

TESIS DOCTORAL



**FUNCIÓN ENDOTELIAL EN
ESCLEROSIS MÚLTIPLE Y MIGRAÑA.**

**ESTUDIO TRANSVERSAL CON
COMPARADOR ACTIVO.**

Vicente González Quintanilla

**FACULTAD DE MEDICINA
UNIVERSIDAD DE CANTABRIA**

Santander, 2015

“Vivimos en un país en el que el talento científico se
desconoce a sí mismo”

Santiago Ramón y Cajal.

“Si espero perderé la audacia de la juventud”

Alejandro Magno

Esta Tesis Doctoral ha sido cofinanciada por el Instituto de Investigación Sanitaria IDIVAL gracias al Contrato Post-MIR Wenceslao López Albo, la Beca del Grupo de Estudio de Cefaleas de la Sociedad Española de Neurología, PI11/1232 y Novartis.

A Silvia, por cada momento juntos.

A mi padre y a Pablo.

AGRADECIMIENTOS:

Resulta difícil reunir en unas líneas tantos agradecimientos pendientes. Aunque falten nombres, todos vosotros amigos, compañeros y familiares sin duda habéis contribuido. De una forma especial quiero dar las gracias a:

- Mis directores de tesis, el Dr. Jesús Castillo y el Dr. Agustín Oterino. Gracias Jesús por aceptar sin dudar dirigir este proyecto, por tu templanza, por tus valiosas aportaciones y por estar siempre disponible. Agustín no es sólo mi director de Tesis, es la persona que confió en mí y a la que debo este trabajo. Referente de generosidad y espíritu de lucha, espero poder seguir trabajando codo con codo en el futuro. Aunque impetuoso en ocasiones, bien podría decirse de él aquello de: “¡Dios, que buen vasallo! ¡Si oviese buen señor!”.
- A María, la auténtica directora en la sombra, gracias por tu inestimable ayuda, por tu paciencia en enseñarme las técnicas, por hacer del trabajo de laboratorio algo divertido y nuevo cada día. Sin duda, mereces lo mejor, ojalá pueda ayudar en tu Tesis como tú en estás.
- Al Dr. Miguel Ángel González Gay, que me mostró su amor por la investigación clínica realizada con dedicación y meticulosidad, su colaboración ha sido fundamental en esta empresa. Por confiar en mí, escuchar mis ideas y creer en ellas.
- A mis compañeros de fatigas y desventuras desde el inicio de la residencia, compañeros, enfermeras, auxiliares... Por todos los momentos vividos juntos.
- A los médicos y personal de la UARH por su colaboración y paciencia en la realización de este trabajo, y especialmente, al Dr. Rebollo, un gran maestro y excelente neurólogo.
- A los pacientes, para que siempre sean el centro de nuestra atención y su bienestar nuestra meta en cada momento.
- A mi padre y a mi hermano, a los que nunca han regalado nada. Suponen para mí un ejemplo de lucha y tesón. Vuestro esfuerzo en el día a día a pesar de las adversidades, vuestra valentía y vuestro cariño, nos permiten seguir en pie y poder estar orgullosos de quienes somos.
- A Silvia, mi esposa, mi compañera, mi amor. Gracias por tu paciencia, por ser mi sostén en los malos momentos y compartir mis alegrías. Por ser quien nunca falla, y por seguir alegrando cada día. Gracias también por Santander, por Londres, por Roma y gracias “per quanta strada ancora c’è da fare”.
- Por último, deseo recordar a mi madre, a la que tanto extraño. A ella no le dedico este trabajo porque sin duda se queda pequeño. Por su amor, y por su cariño a ella le dedico mi vida esperando que pueda sentirse orgullosa de mí.

ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN	21
1.1. INFLAMACIÓN.	23
1.2. FISIOPATOLOGÍA DE LA RESPUESTA INFLAMATORIA.	24
1.3. INFLAMACIÓN Y ATEROESCLEROSIS.	26
1.3.1. Definición de aterosclerosis.	26
1.3.2. Aterosclerosis: Aspectos históricos.	27
1.4. EL ENDOTELIO VASCULAR.	29
1.4.1. Conceptos generales.	29
1.4.2. El endotelio en condiciones de homeostasis normal.	30
1.4.3. Activación endotelial y aterosclerosis.	30
1.5. MARCADORES DE DAÑO ENDOTELIAL.	32
1.5.1. MARCADORES MOLECULARES.	33
1.5.2. MARCADORES ULTRASONOGRÁFICOS.	37
1.6. DISFUNCIÓN ENDOTELIAL EN LAS ENFERMEDADES INFLAMATORIAS.	42
1.7. ESCLEROSIS MÚLTIPLE.	45
1.7.1. Generalidades.	45
1.7.2. Curso clínico de la EM.	46
1.7.3. Recuerdo histórico.	47
1.7.4. Diagnóstico de la EM.	50
1.7.5. Historia terapéutica de la EM.	56
1.7.6. Escalas de valoración de discapacidad y fatiga.	60
1.7.7. Disfunción endotelial en la EM.	63
2. HIPÓTESIS	69
2.1. Fundamentos.	71
2.2. Hipótesis de trabajo.	72
3. OBJETIVOS	73
4. PACIENTES Y MÉTODOS	77
4.1. PACIENTES Y CONTROLES.	79
4.2. CRITERIOS DE SELECCIÓN DE PACIENTES.	83

4.2.1. Criterios de inclusión.	83
4.2.2. Criterios de exclusión.	84
4.3. DESCRIPCIÓN DE PARÁMETROS.	85
4.3.1. Variables epidemiológicas.	85
4.3.2. Variables clínicas.	86
4.3.3. Variables ultrasonográficas.	86
4.4.4. Variables moleculares.	92
4.4. ESTUDIO ESTADÍSTICO.	98
5. RESULTADOS	101
5.1. GENERALIDADES.	103
5.2. ESTUDIO DESCRIPTIVO.	104
5.2.1. Características epidemiológicas de la muestra.	104
5.2.2. Características clínicas de la población de estudio.	106
5.3. ESTUDIO ANALÍTICO.	110
5.3.1. Aterosclerosis subclínica entre los grupos de estudio.	110
5.3.2. Disfunción endotelial en pacientes con Esclerosis Múltiple.	117
5.3.3. Cambios hemodinámicos en la circulación cerebral en pacientes con EM.	121
5.3.4. Determinación del flujo sanguíneo cerebral.	126
5.3.5. Estudio del parénquima cerebral: Medición del III ventrículo.	127
5.4. COMPARACIÓN ENTRE DATOS ANALÍTICOS.	131
5.4.1. Correlación entre tensión arterial y variables ultrasonográficas.	131
5.4.2. Correlación de las características clínicas con las variables estudiadas.	132
5.4.3. Correlación de los tratamientos con las variables estudiadas.	136
5.4.4. Correlación de discapacidad y fatiga con las variables estudiadas.	137
5.5. ESTUDIO MOLECULAR.	139
5.5.1. Células endoteliales progenitoras circulantes (EPC).	139
5.5.2. Marcadores moleculares de inflamación y disfunción endotelial.	142
6. DISCUSIÓN	145
6.1. Disfunción endotelial en la Esclerosis Múltiple.	147
6.2. Importancia de la inflamación en la disfunción endotelial.	147
6.3. Impacto de la enfermedad vascular en la EM.	148
6.4. Técnicas de estudio de la función endotelial.	151

6.5. Características epidemiológicas de la muestra.	152
6.6. Aterosclerosis subclínica en pacientes con EM.	155
6.7. Disfunción endotelial sistémica.	158
6.8. Asociación entre la función endotelial y el GIM carotídeo.	160
6.9. Estudio de reserva hemodinámica cerebral.	161
6.10. Otros marcadores ecográficos estudiados.	164
6.11. Correlaciones entre variables clínicas, bioquímicas y ultrasonográficas.....	166
6.12. Células endoteliales progenitoras circulantes.	169
6.13. Comparación de los resultados con el grupo de AR.	170
6.14. Consideraciones finales.	173
7. CONCLUSIONES	177
8. BIBLIOGRAFÍA	181

ÍNDICE DE TABLAS:

Tabla 1: Factores que pueden alterar los resultados de la VDE.	39
Tabla 2: Criterios de Schumacher para el diagnóstico de EM.	50
Tabla 3: Criterios diagnósticos de Poser (1983).....	51
Tabla 4: Criterios de RM en EM de acuerdo a revisión de McDonald 2005.	53
Tabla 5: Criterios de McDonald 2010 para el diagnóstico de EM.	55
Tabla 6: Puntuaciones de la Expanded Disability Status Scale (EDSS).	61
Tabla 7: Fatigue Severity Scale (FSS).....	62
Tabla 8: Criterios diagnósticos de migraña (2013).	80
Tabla 9: Criterios diagnósticos de Artritis Reumatoide (1987).....	82
Tabla 10: Kits ELISA empleados en el estudio.....	97
Tabla 11: Características epidemiológicas de los grupos.....	104
Tabla 12: Principales factores de riesgo cardiovascular en los grupos clínicos.....	106
Tabla 13: Tratamientos modificadores recibidos por el grupo de estudio.	108
Tabla 14: Características de la migraña en los grupos de ME y MC.	109
Tabla 15: Tratamientos sintomáticos para la migraña utilizados en ME y MC.	110
Tabla 16: Distribución de las placas de ateroma en los grupos de estudio.	110
Tabla 17: Factores predictores de GIM en ambos modelos lineales.	113
Tabla 18: Coordenadas de la curva ROC.	115
Tabla 19: Coordenadas de la curva, en la comparación EM vs AR.	116
Tabla 20: Valores de VDE en los grupos clínicos.....	118
Tabla 21: Factores predictores de la VDE en los modelos lineales.....	119
Tabla 22: Comparación de la VDE entre grupos de EM y AR.	120
Tabla 23: Valores de BHI en ACM. Comparación entre EM y AR.....	124
Tabla 24: Valores predictores de VRC en la arteria basilar. Modelo no ajustado.	126
Tabla 25: Valores de CBF total. Comparación entre EM y AR.	127

ÍNDICE

Tabla 26: Correlaciones bivariadas de las principales variables estudiadas.	135
Tabla 27: Comparación de las variables estudiadas y los tratamientos. Test de Kruskal Wallis.....	136
Tabla 28: Principales correlaciones de la discapacidad en el análisis multivariable....	138
Tabla 29: Principales correlaciones de la fatiga (FSS) en el análisis multivariable....	139
Tabla 30: Concentraciones de ON en los grupos clínicos.	143

ÍNDICE DE FIGURAS:

Figura 1: Resumen histórico de los tratamientos de la EM.....	57
Figura 2: Ecógrafo modelo SIEMENS Accuson X300 PE utilizado.	86
Figura 3: Ejemplo del registro de los valores hemodinámicos en ACM.....	87
Figura 4: Ejemplo de medición del GIM.....	89
Figura 5: VDE medida en la arteria braquial.....	91
Figura 6: Ejemplo de medición del diámetro del III ventrículo.	92
Figura 7: Esquema de la separación por gradiente de densidad con Ficoll.	94
Figura 8: Detalle de una CFU evaluadas con luz invertida.	94
Figura 9: Ejemplo de citometría de flujo células CD34+/KDR+/CD62E.....	96
Figura 10: Distribución de sexos en cada grupo.	104
Figura 11: Distribución de pacientes con EM en función de la puntuación EDSS.....	108
Figura 12: Gráfico P-P normal de regresión residuos estandarizados.....	111
Figura 13: Resultados del GIM en los grupos clínicos.....	112
Figura 14: Curva ROC de Grosor íntima-media.	114
Figura 15: Valores diagnósticos en función del GIM.....	115
Figura 16: Curvas de distribución del GIM en pacientes con EM y AR.....	116
Figura 17: Resultados de la VDE en los grupos de estudio.....	117
Figura 18: Curva ROC de VDE.....	120
Figura 19: Curva ROC de VDE comparando EM y AR.	121
Figura 20: Resultados de la vasorreactividad cerebral mediante BHI en la ACM.....	122
Figura 21: Curva ROC de vasorreactividad cerebral (BHI).	123
Figura 22: Curva ROC de BHI: grupos EM y AR.	124
Figura 23: Resultados de la vasorreactividad mediante BHI en la arteria basilar.....	125
Figura 24: Diagramas de cajas de los valores de CBF en los grupos clínicos.	126
Figura 25: Resultados del diámetro del III ventrículo en los grupos de estudio.	128

Figura 26: Correlaciones entre GIM, VRC y diámetro ventricular.	129
Figura 27: Valores del diámetro del III ventrículo. Comparación entre EM y AR.	130
Figura 28: Curva ROC del III ventrículo. Comparación entre EM y AR.	131
Figura 29: Correlación del GIM con la VDE (A) y la VRC (B).	132
Figura 30: Correlación del GIM con VSG (A), PCR (B), fibrinógeno (D) y la homocisteína (D).	133
Figura 31: Correlación entre la VDE y la vasorreactividad cerebral.	134
Figura 32: Correlación de VDE con VSG (A), homocisteína (B) y fibrinógeno (C)...	134
Figura 33: Correlación de la VRC con la VSG (A) y el fibrinógeno (B).	136
Figura 34: Valores de VRC en función del tratamiento en pacientes con EM.	137
Figura 35: Valores de CFU en los distintos grupos de estudio.	140
Figura 36: Correlación de CFU con variables ecográficas: VRC (A) y GIM (B).	141
Figura 37: Valores de la citometría en los diferentes grupos clínicos.	141

ABREVIATURAS:

ACC: Arteria carótida común.

ACI: Arteria carótida interna.

ACM: Arteria cerebral media.

ACVA: Accidente cerebrovascular agudo.

AIT: Accidente isquémico transitorio.

AR: Artritis Reumatoide.

BHI: Breath Holding Index.

CBF: Flujo sanguíneo cerebral total.

CBV: Volumen sanguíneo cerebral.

CFU: Colony-Forming Unit.

DE: Desviación estándar.

EDSS: Expanded Disability Status Scale.

EM: Esclerosis Múltiple.

EPC: Células progenitoras endoteliales circulantes.

FSS: Fatigue Severity Scale.

FvW: Factor von Willebrand.

GIM: Grosor íntima media.

IAM: Infarto agudo de miocardio.

IMC: Índice de masa corporal.

IP: Índice de pulsatilidad.

LDL: Lipoproteínas de baja densidad.

LES: Lupus Eritematoso Sistémico.

LMP: Leucoencefalopatía multifocal progresiva.

MC: Migraña crónica.

ME: Migraña episódica.

ABREVIATURAS

MP: Micropartículas endoteliales.

ON: Óxido nítrico.

PCR: Proteína C reactiva.

RHC: Reserva hemodinámica cerebral.

RM: Resonancia Magnética.

SNC: Sistema nervioso central.

TAS: Tensión arterial sistólica.

TAD: Tensión arterial diastólica.

TNF: Factor de necrosis tumoral.

VDE: Vasodilatación dependiente de endotelio.

Vm: Velocidad media.

VRC: Vasorreactividad cerebral.

Vs: Velocidad pico sistólica.

VSG: Velocidad de sedimentación globular.

1. INTRODUCCIÓN

1.1. INFLAMACIÓN.

La inflamación es el mecanismo de respuesta inmediata del organismo ante un daño a sus tejidos o células producido por patógenos externos u otros estímulos nocivos como químicos o heridas físicas (1). La inflamación es un evento crítico además para la aparición de numerosas enfermedades complejas, y para el desarrollo de otras como el síndrome metabólico, enfermedades neurodegenerativas, el cáncer o enfermedades cardiovasculares (2). Se trata, por consiguiente, de un proceso biológico que implica un gran gasto de energía. La inflamación es una estrategia protectora de los organismos, esencial para la eliminación del estímulo y la reparación tisular, que clásicamente se divide en inflamación aguda y crónica.

La inflamación aguda, que es la forma más común, es una respuesta corta que habitualmente finaliza con la curación del tejido, como resultado de la infiltración de leucocitos en el tejido dañado, la eliminación del estímulo nocivo y la reparación tisular (3). La inflamación aguda ha sido considerada como uno de los componentes de la inmunidad innata, en la primera línea de defensa del organismo, aunque en las últimas décadas se ha demostrado la gran complejidad de los mecanismos implicados. El proceso implica generalmente, como se ha señalado, un elevado gasto de energía metabólica con daño y destrucción de los tejidos afectados durante el proceso inflamatorio (4). Si la respuesta producida es adecuada, y las condiciones anormales transitorias, se considera que la respuesta inflamatoria es exitosa y el sistema retorna a sus condiciones homeostáticas basales. La eficacia por tanto radica en la capacidad para producir una respuesta rápida y específica a la agresión, limitando los aspectos lesivos de la misma tanto como sea posible (5).

La respuesta inflamatoria aguda se caracteriza por ser una respuesta rápida, que se inicia en cuestión de minutos ante un estímulo determinado (microbiano, agentes irritantes, etc.). El sistema inmune innato es el principal componente de esta respuesta, participando numerosos elementos celulares como macrófagos, células dendríticas, mastocitos y neutrófilos (6). Además de las células del sistema inmune, otras células también poseen relevancia en este proceso, como las células epiteliales, los fibroblastos o las células endoteliales. La activación del sistema inmune innato es necesaria además para la activación de la inmunidad adquirida. Participan en el proceso también citocinas y moléculas proinflamatorias, como el factor de necrosis tumoral (TNF) y las

interleucinas 1 y 6 (IL-1, IL-6) que son los encargados de modificar la permeabilidad del endotelio vascular, del reclutamiento celular y de inducir la producción de proteínas de fase aguda (4). Estas proteínas de fase aguda son moléculas que por definición, cambian su concentración al menos en un 25% durante los estados inflamatorios (7). Son numerosas, y el cambio en sus concentraciones puede implicar un incremento (proteína C reactiva o PCR, amiloide sérico A, fibrinógeno, haptoglobina), o un descenso de las mismas (albúmina, transferrina). La medición de estas proteínas reactantes de fase aguda es frecuentemente utilizada para definir la presencia y el grado de inflamación de los pacientes.

Por el contrario, la inflamación crónica (5) es un proceso prolongado en el tiempo y mal regulado, como consecuencia de una respuesta inadecuada y maladaptativa que produce daño en los tejidos y alteraciones en los sistemas de reparación de los mismos. Se conocen numerosos procesos en los cuales existe una inflamación crónica subyacente, incluyendo enfermedades como la alergia, el cáncer y sobre todo las enfermedades autoinmunes (3).

El proceso por el cual se inicia la inflamación en general es bien conocido, pero se conoce mucho menos sobre las causas que provocan la persistencia de la misma, con la aparición de una inflamación crónica y los procesos celulares y moleculares asociados. Estos procesos asociados a la inflamación crónica, están implicados en numerosas patologías y en sus comorbilidades. Se considera, de forma general, que los estados inflamatorios crónicos no estarían causados por los mismos mecanismos que desencadenan la respuesta aguda, sino más bien relacionados con un malfuncionamiento de los tejidos que produce un desequilibrio en la homeostasis interna con múltiples consecuencias.

1.2. FISIOPATOLOGÍA DE LA RESPUESTA INFLAMATORIA.

Hemos definido la inflamación como una respuesta adaptativa que se desencadena ante estímulos nocivos o en determinadas circunstancias específicas. Una respuesta inflamatoria controlada es por consiguiente una respuesta beneficiosa para el organismo, y se asume el papel necesario de la respuesta inflamatoria ante ciertos estímulos. A nivel básico, la respuesta inflamatoria, se genera en la mayoría de los casos en respuesta a una infección o una agresión tisular, e implica la movilización de células

del sistema inmune (4). En el caso de la respuesta a una infección, los mecanismos son bien conocidos, desencadenándose la respuesta inflamatoria por el sistema inmune innato, con la implicación de mastocitos y macrófagos que liberan diversos mediadores inflamatorios provocando la respuesta inflamatoria y activando localmente el endotelio, para permitir la extravasación de células como los leucocitos (principalmente neutrófilos) a la zona dañada. La selectividad lograda se debe a la unión de las selectinas de las células endoteliales con los receptores de integrinas, y citocinas que tienen los leucocitos en su superficie. Cuando estos llegan a la zona afectada, se activan, bien por contacto directo con el patógeno o de forma indirecta a través de las citocinas secretadas. Los leucocitos tratarán de eliminar el agente invasor mediante la liberación de los agentes contenidos en sus gránulos entre los que se incluyen proteinasa 3, catepsina g y elastasas. La potencia de estas moléculas no discrimina entre dianas microbianas y el huésped, dando lugar a la aparición de daños colaterales.

Si el agente causal no se elimina y no se completa la reparación tisular, el proceso inflamatorio no puede considerarse exitoso. El cambio de un estado proinflamatorio a otro quiescente o de reposo es fundamental en esta etapa. Las lipoxinas participan inhibiendo el reclutamiento de neutrófilos, así como los monocitos encargados de la eliminación de los desechos celulares. Si la respuesta inflamatoria falla, el proceso inflamatorio puede persistir en el tiempo y adquirir características diferentes. En estos casos, el infiltrado de neutrófilos es sustituido por macrófagos y, en algunos casos, también por linfocitos T. Además, la persistencia de la inflamación puede dar lugar al daño tisular por diferentes mecanismos a los de la inflamación clásica (8).

La persistencia en el tiempo de la respuesta inmune da como resultado un estado de inflamación crónica. Este nuevo estado inflamatorio, en el que participan otros componentes celulares y moleculares además de los previamente comentados, se reconoce como uno de los factores clave en una amplia variedad de enfermedades, incluyendo la aterosclerosis (9) (10), la artritis (11) y enfermedades neurodegenerativas como el Alzheimer (12).

La inflamación crónica da como resultado la aparición de daño tisular, que es reparado por tejido cicatricial, fibrinólisis y un infiltrado de células con monocitos, linfocitos y células plasmáticas. Este proceso inflamatorio crónico difiere parcialmente en sus componentes de la inflamación aguda, y sus cambios se reflejan en la gran

variedad de patologías que implican a la inflamación crónica en su fisiopatología, aunque todas presentan algunos mecanismos comunes, tanto en su origen, como en su desarrollo.

1.3. INFLAMACIÓN Y ATEROESCLEROSIS.

La aterogénesis está ampliamente reconocida como un proceso inflamatorio de la pared vascular (13). Los primeros eventos aterogénicos se caracterizan por el acúmulo de lipoproteínas, el reclutamiento de leucocitos, sobre todo de monocitos y macrófagos, y la expresión de citocinas proinflamatorias como la IL-1 o TNF (14). En este contexto, la aterosclerosis constituye la característica principal de la mayoría de las enfermedades vasculares, incluyendo la enfermedad coronaria, el infarto agudo de miocardio (IAM), la enfermedad cerebrovascular con el ictus isquémico como principal exponente, y la enfermedad arterial periférica. Existe una creciente evidencia de que la inflamación, además de ser el componente fundamental del inicio de la aterosclerosis, también es un componente fundamental que promueve la ruptura de la placa ateromatosa, con la enfermedad vascular consecuente (15). Por lo tanto, dada la naturaleza inflamatoria de la aterosclerosis, el conocimiento de los mecanismos implicados en la resolución de la inflamación, constituye un nuevo objetivo terapéutico con potencial importancia en la práctica clínica. Otro objetivo sería identificar los marcadores clínicos relevantes de inflamación, que sirvan para reconocer a aquellos pacientes en riesgo de desarrollar aterogénesis, y que sean potencialmente útiles para el estudio de la eficacia de las medidas terapéuticas.

1.3.1. Definición de aterosclerosis.

El término aterosclerosis procede del griego “athers”, pulpa o papilla, y “skleros”, que significa duro. El término hace referencia a la acumulación de células, lípidos y tejido fibroso (placas de ateroma) en la pared arterial. La aterosclerosis es un proceso inflamatorio crónico que afecta a las arterias de diferentes lechos vasculares, y cuya característica principal es el engrosamiento final de las capas íntima y media con una pérdida de la elasticidad (16). La lesión anatomopatológica básica es la placa de ateroma, compuesta fundamentalmente por lípidos, células inflamatorias y tejido fibroso y que tiene diferentes estadios en su formación (17).

La evolución natural es hacia la complicación de la placa de ateroma con la aparición de fisuras, la erosión o incluso la rotura de la misma y la formación de un trombo en su superficie, lo que facilita su crecimiento, y la aparición de isquemia o necrosis, que constituyen las manifestaciones clínicas clásicas de la misma (18).

Se acepta que la aterosclerosis es una enfermedad sistémica, que afecta a las arterias de diferentes localizaciones de forma simultánea, pero con diferente grado de progresión. El proceso es característico de las arterias coronarias, las arterias que irrigan el cerebro (carótidas, vertebrales y cerebrales intracraneales) y de las extremidades inferiores (ilíacas y femorales). Es por ello que las manifestaciones clínicas se suelen producir en estas localizaciones vasculares. Si el lecho vascular afectado son las arterias coronarias, la expresión clínica es la aparición de un síndrome coronario agudo, IAM o muerte súbita. En el sistema nervioso, se manifiesta como un accidente cerebrovascular agudo (ACVA), o como un accidente isquémico transitorio (AIT). En el caso de las arterias periféricas, produce la claudicación intermitente o la isquemia aguda de los miembros inferiores. Existen además distintas formas de presentación de la enfermedad aterosclerótica, que también puede ser crónica, por estenosis de la luz arterial, como en el caso de la angina estable, o aguda, por la súbita rotura de la placa y la formación de un trombo, como en algunos casos de ictus isquémico.

La importancia de la aterosclerosis radica en su elevada prevalencia, en la gravedad de la patología asociada, y los factores concomitantes. A pesar de ello, se desconocen en gran parte los mecanismos que llevan a su desarrollo y la aparición de complicaciones. Algunas patologías, sobre todo aquellas que asocian un componente inflamatorio crónico, como las enfermedades autoinmunes, asocian un incremento del riesgo de enfermedades vasculares secundario al desarrollo de aterosclerosis, y por tanto, pueden servir como modelo de estudio para la misma.

1.3.2. Aterosclerosis: Aspectos históricos.

Existe de forma generalizada la impresión de que la aterosclerosis es una enfermedad de la sociedad actual, propia de la era industrial, en países ricos y de personas con factores de riesgo como el sedentarismo, o el tabaquismo entre otros, pero este concepto es erróneo.

En el año 2009, en el contexto de la reunión de la American Heart Association, varios investigadores presentaron los resultados de estudios realizados en momias egipcias de más de 3500 años de antigüedad, que mostraban la existencia de aterosclerosis y enfermedad cardíaca en las arterias del faraón Merenptah, que murió en el año 1203 AC. Posteriormente, el estudio se amplió a momias de otras culturas, como las del Perú, cuyos resultados mostraron que la aterosclerosis era común en estas poblaciones, en las mismas localizaciones arteriales que en la actualidad (19).

Una de las primeras descripciones de lo que en el futuro se conocería como aterosclerosis, la realizó Leonardo Da Vinci en los comienzos del siglo XVI, al relatar la autopsia de un anciano (*Il vechio*). Leonardo, en su descripción de los vasos sanguíneos, muestra claramente las diferencias existentes entre los vasos del anciano en comparación con lo que había observado anteriormente al estudiar las arterias de un niño. Da Vinci sugirió tales cambios como efecto de la edad, que habría provocado un ensanchamiento de la pared arterial, su elongación, la aparición de tortuosidades y la constricción de la luz, dificultando el paso de la sangre a través de ellos (20). Poco después, Friedrich Hoffman (1660-1742), en la Universidad de Halle, describió como causa de las enfermedades cardíacas los problemas de circulación de la sangre derivados de la reducción del calibre de las arterias.

El término aterosclerosis, fue utilizado por primera vez por Johann Friedrich Lobstein en 1829. Su descripción se centró en los aspectos macroscópicos. Aproximadamente 30 años más tarde, el célebre patólogo Richard Virchow describió las lesiones sugiriendo que eran consecuencia de un traumatismo de las células que recubren la capa interna de la pared arterial, lo que se continuaría de un proceso inflamatorio con depósito graso, y en última instancia, fenómenos de hipercoagulabilidad (21).

El gran auge en el interés de la aterosclerosis se da a lo largo del siglo XX. Una de las principales contribuciones fue el descubrimiento del colesterol de baja densidad o LDL. En 1948 se inició el estudio Frammingham, en el que se reclutó 5.209 hombres y mujeres de entre 30 y 62 años de edad, y sin evidencia de enfermedad vascular previa. Desde entonces, el grupo se ha ampliado incluyendo a los hijos del primer grupo en 1971 y la tercera generación del grupo original en 2002. Gracias al estudio

Frammingham disponemos de tablas que ayudan a calcular el riesgo de sufrir un episodio vascular (22).

En los años 90, la American Heart Association clasificó las lesiones aterosclerosas en ocho tipos diferentes, desde los estadios iniciales a las fases más avanzadas (23), describiendo la historia natural de la enfermedad; y en el año 1999, Russell Ross definió la aterosclerosis como mucho más que un mero depósito de lípidos en la pared arterial, poniendo en marcha la actual hipótesis inflamatoria, que es aceptada de forma universal en nuestros días (13).

En su descripción, Ross (13) considera la aterosclerosis como un proceso dinámico, que se produce en la pared vascular como respuesta a un agente nocivo, o una agresión sobre la misma. Se establecen, además, diferentes factores que pueden influir en el desarrollo de la cascada inflamatoria que desencadena la aterosclerosis, como los lípidos (principalmente LDL), antecedentes de hipertensión arterial o diabetes, radicales libres, la hiperhomocisteinemia, además de factores genéticos, determinadas infecciones o la combinación de los anteriores. Ross establece la disfunción endotelial como el estadio inicial del proceso ateroscleroso, previo a la aparición de la lesión endotelial en el lecho vascular.

1.4. EL ENDOTELIO VASCULAR.

1.4.1. Conceptos generales.

El endotelio es la monocapa de células que tapiza el interior de todos los vasos sanguíneos, pero no se trata de una simple barrera celular entre la sangre y los tejidos (24). El endotelio es un “órgano”, que tiene unas claras funciones reguladoras. El endotelio es capaz de secretar numerosas sustancias vasoactivas, además interviene en la modulación del tono vascular, controla de forma activa el intercambio de sustancias entre el espacio intravascular y los tejidos, y entre sus funciones se encuentran la activación plaquetaria y la proliferación del músculo liso (25).

En condiciones fisiológicas, el endotelio regula la homeostasis vascular al actuar cada célula endotelial como un detector de señales, que es capaz de generar una respuesta y de transmitirla al entorno vascular y también a distancia, por la circulación sanguínea. Las células endoteliales son capaces de detectar los cambios físicos (estrés

mecánico hemodinámico), y químicos (liberación de moléculas en el entorno), y ejecutar una respuesta funcional adaptativa a tales cambios (25).

Por tanto, la alteración de su función es el paso previo y necesario para el desarrollo posterior de las complicaciones clínicas (13). El reconocimiento del importante papel que juega el endotelio en todos estos procesos ha llevado al desarrollo de una amplia variedad de métodos dirigidos a conocer su grado de alteración y las posibilidades de reparación.

1.4.2. El endotelio en condiciones de homeostasis normal.

A pesar de su aparente simplicidad por tratarse de una monocapa de células, el endotelio sano es capaz de responder a numerosos estímulos físicos y químicos, proporcionando una respuesta adecuada a cada uno de ellos, mediante la producción de una amplia variedad de factores encargados de regular el tono vascular, la adhesión celular, las respuestas de proliferación celular y también las de inflamación.

De entre sus funciones, la primera en conocerse y la más estudiada, es la regulación del tono vascular (25). El endotelio puede modificar el tono vascular mediante la producción y liberación de sustancias vasoactivas, que relajan o contraen la pared vascular, lo que juega un importante papel en la oxigenación y suplencia de las demandas metabólicas de los tejidos. Entre las sustancias producidas por el endotelio, y que participan en estos procesos, destaca el óxido nítrico (ON), que produce un efecto de vasodilatación en la pared vascular. En condiciones normales, el ON juega un papel relevante en el mantenimiento de la pared vascular en un estado quiescente, que inhibe la inflamación, la proliferación celular y el desarrollo de trombosis (26).

El ON se genera a partir de la L-arginina por acción de la ON sintasa endotelial (eNOS) y difunde a través de la pared vascular a la capa muscular favoreciendo la vasodilatación. Existen otras sustancias liberadas con acciones vasodilatadoras como las prostaciclinas, aunque con una importancia ligeramente menor.

1.4.3. Activación endotelial y aterosclerosis.

El endotelio vascular es la diana de los factores aterogénicos, y la disfunción endotelial se considera el evento inicial en el desarrollo de aterosclerosis (27). Clásicamente, el proceso de desarrollo de la aterosclerosis comienza en la infancia y

progresar de forma silenciosa a lo largo de años, en una etapa preclínica, hasta la aparición de potenciales manifestaciones patológicas. El paso fundamental de todo este proceso es la alteración del normal funcionamiento del endotelio.

El término de disfunción endotelial se refiere realmente al proceso de activación endotelial más propiamente dicho, que mantenido, de forma prolongada en el tiempo, y en presencia de ciertos factores, puede producir el desarrollo de la enfermedad vascular. Se define, por tanto, la disfunción endotelial como un mecanismo de respuesta a una agresión, que cursa con una alteración de la vasodilatación dependiente de endotelio, un aumento de la adhesividad de los leucocitos y plaquetas generado por un incremento de la expresión de moléculas de adhesión, trans migración de monocitos/macrófagos y depósito de lípidos en el espacio subendotelial, con aumento de la trombogenicidad y cambios en la modulación del crecimiento y migración de la fibra muscular lisa vascular subyacente (28).

La disfunción endotelial es un proceso dinámico, en el cual el endotelio pasa del estado quiescente descrito previamente a un estado de activación endotelial. Este estado activado implica la existencia de una respuesta inflamatoria, como respuesta defensiva ante un hecho causal. En este nuevo estado se produce un desequilibrio inducido por la activación de reactantes de oxígeno en las fases iniciales de la disfunción endotelial.

Las primeras descripciones de la disfunción endotelial se realizaron en pacientes con insuficiencia renal crónica que presentaban alteraciones complejas de la hemostasia, al coexistir clínica hemorrágica con un riesgo cardiovascular elevado (29). Las investigaciones en estos pacientes permitieron identificar biomarcadores presentes en sangre periférica como el factor von Willebrand (FvW), PAI-1, trombomodulina, endotelina y determinadas citoquinas. Poco después se observó la existencia de una alteración en el correcto funcionamiento endotelial medido por la vasodilatación dependiente de endotelio en pacientes con insuficiencia renal. Los mismos resultados se han obtenido posteriormente en otras patologías, como la diabetes mellitus (30), la hipertensión arterial (31), la insuficiencia cardíaca (32) o el síndrome metabólico (33).

La mayoría de los considerados factores de riesgo cardiovascular clásicos (hipertensión, diabetes, dislipemia, hábito tabáquico, edad), pero también los recientemente descubiertos, como la hiperhomocisteinemia (34), el estrés oxidativo

(35), o la existencia de condiciones inflamatorias sistémicas (36), ponen en marcha este proceso dinámico de cambio, desde el estado quiescente a un estado de activación, que implica el desarrollo de una respuesta defensiva frente a una potencial agresión. Por tanto, estos factores de riesgo cardiovascular se asocian con la existencia de disfunción endotelial con un riesgo acumulativo entre ellos.

La activación de los reactantes de oxígeno que se produce en este estado es la responsable de los cambios en el funcionamiento endotelial. Cuando las circunstancias desencadenantes de esta activación se mantienen de forma crónica, puede llegar a excederse la capacidad de autorregulación del endotelio, contribuyendo al desarrollo de la enfermedad vascular.

1.5. MARCADORES DE DAÑO ENDOTELIAL.

Son numerosos los potenciales marcadores que se han utilizado para identificar la existencia de disfunción endotelial. En la mayoría de los casos, son marcadores moleculares, habitualmente proteínas no relacionadas directamente con la lesión inflamatoria vascular, como la PCR. Algunas de ellas, son marcadores inespecíficos de inflamación como la IL-1 o TNF- α , comentados previamente y que aparecen en cualquier proceso inflamatorio. Otros marcadores más recientemente descubiertos son las micropartículas endoteliales (MPs), y las células endoteliales progenitoras circulantes (EPCs), que aportan información sobre la situación del endotelio vascular y el riesgo de enfermedad vascular. Existen asimismo pruebas que nos permiten conocer la integridad del endotelio vascular y el estudio de la función endotelial mediante técnicas de imagen. Entre estas se incluyen la ecografía y la ecografía doppler, y otras más agresivas como la angiografía, la pletismografía, o los estudios de distensibilidad venosa.

A continuación, se describen brevemente las principales formas de estudio de la integridad y función endotelial. Se han clasificado en dos grandes grupos. El primero de ellos engloba a los principales marcadores bioquímicos y moleculares que han demostrado contribuir al proceso de disfunción endotelial. Este grupo se compone de algunos de los reactantes que juegan un papel importante en la inflamación, previamente señalados como la PCR o el fibrinógeno. En segundo lugar, nos centraremos en el estudio de la estructura y función del endotelio mediante el uso de

técnicas no invasivas, inocuas y reproducibles, siendo la ultrasonografía la técnica que mejor cumple estos requisitos.

1.5.1. MARCADORES MOLECULARES.

La aterosclerosis comparte en su patogenia mecanismos inflamatorios similares con numerosas enfermedades de base inmunológica. Estos mecanismos implican la participación de citocinas, que están implicadas en la respuesta inflamatoria sistémica y tienen un papel fundamental en el desarrollo de aterosclerosis acelerada en algunos pacientes.

Múltiples citocinas proinflamatorias, entre las cuales destacan el TNF, las IL-1 e IL-6 son liberadas por procesos inflamatorios locales a la circulación sistémica. Estas citocinas van a modular la respuesta inmunológica, y actúan simultáneamente como mediadores de numerosos efectos metabólicos en órganos y tejidos (37). Se produce de esta forma un espectro de cambios proaterogénicos que incluyen la presencia de disfunción endotelial, resistencia insulínica, activación de un estado protrombótico y estrés oxidativo, y que tienen como consecuencia el desarrollo de enfermedad aterosclerótica en estos pacientes (38).

Para el estudio de los fenómenos inflamatorios implicados en la disfunción endotelial puede ser útil la determinación de las moléculas proinflamatorias que provocan vasodilatación, como el ON, y de factores de crecimiento o moléculas de adhesión como I-CAM y V-CAM. Existen también marcadores celulares como las MP o las EPCs, cuyos niveles se han mostrado asociados a múltiples patologías que condicionan un incremento del riesgo vascular, como por ejemplo, en el caso de enfermedades neurológicas, en la migraña (39).

Dentro de las moléculas proinflamatorias, describimos a continuación aquellas que serán estudiadas específicamente en esta Tesis Doctoral:

1.5.1.1. Proteína C reactiva (PCR).

La PCR es, con diferencia, el marcador inflamatorio más utilizado en la práctica clínica. Su importancia radica, por una parte, en su fiabilidad, pero también en el hecho de que junto con algunos otros reactantes de fase (proteína SAA, fosfolipasa A2), ha demostrado ser parte activa del mecanismo patogénico de la aterosclerosis (40).

La PCR es una proteína de la familia de las pentraxinas (41). Como se ha señalado previamente, su utilización en la clínica se ha centrado en la identificación de procesos inflamatorios subyacentes, pero en los últimos años, varios estudios han demostrado que la PCR podría participar de forma directa o indirecta en el desarrollo del daño vascular. Entre dichos mecanismos se encuentran la activación del complemento (42), la disminución de la secreción de ON (43), la regulación al alza de las moléculas de adhesión (44), la estimulación de la secreción de factores tisulares por monocitos circulantes con efectos procoagulantes (43), y la facilitación de los mecanismos de apoptosis de las células endoteliales, junto con la inhibición de la angiogénesis (43).

Estos hallazgos apoyan la existencia de una relación entre inflamación y enfermedad cardiovascular, y ofrecen a la vez una explicación al origen del deterioro vascular asociado a las enfermedades infecciosas e inflamatorias crónicas.

1.5.1.2. Óxido Nítrico (ON).

El ON juega un importante papel en los procesos fisiológicos vasculares. El ON tiene un efecto vasodilatador directo, que influye en la regulación de la tensión arterial, pero además, desempeña una función en la modulación de la respuesta inmune, posiblemente a través de la regulación diferencial de la síntesis de citocinas, macrófagos y otros tipos celulares, que pueden inducir la formación de interferón gamma (IFN- γ), TNF- α y lipopolisacárido bacteriano (LPS) (26).

El ON, por tanto, tiene un importante papel en los procesos fisiológicos, pero también en estados patológicos, al tratarse de una sustancia metabólica activa que interviene en el ciclo biológico de la célula endotelial (por inhibición de la respiración mitocondrial, generación de radicales más tóxicos y daño directo al ADN); conduciendo al desarrollo de un desequilibrio en la producción de los mediadores hemostáticos y hemodinámicos, en el que prevalecen aquellos que conducen a la enfermedad vascular (45).

De esta manera se induce la migración de células musculares lisas hacia la íntima, y la diferenciación hacia fibroblastos para aumentar el tamaño de la placa aterosclerótica. Es, por tanto, una respuesta anormal ante el estrés dinámico, con la

consecuente formación de trombos y progresión acelerada hacia la disminución del calibre vascular, produciendo un incremento del riesgo de enfermedad vascular.

El ON está implicado además en la patogénesis de enfermedades neurológicas en las que se ha demostrado la existencia de una disfunción endotelial y un incremento del riesgo de padecer enfermedades vasculares como la migraña. Esta relación, más marcada en el caso de la migraña con aura, se explica por los mecanismos fisiopatológicos comunes entre la migraña y la disfunción endotelial. Entre las funciones del ON, se considera que es también uno de los potenciales mediadores endógenos del inicio del ataque de migraña, tal y como se ha demostrado en diversos estudios, que han evidenciado niveles elevados de metabolitos del ON durante las crisis de migraña (46).

1.5.1.3. Velocidad de sedimentación globular (VSG).

La velocidad de sedimentación globular (VSG) es una herramienta útil y ampliamente utilizada para evaluar la existencia de fenómenos inflamatorios subyacentes en la población general. Además, en algunos estudios, la VSG utilizada como marcador inflamatorio ha sido predictiva del desarrollo de insuficiencia cardíaca (47). Su medición se ha asociado con otros marcadores de inflamación como la PCR.

1.5.1.4. Fibrinógeno sérico.

El fibrinógeno sérico es una proteína reactante de fase aguda que se correlaciona con la PCR. Además, el fibrinógeno ha demostrado en sujetos de la población general ser un factor de riesgo cardiovascular (48), y se ha asociado también con los factores de riesgo tradicionales (49). Entre sus acciones se encuentran la activación plaquetaria, que contribuye a la agregación plaquetaria favoreciendo el desarrollo de trombos. El incremento de los niveles de fibrinógeno, además, contribuye a la viscosidad plasmática, habiéndose demostrado incrementos en situaciones de inflamación (50).

15.1.5. Lipoproteína a [Lp(a)].

La lipoproteína a [Lp(a)] es una lipoproteína cuya estructura es similar a la de LDL-c. La diferencia esencial entre LDL-c y Lp(a) es la presencia de una molécula adicional de apolipoproteína (a) parecida al plasminógeno, unida covalentemente a la apoB-100 por medio de enlaces disulfuro. Debido a su homología con el plasminógeno,

la Lp(a) compete por los sitios de unión en la molécula y las células, y, por lo tanto, puede llegar a interferir con el plasminógeno incrementando el riesgo de enfermedad isquémica.

La Lp(a) ha demostrado también ser un factor de riesgo de enfermedad vascular isquémica y tromboembólica (51). Fisiopatológicamente es una molécula aterogénica y trombogénica, por su similitud estructural con el plasminógeno, y además altera la función endotelial al unirse a la tetranectina y producir una alteración en la agregación plaquetaria. Se ha demostrado, así mismo, que los estados inflamatorios también causan aumento de la Lp(a) sérica (52).

1.5.1.6. Factor de Von Willebrand (FvW).

El FvW, es una glicoproteína producida, almacenada y liberada en el endotelio, que se ha considerado juega un papel importante en el riesgo de desarrollar una enfermedad vascular, y además ha sido considerado un factor de riesgo independiente de ictus (53).

El FvW actúa facilitando la agregación plaquetaria, y su acción es principalmente procoagulante. En caso de existir un daño a nivel endotelial nos encontramos con que se produce un exceso de liberación de FvW asociado a un mayor riesgo de procesos procoagulantes.

1.5.1.7. Moléculas de adhesión intercelular I-CAM y vascular V-CAM.

Las moléculas I-CAM, y V-CAM, forman parte de la superfamilia de las inmunoglobulinas. Estas moléculas desarrollan un importante papel en los procesos de inflamación, intervienen en la respuesta inmune e incluso en diversos mecanismos intracelulares (54).

La familia de I-CAM está formada por 5 moléculas, de ICAM-1 a ICAM-5, y entre sus funciones está unirse a las integrinas inflamatorias producidas por los leucocitos para participar en la respuesta inmune y los procesos inflamatorios asociados. V-CAM, por su parte, se une a la integrina VL-4 de los linfocitos, y entre sus principales funciones está reclutar leucocitos para los lugares en los que se están produciendo fenómenos de inflamación (55).

La importancia del reclutamiento leucocitario radica en que se ponen en marcha todos los mecanismos proinflamatorios que desencadenarán en la disfunción endotelial y la formación de la placa de ateroma, como paso previo a la enfermedad vascular.

1.5.1.8. Células progenitoras endoteliales circulantes (EPCs).

En 1997 Asahara demostró que las células obtenidas de sangre circulante podían convertirse en células endoteliales *in vitro* (56), sugiriendo la presencia de células progenitoras endoteliales circulantes (EPCs). Estas células provenientes de la médula ósea se encuentran circulantes en la sangre periférica conservando su capacidad de proliferación y diferenciación.

Desde entonces se han puesto en marcha numerosos estudios que han demostrado que los niveles de EPCs circulantes son predictivos de eventos vasculares y muerte en numerosas enfermedades, y que pueden definir el pronóstico vascular de distintas patologías, estando implicadas en la supervivencia tras un IAM o enfermedades pulmonares (57). Nuestro grupo ha estudiado la presencia de EPCs y MPs en enfermedades neurológicas. En el caso de una enfermedad neurovascular como la migraña, donde se ha establecido que constituye *per se* un factor de riesgo de enfermedad vascular, se encontró un incremento de las EPCs CD62E+ similar al reportado para otros procesos patológicos (58).

1.5.2. MARCADORES ULTRASONOGRÁFICOS.

Existen diferentes determinaciones que nos reflejan el estado del endotelio mediante estudios de ultrasonografía. El método más ampliamente estudiado y empleado para la evaluación de la función endotelial es la vasodilatación dependiente de endotelio (VDE). En las últimas décadas, la ecografía en modo B también se ha mostrado eficaz para el estudio de los cambios morfológicos iniciales de la pared arterial, en forma de engrosamiento del espesor íntima-media (grosor íntima media; GIM). Menos conocidos, pero que han mostrado una gran relevancia clínica, son los estudios de reserva hemodinámica cerebral (RHC). Estos estudios permiten valorar la integridad de la circulación cerebral, su funcionalidad y las anastomosis leptomeníngeas. Describimos a continuación los principales estudios realizados en esta Tesis Doctoral:

1.5.1.2. Vasodilatación dependiente de endotelio (VDE).

En los seres humanos la respuesta vasodilatadora del sistema vascular puede valorarse a diversos niveles, por ejemplo, mediante angiografía de las arterias coronarias, y, en las arterias periféricas, mediante pletismografía tras la administración de diversas sustancias. En este caso, la medición puede realizarse en la arteria braquial, midiendo la respuesta a una vasodilatación dependiente de un endotelio normofuncinante (después de la administración intraarterial de acetilcolina), e independiente de la función endotelial (después de la administración de nitratos). La ventaja de esta técnica es que es menos agresiva que la coronariografía, y que mantiene una estrecha relación con la respuesta vasodilatadora dependiente de endotelio de las arterias coronarias (59) a pesar de ser una arteria que no tiende al desarrollo de aterosclerosis. Su gran limitación es que es parcialmente agresiva, al requerir la infusión de fármacos, y que algunos de estos, como la nitroglicerina, no deben utilizarse en sujetos con antecedentes de bradicardia o hipotensión.

Ante las limitaciones señaladas previamente, hemos buscado otras técnicas que nos permitan medir la disfunción endotelial. La prueba ideal debe ser inocua y permitir la realización de determinaciones sucesivas en el tiempo para contrastar la evolución de la función endotelial ante diversas patologías y para el estudio de pacientes presintomáticos.

La VDE, medida mediante ultrasonidos en la arteria braquial, se ha mostrado como una de las mejores técnicas hasta el momento. Es un método validado, no invasivo y fisiológico, que se ha generalizado para la medición de la función endotelial. El estudio se puede realizar también a nivel de la arteria femoral o la arteria radial en caso necesario. La VDE se fundamenta en los fenómenos fisiológicos del endotelio. Se caracteriza por una dilatación vascular en respuesta a un incremento del flujo sanguíneo. El estímulo consiste en provocar un aumento de flujo en la arteria braquial. Al someter a una arteria periférica a una compresión mecánica, con la posterior liberación de esa compresión se induce un incremento del flujo sanguíneo a través del vaso por hiperemia reactiva. Este incremento del flujo aumenta la denominada tensión de cizallamiento (del inglés, *shear stress*), en dirección perpendicular a la corriente de flujo sanguíneo que se produce como consecuencia de la liberación de neuromediadores, como el ON endotelial, siendo el resultado final la aparición de vasodilatación. El grado de

vasodilatación será directamente proporcional a la cantidad de ON que libere el endotelio (60). La medición de la VDE se encuentra estandarizada de acuerdo con guías internacionales (61), y se define como el porcentaje de cambio entre el diámetro del vaso tras una hiperemia reactiva y el diámetro en condiciones basales. Se ha demostrado que, en pacientes que presentan factores de riesgo vascular o patología cardiovascular establecida, se reduce el porcentaje de cambio o incluso puede llegar a estar ausente (62).

Los resultados de la medición pueden verse afectados por varios factores que se resumen en la Tabla 1. El estrés de cizallamiento es proporcional a la viscosidad sanguínea y a la velocidad de la sangre y se relaciona de forma inversa con el diámetro del vaso sanguíneo. Por tanto, puede deducirse que cuanto mayor sea el diámetro del vaso el porcentaje de cambio observado será menor. Otros factores que han demostrado influir en este resultado son la edad, el sexo (los estrógenos condicionan una menor respuesta y el diámetro vascular tiende a ser menor), la hora del día (variaciones circadianas) y las condiciones técnicas en las que se realiza la medida (posición, ayunas, toma de medicación, reposo, temperatura ambiental etc.).

Tabla 1: Factores que pueden alterar los resultados de la VDE.

Factores que influyen sobre la determinación de la VDE
Sexo
Edad
Estrés de cizallamiento
Ciclo menstrual
Resistencias vasculares
Condiciones técnicas de la sala (posición, temperatura, duración...)
Hora de realización (Ritmo circadiano)
Ayuno o ejercicio previo
Antecedentes familiares de patología vascular
Factores de riesgo de enfermedad vascular (hipertensión, diabetes, dislipemia, obesidad...)
Daño medular

Una de las grandes ventajas de la ecografía sobre otras técnicas para el estudio de la VDE, es que permite realizar determinaciones repetidas a lo largo del seguimiento de los pacientes en riesgo o con patología ya establecida e incluso estudiar la eficacia las intervenciones terapéuticas. La otra gran ventaja es su accesibilidad, ya que la arteria

braquial es fácilmente localizable y no requiere de métodos invasivos, de grandes requerimientos técnicos o largas curvas de aprendizaje. Además, los resultados medidos en la arteria braquial se correlacionan bien con la función endotelial de arterias coronarias o cerebrales (59).

Por todo lo anterior, su uso se ha extendido no sólo en la clínica, sino que se ha generalizado en el campo de la investigación, en diferentes patologías, incluyendo, en el ámbito de la neurología, la migraña. En el caso de los pacientes migrañosos, está demostrada, sobre todo en el caso de la migraña con aura, la existencia de una reactividad vascular aumentada al CO₂ en el periodo intercrítico (63) (64), aunque los estudios comparativos con controles han mostrado datos contradictorios (65) (66).

