiple sclerosis. *J Neuroimmunol* 1999; 98:208-13.

Chen ZL, Yoshida S, Kato K, Momota Y, Suzuki J, Tanaka T, Ito J, Nishino H, Aimoto S, Kiyama H. Expression and activity-dependent changes of a novel limbic serine protease gene in the hippocampus. *J. Neurosci.* 1995; 15:5088 – 5097.

Chen ZL, Strickland S. Neuronal death in the hippocampus is promoted by plasmin-catalyzed degradation of laminin. *Cell* 1997; 91:917– 925.

Chen ZL, Strickland S. Laminin g1 is critical for Schwann cell differentiation, axon myelination, and regeneration in the peripheral nerve. *J. Cell Biol.* 2003;63:889–899.

Cheng HL, Steinway ML, Russell JW, Feldman EL. GTPases and phosphatidylinositol 3-kinase are critical for insulin-like growth factor-I-mediated Schwann cell motility. *J. Biol. Chem.* 2000; 275:27197 – 27204.

Cheng T, Petraglia AL, Li Z, Thiyagarajan M, Zhong Z, Wu Z, Liu D, Maggirwar SB, Deane R, Fernandez JA, LaRue B, Griffin JH, Chopp M, Zlokovic BV. Activated protein C inhibits tissue plasminogen activator-induced brain hemorrhage. *Nat Med.* 2006; 12:1278-85.

Chernousov MA, Carey DJ. Schwann cell extracellular matrix molecules and their receptors. *Histol. Histopathol.* 2000; 15:593–601.

Choi KS, Fitzpatrick SL, Filipenko NR, Fogg DK, Kassam G, Magliocco AM, Waisman DM: Regulation of plasmin-dependent fibrin clot lysis by annexin II heterotetramer. *J Biol Chem* 2001; 276:25212-25221.

Claudio L, Raine CS, Brosnan CF. Evidence of persistent blood-brain barrier abnormalities in chronic- progressive multiple sclerosis. *Acta Neuropathol.* 1995; 90: 228-238.

Collen D. The plasminogen (fibrinolytic) system. *Thromb Haemost* 1999; 82:259-170.

Compston DAS, Coles AJ. Multiple sclerosis. *Lancet* 2002 ;359.1221-1231.

Compston A. Revisiting The pathogenesis of multiple sclerosis revisited. *The international MS Journal* 2003; 10:29-31.

Compston A, Confavreux C. The distribution of multiple sclerosis. *McAlpine's Multiple Sclerosis*. London, Churchill Livingstone 2006:71-112.

Compston A, Hartmut W. The genetic of multiple sclerosis. *McAlpine's Multiple Sclerosis*. London, Churchill Livingstone 2006:113-182.

Cannella B, Aquino DA, Raine CS. MHC II expression in the CNS after long-term demyelination. *J Neuropathol Exp Neurol*. 1995; 54:521-30.

Confavreux C, Vukusic S. Natural history of multiple sclerosis: implications for counselling and therapy. *Curr Opin Neurol*. 2002; 15:257-66.

Confavreux C, Vukusic S, Adeleine P. Early clinical predictors and progression of irreversible disability in multiple sclerosis: an amnesic process. *Brain* 2003; 126:770-782.

Confavreux C, Vukusic S. Natural course of multiple sclerosis: a unifying concept. *Curr Opin Neurol* 2005; 15: 289-95.

Confavreux C, Compston A. The natural history of multiple sclerosis. *McAlpine's Multiple Sclerosis*. London Churchill Livingstone 2006: 183-269.

Coppin H, Ribouchon MT, Bausero P, Pessac B, Fontaine B, Clanet M, Roth MP. No evidence for transmission disequilibrium between a new marker at the myelin basic protein locus and multiple sclerosis in French patients. *Genes Immun* 2000; 1:478-82.

Csako G, Suba EA. Endotoxin-induced platelet activation in human whole blood in vitro. *Thromb Haemost* 1988; 59:378.

Cuzner ML, Gveric D, Strand C, Loughlin AJ, Paemen L, Opdenakker G, Newcombe J. The expression of tissue-type plasminogen activator, matrix metalloproteases and endogenous inhibitors in the central nervous system in multiple sclerosis: comparison of stages in lesion evolution. *J Neuropathol Exp Neurol* 1996; 55:1194-1204.

Cuzner ML, Opdenakker G. Plasminogen activators and matrix metalloproteases, mediators of extracellular proteolysis in inflammatory demyelination of the central nervous system. *J Neuroimmunol* 1999; 94:1-14.

Davis RL, Holohan PD, Shrimpton AE, Tatum AH, Daucher J, Collins GH, Todd R, Bradshaw C, Kent P, Feiglin D, Rosenbaum A, Yerby MS, Shaw C-M, Lacbawan F, Lawrence DA: Familial encephalopathy with neuroserpin inclusion bodies. *Am J Pathol* 1999; 155:1901-1913.

Davis RL, Shrimpton AE, Holohan PD, Bradshaw C, Feiglin D, Collins GH, Sonderegger P, Kinter J, Becker LM, Lacbawan F, Krasnewich D, Muenke M, Lawrence DA, Yerby MS, Shaw C-M, Goptu B, Elliott PR, Finch JT, Carrell RW, Lomas DA.

Familial dementia caused by polymerization of mutant neuroserpin. *Nature* 1999; 401: 376-379.

Davis GE, Pintar Allen KA, Salazar R, Maxwell SA. Matrix metalloproteinase-1 and -9 activation by plasmin regulates a novel endothelial cell-mediated mechanism of collagen gel contraction and capillary tube regression in three-dimensional collagen matrices. *J. Cell Sci.* 2001; 114:917-930.

Dawson SJ, Wiman B, Hamsten A, Green F, Humphries S, Henney AM. The two allele sequences of a common polymorphism in the promoter of the plasminogen activator inhibitor-1 (PAI-1) gene respond differently to interleukin-1 in HeLa cell. *J Biol Chem* 1993; 268:10739-10745.

Deguchi K, Murashima S, Shirakawa S, Soria C, Soda J, Dunn F, Tobelem C. The potentiating effect of platelet on plasminogen activation by tissue plasminogen activator. *Thromb. Res.* 1985; 40:853-861.

De la Concha EG, Arroyo R, Crusius JB, Campillo JA, Martin C, Varela de Seijas E, Pena AS, Claveria LE, Fernandez-Arquero M. Combined effect of HLA-DRB1\*1501 and interleukin-1 receptor antagonist gene allele 2 in susceptibility to relapsing/remitting multiple sclerosis. *J Neuroimmunol.* 1997; 80(1-2):172-8.

De Lange M, Snieder H, Ariens RA, Spector TD, Grant PJ. The genetics of haemostasis : a twin study. *Lancet* 2001;357:101-5.

Demeule M, Poirier J, Jodoin J, Bertrand Y, Desrosiers RR, Dagenais C, Nguyen T, Lanthier J, Gabathuler R, Kennard M, Jefferies WA, Karkan D, Tsai S, Fenart L, Cecchelli R, Beliveau R. High transcytosis of melanotransferrin (P97) across the blood-brain barrier. *J. Neurochem.* 2002; 83:924-933.

De Munk GA, Groeneveld E, Rijken DC. Acceleration of the thrombin inactivation of single chain urokinase-type plasminogen activator (pro-urokinase) by thrombomodulin. *J Clin Invest.* 1991;88:1680-4.

Deschepper CF, Bigornia V, Berens ME, Lapointe MC. Production of thrombin and antithrombin III by brain and astroglial cell cultures. *Brain Res Mol Brain Res.* 1991; 11(3-4):355-8.

Desrivieres S, Lu H, Peyri N, Soria C, Legrand Y, Menashi S. Activation of the 92 kDa type IV collagenase by tissue kallikrein. *J. Cell. Physiol.* 1993; 57:587-593.

Dickson D, Lee S, Mattiace L, Yen S, Brosnan C. Microglia and cytokines in neurological disease, with special reference to AIDS and Alzheimer's disease. *Glia* 1993; 7:75-83.

Didier Belorgey, Damian C. Crowther, Ravi Mahadeva, and David A. Lomas. Mutant Neuroserpin (S49P) That Causes Familial Encephalopathy with Neuroserpin Inclusion Bodies Is a Poor Proteinase Inhibitor and Readily Forms Polymers in Vitro. *J. Biol. Chem.* 2002; 277:17367-17373.

Diemel LT, Copelman CA, Cuzner ML. Macrophages in CNS remyelination: friend or foe? *Neurochemical Res* 1998; 23:341-347.

Dihanich M, Kaser M, Reinhard E, Cunningham D, Monard D.. Prothrombin mRNA is expressed by cells of the nervous system. *Neuron* 1991; 6:575 – 581.

Djodje Gueric et al. Plasminogen activators in MS lesions. *Brain* 2001; 124, 1978-1988.

Docagne F, Nicole O, Marti HH, MacKenzie ET, Buisson A, Vivien D. Transforming growth factor-beta1 as a regulator of the serpins/t-PA axis in cerebral ischemia. *FASEB J.* 1999; 13:1315-24.

Domotor E, Benzakour O, Griffin JH, Yule D, Fukudome K, Zlokovic BV. Activated protein C alters cytosolic calcium flux in human brain endothelium via binding to endothelial protein C receptor and activation of protease activated receptor-1. *Blood.* 2003; 101(12):4797-801.

Dore-Duffy P, Washington RA, Balabanov R. Cytokine-mediated activation of cultured CNS microvessels: a system for examining antigenic modulation of CNS endothelial cells, and evidence for long-term expression of the adhesion protein E-selectin. *J Cereb Blood Flow Metab.* 1994;14:837-44.

Droogan AG, Kirk CW, Hawkins SA, McMillan SA, Nevin NC, Graham CA. T-cell receptor alpha, beta, gamma, and delta chain gene microsatellites show no association with multiple sclerosis. *Neurology* 1996; 47:1049-53

Drummer C, Ludke S, Spannagl M, Schramm W, Gerzer R. The nitric oxide donor SIN-1 is a potent inhibitor of plasminogen activator inhibitor release from stimulated platelets. *Thromb Res.* 1991; 63:553–556.

Ebers GC, Kukay K, Bulman DE, Sadovnick AD, Rice G, Anderson C, Armstrong H, Cousin K, Bell RB, Hader W, Paty DW, Hashimoto S, Oger J, Duquette P, Warren S, Gray T, O'Connor P, Nath A, Auty A, Metz L, Francis G, Paulseth JE, Murray TJ, Pryse-Phillips W, Nelson R, Freedman M, Brunet D, Bouchard JP, Hinds D, Risch N. A full genome search in multiple sclerosis. *Nat Genet.* 1996; 13:472-6.

Ebner S, Dunbar M, McKinnon RD. Distinct roles for PI3K in proliferation and survival of oligodendrocyte progenitor cells. *J. Neurosci. Res.* 2000; 62:336 – 345.

- Eddleston M, de la Torre JC, Oldstone MB, Loskutoff DJ, Edgington TS, Mackman N.). Astrocytes are the primary source of tissue factor in the murine central nervous system. A role for astrocytes in cerebral hemostasis. *J.Clin. Invest.* 1993; 92:349 – 358.
- Edelberg, JM, Gonzalez-Gronow M, Pizzo SV. Lipoprotein (a) inhibits streptokinase-mediated activation of human plasminogen. *Biochem-istry* 1989; 28:2370-2374.
- Elbaz F, Cambien P, Amarenco M, Roest Y, Van der Schouw DE, Grobbee MJ, Tempelman PG, De Groot JJ, Sixma J, Banga JB. Plasminogen Activator Inhibitor Genotype and Brain Infarction Response. *Circulation* 2001; 103:13-14.
- Endler G, Lalouschek W, Exner M, Mitterbauer G, Haring D, Mannhalter C. The 4G/4G genotype at nucleotide position -675 in the promoter region of the plasminogen activator inhibitor 1 (PAI-1) gene is less frequent in young patients with minor stroke than in controls. *Br J Haematol.* 2000; 110:469–471.
- Engvall E, Ruoslahti E, Miller E.J. Affinity of fibronectin to collagens of different genetic types and to fibrinogen. *J. Exp. Med.* 1978; 147:1584–1595.
- Epplen C, Jackel S, Santos EJ, D'Souza M, Poehlau D, Dotzauer B, Sindern E, Haupts M, Rude KP, Weber F, Stover J, Poser S, Gehler W, Malin JP, Przuntek H, Epplen JT. Genetic predisposition to multiple sclerosis as revealed by immunoprinting. *Ann Neurol.* 1997; 41:341-52.
- Eriksson P, Kallin B, Van Hooft FM, Bavenholm P, Hamsten A. Allele-specific increase in basal transcription of the plasminogen-activator inhibitor 1 gene is associated with myocardial infarction. *Proc Natl Acad Sci.* 1995; 92:1851–1855.
- Ertekin-Taner N, Ronald J, Feuk L, Prince J, Tucker M, Younkin L., Hella M, Jain S. Elevated amyloid  $\beta$  protein (A $\beta$ 42) and late onset Alzheimer's disease are associated with single nucleotide polymorphisms in the urokinase-type plasminogen activator gene *Human Molecular Genetics* 2005; 14:447-460.
- Esmon CT. Does inflammation contribute to thrombotic events? *Haemostasis* 2000; 30: 34–40.
- Falcone DJ, Borth W, Khan KMF, Hajjar KA. Plasminogen-mediated matrix invasion and degradation by macrophages is dependent on surface expression of annexin II. *Blood* 2001; 97:777-784.
- Fang KC, Raymond WW, Blount JL, Caughey GH. Dog mast cell alpha-chymase activates progelatinase B by cleaving the Phe88-Gln89 and Phe91-Glu92 bonds of the catalytic domain. *J. Biol. Chem.* 1997; 272:25628-25635.
- Fatemi SH, Stary JM, Egan EA. Reduced blood levels of reelin as a vulnerability factor in pathophysiology of autistic disorder. *Cell Mol Neurobiol.* 2002; 22:139–152.

