

ARTICULO CIENTÍFICO

Metaloproteinasas de matriz en pacientes con esclerosis múltiple

Matrix Metalloproteinases in patients with Multiple Sclerosis

Lic. Rebeca A. Fernández Carrera¹, Dra. Lourdes Fernández Queija², Dra. Rosa F. Lara Rodríguez³, Dr. José A. Cabrera Gómez⁴, Lic. Idalmis Suárez Luis⁵, Dra. Mabel María León Ortiz⁶, MSc. Lic. Sergio González García⁵, Dra Cs. Alina González-Quevedo Monteagudo⁷

¹Licenciada en Bioquímica. Investigador Auxiliar. Profesora Asistente. Instituto de Neurología y Neurocirugía. ²Especialista I Grado en Medicina General Integral. Especialista de I Grado en Bioquímica Clínica. ICBP "Victoria de Girón". ³Especialista de I Grado en Neurología Clínica. Centro Internacional de Restauración Neurológica (CIREN). ⁴Dr Cs. Especialista de II Grado en Neurología. Centro Internacional de Restauración Neurológica (CIREN). ⁵Licenciada en Bioquímica. Investigador Agregado. Profesora Asistente. Centro Internacional de Restauración Neurológica (CIREN). ⁶Especialista de I Grado en Anestesiología y Reanimación. ⁷Dr.Cs. Investigadora Titular. Profesora Titular.

RESUMEN

Fundamento: La ruptura proteolítica de la matriz extracelular por las metaloproteinasas 2 y 9 es uno de los aspectos que puede influir en la alteración de la permeabilidad de la barrera hematoencefálica en la esclerosis múltiple. **Objetivo:** Determinar la actividad de las metaloproteinasas con actividad gelatinasa en pacientes con esclerosis múltiple. **Métodos:** Las muestras de líquido cefalorraquídeo se obtuvieron de 31 pacientes con esclerosis múltiple y un grupo control conformado por 21 pacientes sin enfermedad neurológica. Las actividades de las metaloproteinasas 2 y 9 en el líquido cefalorraquídeo se determinaron mediante técnica zimográfica por electroforesis en gel de poliacrilamida, después las bandas fueron identificadas por sus pesos moleculares y se calculó la actividad relativa de la metaloproteinasas 2 y 9. Se evaluaron las concentraciones de proteínas totales, albúmina e IgG, el índice IgG y el índice Q para evaluar síntesis intratecal de IgG y estado funcional de la barrera hematoencefálica. **Resultados:** Se detectó actividad de metaloproteinasas 2 en el líquido cefalorraquídeo de todos los pacientes y controles, mientras que la 9 solo se detectó en los pacientes (61, 3 %). La presencia de actividad relativa de metaloproteinasas 9 no se asoció con

las variables clínicas, ni con las variables de laboratorio. Se encontró asociación entre su presencia y las bandas oligoclonales en los pacientes con esclerosis múltiple, en aquellos sometidos a tratamiento inmunomodulador esta se presentó con menor frecuencia. **Conclusiones:** Existe una posible participación de la metaloproteinasas 9 en los mecanismos inmunopatológicos de la esclerosis múltiple.

Palabras clave: Esclerosis múltiple; Metaloproteinasas 2 de la matriz; Metaloproteinasas 9 de la matriz; Líquido cefalorraquídeo; Electroforesis

ABSTRACT

Fundament: The proteolytic rupture of the extracellular matrix due to metalloproteinase 2 and 9 is one of the aspects that can influence in the alteration of the permeability of the blood-brain barrier (BBB) in multiple sclerosis. **Obejective:** To determine metalloproteinase activity with gelatinous activity in patients suffering from multiple sclerosis. **Methods:** the cerebrospinal fluid (CSF) samples taken from 31 patients suffering from multiple sclerosis and a control group formed by 21 patients without neurological disease. The metalloproteinase 2 and 9 activities in the cerebrospinal fluid were determined by zimográfica technique through

Recibido: 16 de enero de 2007

Aprobado: 20 de febrero de 2007

Correspondencia:

Lic. Rebeca A. Fernández Carrera
Dpto. Neurobioquímica Instituto de Neurología y Neurocirugía
Calle 29 y D, Vedado CP 10 400 Ciudad de la Habana, Cuba
Email: rebeca@infomed.sld.cu

polyacrylamide gel electrophoresis. The bands were later analysed by their molecular weight and the relative metalloproteinase 9 activity was calculated. Total protein concentrations, albumin and immunoglobulin G (IgG), the IgG rate and the Q rate were assessed to evaluate the IgG intrathecal and the functional state of the blood-brain barrier. Results: metalloproteinase 2 activity was detected in the cerebrospinal fluid of all patients and control group. Metalloproteinase 9 activity was only found in the 61.3 % of the patients. The presence of relative metalloproteinase 9 activity was neither associated with the clinical variables nor the laboratory ones. An association was found between its presence and the oligoclonal bands in patients with multiple sclerosis. In those patients under immunomodular treatment it was presented with less frequency. Conclusions: There is a possible participation of Metalloproteinase 9 in the immunopathological mechanisms of the multiple sclerosis.

Key words: Multiple Sclerosis; Matrix Metalloproteinase 2; Matrix Metalloproteinase 9; Cerebrospinal Fluid; Electrophoresis

INTRODUCCIÓN

La esclerosis múltiple (EM) es una enfermedad desmielinizante, de causa desconocida^(1,2); es la afección inflamatoria más común del sistema nervioso central (SNC) que afecta a adultos jóvenes⁽³⁾. Provoca, en los casos más severos, un deterioro neurológico intenso acompañado de invalidez extrema. Aparece entre el segundo y cuarto decenio de la vida. Es una enfermedad multifactorial, influenciada por predisposición genética, factores ambientales y mecanismos efectores inmunológicos que dañan el SNC^(1,4-8).

Se distinguen tres formas clínicas principales de EM: 1- Brote-remisión (brotes de disfunción neurológica seguidos de remisión posterior, a veces incompleta), 2- Progresiva primaria (la sintomatología progresa desde el comienzo sin brotes ni remisiones) y 3-Progresiva secundaria (tras un periodo de brotes, estos disminuyen pero la discapacidad neurológica se sigue acumulando)^(4,5,7-9).

Aunque la etiología de la enfermedad se desconoce, muchos factores que conllevan al daño de tejido han sido identificados. Mecanismos no inmunológicos relacionados con la liberación de proteasas por células inflamatorias también parecen tener un importante papel. Muchas proteasas han sido identificadas como potencialmente importantes en este proceso, principalmente el sistema plasminógeno/plasmina y las metaloproteinasas de matriz (MMPs)⁽¹⁰⁾. Durante un ataque agudo, las MMPs tienen 2 funciones: son secretadas de leucocitos activados para facilitar la entrada en el SNC y ellas participan junto con otros factores como citocinas y radicales libres, en el ataque a la mielina⁽¹¹⁾.

Existen 24 miembros de la familia de las MMPs, producto de genes diferentes⁽¹²⁾. Las MMPs son proteasas que colectivamente pueden degradar todo los componentes de la matriz extracelular⁽¹³⁻¹⁶⁾. Son importantes en procesos normales, incluyendo desarrollo, angiogénesis y cicatrización de heridas, y en muchos procesos patológicos^(11,17-20). Los leucocitos son fuente importante de MMPs, todas las células cerebrales producen MMPs por lo que múltiples fuentes están involucradas^(11,15-22). Las MMPs atacan las proteínas de la matriz extracelular en la lámina baal tales como: fibronectinas, lamininas y colágeno tipo IV incrementando la permeabilidad de la barrera hematoencefálica (BHE)⁽²²⁻²⁴⁾. Por lo que en el cerebro ellas participan en la ruptura de la BHE, en inflamación y en remodelación vascular después del daño⁽²⁵⁻²⁸⁾. Al ser extremadamente tóxicas son controladas en múltiples niveles, incluyendo transcripción, traslación, activación e inhibición^(14,22). En la EM provocan daño a la BHE⁽²⁸⁾, la promoción de inflamación en el SNC⁽²⁹⁾ y neurotoxicidad directa^(30,31). La proteólisis por MMPs esta balanceada por 4 inhibidores de tejidos endógenos (TIMPs) para las MMPs⁽²²⁾.

En el presente trabajo nos proponemos determinar la presencia y actividad relativa de las MMPs, en el líquido cefalorraquídeo (LCR) de pacientes con EM, estableciendo su relación con diferentes parámetros clínicos y de laboratorio, con el objetivo de determinar su utilidad como marcadores de la actividad clínica de la enfermedad.