1.5.2.2. Grosor íntima-media (GIM).

La medición del GIM por ultrasonografía constituye un test no invasivo, en el cual se estudia la pared arterial a nivel de las arterias carótidas mediante el uso de ultrasonidos en modo bidimensional. La determinación de las características arteriales mediante esta técnica ha permitido establecer un nuevo marcador de riesgo de morbi-mortalidad cardiovascular (67).

La exploración de la pared arterial muestra la existencia de dos líneas ecogénicas, que se corresponden histológicamente con las interfases luz-íntima y media-adventicia. La distancia entre esas dos líneas ecogénicas representa el engrosamiento combinado de la capa íntima y media de la pared arterial, y se define como GIM.

La ecografía ha demostrado ser una técnica fiable y que permite detectar los cambios estructurales que se producen en la pared arterial desde las primeras etapas de los mismos (68). Además, su generalización ha permitido medir y monitorizar la progresión de la aterosclerosis en individuos asintomáticos (69). Los estudios han puesto de manifiesto que el aumento del GIM medido mediante ecografía en modo B se correlaciona con la presencia de factores de riesgo cardiovascular (70) y constituye por sí mismo un factor de riesgo independiente de cardiopatía isquémica e ictus (71). Su medición de forma consecutiva, dado que se trata de una prueba inocua, nos permite además valorar la progresión de la aterosclerosis o su modificación en estudios de intervención (72).

Teniendo en cuenta que el GIM es un marcador de riesgo cardiovascular y que es capaz de detectar la aterosclerosis subclínica o preclínica, han surgido estudios en los cuales se re-estratifica el riesgo cardiovascular de los individuos. En estos estudios, aquellos individuos con un riesgo bajo o intermedio en los que se obtiene un GIM patológico, son recalificados en situación de riesgo cardiovascular elevado. Esta nueva estratificación del riesgo vascular permite ofrecer a individuos con aterosclerosis subclínica, no detectada por las tablas actuales de estratificación cardiovascular, estrategias de prevención cardiovascular más agresivas (73).

1.5.2.3. Estudio de reserva hemodinámica cerebral (RHC) o vasorreactividad cerebral (VRC).

Los estudios de RHC miden la capacidad que tiene el cerebro de mantener un flujo sanguíneo cerebral (FSC) constante a pesar de variaciones de la presión arterial (74). El conocimiento del estado de la RHC permite valorar la integridad de la circulación cerebral y su funcionalidad.

Existen numerosas series que han relacionado la pérdida de RHC con el riesgo de presentar ictus. Aunque la mejor técnica para su estudio es la tomografía por emisión de positrones (PET), se trata de una técnica de alto coste y poco accesible, por lo que su medición indirecta mediante las técnicas de ultrasonidos se ha demostrado útil y eficaz.

El cerebro tiene elevadas demandas energéticas, que exigen un aporte vascular continuo. Para preservar su función metabólica dispone de dos mecanismos: la autorregulación del flujo y el aumento de la tasa de extracción de oxígeno de la sangre (75). En diferentes situaciones experimentales, se ha comprobado que la capacidad de autorregulación se va perdiendo, como por ejemplo durante la isquemia, tras un traumatismo o en estados de inflamación (76).

Los ultrasonidos permiten medir la VRC de forma indirecta, pero con resultados superponibles a las técnicas consideradas de referencia (77). La determinación puede llevarse a cabo con diferentes métodos (prueba de CO₂, prueba de acetazolamida o mediante test de apnea). En nuestro trabajo hemos optado por el test de apnea (78), dada la sencillez de la misma y porque no precisa el uso de medicación (acetazolamida) que interfiriese con el resto de estudios, o de material extra (capnógrafo).

1.5.2.4. Otras determinaciones ultrasonográficas.

Dentro del estudio ultrasonográfico de la estructura y función endotelial, el cálculo del flujo sanguíneo cerebral total (CBF) ofrece importante información sobre los mecanismos de autorregulación y el potencial daño subyacente. Usando la ecografía, la medición del flujo en ambas carótidas internas y ambas vertebrales permite conocer el flujo cerebral global. Este cálculo ha demostrado tener una buena correlación con el SPECT (del inglés *Single Photon Emission Tomography*), PET (79) y los estudios de perfusión mediante RMN, considerados las pruebas de elección (80). Las alteraciones en este registro resultan de especial interés, dado que se han objetivado registros alterados de la misma en diferentes enfermedades neurológicas como el ictus y la demencia (81).

Por último, la ecografía cerebral en modo B permite obtener imágenes de estructuras parenquimatosas y realizar una medición válida de los diámetros ventriculares, especialmente del tercer ventrículo. Esto hace que se considere una técnica de gran utilidad en la evaluación y seguimiento de pacientes con atrofia cerebral o con riesgo de presentarla, lo que abre una puerta de investigación, sobre todo para las enfermedades neurodegenerativas.

1.6. DISFUNCIÓN ENDOTELIAL EN LAS ENFERMEDADES INFLAMATORIAS.

El reconocimiento del importante papel jugado por la inflamación en todas las fases de la aterosclerosis y del desarrollo de la enfermedad vascular ha sido fundamental para entender la potencial relación entre algunas patologías con un claro componente inflamatorio, y el desarrollo de eventos vasculares en estos pacientes. Es además, un hecho fundamental, que debería condicionar los procesos diagnósticos y de investigación dirigidos a la prevención de complicaciones en este grupo de patologías.

Las enfermedades autoinmunes conforman un amplio grupo de entidades de variada expresión clínica que pueden afectar a casi cualquier órgano del cuerpo. La etiología es desconocida aún en gran parte de las mismas, aunque se considera que un agente ambiental puede alterar el sistema inmune, el cual no reconoce los antígenos como propios y los ataca en individuos genéticamente predispuestos. Son patologías

que frecuentemente afectan a personas jóvenes y asocian una importante morbi-mortalidad. Existe una amplia variedad de enfermedades autoinmunes, entre las más estudiadas se encuentran enfermedades endocrinológicas como la tiroiditis o la diabetes mellitus tipo 1, enfermedades reumatológicas como la artritis reumatoide (AR), o el lupus eritematoso sistémico (LES), mientras que en el ámbito de la neurología la enfermedad autoinmune por excelencia es la esclerosis múltiple (EM).

En muchas de estas enfermedades de naturaleza inflamatoria, se ha constatado la existencia de un incremento de la incidencia de enfermedades vasculares (82). Se ha postulado que este incremento se basa en los mecanismos fisiopatogénicos comunes que comparten las enfermedades inflamatorias autoinmunes con aquellos procesos que desencadenan en la formación y progresión de la placa de ateroma. Además, los factores de riesgo considerados tradicionales únicamente explican el 40% de los casos de eventos vasculares en estos grupos de pacientes, lo que indica la coexistencia de otros factores capaces de desencadenar el proceso aterogénico.

Esta asociación ha quedado especialmente demostrada en las principales enfermedades reumatológicas, como la AR (83), el LES, la espondilitis anquilosante y otras (84). El ejemplo paradigmático lo constituye sin duda la AR, una enfermedad inflamatoria crónica predominantemente articular, pero en la que pueden aparecer manifestaciones extra articulares a lo largo de su evolución. La AR puede presentarse a cualquier edad, aunque su máxima incidencia se sitúa entre los 40 y 60 años con un claro predominio femenino, presentando una relación 3 a 1. En la AR, el riesgo de muerte por enfermedad cardiovascular ha sido considerado el doble comparado con la población general (85), incremento que no se puede explicar únicamente por los factores de riesgo cardiovasculares clásicos (86).

Se ha demostrado que los pacientes con AR de larga evolución presentan un incremento del grosor del GIM y placas de ateroma, en ausencia de otros factores de riesgo cardiovascular clásicos o evidencia de eventos cerebrovasculares o cardiovasculares previos (87). Los pacientes con AR presentan una disfunción endotelial, que se puede objetivar en la respuesta tras la infusión de acetilcolina, así como una reducción en el número y función de las EPCs (88) (89). Es esta alteración, existente en el normal funcionamiento del endotelio, la que favorece el desarrollo de la

ateroesclerosis, que, además, se ha demostrado que progresa más rápidamente en los primeros años tras el diagnóstico (90).

Los últimos 15 años han marcado un considerable cambio en el tratamiento de las enfermedades inmunológicas como la AR. La disponibilidad de nuevos tratamientos, incluyendo tratamientos biológicos, y la generalización del uso de terapias modificadoras de la enfermedad aportan claros beneficios en la evolución de la misma y, en algunas series, también en la progresión de la enfermedad aterosclerótica. Se ha demostrado que estos tratamientos pueden mejorar la función endotelial y reducen la rigidez arterial (91), y aunque en algunos casos los resultados han sido contradictorios, los trabajos publicados han demostrado que los pacientes tratados con fármacos biológicos presentan un riesgo de eventos vasculares en los primeros meses menor que aquellos tratados con los fármacos habituales (92). De todo lo anterior puede concluirse que el tratamiento eficaz en las primeras fases de la enfermedad no logra únicamente el objetivo terapéutico de reducir la actividad de la enfermedad y, por tanto, sus manifestaciones clínicas, sino que también puede actuar limitando el daño endotelial y reducir el riesgo de eventos vasculares futuros.

Como se ha señalado, esta asociación entre enfermedades autoinmunes y riesgo de desarrollo de eventos vasculares secundario a la existencia de una disfunción endotelial subyacente, se ha demostrado también en otras enfermedades autoinmunes. En el caso de la EM, los trabajos, en cambio, son relativamente escasos, y, aunque disponemos de algunos estudios de prevalencia de eventos vasculares, e incluso se ha apuntado a un posible origen vascular en su fisiopatología, los estudios dirigidos a conocer la existencia y el grado de disfunción endotelial en la EM son limitados.

En cambio, los mismos marcadores de estudio de la función endotelial se han utilizado con éxito en otras patologías neurológicas con una base neurovascular y en las que la inflamación juega un papel relevante en su fisiopatología. Es el caso de la migraña, en la que, durante los últimos años, se ha propuesto que puede ser consecuencia de una disfunción endotelial (93). Existen varios grupos internacionales que han demostrado la existencia de una disfunción endotelial en los pacientes migrañosos, aunque con resultados dispares (94) (95). En el caso de la migraña, esta disfunción endotelial sería la responsable de la asociación existente entre migraña y enfermedad cardiovascular, incluyendo el ictus isquémico, que está claramente

demostrada, sobre todo en el caso de la migraña con aura (96), pero también explicaría el incremento de frecuencia de otros eventos vasculares isquémicos como el IAM o la claudicación intermitente (97). Fruto de estas asociaciones, se ha considerado y aceptado que la migraña *per se* constituye un factor de riesgo para la enfermedad aterosclerótica (98).

Se describen a continuación las principales características de la EM, ejemplo de enfermedad autoinmune crónica que afecta al sistema nervioso central (SNC) y en la que la inflamación constituye uno de los componentes fundamentales, haciendo especial hincapié en los datos disponibles en la actualidad sobre la fisiopatología y comorbilidad vascular asociada.

1.7. ESCLEROSIS MÚLTIPLE.

1.7.1. Generalidades.

La EM es una enfermedad inflamatoria crónica desmielinizante y neurodegenerativa del SNC que afecta especialmente a personas jóvenes en los periodos más activos de su vida (99). Se considera la EM como una enfermedad autoinmunitaria del SNC, desencadenada por agentes exógenos desconocidos, en personas con una predisposición genética. Es una enfermedad que clásicamente se presenta de forma episódica, con síntomas parcial o completamente reversibles, y que posteriormente presenta una etapa con un progresivo empeoramiento clínico.

La EM es una enfermedad caracterizada por la aparición de forma consecutiva en diferentes localizaciones de la sustancia blanca fundamentalmente, pero también en la sustancia gris, de lesiones inflamatorias que dejan posteriormente una cicatriz gliótica caracterizada por desmielinización y daño axonal. Característicamente se inicia en las primeras décadas de la vida, frecuentemente entre los 20 y los 40 años y, al igual que otras enfermedades autoinmunes crónicas tiene un claro predominio femenino, con una relación en la prevalencia aproximada de 2:1 (mujer:varón). La fase progresiva de la enfermedad se manifiesta generalmente entre los 5 y los 20 años desde el inicio. Aunque en un 10-15% de los casos ocurre en familiares directos de primera línea, no se ha encontrado hasta la actualidad un patrón de herencia claro. La EM constituye la causa más común de incapacidad neurológica por enfermedad en los adultos jóvenes del mundo desarrollado.

1.7.2. Curso clínico de la EM.

El curso clínico de la EM es completamente diferente al de otras enfermedades neurológicas (100). El inicio de la enfermedad se caracteriza, en más del 85% de los casos por brotes, episodios de déficit neurológico de inicio brusco seguidos de una recuperación gradual a lo largo de varias semanas. Estos episodios o brotes, se repetirán a lo largo de la enfermedad con una frecuencia variable, en lo que constituye la fase de EM remitente-recurrente (101). Entre los brotes, la mayoría de los pacientes presentan una buena recuperación, siendo capaces de mantener sus actividades cotidianas. Aproximadamente entre 5 y 25 años tras el diagnóstico, se produce un cambio significativo, el número de brotes se reduce de forma importante, y son sustituidos por una fase caracterizada por un lento empeoramiento clínico, con agravamiento de los síntomas residuales de los brotes anteriores. Esta fase de la enfermedad conocida como EM secundariamente progresiva tiene una respuesta muy limitada a los fármacos actuales, a diferencia de la fase anterior en la cual el componente inflamatorio es mucho mayor. Una de las características típicas de esta fase son los problemas de movilidad, con pérdida de la independencia, y en muchos casos, el paciente va a requerir del uso de silla de ruedas y ayuda para la movilización y las transferencias.

Una pequeña proporción de los pacientes (<10% aproximadamente), no experimentan el curso y los síntomas típicos de la forma remitente-recurrente descrita previamente. En su caso, la enfermedad se presenta con una progresión de los síntomas desde el inicio de la misma. Esta variedad condiciona un curso clínico mucho más rápido con tasas de incapacidad más altas y ya presentes en las fases iniciales de la enfermedad. Esta entidad se conoce como EM primariamente progresiva y asocia generalmente con un mal pronóstico.

En otro subgrupo de pacientes (10-15%) los brotes son de una intensidad leve y no llegan a desarrollar una fase secundariamente progresiva claramente manifiesta. Estos casos, han recibido históricamente el término de “EM benigna”, aunque en la actualidad se encuentra en discusión. Esto es debido a que, en los últimos años, se ha demostrado, que sólo un pequeño porcentaje de estos pacientes permanecen sin una clara afectación funcional a largo plazo (102).

1.7.3. Recuerdo histórico.

Existen numerosas etapas en la historia de la EM, a pesar de ser una enfermedad que no ha sido descrita hasta épocas recientes. Durante los siglos previos al descubrimiento de la enfermedad, encontramos numerosas descripciones de personas que padecían lo que aparentemente se trataba de una extraña enfermedad que afectaba al sistema nervioso y que resultaba resistente a todas las terapias conocidas. Muchas de ellas son sugerentes de casos de EM, denominados con nombres diversos por los médicos de la época. Tras su primera descripción en el siglo XIX, los clínicos se centraron en la búsqueda de las causas de la EM y el motivo de su predilección por personas jóvenes. El siglo XX fue el siglo de la fisiopatología de la enfermedad, en el cual los investigadores se centraron en los factores bioquímicos, inmunológicos y genéticos relacionados con la enfermedad, lo que se vio plasmado en numerosos avances, sobre todo en los campos de la inmunología y la neuroimagen. Todo esto ha sido el prelude de la época actual, una de las más activas de la historia de la medicina, y que se conoce como la era terapéutica de la EM, que se inició con los primeros fármacos que de forma significativa han logrado modificar el curso de la enfermedad.

Las dos últimas décadas han marcado el devenir de una enfermedad, hasta entonces con connotaciones muy negativas por la discapacidad y los numerosos problemas asociados. Se ha abierto una nueva época prometedora y de esperanza, en la que, desde la ciencia básica, con los ensayos clínicos, los nuevos fármacos disponibles y los que se dispondrán en un futuro próximo, podremos lograr grandes avances en un futuro cercano. Pero se hace necesario un breve conocimiento de los hechos que han llevado a la situación actual en la EM.

Una de las primeras descripciones de una persona cuyos síntomas se podrían corresponder con una EM, según los expertos, corresponde a Santa Lidwina de Schiman, holandesa que vivió entre 1380 y 1433. Tal y como se describe en su canonización, esta mujer, desde los 15 años sufrió una variedad de síntomas neurológicos en distintas localizaciones, que se presentaban con agravamientos y periodos de remisión de los mismos. Entre los síntomas se encontraban pérdida de equilibrio, festinación, dolor facial, ceguera unilateral y una debilidad progresiva que fue descrita como intratable por los médicos de la época y que le llevó a fallecer a la

edad de 53 años. Considerando la sintomatología y el curso de la enfermedad, la EM constituye la principal sospecha de esta afección (103).

En la historia de la medicina se encuentra otro caso sugerente de EM. Sir Augustus Frederic d'Esté, nieto ilegítimo del rey Jorge III de Inglaterra, vivió entre 1794 y 1848. En este caso disponemos de una detallada descripción de los síntomas sufridos, definido de acuerdo con sus médicos como una paraplejia progresiva, con periodos de recuperación entre los episodios de déficit neurológico y con la aparición de una discapacidad progresiva en el tiempo. En su caso se probó una amplia diversidad de posibles tratamientos, pero todos ellos fueron infructuosos.

Desde el siglo XIX, numerosos médicos comenzaron el estudio de una extraña enfermedad neurológica, progresiva y que afectaba sobre todo a pacientes jóvenes, caracterizada por unos hallazgos característicos en las necropsias. La escuela francesa fue particularmente activa en este campo, destacando el hospital de La Pitié Salpêtrière en París. Jean Marie Charcot considerado uno de los padres de la neurología moderna, contribuyó a describir y conocer numerosas patologías del sistema nervioso, entre ellas la EM. Charcot relacionó, por primera vez, los hallazgos de las autopsias con los síntomas neurológicos de la enfermedad que denominó “Esclerosis en placas diseminadas” (104) (105). Una de sus pacientes, una mujer joven, presentaba un temblor, diferente a otros descritos, y que asociaba otros síntomas neurológicos, incluyendo alteración en la articulación el lenguaje y movimientos anormales de los ojos. Cuando la mujer murió, Charcot examinó el cerebro en la autopsia y pudo observar las lesiones en placas existentes. Además, estableció una descripción detallada de los diagnósticos clínicos y evolutivos de la enfermedad, y estableció una correlación con los hallazgos anatomopatológicos. Aunque estas lesiones habían sido descritas previamente por otros patólogos como Cruveilhie (106) en París en 1835, o Carswell (107) en Londres, se considera a Charcot el gran descubridor de la EM, por establecer la primera descripción completa de la enfermedad.

Charcot describió la enfermedad bajo el nombre de esclerosis en placas, término por el que aún se conoce en la literatura francesa, y que hace una clara referencia a los hallazgos anatomopatológicos. Estos hallazgos consisten en la presencia de zonas cicatriciales en la sustancia blanca del encéfalo en las autopsias que realizaba en el hospital de La Pitié Salpêtrière.

Al finalizar sus conclusiones sobre la enfermedad, cuando llego a la discusión del tratamiento, tras haber descrito detalladamente las características clínicas, la patología, el curso y el pronóstico de la enfermedad, sus conclusiones fueron muy pesimistas, y tristemente concluyó: “Después de lo que precede, ¿Es necesario que me detenga en la cuestión del tratamiento? El tiempo de que esta consideración sea seriamente tenida en cuenta aún no ha llegado” (108).

A pesar de las conclusiones pesimistas de Charcot, a partir de este momento hubo un creciente interés por la enfermedad, y otros neurólogos célebres como Joseph François Babinski (109) profundizaron en el conocimiento de la clínica y de las características anatómicas de la EM, explicando la presentación intermitente de los síntomas neurológicos y la variabilidad en las formas de presentación de la enfermedad.

La escuela inglesa se refirió a la enfermedad bajo el término de esclerosis diseminada o esclerosis insular, para reseñar la diseminación existente entre las lesiones en el SNC, y a posteriori, el término que se ha impuesto a nivel internacional y el más utilizado en la literatura es el de EM, que hace referencia a la existencia de múltiples lesiones a nivel del SNC y, al mismo tiempo, a la existencia de diferentes episodios de disfunción neurológica a lo largo del tiempo.

Desde la primera descripción realizada por Charcot se han planteado las mismas dudas que todavía no tienen una clara respuesta. La principal es la etiología de la EM, esto es, qué produce la EM. Multitud de teorías han surgido desde entonces. Uno de los discípulos de Charcot, Pierre Marie (1853-1940), fue pionero en considerar la teoría infecciosa (110), pero ya desde el año 1863 Rindfleisch (111) había considerado que en las lesiones de la EM existía un importante componente inflamatorio, y que esta inflamación podía ser la desencadenante de la pérdida de mielina. Mucho más tarde, ya en los años 40 del siglo XX, esto fue corroborado por Elvin A. Kabat que observó la existencia de un aumento de la proporción de gammaglobulinas en el líquido cefalorraquídeo de los pacientes con EM, lo que apoya la hipótesis de la alteración inmunológica como causa de la enfermedad (112). Desde entonces, la comunidad científica ha avanzado considerablemente en el conocimiento de la fisiopatogenia de la enfermedad, lo que ha permitido mejorar de forma significativa tanto el diagnóstico como las opciones de tratamiento de los pacientes y consecuentemente, su calidad de vida.

1.7.4. Diagnóstico de la EM.

En su descripción Charcot estableció unos criterios diagnósticos, aunque no formales para la EM, se trata de la tríada clásica de nistagmo, temblor y problemas del lenguaje. El problema es que dicha tríada era realmente restrictiva y por tanto dificultaba el diagnóstico de la enfermedad. Posteriormente la utilización de unos criterios diagnósticos se ha generalizado como una herramienta esencial en la enfermedad, y en la actualidad su utilización es insustituible tanto en la clínica como en la investigación, aunque han existido diferentes criterios a lo largo del último siglo.

En los años 30 del siglo XX, Marburg sugirió que la combinación de palidez de la papila, signo de Uthoff, ausencia de reflejos abdominales y signos piramidales eran típicos de la EM. Es a partir del año 1965 cuando surgen los que se consideran los primeros criterios diagnósticos aceptados de la enfermedad (Tabla 2).

Tabla 2: Criterios de Schumacher para el diagnóstico de EM.

Criterios diagnósticos de Schumacher
• Inicio de los síntomas entre los 10 y los 50 años.
• Anomalías objetivadas en la exploración neurológica.
• Los signos y síntomas indican daño en la sustancia blanca del SNC.
• Las lesiones están diseminadas en espacio (2 o más lesiones separadas).
• Las lesiones están separadas en tiempo (2 ataques separados al menos un mes).
• No existe una explicación mejor.

Estos criterios, conocidos como los criterios de Schumacher (113), constituyen esencialmente una lista de las características más habituales de la enfermedad. Se generaliza a partir de este momento el concepto de diseminación temporal y espacial, y no se llega al diagnóstico si el paciente no tiene al menos dos procesos neurológicos distintos separados en el tiempo. Este es un concepto que se mantendrá en los criterios siguientes.

A lo largo de los 20 años siguientes, el desarrollo de las técnicas de neurofisiología, con los potenciales evocados y el análisis del líquido cefalorraquídeo, que se incorporaron en la práctica clínica, contribuyeron a mejorar la información para el diagnóstico. Los potenciales evocados son una prueba no agresiva que permite

valorar el retraso en la conducción nerviosa producido por la pérdida de mielina. La neuroimagen sin duda, ha marcado un hito definitivo en el diagnóstico de la enfermedad. La tomografía axial computerizada (TAC) en primer lugar y, sobre todo, la resonancia magnética (RM) permitían identificar las lesiones de EM e incluso monitorizar el potencial efecto de los tratamientos.

En un esfuerzo por incluir los resultados de estos test para ayudar al diagnóstico surgieron los nuevos criterios de Poser en el año 1983 (114). Estos criterios determinan cuando un paciente tenía una posible, probable o definitiva EM (Tabla 3). Persiste, en estos criterios, la idea de diseminación en el tiempo y en el espacio, pero como principal novedad permiten la identificación de lesiones asintomáticas mediante las nuevas técnicas diagnósticas que ayudan a establecer el diagnóstico. Estos criterios actualizaban por tanto el diagnóstico con las nuevas técnicas complementarias, aunque todavía no incluían las nuevas de neuroimagen, sobre todo la RM, cuyo uso todavía era bastante restrictivo.

Tabla 3: Criterios diagnósticos de Poser (1983).

Categoría	Datos adicionales necesarios para el diagnóstico de EM
EM clínicamente definida	-Dos brotes, y evidencia clínica de dos lesiones separadas. -Dos brotes, evidencia clínica de una, y evidencia paraclínica de otra lesión separada
EM clínicamente definida con apoyo de laboratorio.	-Dos brotes y evidencia clínica o paraclínica de una lesión, más bandas oligoclonales en LCR o elevación de IgG. -Un brote y evidencia clínica de dos lesiones separadas, más bandas oligoclonales en LCR o elevación IgG. -Un brote, evidencia clínica de una lesión, evidencia paraclínica de otra lesión separada, más bandas oligoclonales en LCR o elevación de IgG
EM clínicamente probable	-Dos brotes y evidencia clínica de una lesión. -Un brote y evidencia clínica de dos lesiones separadas. -Un ataque, evidencia clínica de una lesión, evidencia paraclínica de otra lesión separada.
EM probable apoyada en el laboratorio	-Dos brotes y bandas oligoclonales o elevación de IGG.

Poco después de la publicación de estos criterios se generalizó el uso de la RM en la práctica clínica con especial interés para el diagnóstico de las enfermedades desmielinizantes. Esto supuso una revolución al permitir identificar las lesiones

causantes de los brotes, identificar lesiones subclínicas de una manera eficaz y monitorizar la progresión de la enfermedad, así como la potencial eficacia de las nuevas terapias disponibles.

En el año 2001 un comité internacional de expertos en EM decidió revisar los criterios de Poser para incluir la RM como un arma fundamental para el diagnóstico clínico. Los conocidos como criterios de McDonald (115) clarificaron y simplificaron el número de categorías diagnósticas además de facilitar un diagnóstico precoz para facilitar el inicio de los tratamientos. Dichos criterios se basan fundamentalmente en la clínica, pero incorporan como nueva herramienta la RM, además de incluir por primera vez una norma precisa para el diagnóstico de EM primariamente progresiva.

Los criterios que utilizan para definir la diseminación en el espacio en RM son los de Barkhof-Tintoré (116) (117), debiéndose cumplir 3 de los 4 siguientes: 1) una lesión que se realce con gadolinio o nueve lesiones hiperintensas en T2, en caso de que ninguna capte contraste, 2) al menos una lesión infratentorial, 3) al menos una lesión yuxtacortical, 4) al menos tres lesiones periventriculares. Una lesión en la médula espinal puede sustituir a una lesión cerebral infratentorial. Por su parte, para la definición de diseminación en tiempo se precisan los siguientes criterios: Si la primera RM se realiza al menos tres meses después del comienzo del primer evento, la presencia de una lesión realzada con gadolinio demuestra la diseminación en tiempo. Si no hay lesiones que capten contraste, se precisa de nuevas RM en el seguimiento. En el caso de que la primera RM se hubiese realizado antes de 3 meses desde el primer evento clínico, una segunda RM realizada al menos 3 meses después que muestre una nueva lesión que se realce con contraste aporta suficiente evidencia para el diagnóstico de diseminación en el tiempo.

La primera edición de estos criterios fue publicada en el año 2001, pero posteriormente fueron revisados en los años 2005 y 2010. Los criterios de McDonald son los utilizados en la actualidad por la comunidad médica, son criterios fundamentalmente clínicos, pero apoyados por las pruebas diagnósticas. En común con los criterios precedentes, se encuentra el concepto de diseminación espacial y temporal, aunque la gran diferencia recae en los requerimientos para poder establecerlos en los cuales juega un papel fundamental la RM.

En los criterios se especifica la definición de brote, entendiendo éste como la aparición de síntomas neurológicos nuevos o el empeoramiento de alguno previo, que aparece al menos 30 días después del inicio del brote previo, que persiste al menos 24 horas y que se acompaña de cambios objetivos en la exploración neurológica.

Como se ha señalado, en el año 2005 se realizó una revisión de los criterios de McDonald (118), basándose en la experiencia clínica acumulada desde su publicación y con el objetivo de simplificar y permitir un diagnóstico temprano, sin perder sensibilidad ni especificidad. Fruto de esta revisión se modifican los criterios de RM para demostrar la diseminación temporal al disminuir los criterios necesarios para la misma. En la misma línea, se incrementa el valor de las lesiones medulares para el criterio de diseminación en espacio. Además, en la revisión del año 2005 se elimina la exigencia de demostrar bandas oligoclonales en el LCR para el diagnóstico EM.

En resumen, existen dos vías para demostrar la existencia de diseminación en el tiempo de las lesiones de RM: detección de lesiones que realcen gadolinio al menos 3 meses tras el primer evento clínico y, en caso de ausencia de captación de contraste en la lesión causante del primer evento clínico, detección de una nueva lesión en T2 que aparezca en cualquier momento con relación a una RM de referencia realizada al menos 30 días después del primer evento clínico. En la Tabla 4 se resumen las principales características necesarias para el diagnóstico.

Tabla 4: Criterios de RM en EM de acuerdo a revisión de McDonald 2005.

Diseminación en espacio: Al menos 3 de las siguientes:
Al menos una lesión captante de gadolinio o 9 lesiones hiperintensas en T2 si no hay lesiones captantes.
Al menos una lesión infratentorial.
Al menos una lesión yuxtacortical.
Al menos 3 lesiones periventriculares.

Una lesión de la médula espinal puede ser equivalente a una lesión cerebral infratentorial. Una lesión medular hipercaptante es considerada equivalente a una lesión cerebral hipercaptante y lesiones individuales en médula espinal, junto con lesiones individuales cerebrales contribuyen juntas a alcanzar el número requerido de lesiones en T2

Diseminación temporal: Al menos 1 de los siguientes.

- Detección de captación de gadolinio al menos 3 meses después del inicio del evento clínico en lugar distinto al primer brote.
- Detección de nuevas lesiones en T2, si estas aparecen en cualquier momento, comparadas con un examen de referencia hecho al menos 30 días después del inicio del cuadro.

En Mayo de 2010 el Comité de expertos se reunió por tercera vez en Dublín, con la finalidad de examinar los criterios requeridos para la diseminación temporal y espacial, además de ampliar los criterios diagnósticos a la población pediátrica y a otras etnias como la población asiática o hispanoamericana (119).

Las principales novedades de esta tercera revisión se centraron en el uso e interpretación de los criterios radiológicos para definir la diseminación en tiempo y en espacio, basadas sobre todo en las publicaciones del grupo de estudio MAGNIMS (*Magnetic Resonance Imaging in Multiple Sclerosis*). La finalidad de tales cambios fue aumentar la sensibilidad diagnóstica sin comprometer la especificidad, a la vez que se simplificaron los requerimientos diagnósticos.

El uso de las técnicas de neuroimagen para la demostración de la diseminación de las lesiones del sistema nervioso central en espacio y tiempo se han visto simplificadas y, en algunas circunstancias, como principal novedad, la diseminación en tiempo y espacio que se requiere para el diagnóstico, puede demostrarse en un único estudio.

Los criterios de McDonald han permitido realizar diagnósticos más tempranos, manteniendo una elevada especificidad y sensibilidad (120), y permiten, por lo tanto, ofrecer un mayor apoyo a los pacientes y facilitan el inicio precoz de los tratamientos dirigidos a modificar el curso de la enfermedad.

En la Tabla 5 se describen los Criterios de McDonald del año 2010, que son los utilizados en la actualidad, tanto para el diagnóstico clínico, como a nivel de investigación, siendo éstos los que hemos utilizado en nuestro trabajo, de cara a la selección de los participantes con EM.

Tabla 5: Criterios de McDonald 2010 para el diagnóstico de EM.

Presentación clínica	Datos adicionales para el diagnóstico
≥ 2 o más brotes, evidencia clínica objetiva de ≥2 lesiones o evidencia clínica objetiva de 1 lesión con evidencia histórica razonable de un ataque previo.	Ninguno.
≥ 2 o más brotes, evidencia clínica objetiva de una lesión.	Diseminación en el espacio, demostrada por: ≥ 1 lesión en T2 en al menos 2 de 4 regiones típicas de EM en SNC (periventricular, yuxtacortical, infratentorial o en médula espinal) o esperar un nuevo brote clínico que implique un sitio diferente del SNC.
1 ataque, evidencia clínica objetiva de ≥ 2 lesiones.	Diseminación en tiempo, demostrada por: Presencia simultánea de realce con gadolinio con gadolinio asintomático y/o lesiones no captantes en cualquier momento o una nueva lesión en T2 o captante en el seguimiento con RM, independientemente del tiempo con referencia al estudio previo, o esperar a un segundo ataque clínico.
1 ataque, evidencia clínica objetiva de 1 lesión (síndrome clínico aislado).	Diseminación en el espacio, demostrada por: ≥ 1 lesión en T2 en al menos 2 de 4 regiones típicas de EM en SNC (periventricular, yuxtacortical, infratentorial o en médula espinal) o esperar un nuevo brote clínico que implique un sitio diferente del SNC. Diseminación en tiempo, demostrada por: Presencia simultánea de realce con gadolinio con gadolinio asintomático y/o lesiones no captantes en cualquier momento o una nueva lesión en T2 o captante en el seguimiento con RM, independientemente del tiempo con referencia al estudio previo, o esperar a un segundo ataque clínico.
Progresión neurológica insidiosa sugestiva de EM. (EM primaria progresiva).	Un año de progresión de la enfermedad (retro o prospectivamente) más 2 de 3 de los siguientes criterios: 1. Evidencia de diseminación en espacio en el cerebro basado en ≥ 1 lesión en T2 en regiones características de EM. 2. Diseminación en espacio en la médula espinal basada en ≥ 2 lesiones en T2 o LCR positivo.

1.7.5. Historia terapéutica de la EM.

La historia de los tratamientos de la EM sin duda es mucho más breve que la de la enfermedad, ya que no hemos dispuesto de tratamientos realmente eficaces hasta finales del siglo XX.

Como se ha señalado, Charcot fue bastante pesimista en relación con los tratamientos de la EM. Hasta entonces se habían probado numerosos fármacos sin éxito, y muchos más se probaron a lo largo de las siguientes décadas, hasta disponer de herramientas terapéuticas capaces de modificar el curso clínico de la enfermedad.

Las conclusiones de Charcot fueron consecuencia de los fracasos de terapias como el oro, la plata o de venenos como la estricnina a bajas dosis, y a lo largo de los siguientes años se probaron numerosos tratamientos y técnicas. Destaca el uso de fármacos utilizados contra otras enfermedades, como la sífilis, la inyección de toxinas y otros como por ejemplo la belladona, la penicilina, vacunas etc.

En la década de 1940 con la aparición de los anticoagulantes, éstos se usaron para el tratamiento de la EM. Se conocía por las observaciones previas, que en el centro de las placas solía encontrarse vasos sanguíneos y parecía por ello lógico hipotetizar que esas lesiones parcheadas se debiesen a isquemia, émbolos o la existencia de una enfermedad vascular subyacente. Por lo que, cuando la warfarina estuvo disponible, su uso se extendió para el tratamiento de la EM, impulsado en parte por el entusiasmo de personas como Tracy Putman (121), aunque los resultados no fueron los esperados en un primer momento.

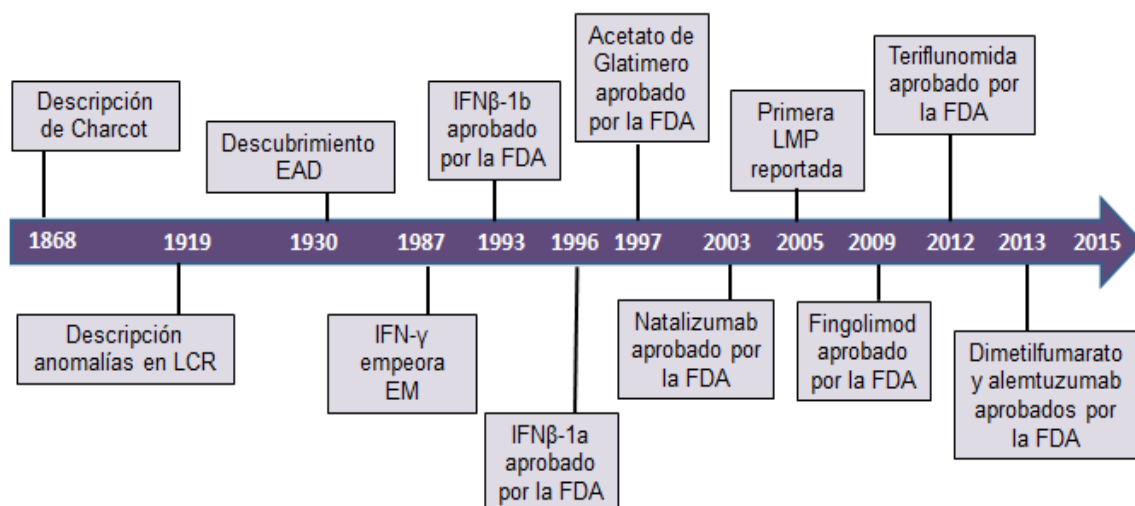
En plena guerra fría, durante los años 50 se especuló con la posibilidad de una vacuna, descubierta por científicos de la Unión Soviética. El oscurantismo de la época hizo que se crearan grandes expectativas, hasta que se descubrió que en realidad se trataba de la vacuna de la rabia y que producía un empeoramiento clínico en los pacientes. La cortisona y la ACTH, que se pensó podrían suponer la cura de la AR, fueron usados en los pacientes con EM por primera vez en los años 50. Aunque algunos casos de la literatura mostraban mejorías significativas en los pacientes tratados, el primer ensayo a doble ciego con esteroides fue llevado a cabo por Henry Miller en Newcastle, sugiriendo una mejoría en los pacientes con EM, especialmente en los casos de neuritis óptica (122), aunque los ensayos con tratamientos orales no fueron efectivos.

A partir de los años 80 se generalizó el uso de megadosis de corticosteroides endovenosos durante los brotes (123). Dicho tratamiento demostró reducir la duración de los síntomas, aunque no tiene efectos sobre el grado de recuperación o la intensidad de las secuelas, ni tampoco se ha demostrado que altera la historia natural de la enfermedad.

Los primeros estudios dirigidos a obtener un fármaco que controlase la enfermedad, a través de su efecto sobre el sistema inmune, se realizaron en las décadas de los 70 y 80, pero supusieron un rotundo fracaso. Basándose en el origen inmunológico de la EM, se probaron numerosos fármacos inmunosupresores e inmunomoduladores, como el ensayo realizado por Lawrence D. Jacobs (124) con interferón beta intratecal, que demostró reducir el número de brotes, pero que presentaba problemas de viabilidad clínica por requerir punciones lumbares repetidas.

El punto de inflexión, como se puede ver en la Figura 1, se produjo en el año 1993, con el descubrimiento de que el interferón (IFN) beta1b, producido por ingeniería genética, y administrado a los pacientes por vía subcutánea, era capaz de variar el curso de la enfermedad, reduciendo el número de brotes y dando lugar a un perfil más favorable. El estudio se realizó en varios hospitales de EEUU y Canadá y los resultados fueron esperanzadores. Otro fármaco, el IFN beta 1a (Avonex™), aplicado vía intramuscular obtuvo similares resultados. El tercer interferón utilizado con resultados similares, fue el IFN beta1b con administración subcutánea (125). El 23 de Julio de 1993 el IFN-β1b fue aprobado para el tratamiento de la EM remitente-recurrente.

Figura 1: Resumen histórico de los tratamientos de la EM.



Se considera que las tres presentaciones de interferón beta aprobadas tienen efectos positivos sobre la EM remitente recurrente gracias a sus efectos antiinflamatorios e inmunomoduladores. Entre los potenciales efectos inmunomoduladores, se considera que dan lugar a una disminución de las citocinas proinflamatorias, como el interferón gamma, la reducción de la expresión de antígenos del complejo mayor de histocompatibilidad y la disminución del paso de linfocitos a través de la barrera hematoencefálica.

El cuarto fármaco que se comercializó fue el acetato de glatiramer (Copaxone™) (126), que demostró reducir la frecuencia de los brotes al igual que los fármacos anteriores. El Natalizumab (Tysabri™) es un anticuerpo monoclonal que se une a la subunidad $\alpha 4$ de las integrinas que se expresan en los linfocitos activados, bloqueando su unión a su ligando en las células endoteliales, la molécula VCAM-1, y por tanto evitando el paso de estos a través de la barrera hematoencefálica, reduciendo el componente inflamatorio de la placa de EM en el SNC. Varios estudios avalan su eficacia, con tasa de reducción de brotes en torno al 68%, además de reducir el riesgo de progresión de la discapacidad y la actividad medida en RM. A los tres meses de su comercialización tras ser aprobada por la FDA en el año 2005, se suspendió transitoriamente por la aparición de 3 casos de leucoencefalopatía multifocal progresiva (LMP). El fármaco fue reintroducido en el año 2007 en España como terapia de segunda línea para la EM remitente recurrente. En la actualidad es posible estratificar el riesgo de desarrollar una LMP en función de varios factores, como el tiempo de tratamiento, tratamientos previos o índice viral (127).

El fingolimod (Gilenya™) es el primer fármaco oral disponible para el tratamiento de la EM en adultos. El fármaco fue autorizado en la Unión Europea en marzo de 2011 y está indicado para el tratamiento de pacientes con EM remitente recurrente en los que la enfermedad es grave y de rápida evolución, o bien no ha respondido al tratamiento con interferones. Su mecanismo de acción se basa en su acción como agonista parcial del receptor de la esfingosina 1 fosfato en los linfocitos, lo que provoca el bloqueo de la migración fuera de los órganos linfoides secundarios. Como consecuencia se produce un descenso en el número de linfocitos circulantes, aunque las células T memoria y las B no se ven afectadas. Se ha comprobado que fingolimod también disminuye las citocinas proinflamatorias (128) y que atraviesa la barrera hematoencefálica, por lo que puede tener un papel en los procesos de

remielinización (129). El fingolimod ha demostrado ser eficaz en la reducción de la tasa de brotes (54%), en la progresión de la enfermedad y en la reducción de progresión de la discapacidad, además de una eficacia superior a los interferones (130). Entre sus efectos adversos se encuentran la bradicardia y los bloqueos AV de primer grado, infecciones del tracto respiratorio inferior, reactivación de virus herpes, linfopenia y elevación de enzimas hepáticas.

Los últimos fármacos en incorporarse a las opciones terapéuticas han sido el dimetilfumarato (BG-12) y la teriflunomida. El BG-12 (131) ha sido utilizado durante décadas para el tratamiento de la psoriasis y posee efectos inmunomoduladores gracias a su acción de regulación a la baja de la expresión de VCAM y estimulando la apoptosis de linfocitos activados. La teriflunomida (132) es un agente que actúa sobre la dihidro-orotato deshidrogenasa, bloqueando la proliferación de los linfocitos, que, administrado por vía oral, ha mostrado una eficacia similar a los interferones. Por último, el alemtuzumab, es un anticuerpo monoclonal dirigido contra los CD52. Causa la lisis de linfocitos B y T circulantes, modificando la inmunidad adaptativa (133), se ha mostrado muy eficaz en la reducción de los brotes clínicos y la discapacidad (134). Entre sus potenciales efectos adversos destacan infecciones del tracto respiratorio, linfopenia y leucopenia y enfermedades autoinmunes.

Los tratamientos para la EM están experimentando una transición muy rápida en los últimos años, en un cambio hacia una mejor optimización de las diferentes opciones, basándose en la eficacia y la seguridad. Aunque en la mayoría de los casos no existen estudios “*head to head*” entre las nuevas terapias, el natalizumab y alemtuzumab se muestran como los más eficaces, similar eficacia ha demostrado fingolimod (135) y se siguen del dimetilfumarato y la teriflunamida. En la actualidad hay numerosos ensayos clínicos en marcha y nuevas alternativas terapéuticas en el horizonte. Existen, además, numerosas terapias encaminadas al tratamiento sintomático de la enfermedad y a la prevención de sus complicaciones. Pero, tanto los estudios sobre los tratamientos dirigidos a modificar el curso de la enfermedad, como los encaminados a mejorar la calidad de vida o actuar sobre los síntomas, precisan continuar la investigación básica de los mecanismos y procesos fisiopatológicos que subyacen en la enfermedad. Por estas razones consideramos que la era terapéutica no ha hecho más que comenzar.

1.7.6. Escalas de valoración de discapacidad y fatiga.

La escala EDSS (escala ampliada del estado de discapacidad o Expanded Disability Status Scale) de Kurtzke (136), es actualmente la escala más ampliamente utilizada para la valoración del daño o deterioro neurológico, así como la limitación de las actividades diarias, en la EM.

La escala se basa en un sistema de puntuación de los sistemas funcionales (piramidal, cerebelo, tronco del encéfalo, sensitivo, esfínteres, visual, cerebral y otros), que nos indica dónde situar el grado de afectación del paciente, en una escala con un recorrido entre el 0 y el 10.

Generalmente, las puntuaciones entre 0 y 3.5 discriminan en función de las puntuaciones de los sistemas funcionales, y a partir del grado 4, las puntuaciones se definen principalmente en función de las alteraciones encontradas en la marcha de los pacientes.

A pesar de ello, la escala tiene limitaciones claras, por ejemplo, no explora la fatiga ni las alteraciones cognitivas, y, por tanto, no se trata de una escala lineal. Es una escala ordinal, en la cual los cambios que se producen pueden traducir diferentes alteraciones funcionales. Además, debe tenerse en cuenta la existencia de una variabilidad intersujetos y la necesidad de formación previa del explorador.

En los últimos años, el uso de la escala EDSS se ha extendido y se recomienda tanto para el seguimiento de los pacientes con EM, como en los diferentes ensayos clínicos, como una herramienta más que permite conocer el curso clínico de la enfermedad y la respuesta a las acciones terapéuticas planteadas.

Otra limitación de la escala, que constituye la principal crítica que recibe, es la gran importancia que da a la deambulación sobre otros sistemas, sobre todo en las puntuaciones más elevadas. Sin embargo, la escala tiene en cuenta la discapacidad asociada a la EM avanzada, y debe tenerse en cuenta que la mayoría de los pacientes no alcanzará puntuaciones elevadas, tal y como se demostró en un estudio llevado a cabo en Ontario, Canadá (previo a la versión extendida) que encontró que el 51% de sus pacientes tenían una puntuación menor de 5 y, en el 88%, era menor de 7 puntos. (100)

Tabla 6: Puntuaciones de la Expanded Disability Status Scale (EDSS).

Expanded Disability Status Scale (EDSS)
0.0= 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 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, 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 200 metros; su incapacidad es suficiente para afectarle en funciones de la vida.
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.
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.
6.5= Ayuda bilateral constante (bastones, muletas o abrazaderas) para caminar unos 20 metros sin descanso.
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.
7.5= Incapaz de caminar más de unos pasos. Limitado a silla de ruedas. Puede necesitar ayuda para salir de ella.
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.
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.
9.0= Paciente inválido en cama, puede comunicarse y comer.
9.5= Totalmente inválido en cama, incapaz de comunicarse o bien comer o tragar.
10= Muerte por esclerosis múltiple.

Existen otras escalas que se centran en ámbitos diferentes a la discapacidad. Entre ellas destacan las centradas en el estudio de la fatiga y sus consecuencias. La fatiga está íntimamente asociada a la EM. Presenta una elevada frecuencia y tiene graves repercusiones en el bienestar, llegando a ser el síntoma más incapacitante para el 40% de los pacientes (137).

La fatiga es un síntoma muy inespecífico, que se presenta en personas sanas y en innumerables patologías, tanto neurológicas como sistémicas. Se define como una sensación de cansancio o falta de energía, desproporcionada con respecto al esfuerzo realizado o al grado de discapacidad, que interfiere de forma significativa en la realización de actividades físicas o intelectuales de forma continuada (138). Debido a que se trata de una sensación subjetiva, cada paciente experimenta la fatiga de una forma diferente, haciendo necesario la búsqueda de formas que permitan su medida.

Existen al menos 30 escalas disponibles que cuantifican la fatiga, muchas de ellas diseñadas específicamente para tal fin. Para el desarrollo de esta Tesis Doctoral se ha usado la escala de gravedad de la fatiga o Fatigue Severity Scale (FSS), que es una de las más utilizadas, tanto a nivel clínico como de investigación. La FSS fue diseñada por Krub para la medición de dicho síntoma en neurología (139). Consiste en 9 ítems con respuesta tipo Likert, con 7 posibilidades de intensidad creciente (Tabla 7), y que puntúan entre 1 y 7. El total se obtiene de la suma de cada uno de los ítems estudiados, y se considera un marcador del grado de impacto de la fatiga en la calidad de vida de los pacientes. Su medición puede contribuir además al inicio de estrategias terapéuticas dirigidas a mejorar la independencia funcional de los pacientes con EM.

Tabla 7: Fatigue Severity Scale (FSS).

Durante la última semana, he encontrado que:	Puntuación						
1. Mi motivación es menor cuando estoy fatigado.	1	2	3	4	5	6	7
2. El ejercicio me fatiga.	1	2	3	4	5	6	7
3. Me canso fácilmente.	1	2	3	4	5	6	7
4. El cansancio interfiere mi funcionamiento mental.	1	2	3	4	5	6	7
5. El cansancio me causa problemas frecuentemente.	1	2	3	4	5	6	7
6. El cansancio me evita funcionar bien mentalmente.	1	2	3	4	5	6	7
7. La fatiga me interfiere en mis labores y responsabilidades.	1	2	3	4	5	6	7
8. La fatiga está entre mis tres principales problemas que me incapacitan.	1	2	3	4	5	6	7
9. La fatiga interfiere con mi vida laboral, social y familiar.	1	2	3	4	5	6	7
Puntuación total:							
Puntuación media:							

La escala se ha mostrado eficaz para la medición de la fatiga y además de en la EM, donde se encuentra ampliamente generalizada, ha mostrado eficacia en otras patologías como el LES (140) o la poliomielitis (141).

1.7.7. Disfunción endotelial en la EM.

Como se ha señalado, la EM es una enfermedad inflamatoria crónica, desmielinizante y neurodegenerativa del SNC, que afecta sobre todo a personas jóvenes durante los periodos más productivos de su vida. A pesar de los inmensos avances en la comprensión de la fisiopatología de la enfermedad y de la introducción de nuevos fármacos que han modificado su pronóstico, la etiología permanece, por lo menos en parte, desconocida.

Existe acuerdo generalizado en señalar que los dos componentes fundamentales son la inflamación y la neurodegeneración, que son los que condicionan la clínica y la incapacidad. Pero existen otros componentes implicados y se ha postulado que, al menos de forma parcial, la EM posee una base vascular, debido a que comparte mecanismos fisiopatológicos con otras comorbilidades, incluyendo la disfunción endotelial (142), la inflamación (143) y la disfunción autonómica cardiovascular (144).

Las enfermedades cardiovasculares constituyen la principal causa de muerte en nuestro país (145). El mejor conocimiento de su fisiopatología y de los factores predisponentes ha permitido retrasar la mortalidad de los pacientes con enfermedades cardiovasculares, pero su incidencia continúa en aumento. El Consejo Mundial de la Salud, comparando el año 1990 con la predicción para 2010, prevé un aumento de la incidencia en los países desarrollados e incluso mayor en el caso de aquellos en vías de desarrollo (146). Por tanto, la prevención de la misma en la población general constituye una prioridad para el sistema sanitario. Además, la asociación de disfunción endotelial y el riesgo de eventos vasculares ha quedado demostrada en el caso de otras enfermedades autoinmunes, como se ha visto previamente, y las enfermedades vasculares suponen una morbilidad asociada a estas patologías que puede generar una mayor incapacidad a medio y largo plazo. A pesar de ello, existe poca información sobre la prevalencia de enfermedades cerebrovasculares en la EM, y sobre su influencia en el curso de la enfermedad.