Fazekas F, Strasser-Fuchs S, Kollegger H, Berger T, Kristoferitsch W, Schmidt H, Enzinger C, Schiefermeier M, Schwarz C, Kornek B, Reindl M, Huber K, Grass R, Wimmer G, Vass K, Pfeiffer KH, Hartung HP, Schmidt R. Apolipoprotein E epsilon 4 is associated with rapid progression of multiple sclerosis. *Neurology*. 2001; 57:853-7.

Fazekas F, Schmidt R, Scheltens P. Pathophysiologic mechanisms in the development of age-related white matter changes of the brain. *Dement Geriatr Cogn Disord*. 1998; 9 Suppl 1:2-5. Review.

Fazekas F, Barkhof F, Filippi M. Unenhanced and enhanced magnetic resonance imaging in the diagnosis of multiple sclerosis. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. 1998; 64 Suppl 1:S2-5.

Fedetz M, Matesanz F, Pascual M, Martin J, Fernandez O, Guerrero M, Alcina A. The -174/-597 promoter polymorphisms in the interleukin-6 gene are not associated with susceptibility to multiple sclerosis. *J Neurol Sci*. 2001; 190(1-2):69-72.

Feltri ML, Graus Porta D, Previtali SC, Nodari A, Migliavacca B, Cassetti A, Littlewood-Evans A, Reichardt LF, Messing A, Quattrini A, Mueller U, Wrabetz L. Conditional disruption of b1 integrin in Schwann cells impedes interactions with axons. *J. Cell Biol*. 2002; 156:199–209.

Fernández-Arquero M, Arroyo R, Rubio A, Martin C, Vigil P, Conejero L, Figueredo MA, De la Concha EG. Primary association of a TNF gene polymorphism with susceptibility to multiple sclerosis. *Neurology*. 1999; 53:1361-3.

Fernández-Monreal M, López-Atalaya J, Benchenane K. Arginine 260 of the Amino-terminal Domain of NR1 Subunit Is Critical for Tissue-type Plasminogen Activator-mediated Enhancement of *N*-Methyl-D-aspartate Receptor. *J Biol Chem*. 2004; 279:50850-6.

Fernández-Valle C, Gwynn L, Wood PM, Carbonetto S, Bunge MB. Anti- $\beta$ 1 integrin antibody inhibits Schwann cell myelination. *J. Neurobiol*. 1994; 25:1207–1226.

Finckh U, van Hadeln K, Muller-Thomsen T, Alberici A, Binetti G, Hock C, Nitsch RM, Stoppe G, Reiss J, Gal A. Association of late-onset Alzheimer disease with a genotype of PLA2, the gene encoding urokinase-type plasminogen activator on chromosome 10q22.2. *Neurogenetics* 2003; 4:213-215.

Fisher M, Francis R. Altered coagulation in cerebral ischemia: plaquet, thrombin, and plasmin activity. *Arch Neurol*. 1990; 47:1075-1079.

Francis DA, Thompson AJ, Brookes P, Davey N, Lechler RI, McDonald WI, Batchelor JR. Multiple sclerosis and HLA: is the susceptibility gene really HLA-DR or -DQ?. *Hum Immunol*. 1991; 32:119-24.

- Frey U, Muller M, Kuhl D. A different form of long-lasting potentiation revealed in tissue plasminogen activator mutant mice. *J Neurosci* 1996; 16:2057-2063.
- Fridman R, Toth M, Pena D, Mobashery S. Activation of progelatinase B (MMP-9) by gelatinase A (MMP-2). *Cancer Res.* 1995; 55:2548-2555.
- Friedmann GC, Seeds NW. Tissue plasminogen activator expression in the embryonic nervous system. *Develop Brain Res* 1994; 81:41-9.
- Friedmann I, Faber-Elman A, Yoles E, Schwartz M. Injury-induced gelatinase and thrombin-like activities in regenerating and non-regenerating nervous systems. *FASEB J.* 1999; 13:533–543.
- Frigerio S, Ariano C, Bernardi G, Ciusani E, Massa G, La Mantia L, Salmaggi A. Cerebrospinal fluid thrombomodulin and VCAM-1 in different clinical stages of multiple sclerosis patients. *J Neuroimmunol.* 1998; 87:88-93.
- Fugger L, Morling N, Ryder LP, Sandberg-Wollheim M, Svejgaard A. Failure to demonstrate human T cell lymphotropic virus type I in multiple sclerosis patients. *J Gen Virol.* 1990;71:1103-7.
- Fugger L, sandberg-Wollheim M, Morlin N, Ryder LP, Svejgaard A. The germline repertoire of T-cell receptor beta chain genes in patients with relapsing/remitting multiple sclerosis or optic neuritis. *Immunogenetics* 1990; 31:278-80.
- Galboiz Y, Shapiro S, Lahat N, Rawashdeh H, Miller A. Matrix metalloproteinases (MMPs) and their tissue inhibitor (TIMPs) as markers of disease subtype and response to interferon-beta therapy in relapsing and secondary progressive multiple sclerosis patients. *Ann Neurol* 2001; 50:443–451.
- Garbuglia M, Bianchi R, Verzini M, Giambanco I, Donato R. Annexin II(2)-p11(2) (calpactin-I) stimulates the assembly of GFAP in a calcium-dependent and pH-dependent manner. *Biochem Biophys Res Commun* 1995;208:901-909.
- Garcia-Merino A, Alper CA, Usuku K, Marcus-Bagley D, Lincoln R, Awdeh Z, Yunis EJ, Eisenbarth GS, Brink SJ, Hauser SL. Tumor necrosis factor (TNF) microsatellite haplotypes in relation to extended haplotypes, susceptibility to diseases associated with the major histocompatibility complex and TNF secretion. *Hum Immunol* 1996; 50(1):11-21.
- García-Rocha M, Avila J, Armas-Portela R. Tissue-type plasminogen activators is the main plasminogen activator associated with isolated rat nerve growth cones. *Neurosci Lett.* 1994; 180(2):123-6.

Gay FW, Drye TJ, Dick GW, Esiri MM. The application of multifactorial cluster analysis in the staging of plaques in early multiple sclerosis. Identification and characterization of the primary demyelinating lesion. *Brain* 1997; 20:461–1483.

Géraldine Liot, Benoit D Roussel, Nathalie Lebeurrier, Karim Benchenane, José P López-Atalaya, Denis Vivien, Carine Ali Tissue-type plasminogen activator rescues neurones from serum deprivation-induced apoptosis through a mechanism independent of its proteolytic activity. *J Neurochem.* 2006; 98:1458-64.

Gijbels K, Masure S, Carton H, Opdenakker G.. Gelatinase in the cerebrospinal fluid of patients with multiple sclerosis and other inflammatory neurological disorders. *J Neuroimmunol* 1992; 41:29–34.

Gijbels K, Galardy RE, Steinman L. Reversal of experimental autoimmune encephalomyelitis with a hydroxamate inhibitor of matrix metalloproteases. *J Clin Invest* 1994;94:2177–2182.

Gilboa N et al. Plasma fibronectin enhances fibrinolysis system in vitro. *Thromb Haemost* 1985; 54:639-644.

Gingrich MB, Junge CE, Lyuboslavsky P, Traynelis SF. Potentiation of NMDA receptor function by the serine protease thrombin. *J. Neurosci* 2000;20:4582-4595.

Gingrich MB, Traynelis SF. Serine proteases and brain damage—is there a link? *Trends Neurosci.* 2000;23:399–407.

Giovannoni G, Hartung HP. The immunopathogenesis of multiple sclerosis and Guillain-Barre Syndrome. *Curr Opin Neurol.* 1996;9:165-177.

Giri R, Shen Y, Stins M, Du Yan S, Schmid A.M, Stern D., Kim K.S, Zlokovic B, Kalra V.K. B-amyloid-induced migration of monocytes across human brain endothelial cells involves RAGE and PECAM-1. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* 2000; 279:1772–1781.

Gonsette R. Tratamiento Precoz de la progresión de la Esclerosis Múltiple. *Cuadernos de esclerosis múltiple* 2001; 8:6-21.

Goodkin DE, Cookfair D, Wende K, Bourdette D, Pullicino P, Scherokman B, Whitham R. Inter- and intrarater scoring agreement using grades 1.0 to 3.5 of the Kurtzke Expanded Disability Status Scale (EDSS). Multiple Sclerosis Collaborative Research Group. *Neurology.* 1992; 42:859-63.

Granchas S, Estelles A, Tormo G, Falco C, Gilabert J, España F, Cano A, Seguí R, Aznar J. Plasminogen-activator inhibitor-1 promoter 4G/5G genotype and increased PAI-1 circulating levels in postmenopausal women with coronary artery disease. *Thromb Haemost* 1999; 81:516-521.

Gravanis I, Tsirka SE. Tissue plasminogen activator and glial function. *Glia*. 2005; 49:177-83.

Green AJ, Barcellos LF, Rimmler JB, Garcia ME, Caillier S, Lincoln RR, Bucher P, Pericak-Vance MA, Haines JL, Hauser SL, Oksenberg JR; Multiple Sclerosis Genetics Group. Sequence variation in the transforming growth factor beta 1 (TGFB1) gene and multiple sclerosis susceptibility. The multiple Sclerosis Genetics Group. *J Neuroimmunol* 2001; 116:116-124.

Grey ST, Tsuchida A, Hau H, Orthner CL, Salem HH, Hancock WW. Selective inhibitory effects of the anticoagulant activated protein C on the responses of human mononuclear phagocytes to LPS, IFN-gamma, or phorbol ester. *J Immunol*. 1994; 153:3664-72.

Grimsley PG, Quinn KA, Owensby DA: Soluble low-density lipoprotein receptor-related protein. *Trends Cardiovasc Med* 1998, 8:363-368.

Grinnell F, Feld M, Minter D. Fibroblast adhesion to fibrinogen and fibrin substrata: Requirement for cold-insoluble globulin (plasma fibronectin). *Cell* 1980; 19:517–525.

Guerini FR, Losciale L, Mediati M, Speciale L, Mancuso R, Saresella M, Calvo MG, Caputo D, Ferrante P. A polymorphism in the repetitive (TGGA)<sub>n</sub> sequence 5' to the human myelin basic protein gene in Italian multiple sclerosis patients. *J Neurovirol*. 2000; 2:S28-32.

Guidotti A, Auta J, Davis JM, Di-Giorgi-Gerevini GV, Dwivedi Y, Grayson DR, Impagnatiello F, Pandey G, Pesold C, Sharma R, Uzunov D, Costa E. Decrease in reelin and glutamic acid decarboxylase67 (GAD67) expression in schizophrenia and bipolar disorder: a postmortem brain study. *Arch Gen Psychiatry* 2000; 57:1061–1069.

Gveric D, Cuzner ML, Newcombe J: Insulin-like growth factors and binding proteins in multiple sclerosis plaques. *Neuropathol Appl Neurobiol* 1999;25:215-225.

Gveric D, Hanemaaijer R, Newcombe J, Van Lent NA, Sier CF, Cuzner ML. Plasminogen activators in multiple sclerosis lesions: implications for the inflammatory response and axonal damage. *Brain* 2001; 124:1978-1988.

Gveric D, Herrera B, Petzold A, Lawrence DA, Cuzner ML. Impaired fibrinolysis in multiple sclerosis: a role for tissue plasminogen activator inhibitors. *Brain* 2003; 126:1590-1598.

Gveric D, Herrera BM, Cuzner ML. tPA receptors and the fibrinolytic response in multiple sclerosis lesions. *Am J Pathol*. 2005;166:1143-51

Haegert DG, Swift FV, Benedikz J. Evidence for a complex role of HLA class II genotypes in susceptibility to multiple sclerosis in Iceland. *Neurology* 1996; 46:1107-11.

- Hahn-Dantona E, Ruiz JF, Bornstein P, Strickland DK. The low density lipoprotein receptor-related protein modulates levels of matrix metalloproteinase 9 (MMP-9) by mediating its cellular catabolism. *J Biol Chem* 2001;276:15498-15503.
- Hajjar KA, Cavish D, Breslow JL, Nachman RL. Lipoprotein(a) modulation of endothelial cell surface fibrinolysis and its potential role in atherosclerosis. *Nature* 1989; 339:303-305.
- Hajjar KA, Krishnan S. Annexin II: a mediator of the plasmin/plasminogen activator system. *Trends Cardiovasc Med* 1999, 9:128-138.
- Hancock WW, Tsuchida A, Hau H, Thomson NM, Salem HH. The anticoagulants protein C and protein S display potent antiinflammatory and immunosuppressive effects relevant to transplant biology and therapy. *Transplant Proc.* 1992; 24:2302-3.
- Harbo HF, Celius EG, Vartdal F, Spurkland A. CTLA4 promoter and exon 1 dimorphisms in multiple sclerosis. *Tissue Antigens.* 1999; 53:106-10.
- Harkness KA, Adamson P, Sussman JD, Davies-Jones GA, Greenwood J, Woodroffe MN. Dexamethasone regulation of matrix metalloproteinase expression in CNS vascular endothelium. *Brain* 2000; 123:698–709.
- Hastings GA, Coleman TA, Haudenschild CC, Stefansson S, Smith EP, Barthlow R, Cherry S, Sandkvist M, Lawrence DA. Neuroserpin, a brain-associated inhibitor of tissue plasminogen activator is localized primarily in neurons. Implications for the regulation of motor learning and neuronal survival. *J Biol Chem* 1997; 272:33062-7.
- He B, Navikas V, Lundahl J, Soderstrom M, Hillert J. Tumor necrosis factor  $\alpha$ -308 alleles in multiple sclerosis and optic neuritis. *J. Neuroimmunol.* 1995; 63:143-147.
- He B, Xu C, Yang B, Landtblom AM, Hillert J. Linkage and association analysis of genes encoding cytokines and myelin proteins in multiple sclerosis. *J. Neuroimmunol* 1998; 86:13-19.
- He B, Yang B, Lundahl J, Fredrikson S, Hillert J. The myelin basic protein gene in multiple sclerosis: identification of discrete alleles of a 1.3 kb tetranucleotide repeat sequence. *Acta neurol scand* 1998;97:46-51.
- He X, Shiosaka S, Yoshida S. Expression of neuropsin in oligodendrocytes after injury to the CNS. *Neurosci. Res.* 2001; 39: 455 – 462.
- Henry M, Chomiki N, Scarabin PY, Alessi MC, Peiretti F, Arveiler D, Ferrieres J, Evans A, Amouyel P, Poirier O, Cambien F, Juhan-Vague I. Five frequent polymorphism of the PAI-1 gene. Lack of association between genotype, PAI-1 activity, and triglyceride levels in a healthy population. *Artheroscler Thromb Vasc Biol* 1997; 17:851-8.