Se han buscado y estudiado en diversas series las causas de muerte más habituales entre los pacientes con EM (147), pero lamentablemente, la mayoría de los estudios se han limitado a distinguir entre fallecimientos atribuibles directamente a la EM o a otras causas diferentes, y no a la búsqueda de patologías asociadas. Destacan

entre los diversos trabajos, dos estudios poblacionales realizados en Dinamarca, que se centraron en la búsqueda de la mortalidad por categorías específicas en pacientes con EM. Los resultados mostraron un riesgo de morir por eventos cardiovasculares un 30% superior en el caso de los pacientes con EM en comparación con la población control ajustada por edad, pero no encontraron diferencias entre los diferentes tipos de eventos vasculares (148) (149).

En cambio, otro estudio realizado en el Reino Unido únicamente mostró un incremento del 6%, aunque en este caso se excluyeron los eventos cerebrovasculares del registro, lo que ha podido interferir en los resultados (150). En ninguno de los estudios descritos se define con claridad las potenciales causas de este incremento de la mortalidad, atribuyéndose en parte a la disminución de la actividad física consecuencia de la enfermedad.

Existen en la literatura otros estudios centrados en la búsqueda de mayor información sobre la incidencia real de eventos vasculares en pacientes con EM. El estudio de Allen y colaboradores (151) incluyó 9.949 pacientes con EM y 19.898 controles, de entre 40 y 85 años de edad, emparejados por edad, sexo y origen étnico. En el diseño del estudio se comparó la prevalencia de cardiopatía isquémica, IAM e ictus isquémico en ambas poblaciones estudiadas entre los años 1988 y 2002. En sus resultados mostraron que los pacientes con EM tenían menores tasas de ingreso hospitalario debido a cardiopatía isquémica (Odds Ratio 0.58, 95% IC 0.51-0.66), menores tasas de IAM (Odds Ratio 0.78; 95% IC 0.64 – 0.96), pero en cambio, las tasas de incidencia de ictus isquémico fueron mayores que en los controles (Odds Ratio 1.66; 95% IC 1.33 – 2.09).

Un segundo estudio, realizado de nuevo entre la población danesa por Christiansen y colaboradores (152), incluyó una cohorte de 13.963 pacientes con EM y 66.407 controles, ajustados por sexo y edad. Los investigadores calcularon la razón de tasa de incidencia (IRR) a lo largo del periodo de 30 años que va desde 1977 a 2006. En sus resultados, la EM se asocia con un incremento de los ingresos hospitalarios por ictus isquémico (IRR 1.92; 95% IC 1.27 – 2.71), IAM (IRR 1.84; 95% IC 1.28 – 2.65) y fallo cardiaco (IRR 1.92; 95% IC 1.27 – 2.90), durante el primer año tras el diagnóstico. En la evaluación del seguimiento posterior a lo largo de los 30 años que abarcaba el

estudio, persistía el incremento de riesgo para ictus isquémico (IRR 1.92; 95% IC 1.10 – 1.38) y fallo cardíaco (IRR 1.53; 95% IC 1,37 – 1.71).

Las causas de este incremento de la enfermedad vascular en la EM permanecen desconocidas. Durante tiempo se ha atribuido a la mayor incidencia de algunos factores tradicionales de riesgo vascular, como la reducción del ejercicio físico o, como apuntaban algunas series, una mayor incidencia de fumadores entre los pacientes con EM (153). Aunque esta teoría pierde fuerza si se tiene en cuenta que otros factores de riesgo de enfermedad vascular, como son la hipertensión, la diabetes, la dislipemia, y la obesidad, no se han mostrado asociadas a la EM (154).

Pero sin lugar a dudas, el mecanismo más aceptado para explicar estos hallazgos es la inflamación, y el papel que ésta juega en la patogénesis de la aterosclerosis está cobrando auge. El sistema inmune es fundamental para el desarrollo de la EM, pero como se ha señalado también, es un componente fundamental de las primeras fases de la disfunción endotelial que conduce al desarrollo de la aterosclerosis y, en último término, al riesgo de desarrollar una enfermedad vascular isquémica. Esta disfunción endotelial ya descrita en otras enfermedades autoinmunes, con un importante componente inflamatorio como es el caso de la AR, se ha demostrado también en el caso de la EM, ya que conocemos que los pacientes con EM presentan activación plaquetaria y un estado protrombótico (155) (156). Otro componente que se ha postulado que puede contribuir al desarrollo de una disfunción endotelial en pacientes con EM es la existencia de un estrés oxidativo mantenido como consecuencia de los mismos fenómenos de inflamación crónica.

La gran limitación hasta la actualidad radica en conocer cómo estos mecanismos contribuyen al desarrollo de la enfermedad vascular, y qué instrumentos podemos utilizar para medir el riesgo de desarrollo de eventos isquémicos en nuestros pacientes. La característica especial de la población afecta de EM (pacientes jóvenes, edad media de la vida, predominio del sexo femenino y la ausencia de los factores de riesgo considerados tradicionales) obligan a la búsqueda de nuevos marcadores. Estos potenciales marcadores, clínicos o moleculares deberán demostrar su utilidad desde las fases iniciales de la enfermedad, pues los estudios nos indican que la incidencia de estos eventos se encuentra ya aumentada desde el diagnóstico de la enfermedad (152).

Dentro de los potenciales marcadores que se han estudiado en los pacientes con EM hasta la actualidad destaca la homocisteína. La concentración plasmática de homocisteína, que ha demostrado ser un factor de riesgo vascular, se encuentra aumentada también en pacientes con EM (157). Las causas de este incremento tampoco son conocidas, pero sí sabemos que son independientes de las concentraciones plasmáticas de vitamina B12, vitamina B6 o ácido fólico. Se ha demostrado, además, que la hiperhomocisteinemia es capaz de producir y contribuir al desarrollo de la disfunción endotelial, incluso aunque el incremento de la concentración plasmática sea moderado (158). Nos encontraríamos, por tanto, ante uno de los primeros marcadores de riesgo vascular e inflamación corroborados en los pacientes con EM.

Todas estas evidencias sugieren que el incremento de los eventos vasculares objetivados en los pacientes con EM puede estar mediado por los mecanismos de inflamación que subyacen en la enfermedad y que han demostrado producir efectos similares en otras enfermedades autoinmunes. Los siguientes pasos deben centrarse en la identificación de dichos mecanismos y la búsqueda de nuevos marcadores subclínicos de riesgo vascular. Todo ello encaminado a establecer los mecanismos de prevención necesarios para evitar más comorbilidades en una enfermedad crónica e incapacitante, como la EM.

Por último, debe señalarse otro de los factores que puede contribuir al desarrollo de lesiones vasculares isquémicas en pacientes con EM, y que ha recibido especial interés en los últimos años, como es la existencia de un descenso global en la perfusión cerebral en los pacientes con EM. Por definición, se define la perfusión cerebral como el volumen de sangre que atraviesa un volumen de tejido por unidad de tiempo. Para su cálculo se usan varios parámetros matemáticos: CBF, volumen sanguíneo cerebral (CBV) y tiempo de tránsito. Mediante la utilización de las modernas técnicas de neuroimagen, como el SPECT o el PET, se ha demostrado que el CBF se encuentra disminuido en los pacientes con EM (159), tanto en la sustancia blanca como en la gris. A los mismos resultados también han llegado diversos autores utilizando diversas secuencias de resonancia, que nos permiten medir dichas variables. Todos ellos encontraron un descenso de la perfusión cerebral que no sólo afectaba a las zonas en las que se localizan las lesiones, sino también a la sustancia blanca no afecta (160).

En lo que no existe amplio acuerdo es en explicar las causas de esta reducción y las consecuencias de misma. Se han postulado diversas teorías, pero ninguna se ha aceptado completamente. En todo caso, estos cambios traducirían los procesos fisiopatológicos subyacentes, y la medición de estos cambios con el tiempo, o como respuesta a los tratamientos puede ayudar a estratificar la actividad de la enfermedad.

2. HIPÓTESIS

2.1. Fundamentos.

- La EM es una enfermedad inflamatoria crónica de etiología parcialmente desconocida, que afecta al SNC y que provoca una importante alteración en la calidad de vida. Diversos estudios han demostrado un incremento de la incidencia de eventos isquémicos, incluyendo el ictus y el IAM, que es más significativa en los primeros años tras el diagnóstico.
- Por tanto, se considera que en la EM puede existir una arteriosclerosis acelerada, que no puede ser explicada por los factores de riesgo tradicionales. El concepto actual de la fisiopatología de la placa de ateroma la considera como un fenómeno inflamatorio del endotelio vascular.
- Fenómenos similares se han descrito en otras enfermedades inflamatorias crónicas como la AR. En estas patologías existe un incremento del riesgo de eventos isquémicos y se ha identificado la existencia de una disfunción endotelial subyacente.
- La existencia de una disfunción endotelial y el incremento del riesgo de enfermedades vasculares se ha postulado también en otras patologías neurológicas como la migraña.
- Se han identificado diversos marcadores moleculares de inflamación que participan en los procesos de disfunción endotelial y aterogénesis, y que también están implicados en otras enfermedades autoinmunitarias. Entre ellos destacan el ON, FvW, fibrinógeno, interleucinas, etc.
- Para este diagnóstico precoz se pueden utilizar técnicas no invasivas, cuyo valor predictivo de posteriores episodios clínicos cardiovasculares ha sido claramente demostrado en la población general. Las pruebas más recomendadas son la ecografía carotídea mediante la medición GIM y la VDE medida en la arteria braquial.
- Debido al potencial riesgo vascular en los pacientes con EM, es importante un diagnóstico precoz de arteriosclerosis subclínica para permitir el establecimiento

de intervenciones preventivas tanto en el cambio de hábitos de vida, como farmacológicamente en caso preciso.

- No existen estudios que valoren la prevalencia de arteriosclerosis subclínica en pacientes con EM, utilizando simultáneamente marcadores moleculares y de ultrasonografía y realizando comparaciones simultáneas con un grupo control y otro grupo activo.
- La neurodegeneración es el otro componente fundamental de la fisiopatología de la EM. Hasta ahora, su estudio se ha limitado a las modernas técnicas de neuroimagen, pero se precisan métodos sencillos que permitan el seguimiento clínico de los pacientes. Se desconoce la relación de la atrofia con los marcadores de aterosclerosis subclínica.

2.2. Hipótesis de trabajo.

Dado que la EM es una enfermedad inflamatoria crónica que presenta similitudes con otras enfermedades autoinmunes, y en cuya fisiopatología intervienen moléculas mediadoras de inflamación que comparten mecanismos patogénicos con la enfermedad vascular aterosclerótica, es posible que los pacientes con EM presenten datos bioquímicos y subclínicos de enfermedad vascular aterosclerótica que expliquen el incremento de la frecuencia de enfermedades vasculares isquémicas observado.

Además, la detección de arteriosclerosis subclínica en los pacientes con EM podría mejorar la estimación del riesgo cardiovascular real de estos pacientes, el cual resulta probablemente infravalorado por los métodos probabilísticos convencionales. Dicho hallazgo permitiría también la instauración de medidas más intensas y adecuadas para la prevención primaria de las complicaciones de la enfermedad vascular.

3. OBJETIVOS

Objetivo primario:

Valorar si los pacientes con EM, sin evidencia clínica de enfermedad cardiovascular, presentan disfunción endotelial, considerada ésta como un estado precoz en el desarrollo de la enfermedad aterosclerótica.

Objetivos secundarios:

1. Evaluación del riesgo vascular mediante marcadores de ultrasonografía: Grosor íntima-media (GIM), vasodilatación dependiente de endotelio (VDE) y estudios de reserva hemodinámica mediante test de apnea (BHI). Investigar la presencia de ateromatosis subclínica en los diferentes territorios vasculares en estos pacientes y analizar las diferencias entre los mismos.
2. Análisis de los marcadores moleculares de activación endotelial (ON, FvW, EPCs, etc.) en relación con el diagnóstico de EM. Correlación de los parámetros bioquímicos con los observados mediante ultrasonografía.
3. Conocer la aplicabilidad y rentabilidad de las técnicas no invasivas para detectar arteriosclerosis subclínica en pacientes con EM.
4. Establecer si los pacientes con EM presentan diferencias en los marcadores subclínicos (ultrasonográficos y moleculares) de disfunción endotelial con respecto a dos grupos activos (pacientes con AR y pacientes migrañosos).
5. Evaluar el riesgo vascular de pacientes con EM respecto a controles ajustados por sexo, edad y factores de riesgo cardiovascular, mediante técnicas moleculares y de ultrasonografía.
6. Valorar la potencial utilidad del estudio de atrofia cerebral y CBF en estas patologías.
7. Evaluar la relación de las escalas de medición de discapacidad (EDSS) y fatiga (FSS) con los hallazgos de disfunción endotelial y el grado de atrofia y neurodegeneración.

4. PACIENTES Y MÉTODOS

4.1. PACIENTES Y CONTROLES.

El estudio se ha realizado en el Hospital Universitario Marqués de Valdecilla de Santander, hospital de tercer nivel de referencia en la Comunidad Autónoma de Cantabria. La selección de los sujetos participantes se llevó a cabo en las consultas de Neurología y Reumatología. La cohorte incluida en este estudio está constituida por pacientes vistos en las consultas externas de dicho centro durante el periodo de Octubre de 2013 a Septiembre de 2014.

Se establecieron los siguientes grupos clínicos: EM, migraña, AR y controles sanos. En todos los casos se recogieron los datos clínicos, ultrasonográficos, niveles de biomarcadores, así como de las determinaciones de EPCs en una base de datos diseñada específicamente para este estudio.

Para el grupo de EM se incluyeron aquellos pacientes que cumplieran los criterios diagnósticos de McDonald 2010 descritos en la Tabla 5 (119). Todos los pacientes fueron seleccionados en la consulta externa de Neurología por un Neurólogo experto en el ámbito de las enfermedades desmielinizantes. Puesto que el propósito de este estudio fue valorar si existía disfunción endotelial en pacientes con EM, se excluyeron aquellos que habían presentado un brote clínico o recibido tratamiento esteroideo en los últimos 30 días para evitar interferencias en los resultados. De la misma forma, se incluyeron sólo aquellos pacientes vistos en la consulta y cuyo diagnóstico había sido realizado al menos 6 meses antes de la realización del estudio. Se estableció un apartado en la base de datos donde se recogieron los diferentes tratamientos modificadores de la enfermedad recibidos y la presencia de otras patologías asociadas. No se incluyeron pacientes con EM secundariamente progresiva, EM primaria progresiva o síndrome clínicamente aislado.

Se utilizaron dos grupos de controles activos, en los cuales de acuerdo con la literatura disponible se ha evidenciado la existencia de disfunción endotelial e incremento del riesgo de enfermedades vasculares. Los grupos correspondían a pacientes diagnosticados de migraña en la consulta de Neurología y pacientes en seguimiento por el servicio de Reumatología diagnosticados de AR.

Los pacientes diagnosticados de migraña fueron seleccionados y pareados por sexo y edad con los pacientes con EM, por un neurólogo experto en el manejo de las

cefaleas desde las consultas externas de Neurología. Para el diagnóstico de la misma se utilizaron los criterios diagnósticos consensuados por la International Headache Society en su tercera edición del año 2013 (161). Se excluyeron pacientes afectados de más de un tipo de cefalea. Se estudió y registró también la prevalencia de migraña en los otros grupos de estudio (EM y AR). En todos los sujetos de migraña, se recogieron los siguientes datos en relación con las características de la misma: tipo de migraña, presencia de aura y características de la misma, existencia de pródromos, frecuencia de las crisis, intensidad de la cefalea, duración de las crisis y presencia de alodinia cutánea. También se recogió el tratamiento que recibían los pacientes en el momento del estudio, los fármacos sintomáticos habituales, el tiempo transcurrido desde el último episodio migrañoso y el último tratamiento sintomático recibido.

Para evitar interferencias en los valores de disfunción endotelial, los sujetos migrañosos en tratamiento con fármacos preventivos fueron instruidos para suspender de forma temporal dichos tratamientos, al menos 96 horas antes de la realización del estudio. En ningún caso habían tomado tampoco tratamientos sintomáticos en las 24 horas previas al estudio.

Tabla 8: Criterios diagnósticos de migraña (2013).

Criterios diagnósticos de la International Headache Society para la migraña sin aura.	
A.	Un mínimo de 5 crisis que cumplen los criterios B a D.
B.	Cefalea que dura entre 4 y 72 horas (no tratada o con tratamiento ineficaz).
C.	El dolor de cabeza presenta al menos dos de estas características: 1. Localización unilateral. 2. Calidad pulsátil. 3. Intensidad moderada o grave. 4. Se agrava con la actividad física (p.e. caminar, subir escaleras) o lleva a evitarla.
D.	Al menos uno de los siguientes síntomas se manifiesta durante el dolor: 1. Náuseas y/o vómitos. 2. Fotofobia y sonofobia.
E.	El dolor no es atribuible a otras causas.

Dentro de la clasificación de cefaleas, la IHS incluyó en el año 2004 y posteriormente modificado en el año 2006, el término de migraña crónica (MC) como una entidad diferenciada, que mantiene en la 3ª edición versión beta publicada en el año 2010.

La MC se define según la clasificación de la IHS (3º revisión), como una cefalea que sufre el paciente durante al menos 15 días al mes, en (como mínimo) los últimos tres meses, y en los que al menos ocho de estos días tienen que cumplir los criterios estrictos de migraña, y, en los otros siete días, alguno de los criterios, sin presencia de abuso de analgésicos.

Distinguimos en nuestro trabajo la MC porque supone una discapacidad aún mayor que la relacionada exclusivamente con la migraña y que, en diversas series, como el Estudio Americano de la Prevalencia y Prevención de la Migraña (AMPP) (162), ha demostrado diferencias significativas con la migraña episódica (ME), sobre todo con respecto a las comorbilidades y a la discapacidad asociada. Así, por ejemplo, se pudo objetivar que sufrir una MC no sólo está asociado a la presencia de un dolor crónico, sino que, además, los pacientes con MC presentan una mayor incidencia de enfermedades comórbidas y una mayor discapacidad. Entre las conclusiones del estudio AMPP destacan una mayor prevalencia de factores de riesgo de enfermedad cardiovascular como la hipertensión, la diabetes o cifras elevadas de colesterol y obesidad. Y de enfermedades respiratorias como la bronquitis, el asma o la enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC).

En un subanálisis del estudio AMPP, realizado tres meses después, se objetivó que el grupo de pacientes diagnosticados de MC presentaban mayores incidencias de absentismo laboral ($p < 0,001$), mayor incidencia de pérdida de actividades familiares y sociales ($p < 0,001$) y una mayor tasa de consultas (87,6%) a profesionales sanitarios en relación con su enfermedad (163). Asimismo, se objetivaron las dificultades existentes en el diagnóstico, ya que únicamente a un 20,2% se les había diagnosticado en alguna ocasión de MC, migraña transformada o cefalea crónica diaria, y el porcentaje de pacientes que recibían tratamiento preventivo se reducía a un tercio del total.

Consideramos que la distinción en la gravedad de la migraña, de acuerdo a la frecuencia de presentación de la misma, al distinguir entre ME y MC, puede aportar información útil en la medición y comparación del grado de disfunción endotelial en las distintas enfermedades neurológicas.

El grupo de pacientes con AR fue seleccionado por un Reumatólogo experto del mismo hospital. En este caso no se realizó muestreo por edad y sexo, correspondiendo

el grupo de AR utilizado en nuestro estudio con una muestra de los pacientes en seguimiento por AR en la Comunidad de Cantabria. Todos los pacientes de este grupo cumplían los criterios de clasificación del Colegio Americano de Reumatología (ACR) de 1987 (164) y también los nuevos criterios diagnósticos de la clasificación del año 2010 (165). En todos los casos se registró simultáneamente el tiempo desde el diagnóstico de AR, tratamientos sintomáticos y fármacos antirreumáticos modificadores de la enfermedad. Se completó la historia en la búsqueda de enfermedades neurológicas, con especial interés a la presencia de migraña en estos pacientes. Los criterios de exclusión fueron los mismos que en los otros grupos de estudio.

Tabla 9: Criterios diagnósticos de Artritis Reumatoide (1987).

4 de los siguientes criterios deben estar presentes en un período de 6 semanas.	
1.	Rigidez matutina ≥ 1 hora.
2.	Artritis de 3 o más de las siguientes articulaciones: - Interfalángicas proximales. - Metacarpofalángicas. - Muñeca. - Codo. - Rodilla. - Tobillo. - Metatarsfalángicas.
3.	Artritis de muñeca, metacarpofalángicas o interfalángicas proximales.
4.	Afectación articular simétrica.
5.	Nódulos reumatoides sobre las prominencias óseas o caras extensoras o regiones periarticulares.
6.	Factor reumatoide positivo.
7.	Alteraciones radiológicas incluyendo erosiones o descalcificación ósea localizada en las articulaciones afectadas o adyacente a éstas.

Se utilizó un grupo control sano con muestreo por frecuencia de igual edad (± 3 años) y sexo. Todos los controles eran de la Comunidad Autónoma de Cantabria, de raza blanca, al igual que los pacientes. Para el estudio se excluyeron pacientes con diabetes mellitus, insuficiencia renal o historia de eventos cardiovasculares previos. Además, se requería que los participantes nunca hubiesen fumado o hubiesen abandonado el hábito tabáquico durante al menos un año antes del reclutamiento, o que no consumiesen más de 5 cigarrillos/día.

En todos los casos se solicitó consentimiento informado para la realización de los mismos. El estudio fue aprobado por el Comité de Ética y de Investigación de la Comunidad Autónoma de Cantabria.

4.2. CRITERIOS DE SELECCIÓN DE PACIENTES.

Con el objetivo de garantizar la confidencialidad de la identificación e información procedente de los pacientes incluidos en el estudio, de acuerdo con el Real Decreto 1720/2007 de 21 de Diciembre, por el que se aprueba la ley Orgánica 15/1999 de 13 de Diciembre de Protección de datos de carácter personal, se utilizó un sistema de codificación. Cada paciente fue identificado mediante un número en el momento de su incorporación al estudio.

Para estudiar la existencia de disfunción endotelial en los pacientes con EM, se diseñó un estudio transversal de casos y controles. Se seleccionaron controles y pacientes diagnosticados de EM. Se definieron los criterios de inclusión y de exclusión de forma previa al inicio de la recogida de datos. Los sujetos seleccionados cumplían todos los criterios de inclusión y ninguno de exclusión. Al realizarse todos los procedimientos y actuaciones en una única visita no se han previsto pérdidas de pacientes en el estudio.

4.2.1. Criterios de inclusión.

Se incluyeron pacientes y controles de los grupos de estudio de acuerdo a los criterios diagnósticos explicados previamente. Los criterios de inclusión fueron los siguientes:

- Ser mayores de edad (≥ 18 años).
- Personas pertenecientes a ambos sexos.
- Posibilidad de cumplimiento del protocolo del estudio.
- Acceder a participar de forma voluntaria, con cumplimentación del consentimiento informado.
- Ser residentes en la Comunidad Autónoma de Cantabria.

- Tiempo de evolución de la EM mayor de 6 meses.
- Las mediciones ultrasonográficas se realizaron en ayunas, entre las 08:00 y las 11:00 horas. Los sujetos fueron previamente instruidos para no fumar, no tomar café o medicaciones antimigrañosas, al menos 24 horas antes. Del mismo modo, los pacientes con medicación preventiva antimigrañosa suspendieron temporalmente los tratamientos 96 horas antes.

4.2.2. Criterios de exclusión.

Se consideraron como criterios de exclusión todos aquellos antecedentes que pudieran interferir con la función endotelial:

- Enfermedades que afecten al sistema vascular, principalmente enfermedades inflamatorias sistémicas (conectivopatías, vasculitis, enfermedades inflamatorias intestinales u otras diferentes a las de los grupos de estudio.) Se toleró el antecedente de hipertensión arterial o dislipemia, siempre y cuando estas patologías estuvieran controladas sin medicación específica.
- Patología del sistema vascular previa conocida (cardiopatía isquémica, enfermedad cerebrovascular o arteriopatía periférica).
- Procesos infecciosos o proinflamatorios recientes (< 10 días).
- Antecedentes de neoplasia o patología infecciosa crónica.
- Pacientes diagnosticados de cefalea distinta a la migraña. Especialmente se excluyeron los casos con criterios de abuso de medicación antimigrañosa.
- Embarazadas y lactantes.
- Enfermedades inflamatorias de curso crónico, salvo en el grupo AR.
- Enfermedad sistémica grave.
- Obesidad (índice de masa corporal > 35 kg/m²).
- Fumadores activos de ≥ 5 cigarrillos/día.

- Consumo reciente de drogas vasoactivas (para la realización del estudio, en caso de consumo, debió pasar al menos un tiempo superior a 4 veces la vida media del fármaco).
- Negativa a firmar el consentimiento informado o retirada del mismo.

4.3. DESCRIPCIÓN DE PARÁMETROS.

El protocolo de estudio se diseñó de acuerdo con la declaración de Helsinki para la investigación biomédica. A continuación, se definen las principales variables epidemiológicas, clínicas, de ultrasonografía y moleculares analizadas en la presente Tesis Doctoral.

4.3.1. Variables epidemiológicas.

Se realizó una entrevista clínica a todos los participantes en el estudio para el registro de las variables epidemiológicas (edad, sexo, antecedentes familiares de migraña, EM y AR).

- Edad y sexo.

Se incluyeron pacientes varones y mujeres. La edad se estableció en años.

- Factores de riesgo cardiovascular tradicionales.

En todos los sujetos se determinó la presencia de los factores de riesgo cardiovascular universalmente aceptados (HTA, Diabetes mellitus, hipercolesterolemia, hábito tabáquico, consumo de alcohol, etc.). Además, durante la entrevista se determinó la talla, el peso, el diámetro abdominal y se calculó el índice de masa corporal (IMC), según la siguiente fórmula.

$$\text{IMC} = \text{peso (kg)} / \text{talla (m}^2\text{)}$$

- Antecedentes médico-quirúrgicos de interés.

Se realizó una historia de los antecedentes médicos que pudieran interferir en los resultados, así como de los tratamientos médicos habituales. Se investigaron antecedentes de enfermedades autoinmunes e inflamatorias crónicas en todos los sujetos participantes. Se registraron también los tratamientos recibidos en caso de existir.

4.3.2. Variables clínicas.

Todos los datos clínicos incluidos en el análisis de la serie se obtuvieron de la entrevista clínica realizada previa a la realización de los estudios y mediante la revisión de las notas de la historia clínica.

Dentro del grupo de pacientes diagnosticados de EM se registró: tiempo desde el diagnóstico, síntomas de debut de la enfermedad, tiempo desde el último estudio de neuroimagen por RM, fecha de último tratamiento esteroideo y dosis recibida. Se registraron también los fármacos modificadores de la enfermedad previos y actuales. Se realizó exploración neurológica completa para conocer el grado de discapacidad que quedó registrado mediante la puntuación en la escala EDSS. El día de la realización del estudio, los pacientes completaron la escala de gravedad de la fatiga FSS, tras lectura y comprensión de las instrucciones pertinentes.

En el caso de los controles se realizó entrevista clínica dirigida a descartar la existencia de criterios de exclusión. La escala de medición de la fatiga FSS fue completada también por el grupo de pacientes afectados de migraña y los controles sanos.

4.3.3. Variables ultrasonográficas.

Los estudios ultrasonográficos se realizaron con un ecógrafo modelo SIEMENS Accuson X300 PE. Para evitar variaciones circadianas de los valores de la reactividad vasomotora, los estudios se llevaron a cabo entre las 08:00 y las 11:00 horas, en una sala sin ruido ni interferencias externas y a una temperatura constante de 22° C.

Figura 2: Ecógrafo modelo SIEMENS Accuson X300 PE utilizado.



De forma previa a la inclusión de pacientes en el estudio, se realizaron las mismas determinaciones en sujetos caso para entrenamiento técnico y validación de los datos, comparándolos con los resultados obtenidos por personal facultativo del Servicio de Neurología entrenado en la técnica. Todas las imágenes de los estudios han sido almacenadas en formato digital, y todas las determinaciones se han realizado a la finalización del estudio.

Las principales técnicas de exploración, todas ellas realizadas en una única sesión, fueron las siguientes:

A.- Estudio de reserva hemodinámica cerebral (reactividad vasomotora cerebral) mediante Test de apnea.

Con el sujeto en decúbito supino se realizó la medición de todos los parámetros hemodinámicos de las arterias intracraneales con una sonda de 2 MHz. Para la medición de la RHC se ha utilizado el test de apnea, que aumenta el $p\text{CO}_2$ plasmático, por lo que se trata de un estímulo vasodilatador. El doppler transcraneal puede medir fácilmente la respuesta de los vasos cerebrales al dióxido de carbono a través del estudio del tiempo de apnea o Breath Holding Index (BHI)

Figura 3: Ejemplo del registro de los valores hemodinámicos en ACM.



El procedimiento es el siguiente: Inicialmente se monitoriza la arteria cerebral media (ACM) izquierda en torno a 50 mm de profundidad, a través de la ventana transtemporal (Figura 3), la arteria basilar se localiza usando la ventana occipital.

Previamente a la recogida de los datos definitivos se realizaron entrenamientos en cada sujeto. Entre cada episodio de apnea, se deja al paciente reposar por lo menos durante 2 minutos. Una vez obtenidos la velocidad media (Vm), la velocidad pico sistólica máxima (Vs) y el índice de pulsatilidad (IP), se solicita al paciente que realice una apnea, que idealmente es de treinta segundos de duración, tras una inspiración normal. En caso de que el paciente no pueda aguantar los treinta segundos de apnea, se le sugiere antes que lo indique y únicamente se consideran válidas apneas de más de 20 segundos para el análisis posterior. Seis segundos tras finalizar la apnea se obtendrá un nuevo registro en el espectro doppler determinándose la Vm, Vs, el IP, tiempo de apnea y saturación de oxígeno al finalizar la apnea (166).

Dos minutos más tarde, se repite el mismo proceso en la ACM contralateral y por último en la arteria basilar con el paciente en decúbito lateral derecho. Con los datos obtenidos se obtiene el índice de apnea (BHI) con la siguiente fórmula:

$$BHI = [(Vm\ ACM\ apnea - Vm\ ACM\ basal) / (Vm\ ACM\ basal \times Duración\ de\ apnea\ (s))] \times 100$$

Los valores de normalidad en la población española, que tomamos como referencia, son los descritos en el trabajo de Jiménez – Caballero et al en 2006 (167).

B. Determinación del Grosor Íntima-Media carotídeo (GIM).

Se realizó un estudio ecográfico de alta resolución de ambas arterias carótidas mediante un transductor lineal de alta frecuencia. La exploración mediante ecografía de la pared arterial muestra dos líneas ecogénicas (Figura 4) que se corresponden histológicamente con las interfases luz-íntima y media-adventicia (168). La distancia entre esas dos líneas ecogénicas representa el engrosamiento combinado de la capa íntima y media de la pared arterial y se define como GIM.

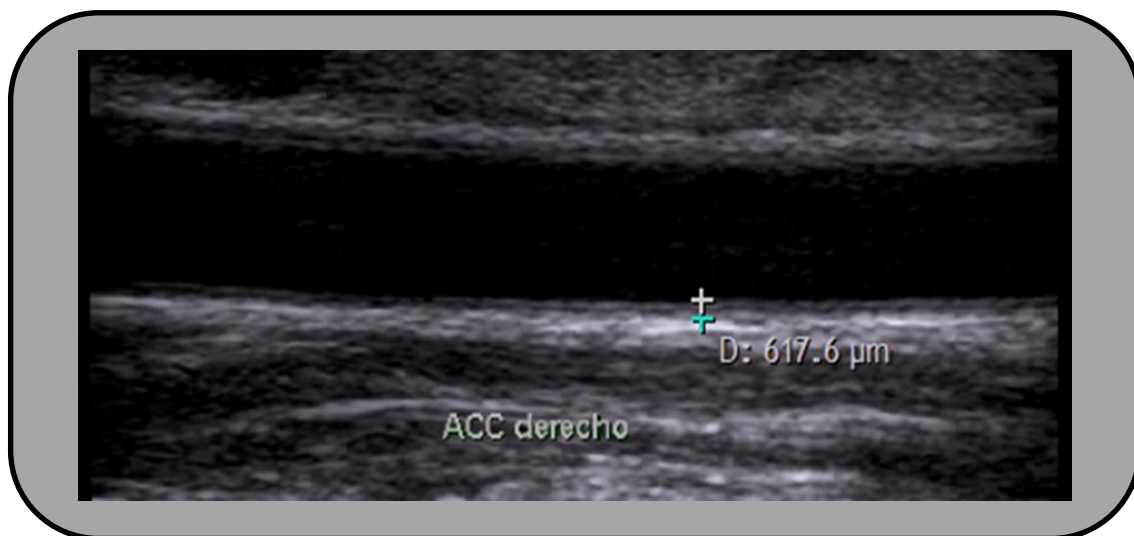
La medición del GIM se realizó tal y como está reflejado en la literatura (169), en las recomendaciones para estudios científicos. Se exploró el territorio carotídeo de forma estandarizada con el participante en posición supina y el cuello extendido y ligeramente girado en dirección contralateral al lado estudiado. Todas las mediciones se realizaron mediante imágenes longitudinales y transversales de la arteria, utilizándose la aplicación de zoom focalizado al segmento medido. El GIM se recogió en la arteria

carótida común (ACC), en el segmento distal de la pared posterior, con una sonda de 8 MHz. Se estudiaron y examinaron 3 segmentos predeterminados de las arterias a ambos lados y libres de placas de ateroma. El GIM se midió a una distancia de 1 centímetro por debajo del bulbo carotídeo, en la pared posterior del vaso.

Todas las mediciones se realizaron en la misma fase del ciclo cardiaco, al final de la diástole de forma estandarizada. Se realizó en cada participante del estudio un total de cinco mediciones en cada lado y el resultado definitivo se expresa como el valor medio del GIM (*mean common*) resultado de la media de las múltiples mediciones en ACC.

La resolución métrica del sistema fue de un decimal. Cualquier valor por encima del percentil 75 del valor normal correspondiente a sujetos sanos de la misma edad y sexo se consideraron patológicos. Se registró también el valor máximo obtenido en cada lado y expresado como GIMmax.

Figura 4: Ejemplo de medición del GIM.



Además, se recogió la presencia o no de placas de ateroma en cada ACC, ACI y carótida externa, reflejándose su tamaño, morfología, ecogenicidad y cuantificación del grado de estenosis en su caso.

Se definió como placa de aterosclerótica carotídea la protrusión inconfundible en la luz de la arteria mayor de 1,5 mm, un engrosamiento mayor del 50% del GIM circundante o como la demostración de una estructura focal que protruye en la luz arterial al menos 0,5 mm (170).

C. Determinación del flujo sanguíneo cerebral.

Para esta determinación se utilizó una sonda lineal de 8 MHz. Tras llevar a cabo un estudio longitudinal de todo el eje carotídeo y vertebral. La arteria carótida interna (ACI) se valora a 1,5 cm de la bifurcación carotídea, y la imagen en modo B es magnificada para obtener una optimización de las imágenes. En el caso de las arterias vertebrales, la determinación se realiza tras su identificación en el espacio intervertebral entre C4 y C5.

El diámetro arterial se mide en el mismo momento del ciclo cardiaco de forma estandarizada, para evitar fluctuaciones. El diámetro se define como la distancia entre el endotelio de ambas paredes vasculares. Se registró asimismo la Vs, Vm, IP y velocidad al final de la diástole (Vdf). Tras la medición del diámetro longitudinal de la arteria carótida interna y el cálculo del área del vaso (cm²), asumiendo que se trata de una estructura circular, se calcula el flujo de volumen sanguíneo local en dicha arteria mediante la siguiente fórmula:

$$CBF(ml/min) = Vm \times \text{Área}$$

La suma de los flujos en ambas ACI y ambas arterias vertebrales nos proporciona el flujo sanguíneo cerebral total (171).

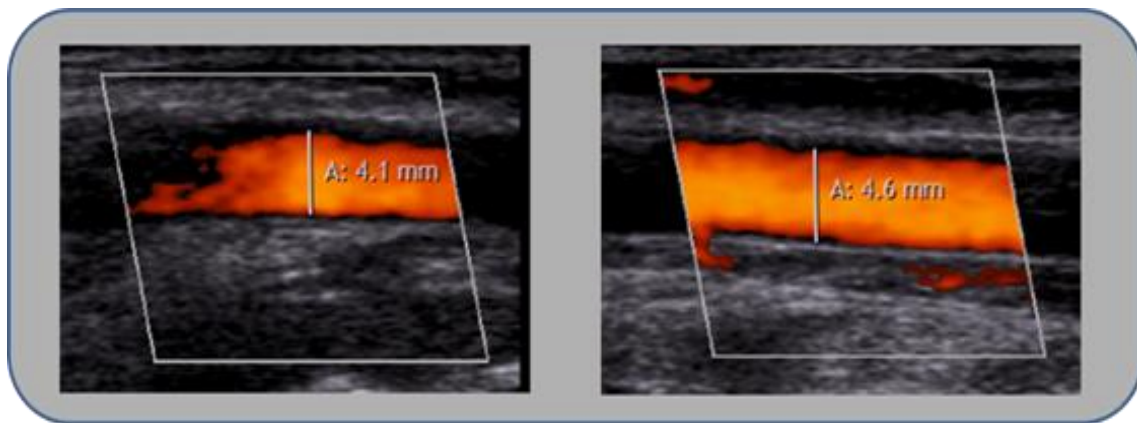
La medición del flujo cerebral global, ha demostrado tener una buena correlación con el SPECT, PET y los estudios de perfusión mediante RMN (80). Las alteraciones en este registro se han objetivado en diferentes enfermedades neurológicas como el ictus, y la demencia (81). En nuestro trabajo se buscó la correlación del flujo medido con el resto de parámetros ecográficos y moleculares estudiados.

D.- Estudio de la vasodilatación mediada por hiperaflujo en la arteria braquial (vasodilatación dependiente de endotelio –VDE).

La función endotelial puede estudiarse de forma no invasiva valorando los cambios en el diámetro de la arteria braquial, producidos en respuesta a un estímulo vasodilatador. Se considera que existe disfunción endotelial, si existe una incapacidad del endotelio para responder con una dilatación normal o completa ante un estímulo vasodilatador.

La VDE se induce mediante un estímulo mecánico consistente en provocar un aumento del flujo sanguíneo dentro de la arteria braquial, que incrementa la denominada tensión de cizallamiento (*shear stress*), libera ON endotelial y provoca finalmente la vasodilatación.

Figura 5: VDE medida en la arteria braquial.



Los pasos son los siguientes: Utilizando una sonda de matriz lineal a una frecuencia de 8 MHz, la exploración se realiza en el brazo dominante, en decúbito supino, con el brazo en una posición cómoda. En primer lugar, se obtiene la imagen de la arteria braquial por encima de la fosa antecubital, en un plano longitudinal. Se obtuvieron también imágenes doppler color y pulsado a nivel de la arteria braquial. Las interfases íntima-media anterior y posterior de la arteria se utilizaron como puntos de referencia para la medición del diámetro basal de la arteria braquial. Una vez localizada, se obtiene la media de 5 mediciones del diámetro de la arteria (las mediciones se realizan en diástole para evitar la variabilidad producida por la elasticidad de los vasos) y se obtiene el valor medio. Posteriormente, tras la medición del diámetro basal y la obtención de las imágenes de flujo, se procede al inflado mediante un manguito de tensión arterial en el tercio proximal del antebrazo, aproximadamente 50 mm Hg por encima de la tensión arterial sistólica, lo que garantiza que la arteria braquial quede ocluida durante 5 minutos. Después de este tiempo, se desinfla el manguito, y, aproximadamente 60 segundos después, se realizan de nuevo cinco mediciones del diámetro de la arteria y se obtiene la media de las mismas. La vasodilatación mediada por hiperaflujo se calcula como el porcentaje de variación entre el diámetro postoclusión y el basal.

$$VDE = \frac{\text{diámetro postoclusión} - \text{diámetro basal}}{\text{diámetro basal}} \times 100$$

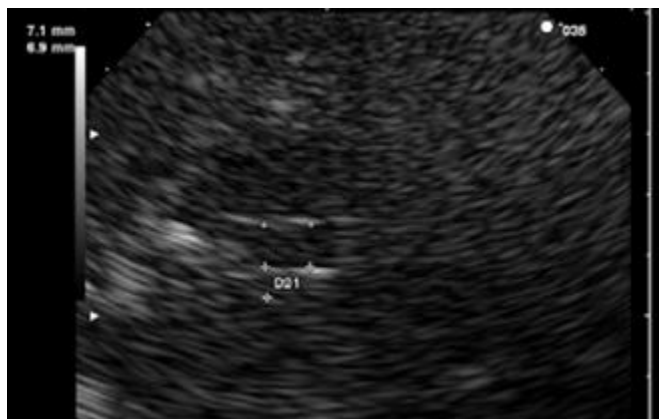
E.- Estudio del parénquima cerebral: Medición del III ventrículo.

Usando el ecógrafo en modo B con una sonda de baja frecuencia, el estudio se realiza a través de la ventana acústica temporal en dirección órbitomedial y a una profundidad de imagen aproximada entre 14-16 cm lo que permite identificar la calota contralateral ayudando en la orientación.

En dicho plano se identifica una imagen hipoeogénica respecto al líquido cefalorraquídeo (LCR) correspondiente al mesencéfalo (Figura 6) y, realizando una leve inclinación craneal de la sonda, se identifican las dos líneas hipereogénicas que corresponden a las paredes del III ventrículo. Generalmente en este plano se pueden identificar también los tálamos como dos estructuras hipoeogénicas adyacentes al ventrículo. Una vez identificadas las paredes del III ventrículo y seleccionado el corte en el que mejor se identificaban, la imagen es congelada, se aplica el zoom y se almacena.

La medición se obtuvo situando los cursores en el borde interno de ambas líneas hipereogénicas, lo que nos proporciona las dimensiones del mismo (172). En todos los casos la medición se llevó a cabo a la finalización del estudio.

Figura 6: Ejemplo de medición del diámetro del III ventrículo.



4.4.4. Variables moleculares.

A todos los participantes del estudio, se les realizó extracción de muestras de sangre periférica. Las muestras de sangre periférica se han extraído con agujas de 21G, desechando los primeros 4 ml para evitar alteraciones debidas a la punción. Todas las muestras se han procesado en un periodo menor a 20 minutos tras su obtención.

A.- Determinaciones bioquímicas.

Parte de las muestras fueron separadas para determinación de los parámetros bioquímicos (PCR, homocisteína, vitamina D, vitamina B12, fibrinógeno, perfil lipídico). Dichas determinaciones se realizaron en el laboratorio del hospital. Otra parte se centrifugó a 3.500 revoluciones durante 10 minutos y fue congelada a -80° C para futuras determinaciones y estudio de marcadores genéticos.

B.- Células endoteliales progenitoras circulantes (EPC).

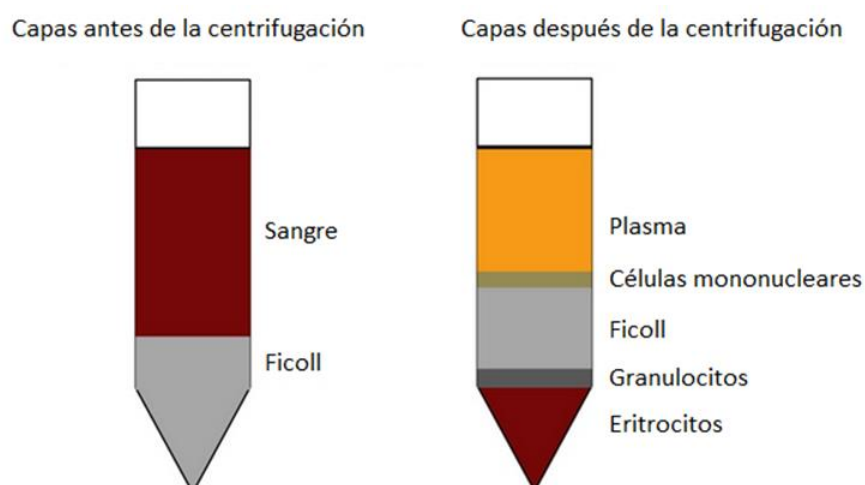
Una muestra de sangre periférica fue procesada en el laboratorio de Neurología donde se realizó la suspensión de células mononucleares, para posteriormente y siguiendo protocolo llevar a cabo la cuantificación de EPCs por citometría de flujo y cultivo de las mismas.

Para obtener EPCs capaces de desarrollar unidades formadoras de colonias (CFUs, siglas en inglés de Colony-Forming Unit), se siguió el protocolo desarrollado por Hill et al (57). Para ello, se extrajeron de cada paciente 4 tubos de sangre periférica en tubos con heparina de 3,5 ml cada uno. Dos de ellos se utilizaron para cultivo celular y la posterior obtención de CFUs y los otros dos se utilizaron para la caracterización de EPCs mediante citometría.

En 4 tubos de polipropileno de 15 ml, se añadió 3,5 ml de Ficoll-Paque™ PLUS y posteriormente, con mucho cuidado, evitando mezclar con el Ficoll, se añadió la sangre con ayuda de una pipeta Pasteur de vidrio. Seguidamente se centrifugaron a 1200 revoluciones por minuto durante 25 minutos, obteniéndose la separación de los distintos componentes de la sangre como se muestra en la Figura 7.

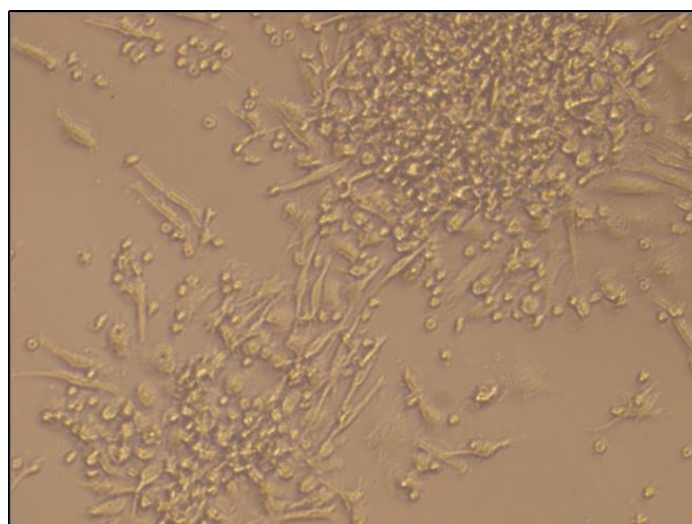
Con ayuda de una pipeta Pasteur, se recogió la capa de células mononucleares de dos de los tubos en un nuevo tubo de polipropileno, para posteriormente lavarla dos veces mediante la adicción de PBS (siglas en inglés de Phosphate Buffered Saline) suplementado con 2% de FBS (siglas en inglés de Fetal Bovine Serum). El pellet obtenido, se resuspendió en 3ml de CFU-Hill Liquid Medium (StemCell) y se utilizó una cámara de Neubauer para contar el número de células que hay en el tubo, usando azul trypan en una dilución 1:2.

Figura 7: Esquema de la separación por gradiente de densidad con Ficoll.



En una placa de 6 pocillos recubiertos con fibronectina, se sembraron 5×10^6 células/pocillo, añadiendo 2 ml de medio de cultivo a cada uno de los pocillos, y se incubaron durante 2 días a 37°C, 5% CO₂ y 95% de humedad. Pasado este tiempo se recolectaron las células no adherentes en un tubo de polipropileno y de nuevo se utilizó azul trypan para contar el número de células para crecer (10^6 células/pocillo) de una placa de 24 pocillos recubiertos con fibronectina, añadiendo medio de cultivo fresco hasta un volumen final de 1ml/pocillo. Las muestras fueron incubadas durante 3 días a 37°C, 5% CO₂ y 95% de humedad, después de los cuales se procedió a contar al microscopio en número de unidades formadoras de colonias existente. Se define una CFU como un núcleo central de células redondeadas, rodeado por células alargadas en la periferia. Un grupo central aislado, sin células alrededor no se considera como CFU.

Figura 8: Detalle de una CFU evaluada con luz invertida.



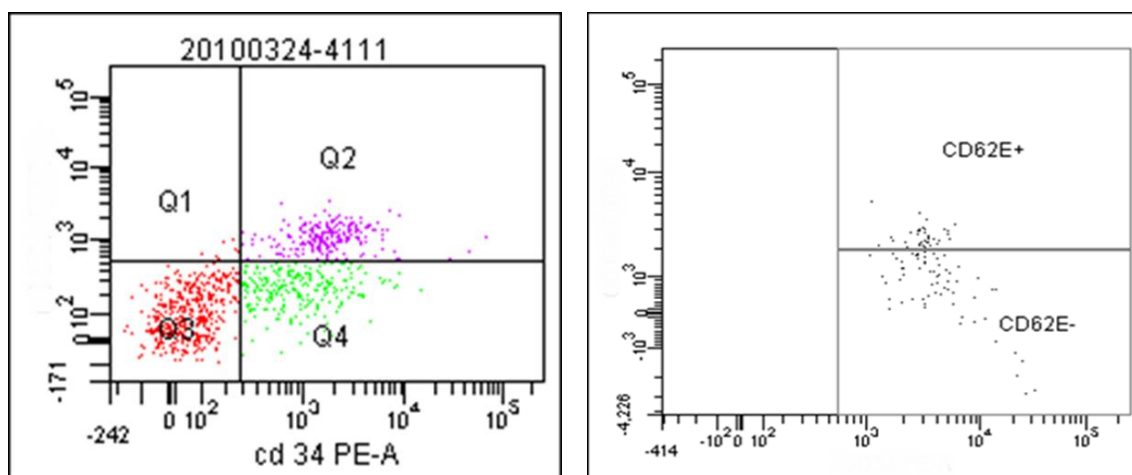
Por su parte, la citometría de flujo es una técnica de análisis multiparamétrico en la que se hace pasar una suspensión de partículas, habitualmente células, alineadas a través de un haz de láser. La señal producida por el impacto de cada célula es recogida por diferentes detectores. Su conversión en señales eléctricas y su posterior digitalización nos permite analizar simultáneamente varios parámetros de un mismo elemento celular.

Las señales de fluorescencia proceden de fluoróforos que generalmente se encuentran unidos a un anticuerpo y que son capaces de reconocer la molécula diana analizada. Además, la cantidad de señal de fluorescencia emitida es proporcional a la cantidad de componentes fluorescentes detectados.

Para la preparación de las células para citometría se aislaron las células siguiendo el protocolo del gradiente de densidad de Ficoll explicado anteriormente. Después de los dos lavados, se resuspendió el pellet y se añadió 1 ml de PBS + 2% FBS a cada uno de los tubos de células, y se contó el número de células existente en ellos. Según el número de células, se añadió el volumen de anticuerpo correspondiente (en una relación de 1 μ l de anticuerpo por cada 10^6 células). En uno de los tubos se añadió la mezcla de anticuerpos CD34-PE, KDR-APC, CD62E-FITC, mientras que en el otro tubo se añadieron los anticuerpos CD34-FITC, KDR-APC, CD133-PE. Las muestras, se incubaron a temperatura ambiente y oscuridad durante 20 minutos, tras los cuales se les añadió 5 ml de PBS + 2% FBS y se las centrifugó, para eliminar el exceso de marcaje y uniones inespecíficas que pudieran existir. Después de la realización de dos lavados con PBS, las muestras fueron resuspendidas en 500 μ l de PBS + 2% FBS y se pasaron por un filtro de 5 μ m, para eliminar agregados celulares. Las poblaciones en estudio, se separaron en un citómetro de flujo modelo BD FACSAria 1, y los resultados obtenidos se analizaron con el software FACSDiva V5.03 ModFit V3.0. Dichos análisis se llevaron a cabo por el técnico encargado del manejo del citómetro. Las poblaciones identificadas para cada una de las muestras fueron:

- EPCs muy tempranas: CD34+ KDR+ CD133+
- EPCs tempranas: CD34+ KDR+ CD62E-
- EPCs tardías activadas: CD34+ KDR+ CD62E+

Figura 9: Ejemplo de citometría de flujo células CD34+/KDR+/CD62E.