Henry M; Tregouët DA; Alessi MC; Aillaud MF; Visvikis S; Siest G; Tired L; Juhan-Vague. Metabolic determinants are much more important than genetic polymorphisms in determining the pai-1 activity and antigen plasma concentrations. A Family Study With Part of the Stanislas Cohort. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 1998; 18:84-91.

Heppner FL, Greter M, Marino D, et al. Experimental autoimmune encephalomyelitis repressed by microglial paralysis. *Nat Med.* 2005; 11:146–152.

Herbert CB, Bittner GD, Hubbell JA. Effects of fibrinolysis on neurite growth from dorsal root ganglia cultured in two- and three-dimensional fibrin gels. *J Comp Neurol* 1996; 365:380-391

Hernández MA. Epidemiology of multiple sclerosis in the Canary Islands (Spain). A study on the island of La Palma. *J. Neurol.* 2002; 249:1378-1381.

Herz J, and Bock H. Lipoprotein receptors in the nervous system. *Annu.Rev. Biochem.* 2002; 71:405-434.

Hesslow G, Svensson P, Ivarsson M. Learned movements elicited by direct stimulation of cerebellar mossy fiber afferents. *Neuron* 1999; 24:179-185.

Hewson AK, Smith T, Leonard JP, Cuzner ML. Suppression of experimental allergic encephalomyelitis in the Lewis rat by the matrix metalloproteinase inhibitor Ro31-9790. *Inflamm Res* 1995; 44: 345–349.

Hillert J, Leng C, Olerup O. No association with germline T cell receptor beta-chain gene alleles or haplotypes in Swedish patients with multiple sclerosis. *J Neuroimmunol* 1991; 32:141-7.

Hindorff LA, Schwartz SM, Siscovick DS, Psaty BM, Longstreth WT, Reiner AP. The association of PAI-1 promotor 4G/5G insertion/deletion polymorphism with myocardial infarction and stroke in young women. *J Cardiovasc Risk* 2002;9:131-137.

Hoekstra T, Geleijnse JM, de Waart F, Nederhand R, Kluft C, Kok FJ, Schouten EG. The 4G/5G-polymorphism in the PAI-1 gene is not associated with markers of atherosclerosis in male smokers. *Thromb Res.* 2002; 107(3-4):115-9.

Hoekstra T, Geleijnse JM, Kluft C, Giltay EJ, Kok FJ, Schouten EG. 4G/4G genotype of PAI-1 gene is associated with reduced risk of stroke in elderly. *Stroke.* 2003; 34:2822-8.

Hong Y, Pederson NL, Egberg N, de Faire U. Moderate genetic influences on plasma levels of PAI-1 and evidence of genetic and environmental influences shared by Pai-1 triglycerides and body mass index. *Tromb Vasc Biol* 1997; 17:2776-82

Hooper WC, Lally C, Austin H, Renshaw M, Dilley A, Wenger NK, Phillips DJ, Whitsett C, Rawlins P, Evatt BL. The role of tPA and PAI-1 4G/5G polymorphisms in

African-American adults with a diagnosis of myocardial infarction or venous thromboembolism. *Thromb Res.* 2000; 99:223–230.

Hoover-Plow JL, Miles LA, Hess CM, Scanu AM, Plow EF. Comparison of the lysine binding functions of lipoprotein(a) and plasminogen. *Biochemistry* 1993; 32:13681-13687.

Horner PJ, Cage F.H. Regenerating the damaged central nervous system. *Nature* 2000; 407:63–970.

Hossain MA, Murayama N, Oka T, Nakajima T. Evidence of  $[Ca^{2+}]_i$  elevation by anti-calreticulin immunoreactive protein in neurons. *Neurosci. Res.* 2000; 36:285 – 290.

Houenou LJ, Turner PL, Li L, Oppenheim RW, Festoff BW. A serine protease inhibitor, protease nexin I, rescues motoneurons from naturally occurring and axotomy-induced cell death. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1995; 92:895-9.

Hu YT, Ma ZZ, Zhang XL, Han SY, Huang LJ. Experiment study of infusing tPA in retinal vein for treatment of retinal vein occlusion. *Zhonghua Yan Ke Za Zhi.* 2003; 39:645-9.

Hu Y, Ivashkiv LB. Costimulation of chemokine receptor signaling by matrix metalloproteinase-9 mediates enhanced migration of IFN- $\alpha$  dendritic cells. *J Immunol.* 2006;176(10):6022-33.

Huang YY, Bach ME, Lipp HP, Zhuo M, Wolfer DP, Hawkins RD, Kandel ER, Godfraind JM, Mulligan C, Collen D, Carmilet P. Mice lacking the gene encoding tissue-type plasminogen activator show a selective interference with late-phase long term potentiation in both Schaffer collateral and mossy fiber pathways. *Proc Natl acad Sci USA* 1996; 93: 8699-8704.

Huang HC, Shi GY, Jiang SJ, Shi CS, Wu CM, Yang HY, Wu HL. Thrombomodulin-mediated cell adhesion: Involvement of its lectin-like domain. *J Biol Chem.* 2003; 278: 46750-9.

Huber, J.D., Egleton, R.D., and Davis, T.P. Molecular physiology and pathophysiology of tight junctions in the blood-brain barrier. *Trends Neurosci.* 2001; 24:719–725.

Imai K, Yokohama Y, Nakanishi I, Ohuchi E, Fujii Y, Nakai N, Okada Y. Matrix metalloproteinase 7 (matrilysin) from human rectal carcinoma cells. Activation of the precursor, interaction with other matrix metalloproteinases and enzymic properties. *J. Biol. Chem.* 1995; 270:6691-6697.

Impagnatiello F, Guidotti AR, Pesold C, Dwivedi Y, Caruncho H, Pisu MG, Uzunov DP, Smalheiser NR, Davis JM, Pandey GN, Pappas GD, Tueting P, Sharma RP, Costa

E. A decrease of reelin expression as a putative vulnerability factor in schizophrenia. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1998; 95:15718–15723.

Impagnatiello F, Pandey G, Pesold C, Sharma R, Uzunov D, Costa E. Decrease in reelin and glutamic acid decarboxylase67 (GAD67) expression in schizophrenia and bipolar disorder: a postmortem brain study. *Arch Gen Psychiatry* 2000; 7:1061–1069.

Inaba Y, Ichikawa M, Inoue A, Itoh M, Kyogashima M, Sekiguchi Y, Nakamura S, Komiyama A, Koh C. *J. Neurol. Sci* 2001; 185:89-93.

Inoue A, Koh CS, Shimada K, Yanagisawa N, Yoshimura K. *J. Neuroimmunol.*1996; 71:131-137.

International Multiple Sclerosis Genetics Consortium. A High-Density Screen for Linkage in Multiple Sclerosis. *Am. J. Hum. Genet.* 2005; 77:454-467.

Isermann B, Sood R, Pawlinski R, Zogg M, Kalloway S, Degen JL, Mackman N, Weiler H. The thrombomodulin-protein C system is essential for the maintenance of pregnancy. *Nat Med.* 2003; 9:331-7.

Ishimoto Y, Ohashi K, Mizuno K, Nakano T. Promotion of the uptake of PS liposomes and apoptotic cells by a product of growth arrest-specific gene, gas6. *J Biochem (Tokyo)* 2000;127:411-7.

Iwata N, Inada T, Harano M, Komiyama T, Yamada M, Sekine Y, Iyo M, Sora I, Ujike H, Ozaki N. No association is found between the candidate genes of t-PA/plasminogen system and Japanese methamphetamine-related disorder: a collaborative study by the Japanese Genetics Initiative for Drug Abuse. *Ann NY Acad Sci.* 2004;1025:34-8.

Jacobsen LK, Staley JK, Zoghbi SS, Seibyl JP, Kosten TR, Innis RB, Gelernter J. Prediction of dopamine transporter binding availability by genotype: a preliminary report. *Am J Psychiatry.* 2000;157:1700-3.

Jacobsen M, schwer D, Ziegler A, Gaber R, schock s, Schwinzer R, Lindert RB, Kantarci O, Schipper H, Oertel WH, Heidenreich F, Weinshenker BG, Sommer N, Hemmer B. A point mutation in PTPRC is associated with the development of multiple sclerosis. *Nat Genet* 2000; 26:495-9.

Jakubowski H. Anti-N-homocysteinylated protein autoantibodies and cardiovascular disease. *Clin Chem Lab Med.* 2005;43:1011-4.

Jannes J, Hamilton-Bruce MA, Pilotto L, Smith BJ, Mullighan CG, Bardy PG, Koblar SA. Tissue plasminogen activator –7351C/T enhancer polymorphism is a risk factor for lacunar stroke. *Stroke.* 2004; 35:1090-1094.

Janson PA, Jubelirer SJ, Weinstein MJ, Deykin D. Treatment of the bleeding tendency in uremia with cryoprecipitate. *N.Engl J Med* 1980; 303:1318.

Jern C, Ladenvall P, Wall U, Jern S. Gene Polymorphism of t-PA is Associated With Forearm Vascular Release Rate of t-PA Arteriosclerosis, Thrombosis and Vascular. *Biology* 1999; 19:454-459.

Jessen KR, Mirsky R. Developmental regulation in the Schwann cell lineage. *Adv. Exp. Med. Biol.* 1999; 468:3–12.

Johansson L, Jansson JH, Boman K, Nilsson TK, Stegmayr B, Hallmans G. Tissue Plasminogen Activator, Plasminogen Activator Inhibitor-1, and Tissue Plasminogen Activator/Plasminogen Activator Inhibitor-1 Complex as Risk Factors for the Development of a First Stroke 2000; 31:26-32.

John B, Enright AJ, Aravin A, Tuschl T, Sander C, Marks DS. Human MicroRNA targets. *PLoS Biol.* 2004;2:363.

Jood K, Ladenvall P, Tjarnlund-Wolf A, Ladenvall C, Andersson M, Nilsson S, Blomstrand C, Jern C. Fibrinolytic Gene Polymorphism and Ischemic Stroke 2005;36: 2077-81.

Kaikita K, Fogo AB, Ma L-J, Schoenhard JA, Brown NJ, Vaughan DE. Plasminogen activator inhibitor-1 deficiency prevents hypertension and vascular fibrosis in response to chronic nitric oxide synthase inhibition. *Circulation* 2001; 104: 839–844.

Kain K, Young J, Bamford J, Bavington J, Grant PJ, Catto AJ. Determinants of Plasminogen Activator Inhibitor-1 in South Asians with Ischaemic Stroke. *Cerebrovascular Dis* 2002; 14:77-83.

Kalderon N. Role of the plasmin-generating system in the developing nervous tissue: I. Proteolysis as a mitogenic signal for the glial cells. *J Neurosci Res.* 1982; 8:509-19.

Kamath S. and Lip G.Y. Fibrinogen: Biochemistry, epidemiology and determinants. *QJM* 2003; 96:711–729.

Kang BY, Kang OL. Genetic Polymorphisms of t-PA and PAI-1 Genes in the Korean Population *Korean J Biol Sci* 2003; 7:249-253.

Kantarci O, Siva A, Eraksoy M, Karabudak R, Sutlas N, Agaoglu J, Turan F, Ozmenoglu M, Togrul E, Demirkiran M. Survival and predictors of disability in Turkish MS patients. Turkish Multiple Sclerosis Study Group (TUMSSG). *Neurology.* 1998; 51:765-72.

Kantarci OH, Atkinson EJ, Hebrink DD, McMurray CT, Weinshenker BG. Association of two variants in IL-1beta and IL-1 receptor antagonist genes with multiple sclerosis. *J Neuroimmunol.* 2000; 106:220-7.

Kantarci O, Wingerchuk D. Epidemiology and natural history of multiple sclerosis: new insights. *Curr Opin Neurol.* 2006; 19:248-54.

Kappa JR, Cottrell ED, Berkowitz HD, Fisher CA, Sobel M, Ellison N, Addonizio VP Jr. Carotid endarterectomy in patients with heparin-induced platelet activation: comparative efficacy of aspirin and iloprost (ZK36374). *J Vasc Surg.* 1987; 5(5):693-701.

Kassam G, Le BH, Choi KS, Kang HM, Fitzpatrick SL, Louie P, Waisman DM: The p11 subunit of the annexin II tetramer plays a key role in the stimulation of t-PA-dependent plasminogen activation. *Biochemistry* 1998; 37:16958-16966

Kasuno K, Tsuzuki D, Tanaka A, Ueda S, Sugawara A, Senzaki H, Kuwahara T. A 41-year-old woman with protein S deficiency and diffuse proliferative lupus nephritis: is protein S deficiency associated with a hyperinflammatory response?. *Am J Kidney Dis.* 1997; 29:931-5.

Katoh M, Egashira K, Mitsui T, Chishima S, Takeshita A, Narita H. Angiotensin-converting enzyme inhibitor prevents plasminogen activator inhibitor-1 expression in a rat model with cardiovascular remodeling induced by chronic inhibition of nitric oxide synthesis. *J Mol Cell Cardiol.* 2000; 32: 73–83.

Kebin Hu, Junwei Yang, Sakae Tanaka Steven L. Gonias], Wendy M. Mars, and Youhua Liu. Tissue-type Plasminogen Activator Acts as a Cytokine That Triggers Intracellular Signal Transduction and Induces Matrix Metalloproteinase-9 Gene Expression *J. Biol. Chem.* 2006; 281:2120-21276.

Kerschensteiner M, Stadelmann C, Dechant G, Wekerle H, Hohlfeld R. Neurotrophic cross-talk between the nervous and immune systems: implications for neurological diseases. *Ann Neurol* 2003; 53:292-304.

Kiefer R, Schweitzer T, Jung S, Toyka K, Hartung H-P. Sequential expression of transforming factor-b1 by T-cells, macrophages, and microglia in rat spinal cord during autoimmune inflammation. *J Neuropathol Exp Neurol* 1998;57:385-395.

Kilic E, Hermann DM, Hossmann KA. Recombinant tissue plasminogen activator reduces infarct size after eversible thread occlusion of middle cerebral artery in mice. *Neuroreport* 1999; 10:107-111.

Killestein J, Schrijver HM, Crusius JB, Perez C, Uitdehaag BM, Pena AS, Polman CH. Intracellular adhesion molecule-1 polymorphisms and genetic susceptibility to multiple sclerosis: additional data and meta-analysis. *Ann Neurol.* 2000; 47:277-9.

- Kim BS, Plow EF, Miles LA. Regulation of plasminogen receptor expression on monocytoid THP-1 cells by adherence to extracellular matrix proteins. *Circulation* 1992; 86:1-148.
- Kim S, Lim IK, Park GH, Paik WK. Biological methylation of myelin basic protein:enzymology and biological significance. *Int J Biochem Cell Biol.* 1997; 29:743-51.
- Kim, K.S. Pathogenesis of bacterial meningitis: From bacteraemia to neuronal injury. *Nat. Rev. Neurosci.* 2003; 4:376–385.
- Kingston IB, Castro MJ, Anderson S. In vitro stimulation of tissue-type plasminogen activator by Alzheimer amyloid beta-peptide analogues. *Nat Med* 1995; 1:138–142.
- Kioussi C, Gruss P. Making of a Schwann. *Trends Genet.* 1996; 12:84–86.
- Kira J, Kanai T, Nishimura Y, Yamasaki K, Matsushita S, Kawano Y, Hasuo K, Tobimatsu S, Kobayashi T. Western versus Asian types of multiple sclerosis: immunogenetically and clinically distinct disorders. *Ann Neurol.* 1996;40:569-74.
- Kira J, Inuzuka T, Hozumi I, Wada H, Tanaka K, Gondo H, Sato S, Tsuji S, Kobayashi T. A novel monoclonal antibody which reacts with a high molecular weight neuronal cytoplasmic protein and myelin basic protein (MBP) in a patient with macroglobulinemia. *J Neurol Sci.* 1997; 148:47-52.
- Kirichuk VF, Streknev AG. The role of hemostasis system in the pathogenesis and course of multiple sclerosis. *Zh Neurol Psikiatri IM SS Korsanova* 2003;(Spec No 2):34-8.
- Kirk J, Plumb J, Mirakhur M, McQuaid S. Tight junctional abnormality in multiple sclerosis white matter affects all calibres of vessel and is associated with blood–brain barrier leakage and active demyelination. *J. Pathol* 2003; 201:319–327
- Klinger KW, Winqvist R, Riccio A, Andreasen PA, Sartorio R, Nielsen LS, Stuart N, Stanislovitis P, Watkins P, Douglas R, Grzeschik KH, Alitalo K. Plasminogen activator inhibitor type 1 gene is located at region q21.3-q22 of chromosome 7 and genetically linked with cystic fibrosis. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1991; 84:8548-8552.
- Knable MB, Torrey EF, Webster MJ, Bartko JJ. Multivariate analysis of prefrontal cortical data from the Stanley Foundation Neuropathology Consortium. *Brain Res Bull.* 2001; 55:651–659.
- Knauper V, Smith B, Lopez-Otin C, Murphy G. Activation of progelatinase B (proMMP-9) by active collagenase-3 (MMP-13). *Eur. J. Biochem.* 1997; 248:369-373.

Kobrin sky NL, Israels ED, Gerrard JM, Cheang MS, Watson CM, Bishop AJ, Schroeder ML. Shortening of bleeding time by 1-de-amino-8-arginine vasopressin in various bleeding disorders. *Lancet* 1984; 26:1145-8.

Koenig H, Trout JJ, Goldstone AD, Lu C. Capillary NMDA receptors regulate blood-brain barrier function and breakdown. *Brain Res.* 1992; 588:297–303

Kohler HP, Grant PJ. Plasminogen-activator inhibitor type 1 and coronary artery disease. *N Engl J Med.* 2000; 342:1792-801.

Kohriyama T, Maruyama H, Kurokawa K, Harada T, Nakamura S. Endothelial cell activation and/or injury in multiple sclerosis: analysis with von Willebrand factor and thrombomodulin. *Rinsho Shinkeigaku.* 1997; 37:287-91.

Koji Yamamoto, Kyosuke Takeshita, Takayoshi Shimokawa, Hong Yi, Ken-ichi Isobe, David J. Loskutoff, and Hidehiko Saito: Plasminogen activator inhibitor-1 is a major stress-regulated gene: Implications for stress-induced thrombosis in aged individuals *Proc Natl Acad Sci .* 2002; 99(2): 890–895.

Kojima S, Harpel PC, Rifkin DB. Lipoprotein (a) inhibits the generation of transforming growth factor : an endogenous inhibitor of smooth muscle cell migration. *J. Cell Biol.* 1991; 113:1439-1445.

Korbut R, Bieron K, Gryglewski RJ. Effect of L-arginine on plasminogen-activator inhibitor in hypertensive patients with hypercholesterolemia. *N Engl J Med.* 1993; 328: 287–288.

Korbut R, Marcinkiewicz E, Cieslik K, Gryglewski RJ. The effect of nitric oxide donors on the release of plasminogen activator inhibitor (PAI) from rabbit platelets in vitro. *J Physiol Pharmacol.* 1995; 46: 37–44.

Kreutzberg G. Microglia, the first line of defense in brain pathologies. *Arzneimittelforschung* 1995;45:357-360.

Krueger JM, Davis JM, Costa E, Smalheiser NR. Methodological issues in the measurement of reelin in human plasma. *Soc Neurosci Abs.* 2001;31:238-5.

Kruman II, Culmsee C, Chan SL, Kruman Y, Guo Z, Penix L, Mattson MP. Homocysteine elicits a DNA damage response in neurons that promotes apoptosis and hypersensitivity to excitotoxicity. *J Neurosci.* 2000;20:6920-6.

Krystosek A, Seeds NW. Plasminogen activator release at the neuronal growth cone. *Science.* 1981; 213:1532-4.

Kunz C, Pebler S, Otte J, and von der Ahe D. Differential regulation of plasminogen activator and inhibitor gene transcription by the tumor suppressor p53. *Nucleic Acids Res* 1995; 23: 3710–3717.

Kurtzke JF. Rating neurologic impairment in multiple sclerosis: an expanded disability status scale (EDSS). *Neurology*. 1983; 33: 1444-1452.

Kwon EE, Prineas JW. Blood-brain barrier abnormalities in longstanding multiple sclerosis lesions. An immunohistochemical study. *J Neuropathol Exp Neurol*. 1994; 53:625-36.

Kwon M, Caplan JF, Filipenko NR, Choi KS, Fitzpatrick SL, Zhang LB, Waisman DM: Identification of annexin II heterotetramer as a plasmin reductase. *J Biol Chem* 2002; 277:10903-10911.

Laaksonen M, Pastinen T, Sjoroos M, Kuokkanen S, Ruutiainen J, Sumelahti ML, Reijonen H, Salonen R, Wikstrom J, Panelius M, Partanen J, Tienari PJ, Ilonen J. HLA class II associated risk and protection against multiple sclerosis-a Finnish family study. *J Neuroimmunol*. 2002; 122:140-5.

Lacoviello I, Castelvuoovo AD, De Kniff P, D’OrazioA, Amore C, Kluft C, Donati MB. Alu-repeat polymorphism in the tissue-type plasminogen activator (t-PA) gene, t-PA levels and risk of familial myocardial infarction (MI). *Fibrinolysis* 1996; 10:13-16.

Ladenvall P, Wall U, Jern S, Jern C. Identification of eight novel single-nucleotide polymorphisms at human tissue-type plasminogen activator (t-PA) locus: association with vascular t-PA release in vivo. *Thromb Haemost*. 2000; 84:150–155.

Ladenvall P, Wall U, Jern S, Jern C. Eight single-nucleotide polymorphisms (SNPs) at the human tissue-type plasminogen activator (t-PA) locus. *J Hum Genet*. 2001; 46:737-8.

Ladenvall P, Johansson L, Jansson JH, Jern S, Nilsson TK, Tjarnlund A, Jern C, Boman K. Tissue-type plasminogen activator -7,351C/T enhancer polymorphism is associated with a first myocardial infarction. *Thromb Haemost*. 2002; 87:105–109.

Langford D, Masliah E. Crosstalk between components of the blood brain barrier and cells of the CNS in microglial activation in AIDS. *Brain Pathol*. 2001; 11, 306–312.

Lapchak PA, Chapman D, Zivin JA. Metalloproteinase inhibition reduces thrombolytic (tissue plasminogen activator)-induced hemorrhage after thromboembolic stroke. *Stroke* 2000; 31:3034–3040.

Lasmann H, Bruck W, Lucchinetti C. Remyelination in multiple sclerosis. *Mult Scler* 1997; 3:133-6.

Lassmann, H, Bruck, W., and Lucchinetti C. Heterogeneity of multiple sclerosis pathogenesis: implications for diagnosis and therapy. *Trends Mol. Med.* 2001; 7:115-121.

Lassmann H, Wekerle H. *Pathology of Multiple Sclerosis*. McAlpine 's Multiple Sclerosis. London, Churchill Livingstone 2006: 323-358.

Ledesma MD, Da Silva JS, Crassaerts K, Delacourte A, De Strooper B, Dotti CG Brain plasmin enhances APP alpha-cleavage and Abeta degradation and is reduced in Alzheimer's disease brains. *EMBO Rep* 2000;1:530–535.

Ledesma MD, Abad-Rodriguez J, Galvan C, Biondi E, Navarro P, Delacourte A, Dingwall C, Dotti CG Raft disorganization leads to reduced plasmin activity in Alzheimer's disease brains. *EMBO Rep* 2003;4:1190–1196.

Lee, S. J., Drabik, K., Van Wagoner, N. J., Lee, S., Choi, C., Dong, Y., and Benveniste, E. N. ICAM-1-induced expression of proinflammatory cytokines in astrocytes: involvement of extracellular signal-regulated kinase and p38 mitogen-activated protein kinase pathways. *J. Immunol.* 2000; 165:4658 – 4666.

Levin EG, Santell L, Osborn KG. The expression of endothelial tissue plasminogen activator in vivo: a function defined by vessel size and anatomic location. *J. Cell Sci* 1997; 110:139-148.

Li Y, Tennekoon GI, Birnbaum M, Marchionni MA, Rutkowski JL Neuregulin signaling through a PI3K/Akt/Bad pathway in Schwann cell survival. *Mol. Cell. Neurosci.* 2001; 17:761-777.

Liedtke W, Cannella B, Mazzaccaro RJ, Clements JM, Miller KM, Wucherpfennig KW, Gearing AJ, Raine CS. Effective treatment of models of multiple sclerosis by matrix metalloproteinase inhibitors. *Ann Neurol* 1998; 44:35–46.

Ligers A, Xu C, Saarinen S, Hillert J, Olerup O. The CTLA-4 gene is associated with multiple sclerosis. *J Neuroimmunol.* 1999; 97:182-90.

Lijnen HR, Collen D. Matrix metalloproteinase system deficiencies and matrix degradation. *Thromb Haemost* 1999; 82:837-845.

Lijnen, H.R. Elements of the fibrinolytic system. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 2001; 936:226-236.

Lindgren A, Lindoff C, Norrving B, Astedt B, Johansson BB. Tissue plasminogen activator and plasminogen activator inhibitor-1 in stroke patients. *Stroke.* 1996; 27:1066–1071.

Ling Q, Jacovina AT, Deora A, Febbraio M, Simantov R, Silverstein RL, Hempstead B, Mark WH, Hajjar KA. Annexin II regulates fibrin homeostasis and neoangiogenesis in vivo. *J Clin Invest* 2004; 113:38-48.

Liot G, Roussel BD, Lebeurrier N, Benchenane K, Lopez-Atalaya JP, Vivien D, Ali C. Tissue-type plasminogen activator rescues neurones from serum deprivation-induced apoptosis through a mechanism independent of its proteolytic activity. *J Neurochem*. 2006; 98:1458-64.

Liu Y, Fields RD, Festoff BW, Nelson PG. Proteolytic action of thrombin is required for electrical activity-dependent synapse reduction. *Proc Natl Acad Sci*. 1994; 25;91:10300-4.

Liu D, Guo H, Griffin JH, Fernandez JA, Zlokovic BV. Protein S confers neuronal. *Circulation*. 2003; 107:1791-6.

Liu D, Cheng T, Guo H, Fernandez JA, Griffin JH, Song X, Zlokovic BV. Tissue plasminogen activator neurovascular toxicity is controlled by activated protein C. *Nat Med*. 2004; 10:1379-83.

Liu Z, Li N, Diaz LA, Shipley M, Senior RM, Werb Z. Synergy between a plasminogen cascade and MMP-9 in autoimmune disease. *J Clin Invest*. 2005; 115:879-87.

Lo EH et al. Extracellular proteolysis in brain injury and inflammation: plasminogen activators and matrix metalloproteinases. *J Neuroscience Res* 2000; 69:1-9.

Lo EH, Wang X, Cuzner ML: Extracellular proteolysis in brain injury and inflammation: role for plasminogen activators and matrix metalloproteinases. *J Neurosci Res* 2002; 69:1-9.

Lo EH, Broderick JP, Moskowitz MA. tPA and proteolysis in the neurovascular unit. *Stroke* 2004; 35:354–356.

Lo EH. Combination stroke therapy: easy as APC?. *Nature Medicine* 2004; 10:1295-1296.

London J, Biegel D, Pachter J Neurocytopathic effects of  $\beta$ -amyloid-stimulated monocytes: a potential mechanism for central nervous system damage in Alzheimer's disease. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996; 93:4147-4152.

Lu, H., Smith, C. W., Perrard, J., Bullard, D., Tang, L., Shappell, S. B., Entman, M. L., Beaudet, A. L., and Ballantyne, C. M.. LFA-1 is sufficient in mediating neutrophil emigration in Mac-1-deficient mice. *J. Clin. Invest*. 1997; 99, 1340 – 1350.