C.- Extracción de RNA.

Posteriormente, se procedió a la extracción de RNA de las células identificadas para posteriores análisis. A cada paciente se le extrajo sangre periférica en un tubo Tempus™ con un estabilizador del RNA. Se aisló el RNA total de la sangre siguiendo el protocolo indicado en el Tempus™ Spin RNA Isolation Reagent Kit. Este protocolo consiste en un lisado celular para obtener un pellet de RNA. Posteriormente se resuspende dicho pellet y se pasa a un filtro, donde se realizarán sucesivos lavados y filtrados, hasta purificar el RNA que finalmente será eluído en un tampón para ácidos nucleicos proporcionado en el kit.

Una vez extraído y cuantificado el RNA se conservó en un congelador de -80°C para su uso en futuros estudios.

D.- Estudio mediante ELISA de marcadores moleculares.

La técnica de ELISA (siglas en inglés de Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay) se basa en la detección de antígenos mediante el uso de anticuerpos marcados con un enzima a los que la adicción de un sustrato cromógeno, hace que la actividad resultante (primero inmunológica y posteriormente enzimática) dé lugar a un color, cuya densidad óptica es detectada por un espectrofotómetro.

En la Tabla 10 se muestran los kits ELISA comerciales empleados en este trabajo y que fueron realizados siguiendo estrictamente las recomendaciones del

fabricante. La intensidad del color obtenida se midió con un lector de BioRad Modelo 550, a la longitud de onda indicada por el manual adjunto por la casa comercial.

Tabla 10: Kits ELISA empleados en el estudio.

Proteína	Muestra estudiada	Fabricante	Sensibilidad
FvW	Suero	Abnova (Taiwan)	2,5 mU/mL
ON	Suero	MybioSource (USA)	0,5 nM/ml

Los kits comerciales empleados en esta Tesis son ELISAs de tipo sándwich cuya base experimental es la siguiente. La microplaca está recubierta por un anticuerpo que reconoce a la molécula en estudio, sobre el que se añadirán los estándares de concentración conocida en los pocillos reservados a tal fin y, al resto de pocillos, se les añadirá la muestra correspondiente de concentración a determinar. Después de incubar a temperatura ambiente, se lava la placa con un tampón de lavado para eliminar los restos de muestra y anticuerpos no fijados.

Una vez bien seca la placa, se añade un segundo anticuerpo policlonal de la molécula de interés con biotina, para que capture el complejo “anticuerpo-antígeno” del paso anterior. Para permitir esta segunda unión, se vuelve a incubar según el protocolo de la molécula en estudio. Transcurrido ese tiempo, se lavará de nuevo para eliminar los restos de anticuerpos libres y se añadirá el enzima streptavidin-peroxidasa, que se une al complejo con biotina anterior. Tras la incubación correspondiente, se volverá a lavar la placa y se añadirá el sustrato cromógeno de detección, con el que reaccionará el enzima y cuya actividad dará lugar a la aparición de una tonalidad azulada. Dicha reacción debe realizarse en oscuridad.

Posteriormente, se añade un tampón ácido que detiene la reacción enzimática, virando el color del pocillo de azul a amarillo. La cantidad de enzima unida al pocillo es directamente proporcional a la cantidad de antígeno presente en la muestra, por ello, cuanto más fuerte es la tonalidad de azul, y posteriormente de amarillo, presente en el pocillo, mayor será la absorbancia observada.

Inmediatamente después de parar la reacción, se procede a la lectura de la densidad óptica de cada uno de las muestras.

4.4. ESTUDIO ESTADÍSTICO.

El análisis estadístico se realizó con el paquete SPSS v.22.0 (SPSS, Chicago, Il.). La distribución de las variables principales se comparó con la curva de distribución normal mediante el test de Kolmogorov-Smirnov. Para todos los estadísticos se asumió un error $\alpha=0,05$; en comparaciones múltiples, los valores de p se corrigieron por el método de Bonferroni. En estas variables se calcularon los valores mediana, percentiles 5, 25, 75, y 95, y se representaron gráficamente.

Con el paquete estadístico SPSS se conformaron las tablas de contingencia y se realizaron los análisis de regresión lineal, así como las pruebas de la *t* de Student, análisis de la varianza de una o dos vías y el análisis de la covarianza. Los análisis *post-hoc* (específicos en comparaciones de 3 o más subgrupos de análisis) se realizaron mediante el método de Tukey, en el caso de que las varianzas intergrupos fueran iguales, o de Games-Howell, en el caso de que las esas varianzas fueran desiguales. La correlación entre las variables cuantitativas se realizó por el estadístico *r* de Pearson, calculando el valor p para dos colas (95% IC; $\alpha=0,05$). Cuando no fue apropiado el análisis paramétrico, se empleó el test *H* de Kruskal-Wallis para *K* muestras independientes.

Estrategia de análisis estadístico.

- Descripción clínica y características clínicas de los pacientes y controles. Se analizaron las frecuencias de las variables cuantitativas y se compararon con los grupos de control y comparadores activos usando el estadístico χ^2 . Las variables cuantitativas continuas se expresaron en forma de media $\pm$ SD.
- Análisis comparativo. Para todas las comparaciones de variables cuantitativas o cualitativas, se estableció un proceso de análisis en dos fases. En la primera fase, las variables de estudio se compararon entre los grupos clínicos controles, ME, MC y EM. Las variables cuantitativas se compararon en tablas de contingencias de dimensiones $4 \times n$ celdas, usando el método de χ^2 con 3 grados de libertad y corrección de Yates. Y en el caso de las variables cuantitativas, mediante el estadístico ANOVA de una vía. En este caso, la igualdad de las varianzas fue analizada mediante el test de Levene, que condiciona el valor del estadístico *t* y el valor de p, en función de que las

varianzas sean o no iguales. En este punto de análisis, se compararon las medias no ajustadas del grupo EM respecto a los controles, ME y MC. Adicionalmente, se realizó un análisis *post-hoc* según método de Tukey o de Games-Howell, evaluando el efecto de cada subgrupo de cefalea respecto a los controles. En la segunda fase, el grupo EM se comparó con un grupo activo de pacientes con AR, dado que en esta última enfermedad se ha demostrado que existe daño endotelial y mayor riesgo cardiovascular. Se procedió de este modo porque los sujetos de los grupos control, ME y MC se seleccionaron ajustados por edad y sexo. En cambio, el grupo AR fue seleccionado sin ajuste por edad y sexo.

- Creación de modelos de regresión lineal. En ambas fases de análisis, se construyeron modelos ajustados por las variables de confusión que hubieren mostrado cierta correlación con las variables de estudio ($p < 0.10$). El modelo elegido fue aquel que mayor coeficiente de determinación (R^2) produjera. En todo caso se demostró que existía homocedasticidad, es decir, que la varianza del error era constante para los distintos valores de las variables independientes.
- Análisis de sensibilidad y especificidad. Curvas ROC. El valor diagnóstico de GIM, VRC, VDE, para discriminar entre EM y resto de grupos de comparación (controles, grupos de migraña), y posteriormente, con el grupo AR, se realizó mediante el análisis de sensibilidad y especificidad para distintos puntos de corte. La mejor combinación de valores de sensibilidad-especificidad para un valor de corte se determinó por el índice J de Youden ($J = \text{sensibilidad} + \text{especificidad} - 1$); y el número de casos necesario para el diagnóstico, que es la inversa de J . La desviación de los valores observados frente a los esperados se representó en curvas ROC, y se calculó el área bajo la curva (ABC), y su significación respecto a una distribución asintótica.
- Cálculo del tamaño muestral: Teniendo en cuenta las medias y DE observadas en estudio preliminar, debe haber al menos 35 participantes en cada grupo para obtener una potencia de 0,95 con un riesgo α de 0,01.

5. RESULTADOS

5.1. GENERALIDADES.

El objetivo de la presente Tesis Doctoral es demostrar la presencia de disfunción endotelial, como primer estadio subclínico del desarrollo de enfermedad aterosclerótica en los pacientes con EM. Para ello, de acuerdo con la descripción previa, se estudió la presencia de marcadores subclínicos de disfunción endotelial mediante un estudio ultrasonográfico de alta resolución y marcadores bioquímicos y moleculares en un grupo de pacientes diagnosticados de EM, en comparación con un grupo control sano ajustado por factores de confusión y con dos grupos de pacientes diagnosticados de migraña: uno, con migraña episódica, y el otro, con migraña crónica. En el caso de la migraña, paradigma de enfermedad neurológica en la que se ha evidenciado la existencia de disfunción endotelial asociada, se ha hecho especial hincapié en la potencial relación entre los mecanismos de cronificación de la misma y las alteraciones subclínicas asociadas.

En una segunda etapa, se compararon los resultados obtenidos en los pacientes con EM con un grupo de pacientes afectados de AR. La comparación con un grupo de pacientes con otra enfermedad inflamatoria sistémica en la que se ha demostrado la presencia de aterosclerosis subclínica sin evidencia clínica de eventos cardiovasculares previos o factores de riesgo cardiovascular clásicos, apoyaría la importancia de la inflamación crónica para el desarrollo de aterosclerosis acelerada en diversas enfermedades autoinmunes crónicas como la EM.

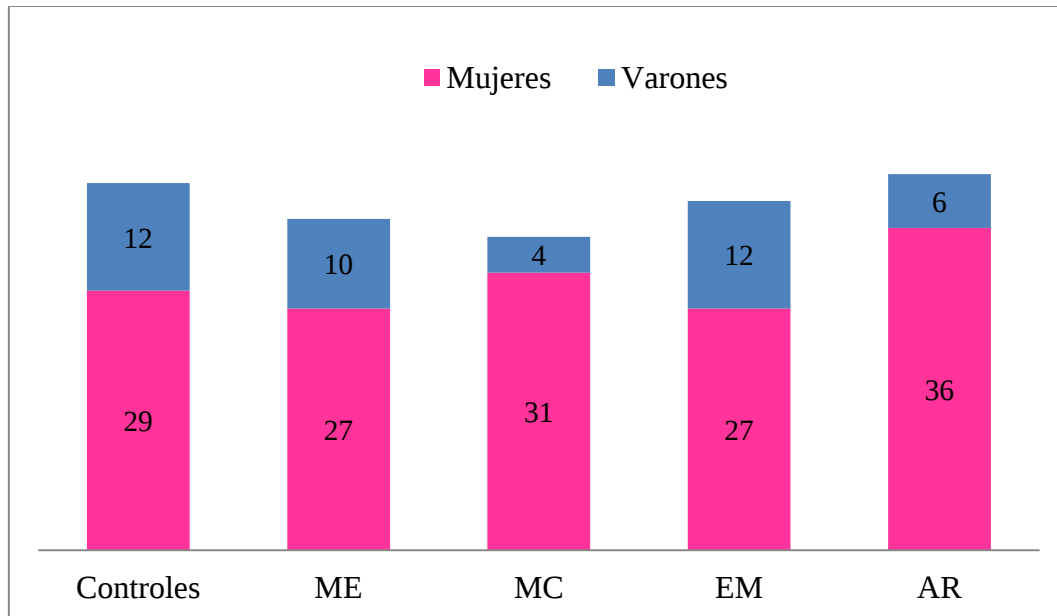
De los sujetos seleccionados, cumplían todos los requisitos de inclusión en el estudio un total de 194 participantes, pertenecientes a los grupos clínicos previamente definidos. Los pacientes diagnosticados de EM seleccionados fueron 39 (media de edad = $40,90 \pm 8,6$ años). Del total de 72 pacientes diagnosticados de migraña, 35 cumplían los criterios para el diagnóstico de MC (media de edad = $37,09 \pm 11,6$ años) y 37 habían sido diagnosticados de ME (media de edad = $37,46 \pm 9,7$ años). En el grupo de pacientes diagnosticados y en seguimiento por AR se reclutó un total de 42 participantes (media de edad = $50,71 \pm 4,7$ años). Por último, en el grupo de controles sanos se reclutó a un total de 41 participantes (media de edad = $40,44 \pm 12,1$ años). Ninguno de los sujetos cumplió ninguno de los criterios de exclusión establecidos. En todos los casos el estudio se completó según lo previsto, sin incidencias ni eventos adversos durante la realización del mismo.

5.2. ESTUDIO DESCRIPTIVO.

5.2.1. Características epidemiológicas de la muestra.

En todos los grupos clínicos se observó la existencia de un predominio del sexo femenino, como se representa en la Figura 10. El predominio del sexo femenino en el caso de la EM, se constató en todos los rangos de edad de los participantes.

Figura 10: Distribución de sexos en cada grupo.



En la Tabla 11 se resumen las principales características demográficas utilizadas en el estudio actual y su distribución en los grupos clínicos.

Tabla 11: Características epidemiológicas de los grupos.

Variables		Edad (a)	Peso (Kg)	Altura (cm)	IMC (Kg/m ²)
Controles	Media±DE	40,44±12,1	66,68±12,2	164,68±25,9	23,11±3,3
	Rango	42	37	33	6,01
ME	Media±DE	37,46±9,7	65,26±12,1	166,74±8,4	23,05±2,9
	Rango	42	39	43	10,01
MC	Media±DE	37,09±11,6	65,25±11,9	164,41±7,5	24,26±5,2
	Rango	45	40	38	5,55
EM	Media±DE	40,90±8,6	68,61±16,7	166,82±6,5	24,83±4,6
	Rango	35	45	33	9,62
AR	Media±DE	50,71±4,7	71,78±15,8	1,62±0,77	25,35±6,9
	Rango	23	41	41	4,19

El análisis de los datos epidemiológicos muestra que las diferencias por sexo entre los diferentes grupos no resultaron significativas ($\chi^2=7,995$; 4 g.l.; $p=0,092$). En cambio, la media de edad difirió entre grupos ($F=15,836$; $p=4,2E-11$) debido a que la muestra de pacientes con AR, que no había sido pareada, presentaban una media de edad 10 años superior a los otros grupos incluidos en el estudio. Por este motivo, el proceso de análisis se estableció en dos pasos (*vide supra*). Siguiendo este orden, las diferencias de media de edad entre controles, grupos de migraña y EM no fueron significativas ($F=1,299$; $p=0,277$).

El IMC también mostró diferencias significativas ($F=5,582$; $p=2,9E-4$) a expensas del grupo de pacientes con AR, mientras que para los grupos control, migraña y EM, las diferencias intergrupos para el IMC no fueron significativas ($F=1,609$; $p=0,190$).

Por el contrario, el análisis de otras variables estudiadas como la edad ($p=0,238$), el peso ($p=0,515$) y la altura ($p=0,897$) no mostró diferencias entre los pacientes con EM y el resto de grupos clínicos.

Con el objetivo de demostrar la existencia de disfunción endotelial en nuestros pacientes con EM, y valorar la presencia de aterosclerosis subclínica como primer estadio del desarrollo de la enfermedad vascular, se estudió la presencia de los factores de riesgo cardiovascular considerados tradicionales en cada uno de los grupos de estudio. Los principales factores de riesgo clásicos ya se encontraban excluidos gracias a los criterios de inclusión aplicados, mientras que en el caso del resto de los factores estudiados no se encontraron diferencias significativas entre grupos en el primer paso de análisis comparativo.

En la comparación realizada entre el grupo de EM y los pacientes con AR tampoco se objetivaron diferencias significativas, aunque existía una tendencia a la significación en el caso del perfil lipídico ($p=0,059$) y en el IMC ($p=0,084$). En la Tabla 12 se describen las variables estudiadas en cada uno de los grupos clínicos establecidos para el estudio.

Tabla 12: Principales factores de riesgo cardiovascular en los grupos clínicos.

	Controles (n)	ME (n)	MC (n)	EM (n)	AR (n)	P ^s	P EMvsAR
Estenosis carotídea	0	0	0	0	1	Ns	Ns
Diabetes Mellitus	0	0	0	0	0	Ns	Ns
Homocisteinemia (>15 pg/mL)	0	1	0	0	1	Ns	Ns
Ex-fumador	3	5	9	7	10	Ns	Ns
Fumador ligero	9	14	10	13	8	Ns	Ns
Alcohol (<40 gr/día)	2	2	0	3	1	Ns	Ns
Dislipemia	7	8	5	8	17	Ns	0,059
Cardiopatía	0	0	0	0	1	Ns	Ns
Arteriopatía periférica	0	0	0	0	0	Ns	Ns
Ácido úrico	0	0	0	0	1	Ns	Ns
Trombosis venosa	0	0	0	0	0	Ns	Ns
SAHOS	0	0	0	0	0	Ns	Ns
Fibrilación auricular	1	0	0	0	1	Ns	Ns
Asma	3	2	4	0	2	Ns	Ns
Insuficiencia renal	0	0	0	0	0	Ns	Ns
IMC >30	1	1	3	4	8	Ns	0,084
Ns= No significativo. Distribución χ^2 con 3 grados de libertad.							

Al inicio del estudio se realizaron tres determinaciones de la presión arterial en reposo y se registró la media de las mismas. No se objetivaron cifras patológicas en ninguno de los sujetos, ni diferencias significativas intersujetos, ni entre los pacientes con EM y el resto de grupos clínicos.

5.2.2. Características clínicas de la población de estudio.

De cada grupo clínico activo se recogieron datos específicos de su proceso en una base de datos creada a tal fin. En el caso de los pacientes afectados de EM se realizó un análisis estadístico de los principales datos clínicos asociados a la enfermedad.

- **Tipo de EM.**

Todos los pacientes estudiados cumplían los criterios diagnósticos de McDonald del año 2010 para EM. En todos los casos los pacientes se encontraban en la fase remitente recurrente de la enfermedad. No se seleccionaron pacientes con EM primariamente

progresiva ni pacientes en la fase secundariamente progresiva, para homogeneizar la muestra en la medida de lo posible. Tampoco se seleccionaron pacientes con síndrome clínico aislado en el momento del estudio.

- **Tiempo de evolución de la enfermedad.**

El tiempo medio transcurrido desde el diagnóstico de la EM fue de $6,62 \pm 4,9$ años. El rango fue amplio, oscilando entre los 6 meses y los 21 años.

- **Frecuencia de los brotes.**

La media de tiempo transcurrido desde el último brote clínico de EM variaba entre 6 y 18 meses. De los pacientes objeto del estudio, el 65.58% habían recibido tratamiento esteroideo con bolos endovenosos de metilprednisolona durante el último brote clínico. Ningún participante había recibido esteroides en el mes previo al estudio y ningún paciente presentaba síntomas o signos sugerentes de un brote de EM en el momento de realizarse el estudio.

- **Manifestaciones clínicas.**

Con respecto a la sintomatología clínica de la EM, se recogió el evento inicial en caso de estar registrado en la historia clínica. El 54% presentaron un debut como neuritis óptica, el 32% como manifestación de una lesión a nivel del tronco del encéfalo y el 14% una lesión hemisférica cerebral.

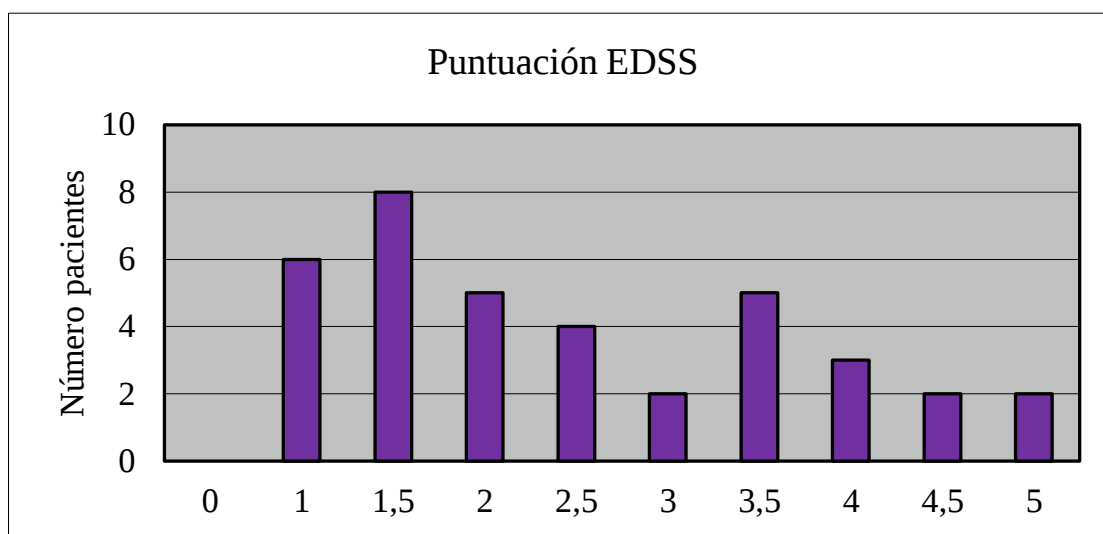
- **Pruebas de neuroimagen.**

En todos los pacientes se había realizado al menos una RM en los últimos 12 meses. Se revisaron todos los estudios y se analizó la carga lesional presente en cada paciente en el momento del estudio para futuras investigaciones.

- **Grado de discapacidad.**

El grado de discapacidad fue medido mediante la aplicación de la escala EDSS en el momento del estudio. La media de puntuación fue de $2,608 \pm 0,47$ puntos, con un rango de puntuación de 1,0 a 5,0 puntos. En la Figura 11 se muestra la distribución de los pacientes con EM en función de la puntuación obtenida en la escala EDSS.

Figura 11: Distribución de pacientes con EM en función de la puntuación EDSS.



- **Grado de fatiga.**

La puntuación media de la escala FSS en los pacientes con EM fue de $38,27 \pm 16,09$ puntos (Rango =56 puntos).

- **Tratamientos modificadores de la enfermedad.**

En relación con el tratamiento modificador de la enfermedad, de los 39 pacientes con EM, 28 se encontraban en tratamiento con fármacos modificadores de la enfermedad en el momento del estudio (71,79%). La mayoría de los pacientes se encontraban en una primera línea de tratamiento, y únicamente 3 casos habían sido tratados previamente con otros fármacos. En esos casos, el tratamiento había sido sustituido por intolerancia o falta de eficacia. El tratamiento más utilizado fue el interferón $\beta 1a$ (51,61% con administración subcutánea e intramuscular en el 16,13% de los pacientes), seguido de fingolimod y natalizumab (9,68% cada uno) y, de forma minoritaria el acetato de glatiramero (ver Tabla 13).

Tabla 13: Tratamientos modificadores recibidos por el grupo de estudio.

Tratamiento modificador de la enfermedad	Pacientes tratados (n)
Interferón- $\beta 1a$	21
Acetato de glatiramero	1
Fingolinod	3
Natalizumab	3
Sin tratamiento	11

Entre los pacientes diagnosticados de migraña se hizo un análisis de las características de la misma, en los dos grupos escogidos (ME y MC).

No se objetivaron diferencias significativas entre ambos grupos ni en el tipo de aura, ni en los factores precipitantes o la existencia de pródromos. El único dato que mostró diferencias de forma significativa fue la presencia de alodinia, que fue más frecuente en el grupo de pacientes diagnosticados de MC ($p=0.017$).

Tabla 14: Características de la migraña en los grupos de ME y MC.

Signo/Síntoma	Migraña episódica	Migraña crónica	P
Unilateral	27 (77,1%)	27 (72,9%)	Ns
Fotofobia	33 (94,3%)	34 (91,9%)	Ns
Fonofobia	33 (94,3%)	29 (78,4%)	Ns
Osmofobia	10 (28,6%)	10 (27%)	Ns
Precipitantes	33 (94,3%)	31 (83,8%)	Ns
Estrés	26 (74,3%)	25 (67,5%)	Ns
Sueño	4 (11,4%)	11 (29,7%)	Ns
Trastorno sueño	21 (60%)	18 (48,6%)	Ns
Alcohol	6 (17,1%)	13 (35,1%)	Ns
Menstruación	11 (31,4%)	17 (45,9%)	Ns
Cambios climáticos	9 (25,7%)	17 (45,9%)	P=0.029
Pródromos	14 (40%)	18 (48,6%)	NS
Somnolencia	10 (28,6%)	9 24,3%)	Ns
Irritabilidad	8 (22,8%)	14 (37,8%)	Ns
Apetito	2 (5,7%)	0 (0%)	Ns
Aura	25 (71,4%)	22 (59,5%)	Ns
Visual	23 (65,7%)	21 (56,7%)	Ns
Sensitiva	8 (22,8%)	6 (16,2%)	Ns
Basilar	0 (0%)	2 (5,4%)	Ns
Alodinia	11 (31,4%)	21 (56,7%)	P=0.017 (1 l.f.)
Ns = No significativo			

Entre los tratamientos sintomáticos utilizados por los pacientes en la fase aguda, los más frecuentes son los antiinflamatorios no esteroideos, seguido de los triptanes o una combinación de ambos. Únicamente dos pacientes con MC habían tomado ergóticos, un caso de ME y otros dos pacientes con MC habían tomado derivados opiáceos en alguna ocasión.

Tabla 15: Tratamientos sintomáticos para la migraña utilizados en ME y MC.

Tratamiento	Migraña episódica	Migraña crónica	P
Paracetamol	9	16	Ns
Dipiridamol	7	10	Ns
AINEs	31	32	Ns
Derivados ergóticos	1	2	Ns
Opiáceos	0	2	Ns
Ns = No significativo			

5.3. ESTUDIO ANALÍTICO.

5.3.1. Aterosclerosis subclínica entre los grupos de estudio.

A. *Eco-doppler de troncos supraaórticos.*

A nivel anatómico en el estudio longitudinal del eje carotídeo se encontraron pequeñas placas de ateroma en alguno de los sujetos estudiados, de acuerdo con la definición de placa aterosclerótica utilizada (170).

En total se encontraron placas de ateroma en 5 controles, 1 paciente con ME, 2 con MC, 6 pacientes de EM, y 17 diagnosticados de AR. Estas diferencias entre grupos resultaron altamente significativas ($\chi^2=26,825$; 4 g.l.; $p=2,2E-5$), exclusivamente a expensas del grupo de AR.

En ninguno de los casos dichas placas daban lugar a cambios hemodinámicos relevantes o provocaban estenosis significativas de los vasos estudiados. En la Tabla 16 se describe el número y la localización de las placas halladas en cada grupo clínico.

Tabla 16: Distribución de las placas de ateroma en los grupos de estudio.

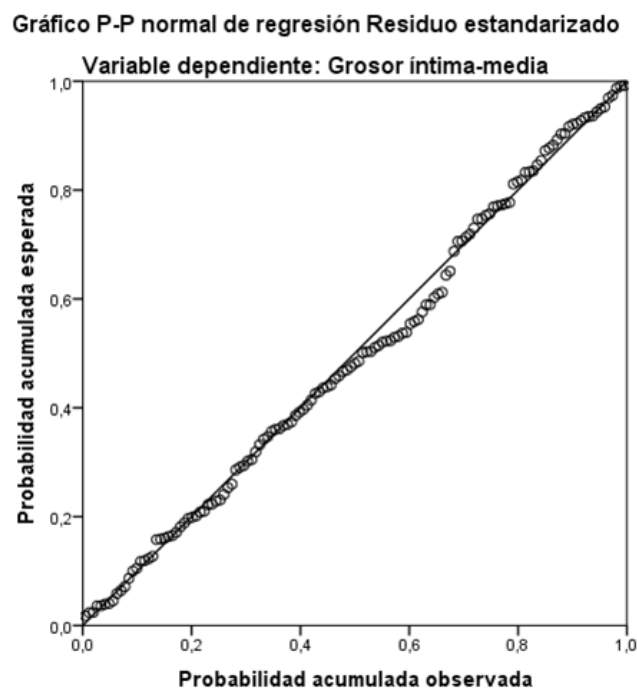
		Controles	ME	MC	EM	AR
ACC	Derecha	1	0	0	2	5
	Izquierda	5	1	2	4	6
ACI	Derecha	1	0	0	1	7
	Izquierda	0	0	0	2	7
ACE	Derecha	0	0	0	0	0
	Izquierda	0	0	0	0	0
TOTAL PLACAS		5*	1*	2*	6*	17**
* Diferencias no significativas en comparación con controles y grupos de migraña.						
** $p= 2,2E-5$, en comparación con EM.						

B. Grosor íntima-media. (GIM).

Se estudió la presencia de enfermedad aterosclerótica subclínica a nivel carotídeo en los pacientes con EM, en ausencia de evidencia de enfermedad vascular previa o factores de riesgo cardiovascular clásicos mediante medición del GIM, y posteriormente, se investigó su relación con factores demográficos y clínicos que pudiesen condicionar su desarrollo.

La distribución de los valores de GIM no siguió una distribución normal, según la prueba de Kolmogorov-Smirnov, ($p < 0,001$), tal y como se observa en la Figura 12.

Figura 12: Gráfico P-P normal de regresión residuos estandarizados.



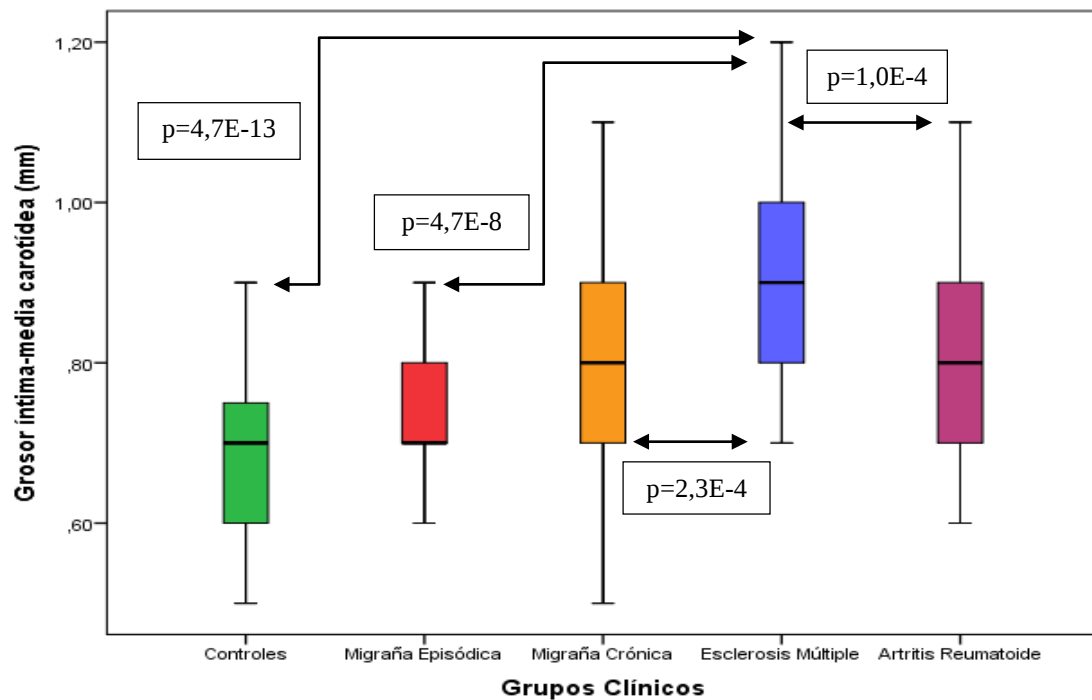
En el primer paso de análisis estadístico, en el análisis univariado, la diferencia de medias de GIM fue significativamente diferente en función del diagnóstico clínico entre controles, ambos grupos de migraña y EM ($F=27,135$; $p=5,7E-14$; potencia observada = 1,0). De esta forma, el diagnóstico clínico explicó el 35% de la varianza objetivada en los valores del GIM (coeficiente de determinación = 0,361; ajustado $R^2=0,348$).

En el análisis *post hoc*, los pacientes con EM tenían un mayor GIM (media = $0,927 \pm 0,020$ mm) que los controles sanos (media = $0,682 \pm 0,019$ mm) cuya diferencia

RESULTADOS

resultó altamente significativa (diferencia de las medias = -0,245 mm; $p=4,7E-13$). Entre los pacientes con migraña, el grupo de pacientes con ME mostraron un GIM de $0,757\pm0,020$ mm, y en los pacientes con MC la media de GIM fue de $0,806\pm0,020$ mm. En la Figura 13, se representan los resultados del GIM en los diferentes grupos.

Figura 13: Resultados del GIM en los grupos clínicos.



Por otra parte, también existían diferencias significativas en comparación con los pacientes migrañosos. Los pacientes diagnosticados de EM presentaban un GIM mayor que el grupo de ME (diferencia de las medias = -0,170 mm; $p=7,6E-8$) y que el grupo de MC (diferencia de las medias = 0,121 mm; $p=2,3E-4$). Se ha objetivado también la existencia de diferencias significativas entre los pacientes con migraña y los controles. Tanto los pacientes con ME (diferencia de las medias = -0,074 mm; $p=0,040$), como los pacientes con MC (diferencia de las medias = -0,123 mm; $p=1,3E-4$) presentaban GIM mayores que los controles.

En el análisis de subconjuntos homogéneos, según la prueba HSD de Tukey, se distinguían 3 grupos diferenciados respecto a las medias de GIM: controles, migrañosos y EM.

Además del diagnóstico clínico, existían otras variables relacionadas con el GIM. La edad en el momento del estudio se relacionó con el valor obtenido del GIM

($r=0,365$; $p=2,3E-7$), y también existía una relación entre los valores del GIM y el IMC ($r=0,219$; $p=0,003$). Posteriormente se construyó un modelo de regresión lineal con las variables que habían mostrado cierta correlación con el GIM. El modelo que mejor predijo la varianza del GIM fue el construido con el diagnóstico clínico, edad y el IMC.

En el modelo ajustado, el diagnóstico clínico fue el mejor predictor de GIM ($F=27,317$; $p=8,7E-14$). No obstante, tanto el IMC ($F=6,698$; $p=0,011$), como la edad ($F=28,780$; $p=3,5E-7$), permanecieron como predictores significativos. Este modelo predijo el 50% de la varianza del GIM ($R^2=0,508$; ajustada = 0,489). A pesar de que el colesterol total se correlacionó con el GIM ($r=0,184$; $p=0,029$), este parámetro no se incluyó en el análisis de regresión por producir modelos con índices de determinación inferiores. El modelo así ajustado por edad e IMC produjo unos residuos estudentizados de GIM que se aproximaban a la distribución normal (media estudentizada = 0,001; $\sigma^2=1,004$), y se descartó colinealidad de las variables independientes incluidas en el modelo.

En el análisis *post hoc*, se objetivaron diferencias significativas entre los grupos de migraña y los controles. Los pacientes con ME (diferencias de las medias = 0,080 mm; $p=0,007$) o con MC (diferencia de las medias = 0,133 mm; $p=2,5E-6$), tenían valores de GIM mayores que los controles, por el contrario, no se objetivaron diferencias entre ambos grupos de migraña (diferencia de las medias = -0,052 mm; $p=0,214$).

Los parámetros de regresión observados por grupos demostraron que los pacientes con EM presentaban diferentes valores de significación en la comparación frente a cada grupo de estudio. En la Tabla 17, se refleja la estimación de los parámetros $\beta \pm EE$, en el modelo no ajustado, y en el ajustado por factores de confusión. En ambos modelos las diferencias observadas fueron altamente significativas.

Tabla 17: Factores predictores de GIM en ambos modelos lineales.

Factores	Modelo no ajustado		Modelo ajustado	
	$\beta \pm EE$	P	$\beta \pm EE$	p
Control – EM	-0,245 $\pm$ 0,028	3,9E-15	-0,222 $\pm$ 0,025	5,6E-15
ME – EM	-0,170 $\pm$ 0,028	1,2E-8	-0,142 $\pm$ 0,026	1,8E-7
MC - EM	-0,121 $\pm$ 0,029	4,0E-5	-0,090 $\pm$ 0,026	7,3E-4

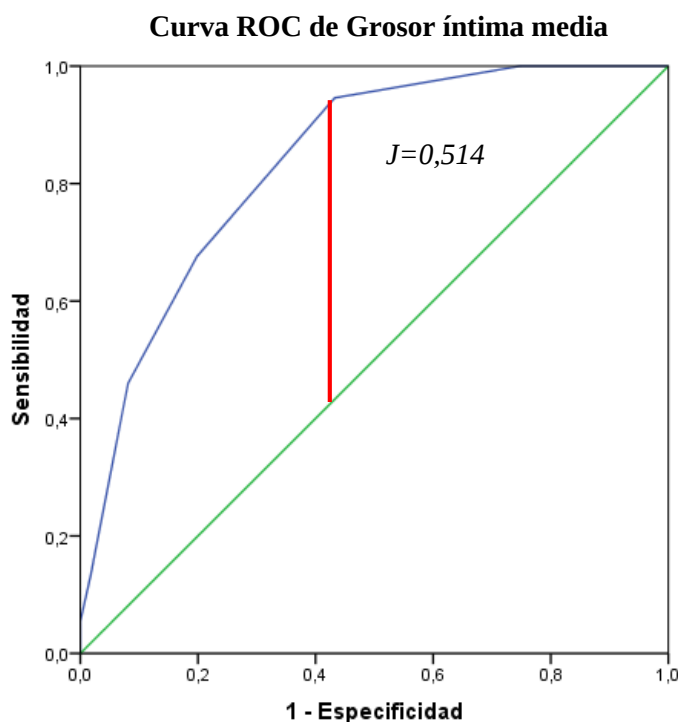
RESULTADOS

Se exploró también la posible interacción entre el diagnóstico, la edad y el IMC. En el modelo establecido con diagnóstico*edad y diagnóstico*IMC, el coeficiente de determinación hallado fue similar al descrito previamente ($R^2=0,48$). El mejor predictor del GIM en este modelo fue el factor diagnóstico*edad ($F=7,727$; $p=1,3E-5$).

En el análisis de sensibilidad y especificidad del GIM para el diagnóstico de EM, el valor del GIM que discrimina el diagnóstico de EM frente a los controles y los dos grupos de migraña, se corresponde con una combinación de una sensibilidad del 95% y una especificidad del 57% (índice de Youden $J=0,514$), que se obtiene con un valor de GIM mayor de 0,75 mm.

En nuestro estudio el 84% ($ABC=0,836$; $p=1,0E-9$) de los pacientes con EM pueden identificarse por tener un GIM mayor de 0,75 mm con respecto a los controles sanos y a los pacientes migrañosos (Figura 14). Únicamente en dos casos de EM se observó un GIM menor de 0,75 mm, correspondiendo a dos casos con una puntuación en la escala EDSS menor de 2,5 puntos.

Figura 14: Curva ROC de Grosor íntima-media.



Como puede observarse en la Tabla 18 de distribución de valores, los puntos de corte con respecto a los valores de GIM de controles, ME y MC, son próximos a 0,8 mm (valor más aproximado al hallado por el análisis de sensibilidad/especificidad).

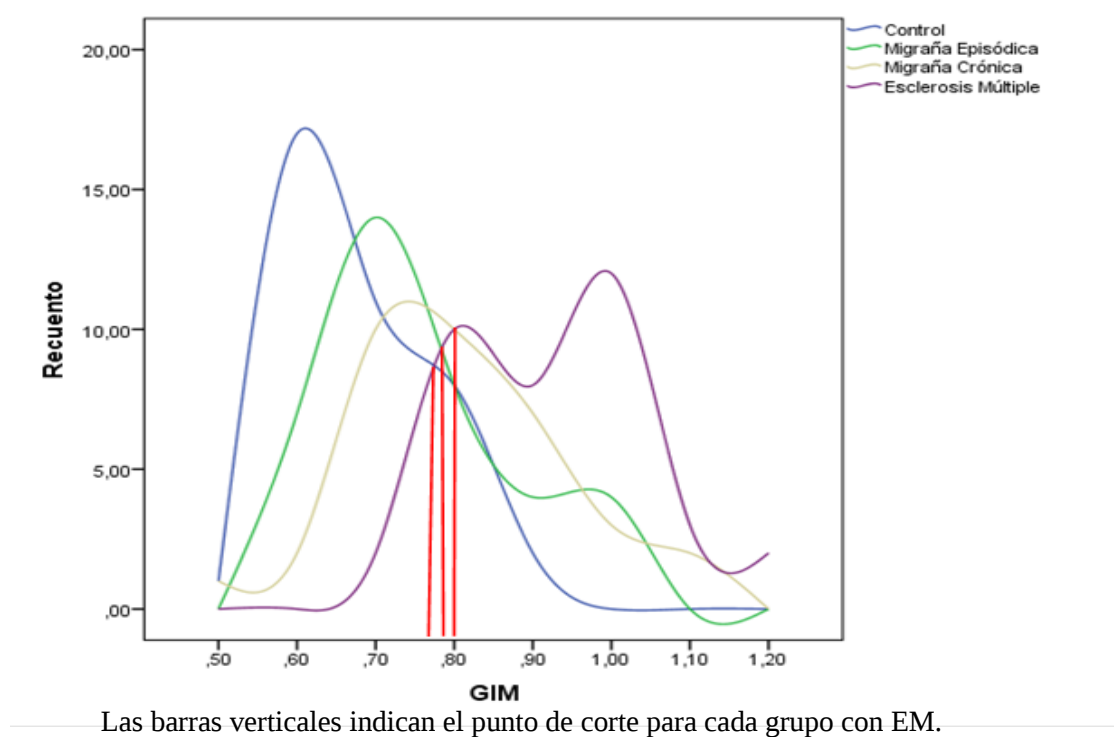
De acuerdo con ello, el número necesario para diagnosticar (NND) de EM con un GIM mayor de 0,75 mm fue de 2 (NND=1/J).

Tabla 18: Coordenadas de la curva ROC.

Positivo si es mayor o igual a:	Sensibilidad	1 – Especificidad	Especificidad	J	NND
-0,500	1,000	1,000	0,000	0,000	IND
0,550	1,000	0,982	0,018	0,018	55
0,650	1,000	0,748	0,252	0,252	4
0,750	0,946	0,432	0,568	0,514	2
0,850	0,676	0,198	0,802	0,477	2
0,950	0,459	0,081	0,919	0,378	3
1,050	0,135	0,018	0,982	0,117	9
1,150	0,054	0,000	1,000	0,054	19
2,200	0,000	0,000	1,000	0,000	IND

IND= Indeterminado.
NND = Número de casos necesarios para el diagnóstico.
J = Índice de Youden.

Figura 15: Valores diagnósticos en función del GIM.



Comparación de los resultados con pacientes con AR.

Según el modelo no ajustado, las medias de GIM fueron diferentes ($F=16,823$; $p=1,0E-4$). Los pacientes con EM mostraron un valor medio de GIM mayor que los pacientes con AR (diferencia de las medias = $-0,113$ mm; $p=1,0E-4$).

RESULTADOS

En el modelo ajustado por edad e IMC, el diagnóstico clínico fue el mejor predictor del resultado del GIM ($F=19,84$; $p=3,1E-5$). Aunque la edad permaneció como factor predictor del GIM ($F=5,654$; $p=0,020$), ésta ejerció un efecto menor que en el caso de los grupos control y migraña, a pesar de que la media de edad de los pacientes con EM era 10 años menor que la del grupo AR.

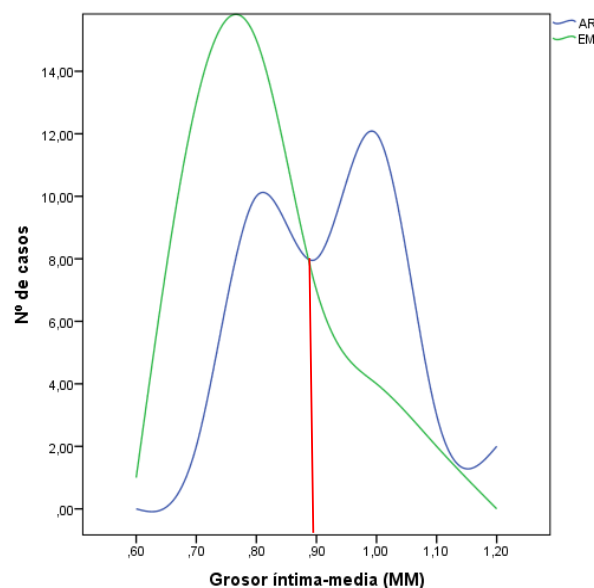
El valor de GIM que, según la tabla de coordenadas (Tabla 19), discriminaba el diagnóstico de EM frente a AR, se corresponde con la combinación de una sensibilidad del 68% y una especificidad del 69% (índice de Youden $J=0,366$), obtenido con un GIM mayor de 0,85 mm. En consecuencia, el 74% ($ABC=0,742$; $p=2,2E-4$) de los pacientes con EM pueden identificarse a partir de este valor respecto al grupo con AR.

Tabla 19: Coordenadas de la curva, en la comparación EM vs AR.

Positivo si mayor o igual a:	Sensibilidad	1 – Especificidad	Especificidad	J
-0,400	1,000	1,000	0,000	0,000
0,650	1,000	0,976	0,0024	0,024
0,750	0,946	0,667	0,333	0,279
0,850	0,676	0,310	0,690	0,366
0,950	0,459	0,143	0,857	0,317
1,050	0,135	0,048	0,952	0,088
1,150	0,054	0,000	1,000	0,054
2,200	0,000	0,000	1,000	0,000

En el siguiente gráfico (Figura 16) que se corresponde con la distribución de valores del GIM para los grupos de pacientes con EM y pacientes con AR, se puede observar cómo ambas curvas se cortan en el punto correspondiente a 0,89 mm.

Figura 16: Curvas de distribución del GIM en pacientes con EM y AR.



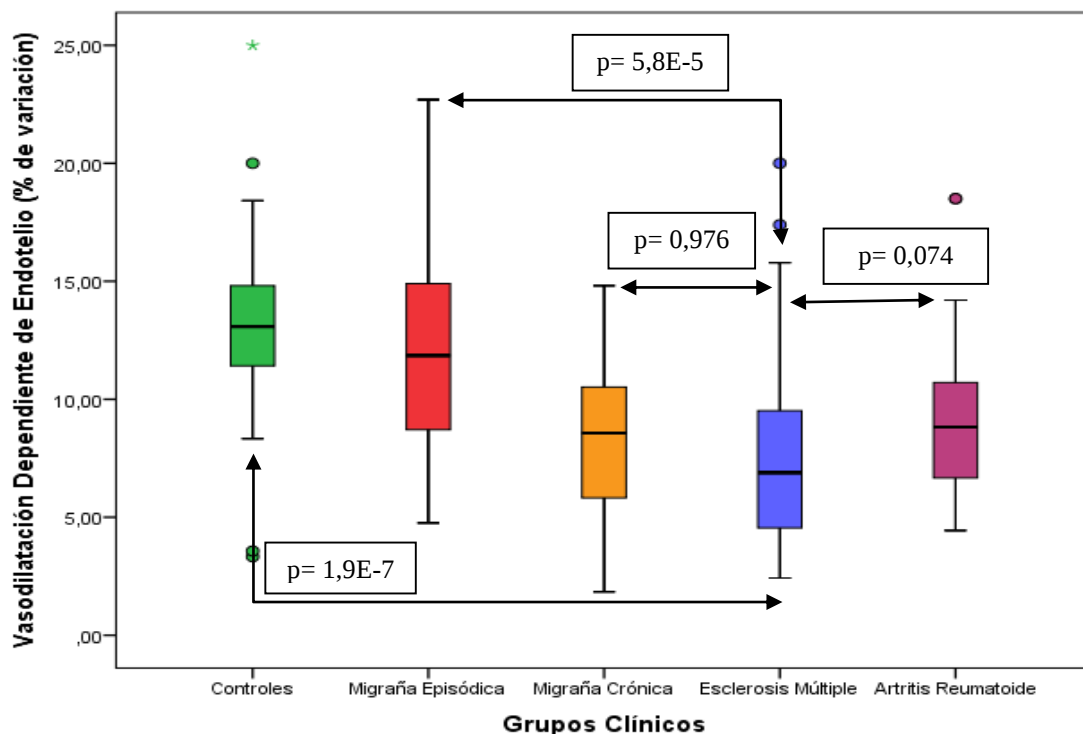
La barra vertical indica el punto de corte entre AR y EM.

5.3.2. Disfunción endotelial en pacientes con Esclerosis Múltiple.

La enfermedad aterosclerótica precisa la presencia de disfunción endotelial, como el primer estadio subclínico necesario para su posterior desarrollo en los pacientes con EM. En la primera etapa del estudio se realizó el estudio comparativo entre EM y los grupos control y de migraña. El análisis de la función endotelial se realizó mediante estudio ultrasonográfico de la arteria braquial, con medición de la VDE, de acuerdo con la técnica descrita en la sección de pacientes y métodos.

Los valores de VDE siguieron una distribución normal, de acuerdo con la prueba de Kolmogorov-Smirnov ($p=0,200$). En el análisis univariado, asumiendo igualdad de las varianzas ($F=1,125$; $p=0,351$), el diagnóstico clínico predijo significativamente el valor de VDE ($F=16,980$; $p=2,0E-9$; potencia observada = 1,0). El diagnóstico clínico explicó el 26% de la varianza de VDE (coeficiente de determinación $R^2=0,272$; ajustado $R^2=0,256$).

Figura 17: Resultados de la VDE en los grupos de estudio.



En el análisis *post hoc* (Figura 17), se observan diferencias entre algunos de los grupos clínicos. Según el modelo no ajustado, los pacientes con EM presentaron un porcentaje de VDE de $7,69 \pm 4,2\%$, que fue menor que en los controles sanos, donde se

RESULTADOS

objetivó una VDE de $13,12 \pm 3,9\%$. Los pacientes con ME mostraron una VDE de $11,99 \pm 4,1\%$, mientras que la VDE se redujo entre el grupo de MC con una media del $8,09 \pm 3,3\%$. Por último, los pacientes diagnosticados de AR presentaron un porcentaje de VDE del $9,62 \pm 3,81\%$.

Tabla 20: Valores de VDE en los grupos clínicos.

Diagnóstico	Media (%)	Desviación estándar	N
Controles	13,122	3,972	38
Migraña episódica	11,995	4,123	36
Migraña crónica	8,091	3,321	31
Esclerosis múltiple	7,690	4,247	35
TOTAL			140

En el modelo no ajustado, los pacientes con diagnóstico de EM, presentaban un porcentaje de variación de la VDE menor que los controles (diferencia de las medias = -5,43%; $p=1,9E-7$). Con respecto a los pacientes con migraña, la VDE estaba significativamente disminuida en los pacientes con EM en comparación con el grupo de ME (diferencia de las medias = -4,30%; $p=5,8E-5$), pero, en cambio, no se objetivaron diferencias significativas con los pacientes diagnosticados de MC (diferencia de las medias = -0,40%; $p=0,976$).

De los resultados de este análisis *post hoc*, se concluye la existencia de dos subconjuntos homogéneos, según la prueba HSD de Tukey: un primer subconjunto estaría constituido por los controles y los pacientes con ME, y el segundo estaría compuesto por los pacientes con EM y el grupo de MC.

Se estudiaron el resto de variables que podían interferir en el porcentaje de variación de la VDE. A diferencia de lo observado en los resultados del GIM, ni la edad, ni el IMC afectaron a los resultados de VDE.

El hábito tabáquico fue el único factor de confusión que, de forma independiente, se correlacionó con los valores obtenidos de VDE ($F=5,226$; $p=0,024$). En el modelo ajustado, las diferencias de las medias de variación de la VDE entre los grupos clínicos fueron muy significativas ($F=17,553$; $p=1,1E-9$).

Los valores de VDE fueron significativamente menores en los pacientes con EM frente a los controles (diferencia de las medias = -5,43%; $p=1,2E-7$) y también en el

caso de los pacientes con ME (diferencia de las medias = -4,30%; $p=4,3E-5$), pero en cambio, no fue así en el caso de los pacientes con MC (diferencia de las medias = -0,40%; $p=0,975$), donde no se hallaron diferencias significativas.

El modelo ajustado mejoró de forma ligera la predicción de la varianza de la VDE (coeficiente de determinación $R^2=0,300$; corregido=0,279). El hábito tabáquico disminuía el valor de la VDE en cada grupo de estudio, pero las diferencias no alcanzaron valores significativos.

En la Tabla 21, se encuentran resumidos los valores estimados de los parámetros de regresión para el modelo no ajustado y en el ajustado por los factores de confusión, en este caso el tabaquismo, ya que en el resto de las variables consideradas no se alcanzó valores significativos.

Adicionalmente, en el análisis *post hoc* entre el resto de los grupos clínicos, sólo se observaron diferencias entre controles y el grupo de MC (diferencia de las medias = 5,03%; $p=2,2E-6$).