- Lu W, Bhasin M, Tsirka SE. Involvement of tissue plasminogen activator in onset and effector phases of experimental allergic encephalomyelitis. *J Neurosci* 2002; 22:10781-10789.
- Lublin FD et al. Defining the clinical course of MS: results of an international survey. *Neurology* 1996;46:907-911.
- Lucchinetti CF, Bruck W, Rodriguez M, Lassmann H. Distinct patterns of multiple sclerosis pathology indicates heterogeneity on pathogenesis. *Brain Pathol.* 1996; 6:259–274.
- Luckenbill-Edds, L. Laminin and the mechanism of neuronal outgrowth. *Brain Res. Brain Res. Rev.* 1997; 23:1-27.
- Ludwig M, Wohn KD, Schleuning WD, Olek K. Allelic dimorphism in the human tissue type plasminogen activator gene as a result of Alu insertion/deletion event. *Hum genet* 1992; 88:388-92.
- Luo L. Rho GTPases in neuronal morphogenesis. *Nature Rev. Neurosci.* 2000; 1, 173-180.
- Luomala M, Elovaara I, Ukkonen M, Koivula T, Lehtimäki T. Plasminogen activator inhibitor 1 gene and risk of MS in women. *Neurology* 2000; 54:1862-1864.
- Lynch SG, Rose JW, Petajan JH, Stauffer D, Kamerath C, Leppert M. Discordance of T-cell receptor beta-chain genes in familial multiple sclerosis. *Ann Neurol* 1991; 30:402-10.
- Macko RF, Kittner SJ, Epstein A, Cox DK, Wozniak MA, Wityk RJ, Stern BJ, Sloan MA, Sherwin R, Price TR, McCarter RJ, Johnson CJ, Earley CJ, Buchholz DW, Stolley PD. Elevated tissue plasminogen activator antigen and stroke risk: the Stroke Prevention In Young Women Study. *Stroke.* 1999; 30:7–11.
- Maestrelli P, Boschetto P et al. Venous blood platelets decrease during allergen-induced asthmatic reactions. *Clin Exp Allergy* 1990; 20:367.
- Makarova A, Mikhailenko I, Bugge TH, List K, Lawrence DA, Strickland DK. The low density lipoprotein receptor-related protein modulates protease activity in the brain by mediating the cellular internalization of both neuroserpin and neuroserpin-tissue-type plasminogen activator complexes. *J Biol Chem* 2003; 278:50250-50258.
- Mansfield MW, Strickland MH, Grant PJ. Environmental and genetic factors in relation to elevated circulating levels of plasminogen activator inhibitor-1 in Caucasian patients with non-insulin-dependent diabetes mellitus. *Thromb Haemost.* 1995; 74:842–847.

Marrosu MG, Schirru L, Fadda E, Mancosu C, Lai M, Cocco E, Cucca F. ICAM-1 gene is not associated with multiple sclerosis in Sardinian patients. *J. Neurol* 2000; 247:677-80.

Martino G, Hartung HP. Immunopathogenesis of multiple sclerosis: the role of T cells. *Curr Opin Neurol* 1999;12:309-21.

Martinez-Naves E, Victoria-Gutierrez M, Uria DF, Lopez-Larrea C. The germline repertoire of T cell receptor beta-chain genes in multiple sclerosis patients from Spain. *J Neuroimmunol.* 1993;47(1):9-13.

Marzolo MP, von Bernhardi R, Bu GJ, Inestrosa NC. Expression of alpha(2)-macroglobulin receptor/low density lipoprotein receptor-related protein (LRP) in rat microglial cells. *J Neurosci Res* 2000; 60:401-411.

Matys T, Pawlak R, Matys E, Pavlides C, McEwen B, and Strickland S. Tissue plasminogen activator promotes the effects of corticotropin-releasing factor on the amygdala and anxiety-like behavior *PNAS* 2004; 101:16345-16350.

Matsubara Y, Murata M, Isshiki I, Watanabe R, Zama T, Watanabe G, Watanabe K, Ikeda Y. Genotype frequency of plasminogen activator inhibitor-1 (PAI-1) 4G/5G polymorphism in healthy Japanese males and its relation to PAI-1 levels. *Int J Hematol* 1999; 69:43-47.

Mattson, M. P., and Camandola, SNF-B in neuronal plasticity and neurodegenerative disorders. *J. Clin. Invest.* 2001; 107:247-254.

Maurer M, Kruse N, Giess R, Toyka KV, Rieckmann P. Genetic variation at position-1082-of the interleukin 10 (IL10) promoter and the outcome of multiple sclerosis. *J Neuroimmunol* 2000; 104:98-100.

Mazzieri R, Masiero L, Zanetta L, Monea S, Onisto M, Garbisa S, Mignatti P. Control of type IV collagenase activity by components of the urokinase-plasmin system: a regulatory mechanism with cell-bound reactants. *EMBO J.* 1997; 16:2319-2332.

McDonald WI, Compston A, Edan G, Goodkin D, Hartung HP, Lublin FM, Paty DW, Polman CH, Reingold SC, Sandberg-Wollheim M, Sibley W, Thompson A, Weinshenker BY, Wolinsky JS. Recommended diagnostic criteria for multiple sclerosis: guidelines from International Panel on the diagnosis of multiple sclerosis. *Ann Neurol* 2001; 50:121-127.

Medina M, Ledesma MD, Domínguez J, Medina M, Zafra D, Alameda F, and Navarro P. Tissue plasminogen activator mediates amyloid-induced neurotoxicity via Erk1/2 activation *EMBO J.* 2005; 24:1706-1716.

- Melchor JP, Pawlak R, Strickland S. The tissue plasminogen activator-plasminogen proteolytic cascade accelerates amyloid-beta (Abeta) degradation and inhibits Abeta-induced neurodegeneration. *J Neurosci* 2003; 23:8867–8871.
- Melchor JP, Pawlak R, Chen Z, Strickland S. The possible role of tissue-type plasminogen activator (tPA) and tPA blockers in the pathogenesis and treatment of Alzheimer's disease. *J. Mol. Neurosci.* 2003; 20:287–289.
- Midorikawa S, Sanada H, Hashimoto S, Watanabe T. Enhancement by homocysteine of plasminogen activator inhibitor-1 gene expression and secretion from vascular endothelial and smooth muscle cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 2000; 272:182-188.
- Miles LA, Ginsberg MH, White JG, Plow EF. Plasminogen interacts with human platelets through two distinct mechanisms. *Clin. Invest.* 1986; 77:2001-2009.
- Miles LA, Hess CM, Levin EC, Scanu AM, Plow E. FA potential basis for the thrombotic risks associated with lipoprotein(a). *Nature* 1989; 339:301-303.
- Miles LA, Plow, E. F. Lp(a): an interloper into the fibrinolytic system?. *Thromb. Haemost.* 1990; 63:331-335.
- Miller DH, Hornabrook RW, Purdie G. The natural history of multiple sclerosis: a regional study with some longitudinal data. *J. Neurol Neurosurg Psychiatry* 1992; 55:341-346.
- Milner R, Edwards G, Streuli C, ffrench-Constant C. A role in migration for the  $\alpha$ -1 integrin expressed on oligodendrocyte precursors. *J. Neurosci.* 1996; 16:7240–7252.
- Milner R, Wilby M, Nishimura S, Boylen K, Edwards G, Fawcett J, Streuli C, Pytela R, ffrench-Constant C. Division of labor of Schwann cell integrins during migration on peripheral nerve extracellular matrix ligands. *Dev. Biol.* 1997; 185:215-228.
- Milner R, Relvas JB, Fawcett J, ffrench-Constant C. Developmental regulation of  $\alpha$ v integrins produces functional changes in astrocyte behavior. *Mol. Cell. Neurosci.* 2001; 18:108-118.
- Minagar A, Alexander J.S. Blood-brain barrier disruption in multiple sclerosis. *Mult. Scler.* 2003; 9:540–549.
- Miterski B, Jaeckel S, Epplen JT, Pohlau D, Hardt C. The interferon gene cluster: a candidate region for MS predisposition? Multiple Sclerosis Study Group. *Genes Immun.* 1999; 1:37-44.

- Moestrup SK: The alpha(2)-macroglobulin receptor and epithelial glycoprotein-330-2 giant receptors mediating endocytosis of multiple ligands. *BBA-Rev Biomembranes* 1994; 1197:197-213 .
- Monard D. Cell-derived proteases and protease inhibitors as regulators of neurite outgrowth. *Trends Neurosci.* 1988; 11:541-4.
- Monteyne P, Guillaume B, Sindic CJ. B7-1 (CD80), B7-2 (CD86), interleukin-12 and transforming growth factor-beta mRNA expression in CSF and peripheral blood mononuclear cells from multiple sclerosis patients. *J Neuroimmunol.* 1998; 91:198-203.
- Moonen G, Grau-Wagemans MP, Selak I. Plasminogen activator-plasmin system and neuronal migration. *Nature.* 1982; 298:753-5.
- Morgenstern E, Gnad U, Preissner KT, Dierichs R, Belleli A, Chestukhin A, Schwartz I, Shaltiel S. Localization of protein kinase A and vitronectin in resting platelets and their translocation onto fibrin fibers during clot formation. *Eur. J. Cell Biol.* 2001; 80:87–98.
- Mulligan MS, Varani J, Dame MK, Lane CL, Smith CW, Anderson DC, Ward PA. Role of endothelial-leukocyte adhesion molecule 1 (ELAM-1) in neutrophil-mediated lung injury in rats. *J Clin Invest.* 1991; 88:1396-406.
- Mycko MP, Kwinkowski M, Tronczynska E, Szymanska B, Selmaj KW. Multiple sclerosis: the increased frequency of the ICAM-1 exon 6 gene point mutation genetic type K469. *Ann Neurol.* 1998; 44(1):70-5.
- Nagai T, Yamada K, Yoshimura M, Ishikawa K, Miyamoto Y, Hashimoto K, Noda Y, Nitta A, Nabeshima T. The tissue plasminogen activator-plasmin system participates in the rewarding effect of morphine by regulating dopamine release. *Proc Natl Acad Sci.* 2004; 101:3650-5.
- Nagai T, Kamei H, Ito M, Hashimoto K, Takuma K, Nabeshima T, Yamada K. Modification by the tissue plasminogen activator-plasmin system of morphine-induced dopamine release and hyperlocomotion, but not anti-nociceptive effect in mice. *J Neurochem.* 2005; 93:1272-9.
- Nagamine Y, Medcalf RL, Muñoz-Cánoves P. Transcriptional and posttranscriptional regulation of the plasminogen activator system. *Thromb Haemost.* 2005; 93:661-75.
- Nagata K, Nakajima K, Kohsaka S. Plasminogen promotes the development of rat mesencephalic dopaminergic neurons in vitro. *Brain Res Dev Brain Res.* 1993; 75:31-7.
- Nakajima K, Tsuzaki N, Nagata K, Takemoto N, Kohsaka S. Production and secretion of plasminogen in cultured rat brain microglia. *FEBS Lett.* 1992; 308:179–182.

Nakajima K, Reddington M, Kohsaka S, Kreutzberg GW. Induction of urokinase-type plasminogen activator in rat facial nucleus by axotomy of the facial nerve. *J Neurochem.* 1996; 66:2500-2505.

Nakajima A, Yamada K, He J, Zeng N, Nitta A, Nabeshima T. Anatomical substrates for the discriminative stimulus effects of methamphetamine in rats. *J Neurochem.* 2004; 9:308-17.

Nakajima K, Tohyama Y, Kurihara T, Kohsaka S. Enhancement of urokinase-type plasminogen activator (uPA) secretion, but not that of substrate plasminogen (PGn), by rat microglia stimulated with neuronal conditioned medium. *Neurosci Lett.* 2005; 378:13-7.

Narita M, Bu GJ, Holtzman DM, Schwartz AL: The low-density lipoprotein receptor-related protein, a multifunctional apolipoprotein E receptor, modulates hippocampal neurite development. *J Neurochem* 1997; 68:587-595.

Navikas V, Link H. Review: cytokines and the pathogenesis of multiple sclerosis. *J Neurosci Res* 1996; 45:322-333.

Navratil E, Couvelard A, Rey A, Henin D, Scoazec JY. Expression of cell adhesion molecules by microvascular endothelial cells in the cortical and subcortical regions of the normal human brain: an immunohistochemical analysis. *Neuropathol. Appl. Neurobiol.* 1997; 23:68 – 80.

Nelissen I, Vandenbroeck K, Fiten P, Hillert J, Olsson T, Marrosu MG, Opdenakker G. Polymorphism analysis suggests that the gelatinase B gene is not a susceptibility factor for multiple sclerosis. *J. Neuroimmunol* 2000; 105:58-63.

Nelissen I, Martens E, Van den Steen PE, Proost P, Ronsse I, Opdenakker G. Gelatinase B/matrix metalloproteinase-9 cleaves interferon-beta and is a target for immunotherapy *Brain* 2003; 126:1371-1381.

Neuhoff H, Roeper J, Schweizer M. Activity-dependent formation of perforated synapses in cultured hippocampal neurons. *Eur J Neurosci.* 1999;11:4241-50.

Nicole O, Docagne F, Ali C, Margail I, Carmeliet P, MacKenzie E, Vivien D, Buisson A. The proteolytic activity of tissue-plasminogen activator enhances NMDA receptor-mediated signaling. *Nat Med.* 2001; 7:59–64.

Nicole O, Goldshmidt A, Hamill CE, Sorensen SD, Sastre A, Lyuboslavsky P, Hepler JR, McKeon RJ, Traynelis SF. Activation of protease-activated receptor-1 triggers astroglial injury after brain injury. *J Neurosci.* 2005; 25:4319-29.