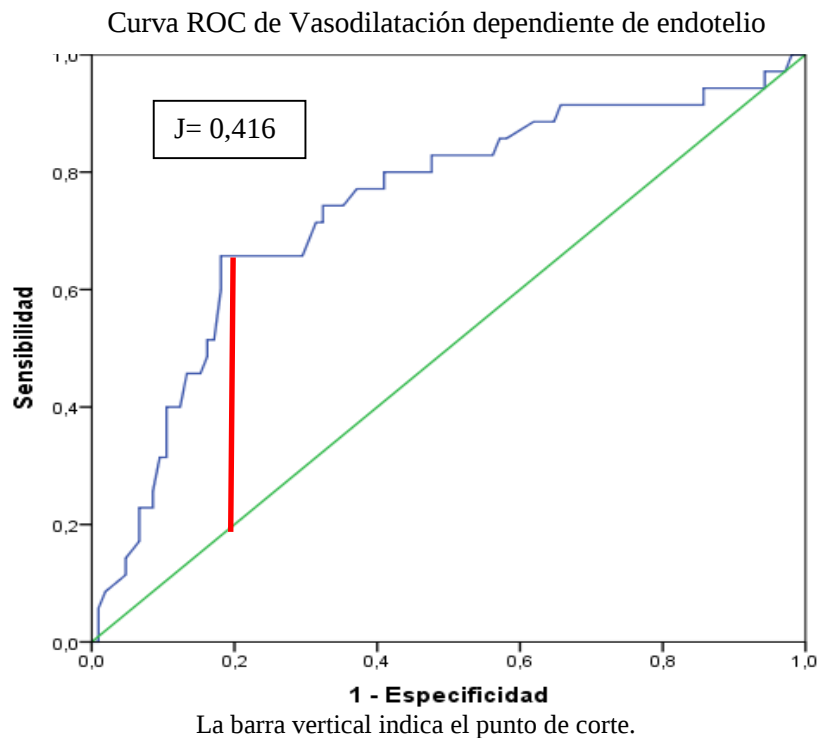
Tabla 21: Factores predictores de la VDE en los modelos lineales.

Factores	Modelo no ajustado		Modelo ajustado	
	$\beta \pm EE$	p	$\beta \pm EE$	p
Control – EM	5,3 $\pm$ 0,92	3,1E-8	5,304 $\pm$ 0,91	4,3E-8
ME – EM	4,306 $\pm$ 0,93	9,9E-6	4,787 $\pm$ 0,92	4,4E-6
MC - EM	0,401 $\pm$ 0,97	Ns	0,308 $\pm$ 0,96	Ns

En el análisis de los valores de sensibilidad y especificidad de la VDE para el diagnóstico clínico. El valor de VDE que discrimina el diagnóstico de EM frente a los controles, se corresponde con una combinación de una sensibilidad del 66% y una especificidad del 84% (índice de Youden $J=0,476$).

Con este análisis de sensibilidad-especificidad, el 74% de los pacientes diagnosticados de EM ($ABC=0,739$; $p=2,0E-5$), pueden ser identificados con valores de VDE inferiores al 7,47%.

Figura 18: Curva ROC de VDE.



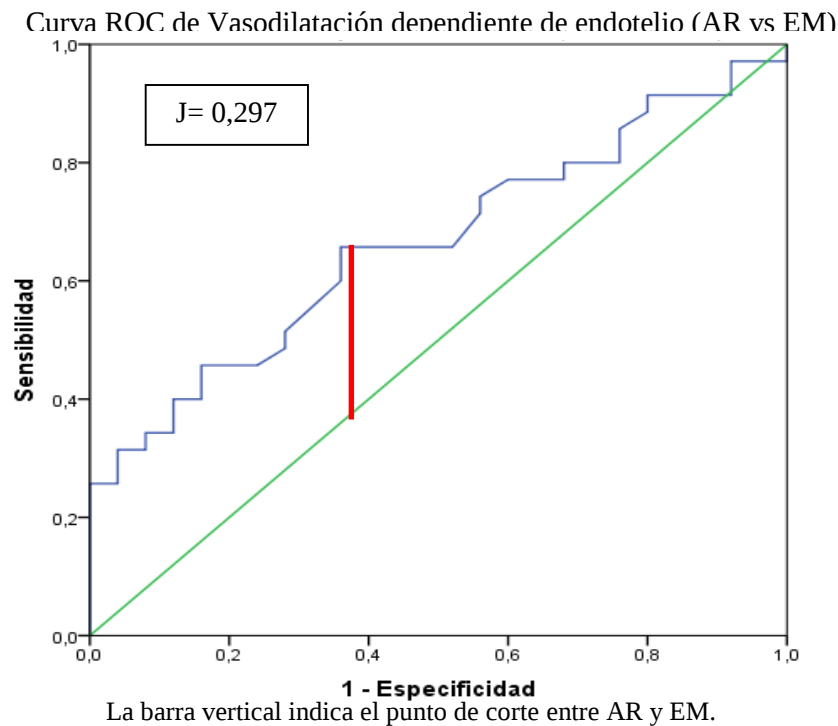
Comparación de los resultados con pacientes con AR.

En el modelo no ajustado, las medias de porcentaje de variación de la VDE entre pacientes con EM (media VDE = $7,690 \pm 4,20\%$) y pacientes con AR (media VDE = $9,629 \pm 3,80\%$) no fueron significativas (diferencia de las medias = $-1,94\%$; $p=0,074$). Sin embargo, tras ajuste del modelo por el hábito tabáquico (Tabla 22), las diferencias entre EM y AR fueron significativas ($F=6,750$; $p=0,012$), aunque este modelo explica sólo un 10% de la varianza en la VDE (R^2 ajustada = 0,097)

Tabla 22: Comparación de la VDE entre grupos de EM y AR.

VDE	Modelo no corregido	Modelo corregido
Factor	$\beta \pm EE$ (p)	$\beta \pm EE$ (p)
AR vs EM	$1,940 \pm 1,06$ (0,074)	$3,475 \pm 1,5$ (0,028)

Posteriormente, se realizó el análisis de sensibilidad-especificidad, que estableció como punto de corte del porcentaje de VDE que discrimina el diagnóstico de EM frente a AR, en 7,725%. Dicho punto se corresponde con una sensibilidad del 66% y una especificidad del 64%, permitiendo llegar al diagnóstico en un 66% de los casos ($ABC=0,663$; $p=0,032$).

Figura 19: Curva ROC de VDE comparando EM y AR.

5.3.3. Cambios hemodinámicos en la circulación cerebral en pacientes con EM.

Para la determinación de la VRC o RHC, se utilizó el test de apnea en ambas circulaciones cerebrales. A nivel de la circulación anterior, se calculó la media del BHI obtenido en ambas ACM, y para el estudio de la circulación posterior se utilizó la arteria basilar.

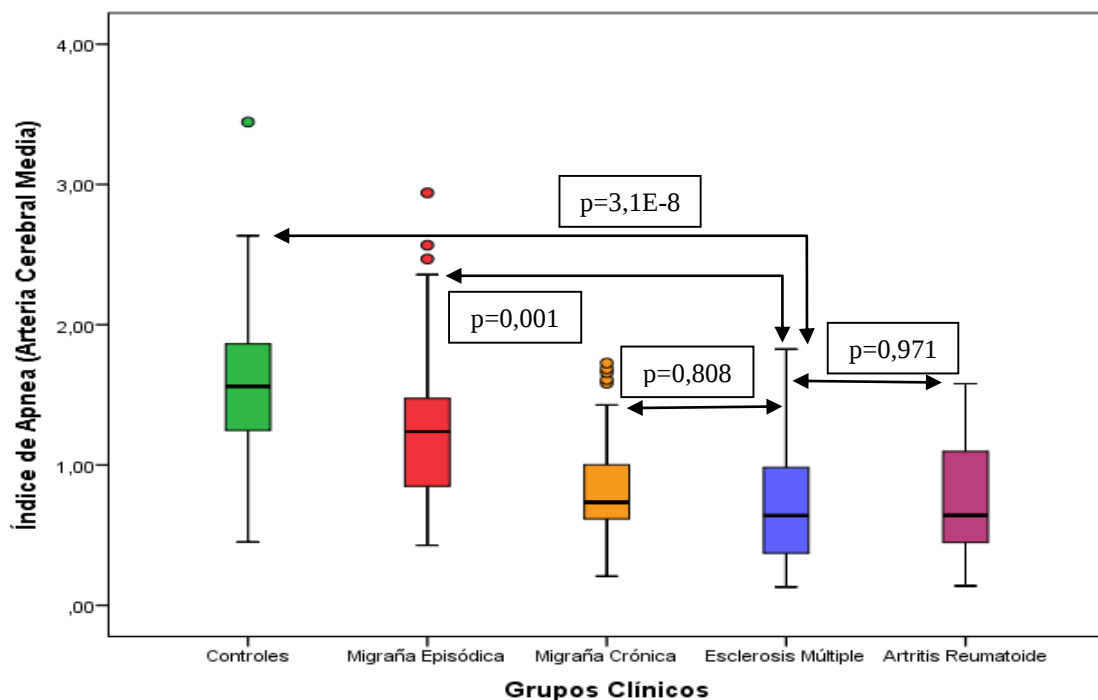
El estudio se pudo completar en un total de 173 sujetos (89,17%) debido a la ausencia de una ventana adecuada para las determinaciones ultrasonográficas en todos los participantes. No existieron claras diferencias entre grupos en el número de sujetos sin ventana para los ultrasonidos. Para los cálculos, se consideraron únicamente aquellos casos que habían realizado al menos un test con un tiempo de apnea adecuado (>20 segundos). En la circulación posterior se utilizó la media de las determinaciones de BHI realizadas. En ninguno de los casos estudiados se encontraron alteraciones hemodinámicas en los valores basales, ni estenosis en las arterias intracraneales significativas. El valor medio de la velocidad media en la ACM fue $57,99 \pm 13,1$ cm/s y de $41,07 \pm 9,4$ cm/s en la basilar, mientras que el índice de pulsatilidad fue $0,84 \pm 0,11$ para la ACM y $0,88 \pm 0,13$ en la arteria basilar.

A.-ESTUDIO DE LA CIRCULACIÓN ANTERIOR: Arteria cerebral media (ACM).

Al igual que en las determinaciones anteriores, en el primer paso del análisis comparativo se incluyeron los grupos de pacientes con EM, controles y los dos grupos de migraña.

En el análisis univariado, asumiendo igualdad de varianzas ($F=1,125$; $p=0,351$), las medias de BHI en la ACM entre los grupos de estudio difirieron de forma significativa ($F=16,946$; $p=2,4E-9$). Los pacientes con EM presentaron un BHI menor (media de BHI = $0,746 \pm 0,48\%$) que los controles sanos (media de BHI = $1,588 \pm 0,59\%$). Entre los pacientes diagnosticados de migraña, los pacientes con ME presentaban BHI ligeramente mayores (media BHI = $1,312 \pm 0,65\%$) que el grupo con MC (media del BHI = $0,873 \pm 0,43\%$).

Figura 20: Resultados de la vasorreactividad cerebral mediante BHI en la ACM.



El diagnóstico clínico explicó el 26% de la varianza obtenida en el valor de BHI ($R^2=0,283$; R^2 ajustado = 0,266). En el análisis *post hoc* se observaron diferencias entre algunos de los grupos clínicos. De acuerdo con este modelo no ajustado, los pacientes con diagnóstico de EM presentaban un porcentaje de variación del BHI menor que los controles (diferencia de las medias = $-0,842\%$; $p=3,1E-8$). Con respecto a los pacientes diagnosticados de migraña, se encontraron diferencias estadísticamente significativas

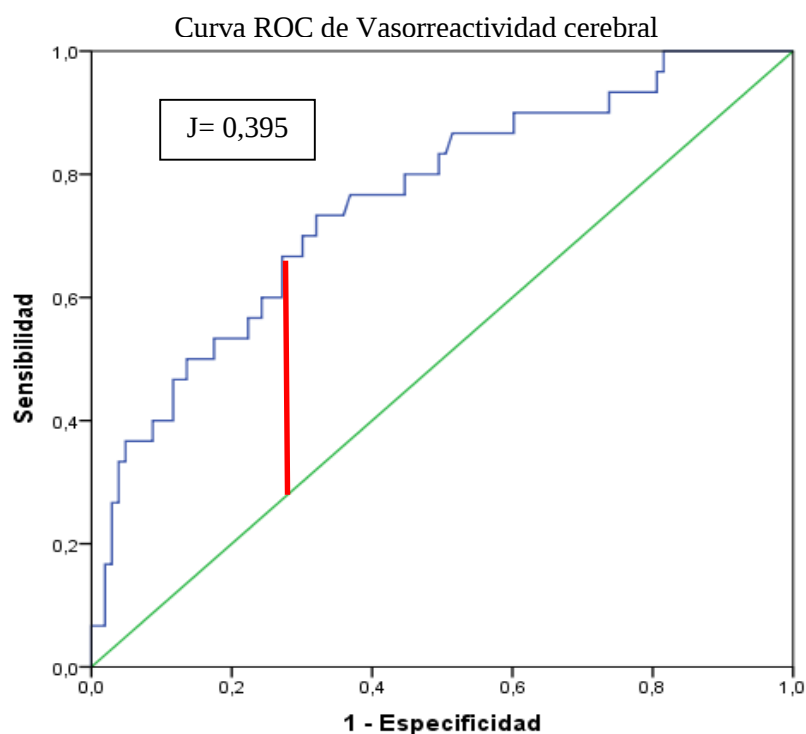
entre EM y ME (diferencia de las medias = -0,566; $p=0,001$), pero en cambio, no existían diferencias significativas entre EM y pacientes con MC (diferencia de las medias = -0,127; $p=0,808$).

En este análisis *post hoc*, se observaron dos subconjuntos homogéneos, según prueba HSD Tukey: un primer subconjunto constituido por los controles y los pacientes con ME, y el segundo grupo compuesto por los pacientes con EM y el grupo de MC.

A diferencia de otras variables ultrasonográficas estudiadas como el GIM o la VDE, ninguno de los factores de confusión como la edad, el IMC, el colesterol total o el tabaquismo se correlacionaron con los valores de BHI. Tampoco se objetivó relación entre los resultados de BHI y la tensión arterial basal en reposo medida en el momento del estudio.

En el análisis de sensibilidad-especificidad, como se observa en la Figura 21, el 75% de los pacientes con EM pudieron ser identificados ($ABC=0,756$; $p=2,0E-5$) con valores de BHI inferiores a 0,810% (índice de Youden $J=0,395$) con una sensibilidad del 66% y una especificidad del 72%.

Figura 21: Curva ROC de vasorreactividad cerebral (BHI).



La barra vertical indica el punto de corte.

Comparación de los resultados con pacientes con AR.

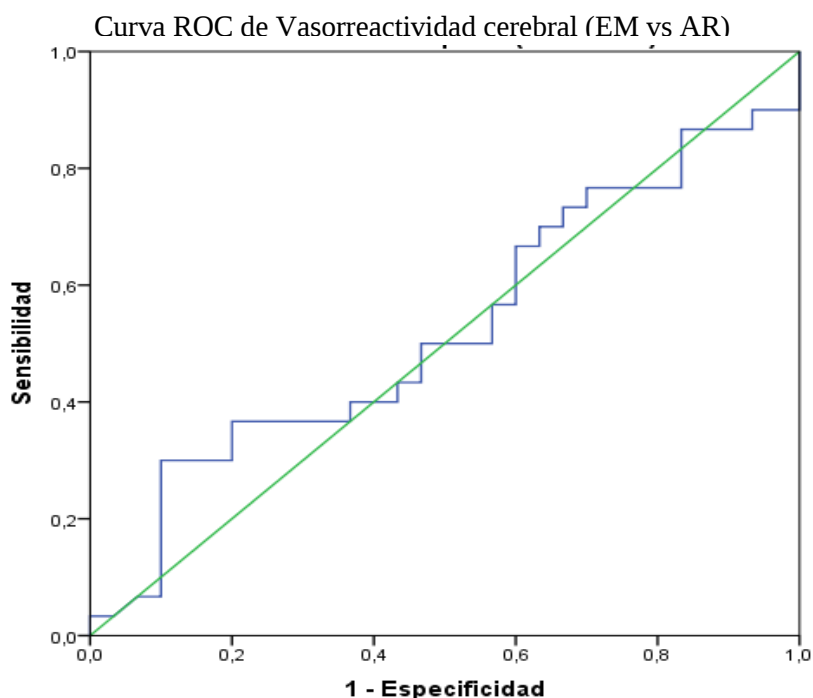
La media de los valores del BHI en la ACM obtenidos en el grupo de pacientes diagnosticados de AR fue de $0,742 \pm 0,39\%$. En la comparación de los AR con el grupo de pacientes diagnosticados de EM, no se objetivaron diferencias significativas entre ambos grupos clínicos ($p=0,971$).

Tabla 23: Valores de BHI en ACM. Comparación entre EM y AR.

Grupo clínico	Media	Desviación estándar	P
Esclerosis múltiple	0,7462	0,479	0,971
Artritis reumatoide	0,7421	0,398	

Por consiguiente, no se podían distinguir entre pacientes con AR y pacientes con EM en función de los valores de VRC medidos mediante BHI a nivel de la ACM, tal y como queda reflejado en la Figura 22.

Figura 22: Curva ROC de BHI: grupos EM y AR.



B.-ESTUDIO DE LA CIRCULACIÓN POSTERIOR: Arteria basilar.

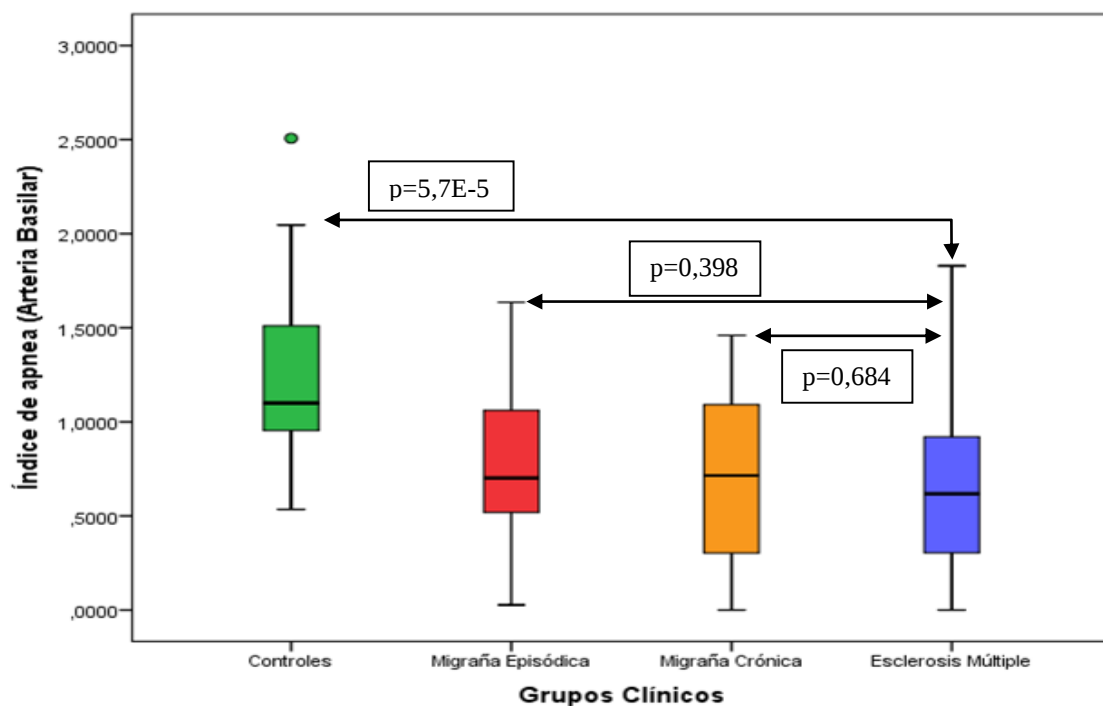
Se realizaron comparaciones entre los grupos control, migraña y EM, ya que este parámetro no fue explorado en los pacientes con AR. En el análisis univariado,

asumiendo igualdad de varianzas ($F=1,125$; $p=0,351$), se encontraron diferencias en las medias del BHI entre los distintos grupos de estudio ($F=7,82$; $p=9,2E-5$).

Según el modelo no ajustado, los pacientes con EM presentaron un porcentaje de BHI menor (media de BHI = $0,664 \pm 0,45\%$) que en caso de los controles sanos (media de BHI = $1,202 \pm 0,46\%$). Las diferencias entre ambos grupos fueron altamente significativas ($p=5,7E-5$). Por el contrario, no se objetivaron diferencias significativas entre los pacientes migrañosos y el grupo de EM.

En los grupos de pacientes con migraña se obtuvieron resultados diferentes. Así los pacientes con ME mostraron una variación del BHI de $0,774 \pm 0,47\%$, mientras que en el grupo de MC la media de variación del BHI fue menor (media de BHI = $0,719 \pm 0,47\%$).

Figura 23: Resultados de la vasorreactividad mediante BHI en la arteria basilar.



En el análisis *post hoc*, los pacientes diagnosticados de migraña, mostraron valores de BHI ligeramente reducidos, tanto entre los pacientes con ME (media de BHI = $0,774 \pm 0,47\%$) frente a los controles (diferencia de las medias = $-0,428$; $p=0,005$), como entre MC (media de BHI = $0,719 \pm 0,47\%$) comparados con los controles (diferencia de las medias = $-0,483$; $p=0,002$). Por el contrario, estas diferencias no fueron significativas entre ME y MC.

Tabla 24: Valores predictores de VRC en la arteria basilar. Modelo no ajustado.

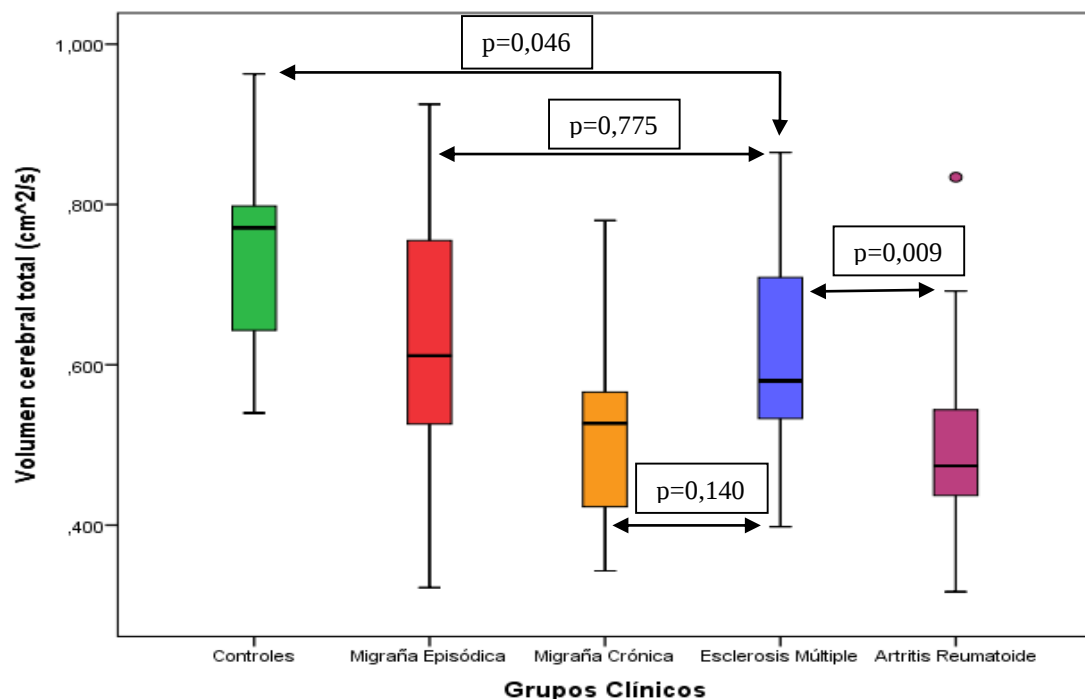
	$\beta \pm EE$	p
Control - EM	0,538 $\pm$ 0,128	5,7E-5
ME - EM	0,110 $\pm$ 0,129	0,398
MC - EM	0,055 $\pm$ 0,134	0,684

5.3.4. Determinación del flujo sanguíneo cerebral.

El flujo cerebral se calculó como la suma del volumen de flujo en ambas arterias carótidas y las arterias vertebrales. Debido a las dificultades técnicas asociadas a la correcta identificación del flujo en las 4 arterias, y sobre todo a nivel de la circulación vertebral, el número de participantes en los que se pudo calcular el flujo total fue 101.

La distribución por grupos fue la siguiente: 20 sujetos del grupo control, 10 pacientes con ME, 14 con MC, y 20 pacientes con EM. La determinación se realizó también en 37 pacientes con AR. En el primer paso del análisis, con los grupos control, migraña y EM y asumiendo varianzas desiguales entre grupos, se objetivaron diferencias en el flujo total significativamente diferentes en función del diagnóstico clínico ($F=5,720$; $p=0,002$; potencia observada = 0,930). En la Figura 24 se muestra la mediana de valores y los percentiles obtenidos en los diferentes grupos clínicos.

Figura 24: Diagramas de cajas de los valores de CBF en los grupos clínicos.



Las diferencias de flujo total fueron discretas entre controles y pacientes con EM ($p=0,046$). En comparación con el resto de grupos, sólo se objetivaron diferencias significativas entre los controles y el grupo de MC ($p=0,007$).

En el análisis del flujo entre los pacientes con EM y el grupo de AR, los pacientes con AR presentaban un CBF menor que los pacientes con EM (diferencia de las medias = $0,113 \pm 0,04$ ml/min; $p=0,009$).

Tabla 25: Valores de CBF total. Comparación entre EM y AR.

Grupo clínico	Media (ml/min)	Desviación estándar	P
Esclerosis múltiple	0,610	0,147	0,009
Artritis reumatoide	0,497	0,100	

5.3.5. Estudio del parénquima cerebral: Medición del III ventrículo.

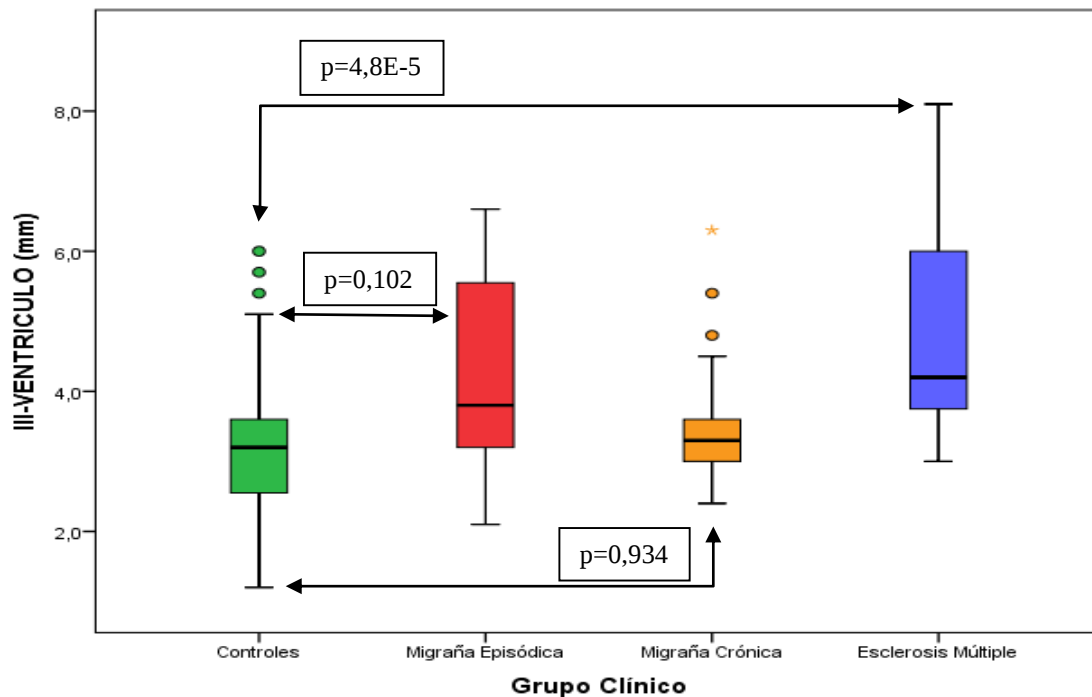
Para el estudio de neurodegeneración y valoración de la atrofia cerebral asociada al proceso inflamatorio específico, se llevó a cabo la medición del diámetro del III ventrículo mediante ultrasonografía, debido a que se acepta que el tamaño del III ventrículo se correlaciona de forma directa con el grado de atrofia cerebral, y es un buen marcador de la misma (173).

En total, el III ventrículo pudo identificarse a través de la ventana temporal en las condiciones adecuadas para una correcta medición en 135 participantes. Por grupos clínicos, el estudio se completó en 27 controles, 48 pacientes con migraña (23 ME y 25 MC) y en 24 pacientes con EM. La determinación del diámetro ventricular, se realizó también en 36 sujetos con diagnóstico de AR.

El primer paso del análisis incluyó el grupo control, ambos grupos de migraña y los pacientes con EM. Asumiendo varianzas desiguales, el tamaño del III ventrículo resultó diferente respecto al diagnóstico clínico ($F=7,389$; $p=1,67E-4$; potencia observada = 0,982).

En el modelo de regresión lineal no ajustado, los pacientes con EM presentaron un III ventrículo mayor (media del III ventrículo = $4,858 \pm 1,62$ mm) que los controles sanos (media III ventrículo = $3,348 \pm 1,14$ mm), lo cual se correlaciona con la existencia de un mayor grado de atrofia cerebral (diferencia de las medias = $1,510 \pm 0,35$ mm; $p=4,8E-5$) significativo en los pacientes con EM.

Figura 25: Resultados del diámetro del III ventrículo en los grupos de estudio.



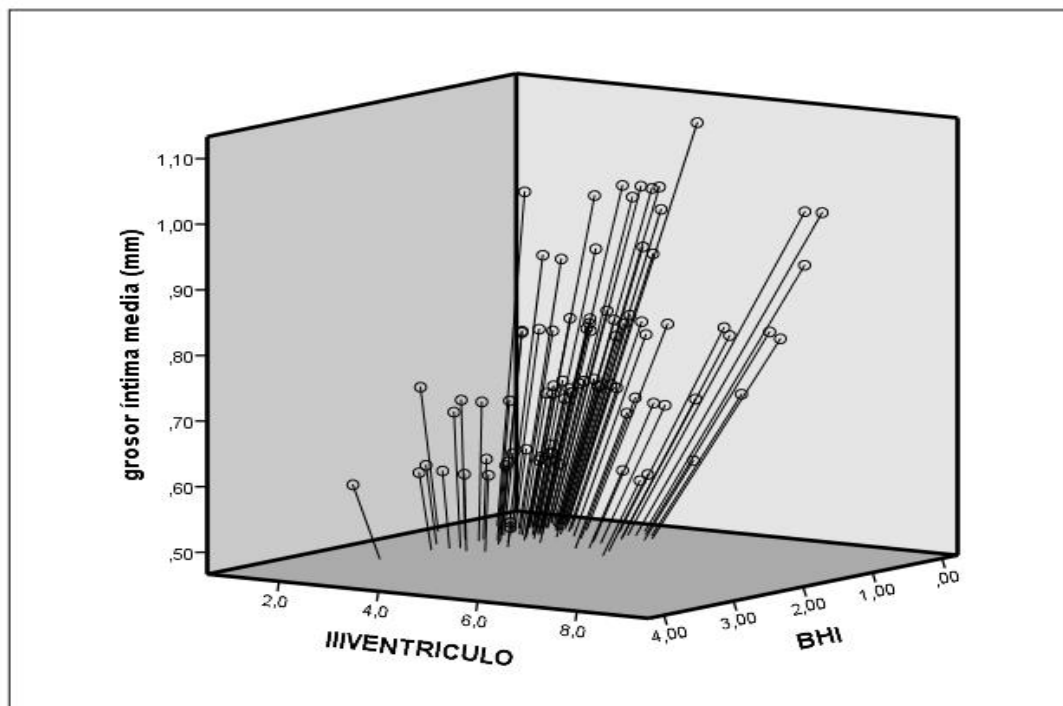
En el análisis *post hoc*, en los pacientes con EM se objetivó que tenían un diámetro del III ventrículo mayor que los controles (diferencia de las medias = $1,510 \pm 0,40$ mm; $p=0,030$). Entre los grupos de migraña, ni los pacientes con ME (diferencia de las medias = $0,826 \pm 0,35$ mm; $p=0,102$), ni los pacientes con MC (diferencia de las medias = $0,168 \pm 0,28$ mm; $p=0,934$), mostraron diferencias significativas con los controles. En el análisis de subconjuntos homogéneos, según la prueba HSD de Tukey, se distinguieron únicamente dos subconjuntos, uno con los pacientes con EM y el segundo con los controles y ambos grupos de migrañosos.

El valor de diámetro de III ventrículo, que discrimina el diagnóstico de EM frente a los controles y a ambos grupos de migraña, se corresponde con una combinación de una sensibilidad del 91,7% y una especificidad del 58,7% (índice de Youden $J=0,503$), que se obtiene con un diámetro mayor de 3,55 mm. El 77% ($ABC=0,769$, $p=7,6E-5$) de los pacientes con EM, pueden identificarse a partir de un diámetro ventricular de 3,55 mm con respecto a los controles y los pacientes de ambos grupos de migraña. Únicamente en dos casos de pacientes con EM se encontró un diámetro menor de 3,55 mm, ambos con valores de EDSS menor de 2,5 puntos.

No se observó correlación del tamaño del III ventrículo con la edad ($r=0,132$; $p=0,192$), ni con el grado de discapacidad medido por la escala EDSS ($r=0,700$; $p=0,755$). En el subanálisis del tamaño del III ventrículo por puntuaciones EDSS, se encontró la existencia de atrofia cerebral desde las fases iniciales de la enfermedad, estando ya presente desde el diagnóstico de la EM.

Por el contrario, sí que se objetivó la existencia de una correlación directa entre el tamaño del III ventrículo y los otros parámetros de ultrasonografía estudiados. Como se observa en la Figura 26, existía una correlación inversa con la VDE ($r=-0,379$; $p=2,2E-4$); y también con los resultados de la vasorreactividad cerebral en la ACM medidos por BHI ($r=-0,304$; $p=0,040$). Existía, en cambio, una correlación directa entre el diámetro ventricular y los resultados del GIM carotídeo ($r=0,403$; $p=4,7E-5$).

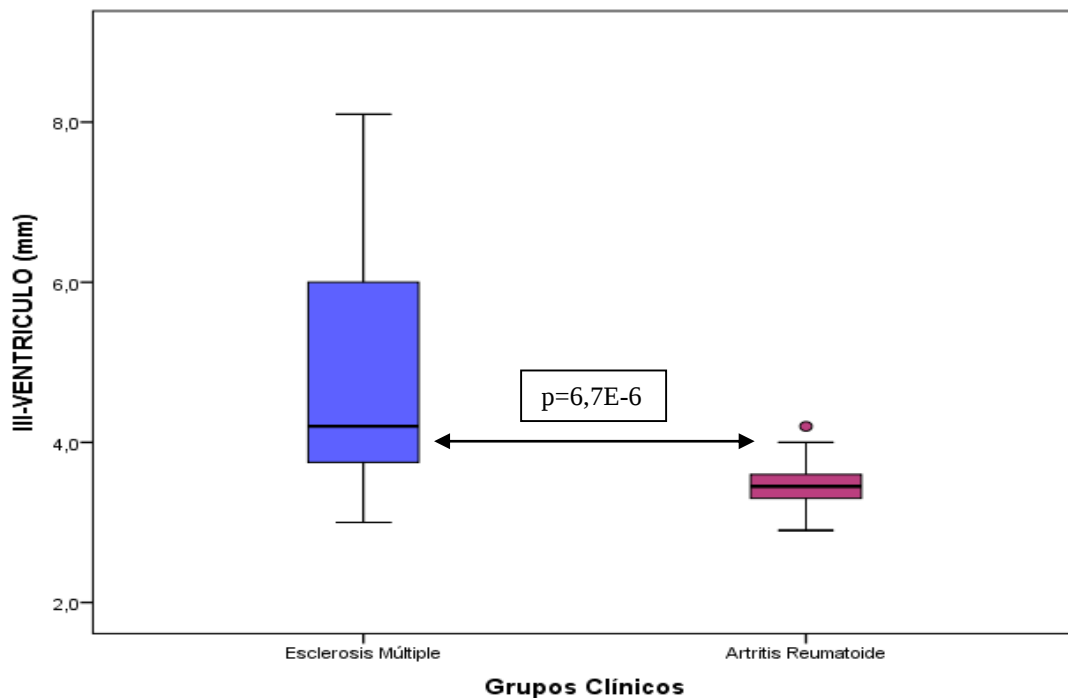
Figura 26: Correlaciones entre GIM, VRC y diámetro ventricular.



Comparaciones de los resultados con pacientes con AR.

Las medias de diámetro del III ventrículo fueron diferentes entre los grupos EM y AR ($F=24,479$; $p=6,7E-6$, potencia observada = 0,998). Los pacientes con AR presentaron un diámetro medio de $3,492 \pm 0,28$ mm (Figura 27).

Figura 27: Valores del diámetro del III ventrículo. Comparación entre EM y AR.

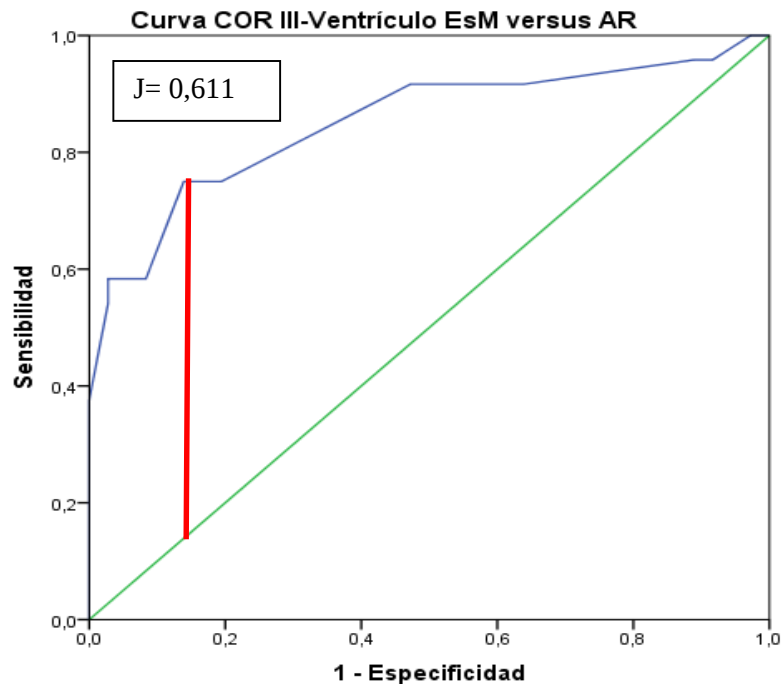


En el análisis se objetivó que los pacientes con EM presentaban una media del diámetro del III ventrículo mayor que los pacientes del grupo de AR (diferencia de las medias = 1,36 mm; $p=6,7E-6$).

El valor del diámetro del III ventrículo, que según la tabla de coordenadas mejor discriminaba el diagnóstico de EM frente a AR, se correspondió con la combinación de una sensibilidad del 75% y una especificidad del 86% (índice de Youden $J=0,611$).

Dicha combinación de sensibilidad-especificidad se obtuvo con un diámetro del ventrículo por encima de 3,80 mm. En consecuencia, el 85% ($ABC = 0,851$ $p = 5,0E-6$) de los pacientes con EM pueden identificarse a partir de este valor de diámetro ventricular (Figura 28).

En el análisis bivariado, el diámetro del III ventrículo, y por tanto la atrofia cerebral medida mediante ecografía, mostró una correlación directa con el tiempo transcurrido desde el diagnóstico de la enfermedad ($r = 0,299$; $p=0,039$). De esta forma, los pacientes en los que la enfermedad había sido diagnosticada antes, presentaban un mayor grado de atrofia cerebral que los de reciente diagnóstico.

Figura 28: Curva ROC del III ventrículo. Comparación entre EM y AR.

La barra vertical representa el punto de corte entre AR y EM.

Además, en el estudio de los marcadores bioquímicos de inflamación, la VSG se correlacionó con el diámetro del III ventrículo en los pacientes con EM ($r=0,465$, $p=2,6E-6$). Del resto de parámetros bioquímicos, la homocisteína plasmática mostró una correlación positiva con el grado de atrofia ($r=0,221$; $p=0,034$) y, en el mismo sentido, los niveles séricos de ácido fólico ($r=0,251$; $p=0,034$).

5.4. COMPARACIÓN ENTRE DATOS ANALÍTICOS.

5.4.1. Correlación entre tensión arterial y variables ultrasonográficas.

El análisis de correlaciones bivariadas mostró que las cifras de tensión arterial sistólica (TAS) se correlacionaron con el GIM ($r=0,200$; $p=0,048$) y, de forma inversa, con la VDE ($r=-0,285$; $p=0,006$). Por consiguiente, inicialmente se incluyó la TAS en los modelos de VDE y GIM. No obstante, la inclusión de la TAS no modificó significativamente el índice de determinación de los modelos de regresión lineal previamente descritos.

En cambio, no existía correlación entre las cifras de TAS y la VRC medida por el BHI ($r=-0,095$, $p=0,398$).

RESULTADOS

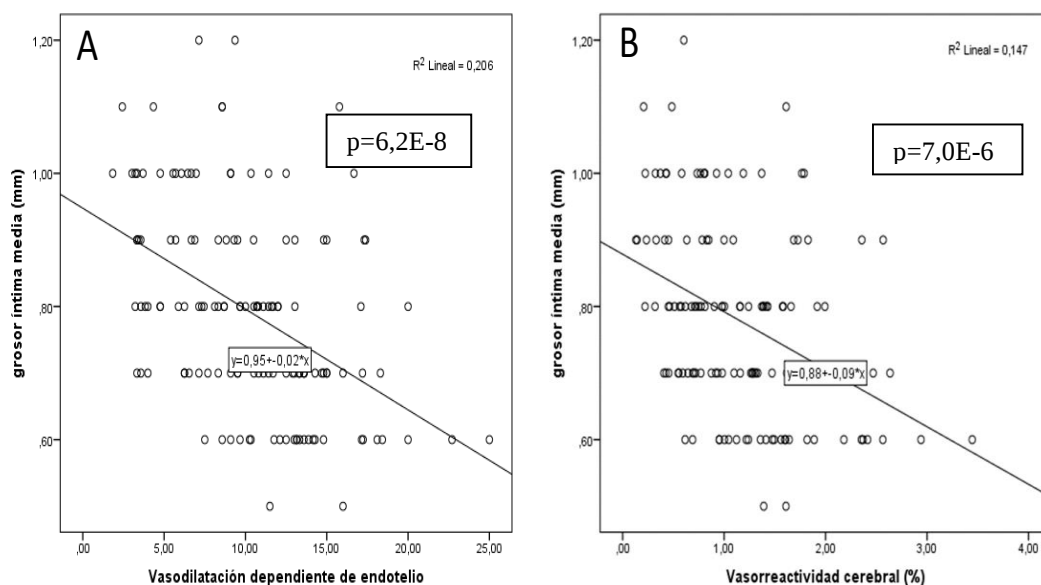
Por otro lado, las cifras de tensión arterial diastólica (TAD) no se correlacionaron con ninguna de las variables estudiadas: GIM ($r=0,115$; $p=0,259$), VDE ($r=-0,158$; $p=0,134$), y BHI ($r=0,039$; $p=0,709$).

5.4.2. Correlación de las características clínicas con las variables estudiadas.

Como era de esperar, y se ha señalado previamente, la edad en el momento del estudio se correlacionó con el resultado del GIM ($r=0,388$; $p=1,1E-9$). Sin embargo, no se encontraron correlaciones significativas con otros parámetros valorados en el estudio ecográfico como la VDE ($p=0,476$), el BHI ($p=0,890$), el diámetro del III ventrículo ($p=0,192$), o el CBF ($p=0,369$). Otros parámetros clínicos, como la duración de la enfermedad en años, se correlacionaron con el grado de atrofia cerebral ($r=0,299$; $p=0,039$), pero no mostraron relación con el resto de las variables ecográficas estudiadas.

En el análisis por separado de las variables ecográficas, se objetivó que el GIM presentó una fuerte correlación negativa con la disfunción endotelial en la arteria braquial medida como el porcentaje de variación de la VDE ($r=-0,454$; $p=2,4E-8$; Figura 29A). El GIM también se asoció de manera inversa con los valores de VRC medidos tanto a nivel de la ACM ($r=-0,384$; $p=7,0E-6$; Figura 29B), como en la arteria basilar ($r=-0,283$; $p=0,03$).

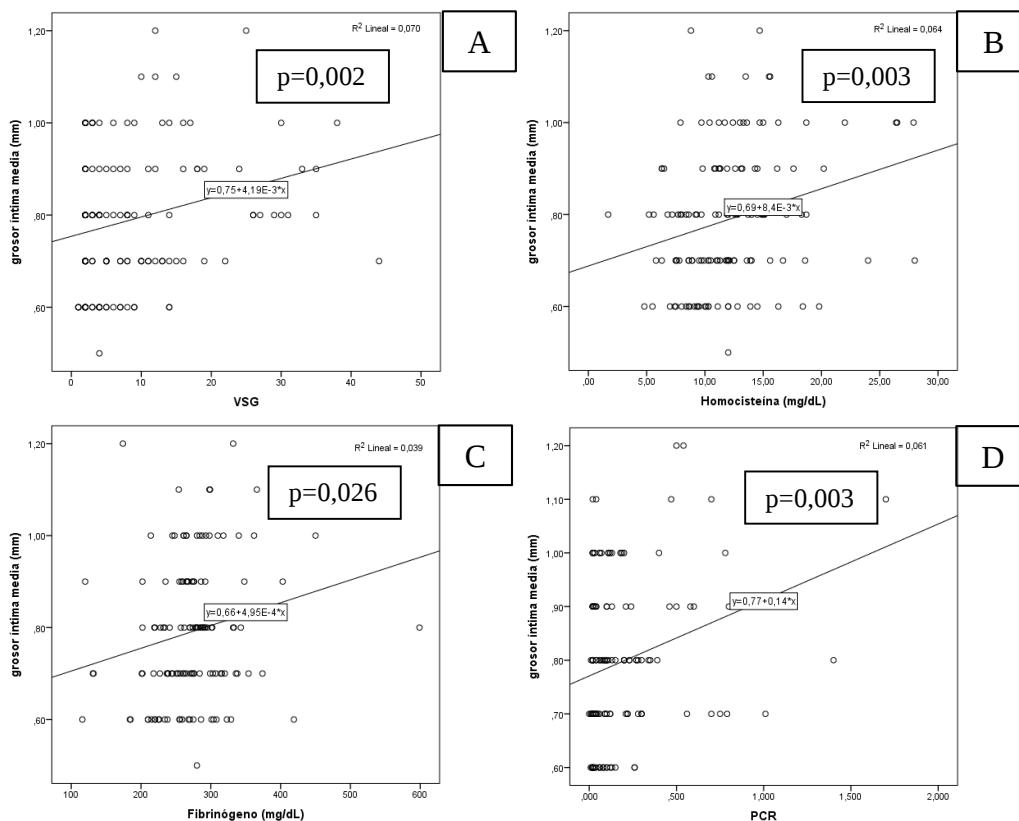
Figura 29: Correlación del GIM con la VDE (A) y la VRC (B).



Del mismo modo, el incremento del GIM se correlacionó con el aumento el tamaño del III ventrículo ($r=0,403$; $p=4,7E-5$). Entre las variables clínicas además de la edad y el IMC, el GIM se correlacionó con el colesterol total y la TAS en el momento del estudio. En cambio, no se observó correlación del GIM con la TAD, el sexo, el consumo de alcohol o tabaco, la frecuencia de los brotes, ni con la forma de debut de la enfermedad.

El incremento del GIM se asoció también con la concentración de las principales moléculas proinflamatorias implicadas en la disfunción endotelial. De esta forma, el incremento del GIM mostró una fuerte correlación positiva con la VSG ($r=0,264$; $p=0,002$; Figura 30A), la PCR ultrasensible ($r=0,247$; $p=0,003$; Figura 30B), el fibrinógeno ($r=0,197$; $p=0,026$ Figura 30C) y la homocisteína ($r=0,252$; $p=0,003$; Figura 30D).

Figura 30: Correlación del GIM con VSG (A), PCR (B), fibrinógeno (D) y homocisteína (D).

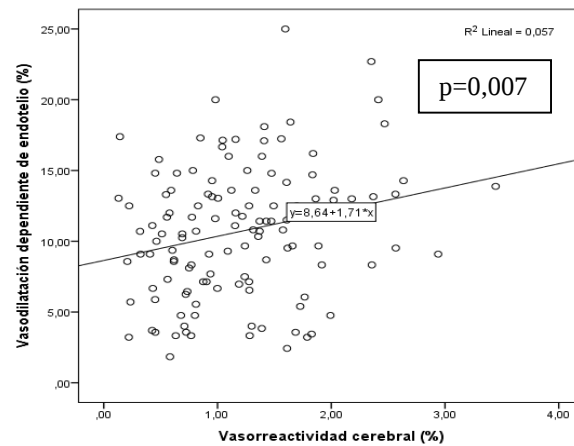


La segunda variable fue la VDE. Entre las variables clínicas analizadas, únicamente se demostró una ligera correlación negativa con el tabaquismo ($r=-0,147$; $p=0,046$), además de con la TAS, ya mencionada. Otros parámetros clínicos como el

RESULTADOS

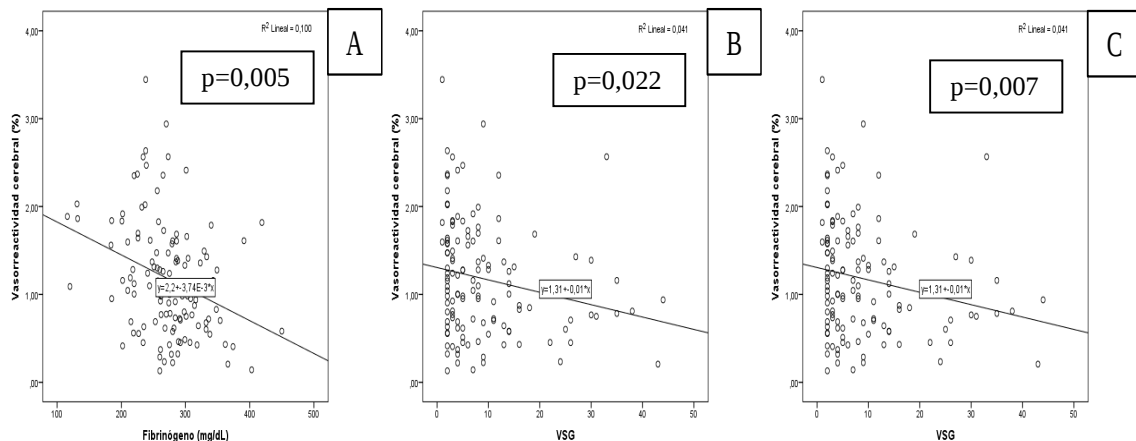
sexo, el peso, el IMC, o la duración de la enfermedad, no mostraron correlaciones significativas con la VDE. Entre las variables ecográficas estudiadas, se objetivó que los pacientes con mayor disfunción endotelial sistémica presentaban mayor atrofia cerebral, al demostrarse una correlación negativa entre el porcentaje de variación de la VDE y el tamaño del III ventrículo ($r=-0,379$; $p=2,1E-4$). Existía en cambio, una correlación positiva con los cambios en la VRC a nivel de la ACM ($r=0,239$; $p=0,007$), aunque no en el caso de la circulación posterior ($p=0,240$). Tampoco se objetivó correlación entre la VDE y el flujo sanguíneo cerebral.

Figura 31: Correlación entre la VDE y la vasorreactividad cerebral.