- Niino M, Kikuchi S, Fukazawa T, Yabe I, Sasaki H, Tashiro K. Heat shock protein 70 gene polymorphism in Japanese patients with multiple sclerosis. *Tissue Antigens* 2001; 58:93-6
- Nilius B, Gerke V, Prenen J, Szucs G, Heinke S, Weber K, Droogmans G: Annexin II modulates volume-activated chloride currents in vascular endothelial cells. *J Biol Chem* 1996; 271:30631-30636.
- Noseworthy J, Lucchinetti C, Rodriguez M. Multiple Sclerosis. *N Engl J Med* . 2000; 343: 938-952.
- Nowak-Göttl U, Sträter R, Kosch A, von Eckardstein R, Luigs P, Nabel P, Vielhaber H, Kurnik K, Junker R. The plasminogen activator inhibitor (PAI)-1 promoter 4G/4G genotype is not associated with ischemic stroke in a population of German children. *Eur J Haematol*. 2001; 66:57-62.
- Novick GE, Novick CC, Yunis J, Yunis E, Antunez de Mayolo P, Scheer WD, Deininger PL, Stoneking M, York DS, Batzer MA, Herrera RJ. Polymorphic Alu insertions and the Asian origin of Native American populations. *Hum Biol*. 1998; 70:23-39.
- Nygard O, Vollset SE, Refsum H, Stensvold I, Tverdal A, Nordrehaug JE, Ueland M, Kvale G. Total plasma homocysteine and cardiovascular risk profile. The Hordaland Homocysteine Study. *JAMA*. 1995; 274:1526-33.
- Nygaard ST, Haugland HK, Kristoffersen EK, Lundjohansen M, Laerum OD, Tysnes OB. Expression of annexin II in glioma cell lines and in brain tumor biopsies. *J Neuro-Oncol*. 1998; 38:11-18.
- Onodera H, Nakashima I, Fujihara K, Nagata T, Itoyama Y. Elevated plasma level of plasminogen activator inhibitor-1 (PAI-1) in patients with relapsing-remitting multiple sclerosis. *Tohoku J. Exp. Med*. 1999; 189:259-265.
- Osterwalder T, Contartese J, Stoeckli ET, Kuhn TB, Sonderegger P. Neuroserpin, an axonally secreted serine protease inhibitor. *EMBO J*. 1996; 15:2944-53.
- Paterson PY, Koh CS, Kwaan HC. Role of the clotting system in the pathogenesis of neuroimmunologic disease. *Fed Proc*. 1987; 46:91-6.
- Paty DW, Li DK, Oger JJ, Kastrukoff L, Koopmans R, Tanton E, Zhao GJ. Magnetic resonance imaging in the evaluation of clinical trials in multiple sclerosis. *Ann Neurol*. 1994; 36 Suppl:S95-6.
- Pawlak R and Strickland S. Tissue plasminogen activator and seizures: a clot-bluster's secret life. *J Clin Invest*. 2002; 12:1529-1531.

Pawlak R, Rao BS, Melchor JP, Chattarji S, McEwen B, Strickland S. Tissue plasminogen activator and plasminogen mediate stress-induced decline of neuronal and cognitive functions in the mouse hippocampus. *Proc Natl Acad Sci.* 2005; 102:18201-6.

Pedersen-Bjergaard J, Timshel S, Andersen MK, Andersen AS, Philip P. Cytogenetically unrelated clones in therapy-related myelodysplasia and acute myeloid leukemia: experience from the Copenhagen series updated to 180 consecutive cases. *Genes Chromosomes Cancer.* 1998; 23:337-49.

Pérez RL, Ritzenthaler JD, Roman J. Transcriptional regulation of the interleukin-1 $\beta$  promoter via fibrinogen engagement of the CD 18 integrin receptor. *Am. J. Respir Cell Mol. Biol.* 1999; 20:1059-1066.

Perry, V. H., Hume, D. A., and Gordon, S. Immunohistochemical localization of macrophages and microglia in the adult and developing mouse brain. *Neuroscience* 1985; 15:313 – 326.

Persico AM, D'Agruma L, Maiorano N, Totaro A, Militerni R, Bravaccio C, Wassink TH, Schneider C, Melmed R, Trillo S, Montecchi F, Palermo M, Pascucci T, Puglisi-Allegra S, Reichelt KL, Conciatori M, Marino R, Quattrocchi CC, Baldi A, Zelante L, Gasparini P, Keller F. Collaborative Linkage Study of Autism. Reelin gene alleles and haplotypes as a factor predisposing to autistic disorder. *Mol Psychiatry.* 2001; 6:150-159.

Pesheva P, Probstmeier R. The yin and yang of tenascin-R in CNS development and pathology. *Prog. Neurobiol.* 2000; 61:465-493.

Peters RJG, Boekholdt SM. Gene Polymorphisms and the Risk of Myocardial Infarction- An Emerging Relation. *N Engl J Med* 2002; 347:1963-1965.

Petti TP, Henry K. Teng, Eugene Zaitsev, Newton T. Woo, Kazuko Sakata, Shushuang Zhen, Kenneth K. Teng, Wing-Ho Yung, Barbara L. Hempstead, Bai Lu Cleavage of proBDNF by tPA/Plasmin Is Essential for Long-Term Hippocampal Plasticity *Science* 2002; 306:487-491.

Pickard C, Mann C, Sinnott P, Boggild M, Hawkins C, strange RC, Olliver WE, Donn RP. Interleukin-10 promoter polymorphisms and multiple sclerosis. *J. Neuroimmunol* 1999; 101:201-10.

Pindon, A., Hantai, D., Jandrot-Perrus, M., and Festoff, B. W. Novel expression and localization of active thrombomodulin on the surface of mouse brain astrocytes. *Glia* 1997; 19:259-268.

Pires Neto MA, Braga-de-Souza S, Lent R. Extracellular matrix molecules play diverse roles in the growth and guidance of central nervous system axons. *Braz. J. Med. Biol. Res.* 1999; 32: 633 – 638.

Pitt D, Werner P, Raine C. Glutamate excitotoxicity in a model of multiple sclerosis. *Nat Med.* 2000; 6:67-70.

Pluskota E, D'Souza SE. Fibrinogen interaction with ICAM-1 regulate endothelial cell survival. *Eur J. Biochem.* 2000; 267:4693-4704

Pluskota E, Stenina OI, Krukovets I, Szpak D, Topol EJ, Plow EF. Mechanism and effect of thrombospondin-4 polymorphisms on neutrophil function. *Blood.* 2005 ;106:3970-8.

Polman CH, Reingold SC, Edan G, Filippi M, Hartung HP, Kappos L, Lublin FD, Metz LM, McFarland HF, O'Connor PW, Sandberg-Wollheim M, Thompson AJ, Weinshenker BG, Wolinsky JS. Diagnostic criteria for multiple sclerosis: 2005 revisions to the "McDonald Criteria". *Ann Neurol.* 2005;58:840-6

Ponnura K, Bowden MG, Davis S., Gurusiddappa S, Moore D, Choe D, Xu Y, Hook M, Narayana SV. A "dock, lock, and latch" structural model for a staphylococcal adhesin binding to fibrinogen. *Cell.* 2003; 115:217–228.

Popovich P.G, Horner P.J, Mullin B.B, Stokes BT. A quantitative spatial analysis of the blood–spinal cord barrier. I. Permeability changes after experimental spinal contusion injury. *Exp. Neurol.* 1996; 142:258–275.

Poser CM, Paty DW, Scheinberg L, McDonald WI, Davis FA, Ebers GC, Johnson KP, Sibley WA, Silberberg DH, Tourtellotte WW. New diagnostic criteria for multiple sclerosis: guidelines for research protocols. *Ann Neurol.* 1983; 13:227-31

Poskitt TR, Poskitt PKF. Thrombocytopenia in sepsis: the role of circulation IgG-containing immune complexes. *Arch Intern Med* 1985; 145:891.

Prineas JW, Barnard RO, Revesz T, Kwon EE, Sharer L, Cho ES. Multiple sclerosis. Pathology of recurrent lesions. *Brain* 1993; 116:681-93.

Qian Z, Gilbert ME, Colicos MA, Kandel ER, Kuhl D. Tissue plasminogen activator is induced as an immediate-early gene during seizure, kindling and long-term potentiation. *Nature* 1993; 361:453-456.

Raine C.S, Barnett L.B., Brown A, Behar T, McFarlin DE. Neuropathology of experimental allergic encephalomyelitis in inbred strains of mice. *Lab. Invest.* 1980; 43: 150–157

Ramsaransing GS, Fokkema MR, Teelken A, Arutjunyan AV, Koch M, De Keyser J. Plasma homocysteine levels in multiple sclerosis. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 2006; 77: 189-192.

Rasmussen HB, Kelly MA, Francis Da, Clausen J. CTLA 4 in multiple sclerosis. Lack of genetic association in a European Caucasian population but evidence of interaction with HLA-DR2 among Shanghai Chinese. *J Neurol Sci* 2001; 184:143-147.

Rao BS, Desiraju T, Raju TR. Neuronal plasticity induced by self-stimulation rewarding experience in rats--a study on alteration in dendritic branching in pyramidal neurons of hippocampus and motor cortex. *Brain Res.* 1993; 627:216-24.

Reboul J, Mertens C, Levillayer F, Eichenbaum-Voline S, Vilcoren T, Cournu I, Babron MC, Lyon-Caen O, Edan G, Clanet M, Brahic M, Bureau JF, Fontaine B, Liblau R. Cytokines in genetic susceptibility to multiple sclerosis: a candidate gene approach. French Multiple Sclerosis Genetics Group. *J Neuroimmunol* 2000; 102:107-112.

Reeves SA, Chavez-Kappel C, Davis R, Rosenblum M, Israel MA: Developmental regulation of annexin-II (lipocortin-2) in human brain and expression in high-grade glioma. *Cancer Res* 1992; 52:6871-6876.

Reiner AP, Schwartz SM, Frank MB, Longstreth WT, Hindorff LA, Teramura G, Rosendaal FR, Gaur LK, Psaty BM, Siscovick DS. Polimorphism of coagulation factor XIII subunit A and risk of nonfatal hemorrhagic stroke in young white women. *Stroke* 2001; 32:2580-2587.

Reinhard E, Suidan HS, Pavlik A, Monard D. Glia-derived nexin/protease nexin-1 is expressed by a subset of neurons in the rat brain. *J Neurosci Res.* 1994; 37:256-70.

Relvas JB, Setzu A, Baron W, Buttery PC, LaFlamme SE, Franklin RJ, ffrench-Constant C. Expression of dominant-negative and chimeric subunits reveals an essential role for beta1 integrin during myelination. *Curr. Biol.* 2001; 11:353-359.

Riccio A, Lund LR, Sartorio R, Lania A, Andreasen PA, Dano K, Blasi F. The regulatory region of the human plasminogen activator inhibitor type-1 (PAI-1) gene. *Nucleic Acids Res.* 1988; 16:2805-24.

Ridker PM, Hennekens CH, Stampfer MJ, Manson JE, Vaughan DE. Prospective study of endogenous tissue plasminogen activator and risk of stroke. *Lancet.* 1994; 343:940-943.

Ridker PM, Baker MT, Hennekens CH, Stampfer MJ, Vaughan DE. Alu-repeat polymorphism in the gene coding for tissue-type plasminogen activator (t-PA) and risks of myocardial infarction among middle-aged men. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1997; 17:1687-90.

Ridker PM. Intrinsic fibrinolytic capacity and systemic inflammation: novel risk factors for arterial thrombotic disease. *Haemostasis.* 1997; 27:2-11.

Ringdahl U, Svensson H.G, Kotarsky H, Gustafsson M, Weineisen M, Sjobring U. A role for the fibrinogen-binding regions of streptococcal M proteins in phagocytosis resistance. *Mol. Microbiol.* 2000; 37:1318–1326.

Robert Pawlak, B. S. Shankaranarayana Rao, Jerry P. Melchor, Sumantra Chattarji, Bruce McEwen, and Sidney Strickland Tissue plasminogen activator and plasminogen mediate stress-induced decline of neuronal and cognitive functions in the mouse hippocampus *PNAS* 2005; 102:18201-18206.

Roberts H.C., Roberts T.P, Brasch R.C, Dillon W.P. Quantitative measurement of microvascular permeability in human brain tumors achieved using dynamic contrast-enhanced MR imaging: Correlation with histologic grade. *AJNR.* 2000; 21:891–899.

Rodríguez M, Miller DJ, Lennon VA. Immunoglobulins reactive with myelin basic protein promote CNS remyelination. *Neurology* 1996; 46:538-545.

Rodríguez M. Multiple sclerosis: insights into molecular pathogenesis and therapy. *Mayo Clin Proc.* 1997; 72:663-4

Roest M, van der Schouw YT, Banga JD, Tempelman MJ, de Groot PG, Sixma JJ et al. Plasminogen activator inhibitor 4G polymorphism is associated with decreased risk of cerebrovascular mortality in older women. *Circulation* 2000; 101: 67–70.

Roest M, Banga JD. Editorial comment-- genetic make-up for increased PAI-1 expression protects against stroke. *Stroke.* 2003; 34:2828-9.

Rogister B, Ben-Hur T, Dubois-Dalcq M. From neural stem cells to myelinating oligodendrocytes. *Mol Cell Neurosci.* 1999;14(4-5):287-300.

Rogister B, Belachew S, Moonen G. Oligodendrocytes: from development to demyelinated lesion repair. *Acta Neurol Belg.* 1999; 99:32-9.

Rogove AD, Siao C, Keyt B, Strickland S, Tsirka SE. Activation of microglia reveals a non-proteolytic cytokine function for tissue plasminogen activator in the central nervous system. *J. Cell Sci* 1999; 284:647-50.

Rosell A, Alvarez-Sabin J. et al. A matrix metalloproteinase protein array reveals a strong relation between MMP-9 and MMP-13 in human stroke. *Stroke* 2005; 36:1415-1420.

Rosenberg GA, Dencoff JE, Correa N Jr, Reiners M, Ford CC. Effect of steroids on CSF matrix metalloproteinases in multiple sclerosis: relation to blood-brain barrier injury. *Neurology* 1996a; 46:1626– 1632.

Rosenberg GA, Cunningham LA, Wallace J, Alexander S, Estrada EY, Grossetete M, Razhagi A, Miller K, Gearing A. Immunohistochemistry of matrix metalloproteinases in

reperfusion injury to rat brain: activation of MMP-9 linked to stromelysin-1 and microglia in cell cultures. *Brain Res* 2001a; 893:104–112.

Rosenberg GA, Sullivan N, Esiri MM. White matter damage is associated with matrix metalloproteinases in vascular dementia. *Stroke* 2001b; 32:1162–1168.

Sahni, A. and Francis, C.W. Vascular endothelial growth factor binds to fibrinogen and fibrin and stimulates endothelial cell proliferation. *Blood* 2000; 96:3772–3778

Sahni A, Odrlijin T, Francis CW. Binding of basic fibroblast growth factor to fibrinogen and fibrin. *J. Biol. Chem.* 1998; 273:7554–7559.

Sahni, A., Sporn, L.A., and Francis, C.W. Potentiation of endothelial cell proliferation by fibrin(ogen)-bound fibroblast growth factor-2. *J. Biol. Chem.* 1999; 274:14936–14941.

Sallés FJ, Strickland S. Localization and regulation of the tissue plasminogen activator-plasmin system in the hippocampus. *J Neurosci* 2002; 22:2125-2134.

Sans E, Delachanal E, Duperray A. Analysis of the roles of ICAM-1 in neutrophil transmigration using a reconstituted mammalian cell expression model: implication of ICAM-1 cytoplasmic domain and Rho-dependent signaling pathway. *J. Immunol* 2001; 166: 544-511.

Sappino AP, Madani R, Huarte J, Belin D, Kiss JZ, Wohlwend A, Vassalli JD. Extracellular proteolysis in adult murine brain. *J. Clin. Invest* 1993; 92:679-85.

Sartori MT, Danesin C, Saggiorato G, Tormene D, Simioni P, Spiezia L, Patrassi GM, Girolami A. The PAI-1 gene 4G/5G polymorphism and deep vein thrombosis in patients with inherited thrombophilia. *Clin Appl Thromb Hemost.* 2003; 9:299-307.

Scanu A. Lipoprotein(a): a genetic risk factor for premature coronary heart disease. *JAMA* 1992; 267:3326-3329.

Scarlsbrick IA, Blaber SI, Lucchinetti CF, Genain CP, Blaber M, Rodriguez M. Activity of a newly identified serine protease in CNS demyelination. *Brain.* 2002; 125:1283-96.

Scarpati, E. M., and Sadler, J. E. Regulation of endothelial cell coagulant properties. Modulation of tissue factor, plasminogen activator inhibitors, and thrombomodulin by phorbol 12-myristate 13-acetate and tumor necrosis factor. *J. Biol. Chem.* 264, 20705-20713.

Schmidt S, Papanastropoulos a, Bagli M, Harzheim M, Heun R, Klockgether. No association of serum levels of interleukin-6 and its soluble receptor components with a genetic variation in the 3' flanking region of the interleukin-6 in patients with multiple sclerosis. *Neurosci Lett* 2000;294:139-142.

Schmidt VA, Scudder L, Devoe CE, Bernards A, Cupit LD, Bahou WF. IQGAP2 functions as a GTP-dependent effector protein in thrombin-induced platelet cytoskeletal reorganization. *Blood*. 2002; 15:3021-8.

Schrijver HM, Crusius JB, Uitdehaag BM, Garcia Gonzalez MA, Kostense PJ, Polman CH, Pena AS. Association of interleukin-1beta and interleukin-1 receptor antagonist genes with disease severity in MS. *Neurology* 1999; 52:595-9.

Schorr K. Aspirin and platelets: the antiplatelet action of aspirin and its role in thrombosis treatment and prophylaxis. *Thromb Haemos* 1997; 23:349-56.

Sciacca FL, Ferri C, Vandebroek K, Veglia F, Gobbi C, Martinelli F, Franciotta D, Marrosu M, Martino G, Martinelli V, Comi G, Canal N, Grimaldi LM. Relevance of interleukin 1 receptor antagonist intron 2 polymorphism in Italian MS patients. *Neurology* 1999; 52:1896-8.

Sciacca FL, Ciusani E, Silvani A, Corsini E, Frigerio S, Pogliani S, Parati E, Croci D, Boiardi A, Salmaggi A. Genetic and plasma marker of venous thromboembolism in patients with high grade glioma. *Clin Cancer Res* 2004; 15:1312-7.

Seboun E, Robinson MA, Doolittle TH, Ciulla TA, Kindt TJ, Hauser SL. A susceptibility locus for multiple sclerosis is linked to the T cell receptor beta chain complex. *Cell* 1989; 57:1095-100.

Seboun E, Oksenberg JR, Rombos A, Usuku K, Goodkin DE, Lincoln RR, Wong M, Pham-Dinh D, Boesplug-Tanguy O, Carsique R, Fitoussi R, Gartioux C, Reyes C, Ribierre F, Faure S, Fizames C, Gyapay G, Weissenbach J, Dautigny A, Rimmler JB, Garcia ME, Pericak-Vance MA, Haines JL, Hauser SL. Linkage analysis of candidate myelin genes in familial multiple sclerosis. *Neurogenetics*. 1999; 2:155-62.

Seeds NW, Williams BL, Bickford PC. Tissue plasminogen activator induction in Purkinje neurons after cerebellar motor learning. *Science* 1995; 270:1992-1994.

Seeds NW, Friedman G, Hayden S, Thewke D, Haffke S, McGuire P, Krystosek A: Plasminogen activators and their interaction with the extracellular matrix in neural development, plasticity and regeneration. *Semin Neurosci* 1996; 8:405-412 .

Seeds NW, Basham ME, Haffke SC Neuronal migration is retarded in mice lacking the tissue plasminogen activator gene. *Proc Natl Acad Sci*. 1999; 96:14118-14123

Seitz R.J, Wechsler W. Immunohistochemical demonstration of serum proteins in human cerebral gliomas. *Acta Neuropathol*. 1987; 73:145-152.

Seshadri S, Beiser A, Selhub J, Jacques PF, Rosenberg IH, D'Agostino RB, Wilson PW, Wolf PA. Plasma homocysteine as a risk factor for dementia and Alzheimer's disease. *N Engl J Med*. 2002; 346:476-83.

Siao CJ, Tsirka SE. Tissue plasminogen activator mediates microglial activation via its finger domain through annexin II. *J Neurosci* 2002; 22:3352-3358.

Siao CJ, Fernandez S, Tsirka SE. Cell Type-Specific Roles for Tissue Plasminogen Activator Released by Neurons or Microglia after Excitotoxic Injury *The Journal of Neuroscience* 2003; 23:3234.

Siconolfi, L. B., and Seeds, N. W. Mice lacking tPA, uPA, or plasminogen genes showed delayed functional recovery after sciatic nerve crush. *J. Neurosci.* 2001; 21, 4348 – 4355.

Siever DA, Erickson HP. Extracellular annexin II. *Int J Biochem Cell B* 1997; 29:1219-1223.

Silver J, Miller JH. Regeneration beyond the glial scar. This review discusses the consequences of glial scar formation after CNS injury and examines recent strategies aimed at facilitating CNS regeneration. *Nat. Rev. Neurosci.* 2004; 5:146–156.

Smalheiser NR, Krueger JM, Larson JR, Ruiz JF, Strickland DK. Reelin is a substrate for plasminogen activator and plasmin in vitro. *Soc Neurosci Abs.* 2001;31:662.

Smiley ST, King JA, Hancock WW. Fibrinogen stimulates macrophage chemokine secretion through toll-like receptor 4. *J Immunol.* 2001; 167:2887-94.

Smith DB, Janmey PA, Herbert TJ, Lind SE. Quantitative measurement of plasma gelsolin and its incorporation into fibrin clots. *J. Lab. Clin. Med.* 1987; 110:189–195.

Smith FB, Lee AJ, Fowkes FG, Price JF, Rumley A, Lowe GD. Hemostatic factors as predictors of ischemic heart disease and stroke in the Edinburgh Artery Study. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 1997; 17:3321–3325.

Sobel RA, Schneeberger E.E, Colvin RB. The immunopathology of acute experimental allergic encephalomyelitis. V.A light microscopic and ultrastructural immunohistochemical analysis of fibronectin and fibrinogen. *Am. J. Pathol.* 1988; 131: 547–558.

Soff GA, Jackman RW, Rosenberg RD. Expression of thrombomodulin by smooth muscle cells in culture: different effects of tumor necrosis factor and cyclic adenosine monophosphate on thrombomodulin expression by endothelial cells and smooth muscle cells in culture. *Blood.* 1991; 77:515-8.

Sosa-Enríquez M, León Betáncor P, Rosas P et al. La Esclerosis Múltiple en la provincia de Las Palmas. *Arch. Neurobiol.* 1983; 46:161-166.

Souto JC, Almasy L, Borrell M, Gari M, Martinez E, Mateo J, Stone WH, Blangero J, Fontcuberta J. Genetic determinants of hemostasis phenotypes in Spanish families. *Circulation* 2000; 101:1546-51.

Standinger T, Lacker GT, Frass M. Management of acquired coagulation disorders in emergency and intensive care medicine. *Semin Thromb Hemost* 1996; 22 (1):93-104.

Stariha RL, Kikuchi S, Siow YL, Pelech SL, Kim M, Kim SU. Role of extracellular signal-regulated protein kinases 1 and 2 in oligodendroglial process extension. *J. Neurochem.* 1997; 68, 945-953.

Steeds R, Adams M, Smith P, Channer K, Samani NJ. Distribution of tissue plasminogen activator insertion/deletion polymorphism in myocardial infarction and control subjects. *Thromb Haemost.* 1998; 79:980-4.

Steinman L. Multiple Sclerosis: a coordinated immunological attack against myelin in the central nervous system. *Cell* 1996; 85:299-302.

Stitt TN, Conn G, Gore M, Lai C, Bruno J, Radziejewski C, Mattsson K, Fisher J, Gies DR, Jones PF, et al. The anticoagulation factor protein S and its relative, Gas6, are ligands for the Tyro 3/Axl family of receptor tyrosine kinases. *Cell.* 1995; 80:661-70.

Storch M, Lassmann H. Pathology and pathogenesis of demyelinating disease. *Curr Opin Neurol* 1997;10:186-92.

Stricker, R. B., Wong, D., Shiv, D. I., Reyes, P. T., and Shuman, M. A. Activation of plasminogen by tissue plasminogen activator on normal and thrombasthenic platelets: effects on surface proteins and platelet aggregation. *Blood* 1986;68: 275-280.

Strickland S. Tissue plasminogen activator in Nervous System function and dysfunction. *Thromb Haemost* 2001;86:138-143.

Sudha Seshadri, M.D., Alexa Beiser, Ph.D., Jacob Selhub, Ph.D., Paul F. Jacques, Sc.D., Irwin H. Rosenberg, M.D., Ralph B. D'Agostino, Ph.D., Peter W.F. Wilson, M.D., and Philip A. Wolf, M.D. Plasma Homocysteine as a Risk Factor for Dementia and Alzheimer's Disease. *N Engl J Med.* 2002; 346: 466-467.

Sumii, T. & Lo, E.H. Involvement of matrix metalloproteinase in thrombolysis-associated hemorrhagic transformation after embolic focal ischemia in rats. *Stroke* 2002; 33: 831-836.

Tabrizi P, Wang L, Seeds N, McComb JG, Yamada S, Griffin JH, Carmeliet P, Weiss MH, Zlokovic BV. Tissue plasminogen activator (tPA) deficiency exacerbates cerebrovascular fibrin deposition and brain injury in a murine stroke model: studies in tPA-deficient mice and wild-type mice on a matched genetic background. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1999; 19:2801-6.

Takada A, Takada Y, Urano T. The physiological aspects of fibrinolysis. *Thromb Res* 1994;76:1-31.

Taku Nagai, Kiyofumi Yamada, Masako Yoshimura, Kazuhiro Ishikawa, Yoshiaki, Miyamoto, Kazuki Hashimoto, Yukihiro Noda, Atsumi Nitta, and Toshitaka Nabeshima. The tissue plasminogen activator-plasmin system participates in the rewarding effect of morphine by regulating dopamine release *PNAS* 2004; 101: 3650-5

Teesalu T, Hinkkanen AE, Vaehri A: Coordinated induction of extracellular proteolysis systems during experimental autoimmune encephalomyelitis in mice. *Am J Pathol* 2001; 159:2227-2237.

Teesalu T, Kulla A, Asser T, Koskiniemi M, Vaehri A. Tissue plasminogen activator as a key effector in neurobiology and neuropathology. *Biochem. Soc. Trans.* 2002; 30:183–189.

Thomas W.S, Mori E., Copeland B.R., Yu J.Q, Morrissey J.H, del Zoppo G.J. Tissue factor contributes to microvascular defects after focal cerebral ischemia. *Stroke* 1993; 24:847–853.

Tienari PJ, Kuokkanen S, Pastinen T, Wikstrom J, Sajantila A, Sandberg-Wollheim M, Palo J, Peltonen L. Golli-MBP gene in multiple sclerosis susceptibility. *J Neuroimmunol.* 1998; 81:158-67.

Tietze, L., Elbrecht, A., Schauerte, C., Klosterhalfen, B., Amo- Takyi, B., Gehlen, J., Winkeltau, G., Mittermayer, C., and Handt, S.. Modulation of pro- and antifibrinolytic properties of human peritoneal mesothelial cells by transforming growth factor -1 (TGF-1), tumor necrosis factor  $\alpha$  (TNF-  $\alpha$ ) and interleukin 1(IL- 1). *Thromb. Haemost.* 1998; 79: 362 – 370.

Tishkoff SA, Ruano G, Kidd JR, Kidd KK. Distribution and frequency of a polymorphic Alu insertion at the plasminogen activator locus in humans. *Hum Genet.* 1996; 97:759-64.

Tooyama I, Kawamata T, Akiyama H, Kimura H, Moestrup SK, Gliemann J, Matsuo A, McGeer PL: Subcellular localization of the low density lipoprotein receptor-related protein ( $\alpha$ 2-macroglobulin receptor) in human brain. *Brain Res* 1995; 691:235-238.

Trapp BD, Peterson J, Ransohoff RM Bo L. Axonal transection in the lesions of multiple sclerosis. *N. Engl J Med* 1998; 338:278-85.

Tsirka S, Gualandris A, Amaral DG, Strickland S. Excitotoxin-induced neuronal degeneration and seizure are mediated by tissue plasminogen activator. *Nature* 1995; 377:340-344.