En el caso de la VDE, se ha objetivado la existencia de una correlación negativa con las principales moléculas inflamatorias estudiadas. Así, se observó una correlación negativa entre los valores de la VDE y la VSG ($r=-0,244$; $p=0,005$; Figura 32A), homocisteína ($r=-0,201$; $p=0,022$; Figura 32B), fibrinógeno ($r=-0,244$; $p=0,007$; Figura 32C), y con la apoproteína B ($r=-0,239$; $p=0,01$).

Figura 32: Correlaciones de VDE con VSG (A), homocisteína (B) y fibrinógeno (C).



La VRC en la circulación anterior en la ACM se correlacionó con los resultados de la circulación posterior en la arteria basilar ($r=0,429$; $p=1,1E-5$). El BHI, además, mostró una correlación negativa con el diámetro del III ventrículo, de esta forma, cuánto más alterada se encontraba la vasorreactividad cerebral, mayor era el diámetro ventricular ($r=-0,304$; $p=0,004$). Los pacientes con menor variación en la vasorreactividad cerebral, también mostraron un menor CBF ($r=0,249$; $p=0,092$), aunque no alcanzó significación estadística.

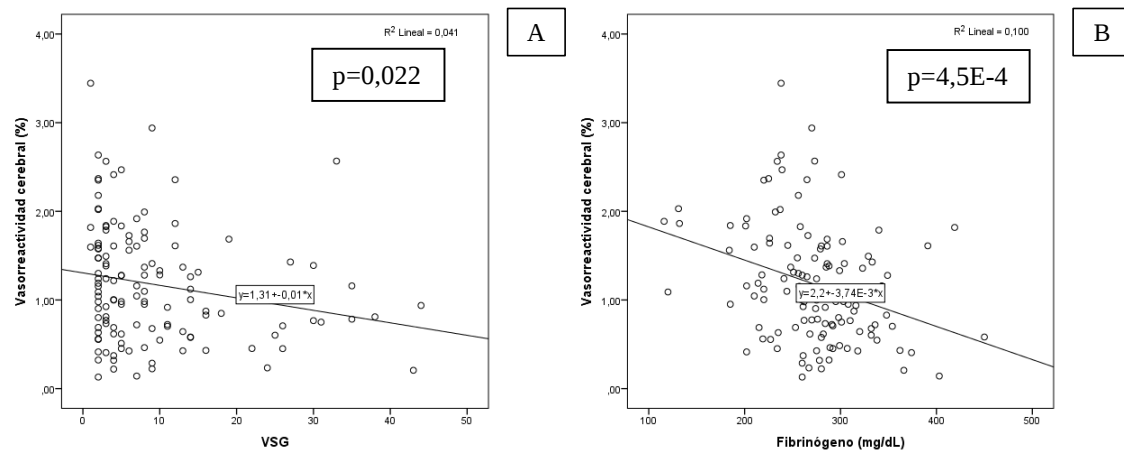
La Tabla 26 resume las principales correlaciones encontradas entre las variables clínicas y ecográficas.

Tabla 26: Correlaciones bivariadas de las principales variables estudiadas.

		GIM	VDE	BHI	Edad	Tabaco
GIM	Correlación Pearson	1	-0,454	-0,384	-0,388	0,04
	p*		2,4E-8	7,0E-6	1,1E-6	0,562
VDE	Correlación Pearson	-0,454	1	0,239	-0,061	-0,163
	p*	2,4E-8		0,007	0,476	0,055
BHI	Correlación Pearson	-0,384	0,239	1	0,012	-0,104
	p*	7,0E-6	0,007		0,890	0,233
Edad	Correlación Pearson	0,388	-0,061	0,012	1	-0,056
	p*	1,1E-6	0,476	0,890		0,492
Tabaco	Correlación Pearson	0,048	-0,163	-0,104	-0,56	1
	p*	0,562	0,055	0,233	0,492	
*Todos los valores de p están calculados para dos colas.						

A nivel bioquímico, al igual que en el caso de la VDE, la VRC mostró una correlación negativa significativa con los parámetros inflamatorios estudiados. EL BHI se correlacionó de forma negativa con la VSG ($r=-0,204$; $p=0,022$; Figura 33A), la PCR ultrasensible ($r=-0,227$; $p=0,010$), y con el fibrinógeno ($r=-0,317$; $p=4,5E-4$; Figura 33B). En cambio, existió una correlación positiva del BHI con la concentración de ácido úrico ($r=0,184$; $p=0,040$).

Figura 33: Correlación de la VRC con la VSG (A) y el fibrinógeno (B).



5.4.3. Correlación de los tratamientos con las variables estudiadas.

Se analizó la relación entre los resultados ultrasonográficos y los tratamientos modificadores de la enfermedad. Ninguno de los sujetos había recibido tratamiento esteroideo en las semanas previas al estudio, y se habían eliminado todas aquellas sustancias vasoactivas, por lo que los fármacos modificadores de la enfermedad eran los únicos que podían influir en los resultados.

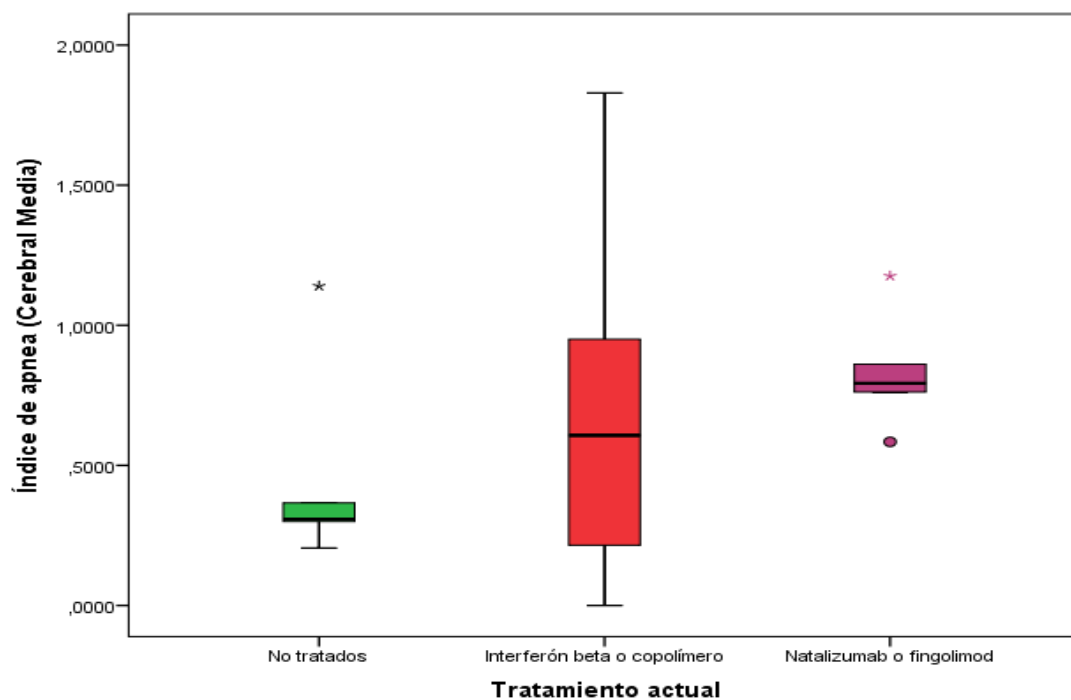
A tal fin los pacientes con EM se reagruparon en 3 subgrupos en función de los tratamientos recibidos: un grupo con los pacientes que no recibían tratamiento en el momento del estudio (11 pacientes, 28,21%), un segundo grupo con aquellos que recibían fármacos de primera línea (22 pacientes, 56,41%), y el último con aquellos que se encontraban en tratamiento con fármacos considerados de segunda línea de acuerdo con las guías de tratamiento en el momento del estudio (6 pacientes, 15,38%). Todos los pacientes en segunda línea llevaban como mínimo un periodo de 6 meses con el tratamiento actual (Tabla 27).

Tabla 27: Comparación de las variables estudiadas y los tratamientos. Test de Kruskal Wallis.

	Sin tratamiento		Tratamiento 1ª línea		Tratamiento 2ª línea		KW p
	Mediana	Rango	Mediana	Rango	Mediana	Rango	
GIM (mm)	0,950	0,400	0,900	0,580	1,000	0,200	Ns
VDE (%)	10,09	1,1,68	6,250	10,61	6,340	16,78	Ns
BHI	0,393	1,010	0,745	1,700	0,890	1,360	0,081

El análisis no paramétrico de los subgrupos no objetivó diferencias significativas entre los diferentes tratamientos ni con el GIM carotídeo, ni la VRC, ni con la VDE. No obstante, sí que pudo observarse una tendencia asociativa, en el caso de la VRC medida por el BHI ($p=0,081$). De tal forma que el BHI en los pacientes que se encontraban en tratamiento, experimentaba un mayor porcentaje de variación que aquellos que no recibían ningún tratamiento, y esta variación fue mayor en los tratados con fingolimod o natalizumab, que con fármacos considerados de primera línea (Figura 34).

Figura 34: Valores de VRC en función del tratamiento en pacientes con EM.



Dado el tamaño reducido de la muestra no se extendió el análisis al estudio de la acción de cada tratamiento sobre las variables ecográficas.

5.4.4. Correlación de la discapacidad (EDSS) y la fatiga con las variables estudiadas.

En un análisis posterior se investigó la posible relación entre los resultados ultrasonográficos hallados y las puntuaciones en las escalas de discapacidad (EDSS) y de fatiga (FSS).

En primer lugar, con la finalidad de identificar la influencia de los distintos tratamientos se estudió la relación entre la puntuación EDSS y el tratamiento

RESULTADOS

modificador de la enfermedad, de acuerdo con los tres subgrupos de EM previamente descritos. En este análisis, no se encontraron diferencias en las medianas entre las líneas de tratamiento y el grado de discapacidad.

La puntuación EDSS se correlacionó de forma directa con el incremento del GIM ($r=0,497$; $p=0,020$). De esta forma, los pacientes con EM que presentaban mayor discapacidad objetivada a la exploración física, presentaban mayor aterosclerosis subclínica a nivel carotídeo. Por otra parte, la puntuación EDSS se correlacionó de forma inversa con el flujo sanguíneo cerebral ($r=-0,717$; $p=0,045$).

Existía también relación entre la puntuación en la escala de discapacidad EDSS con marcadores bioquímicos de inflamación como la VSG ($r=0,350$; $p=0,039$). Por el contrario, no existía correlación entre la EDSS y la edad ($p=0,455$), ni con el tiempo transcurrido desde el diagnóstico de EM ($p=0,113$).

Tabla 28: Principales correlaciones de la discapacidad en el análisis multivariable.

Variable	Correlación de Pearson	Significación
GIM	0,497	0,02
CBF	-0,717	0,045
VSG	0,350	0,039
Edad	0,127	0,455
Tiempo diagnóstico	0,306	0,113

La fatiga, a pesar de ser un síntoma inespecífico, presenta una elevada frecuencia en pacientes con EM. El grupo de pacientes de EM presentaba un grado de fatiga mayor que los controles medido por la escala FSS. La puntuación media entre los pacientes de EM fue de $38,27 \pm 3,16$ puntos, mientras que en el grupo control fue de $23,00 \pm 1,99$ puntos ($p=0,001$).

Se observó una correlación positiva entre la puntuación en la escala FSS y el GIM carotídeo ($r=0,338$; $p=0,010$), indicando la existencia de mayor clínica de fatiga cuanto mayor fue la aterosclerosis subclínica de los pacientes. Contrariamente, la puntuación FSS se correlacionó de forma inversa con la VDE ($r=-0,211$; $p=0,040$), mostrando mayor disfunción endotelial en los pacientes con más fatiga. Por último, existía una clara correlación negativa con la vasorreactividad cerebral medida en la arteria basilar ($r=-0,373$; $p=0,010$), pero esta correlación alcanzó sólo cierta tendencia a la significación en la circulación anterior ($r=-0,198$; $p=0,073$).

En lo referente a las variables clínicas, el grado de fatiga, demostró una correlación positiva con la duración de la enfermedad ($r=0,492$; $p=0,001$), y mostró una tendencia a la significación con el tiempo transcurrido desde el último tratamiento esteroideo ($r=0,454$; $p=0,051$). En cambio, no existió correlación entre la gravedad de la fatiga y otras variables clínicas como la edad ($p=0,538$), el IMC ($p=0,735$), o el hábito tabáquico ($p=0,406$).

Se investigó a continuación la posible correlación entre los parámetros bioquímicos y la puntuación FSS. En las variables bioquímicas estudiadas, la magnitud de la fatiga se correlacionó con algunos de los marcadores de inflamación. De esta forma la puntuación total en la escala FSS mostró una correlación directa con la VSG ($r=0,262$; $p=0,012$), y con los niveles séricos de homocisteína ($r=0,271$; $p=0,010$). Además, los pacientes con mayor fatiga mostraron niveles más altos de colesterol-LDL en sangre periférica ($r=0,264$; $p=0,010$), mientras existió una tendencia a la correlación positiva con otros marcadores de inflamación como el fibrinógeno ($p=0,054$).

Tabla 29: Principales correlaciones de la fatiga (FSS) en el análisis multivariable.

Variable	Correlación de Pearson	Significación
GIM (mm)	0,338	0,001
VDE (%)	-0,211	0,04
BHI basilar (%)	-0,373	0,01
BHI ACM (%)	-0,198	0,073
VSG (mm/h)	0,262	0,012
Homocisteína (mg/ml)	0,271	0,01
Edad (a)	0,063	0,538
Tiempo diagnóstico (a)	0,492	0,001

Es reseñable que no se observó correlación entre el grado de discapacidad y la fatiga en la población de EM de nuestro estudio ($r=0,259$; $p=0,211$).

5.5. ESTUDIO MOLECULAR.

5.5.1. Células endoteliales progenitoras circulantes (EPC).

Para el análisis de las EPC, se utilizaron dos técnicas de estudio, el cultivo de las CFU y la cuantificación de las células marcadas mediante citometría de flujo. En ambos casos, las muestras fueron recogidas en el momento del estudio y procesadas en los 20 minutos siguientes.

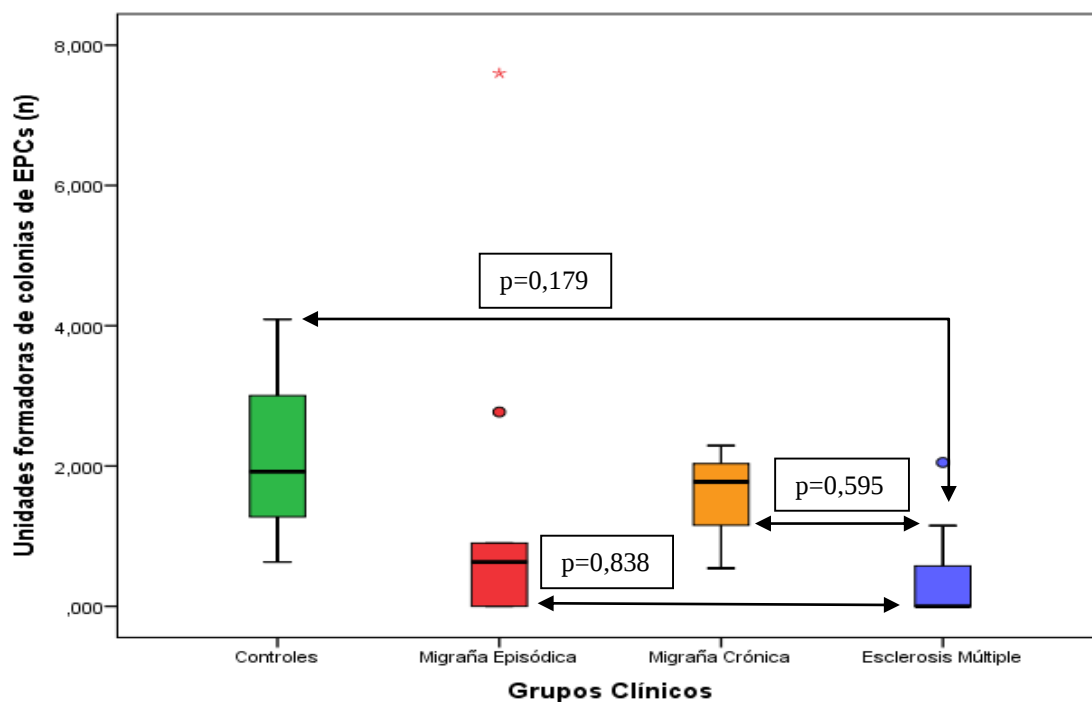
RESULTADOS

En el análisis de la presencia y el número de CFU, se incluyeron un total de 32 participantes, distribuidos entre los grupos de estudio de la siguiente forma: 8 pacientes con EM, 5 controles sanos y 14 pacientes migrañosos, 9 de ellos diagnosticados de ME y 5 de MC.

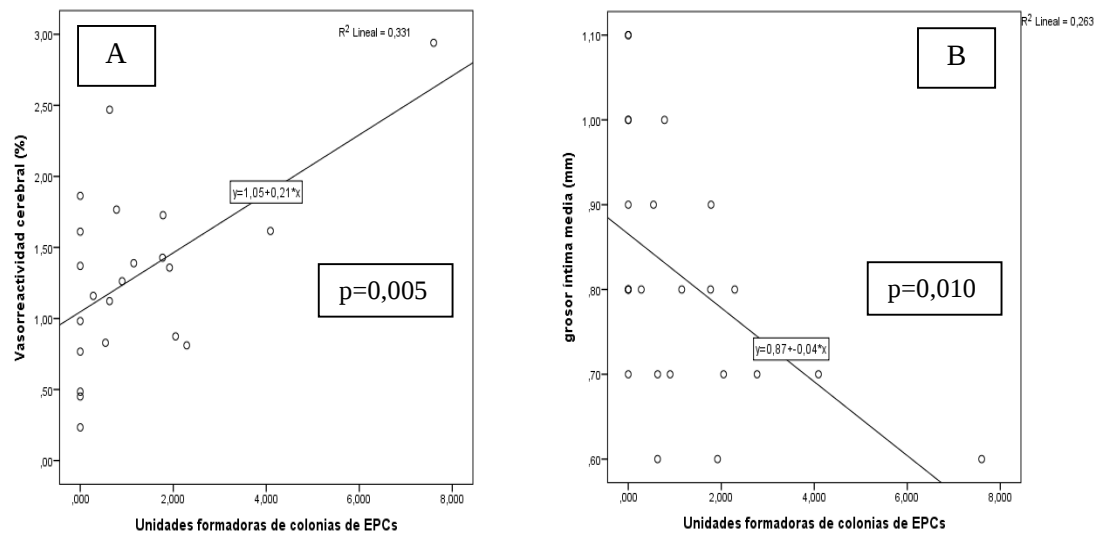
El número de CFUs fue menor en el grupo de pacientes diagnosticados de EM que en los controles, aunque no se alcanzaron diferencias estadísticamente significativas entre ambos grupos ($p=0,179$).

Como puede observarse en la Figura 35, el número de CFU también fue relativamente menor, aunque sin alcanzar diferencias significativas entre los pacientes migrañosos, especialmente en el caso de la ME.

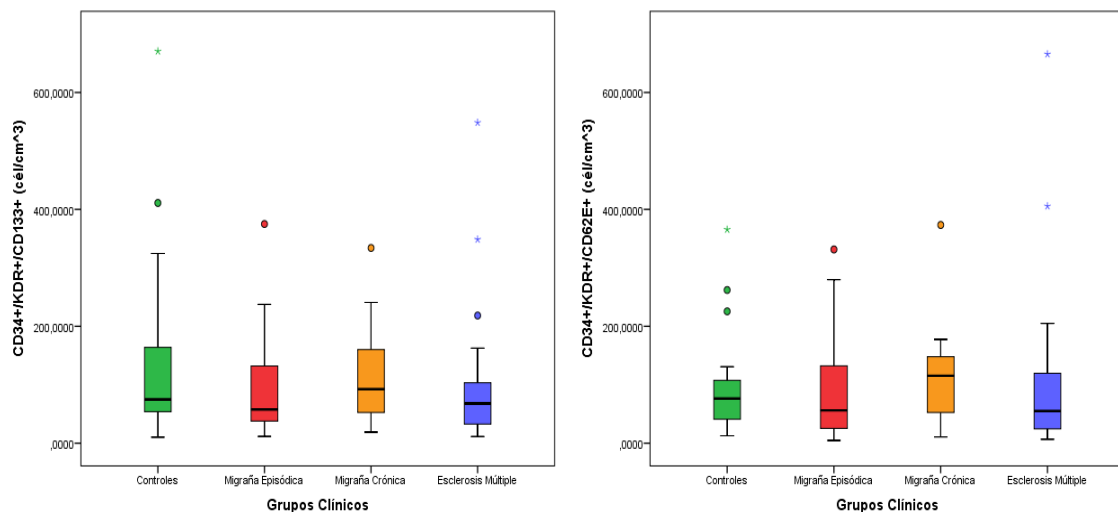
Figura 35: Valores de CFU en los distintos grupos de estudio.



El número de CFUs presentó una correlación inversa con la edad ($r=-0,473$; $p=0,020$). Se ha demostrado también una correlación entre el número de CFU y algunas de las variables ecográficas estudiadas. De esta forma, las CFUs mostraron una correlación positiva con la VRC medida con el BHI ($r=0,576$; $p=0,005$; Figura 36A). En cambio, el número de CFUs se correlacionó de una forma inversa con el incremento del GIM ($r=-0,512$; $p=0,010$; Figura 36B) a nivel carotídeo, y también con el diámetro del III ventrículo ($r=-0,756$; $p=0,011$).

Figura 36: Correlación de CFU con variables ecográficas: VRC (A) y GIM (B).

El análisis por citometría de flujo, debido a las limitaciones existentes para el uso del citómetro, solamente se llevó a cabo en un total de 57 participantes, distribuidos entre los grupos clínicos de estudio de la siguiente forma: 14 controles, 23 pacientes con migraña (16 ME y 7 MC) y 20 pacientes con el diagnóstico de EM. Ni la tasa de células CD34+/KDR+/CD62E+ ni la de CD34+/CD133+/KDR+ mostró diferencias entre controles, migrañosos y pacientes con EM. Del mismo modo, no observamos correlación, ni con el tiempo de evolución de la enfermedad, ni con la edad, ni con ninguno de los parámetros ecográficos (Figura 37).

Figura 37: Valores de la citometría en los diferentes grupos clínicos.

5.5.2. Marcadores moleculares de inflamación y disfunción endotelial.

Se estudiaron las concentraciones de FvW y de ON en los grupos clínicos de acuerdo con el protocolo del estudio previamente descrito.

La determinación del FvW, mediante test de ELISA, se realizó en un total de 139 participantes. La distribución por grupos clínicos incluyó 35 pacientes con EM, 35 controles sanos y 69 pacientes con migraña (34 ME y 35 MC). En el análisis univariado, asumiendo igualdad de las varianzas, el diagnóstico clínico predijo significativamente el valor del FvW ($F=4,199$; $p=0,007$; potencia observada = 0,848). Los valores obtenidos fueron significativamente mayores en el grupo de EM que en el resto de grupos clínicos. En el análisis *post hoc*, las diferencias fueron significativas entre EM y controles ($p=0,006$), entre EM y ME ($p=0,002$), y también entre EM y MC ($p=0,010$).

Se observaron, por tanto, dos subconjuntos homogéneos, según prueba HSD de Tukey: un primer subconjunto constituido por los controles y los pacientes con migraña, y el segundo compuesto por los pacientes con EM.

En el siguiente paso se correlacionó la concentración plasmática de FvW con los valores obtenidos en el estudio de las variables ecográficas y con el resto de las variables moleculares estudiadas. En este análisis, la concentración de FvW mostró una correlación inversa con la VRC medida en la ACM ($r=-0,210$; $p=0,020$), y a nivel de la arteria basilar ($r=-0,255$; $p=0,010$). Igualmente se demostró una correlación directa de la concentración de FvW con marcadores inflamatorios como la VSG ($r=0,176$; $p=0,045$) y el fibrinógeno ($r=0,211$; $p=0,021$).

El segundo marcador molecular estudiado mediante técnicas ELISA fue el ON. Aunque en los resultados obtenidos la determinación del ON mostró concentraciones ligeramente menores en el grupo de EM que en resto de grupos clínicos estudiados (Tabla 30), las diferencias con el grupo control no fueron estadísticamente significativas ($p=0,292$). En un análisis detallado de los valores se objetivó que, únicamente en el grupo de ME, la concentración de ON fue ligeramente mayor que en el grupo de pacientes diagnosticados de EM (diferencia de las medias = $7,249 \pm 3,17$ nmol/ml; $p=0,025$).

Tabla 30: Concentraciones de ON en los grupos clínicos.

Grupo clínico	Media (nmol/ml)	Desviación estándar
Controles	40,302	11,752
Migraña episódica	44,993	12,958
Migraña crónica	41,550	14,159
Esclerosis múltiple	37,744	9,415

6. DISCUSIÓN

6.1. Disfunción endotelial en la Esclerosis Múltiple.

En la presente Tesis Doctoral se ha demostrado que la EM asocia la existencia de disfunción endotelial, que también está presente en la otras enfermedades neurológicas y autoinmunes exploradas. Además, la inflamación crónica es el principal componente de la disfunción endotelial, y los cambios observados dependen del grado de inflamación subyacente. En primer lugar, dichos cambios y su intensidad pueden medirse mediante pruebas de ultrasonografía, tanto en la circulación cerebral, como a nivel sistémico; y, en segundo lugar, utilizando marcadores biológicos de inflamación y de daño endotelial, que se encuentran relacionados con el riesgo de patología cardiovascular. Las diferencias observadas a nivel molecular y ultrasonográfico entre controles sanos y pacientes con EM indican la relevancia de los fenómenos inflamatorios ya desde el inicio, y en el desarrollo y la progresión de la enfermedad vascular. La caracterización completa de los mecanismos implicados es necesaria y puede tener importantes repercusiones en la prevención de comorbilidades asociadas a la enfermedad.

6.2. Importancia de la inflamación en la disfunción endotelial.

La disfunción endotelial se define como la pérdida de la capacidad del endotelio para realizar sus funciones, y por tanto, para mantener una adecuada homeostasis vascular. El proceso se caracteriza por la aparición de un estado de activación endotelial, con un desequilibrio a favor de sustancias procoagulantes, que desencadenan el desarrollo de la aterosclerosis. En consecuencia, la disfunción endotelial está considerada como un marcador preclínico de aterosclerosis.

Esta asociación entre inflamación y disfunción endotelial, fue postulada en primer lugar por Ross (13). La inflamación, que constituye una respuesta del organismo ante diversos estímulos, es una respuesta positiva, pero si los agentes causales no son eliminados o la respuesta inflamatoria y la inflamación progresan, ésta pierde su papel protector, dando lugar a una respuesta fibroproliferativa que, cuando es excesiva, disminuye la capacidad funcional de los órganos, en nuestro caso, afectando al endotelio. Nuestro trabajo está en línea con las investigaciones actuales, que demuestran que la disfunción endotelial constituye un proceso proaterogénico que contribuye a la aparición de aterosclerosis (174). Como en nuestro caso, existen diversos estudios que

han postulado que la inflamación crónica y los fenómenos de disregulación del sistema inmune juegan un importante papel en el desarrollo de la aterosclerosis, considerada en la actualidad una enfermedad inflamatoria (175).

La presente Tesis Doctoral sigue la misma línea de investigación que ha sido demostrada con éxito en otras patologías, especialmente en algunas enfermedades inflamatorias crónicas que comparten mecanismos fisiopatológicos con la EM. Entre las más destacadas, se encuentran las enfermedades reumatológicas y las enfermedades infecciosas crónicas. En el ámbito de la neurología, la patología más estudiada ha sido la migraña, en donde se ha postulado en repetidas ocasiones la existencia de una disfunción endotelial que justifique el incremento de los eventos isquémicos, aunque con resultados contradictorios (176). Dentro de las enfermedades autoinmunes, la entidad más conocida es la AR, prototipo de enfermedad en la que se ha evidenciado la existencia de una aterogénesis acelerada (177), y en la que se ha descrito la existencia de disfunción endotelial en pacientes desde el inicio de la enfermedad (178).

Nuestro trabajo se ha centrado en el estudio de la disfunción endotelial en una enfermedad inflamatoria crónica, la EM, y en la búsqueda de los mecanismos fisiopatológicos comunes con otras enfermedades autoinmunes, que expliquen el incremento de eventos vasculares en los pacientes con EM (179). El principal componente de ambos procesos es la inflamación mantenida, que pone en marcha los mecanismos de alteración vascular que conducen a la aterosclerosis. Además, nuestro trabajo permite asociar los hallazgos a nivel endotelial con los marcadores de inflamación a nivel celular y molecular asociados. La identificación de estos marcadores puede constituir una herramienta útil para el seguimiento y prevención de las comorbilidades asociadas.

6.3. Impacto de la enfermedad vascular en la EM.

La EM es una enfermedad desmielinizante, inflamatoria y degenerativa del SNC de naturaleza autoinmune, aunque sus causas y sus mecanismos etiopatogénicos todavía permanecen en gran parte desconocidos. Se considera que en la patogénesis de la misma interviene la existencia de una predisposición genética y factores ambientales, alguno de ellos desconocidos, que dan lugar a la aparición de una compleja alteración del sistema

inmune, responsable de la aparición de los fenómenos inflamatorios y neurodegenerativos propios de la enfermedad (180).

Existen estudios recientes que han confirmado la existencia de un aumento de la incidencia de complicaciones cardiovasculares en pacientes con EM en comparación con la población general (148). A pesar de las limitaciones evidentes en muchos de los estudios de mortalidad realizados en la EM, que sólo distinguen entre muerte por EM o debida a otras causas, en los últimos años, y en parte gracias al avance en los tratamientos, y a las grandes cohortes de pacientes, la información se ha ampliado considerablemente (149). La mayoría de trabajos están de acuerdo en la existencia de un incremento de eventos vasculares, más acusado en el caso de la enfermedad cerebrovascular isquémica, con un incremento del riesgo más significativo en los primeros años tras el diagnóstico de la enfermedad (152), aunque el riesgo permanecerá elevado también posteriormente. Recientemente, también se han publicado los resultados del estudio de mortalidad de la cohorte de Vizcaya (181). Tras 24 años de seguimiento, se incluyeron 1.283 pacientes con EM. Entre sus conclusiones destaca un claro incremento del riesgo de muerte, al menos tres veces superior a la población de referencia de la misma región y una reducción de la esperanza de vida de 6,53 años.

Hay diversas teorías que intentan discernir las causas de estos hallazgos. De forma clásica se ha postulado la potencial influencia de algunos factores de riesgo cardiovascular, como la ausencia de ejercicio físico consecuencia de la discapacidad propia de la enfermedad, y también, basándose en series pequeñas que indicaban cifras más altas de tabaquismo entre los pacientes con EM (153). Pero estudios posteriores, dirigidos a conocer la incidencia real de los considerados factores de riesgo cardiovascular tradicionales, han mostrado datos contradictorios, no consiguiendo demostrar que estos factores de riesgo presentaran una asociación con la enfermedad en algunos casos (151); mientras otros han llegado a asociar los factores de riesgo tradicionales con un incremento de la carga lesional y de la atrofia cerebral (182), sugiriendo mecanismos comunes entre la EM y la enfermedad vascular.

En conclusión, en la mayoría de los estudios analizados, el incremento del riesgo desde el punto de vista cardiovascular objetivado en los pacientes con EM no puede explicarse únicamente por los factores de riesgo cardiovascular clásicos (183). En el presente trabajo hemos excluido del estudio a aquellos sujetos que presentaban factores

de riesgo cardiovascular conocidos, todo ello, con la doble finalidad de impedir su potencial interferencia, tanto en los resultados del estudio, como en la búsqueda de nuevos marcadores subclínicos de riesgo vascular. De este modo, podemos colegir que los hallazgos referentes a la disfunción endotelial son debidos a la propia enfermedad, en nuestro caso la EM, y no al efecto de los factores de confusión. Se decidió, por tanto, dirigir el estudio a conocer la existencia de disfunción endotelial en la EM, ya que la disfunción endotelial ha mostrado ser un excelente predictor del riesgo de desarrollo de enfermedad vascular, y en la actualidad es reconocida como un predictor de eventos vasculares (184).

En la literatura, las referencias a la existencia de una potencial disfunción endotelial en los pacientes con EM son limitadas (185), a pesar de que desde el descubrimiento de la enfermedad se ha planteado la implicación vascular en la patogénesis de la misma (186). Nuestro trabajo es novedoso, porque en lugar de centrarse en la búsqueda de los mecanismos fisiopatológicos que producen la enfermedad, se ha centrado en la identificación precoz de los efectos de la inflamación a nivel del endotelio vascular y en el empleo de técnicas que ayuden al diagnóstico y seguimiento de estos cambios.

La mayoría de trabajos que investigan el componente vascular de la EM no han tenido en cuenta estos cambios o los describen sólo parcialmente. En los últimos años, el componente vascular de la patogenia de la EM adquirió relevancia gracias a las publicaciones de Zamboni (187), que propuso una insuficiencia venosa cerebral y medular crónica como origen de la enfermedad, pero posteriormente dichos hallazgos no han podido ser replicados y los procedimientos terapéuticos promovidos se demostraron peligrosos e ineficaces (188) (189).

La importancia del componente vascular en la EM se postula a partir de la presencia común de las lesiones desmielinizantes en regiones perivenulares, lo que sugiere la existencia de una disrupción de la barrera hematoencefálica en los pacientes con EM (142). Se ha demostrado también, que algunas integrinas, como la VCAM1, participan en la patogénesis de la EM (190), y que la enfermedad está asociada con cambios en la expresión y la activación de las células endoteliales por partículas inflamatorias, como el TNF- α o citosinas, que producirían una alteración en su correcto funcionamiento.

Por tanto, la primera parte del nuestro trabajo se centró en la búsqueda de las técnicas de estudio de la función endotelial más adecuadas, y en la correcta identificación clínica de los pacientes, para poder identificar aquellos parámetros que se relacionasen con el estado clínico de los pacientes con EM de nuestra población.

6.4. Técnicas de estudio de la función endotelial.

La utilidad clínica del estudio de la función endotelial no está completamente demostrada, en parte por la ausencia de un único método o prueba de medida, con elevada especificidad, que permita una cuantificación exacta del riesgo, y que pueda incluirse en las guías de prácticas clínicas dirigidas a la prevención, tanto primaria como secundaria de la enfermedad vascular (191).

Para la realización del presente trabajo se realizó una revisión bibliográfica de las técnicas disponibles. En general, las técnicas dirigidas al estudio de la función endotelial son muy diferentes y tienden a variar entre los diferentes estudios (192). En nuestra revisión, la técnica más ampliamente utilizada ha sido la VDE, aunque en algunos casos sus resultados se han visto limitados por problemas relacionados con su reproducibilidad y variabilidad (193). Existen otras técnicas de estudio, tanto de imagen como a nivel molecular, que también han mostrado ser eficaces. Sin duda, el desarrollo de técnicas no invasivas, como la ultrasonografía y marcadores bioquímicos y moleculares, ofrece una ventaja sobre otras, ya que nos permiten el análisis de amplias cohortes de sujetos, desde estadios preclínicos de aterosclerosis, como en el presente trabajo, y sin riesgos para la población estudiada. Además, aportan la ventaja de permitir el estudio del impacto producido por las medidas terapéuticas y de prevención que se establezcan en la práctica clínica.

Por tanto, aunque existen numerosos métodos que permiten el estudio de los cambios que se producen en la función vascular, hasta la actualidad los estudios disponibles en el caso de la EM son escasos. En la presente Tesis Doctoral se han seleccionado los métodos de estudio basándose, por una parte, en la eficacia demostrada en la medición de alteraciones desde las fases iniciales de la enfermedad vascular en enfermedades similares a la EM, con las que esta comparte mecanismos fisiopatogénicos, y por otra parte, en aquellos métodos de estudio no invasivos, reproducibles e inocuos para los participantes. Se seleccionaron entre los disponibles los

estudios de ecografía para el estudio tanto de la circulación cerebral, como a nivel sistémico, y, en segundo lugar, marcadores bioquímicos y moleculares.

Existen, aparte de los utilizados en este trabajo, otras técnicas de estudio de la función endotelial, que también han demostrado la existencia de alteraciones en los pacientes con EM. Un ejemplo lo constituyen las micropartículas (MP), uno de los primeros marcadores descritos de la existencia de disfunción endotelial, compuestas por fragmentos de membrana plasmática que contienen citocinas y moléculas de superficie que permiten su identificación y procedencia. Minagar y colaboradores (194) estudiaron por primera vez el papel de las MP endoteliales en la EM. Con una muestra de 30 pacientes con EM remitente recurrente en brote clínico y 20 pacientes con EM remitente recurrente en fase de remisión, cuantificaron las MP endoteliales en el plasma, mediante citometría de flujo, en comparación con un grupo control de 48 sujetos sanos. Los resultados mostraron un incremento significativo de las MP endoteliales CD51+ durante los brotes, respecto a aquellos pacientes que se encontraban en una fase de remisión, y de estos a su vez respecto al grupo control. Por su parte, las MP endoteliales CD51+ se encontraban elevadas tanto en la fase activa como entre brotes clínicos de la enfermedad. Los autores concluyeron que las diferencias objetivadas podrían constituir un marcador de la existencia de un daño endotelial asociado en la EM. En otro trabajo, Oliva et al (195) encontraron un incremento de las MP endoteliales CD31+ en todas las formas clínicas de EM, además de en pacientes con síndrome clínico aislado, postulando su potencial utilidad en la monitorización del tratamiento de la EM. Por el contrario, en los brotes, las MP CD62E+ se incrementan respecto a los basales, sugiriendo su utilidad como marcador de brotes (195).

Aunque nuestros resultados deben ser reproducidos en el futuro en pacientes con EM, constituyen unos métodos eficaces para el estudio de la función endotelial, además de aportar nuevos datos en relación al papel del endotelio en los pacientes con EM.

6.5. Características epidemiológicas de la muestra.

El análisis de las características de la muestra seleccionada para el estudio presenta como principal característica, que se trata de una población exenta de patología cardiovascular previa. Los factores de riesgo considerados como tradicionales se excluyeron, aunque se toleraron la obesidad tipo I ($IMC > 30$ y < 35) y el tabaquismo

ligero (menor de 5 cigarrillos/día), para evitar su interferencia en los resultados del estudio.

Los estudios disponibles han demostrado ampliamente la influencia del tabaco en la aparición y progresión de la disfunción endotelial, incrementando el riesgo de enfermedad vascular (196). Esta relación se ha visto también en casos de consumo leve (197) (198), e incluso en fumadores pasivos (199), lo que dificulta considerablemente la selección de los sujetos participantes. Además, los estudios no han sido capaces de hallar una relación dosis-dependiente entre el número de cigarrillos diarios y la intensidad de los cambios en la función vascular (200), por lo que en el presente trabajo, se tuvo en cuenta la condición de tabaquismo activo o no en el análisis de los resultados. Contrariamente a lo esperado, el hábito tabáquico no resultó un factor significativo en los resultados ecográficos, con excepción de la VDE, donde el tabaco fue el único factor de confusión que, de forma independiente, se correlacionó con los valores de VDE. No obstante, en el modelo corregido, las diferencias de las medias de variación de la VDE entre los grupos clínicos se mantuvieron muy significativas. No se objetivó que el tabaco fuese un factor relevante en el resto de resultados, posiblemente debido a que no existían diferencias significativas entre la población fumadora de los distintos grupos de estudio. Además, los participantes fueron instruidos para no fumar en las 24 horas anteriores al estudio. No nos hemos centrado, por no ser objeto del presente estudio, y por el reducido número de participantes, en las consecuencias del tabaco en la progresión y el grado de discapacidad de la enfermedad, que ha sido propuesto en diversos trabajos (201), que asocian el tabaquismo con una progresión más rápida de la discapacidad medida en la escala EDSS. De confirmarse dicha asociación, sería esperable que esos pacientes presentasen también un mayor daño endotelial que los no fumadores.

La edad media del grupo de pacientes con EM y la del grupo control estaba en torno a los 41 años, mientras que los pacientes con migraña eran ligeramente más jóvenes ($37,46 \pm 9,7$ años para ME y de $37,09 \pm 11,6$ años para aquellos con MC), pero sin alcanzar diferencias significativas. En cambio, el grupo con AR era de media 10 años mayor, lo que se tuvo en cuenta en las comparaciones con los pacientes con EM.

El tiempo medio de evolución de la EM desde el diagnóstico hasta la realización del estudio fue de $6,62 \pm 4,9$ años, lo que supone un tiempo de evolución de la

enfermedad relativamente corto, pero suficiente para el hipotético desarrollo de una alteración en la función del endotelio en estos pacientes. La ausencia de pacientes con otras formas clínicas de la enfermedad contribuyó a homogeneizar la muestra. Por otra parte, todos los pacientes se encontraban en un periodo intercrítico en el momento del estudio, con un mínimo de 6 meses desde el último brote y al menos 30 días desde el último tratamiento esteroideo recibido. Se decidió este límite arbitrario para evitar las consecuencias de la disrupción de la barrera hematoencefálica y de los esteroides como tratamiento sintomático sobre los resultados del estudio (202), tanto a nivel ultrasonográfico como bioquímico y molecular (203).

En nuestra serie, un porcentaje elevado de pacientes con EM se encontraban en tratamiento con fármacos modificadores de la enfermedad, aunque la mayoría de ellos estaba con IFN β o copolímero (53,8%), como tratamientos de primera línea, y únicamente en 3 casos habían recibido previamente otro fármaco diferente del actual.

No se objetivaron diferencias significativas entre grupos en los valores hallados respecto a la talla, peso y tensión arterial. Aunque se conoce que la EM puede alterar el sistema nervioso autónomo, y que hasta el 50% de los pacientes con EM pueden presentar signos de intolerancia al ortostatismo (204), las consecuencias de estos cambios en la evolución de la enfermedad permanecen desconocidos. Dichas alteraciones podrían dar lugar a cambios en la respuesta hemodinámica cerebral, por lo que, para evitarlo, todos los sujetos permanecieron en reposo, y se investigó la presencia de dicha sintomatología en los participantes. El análisis de los valores de tensión arterial entre los grupos clínicos no mostró diferencias significativas. Este hallazgo está de acuerdo con Fjeldstad et al (205), que en su estudio no encontraron diferencias ni en los valores de TAS ni en la TAD entre sujetos con EM y controles. En nuestro trabajo, los valores de TAS y TAD se incluyeron en los modelos de GIM y VDE, al objetivarse la existencia de una correlación del valor sistólico con ambas variables, aunque su influencia fuera despreciable en los resultados finales. En cambio, no se objetivó en nuestro estudio correlación entre los valores de tensión arterial y la VRC medida por el BHI.

El resto de variables epidemiológicas recogidas, como la forma de inicio de la enfermedad, tiempo transcurrido hasta el diagnóstico y los datos de neuroimagen, se registraron para posteriores investigaciones.

El objetivo de nuestro estudio ha sido investigar la posible alteración de la función endotelial mediante técnicas de ultrasonografía y marcadores moleculares. Se discuten a continuación los principales hallazgos del trabajo.

6.6. Ateroesclerosis subclínica en pacientes con EM.

En nuestro trabajo, demostramos, mediante el estudio no invasivo ultrasonográfico de la arteria carótida, la presencia de enfermedad aterosclerosa macrovascular, que se expresa como un incremento del GIM en los pacientes con EM que no presentaban factores de riesgo cardiovascular clásicos, ni evidencia de eventos cerebrovasculares o cardiovasculares previos.

La medición del GIM se ha mostrado como una herramienta eficaz generalizándose su uso en el estudio de la aterosclerosis subclínica en los últimos años. La disfunción endotelial tiene un papel clave en los primeros estadios de la enfermedad aterosclerosa (206), y por tanto, su identificación precoz es fundamental, debido a su contribución al desarrollo de la enfermedad vascular (207), considerándose como un factor de riesgo independiente de la incidencia de enfermedad coronaria y cerebrovascular.

En relación con la presencia y el número de placas de ateroma, la proporción es muy similar entre controles y pacientes con EM, y únicamente se objetivó una mayor prevalencia entre los pacientes con AR, probablemente en relación con las diferencias en la media de edad de estos pacientes con respecto al resto de grupos clínicos.

En nuestro conocimiento, el presente estudio es el primero claramente dirigido a medir el GIM en pacientes con EM en la búsqueda de alteraciones macrovasculares y del riesgo de desarrollar placas ateromatosas. En una revisión de la literatura, no hemos encontrado ningún estudio dirigido al estudio de enfermedad arterial carotídea en los pacientes con EM, a pesar de que sí se encuentran descritos hallazgos parciales que apoyan nuestros resultados. Grebe et al en 2010 (208) demostraron la existencia de una asociación entre los valores del GIM, medido en la ACC en 125 sujetos sanos sin factores de riesgo cardiovascular, y marcadores bioquímicos y epidemiológicos. Al igual que en el presente trabajo, encontraron una correlación positiva entre el GIM y la edad, el IMC, el colesterol, y marcadores inflamatorios como la homocisteína y el fibrinógeno. El aumento de los niveles de fibrinógeno plasmático sería indicativo de un

mayor GIM carotídeo, que a su vez se relaciona con las primeras etapas de los cambios aterogénicos. Reinhardt (209), por su parte, demostró que el fibrinógeno se acumula en las placas de ateroma, y el análisis anatomopatológico de las mismas en fases tempranas de su desarrollo, objetivó un elevado contenido de fibrinógeno y fibrina, sugiriendo que el fibrinógeno es un factor que contribuye al desarrollo de la aterosclerosis. Además de los lípidos, cuya importancia es conocida desde las descripciones de Ross (13), otras moléculas como la homocisteína (210) también han demostrado asociarse a un mayor riesgo de aumento del GIM carotídeo. Nuestro estudio apoya la existencia de dicha asociación, ya que en nuestros pacientes, los valores plasmáticos de fibrinógeno se correlacionaron de forma significativa con el GIM ($p=0,026$), al igual que la homocisteína ($p=0,003$), y otros marcadores inflamatorios inespecíficos, como la VSG y la PCR. La elevación de estos marcadores en los pacientes del estudio, en ausencia de otros componentes inflamatorios o infecciosos, sólo puede explicarse por el componente inflamatorio de la enfermedad.

El GIM se incrementa cada año de vida entre 0,01 y 0,02 mm (211), por lo que la edad actuó como factor de confusión, pero las diferencias se mantuvieron en el modelo corregido. Aunque no existe un valor a partir del cual se pueda estratificar el riesgo, el estudio de Rotterdam obtuvo que un GIM mayor de 0,89 mm se asocia con aterosclerosis en los miembros inferiores, por lo que predijeron que el GIM es un predictor de la existencia de aterosclerosis generalizada (212). En nuestro trabajo la mayoría de pacientes con EM presentaban valores de GIM mayores de 0,75 mm y en numerosos casos se encontraban por encima de 0,90 mm. El único estudio, aunque de manera indirecta, que ha analizado la pared arterial carotídea en EM es el trabajo de Nelson (213). A pesar de que no iba dirigido al diagnóstico de enfermedad aterosclerótica de forma directa, incluía entre sus variables la determinación del GIM. El estudio incluyó un total de 29 pacientes con EM de entre 28 y 64 años sin antecedentes de enfermedad vascular previa. Estos autores, a nivel de la ACC, no objetivaron placas ateromatosas, ni estenosis significativa en ningún paciente; pero un total de 4 pacientes con EM (13,89% del total) presentaron un GIM ligeramente elevado. El rango medio de incremento oscilaba entre 0,9 y 1,0 mm. Además, en la ACI encontraron placas en el 6,89% de los pacientes con EM, que no condicionaban alteraciones hemodinámicas al igual que en nuestro trabajo. No obstante, sí encontraron correlación entre los marcadores bioquímicos y los hallazgos de ultrasonografía, aunque algunas

determinaciones, como la homocisteína, no se practicaron en todos los casos. Sus principales limitaciones son la ausencia de comparación de dichos hallazgos con un grupo control, para poder establecer comparaciones reales, y el número limitado de la muestra. Nuestro trabajo tiene un número mayor de efectivos y, sobre todo, permite establecer comparaciones con un grupo de controles sanos, ajustado por sexo y edad, y en ausencia de otros factores de riesgo que puedan influir en los resultados.

La hipótesis de que los pacientes con EM podrían presentar un incremento del GIM, y una alteración en el normal funcionamiento arterial, y que esas alteraciones podrían quedar reflejadas en el incremento de sustancias proinflamatorias, como la PCR o la IL-6, ha sido propuesta también por Ranadive et al (214). En su trabajo incluyeron 33 pacientes diagnosticados de EM y 33 controles sanos, todos ellos no fumadores, y llevaron a cabo mediciones de la presión arterial, medición del GIM carotídeo, análisis de la rigidez arterial carotídea y el estudio de la hiperemia reactiva. En sus resultados, señalan la existencia de una alteración en la función endotelial de sus pacientes, con alteraciones del flujo arterial a nivel braquial, y de la complianza carotídea midiendo los cambios en la distensión arterial. A diferencia de nuestro trabajo, no encontraron diferencias significativas a nivel estructural en la pared arterial entre pacientes con EM y controles.

De los hallazgos de nuestro trabajo se puede concluir que, en pacientes con EM, la inflamación crónica podría conducir, a través del desarrollo de disfunción endotelial, a la aparición posterior de enfermedad aterosclerosa, y a la presentación de eventos vasculares. Dicha relación se explicaría por la persistencia de un estado proinflamatorio crónico en los pacientes con EM, que provoca la aparición de disfunción endotelial y cambios aterogénicos, evaluados mediante el GIM. Dichos hallazgos abren la puerta además a futuras investigaciones, encaminadas a buscar cambios dinámicos, como consecuencia de la adopción de las medidas terapéuticas para el control de la enfermedad.

En la comparación de los resultados con un grupo activo, como es el caso de la migraña, nuestro trabajo demuestra la existencia de una fuerte correlación entre la cronificación de la migraña y el aumento del GIM. Estos datos eran esperables, ya que en la migraña también se ha documentado un aumento del riesgo de enfermedades

vasculares (97) y cerebrovasculares (96), y se acepta que la migraña *per se* constituye un factor de riesgo de enfermedad aterosclerótica (215).

Destaca la fuerte relación hallada entre el incremento del GIM y la MC. En relación con la migraña, disponemos de más datos que apoyan la existencia de alteraciones vasculares que provocan un incremento de riesgo vascular, sobre todo con alteraciones de la circulación cerebral. No en vano, la migraña se postula como una enfermedad neurovascular (216). Por otro lado, autores como Rajan (217) hipotetizaron que la función endotelial en la circulación cerebral difiere de aquella a nivel sistémico, exponiendo que la migraña no sería capaz *per se* de producir un aumento del GIM, y trabajos como los de Stam et al (218) no encontraron relación entre la migraña y la aterosclerosis medida por el GIM, la velocidad de pulso y el índice braquial. A pesar de ello, en nuestro trabajo encontramos una fuerte relación entre la gravedad de la migraña, definida como la cronificación de la misma, en términos de puntuación MIDAS y frecuencia de los ataques, y el aumento del GIM. Un hecho relevante que puede explicar las diferencias entre los trabajos descritos y nuestro estudio, es la diferenciación del grupo de MC, con una prevalencia muy baja en la literatura y el hallazgo de una elevada incidencia de migrañosos fumadores y con diabetes mellitus en la población de dichos estudios (219).

6.7. Disfunción endotelial sistémica.

Como se ha señalado, tradicionalmente el método que más se ha utilizado para el estudio de la función endotelial a nivel sistémico, por su utilidad e inocuidad, ha sido la VDE. Mediante esta técnica podemos conocer la existencia de un deterioro funcional del endotelio, caracterizado por vasoconstricción, activación de mecanismos de coagulación y fibrinólisis anómalos e incremento de la proliferación vascular (220). El hallazgo de una VDE alterada puede asociarse con la existencia de una disfunción endotelial, incluso desde las fases iniciales de la misma, antes de la aparición de alteraciones estructurales, tal y como ha sido demostrado en la bibliografía, donde encontramos que la VDE está disminuida, incluso en estadios tempranos, en pacientes con hipercolesterolemia e hipertensión arterial (221), fumadores (206) y diabéticos (222).

Nuestro estudio está dirigido, de forma ambiciosa, a demostrar que la inflamación debida a la EM produce una alteración de la respuesta vascular independiente de los factores de confusión. Nuestros pacientes con EM presentan una reducción significativa de la VDE con respecto a los controles, y los valores permanecieron significativos tras la corrección por el hábito tabáquico.

A pesar de que la VDE ha sido ampliamente estudiada en numerosas patologías, no es así en el caso de la EM. El único estudio que ha analizado la función vascular sistémica incluyendo la VDE en pacientes con EM (223) comparó 14 pacientes con EM y 13 controles sanos, encontrando que los pacientes con EM presentaban una VDE ligeramente menor que los controles, pero sin diferencias estadísticamente significativas, quizás debido al escaso tamaño muestral. Estos resultados, no obstante, están en línea con los hallados en nuestro trabajo, en el que los pacientes con EM presentan una significativa disminución del porcentaje de variación de la VDE con respecto a los controles. Resultados comparables, aunque utilizando una técnica diferente como es la tonometría arterial periférica, han sido publicados recientemente (224). En este caso, en el que se compararon 46 pacientes con EM y 31 controles sanos, los pacientes con EM mostraron valores claramente inferiores a los controles, a pesar de que los controles presentaban un IMC mayor y una proporción mayor de participantes del género masculino. En el análisis realizado, al igual que en nuestro caso, la presencia de EM fue la única variable independiente asociada con los resultados. También se mostraron alterados el flujo a nivel braquial y la hiperemia reactiva en el estudio de Ranadive (214), comentado con anterioridad.

Tomando en consideración que existen numerosas líneas de investigación que han demostrado la validez del estudio de la VDE para conocer la integridad del sistema endotelial (225), los hallazgos de nuestro estudio objetivan la existencia de alteraciones en la función endotelial a nivel sistémico. La existencia de esta alteración endotelial fuera del sistema nervioso implica que la fisiopatología de la EM no sólo involucra estructuras nerviosas, sino que sus consecuencias son sistémicas. Este hecho puede tener importantes repercusiones, y justifica la búsqueda de marcadores séricos de disfunción endotelial, que sirvan para la monitorización de la evolución de la enfermedad o la evaluación de la respuesta terapéutica (226).

Aunque hemos encontrado valores de VDE más bajos en los pacientes de EM que en los controles, debe señalarse que el porcentaje de reducción objetivado es menor del que se encuentra clásicamente en los trabajos que estudiaron el impacto de los factores de riesgo tradicionales, como el tabaco (206), en los que los valores de VDE fueron claramente inferiores. Por lo tanto, la inflamación asociada a la EM, identificable fuera del sistema nervioso central, es capaz de originar alteraciones en la función endotelial sistémica, aunque de menor intensidad que otros factores de riesgo considerados tradicionales. No obstante, nuestros resultados deben ser replicados en el futuro.

En el análisis del grupo de pacientes con migraña, nuestro estudio objetiva valores inferiores de VDE en los pacientes migrañosos con respecto a los controles, lo que implicaría que la migraña tiene también consecuencias sistémicas. En el caso de la migraña disponemos de un mayor número de estudios dirigidos a conocer la existencia de disfunción endotelial, pero con resultados dispares entre ellos. En algunos casos, como los estudios de Silva et al (64), no existen diferencias entre migrañosos y controles sanos, mientras que De Hoon et al (227), que compararon la VDE tras una infusión intraarterial de 5-HT (estimulante de liberación endógena de ON), nitratos y CGRP en un reducido grupo de sujetos control y otros de migraña, tampoco constataron cambios en la VDE. Por el contrario, los estudios realizados por Yetkin et al (228), evidencian un descenso de la VDE en los pacientes migrañosos. Los resultados del estudio de Yetkin son similares a los nuestros, aunque en su caso, no distinguían en función de la gravedad de la migraña que, en nuestro estudio, se ha revelado como un elemento fundamental para demostrar la evidencia de dicha disfunción entre migrañosos.

6.8. Asociación entre la función endotelial y el GIM carotídeo.

Nuestro objetivo fue evaluar el GIM, la función endotelial y su correlación en pacientes sin evidencia previa de aterosclerosis o antecedentes de enfermedad cardiovascular. La importancia de las técnicas utilizadas para detectar el daño incipiente de la aterosclerosis es indudable, sin embargo, su papel en pacientes asintomáticos es desconocido. Son escasos los estudios que han correlacionado el GIM carotídeo con la función endotelial en las arterias periféricas, alguno de los cuales ha demostrado que ambos se alteraban en pacientes con enfermedad coronaria subyacente (229), y también

en pacientes asintomáticos, pero con factores de riesgo asociados (230). Existe, por tanto, un creciente interés en determinar la utilidad clínica de ambas mediciones, lo que permitiría detectar las fases tempranas de la aterosclerosis, y así mejorar su prevención.

En nuestro trabajo, la función endotelial está más alterada, y el GIM es mayor en los pacientes con EM que en los controles. Esto nos permite concluir que la función endotelial es más deficiente en los pacientes con EM, y también en los pacientes migrañosos, sobre todo en el grupo de MC, y que existe una asociación lineal entre ambas variables estudiada, de forma que, a medida que empeora la VDE, aumenta el GIM de una forma inversamente proporcional. Es probable que ambas técnicas valoren el mismo proceso aterosclerótico desde diferentes ópticas (funcional y anatómica respectivamente), permitiendo una orientación precoz y no invasiva del riesgo cardiovascular de nuestros pacientes.

En los pacientes con EM, la inflamación crónica podría conducir al desarrollo, desde las fases iniciales de la enfermedad, de una disfunción endotelial; más tarde a la aparición de enfermedad aterosclerosa y, finalmente, dar lugar a la aparición de eventos vasculares. Por otro lado, se conoce que la disfunción endotelial regresa con la modificación y el tratamiento de los factores de riesgo (61), de forma que se abre la posibilidad en el futuro de utilizarse como marcador de la respuesta a un determinado tratamiento o intervención en los pacientes con EM.

6.9. Estudio de reserva hemodinámica cerebral.

El cerebro humano necesita un constante aporte de oxígeno para mantener su integridad estructural y funcional, y por ello, precisa de mecanismos específicos que aseguren un adecuado aporte en cada momento. Un cerebro humano sano es capaz de ajustar el flujo sanguíneo en función de las necesidades de oxígeno y glucosa, mediante los cambios en el diámetro de las pequeñas arterias y los capilares (231), para mantener un aporte sanguíneo a pesar de los cambios de presión y de las condiciones bioquímicas, como por ejemplo, un incremento del CO arterial.

La medición de la VRC es una medida útil, ya que proporciona información sobre la salud vascular, su capacidad de adaptación a los cambios, y en último lugar, de la salud neuronal. El estudio de la autorregulación cerebral puede realizarse de diferentes formas, mediante la utilización de fármacos, cambios posturales o el test de

apnea que utilizamos en nuestro estudio (232). La apnea voluntaria provoca una vasodilatación y un incremento del flujo en la corteza cerebral (233), que evaluamos con el doppler transcraneal para conocer la reactividad vascular (78).

Aunque se han realizado estudios de reserva hemodinámica en diferentes patologías neurológicas, y se ha demostrado la existencia de alteraciones en la VRC tras patologías vasculares, tales como el ictus (234), o en otras enfermedades neurodegenerativas, como el Alzheimer (235) o el Parkinson (236), los datos disponibles en EM son limitados.

En nuestro trabajo, hemos encontrado una disminución de la VRC en los pacientes con EM, objetivada tanto a nivel de la circulación anterior, como en la posterior. Este hallazgo explicaría la existencia de una alteración en la capacidad de adaptación cerebral a los cambios, además de ser un factor que puede influir en la fisiología de otros hallazgos asociados a la EM, como la hipoperfusión cerebral o la atrofia y la neurodegeneración. Los estudios previos en pacientes con EM se han centrado, en la mayoría de los casos, en las alteraciones autonómicas asociadas a la EM, aunque con resultados dispares (237), que en algunos casos llegan a variaciones de hasta el 50% con respecto a los controles (238). Tales discrepancias pueden atribuirse a los diferentes criterios de selección utilizados, a la fase de la enfermedad en la que se realizaron los estudios y a los distintos métodos de estudio.

Recientemente, Uzuner et al (239), han descrito sus resultados usando el BHI en pacientes con EM. Los autores evaluaron la VRC en pacientes con EM en el momento de un brote clínico, tras el tratamiento endovenoso con megadosis de metilprednisolona y un mes después. En sus resultados, a diferencia de nuestro trabajo, no encontraron diferencias significativas entre los pacientes con EM y los controles. En un análisis detallado, se pueden observar diferencias con nuestro trabajo: en primer lugar en el número, ya que únicamente se estudiaron 12 pacientes con EM y 11 controles sanos; en segundo lugar, sólo se estudió la circulación anterior, y, en tercer lugar, el tiempo de apnea se limitó a 15 segundos. A pesar de ello, los autores en sus conclusiones señalan que el BHI era ligeramente menor en los pacientes con EM que en los controles, no alcanzando la significación, quizás, por la metodología utilizada. Los mismos autores habían estudiado previamente la VCR en respuesta a estímulos visuales en pacientes con EM remitente recidivante, en comparación con controles (240). Con un número

mayor de casos (84 pacientes y 45 controles), objetivaron un descenso de las velocidades registradas en las arterias posteriores y un incremento de la reactividad de los pacientes con EM ante los estímulos visuales durante el brote clínico, que sugerían la existencia de cambios en la normal reactividad con respecto a los controles.

Otro trabajo reciente estudió la autorregulación cerebral en pacientes con EM, antes y después del tratamiento esteroideo, mediante el análisis de los cambios en las velocidades de flujo en ambas ACM en respuesta al test basculante (241). En los resultados, en la comparación con los controles, no encontraron diferencias significativas y tampoco en respuesta a los corticoides, pero señalan que existen diferencias entre EM y controles en los cambios en las velocidades asociados con el descenso de la presión arterial, y también como efecto de los esteroides. Por ello concluyen que existe una alteración de los mecanismos de autorregulación desde las fases más tempranas de la EM, y que los corticoesteroides tienen un papel en estos cambios.

Nuestros resultados siguen la línea de los expuestos por Marshal et al (242). En su trabajo estudiaron la vasoreactividad cerebral en 19 pacientes con EM, en comparación con un grupo control, mediante el análisis de los cambios en el flujo cerebral, en respuesta a la hipercapnia, con estudios de perfusión en RM. Sus resultados demostraron la existencia de una reducción significativa de la VRC, a nivel global en los pacientes con EM. La RM permitió además localizar aquellas áreas donde las diferencias eran mayores, situándose a nivel de la sustancia gris temporal, parietal y en regiones límbicas, encontrando una correlación con la atrofia cerebral, y sugiriendo que las alteraciones de la VRC observadas, pueden relacionarse con los mecanismos de neurodegeneración presentes en la enfermedad.

En el análisis de los datos de la VRC en el grupo de migraña, hasta la fecha, nuestro estudio, es el primero enfocado en las consecuencias de la cronificación de la migraña en la función endotelial. Los estudios previos se han centrado sobre todo en la búsqueda de diferencias entre migraña con aura y migraña sin aura, pero no han tenido en cuenta la periodicidad de los ataques de migraña. En una revisión de la literatura disponible, hemos encontrado datos contradictorios en relación con las alteraciones asociadas a la migraña.

Recientemente, Akgün et al, han encontrado valores de BHI reducidos en pacientes diagnosticados de MC, pero únicamente estableciendo un grupo control de pacientes no migrañosos (243). En este trabajo, el BHI fue menor (~50%) durante el episodio migrañoso que en el periodo interictal. Los estudios dirigidos a mostrar las variaciones, teniendo en cuenta la presencia o ausencia de aura, han encontrado generalmente cifras de BHI más reducidas en aquellos con fenómeno de aura asociado. Así, por ejemplo, Silvestrini et al (166) publicaron valores menores de BHI en los pacientes diagnosticados de migraña con aura, aunque, en este caso, únicamente en la circulación posterior.

6.10. Otros marcadores ecográficos estudiados.

En nuestro trabajo hemos objetivado que los pacientes con EM presentan un CBF total, medido mediante ultrasonografía, significativamente menor que los controles sanos, aunque las diferencias encontradas han sido discretas ($p=0,046$). Estos resultados son similares a los encontrados en la literatura con otras técnicas de estudio, que han demostrado dicha alteración en la perfusión desde las fases iniciales de la enfermedad (160) (179). Sólo un estudio que empleó ecografía para medir el CBF total encontró valores ligeramente inferiores entre los pacientes con EM con respecto a los controles, aunque las diferencias no alcanzaron significación (244).

La medición del CBF ofrece información sobre los mecanismos de autorregulación cerebrales y su medición por ecografía puede constituir un marcador de respuesta terapéutica en el futuro, de fácil uso y reproducible, aunque, a diferencia de otras técnicas como la RM, no permite discernir la perfusión en las distintas áreas cerebrales, ni distinguir entre sustancia gris y blanca, por lo que debería ser complementada con esas otras técnicas. Se desconoce la causa del descenso en la perfusión cerebral obtenida en los pacientes con EM. Se consideró que podía ser secundaria a los procesos de degeneración axonal, pero esta teoría no ha podido ser demostrada (245). En la actualidad, existen crecientes evidencias de que algunos péptidos vasoconstrictores, como la endotelina 1, liberada a la circulación cerebral por los astrocitos de las áreas desmielinizadas, y que se encuentran elevados en los pacientes con EM, pueden estar involucrados en la reducción del CBF (246). Esta hipoperfusión resultante se ha planteado también como un potencial objetivo terapéutico, lo que justifica su estudio en nuestros pacientes (247).

Precisamente, la elevación de la endotelina y otros péptidos vasoactivos, como el CGRP, durante el periodo ictal, se ha relacionado con la patogenia de las crisis de migraña. En los pacientes migrañosos, aunque existen datos contradictorios (248), varios estudios han señalado un incremento de sustancias vasoactivas, como la vasopresina o la misma endotelina 1, en la fase ictal de las crisis migrañosas (249). Además, la endotelina puede estar implicada también en el fenómeno de depresión propagada y en los mecanismos neurogénicos asociados al dolor migrañoso (250). Esta asociación, y su potencial efecto en el descenso del CBF, explicaría los resultados obtenidos en nuestro trabajo, donde los pacientes con MC presentaban una CBF significativamente menor que los controles, por ser este grupo de pacientes los que presumiblemente presentan niveles más altos mantenidos por la frecuencia de las crisis.

En la última década, el estudio de la atrofia cerebral en pacientes con EM ha cobrado especial interés como potencial marcador de la enfermedad (251). Incluso, en algunos estudios, se ha relacionado el grado de atrofia con el status clínico de los pacientes, al encontrarse una correlación con la puntuación EDSS (252). Se acepta, como describe Pérez Miralles (253), que la atrofia cerebral se inicia en las fases más iniciales de la EM, aunque tenga una mayor relevancia en las fases avanzadas. Por otro lado, la tasa de progresión de la atrofia cerebral es mayor en pacientes con EM que en adultos sanos, sugiriendo que la atrofia podría ser un biomarcador relevante de neurodegeneración (254), e incluso relacionarse con el pronóstico de la enfermedad (255). En el presente trabajo, hemos estudiado el grado de atrofia usando el diámetro del III ventrículo. Nuestros resultados, acordes con lo descrito en la literatura (256), objetivan un incremento del diámetro sugerente de mayor atrofia cerebral en los pacientes con EM. En nuestro estudio, el grado de atrofia no muestra relación con la puntuación EDSS, a pesar de que los 2 pacientes con EM que presentaron un diámetro menor tenían una puntuación baja en la escala EDSS. Los resultados apoyan la existencia de un grado de atrofia presente desde las fases iniciales de la enfermedad.

El diámetro del III ventrículo sí se correlaciona con otros parámetros ecográficos estudiados. Hemos encontrado una correlación directa con el incremento del GIM, e inversa con la VDE. También existe una correlación inversa con los resultados de VRC. Éste es un hallazgo esperado, porque el incremento del III ventrículo que es indicativo de neurodegeneración, podría en parte ser debido al descenso de la VRC en los pacientes con EM, algo ya hipotetizado por Marshall en su estudio (242), al señalar que

la disfunción de la CVR en los pacientes con EM puede llevar a un inadecuado aporte sanguíneo de las demandas neuronales y, eventualmente, a la disfunción y muerte neuronal, y a la extensión de la neurodegeneración.

6.11. Correlaciones entre variables clínicas, bioquímicas y ultrasonográficas.

Analizamos a continuación la relación entre los resultados ultrasonográficos, los biomarcadores estudiados y las características clínicas de la muestra.

El grado de discapacidad de acuerdo con la puntuación EDSS se correlacionó con el desarrollo de aterosclerosis expresada como el incremento del GIM y también con la disminución del CBF, pero no con los otros parámetros estudiados. Sí que existió relación con marcadores de inflamación como la VSG. La ausencia de correlación de la EDSS con alguno de estos parámetros ultrasonográficos probablemente se deba a las propias características de la escala, ya que debe tenerse en cuenta que factores como la fatiga o la función cognitiva apenas son valoradas adecuadamente en la misma; en cambio, factores como una lesión medular pueden tener un alto impacto. Así, por ejemplo, otros trabajos tampoco han podido correlacionar el descenso del CBF con la puntuación en la escala EDSS (257), aunque en algunos casos se ha comprobado que la puntuación EDSS se correlaciona con la hipoperfusión a nivel regional en determinadas áreas cerebrales como la sustancia blanca periventricular y frontal (258).

La intensidad de la fatiga mostró también una correlación positiva con el GIM y la duración de la enfermedad, y negativa con la VDE y el BHI. No se demostró en el trabajo correlación entre la fatiga y el grado de discapacidad medido por la EDSS, algo ya descrito en estudios previos (259), y que puede estar influenciado también con la selección de los casos. La fatiga presente también desde fases iniciales de la enfermedad, se correlacionó con la duración de la enfermedad, y de forma significativa con los marcadores bioquímicos de inflamación. En nuestro trabajo, la fatiga se correlacionó con los valores de VSG, homocisteína y fibrinógeno. La asociación entre el grado de fatiga y los marcadores séricos de inflamación, aunque débil, ha sido descrita previamente. Giovannoni (260) no encontró una correlación con marcadores como ICAM o IFN- γ , pero sí con la PCR, mientras Heesen demostró niveles elevados de

citocinas inflamatorias en pacientes de EM con fatiga, sugiriendo que la fatiga en la EM está, al menos parcialmente, mediada por el componente inflamatorio (261).

Esta asociación apoya la hipótesis que postula que la fatiga asociada a la EM es causada por la inflamación asociada a la enfermedad (262). Dicha hipótesis justificaría la elevada prevalencia de la fatiga, que es un síntoma prominente en numerosas enfermedades crónicas. En este sentido, aunque en nuestro trabajo no hemos estudiado el grado de fatiga en el grupo de AR, existen en la literatura trabajos que han demostrado que los niveles de proteínas de fase aguda se correlacionan con la fatiga también en pacientes con AR (263), lo que justificaría un mecanismo común. Estas observaciones sugieren que, en el caso de las enfermedades inflamatorias, especialmente en la EM, la fatiga está asociada a una inflamación periférica más que central y evidenciable desde las primeras etapas de la enfermedad. Existen también teorías que consideran que la fatiga tiene un origen central, y aunque en el presente trabajo no hemos encontrado correlación entre ésta y el CBF, otros autores encontraron que la disminución de la perfusión en la sustancia gris en los pacientes con EM se correlacionaba con la intensidad de la fatiga (264).

También hemos encontrado relación entre los marcadores inflamatorios y las determinaciones ecográficas, sobre todo en el caso de la VSG, la PCR y el fibrinógeno que se correlacionaron de forma directa con los valores de GIM y BHI e inversamente con la VDE, por lo que su influencia en la fisiopatología endotelial podría detectarse a nivel estructural y funcional mediante la ecografía. Otros marcadores que han mostrado utilidad son la homocisteína, que se correlaciona con el GIM, y la apoB, que se correlaciona de forma inversa con la VDE.

Otros marcadores moleculares se han detectado mediante técnicas de ELISA. Tras una revisión de la literatura, se seleccionaron el ON y el FvW, ya que se tratan de sustancias íntimamente relacionadas con la función endotelial, que se han demostrado involucradas en distintos procesos fisiopatológicos y asociados al riesgo de enfermedad vascular.

En nuestros resultados, el FvW, una glicoproteína producida, almacenada y liberada en el endotelio, se encuentra elevada en el grupo EM frente los controles de forma significativa ($p=0,006$), pero también es mayor que en ambos grupos de migraña.

Además, el aumento del FvW se asocia de forma inversa con los resultados de la VRC y muestra una correlación con otros marcadores de inflamación como la VSG y el fibrinógeno. Estos resultados demuestran la asociación entre la actividad del FvW y los marcadores de inflamación presentes en la EM. La asociación del FvW con los marcadores inflamatorios, incluyendo otros como TNF- α y distintas interleucinas, ya ha sido previamente demostrada (265), sugiriendo una relación entre la inflamación y los procesos trombogénicos. La correlación con la VRC sería la consecuencia a nivel funcional de la disfunción endotelial provocada por la inflamación mantenida, y objetivada a nivel ecográfico. El incremento de las concentraciones de FvW en pacientes con EM ha sido descrito previamente. Spirin (266) sugirió la existencia de una disfunción endotelial tras encontrar niveles más altos de FvW en pacientes con EM que no recibían tratamiento. En otro estudio, Kohriyama (267) encontró, al igual que en nuestro trabajo, concentraciones más elevadas en los pacientes con EM, pero además objetivó que las concentraciones descendían tras el inicio de tratamientos inmunosupresores, sugiriendo su uso como potencial marcador de respuesta terapéutica.

En el resto de grupos estudiados, el FvW fue ligeramente mayor en los pacientes migrañosos, especialmente en el caso de la MC que en los controles. Dicho hallazgo es acorde con los datos publicados, que reflejan un incremento de la actividad del FvW en pacientes con migraña (268), como consecuencia de la existencia de una disfunción endotelial asociada (269). Aunque no se ha realizado estudio de FvW en nuestra muestra de pacientes con AR, una revisión de la literatura muestra, como era esperable, resultados similares a los que hemos encontrado en nuestros pacientes con EM. Recientemente, Ristic (270) ha descrito una asociación significativa entre la actividad del FvW y la presencia de aterosclerosis subclínica en pacientes con AR. En su estudio los pacientes con AR presentaron mayor FvW que los controles, asociándose también con marcadores inflamatorios y, en su caso, a un mayor GIM en pacientes sin antecedentes de riesgo cardiovascular, resultados similares a los reportados previamente en pacientes con AR (271), y similares a los que hemos obtenido en nuestros pacientes, donde a pesar de no haber encontrado una correlación significativa con el GIM, sí se observó una tendencia.

Por el contrario, a pesar de las evidencias que indican que el ON juega un papel importante en varios de los procesos fisiopatogénicos de la EM, incluyendo la alteración de la barrera hematoencefálica y los procesos desmielinizantes (272), y que algunos

estudios han descrito cambios en su concentración en respuesta a tratamientos, los valores de nuestro trabajo no han mostrado diferencias significativas. Se precisa replicar en el futuro los resultados, incluyendo un mayor número de sujetos en la muestra e incluyendo variables como el tratamiento recibido. El incremento objetivado en pacientes con migraña, ha sido previamente descrito en varios trabajos tanto durante las crisis migrañosas, como en el periodo intercrítico (273), confirmando su papel en la génesis de la migraña (274).

6.12. Células endoteliales progenitoras circulantes.

Las EPC también constituyen un marcador de la función endotelial. En nuestro trabajo, debido a las dificultades técnicas asociadas, el número de estudios realizado ha sido limitado. En el análisis hemos objetivado un menor número de CFU en los pacientes con EM que en los controles, y también era menor el número de colonias en los pacientes migrañosos con respecto a los controles, aunque en ninguno de los casos se alcanzaron diferencias significativas.

A pesar de que no hemos encontrado significación en nuestros datos, consideramos que es una línea de trabajo que debe ser implementada y completada. Se precisa un mayor número de casos para obtener resultados reproducibles. Aunque las EPC han sido estudiadas en numerosas patologías y su relación con el riesgo vascular es indiscutible, no hay estudios similares en pacientes con EM. En el caso de la migraña, varios estudios sí que han sido capaces de demostrar niveles menores de EPC en pacientes migrañosos con respecto a controles (39), y no sólo eso, sino que las EPC más envejecidas y con menor capacidad migratoria se encuentran aumentadas en pacientes con MC (58), sugiriendo una baja capacidad de regeneración del endotelio en estos pacientes. Esta tendencia es la que se encuentra presente en nuestros resultados. Estos hallazgos, mantenidos en el tiempo, podrían dar lugar a largo plazo, a alteraciones en la función endotelial detectables por el resto de marcadores utilizados en el presente trabajo. Se precisa por consiguiente de futuros estudios para conocer el impacto real de las EPC en ambas patologías.

6.13. Comparación de los resultados con el grupo de AR.

Los resultados de las variables estudiadas se han contrastado con un grupo comparador activo que aporta consistencia y valor a nuestros resultados. Se escogió la AR por la similitud existente en alguno de los mecanismos fisiopatogénicos con la EM, y por la amplia variedad de datos y estudios que han demostrado el incremento del riesgo de enfermedad cardiovascular, y la existencia de alteraciones en alguna de las variables estudiadas.

La AR, al igual que la EM, es una enfermedad inflamatoria crónica, sus principales manifestaciones son articulares, pero también pueden aparecer manifestaciones extraarticulares a lo largo de su evolución. De diagnóstico fundamentalmente clínico, la actividad inflamatoria de la enfermedad se valora con parámetros clínicos, que determinan los criterios de actividad de la enfermedad (Disease Activity Score) en 28 articulaciones (275) y mediante la determinación de parámetros bioquímicos, a través de los reactantes de fase aguda como los estudiados en nuestro trabajo (VSG y PCR). Al igual que en la EM, la etiopatogenia permanece en gran parte desconocida, y como en ésta, se postula la existencia de una base genética y factores inmunorreguladores.

Otra similitud y uno de los motivos de selección de la AR como comparador activo con las enfermedades neurológicas estudiadas, es el incremento de la incidencia de enfermedades vasculares, independiente de otros factores de riesgo y la mayor mortalidad cardiovascular (86) que la población de la misma edad, debido al desarrollo demostrado en la AR de una aterogénesis acelerada (177). La disfunción endotelial es el componente inicial del desarrollo de aterogénesis, y su estudio ha permitido la detección de la misma desde las fases iniciales de la enfermedad, además de conocimiento de los potenciales efectos beneficiosos de los tratamientos sobre la misma. Describimos a continuación los principales hallazgos en la comparación con la AR encontrados en nuestro estudio.

En nuestro trabajo hemos demostrado, mediante el estudio no invasivo ultrasonográfico del sistema carotídeo, la presencia de enfermedad aterosclerótica macrovascular en los pacientes con EM. El GIM resultó mayor en los pacientes con EM que en el grupo de AR, que por su parte, presentó un GIM mayor que los controles, de

forma concordante con los datos que se encuentra descritos en la literatura (276). Las diferencias entre EM y AR son más relevantes, teniendo en cuenta que la media de edad es aproximadamente 10 años mayor en los pacientes con AR, y a pesar de que el número de placas de ateroma sí era más elevado en este último grupo. Una posible hipótesis que explicaría estos hallazgos, es que los pacientes del grupo de AR presentaban una larga historia terapéutica, incluyendo fármacos biológicos. Aunque no se ha realizado subanálisis en función de los tratamientos recibidos dado lo limitado de la muestra, se conoce que el tratamiento puede tener efectos beneficiosos en la progresión de la aterosclerosis subclínica en la AR (277), por lo que es probable, que el GIM no haya progresado tanto como en los pacientes con EM. En ambas entidades se objetiva que los cambios se producen desde las fases iniciales de la enfermedad.

En el estudio de la función endotelial sistémica, los resultados fueron similares entre el grupo de EM y los pacientes con AR, y únicamente tras ajuste por el hábito tabáquico se encontraron diferencias significativas entre ambos. La clara diferencia de ambos grupos con respecto a los controles avala la existencia de una alteración en el correcto funcionamiento del endotelio en ambas enfermedades. Alteración que en el caso de la AR, ya ha sido demostrada (278) y validada en diferentes trabajos (279). El mecanismo común en ambas enfermedades para el desarrollo de esta disfunción endotelial sería la inflamación, que mantenida en el tiempo, es capaz de poner en marcha los mecanismos que conducen a la aterogénesis. En conclusión, puede afirmarse que la disminución de los valores de VDE en la arteria braquial en ambas patologías apoya el potencial valor de su determinación para establecer la presencia de disfunción endotelial asociada a la enfermedad y puede suponer la base de la asociación entre la AR, y la EM con la enfermedad aterosclerosa.

Es sorprendente la ausencia de diferencias en los valores de VRC entre los pacientes con EM y AR, siendo sus valores prácticamente superponibles en la circulación cerebral anterior. Los cambios hemodinámicos en la circulación cerebral no han sido clásicamente objeto de estudio en los pacientes con AR, y únicamente hemos encontrado en la literatura un trabajo que, de forma parcial, describe la existencia de una alteración de la VRC en pacientes con AR independientemente del antecedente de hipertensión, y asociando los resultados con la alteración simultánea de la VDE braquial (280). A pesar de la ausencia de estudios dirigidos a valorar la VRC en pacientes con AR, la existencia de la misma no debería extrañar. Considerando que la alteración en la

VRC se asocia a un mayor riesgo de ictus y enfermedad cerebrovascular isquémica, patologías de mayor incidencia en la AR que en la población general, y que la capacidad de autorregulación cerebral se pierde en situaciones como la inflamación (76), es probable que los pacientes con AR presenten también una alteración de la reserva hemodinámica cerebral asociada. Los hallazgos de nuestro trabajo deberán ser replicados en el futuro, incluyendo la circulación posterior, no estudiada entre los pacientes con AR en el presente trabajo, pero abren una nueva línea de investigación y un potencial nuevo marcador de la respuesta terapéutica en los pacientes con AR.

Más sorprendente si cabe, es el hallazgo de una disminución del CBF en los pacientes con AR, no únicamente en comparación con el grupo control, sino que también se encontró reducido en relación con el grupo de EM. En este caso los estudios disponibles también son limitados, aunque apoyarían nuestros resultados. Alteraciones en el CBF se han descrito en otras patologías reumatológicas, como el síndrome de Sjögren (281) y el LES (282). En la AR, Bartolini (283) describió mediante SPECT cerebral que el 85% de los pacientes tenía una hipoperfusión de los lóbulos frontales, y hasta el 40% a nivel parietal. Una posible explicación se expone en el trabajo de Rafteri et al (284). Aunque no lograron demostrar cambios longitudinales en el CBF en respuesta a los tratamientos, postularon que si el TNF α es capaz de influenciar el CBF como se ha demostrado a nivel experimental (285), entonces, los niveles elevados mantenidos propios de la AR [y también manifiestos en otras patologías como la EM (286)] podrían estar implicados en las alteraciones del CBF objetivadas en los pacientes.

Como era de esperar, existieron diferencias significativas entre el grupo de EM y los pacientes con AR en los resultados de la medición del III ventrículo. El grado de atrofia cerebral fue significativamente mayor en los pacientes con EM, a pesar de la ausencia de diferencias en otros valores como la CVR. Las diferencias posiblemente se deban a que la atrofia es consecuencia de la neurodegeneración, componente fundamental en el caso de la EM, y no únicamente al componente inflamatorio. En nuestro trabajo no hemos encontrado mayor grado de atrofia en los pacientes con AR que en el grupo control, existiendo unos valores muy homogéneos entre los sujetos de la muestra. A pesar de que algunos estudios han señalado un aumento de la sustancia gris en los núcleos basales y una disminución del volumen intracraneal en pacientes con AR (287), otros estudios no han podido demostrar más que una tendencia a una mayor

atrofia cerebral y cerebelosa en el subgrupo de pacientes con AR grave de más de 15 años de evolución (288).

6.14. Consideraciones finales.

En el presente trabajo se ha demostrado que los pacientes con EM y sin evidencia clínica de enfermedad cardiovascular, presentan una disfunción endotelial como estadio precoz del desarrollo de enfermedad aterosclerosa. Además, los hallazgos son similares a los objetivados en otras patologías inflamatorias crónicas, como la AR, y de mayor intensidad a los presentados en los pacientes migrañosos.

Las técnicas seleccionadas, tanto a nivel molecular, como ultrasonográfico, han demostrado su utilidad en el estudio de la función endotelial, además de existir una correlación entre los resultados obtenidos con las distintas técnicas de estudio, y permitir estudios longitudinales en el futuro. Todo ello pone de relieve que la inflamación, mantenida de una forma crónica, es capaz de originar cambios en el normal funcionamiento del endotelio vascular, y que dichos cambios pueden ser identificados con las técnicas actuales.

Aunque entre los objetivos de la presente Tesis Doctoral no se encontraba indagar en la etiopatogenia ni la fisiopatología de la enfermedad, es posible que los hallazgos encontrados traduzcan, al menos parcialmente, los complejos mecanismos inmunitarios de la enfermedad, cuyas consecuencias se manifiestan también a nivel sistémico. Los resultados obtenidos pueden servir además como punto de partida para futuras investigaciones. Entre ellas, destacaría en primer lugar el conocimiento de si la disfunción endotelial descrita es al menos parcialmente reversible con los tratamientos modificadores de la enfermedad. En el trabajo se describe como existe una tendencia a la mejoría del BHI en los pacientes tratados, sobre todo entre aquellos que reciben fármacos de segunda línea, que son los que han demostrado una eficacia mayor en el control a largo plazo de la enfermedad. El número reducido de pacientes puede ser la causa de la ausencia de significación encontrada. Se hace por tanto preciso el diseño de un estudio más amplio dirigido a conocer dichos cambios. Por otra parte, cambios similares han sido descritos en el comparador activo utilizado, la AR. Así por ejemplo, existen estudios que han mostrado una reducción de la mortalidad cardiovascular en pacientes con AR en tratamiento con metotrexato (289), y un anticuerpo monoclonal

anti-TNF α , adalimumab, ha demostrado mejorar la función endotelial en pacientes con AR refractaria estudiando los cambios en la VDE (290). Dada la existencia de una disfunción endotelial en ambas entidades, en la cual, en ausencia de otros factores intercurrentes, la inflamación crónica es el origen de la misma, sería esperable también una mejoría similar en los pacientes con EM tratados.

Nuestro estudio tiene algunas limitaciones. La población estudiada es reducida y se ha extraído de las consultas especializadas de un hospital de tercer nivel, por tanto, pueden existir sesgos de selección. Por otra parte, aunque existe una baja proporción de varones, lo que podría influir en alguna de las determinaciones realizadas, no se ha demostrado que los biomarcadores empleados en este estudio varíen en función del sexo. El sexo podría dar lugar a diferencias en los valores de VDE dado que el diámetro basal tiende a ser menor en las mujeres que en los hombres, por razones anatómicas, y los estrógenos pueden condicionar una mejor respuesta vasodilatadora. Sin embargo, debe considerarse que en el análisis entre los diferentes grupos clínicos no existen diferencias en la relación entre hombres y mujeres, por lo que no esperaríamos que influyese en nuestros resultados. En segundo lugar, aunque se ha pareado la muestra por edad (excepto en el caso de los pacientes con AR, donde la edad se ha considerado en el análisis), otras variables podrían influenciar los resultados por la complejidad de los grupos estudiados. No obstante, se han seleccionado sujetos sin antecedentes de enfermedades cardiovasculares, se ha eliminado cualquier sustancia vasoactiva que pudiese influir en los resultados, y ninguno de los pacientes con EM habían recibido tampoco tratamiento esteroideo reciente, además de ajustar los valores de p por las distintas variables de confusión. En el caso de los pacientes con AR sí existían diferencias significativas en la media de edad con el resto de grupos. En este sentido, debe señalarse que se ha objetivado que la edad no ejercía influencia en los resultados de la VDE, sino únicamente el tabaquismo, lo que concuerda con estudios clásicos (291). Sin embargo, la edad sí influye en los resultados del GIM, donde sorprendentemente hemos encontrado valores más elevados en los pacientes con EM a pesar de ser más jóvenes. En tercer lugar, y por razones prácticas, el examinador que ha realizado los estudios de ecografía no estaba ciego con respecto a la historia de los participantes. Este hecho se ha tratado de corregir al no realizarse las mediciones en ese momento. El análisis de las imágenes se realizó a la finalización del estudio y usando un sistema numérico para codificar los estudios. Por último, como se ha señalado, no se ha

estudiado el impacto de la progresión de la enfermedad y de las diferentes opciones terapéuticas en las variables utilizadas, lo que deberá ser efectuado en futuras investigaciones.

Entre las fortalezas del estudio figuran un adecuado tamaño muestral, en el que existe un elevado número de sujetos en cada uno de los grupos clínicos, lo que aportan consistencia al estudio. Además, la precisión del diagnóstico clínico, que fue realizado por un neurólogo experto, permitió la exclusión de pacientes con EM secundariamente progresiva o primariamente progresiva, permitiendo homogeneizar la muestra y evitar posibles factores de confusión. En el caso de la migraña permitió una adecuada distinción entre ME y MC. Además, se llevó a cabo una anamnesis y una revisión de los datos clínicos exhaustivo, para evitar los factores de confusión. Los estudios moleculares fueron realizados por una experta bióloga y el análisis se realizó tras la extracción de las muestras, manteniendo en todo momento la cadena de custodia.

En conclusión, nuestro estudio intenta analizar de forma global la función endotelial y su influencia en la fisiopatología de las enfermedades inflamatorias. Los resultados obtenidos en los marcadores utilizados permiten demostrar la presencia de una disfunción endotelial, expresada como aterosclerosis subclínica en pacientes con EM y sin evidencia de eventos vasculares previos. Además, también existe un grado de disfunción endotelial asociada a la migraña, especialmente en el caso de la MC.

Nuestros resultados resaltan la importancia de la inflamación crónica, que se establece como un componente fundamental del proceso de disfunción endotelial. Puede concluirse, que nuestro estudio muestra una relación entre las patologías estudiadas y la disfunción endotelial, tanto a nivel sistémico como cerebral, al alterarse tanto el BHI en las arterias cerebrales como la VDE en la arteria braquial, además de mayores índices de GIM en comparación con los controles.

Se requieren nuevos estudios que repliquen nuestros resultados, y el siguiente objetivo será corroborar la reversibilidad de estas alteraciones endoteliales en los pacientes con EM mediante la optimización de los procedimientos terapéuticos y la búsqueda de terapias destinadas a retrasar el desarrollo y progresión de la enfermedad aterosclerótica y poder así disminuir las complicaciones cardiovasculares de nuestros pacientes.

7. CONCLUSIONES

- Los pacientes con EM sin evidencia de enfermedad cardiovascular previa presentan una disfunción endotelial asociada.
- La alteración de la función endotelial puede ser estudiada mediante los estudios ultrasonográficos y moleculares empleados en el trabajo.
- Los pacientes con EM presentan enfermedad cardiovascular subclínica, objetivada mediante el incremento del GIM con respecto a los controles, y también frente a los comparadores activos (migraña y AR).
- Hemos encontrado alteración en la función endotelial medida mediante VDE y VRC en los pacientes con EM en comparación con los controles. Dicha alteración es similar a la existente en los pacientes con AR.
- En los pacientes con EM, la alteración de la función endotelial medida por ultrasonografía se asocia con los cambios a nivel molecular y celular estudiados. La utilización de EPC y otros estudios moleculares (FvW) puede ser de interés en la monitorización de la respuesta de los fármacos modificadores de la enfermedad.
- La disfunción endotelial objetivada en los pacientes con EM y en los otros grupos de comparación de nuestro trabajo se correlaciona con la respuesta inflamatoria crónica sistémica, determinada por los niveles plasmáticos de distintos marcadores inflamatorios (VSG, PCR, homocisteína).
- La disfunción endotelial se ha mostrado presente desde las fases iniciales de la enfermedad.
- El incremento de la mortalidad en los pacientes con EM objetivado en diversas series internacionales puede ser explicado por el desarrollo acelerado de aterosclerosis que facilita el desarrollo de enfermedad vascular.
- La neurodegeneración, aunque de mecanismos fisiopatológicos parcialmente desconocidos, se encuentra presente también desde las fases iniciales de la enfermedad.

CONCLUSIONES

- La fatiga medida en la escala FSS ha mostrado más correlación con los marcadores clínicos y ecográficos que la discapacidad de acuerdo a la escala EDSS, aunque en ambas existió correlación con los niveles plasmáticos de marcadores inflamatorios.
- Se precisan futuros estudios que investiguen la influencia de las intervenciones terapéuticas en la historia natural de la enfermedad aterosclerótica de los pacientes con EM.
- Se ha objetivado la presencia de una alteración de la función endotelial también en los pacientes migrañosos, especialmente en el caso de la migraña crónica, que da lugar a cambios moleculares y hemodinámicos detectables con las técnicas de ultrasonografía.

8. BIBLIOGRAFÍA

1. *Points of control in inflammation*. Nathan, C. Nature 2002. 420:846-852.
2. *Cancer-related inflammation*. Mantovani A, Allavena P, Sica A, Balkwill F. Nature 2008 Jul 24; 454(7203):436-44.
3. *Robbins basic pathology*. Kumar V, Cotran RS, Robins SL. Sanders 2003.
4. *Innate immunity*. Hoffman J, Akira S. Curr Opin Immunol 2013 Feb; 25(1):1-3.
5. *Origin and physiological roles of inflammation*. Medzhitov, R. Nature 2008 Jul 24; 454(7203):428-35. .
6. *Pathogen recognition and innate immunity*. Akira et al. Cell 2006 Feb 24; 124(4):783-801.
7. *The phenomenon of acute phase response*. Kusher I. s.l. : Ann N Y Acad Sci 1982; 389:39.
8. *Celular and molecular mechanisms of chronic inflammation-associated organ fibrosis*. Ueha S, Shand FH, Matsushima K. Front Immunol 2012 Apr 10; 3:71.
9. *Inflammation in atherosclerosis*. Libby P. Nature 2002; 420:868–874.
10. *The immune response in atherosclerosis: a doubled edged sword*. Hansson GK, Libby P. Nat Rev Immunol 2006; 6:508–519.
11. *Rheumatoid arthritis*. Lee DM, Weinblatt ME. Lancet 2001 Sep 15; 358(9285):903-11.
12. *Systemic infections and inflammation affect chronic neurodegeneration*. Perry VH, Cunningham C, Holmes C. Nat Rev Immunol 2007; 7:161-167.
13. *Atherosclerosis an inflammatory disease*. R., Ross. N Engl J Med 1999 Jan 14; 340:115-126.
14. *Inflammation and Atherosclerosis*. Hansson GK, Robertson AK, Soderberg-Naucler C. Annu Rev Pathol 2006; 1:297–329.
15. *Macrophage death and defective inflammation resolution in atherosclerosis*. Tabas I. Nat Rev Immunol 2010; 10:36 – 46.
16. *Atherosclerotic vascular disease conference: Writing group III: Pathophysiology*. Faxon DP, Fuster V, Libby P, et al. Circulation 2004; 109:2617.
17. *A definition of advanced types of atherosclerotic lesions and a histological classification of atherosclerosis. A report from the Committee on Vascular Lesions of the Council on Arteriosclerosis. American Heart Association*. Stary HC, Chandler AB, Dinsmore RE, Fuster V, Glagov S, Insull W Jr, et al. Vols. Arterioscler Tromb Vasc Biol 1995 Sep; 15(9):1512-31.
18. *Progress and challenges in translating the biology of atherosclerosis*. Libby P, Ridker PM, Hansson GK. Nature 2011; 473 (7347):317.
19. *Atherosclerosis across 4000 years of human history: the Horus study of four ancient populations*. Thomason RC et al. Lancet 2013 Apr 381(9873):1211-22.

20. *Leonardo da Vinci's views on arteriosclerosis*. Keele KD. Med Hist 1973 Jul; 17(3):304-308.
21. *Phologose und thrombose in gefass-system*. Virchow, R. Berlin. Gesammelte Abhandlungen fur Wissenschaftlichen Medizin, 1856.
22. *Validation of the Framingham coronary heart disease prediction scores: results of a multiple ethnic groups investigation*. D'Agostino. JAMA 2001 Jul 11; 286(2):180-7.
23. *A defintion of advanced types of atherosclerosis lesions and a histological classification of atherosclerosis. A report of the Committee on Vascular Lesions of the Council of Arteriosclerosis*. Stary HC et al. Circulation 1995 Sep 1; 92(5):1355-1374.
24. *Blood vessels*. Cliff WJ. Cambridge University Press. New York, 1976.
25. *The endothelium and thrombosis*. Gross PL, Aird WC. Sem Thromb Hemost 2000; 26: 463.
26. *Nitric oxide sinthase isozymes. Characterization, purification, molecular cloning and functions*. Försterman V, Closs EI, Pollock JS, et al. Hypertension 1994; Jun 23 (6, Pt 2):1121-31.
27. *Predicting the development of atherosclerosis*. Steffel J, Lüscher TF. Circulation 2009; 119:919-921.
28. *Endothelial dysfunctions: common denominators in vascular disease*. R, De Caterina. Curr Opin Lipidol 2000 Feb; 11(1):9-23.
29. *Impaired endothelium dependent vasodilation in renal failure in humans*. Annuk H, Lind L, Linde T, Fellstöm B. Nephrol Dial Transplant 2001; 16:302-306.
30. *Association between insulin resistance and endothelial dysfunction in type 2 diabetes and the effects of pioglitazone*. Suzuki M, Takamisawa I, Yoshimasa Y, Harano Y. Diabetes Res Clin Pract. 2007; 76:12-17.
31. *The pathophysiology of target organ damage in hypertension*. Karpf M, Lip GV. Minerva Cardioangiol 2006; 54:417-429.
32. *Endothelial dysfunction in heart failure*. Bauersachs J, Widder JD. Pharmacol Rep 2008; 60:119-126.
33. *Endothelial dysfunction and the metabolic syndrome*. McVeigh GE, Cohn JN. Curr Diab Rep 2003; 3:87-92.
34. *Endothelial dysfunction induced by hyperhomocysteinemia: role of asymmetric dimethylarginine*. Stuhlinger et al. Circulation 2003; 108:933-938.
35. *Endothelial dysfunction associated with oxidative stress in human*. Matsuoka H. Diabetes Res Clin Pract 2001; 54 Suppl 2:S65-72.
36. *Low-grade systemic inflammation causes endothelial dysfunction in patients with Hashimoto's thyroiditis*. Taddei S, et al. J Clin Endocrinol Metab 2006; 91:5076-5082.

37. *Interleukine 6 in Biology and Medicine*. Akira S, Taga T, Kishimoto T. *Adv Immunol* 1993; 54:1-78.
38. *Explaining how "high-grade" systemic inflammation accelerates vascular risk in rheumatoid arthritis*. Sattar et al. *J Rheumatol* 1997; 24:1477-1485.
39. *Decreased number and function of endothelial progenitor cells in patients with migraine*. Lee ST, Chu K, Jung KH, et al. *Neurology* 2008; 70:1510-1517.
40. *Genetically elevated C-reactive protein and ischemic vascular disease*. Zacho J, Tybjaerg-Hansen A, Jensen JS, et al. *N Engl J Med* 2008; 359:1897.
41. *Structure of the mouse C-reactive protein gene*. Ohnishi S, Maeda S, Nishiguchi S, Arao T, Shimada K. *Biochem Biophys Res Commun* 1988, 156:814-822.
42. *Complement and atherogenesis. Binding of CRP to degraded, nonoxidized LDL enhances complement activation*. Bhakdi S, Torzewski M, Klouche M, Hemmes M. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1999; 19: 2348-2354.
43. *A self-fulfilling prophecy: C-reactive protein attenuates nitric oxide production and inhibits angiogenesis*. Verma S, Wang CH, Li SH, et al. *Circulation* 2002; 106: 913-919.
44. *Modulation of C-reactive protein-mediated monocyte chemoattractant protein-1 induction in human endothelial cells by anti-atherosclerosis drugs*. Pasceri V, Chang J, Willerson JT, et al. *Circulation* 2001; 103: 2531-2534.
45. *Decreased activity of the L-arginine-nitric oxide metabolic pathway in patients with congestive heart failure*. Kaz SD, Khan T, Zeballos GA, et al. *Circulation* 1999; 99:2113.
46. *Nitric oxide metabolites, prostaglandins and trigeminal vasoactive peptides in internal jugular vein blood during spontaneous migraine attacks*. Sarchielli P, Alberti A, Codini M, Floridi A, Gallai V. *Cephalalgia* 2000 Dec; 20(10):907-18.
47. *Inflammation, as Measured by the Erythrocyte Sedimentation Rate, Is an Independent Predictor for the Development of Heart Failure*. Ingelsson et al. *J Am Coll Cardiol* 2005; 45:1802-6.
48. *Association of fibrinogen, C-reactive protein, albumin, or leukocyte count with coronary heart disease: meta-analyses of prospective studies*. Danesh J, Collins R, Appleby P, Peto R. *JAMA* 1998 May 13; 279(18):1477-82.
49. *Fibrinogen in relation to personal history of prevalent hypertension, diabetes, stroke, intermittent claudication, coronary heart disease, and family history: the Scottish Heart Health Study*. Lee Aj, Lowe GDO, Woodward M, et al. *Br. Heart J* 1993; 69:338-342.
50. *Fibrinogen and risk for cardiovascular disease*. Kannel WB, Wolf PA, Castelli WP, et al. *JAMA* 1987; 258:1183-1186.
51. *Plasma lipoprotein(a) levels and expression of the apolipoprotein(a) gene are dependent on the nucleotide polymorphisms in its 5'-flanking region*. Suzuki et al. *J Clin Invest* 1997 Mar 15; 99(6):1361-1366. .

52. *Elevated plasma concentrations of lipoprotein (a) in patients with end-stage renal disease are not related to the size polymorphism of apolipoprotein (a).* Dieplinger H, Lackner C, Kronenberg F, et al. *J Clin Invest* 1993; 91:397–401.
53. *Prospective study of markers of hemostatic function with risk of ischemic stroke.* Folsom AR, Rosamond WD, Shahar E, et al. *Circulation* 1999 Aug 17; 100(7):736-42.
54. *Vascular cell adhesion molecule-1 mediates lymphocyte adherence to cytokine-activated cultured human endothelial cells.* Carlos TM, Schwartz BR, Kovach NL, Yee E, Rosa M, Osborn L, Chi-Rosso G, Newman B, Lobb R, Harlan JM. *Blood* (1990) 76:965–970.
55. *Vascular cell adhesion molecule-1 expression and signaling during disease: regulation by reactive oxygen species and antioxidants.* Cook-Mills et al. *Antiox Redox Signal* 2011 Sep 15; 15(6):1607-38.
56. *Isolation of putative progenitor cells for angiogenesis.* Asahara T, Murohara T, Sullivan A, Silver M, van der Zee R, Li T, Witzenbichler B, Schatteman G, Isner JM. *Science* 1997 Feb 14; 275 (5302):964-7.
57. *Circulating endothelial progenitor cells, vascular function, and cardiovascular risk.* Hill JM, Zalos G, Halcox JP, Schenke WH, Wacławski MA, Quyyumi AA, Finkel T. *N Engl J Med*, 2003 Feb 13; 348(7): 593-600.
58. *Analysis of endothelial precursor cells in chronic migraine: a case-control study.* Oterino A, Toriello M, Palacio E, Quintanilla VG, Ruiz-Lavilla N, Montes S, Vega MS, Martínez Nieto R, Castillo J, Pascual J. *Cephalalgia* 2013 Mar; 33(4):236-44.
59. *Close relation of endothelial function in the human coronary and peripheral circulations.* Anderson TJ, Uehata A, Gerhard MD, et al. *J Am Coll Cardiol* 1995; 26:1235-1241.
60. *Endothelial function testing.* Csiba L. *Front Neurol Neurosci* 2006; 21:27-35.
61. *Guidelines for the ultrasound assessment of endothelial-dependent flow-mediated.* Corretti MC, Anderson TJ, Benjamin EJ, Celermajer D, Charbonneau F, Creager MA, Deanfield J, Drexler H, Gerhard-Herman M, Herrington D, Vallance P, Vita J, Vogel R. *J Am Coll Cardiol* 2002; 39:257-265.
62. *Clinical correlates and heritability of flow-mediated dilation in the community: the Framingham heart study.* Benjamin EJ, Larson MG, Keyes MJ, Mitchell GF, Vasan RS, Keaney JF, Jr., Lehman BT, Fan S, Osypiuk E, Vita JA. *Circulation* 2004; 109:613-619.
63. *Impaired cerebral CO₂ vasoreactivity: association with endothelial dysfunction.* Lavi S, Gaitini D, Milloul V, Jacob G. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2006; 291:H1856-1861.
64. *Endothelial function in patients with migraine during the interictal period.* Silva FA, Rueda-Clausen CF, Silva SY, Zarruk JG, Guzman JC, Morillo CA, Vesga B, Pradilla G, Flórez M, López-Jaramillo P. *Headache* 2007; 47:45-51.
65. *Increased cerebrovascular pCO₂ reactivity in migraine with aura: a transcranial doppler study during hyperventilation.* Thomsen LL, Iversen HK, Olesen J. *Cephalalgia* 1995; 15:211-215.