- Tsirka S, Rogove AD, Strickland S. Neuronal cell death and tPA. *Nature* 1996; 384:123-4.
- Tsirka S, Rogove AD, Bugge TH, Degen JL, Strickland S. An extracellular proteolytic cascade promotes neuronal degeneration in the mouse hippocampus. *J. Neurosci.* 1997; 17:543-552.
- Tsirka SE, Bugge TH, Degen JL, Strickland S. Neuronal death in the central nervous system demonstrates a non-fibrin substrate for plasmin. *Proc Natl Acad Sci.* 1997;94:9779-81.
- Tsukada N, Matsuda M, Miyagi K, Yanagisawa N. Thrombomodulin in the sera of patients with multiple sclerosis and human lymphotropic virus type-1-associated myelopathy. *J Neuroimmunol.* 1995; 56:113-6.
- Tucker HM, Kihiko M, Caldwell JN, Wright S, Kawarabayashi T, Price D, Walker D, Scheff S, McGillis JP, Rydel RE, Estus S. The plasmin system is induced by and degrades amyloid-beta aggregates. *J Neurosci* 2000a; 20:3937–3946.
- Tucker HM, Kihiko-Ehmann M, Wright S, Rydel RE, Estus S. Tissue plasminogen activator requires plasminogen to modulate amyloid-beta neurotoxicity and deposition. *J Neurochem* 2000b; 75:2172–2177.
- Ugarova, T. P., Budzynski, A. Z., Shattil, S. J., Ruggeri, Z. M., Vincent, V. A., Lowik, C. W., Verheijen, J. H., de Bart, A. C., Tilders, F. J., and Van Dam, A. M. Role of astrocyte-derived tissue-type plasminogen activator in the regulation of endotoxin-stimulated nitric oxide production by microglial cells. *Glia* 1998; 22:130 – 137.
- Uhm JH, Dooley NP, Oh LY, Yong VW. Oligodendrocytes utilize a matrix metalloproteinase, MMP-9, to extend processes along an astrocyte extracellular matrix. *Glia.* 1998; 22:53-63.
- Van der Bom JG, de Knijff P, Haverkate F, Bots ML, Meijer P, deJong PTVM, Hofman A, Kluft C, Grobbee DE. Tissue plasminogen activator and risk of myocardial infarction: the Rotterdam study. *Circulation.* 1997; 95:2623–2627.
- Van der Bom JG, Bots ML, Haverkate F, Kluft C, Grobbee DE. The 4G5G polymorphism in the gene for PAI-1 and the circadian oscillation of plasma PAI-1. *Blood* 2002; 24:342-347
- Vandenbroeck K, Goris a, Murru R et al. Occurrence and clinical relevance of interleukin-4 gene polymorphism in patients with multiple sclerosis. *J Neuroimmunol* 2000; 76:189-192.

- Vandenbroeck K, Fiten P, Ronsse I, Goris A, Perru I, Melis C, Billiau A, Marrosu MG, Opendakker G. High-resolution analysis of IL-6 minisatellite polymorphism in Sardinian multiple sclerosis: effect on course and onset of disease. *Genes Immun* 2000; 1:460-463.
- Vandenbroeck K, Fiten P, Heggarty S, Goris A, Cocco E, Hawkins SA, Graham CA, Marrosu MG, Opendakker G. Chromosome 7q21-22 and multiple sclerosis: evidence for a genetic susceptibility effect in vicinity to the protachykinin-1 gene. *J Neuroimmunol.* 2002; 125:141-8.
- Vandevyver C, Gu XX, Geusens P, Spaepen M, Philippaerts L, Cassiman JJ, Raus J. HLA class II and T-cell receptor beta chain polymorphisms in Belgian patients with rheumatoid arthritis: no evidence for disease association with the TCRBC2, TCRBV8 and TCRBV11 polymorphisms. *Ann Rheum Dis.* 1994; 53:580-6.
- Van den Eijnden DH, Neeleman AP, Van der Knaap WP, Bakker H, Agterberg M, Van Die I. Control and function of complex-type oligosaccharide synthesis. Novel variants of the lacNAc pathway. *Adv Exp Med Biol.* 1995; 376:47-52
- Van de Wouwer M, Collen D, Conway EM. Thrombomodulin-protein C-EPCR system: integrated to regulate coagulation and inflammation. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2004; 24:1374-83.
- Van Goor ML, Van Heerde WL, Schoormans S, Dippel DW, Leebeek FW. The Annexin A5-1C/T polymorphism in ischemic stroke: a case-control study. *J Thromb Haemost.* 2005; 3:173-5.
- Van Goor ML, Garcia EG, Leebeek F, Brouwers GJ, Koudstaal P, Dippel D. The plasminogen activator inhibitor (PAI-1) 4G/5G promoter polymorphism and PAI-1 levels in ischemic stroke. A case-control study. *Thromb Haemost.* 2005; 93:92-6.
- Van Hinsbergh VW et al. Regulation of activator production by endothelial cell. Role in fibrinolysis and local proteolysis. *Int J Radiat Biol* 1991; 60:261-172.
- Van Meijer M, Gebbink RK, Preissner KT, Pannekoek H. Determination of the vitronectin binding site on plasminogen activator inhibitor 1 (PAI-1). *FEBS Lett.* 1994;352:342-6.
- Virtanen JO, Zabriskie JB, Siren V, Friedman JE, Lyons MJ, Edgar M, Vaheri A, Koskiniemi M. Co-localization of human herpes virus 6 and tissue plasminogen activator in multiple sclerosis brain tissue *Med Sci Monit.* 2005;11:84-7.
- Von Bredow D, Cress AE, Howard EW, Bowden GT, Nagle RB. Activation of gelatinase-tissue-inhibitors-of-metalloproteinase complexes by matrilysin. *Biochem. J.* 1998; 331:965-972.

Vrethem M, Mattsson E, Hebelka H, Leerbeck K, Osterberg A, Landtblom AM, Balla B, Nilsson H, Hultgren M, Brattstrom L, Kagedal B. Increased plasma homocysteine levels without signs of vitamin B12 deficiency in patients with multiple sclerosis assessed by blood and cerebrospinal fluid homocysteine and methylmalonic acid. *Mult Scler.* 2003; 9:239-45.

Wakefield AJ, More LJ, Difford J, McLaughlin JE. Immunohistochemical study of vascular injury in acute multiple sclerosis. *J. Clin. Pathol.* 1994; 47:129-133.

Wang YF, Tsirka SE, Strickland S, Stieg PE, Soriano SG, Lipton SA. Tissue plasminogen activator (tPA) increases neuronal damage after focal cerebral ischemia in wild-type and tPA-deficient mice. *Nat Med.* 1998; 4:228-31.

Wang B, Zhou X, Dang A, Liu G, and He R Alu-repeat polymorphism in the gene coding for tissue-plasminogen activator and the risk of hypertension in a Chinese population. *Hypertens Res* 2002; 25:949-953.

Wang X, Lee SR, Arai K, Lee SR, Tsuji K, Rebeck GW, Lo EH. Lipoprotein receptor-mediated induction of matrix metalloproteinase by tissue plasminogen activator. *Nat Med* 2003; 9:1313–1317.

Wang X, Lo E.H. Triggers and mediators of hemorrhagic transformation in cerebral ischemia. *Mol. Neurobiol.* 2003; 28:229–244.

Wansen K, Pastinen T, Kuokkanen S, Wikstrom J, Palo J, Peltonen L, Tienari PJ. Immune system genes in multiple sclerosis: genetic association and linkage analyses on TCR beta, IGH, IFN-gamma and IL-1ra/IL-1beta loci. *J. Neuroimmunol* 1997;79:29-36.

Wei S, Charmley P, Concannon P. Human T-cell receptor V beta gene polymorphism and multiple sclerosis. *Am J Hum Genet* 1995;56:963-9.

Weinshenker BG, Hebrink DD, Klein C, Atkinson EJ, O'Brien PC, McMurray. Genetic variation in the B-7 gene in patients with multiple sclerosis. *J Neuroimmunol* 2000; 105:184-8.

Weinstein J, Gold SJ, Cunningham D, Gall CM. Cellular localization of thrombin receptor mRNA in rat brain: expression by mesencephalic dopaminergic neurons and codistribution with prothrombin mRNA. *J. Neurosci.* 1995;15:2906 – 2919.

Whitlock B, Gardai S, Fadok V, Bratton D, Henson PM. Differential roles for alpha(M)beta(2) integrin clustering or activation in the control of apoptosis via regulation of akt and ERK survival mechanisms. *J Cell Biol.* 2000; 151:1305-20.

Witte T, Hartung K, Sachse C, Fricke M, Buyny S, Deicher H, Kalden JR, Lakomek HJ, Peter HH, Schmidt RE. Thrombomodulin in systemic lupus erythematosus: association with clinical and laboratory parameters. *Rheumatol Int.* 1999; 19:15-8.

Wnendt S, Wetzels I, Gunzler WA. Amyloid beta peptides stimulate tissue-type plasminogen activator but not recombinant prourokinase. *Thromb Res* 1997; 85: 217–224.

Wosik Karolina, Jack Antel, Tanja Kuhlmann, Wolfgang Brück, Bernard Massie and Josephine Nalbantoglu. Oligodendrocyte injury in multiple sclerosis: a role for p53 J. *Neurochem.* 2003; 85:635–644.

Wu Y-P, Siao C-J, Lu W, Sung T-C, Frohman M, Milev P, Bugge T, Degen J, Levine J, Margolis R, Tsirka S. The tPA/plasmin extracellular proteolytic system regulates seizure-induced hippocampal mossy fiber outgrowth through a proteoglycan substrate. *J Cell Biol* 2000;148:1295-1304.

Yamada Y, Izawa H, Ichihara S, Takatsu F, Ishihara H, Hirayama H, Sone T, Tanaka M, Yokota M. Prediction of the risk of myocardial infarction from polymorphisms in candidate genes. *N Engl J Med* 2002; 347:1916-1923.

Yamamoto K, Loskutoff DJ. Extrahepatic expression and regulation of protein C in the mouse. *Am. J. Pathol.* 1998; 153:547 – 555.

Yamanaka H, Obata K, Fukuoka T, Dai Y, Kobayashi K, Tokunaga A, Noguchi K. Tissue plasminogen activator in primary afferents induces dorsal horn excitability and pain response after peripheral nerve injury. *Eur J Neurosci.* 2004; 19:93-102.

Yang YH, Carmeliet P, Hamilton JA Tissue-type plasminogen activator deficiency exacerbates arthritis. *J Immunol* 2001; 167:1047-1052.

Yang Z, Mochalkin I, Doolittle RF. A model of fibrin formation based on crystal structures of fibrinogen and fibrin fragments complexed with synthetic peptides. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 2000; 97:14156–14161.

Ye S, Green FR, Scarabin PY, Nicaud V, Bara L, Dawson SJ, Humphries SE, Evans A, Luc G, Cambou JP, Arveiler D, Henney AM, Cambien F. The 4G/5G genetic polymorphism in the promoter of the plasminogen activator inhibitor-1(PAI-1) associated with differences in plasma PAI-1 activity but not with risk of myocardial infarction in the ECTIM study. *Thromb Haemost.* 1995; 74:837–841.

Yepes M, Sandkvist M, Wong MK, Coleman TA, Smith E, Cohan SL, Lawrence DA. Neuroserpin reduces cerebral infarct volume and protects neurons from ischemia-induced apoptosis. *Blood.* 2000; 96:569-76.

Yepes M, Sandkvist M, Coleman TA, Moore E, Wu JY, Mitola D, Bugge TH, Lawrence DA. Regulation of seizure spreading by neuroserpin and tissue-type plasminogen activator is plasminogen-independent. *J Clin Invest.* 2002; 109:1571-8.

Yepes M, Sandkvist M, Moore EG, Bugge TH, Strickland DK, Lawrence DA. Tissue-type plasminogen activator induces opening of the blood–brain barrier via the LDL receptor–related protein. *J Clin Invest* 2003; 112:1533–1540.

Yepes M, Lawrence DA. New functions for an old enzyme: nonhemostatic roles for tissue-type plasminogen activator in the central nervous system. *Exp Biol Med (Maywood)* 2004; 229:1097-104

Yerby MS, Shaw C-M, Watson JMD: Progressive dementia and epilepsy in a young adult: unusual intraneuronal inclusions. *Neurology* 1986; 36:68-71.

Yoo-Hun Suh and Frederic Checler. Amyloid Precursor Protein, Presenilins, and alpha - Synuclein: Molecular Pathogenesis and Pharmacological Applications in Alzheimer's Disease. *Pharmacol. Rev.* 2002; 54: 469-525

Yong VW, Krekoski CA, Forsyth PA, Bell R, Edwards DR. Matrix metalloproteinases and diseases of the CNS. *Trends Neurosci.* 1998; 21:75-80.

Yong VW, Power C, Forsyth P, Edwards D.R. Metalloproteinases in biology and pathology of the nervous system. *Nat. Rev. Neurosci.* 2001; 2:502–511

Yoo-Hun Suh and Frederic Checler. Amyloid Precursor Protein, Presenilins, and alpha - Synuclein: Molecular Pathogenesis and Pharmacological Applications in Alzheimer's Disease. *Pharmacol. Rev.* 2002; 54:469-525.

Yoshimura, K. Suppression of cell-transferred experimental autoimmune encephalomyelitis in defibrinated Lewis rats. *J. Neuroimmunol.* 1996;71:131 – 137.

Z. Liu, N. Li, L. A. Diaz, M. Shipley, R. M. Senior, and Z. Werb. Synergy between a plasminogen cascade and MMP-9 in autoimmune disease. *J. Clin. Invest.*, April 1, 2005; 115(4): 879 - 887.

Zea Sevilla MA, Carrillo Padilla F, Fernandez Sanfiel ML, De Juan Hernández P. The plasminogen activator inhibitor 1 plasminogen system and multiple sclerosis. *Neurology* 2006;55:370.

Zhuo M, Holtzman DM, Li Y, Osaka H, DeMaro J, Jacquin M, Bu G. Role of tissue plasminogen activator receptor LRP in hippocampal long-term potentiation. *J. Neurosci.* 2000;20:542-549.

Zou Tie, Ling Changchun, Xiao Yao, Strickland Sidney, Houyan Song. Exogenous tissue plasminogen activator enhances peripheral nerve regeneration and functional recovery after injury in mice. *J. Neuropathol. Exp. Neurol* 2006;65:78-86.