66. *Altered arterial function in migraine of recent onset.* Vanmolkot FH, Van Bortel LM, de Hoon JN. *Neurology* 2007; 68:1563-1570.
67. *Prediction of clinical cardiovascular events with carotid intima-media thickness: a systematic review and meta-analysis.* Lorenz MW, Markus HS, Bots ML, Rosval M, Sitzer M. *Circulation* 2007; 115:459-467.
68. *Carotid intima-media thickness is only weakly correlated with the extent and severity of coronary artery disease.* Adams MR, Nakagomi A, Keech A, Robinson J, McCredie R, Bailey BP, et al. *Circulation*. 1995; 92:2127-34.
69. *Effect of carotid atherosclerosis screening on risk stratification during primary cardiovascular disease prevention.* Bard RL, Kalsi H, Rubenfire M, Wakefield T, Fex B, Rajagopalan S, et al. *Am J Cardiol* 2004; 93:1030-2.
70. *Carotid artery intima media thickness measured by ultrasonography in normal clinical practice correlates well with atherosclerosis risk factors.* Baldassarre D, Amato M, Bondioli A, Sirtori CR, Tremori E. *Stroke* 2000 Oct; 31(10):2426-30.
71. *Carotid artery intima and media thickness as a risk factor for myocardial infarction and stroke in older adults.* Cardiovascular health Study Collaborative Research Group. O'Leary DH et al. *N Engl J Med* 1999; 340:14-22.
72. *Carotid intima-media thickness measurements in intervention studies: design options, progressive rates, and sample size considerations: a point of view.* Bots MI, Evans GW, Riley WA, Grobbee DE. *Stroke* 2003; 34:2985-94.
73. *Vascular age: integrating carotid intima-media thickness measurements with global coronary risk assessment.* Stein et al. *Clin Cardiol*. 2004 Jul; 27(7):388-92.
74. *Phase relationship between cerebral blood flow velocity and blood pressure. A clinical test of autoregulation.* Diehl RR, Linden D, Lucke D, Berlit P. *Stroke* 1995; 26:1801-1804.
75. *Cerebral blood flow and cerebral metabolic rate of oxygen requirements for cerebral function and viability in humans.* Powers WJ, Grubb RLJ, Darriet D, Raichle ME. *J cereb Blood Flow Metab* 1985; 5:600-608.
76. *Autoregulation of cerebral blood flow in experimental focal brain ischemia.* Dirnagl U, Pulsinelli W. *J. Cereb Blood Flow Metab* 1990; 10:327-36.
77. *Non invasive assesment of CO2 induced cerebral vasomotor response in normal individuals and patients with internal carotid artery occlusions.* Ringelstein EB, Sievers C, Ecker S, Schneider PA, Otis SM. *Stroke* 1998; 19:963-9.
78. *Estimation of cerebrovascular reactivity using transcranial Doppler, including the use of breath-holding as the vasodilatory stimulus.* Markus HS, Harrison MJ. *Stroke* 1992 May; 23(5):668-73.
79. *99mTc-d, I-HMPAO and SPECT of the brain in normal aging.* Waldemar G, Hasselbalch SG, Andersen AR, et al. *J cereb Blood Flow metab* 1991; 11:508-521.

80. *Effect of age on cerebral blood flow: measurement with ungated two dimensional phase-contrast MR angiography in 250 adults.* Buijs PC, Krabbe-Hartkamp MJ, Bakker CJ, et al. Radiology 1998; 209:667-674.
81. *Ultrasonographic measurement of cerebral blood flow, cerebral circulation time and cerebral blood volume in vascular and Alzheimers demetia.* Schreiber SJ, Doepp F, Spruth E, Kopp UA, Valdueza JM. J. Neurol 2005; 252:1171-1177.
82. *Biomarkers for cardiovascular risk assesment in autoimmune diseases.* Teixeira PC, Ferber P, Vuilleumier N, Cutler P. Proteomics Clin Appl 2015 Feb; 9 (1-2):48-57.
83. *Length of life and cause of death in rheumatoid arthritis.* Cobb S, Anderson F, Bauer W. N Engl J Med 1953 Oct 1; 249 (14):553-6.
84. *Cardiovascular disease in autoimmune rheumatic diseases.* Hollan I, Meroni PL, Ahearn JM, Cohen Tervaert JW, Curran S, Goodyear CS. Autoimm Rev 2013 Aug; 12(10):1004-15.
85. *Longterm mortality outcome in patients with rheumatoid arthritis: early presenters continue to do well.* Symmonds DP, Jones MA, Scott DL, Prior P. J Rheumatol 1998; 25:1072-1077.
86. *Cardiovascular risk factors, including trombotic variables, in a population with rheumatoid arthritis.* McEntegart A, Capell HA, Creran D, Rumley A, Woodward M, Lowe GD. Rheumatology (Oxford) 2001; 40:640-644.
87. *Increased prevalence of severe subclinical atherosclerotic findings in long-term treated rheumatoid arthritis patients without clinically evident atherosclerotic disease.* González-Juanatey C, Llorca J, Testa A, Revuelta J. Medicine (Baltimore) 2003; 82:407-413.
88. *Endothelial dysfunction in patients with rheumatoid arthritis is associated with a reduced number and impaired function of endothelial progenitor cells.* Herbrig K, Haensel S, Oelschlaegel U, Pistrosch F, Foerster S, Passauer J. Ann Rheum Dis 2006 Feb; 65(2):157-63.
89. *Anti-tumor necrosis factor-alpha treatment improves endothelial function in patients with rheumatoid arthritis.* Hurlimann D et al. Circulation 2002 Oct 22, 106(17):2184-7.
90. *Correlation between endothelial function and carotid atherosclerosis in rheumatoid arthritis patients with long-standing disease.* González-Juanatey C, Llorca J, González-Gay MA. Arthritis Res Ther 2011 Jun 22; 13(3):R101.
91. *Antitumor necrosis factor-alpha treatment improves endothelial function in patients with rheumatoid arthritis.* Hurlimann D, Forster A, Noll G, Enseleit F, Chenevard R, Distler O, Bechir M, Spieker LE, Neidhart M, Michel BA, Gay RE, Luscher TF, Gay S, Ruschitzka F. Circulation 2002; 106:2184-2187.
92. *Cardiovascular risk in rheumatoid arthritis: comparing TNF-alpha blockade with nonb iologic DMARDs.* Solomon DH, Curtis JR, Saag KG, Lii J, Chen L, Harrold LR, Herrinton LJ, Graham DJ, Kowal MK, Kuriya B, Liu L, Griffin MR, Lewis JD, Rassen JA. s.l. : Am J Med. 2013 Aug; 126(8):730.e9-730.e17.
93. *Migraine as a systemic vasculopathy.* Tietjen GE. Cephalalgia 2009 Sep; 29(9):987-96.

94. *Endothelium dependent vasodilatation in migraine patients*. Perko D, Pretnar-Oblak J, Sabovic M, Zvan B, Zaletel M. *Cephalalgia* 2011 Apr; 31(6):654-60.
95. *Endothelial function in migraine: a cross-sectional study*. Vanmolkot FH, de Hoon JN. *BMC Neurol* 2010 Dec 1; 10:119.
96. *Migraine and stroke: current perspectives*. Elliot D. *Neurol Res* 2008 Oct; 30(8):801-12.
97. *Migraine and risk of cardiovascular disease in men*. Kurth T, Gaziano JM, Cook NR et al. *Arch Intern Med* 2007 Apr 23; 167(8):795-801.
98. *Migraine and retinal microvascular abnormalities: the Atherosclerosis Risk in Communities Study*. Rose KM, Wong TY, Carson AP, Copuper DJ, Klein R, Sharret AR. *Neurology* 2007 May 15; 68(20):1694-700.
99. *Características clínicas de la esclerosis múltiple*. En: *Esclerosis Múltiple, bases clínicas y patogénicas*. . Raine CS, McFarland HF, Tourtellotte WW. Editores Médicos S.A (edición española). Madrid año 2000. Pp 3-17.
100. *The natural history of multiple sclerosis*. Weinshenker, B. G. *Neurol. Clin* 1995; 13:119–146.
101. *New multiple sclerosis phenotypic classification*. Lublin FD. *Eur Neurol* 2014; 72 Suppl 1:1-5.
102. *Is "Benign Multiple Sclerosis" really benign?* Rigotti J, Gonen O. *Revista Española de Esclerosis Múltiple* Jun 2010 (14):22-29.
103. *Does the history of multiple sclerosis go back as far as the 14th century?* Medaer R. *Acta Neurol Scand* 1979; 60(3):189-92.
104. *Pieces anatomiques relatives a un cas de sclerose e plaques generalisee du cerveau et de la moelle epiniere*. Charcot, J. *CR Seances Mémoires Soc Biologie* 1868. 13(4e).
105. *Histologie de la sclérose en plaques*. Charcot J. *Gaz Hopit Civils Milit* 1868. 41:p554,557,566.
106. *Anatomie pathologique du corps humain; ou description avec figures lithographiées et coloriées, des diverses alterations morbides dont le corps humain est susceptible*. Cruveilhier J. 1835-1842. 2(32):p19.
107. *Pathological Anatomy. Illustrations of the Elementary Forms of Disease*. Carswell R. Chapters “Inflammation”, “atrophy” (Plate IV), “Softening” (plate IV). Longman, 1833
108. *Lectures on the diseases of the Nervous System*. Charcot JM. Sigurdson G, trans-ed. London: New Sydenham Society; 1881.
109. *Estude anatomique et clinique sur la sclérose en plaques*. Babinski J. Masson, 1885.
110. *Sclérose en plaques et maladies infectieuses*. Marie, P. 1884. XII: p.287,305,349,365.
111. *A manual of pathological Histology*. Rindfleisch G. London, New Sydenham Society 1872; 2:344-351.

112. *An Electrophoretic Study of the Protein Components in Cerebrospinal Fluid and their relationship to the Serum proteins.* Kabat, E. D. J Clin Invest 1942. 21(5):p571-7.
113. *Problems of experimental trials in multiple sclerosis.* Schumacher G, Kibler R, Kurland R, Kurtzke J, McDowell F. Ann NY Acad Sci 1965; 122:552-568.
114. *New diagnostic criteria for multiple sclerosis: Guidelines for research protocols.* Poser CM, Paty DW, Scheinberg L, et al. Ann Neurol 1983; 13:227-231.
115. *Recommended diagnostic criteria for multiple sclerosis: guidelines from the International Panel on the diagnosis of multiple sclerosis.* McDonald WI, Compston A, Edan G, Goodkin D, Hartung HP, Lublin FD, et al. Ann Neurol 2001 Jul; 50(1):121-7.
116. *Comparison of MR imaging criteria at first presentation to predict conversion to clinically definite MS.* Barkhof F, Filippi M, Miller DM, et al. Brain 1997; 120:2059-2069.
117. *Isolated demyelinating syndromes: comparison of different MR imaging criteria to predict conversion to clinically definite multiple sclerosis.* Tintoré M, Rovira A, Martínez M, et al. Am J Neuroradi 2000; 21:702-706.
118. *Diagnostic criteria for multiple sclerosis: 2005 revisions to the "McDonald Criteria".* Polman CH, Reingold SC, Edan G, et al. Ann Neurol 2005 Dec; 58(6):840-6.
119. *Diagnostic Criteria for Multiple Sclerosis: 2010 Revisions to the McDonald Criteria.* Polman CH, Reingold SC, Banwell B, Clanet M, et al. Ann Neurol 2011; 69:292-302.
120. *New diagnostic criteria for multiple sclerosis: application in first demyelinating episode.* Tintoré M, Rovira A, Río J, Nos C, Grivé E, Sastre-Garriga J, Pericot I, Sánchez E, Comabella M, Montalban X. Neurology 2003 Jan 14; 60(1):27-30.
121. *Results of treatment of multiple sclerosis with dicoumarin.* Putnam TJ, Chiavacci LV, Hoff H, et al. Arch Neurol 1947; 57:1-13.
122. *Treatment of multiple sclerosis with corticotrophin (ACTH).* Miller HG, Newell DJ, Ridley A. Lancet 1961; 2:1361-1362.
123. *Possible beneficial effect of high-dose intravenous steroid therapy in acute demyelinating disease and transverse myelitis.* Dowling P C, V. V. Bosch ans S D Cook. Neurology, 1980. 30 (7 Pt 2): 33-6.
124. *Intrathecal interferon reduces exacerbations of multiple sclerosis.* Jacobs L, et al. Science. 1981 Nov 27; 214(4524):1026-8.
125. *Randomized double blind placebo controlled study of interferon beta 1a in relapsing remitting multiple sclerosis. PRISMS (Prevention of Relapses and Disability by interferon beta 1a subcutaneously in Multiple Sclerosis).* Ebers George C. Lancet. 1998 Nov 7; 352(9139):1498-504.
126. *Copolymer 1 reduces relapse rate and improves disability in relapsing-remitting multiple sclerosis: results of a phase III multicenter , doubled-blind placebo-controlled trial. The Copolymer 1 Multiple Sclerosis Study Group.* Johnson K P et al. Neurology 1995 Jul; 45(7):1268-76.

127. *Risk of natalizumab-associated progressive multifocal leukoencephalopathy.* Bloomgren G, Richman S, Hotermans C, Subramanyam M, Goelz S, et al. *N Engl J Med* 2012 May 17; 366(20):1870-80.
128. *The sphingosine-1 phosphate receptor agonist FTY-20 differentially affects the sequestration of CD4+/CD25+ T regulatory cells and enhances their functional activity.* Sawicka E, Dubois G, Jarai G, et al. *J Immunol* 2005; 176:7973-7978.
129. *Sphingosine-1-Phosphate Receptors in the Central Nervous and Immune Systems.* Healy LM, Antel JP. *Curr Drug Targets* 2015 Oct 1. [Epub ahead of print].
130. *A Placebo-Controlled Trial of Oral Fingolimod in Relapsing Multiple Sclerosis.* Kappos L, Radue EW, O'Connor P, Polman C, Hohlfeld R, Calabresi P, Selmaj K, Agoropoulou C, Leyk M, Zhang-Auberson L, Burtin P and Group., FREEDOMS Study. *N Engl J Med* 2010 Feb 4; 362(5):387-401.
131. *BG-12 (dimethyl fumarate): a review of mechanism of action, efficacy, and safety.* Fox RJ, Kita M, Cohan SL, Henson LJ, Zambrano J, et al. *Curr Med Res Opin.* 2014 Feb; 30(2):251-62.
132. *Teriflunomide: a novel oral treatment for relapsing multiple sclerosis.* Sartori A, Carle D, Freedman MS. *Expert Opin Pharmacother.* 2014 May; 15(7):1019-27.
133. *A single-arm, open label study of alemtuzumab in treatment refractory patients with multiple sclerosis.* Fox EJ, Sullivan HC, Gazda SK, et al. *Eur J Neurol* 2012; 19:307-11.
134. *Alemtuzumab for patients with relapsing multiple sclerosis after disease-modifying therapy: a randomised controlled phase 3 trial.* Coles AJ, Twyman CL, Arnold DL, Cohen JA, Confavreux C, Fox EJ, et al. *Lancet* 2012 Nov 24; 380(9856):1829-39.
135. *A comparison of MS disease activity between patients treated with natalizumab and fingolimod.* Koch-Henriksen N. *ECTRIMS* 20015, Barcelona 7-10 October.
136. *Rating neurologic impairment in multiple sclerosis: an expanded disability status scale (EDSS).* Kurtzke JF. *Neurology*, 1983; 33(11):1444-52.
137. *Fatigue associated with multiple sclerosis: diagnosis, impact and management.* Bakshi R. *Mult Scler.* 2003 Jun; 9(3):219-27.
138. *Fatigue in multiple sclerosis.* Krupp LB, Cristodoulou C. *Curr Neurol Neurosci Rep* 2001; 1:294-298.
139. *The Fatigue Severity Scale. Application to Patients With Multiple Sclerosis and Systemic Lupus Erythematosus.* Krupp LB, LaRocca NG, Muir-Nash J, Steinberg AD. *Arch Neurol* 1989; 46:1121-4.
140. *Health outcome improvements in patients with systemic lupus erythematosus using two telephone counseling interventions.* Austin JS, Maisiak RS, Macrina DM, Heck LW. *Arthritis Care Res* 1996; 9:391-9.
141. *Fatigue secondary to chronic illness: postpolio syndrome, chronic fatigue syndrome, and multiple sclerosis.* Packer TL, Sauriol A, Brouwer B. *Arch Phys Med Rehabil* 1994; 75:1122-6.

142. *Multiple sclerosis as a vascular disease.* Minagar A, Jy W, Jimenez JJ, Alexander JS. *Neurol Res* 2006 Apr; 28(3):230-5.
143. *The prevalence of the classical and non-classical cardiovascular risk factors in multiple sclerosis patients.* Sternberg Z, Leung C, Sternberg D, Li F, Karmon Y, Chadha K, Levy E. *CNS Neurol Disord Drug Targets* 2013 Feb 1; 12(1):104-11.
144. *Cardiovascular autonomic dysfunction in multiple sclerosis: correlation with orthostatic intolerance.* Flachenecker P, Wolf A, Krauser M, Hartung HP, Reiners K. *J Neurol* 1999 Jul; 246(7):578-86.
145. <http://www.ine.es/prensa/np896.pdf>.
146. *Global burden of cardiovascular diseases consideration, the epidemiologic transition, risk factors and impact of urbanization.* Yusuf S, Reddy S, Ounpuu S, Anand S. *Circulation* 2001; 104:2746-2753.
147. *Cause of death in patients attending multiple sclerosis clinics.* Sadovneik AD, Eiden k, Ebers GC, Paty DW. *Neurology* 1991; 41:1193-96.
148. *Underlying cause of death in Danish patients with multiple sclerosis: results from the Danish Multiple Sclerosis Registry.* Koch-Henriksen N, Bronnum-Hansen H, Stenager E. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 1998; 65:56–59.
149. *Trends in survival and cause of death in Danish patients with multiple sclerosis.* Bronnum-Hansen H, Koch-Henriksen N, Stenager E. *Brain* 2004; 127:844–50.
150. *Survival and cause of death in multiple sclerosis: a prospective population-based study.* Hirst C, Swingle R, Compston DA, Ben-Shlomo Y, Robertson NP. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 2008; 79:1016–21.
151. *Vascular disease among hospitalized multiple sclerosis patients.* Allen NB, Lichtman JH, Cohen HW, Fang J, Brass LM, Alderman MH. *Neuroepidemiology* 2008; 30:234–38.
152. *Risk of arterial cardiovascular diseases in patients with multiple sclerosis: a population-based cohort study.* Christiansen CF, Christensen S, Farkas DK, Miret M, Sorensen HT, Pedersen L. *Neuroepidemiology* 2010; 35:267–74.
153. *Cigarette smoking and incidence of multiple sclerosis.* Hernan MA, Olek MJ, Ascherio A. *Am J Epidemiol* 2001; 154:69–74.
154. *Vascular disease among hospitalized multiple sclerosis patients.* Allen NB, Lichtman JH, Cohen HW, Fang J, Brass LM, Alderman MH. *Neuroepidemiology* 2008; 30:234–38.
155. *Coagulation status and biochemical and inflammatory markers in multiple sclerosis.* Aksungar FB, Topkaya AE, Yildiz Z, Sahin S, Turk U. *J Clin Neurosci* 2008; 15:393–97.
156. *Evidence of platelet activation in multiple sclerosis.* Sheremata WA, Jy W, Horstman LL, Ahn YS, Alexander JS, Minagar A. *J Neuroinflammation* 2008; 5:27.
157. *Increased plasma homocysteine levels in multiple sclerosis.* Sahin S, Aksungar FB, Topkaya AE, et al. *Mult Scler* 2007; 13:945–46.

158. *Homocysteine impairs coronary artery endothelial function by inhibiting tetrahydrobiopterin in patients with hyperhomocysteinemia.* He L, Zeng H, Li F, et al. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2010; 299:E1061–65.
159. *Clinical significance of reduced cerebral metabolism in multiple sclerosis: a combined PET and MRI study.* Sun X, Tanaka M, Kondo S, Okamoto K, Hirai S. *Ann Nucl Med* 1998; 12:89–94.
160. *Microvascular abnormality in relapsing-remitting multiple sclerosis: Perfusion MR imaging findings in normal-appearing white matter.* Law M, et al. *Radiology* 2004; 231(3):645–652.
161. *Classification and diagnosis criteria for headache disorders, cranial neuralgias and facial pain.* Headache Classification Committee of the IHS. *Cephalalgia*. 2013 Jul; 33(9):629-808.
162. *Prevalence and burden of migraine in the United States: data from the American Migraine Study II.* Lipton RB, Stewart WF, Diamond S, Diamond ML, Reed M. *Headache* 2001; 41:646-57.
163. *Sociodemographic and comorbidity profiles of chronic migraine and episodic migraine sufferers.* Buse DC, Manack A, Serrano D, Turkel C, Lipton RB. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 2010; 81:428-32.
164. *The American Rheumatism Association 1987 revised criteria for the classification of rheumatoid arthritis.* Arnett FC, Edworthy SM, Bloch DA, Mcshane DJ, Fries JF, Cooper NS, et al. *Arthritis Rheum* 1988; 31:315–24.
165. *2010 rheumatoid arthritis classification criteria: an American College of Rheumatology/European League Against Rheumatism collaborative initiative.* Aletaha D, Neogi T, Silman AJ, Funovits J, Felson DT, Bingham CO, et al. *Ann Rheum Dis*. 2010; 69:1580–8.
166. *Cerebrovascular reactivity in migraine with and without aura.* Silvestrini M, Matteis M, Troisi E, Cupini LM, Bernardi G. *Headache* 1996; 36:37-40.
167. *Valores de normalidad de la reactividad vasomotora cerebral mediante el test de apnea voluntaria.* Jimenez-Caballero PE, Segura T. *Rev Neurol* 2006; 43:598-602.
168. *Use of carotid ultrasound to identify subclinical vascular disease and evaluate cardiovascular disease risk: a consensus statement from the American Society of Echocardiography Carotid Intima-Media Thickness Task Force.* Stein JH, Korcarz CE, Hurst RT, Lonn E, et al. *J Am Soc Echocardiogr* 2008; 21:93-11; quiz 89-90.
169. *Relationship between intima-media thickness in the common carotid artery and atherosclerosis in the carotid bifurcation.* Rosfors S, Hallerstam S, Jensen-Urstad K, Zetterling M, Carlstrom C. *Stroke* 1998; 29:1378-1382.
170. *Mannheim carotid intima-media thickness and plaque consensus (2004-2006-2011). An update on behalf of the advisory board of the 3rd, 4th and 5th watching the risk symposia, at the 13th, 15th and 20th European Stroke Conferences.* Touboul PJ, Hennerici MG, Meairs S, Adams H, Amarenco P, et al. *Cerebrovasc Dis* 2012; 34(4):290-6.

171. *Estimation of cerebral blood flow through colour duplex sonography of the carotid and vertebral arteries in healthy adults.* Schöning M, Walter J, Scheel P. *Stroke* 1994; 25:17-22.
172. *Estudio del diámetro del ventrículo III mediante duplex transcraneal.* López Hernandez N, García Escrivá A, Molto Jordá JM. *Neurología* 2007; 22:507-10.
173. *A longitudinal study of brain atrophy in relapsing multiple sclerosis. The Multiple Sclerosis Collaborative Research Group (MSCRG).* Simon JH, Jacobs LD, Campion MK, Rudick RA, et al. *Neurology* 1999 Jul 13; 53(1):139-48.
174. *From endothelial dysfunction to atherosclerosis.* Sitia S, Tomasoni L, Atzeni F, Ambrosio G, Cordiano C, et al. *Autoimmun Rev* 2010, 9:830-834.
175. *Cardiac involvement in systemic rheumatic diseases: An update.* Sarzi-Puttini P, Atzeni F, Gerli R, Bartoloni E, Doria A, et al. *Autoimmun Rev* 2010 Oct; 9(12):849-52.
176. *Endothelial function in migraine with aura - A systematic review.* Butt JH1, Franzmann U, Kruuse C. *Headache* 2015 Jan; 55(1):35-54.
177. *Rheumatoid arthritis: a disease associated with accelerated atherogenesis.* Gonzalez-Gay MA, Gonzalez-Juanatey C, Martin J. *Semin Arthritis Rheum* 2005 Aug; 35(1):8-17.
178. *Vascular endothelial dysfunction in patients with rheumatoid arthritis.* Park Y-B, Kang S-M, Chung N-s, Lee S-K. *Arthritis Rheum* 2001; 44 (suppl):S54.
179. *Vascular aspects of multiple sclerosis.* D'haeseleer M, Cambron M, Vanopdenbosch L, De Keyser J. *Lancet Neurol* 2011 Jul; 10(7):657-66.
180. *Multiple sclerosis: pathogenesis and treatment.* Ioma I, Heymn R. *Curr Neuroparmacol* 2011; 9:409-416.
181. *Mortality and cause of death in multiple sclerosis: findings from a prospective population-based cohort in Bizkaia, Basque Country, Spain.* Rodríguez-Antigüedad Zarranz A, Mendibe Bilbao M, Llarena González C, Audicana C. *Neuroepidemiology* 2014; 42(4):219-25.
182. *Cardiovascular risk factors are associated with increased lesion burden and brain atrophy in multiple sclerosis.* Kappus N, Weinstock-Guttman B, Hagemeier J, Kennedy C, et al. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. 2015 Feb 26. pii: jnnp-2014-310051.
183. *The Framingham cardiovascular risk score in multiple sclerosis.* Moccia M, Lanzillo R, Palladino R, Maniscalco GT. *Eur J Neurol* 2015 Aug; 22(8):1176-83.
184. *Prognostic value of coronary vascular endothelial dysfunction.* Halcox JP, Schenke WH, Zalos G, et al. *Circulation* 2002; 106:653-658.
185. *Multiple sclerosis and cerebral endothelial dysfunction: Mechanisms.* Alexander JS, Zivadnov R, Maghzi AH, Ganta VC, Harris MK, Minagar A. *Pathophysiology* 2011 Feb; 18(1):3-12.
186. *The pathogenesis of Multiple Sclerosis: A possible Vascular Factor.* Tracy J, Putnam, MD. *N Engl J Med* 1933; 209:786-790.

187. *Chronic cerebrospinal venous insufficiency in patients with multiple sclerosis*. Zamboni P, Galeotti R, Menegatti E, Malagoni AM, Tacconi G, Dall'Ara S, Bartolomei I, Salvi F. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 2009 Apr; 80(4):392-9.
188. *Chronic cerebrospinal venous insufficiency in multiple sclerosis: the final curtain*. Paul F, Wattjes MP. *Lancet* 2014 Jan 11; 383(9912):106-8.
189. *CCSVI and MS: a statement from the European Society of neurosonology and cerebral hemodynamics*. Baracchini C, Valdueza JM, Del Sette M, Baltgaile G, Bartels E, Bornstein NM, et al. *J Neurol* 2012 Dec; 259(12):2585-9.
190. *Immune cell entry into the central nervous system: involvement of adhesion molecules and chemokines*. Engelhardt., B. J. *Neurol Sci* 2008; 274:23–26.
191. *The assesment of endothelial function: from research into clinical practice*. Flammer AJ, Anderson T, Celermajer DS, et al. *Circulation* 2012; 126:753-67.
192. *A meta-analysis of published studies of endothelial dysfunction does not support its routine clinical use*. Cardona A, Kondapally Seshasai SR, Davey J, Arrebola-Moreno AL, Ambrosio G, Kaski JC, Ray KK. *Int J Clin Pract*. 2015 Jun; 69(6):649-58.
193. *Assesment of flow-mediated dilation reproducibility: a nation-wide multicenter study*. Ghiadoni L, Faita F, Salvetti M, et al. *J Hypertens* 2012; 30:1399-1405.
194. *Blood–brain barrier disruption in multiple sclerosis*. Minagar A, Alexander JS. *Mult Scler* 2003 Dec; 9(6):540-9.
195. *Microparticles in multiple sclerosis and clinically isolated syndrome: effect on endothelial barrier function*. Marcos-Ramiro B, Oliva Nacarino P, Serrano-Pertierra E, Blanco-Gelaz MA, et al. *BMC Neurosci* 2014 Sep 22; 15:110. .
196. *Statement on smoking and cardiovascular disease for health care professionals: American Heart Association*. Jonas MA, Oates JA, Ockene JK, Hennekens CH. *Circulation* 1992; 86:1664-9.
197. *Tar yield of cigarettes and risk of acute myocardial infarction: GISSI-EFRIM Investigators*. Negri E, Franzosi MG, La Vecchia C, Santoro L, Nobili A, Tognomi G. *BMJ* 1993; 306:1567-70.
198. *Smokeless tobacco use and increased cardiovascular mortality among Swedish construction workers*. Bolinder G, Alfredsson L, Englund A, de Faire U. *Am J Public Health* 1994; 84:399-404.
199. *Environmental tobacco smoke exposure and ischemic heart disease: an evaluation of the evidence*. Law MR, Morris JK, Wald NJ. *BMJ* 1997; 315:973-80.
200. *Passive smoking and heart disease: epidemiology, physiology and biochemistry*. Glantz SA, Pamley WW. *Circulation* 1991; 93:1-12.
201. *Tobacco smoking and disability progression in multiple sclerosis: United Kingdom cohort study*. Manouchehrinia A, Tench CR, Maxted J, Bibani RH, Britton J, Constantinescu CS. *Brain* 2013 Jul;136(Pt 7): 2298-304.

202. *Glucocorticoids and endothelial cell barrier function.* Salvador E, Shityakov S, Förster C. Cell Tissue Res 2014 Mar; 355(3):597-605.
203. *Serial analysis of circulating adhesion molecules and TNF receptor in serum from patients with multiple sclerosis: cICAM-1 is an indicator for relapse.* Rieckmann P, Martin S, Weichselbraun I, Albrecht M, Kitze B, et al. Neurology 1994 Dec; 44(12):2367-72.
204. *Cardiovascular autonomic dysfunction in multiple sclerosis: correlation with orthostatic intolerance.* Flachenecker P, et al. J Neurol 1999; 246:578-586.
205. *Arterial compliance in multiple sclerosis: a pilot study.* Fjeldstad C, Frederiksen C, Fjeldstad AS, Bemben M, Pardo G. Angiology 2010; 61(1):31-6.
206. *Non invasive detection of endothelial dysfunction in children and adults at risk of atherosclerosis.* Celermajer DS, Sorensen KE, Gooch VM, Spiegelhalter DJ, Miller OI, Sullivan ID, Lloyd JK, Deanfield JE. Lancet 1992; 340:1111-1115.
207. *Endothelial function: a barometer for cardiovascular risk?* Vita JA, Keaney JF. Circulation 2002; 106:640-642.
208. *Fibrinogen promotes early atherosclerotic changes of the carotid artery in young, healthy adults.* Grebe MT, Luu B, Sedding D, Heidt MC, Kemkes-Matthes B, Schaefer CA, Tillmanns HH, Gündüz D. J Atheroscler Thromb 2010 Oct 27; 17(10):1003-8.
209. *Fibrinogen - marker or mediator of vascular disease.* Reinhart, W. H. Vascular Medicine 2003; 8:211-216.
210. *Long term improvement in homocysteine levels and arterial endothelial function after 1-year folic acid supplementation.* Woo KS, Chook P, Chan LL, Cheung AS, Fung WH, Qiao Mu, Lolin YI, Thomas GN, Sanderson JE, Metreweli C, Celermajer DS. Am J Med 2002 May; 112(7):535-9.
211. *Carotid plaque, intima media thickness, cardiovascular risk factors and prevalent cardiovascular disease in men and women. The British Regional Heart Study.* Ebrahim S, Papacosta O, Whincup P, Wannamethee G, et al. Stroke 1999; 30:841-50.
212. *Common carotid intima-media thickness and lower extremity arterial atherosclerosis. The Rotterdam study.* Bots M, Hofman A, Grobbee D. Arterioscler Thromb 1994; 14:1885-91.
213. *Ultrasound evaluation of the extracranial cerebrospinal venous system and carotid arteries in patients with multiple sclerosis.* Nelson, Merlisa Claudia. Doctoral Thesis; Cape Peninsula University 2013.
214. *Vascular dysfunction and physical activity in multiple sclerosis.* Ranadive SM, Yan H, Weikert M, Lane AD, Linden MA, Baynard T, Motl RW, Fernhall B. Med Sci Sports Exerc 2012 Feb; 44(2):238-43.
215. *Migraine and retinal microvascular abnormalities: the Atherosclerosis Risk in Communities Study.* Rose KM, Wong TY, Carson AP, Couper DJ, Klein R, Sharrett AR. Neurology 2007; 68:1694-1700.

216. *Neurogenic inflammation in the pathophysiology and treatment of migraine*. Moskowitz MA. *Neurology* 1993 Jun; 43 (6 Suppl 3):S16-20.
217. *Interictal cerebral and systemic endothelial dysfunction in patients with migraine: a case-control study*. Rajan R, Khurana D, Lal V. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 2015 Nov; 86(11):1253-7.
218. *Migraine is not associated with enhanced atherosclerosis*. Stam AH, Weller CM, Janssens AC, Aulchenko YS, Oostra BA, Frants RR, van den Maagdenberg AM, Ferrari MD, van Duijn CM, Terwindt GM. *Cephalalgia* 2013; 33(4):228-235.
219. *Obesity, migraine, and chronic migraine: possible mechanisms of interaction*. Bigal ME, Lipton RB, Holland PR, Goadsby PJ. *Neurology* 2007; 68:1851-1861.
220. *Endothelial dysfunction: clinical implications*. Drexler H. *Prog Cardiovasc Dis* 1997 Jan-Feb; 39(4):287-324.
221. *Impaired endothelial function in arterial hypertension and hypercholesterolemia, potential mechanism and differences*. Schmieder JS. *J Hypertens* 2000; 18:363-74.
222. *Microvascular and macrovascular reactivity is reduced in subjects at risk for type 2 diabetes*. Caballero AE, Arora S, Saouaf R, Lim SC, et al. *Diabetes* 1999; 48:1856-62.
223. *Vascular function and multiple sclerosis*. Fjeldstad AS1, McDaniel J, Witman MA, Ives SJ, Zhao J, Rose JW, Hannon J, Wray DW, Richardson RS. *J Neurol* 2011 Nov; 258(11):2036-42.
224. *Impairment of endothelial function in patients with multiple sclerosis*. Keményová P, Siarnik P, Sutovský S, Blaho A, Turčáni P, Kollár B. *Neuro Endocrinol Lett* 2015; 36(1):67-71.
225. *Endothelial dysfunction, intima-media thickness and coronary reserve in relation to risk factors and Framingham score in patients without clinical atherosclerosis*. Campuzano R, Moya JL, García-Lledó A, et al. *J Hypertens* 2006; 24:1581-1588.
226. *Biomarkers for multiple sclerosis*. Tomioka R, Matsui M. *Intern Med* 2014; 53(5):361-5.
227. *Forearm vascular response to nitric oxide and calcitonin gene-related peptide: comparison between migraine patients and controls*. De Hoon JN, Smits P, Troost J, Struijker-Boudier HA, Van Bortel LM. *Cephalalgia* 2006; 26(1):56-63.
228. *Decreased endothelium-dependent vasodilatation in patients with migraine: a new aspect to vascular pathophysiology of migraine*. Yetkin E, Ozisik H, Ozcan C, Aksoy Y, Turhan H. *Coron Artery Dis* 2006 Feb; 17(1):29-33.
229. *Comparison of peripheral endothelial dysfunction and intima media thickness in patients with suspected coronary artery disease*. Enderle M, Schoröder S, Ossen R, Meisner C, Baumbach A, Haering H, et al. *Heart* 1998; 80:349-54.
230. *Asociación de la disfunción endotelial y el grosor mediointimal carotídeo con los factores de riesgo coronario en pacientes sin evidencia clínica de aterosclerosis*. Campuzano R, Moya, JL, García-Lledó, et al. *Rev Esp Cardiol* 2013; 56(6):546-54.

231. *Cerebral autoregulation*. Paulson OB, Strandgaard S, Edvinsson L. Cerebrovasc Brain Metab Rev 1990; 2:161-92.
232. *Monitoring of cerebrovascular autoregulation: facts, myths, and missing links*. Czosnyka M, Brady K, Reinhard M, Smielewski P, Steiner LA. Neurocrit Care 2009; 10(3):373-86.
233. *Cerebral oxygen vasoreactivity and cerebral tissue oxygen reactivity*. Johnston AJ, Steiner LA, Gupta AK, Menon DK. Br J Anaesth 2003 Jun; 90(6):774-86.
234. *Regional impairment of cerebrovascular reactivity and BOLD signal in adults after stroke*. Krainik A, Hund-Georgiadis M, Zysset S, von Cramon DY. Stroke 2005; 36(6):1146–1152.
235. *Forebrain-dominant deficit in cerebrovascular reactivity in Alzheimer's disease*. Yezhuvath US, Uh J, Cheng Y, et al. Neurobiol Aging 2012; 33(1):75–82.
236. *Abnormal Cerebrovascular Reactivity in Patients with Parkinson's Disease*. Camargo CH, Martins EA, Lange MC, Hoffmann HA, et al. Parkinsons Dis. 2015; 2015:523041. doi: 10.1155/2015/523041.
237. *Cardiovascular reflexes in multiple sclerosis*. Pentland B, Ewing DJ. Eur Neurol 1987; 26(1):46-50.
238. *Cardiovascular autonomic function in multiple sclerosis*. Anema JR, Heijenbrok MW, Faes TJ, Heimans JJ, Lanting P, Polman CH. J Neurol Sci 1991 Aug; 104(2):129-34.
239. *Cerebrovascular reactivity in multiple sclerosis patients*. Uzuner, N, S, Ozkan and Cinar, N. Multiple Sclerosis 2007, 13:737-741.
240. *Cerebral blood flow velocity changes to visual stimuli in patients with multiple sclerosis*. Uzuner N, Ozkan S, Gücüyener D, Ozdemir G. Mult Scler 2002 May; 8(3):217-21.
241. *Cerebrovascular hemodynamic changes in multiple sclerosis patients during head-up tilt table test: effect of high-dose intravenous steroid treatment*. Mezei Z, Olah L, Kardos L, Kovacs RK, Csiba L, Csepany T. J Neurol 2013 Sep; 260(9):2335-42.
242. *Impaired Cerebrovascular Reactivity in Multiple Sclerosis*. Marshal O, Lu H, Brisset JC, Xu F, et al. JAMA Neurol 2014 October; 71(10):1275-1281.
243. *Reduced breath holding index in patients with chronic migraine*. Akgün H, Tasdemir S, Ulas UH, Alay S, Cetiz A, Yücel M, Oz O, Odabasi Z, Demirkaya S. Acta Neurol Belg 2015 Sep; 115(3):323-7.
244. *Ultrasonographic evaluation of cerebral arterial and venous haemodynamics in Multiple Sclerosis: A case-control Study*. Marchione P, Morreale M, Giacommi P, et al. PLoS One. 2014; 9(10):e111486.
245. *Correlation of diffusion tensor and dynamic perfusion MR imaging metrics in normal-appearing corpus callosum: support for primary hypoperfusion in multiple sclerosis*. Saindane AM, Law M, Ge Y, Johnson G, Babb JS, Grossman RI. AJNR Am J Neuroradiol 2007; 28:767-72.

246. *Cerebral hypoperfusion in multiple sclerosis is reversible and mediated by endothelin-1.* D'haeseleer M, Beelen R, Fierens Y, Cambron M, Vanbinst AM, Verborgh C, Demey J, De Keyser J. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2013 Apr 2; 110(14):5654-8.
247. *Cerebral hypoperfusion: a new pathophysiologic concept in multiple sclerosis?* D'haeseleer M, Hostenbach S, Peeters I, El Sankarj S, Nagels G, De Keyser J, D'hooghe MB. *J Cereb Blood Flow Metab* 2015 Sep; 35(9):1406-10.
248. *Nitric oxide endothelin-1, and transcranial Doppler in migraine. Findings in interictal conditions and during migraine attack.* Nattero G, Mengozzi G, Inconis T, Paradisi L. *Headache* 1996; 36:307–11.
249. *Endothelin in migraine patients.* Kallela M, Färkkilä M, Saijonmaa O, Fyhrquist F. *Cephalalgia* 1998 Jul-Aug; 18(6):329-32.
250. *Endothelin-1 induced potently induces Leao's cortical spreading depression in vivo in the rat: a model for an endothelial trigger of migrainous aura?* Dreier JP, Kleeberg J, Alam M, et al. *Brain* 2002; 125:102-12.
251. *Biomarkers in multiple sclerosis: an update for 2014.* Fernandez O, Martin R, Rovira A, Llufríu S, Vidal-Jordana A, Fernandez-Sanchez VE, Alvarez-Cermenó JC, Izquierdo G, Arroyo-Gonzalez R, Rodriguez-Antiguedad A, Casanova-Estruch B, Montalban X. *Rev Neurol*. 2014 Jun 16; 58(12):553-70.
252. *Determination of ventricular diameters in multiple sclerosis patients with transcranial sonography (TCS)--a two year follow-up study.* Kallmann BA, Sauer J, Schliesser M, et al. *J Neurol* 2004; 251:30-4.
253. *Clinical impact of early brain atrophy in clinically isolated syndromes.* Pérez-Miralles F, Sastre-Garriga J, Tintoré M, Arrambide G, Nos C, Perkal H, et al. *Mult Scler* 2013; 19:1978-86.
254. *Central nervous system atrophy and clinical status in multiple sclerosis.* Zivadinov R, Bakshi R. *J Neuroimaging* 2004; 14(Suppl 3):S27-35.
255. *Brain atrophy and lesion load predict long term disability in multiple sclerosis.* Popescu V, Agosta F, Hulst HE, Sluimer IC, Knol DL, Sormani MP. *J Neurol neurosurg Psychiatry* 2013; 84:1082-91.
256. *Width of 3 Ventricle: reference values and clinical relevance in a cohort of patients with relapsing remitting multiple sclerosis.* Müller M, Esser R, Kötter K, Voss J, Müller A, Stellmes P. *Open Neurol J* 2013 May 3; 7:11-6.
257. *Cerebral white matter blood flow and energy metabolism in multiple sclerosis.* Steen C, D'haeseleer M, Hoogduin JM, Fierens Y, Cambron M, Mostert JP, Heersema DJ, Koch MW, De Keyser J. *Mult Scler* 2013 Sep; 19(10):1282-9.
258. *Pattern of hemodynamic impairment in multiple sclerosis: dynamic susceptibility contrast perfusion MR imaging at 3.0 T.* Adhya S, Johnson G, Herbert J, Jaggi H, Babb JS, Grossman RI, Inglese M. *Neuroimage* 2006 Dec; 33(4):1029-35.

259. *Fatigue in multiple sclerosis and its relationship to depression and neurologic disability.* Bakshi R, Shaikh ZA, Miletich RS, Czarnecki D, Dmochowski J, Henschel K, Janardhan V, Dubey N, Kinkel PR. *Mult Scler* 2000 Jun; 6(3):181-5.
260. *Fatigue is not associated with raised inflammatory markers in multiple sclerosis.* Giovannoni G, Thompson A J, Miller D H. et al. *Neurology* 2002 Apr 9; 58(7):1134.
261. *Fatigue in multiple sclerosis: an example of cytokine mediated sickness behaviour?* Heesen C, Nawrath L, Reich C, Bauer N, Schulz KH, Gold SM. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 2006 Jan; 77(1):34-9.
262. *Multiple sclerosis related fatigue.* Giovannoni G. *J Neurol Neurosurg Psychiatry.* 2006 Jan; 77(1):2-3.
263. *Randomised double-blind comparison of chimeric monoclonal antibody to tumour necrosis factor alpha (cA2) versus placebo in rheumatoid arthritis.* Elliott MJ, Maini RN, Feldmann M, Kalden JR, Antoni C, Smolen JS, Leeb B, Breedveld FC, Macfarlane JD, Bijl H, et al. *Lancet* 1994 Oct 22; 344(8930):1105-10.
264. *Deep gray matter perfusion in multiple sclerosis: dynamic susceptibility contrast perfusion magnetic resonance imaging at 3 T.* Inglese M, Park SJ, Johnson G, Babb JS, Miles L, Jaggi H, Herbert J, Grossman RI. *Arch Neurol* 2007 Feb; 64(2):196-202.
265. *Effects of inflammatory cytokines on the release and cleavage of the endothelial cell-derived ultralarge von Willebrand factor multimers under flow.* Bernardo A, Ball C, Nolasco L, Moake JF, Dong JF. *Blood* 2004 Jul 1; 104(1):100-6.
266. *von Willebrand factor and adhesion molecules in patients with multiple sclerosis.* Spirin NN, Spirina NN, Boiko AN. *Zh Nevrol Psikhiatr Im S S Korsakova* 2014; 114:35-39.
267. *Endothelial cell activation and/or injury in multiple sclerosis: analysis with von Willebrand factor and thrombomodulin.* Kohriyama T, Maruyama H, Kurokawa K, Harada T, Nakamura S. *Rinsho Shinkeigaku* 1997 Apr; 37(4):287-91.
268. *Increase Von Willebrand factor in migraine.* Tietjen GE, Al-Qasbi MM, Athanas K, Dafer RM, Khuder SA. *Neurology.* 2001 Jul 24; 57(2):334-6.
269. *Migraine and biomarkers of endothelial activation in young women.* Tietjen GE, Herial NA, White L, Utley C, Kosmyrna JM, Khuder SA. *Stroke* 2009 Sep; 40(9):2977-82.
270. *Subclinical Atherosclerosis in Patients with Rheumatoid Arthritis and Low Cardiovascular Risk: The Role of von Willebrand Factor Activity.* Ristić GG, Subota V, Lepić T, Stanisavljević D, Glišić B, Ristić AD, Petronijević M, Stefanović DZ. *PLoS One.* 2015 Aug 6; 10(8):e0130462. doi: 10.1371.
271. *Carotid enlargement and serum levels of von Willebrand factor in rheumatoid arthritis: a follow-up study.* Veselinovic M, Jakovljevic V, Jurisic-Skevin A, Toncev S, Djuric DM. *Clin Rheumatol* 2012 Dec; 31(12):1727-32.
272. *The role of nitric oxide in multiple sclerosis.* Smith KJ, Lassmann H. *Lancet Neurol.* 2002 Aug; 1(4):232-41.

273. *L-arginine/nitric oxide pathway activation in platelets of migraine patients with and without aura.* Gallai V, Floridi A, Mazzotta G, Codini M, Tognoloni M, Vulcano MR, Sartori M, Russo S, Alberti A, Michele F, Sarchielli P. *Acta Neurol Scand* 1996 Aug; 94(2):151-60.
274. *The L-arginine-nitric oxide pathway.* Moncada S, Higgs A. *N Engl J Med* 1993 Dec 30; 329(27):2002-12.
275. *Modified disease activity scores that include twenty-eight-joint counts. Development and validation in a prospective longitudinal study of patients with rheumatoid arthritis.* Prevoo ML, van't Hof MA, Kuper HH, van Leeuwen MA, van de Putte LB, van Riel PL. *Arthritis Rheum* 1995; 38:44-48.
276. *Carotid intima media thickness in rheumatoid arthritis as compared to control subjects: a meta-analysis.* van Sijl AM, Peters MJ, Knol DK, de Vet HC, Gonzalez-Gay MA, Smulders YM, Dijkmans BA, Nurmohamed MT. *Semin Arthritis Rheum* 2011 Apr; 40(5):389-97.
277. *Can suppression of inflammation by anti-TNF prevent progression of subclinical atherosclerosis in inflammatory arthritis?* Tam LS, Kitas GD, González-Gay MA. *Rheumatology (Oxford)* 2014; 53(6):1108-19.
278. *Endothelial dysfunction in young patients with long-term rheumatoid arthritis and low disease activity.* Hänsel S, Lässig G, Pistrosch F, Passauer J. *Atherosclerosis* 2003 Sep; 170(1):177-80.
279. *Validated methods for assessment of subclinical atherosclerosis in rheumatology.* Kerekes G, Soltész P, Nurmohamed MT, Gonzalez-Gay MA, Turiel M, Végh E, Shoenfeld Y, McInnes I, Szekanecz Z. *Nat Rev Rheumatol* 2012 Feb 21; 8(4):224-34.
280. *Cerebrovascular reactivity in patients with rheumatoid arthritis concurrent with and without hypertension.* Rebrova NV, Anisimova EA, Sarkisova OL, Mordovin VF, Karpov RS, et al. *Ter Arkh* 2015; 87(4):24-9.
281. *Cerebrovascular reactivity in patients with rheumatoid arthritis concurrent with and without hypertension.* Lass P, Krajka-Lauer J, Homziuk M, Iwaszkiewicz-Bilikiewicz B, Koseda M, et al. *Nucl Med Commun* 2000 Jan; 21(1):31-5.
282. *Blood pressure and vascular dysfunction underlie elevated cerebral blood flow in systemic lupus erythematosus.* Gasparovic C, Qualls C, Greene ER, Sibbitt WL Jr, Roldan CA. *J Rheumatol* 2012 Apr; 39(4):752-8.
283. *Are behaviour and motor performances of rheumatoid arthritis patients influenced by subclinical cognitive impairments? A clinical and neuroimaging study.* Bartolini M, Candela M, Brugni M, Catena L, Mari F, Pomponio G, Provinciali L, Danieli G. *Clin Exp Rheumatol* 2002 Jul-Aug; 20(4):491-7.
284. *Disease activity and cognition in rheumatoid arthritis: an open label pilot study.* Raftery G, He J, Pearce R, Birchall D, Newton JL, Blamire AM, Isaacs JD. *Arthritis Res Ther* 2012 Dec 4; 14(6):R263.
285. *TNF-alpha reduces cerebral blood volume and disrupts tissue homeostasis via an endothelin- and TNFR2-dependent pathway.* Sibson NR, Blamire AM, Perry VH, Gauldie J, Styles P, Anthony DC. *Brain* 2002 Nov; 125(Pt 11):2446-59.

BIBLIOGRAFÍA

286. *Association between tumor necrosis factor-alpha and disease progression in patients with multiple sclerosis.* Sharief MK, Hentges R. *N Engl J Med* 1991; 325:467-472.
287. *Structural changes of the brain in rheumatoid arthritis.* Wartolowska K, Hough MG, Jenkinson M, Andersson J, Wordsworth BP, Tracey I. *Arthritis Rheum* 2012 Feb; 64(2):371-9.
288. *Quantitative cerebral MR in rheumatoid arthritis.* Bekkelund SI, Pierre-Jerome C, Husby G, Mellgren SI. *AJNR Am J Neuroradiol.* 1995 Apr; 16(4):767-72.
289. *Methotexate and mortality in patients with rheumatoid arthritis: a prospective study.* Choi HK, Hernan MA, Seeger JD, Robins JM, Wolfe F. *Lancet* 2002; 359:1173-1177.
290. *Short-term adalimumab therapy improves endo-thelial function in patients with rheumatoid arthritis refractory to infliximab.* Gonzalez-Juanatey C, Llorca J, Sanchez-Andrade A, Garcia-Porrua C, Martin J, Gonzalez-Gay MA. *Clin Exp Rheumatol* 2006 May-Jun; 24(3):309-12.