MÉTODOS

Estudio de casos y controles que incluyó 31 casos y 21 controles, realizado en el Instituto de Neurología.

Se seleccionaron 31 pacientes por muestreo discrecional con diagnóstico de esclerosis múltiple (EM) definida de acuerdo a los criterios de McDonald⁽³²⁾; los pacientes se distribuyeron según la forma clínica en: brote-remisión (B-R), primaria progresiva (P-P) y secundaria progresiva (S-P). Tenían tratamiento inmunomodulador 19 pacientes: 1 con Interferon α , 1 con Interferon β , 15 con esteroides (prednisona, metilprednisolona o ACTH) y 2 con Biomodulina T. Se seleccionó un grupo control constituido por 21 pacientes sin enfermedad neurológica, psiquiátrica, neoplásica o inflamatoria que fueron sometidos a anestesia raquídea para intervención quirúrgica.

Previo consentimiento informado, a pacientes y controles (en ayuno de más de 12 horas) se les tomaron muestras de 4 ml de líquido cefalorraquídeo (LCR) por punción lumbar no traumática, y 5 ml de sangre por punción venosa para la obtención de suero. La sangre y el LCR fueron centrifugados a 3000 rpm durante 10 minutos y los sobrenadantes fueron congelados y conservados a -20°C hasta su procesamiento.

Se realizaron los siguientes técnicas analíticas:

Electroforesis de las proteínas del LCR: Se llevó a

cabo por electroforesis vertical de disco en gel de poliacrilamida al 7,5 %, descrita por Ornstein y Davies⁽³³⁾. Tinción: Metanol-ácido acético-agua (5:1:5) y Coomassie R-250 a 0,25 % durante 24 horas. Decoloración de los geles: metanol - ácido acético - agua (5:1:5) hasta la total visualización de las bandas de proteínas.

Teniendo en cuenta los parámetros propuestos por Evans⁽³⁴⁾ y Takeoka, et al⁽³⁵⁾, los patrones electroforéticos del LCR se clasificaron en:

- Patrón electroforético normal (PEAN).
- Daño de barrera hematoencefálica (DBHE).
- Patrón ganmaglobulinico con presencia de bandas oligoclonales.
- DBHE y bandas oligoclonales.
- Patrón degenerativo.

Determinación de proteínas totales en el LCR por el método de Lowry⁽³⁶⁾. Las concentraciones de proteínas se calcularon sobre la base de una curva de calibración con albúmina bovina (Fracción V) expresándose en mg/dl.

La actividad de MMPs fue determinada electroforéticamente por zimografía inversa en geles de poliacrilamida al 10 %, los cuales polimerizaron con gelatina, como sustrato para la reacción de las MMPs, según la técnica descrita por Rosenberg, et al⁽²⁵⁾. Se utilizaron marcadores de peso molecular (PM) en cada corrida electroforética. Tinción: metanol 50 %; ácido acético 1 %; Coomassie G-250 a 0,125 % durante 1 hora. Decoloración: Ácido acético al 10 %. Se observaron bandas claras de proteólisis en las zonas donde se degradó la gelatina por las MMPs sobre el fondo azul del gel (contiene gelatina no degradada) (Fig 1).

Zimograma de la actividad de las MMPs en el LCR de pacientes con EM.

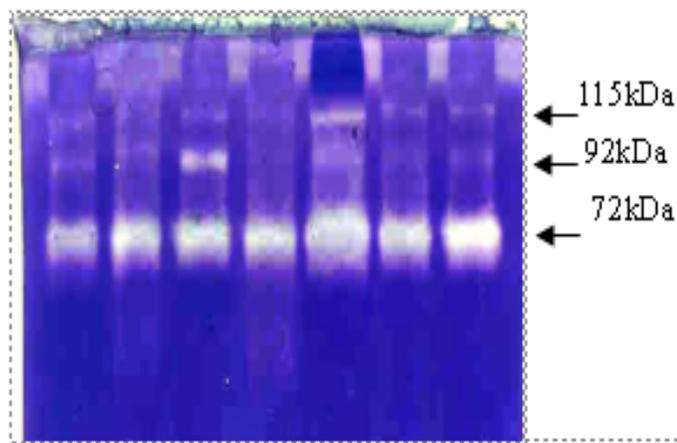


Figura 1: Zimograma en gel de poliacrilamida de la actividad gelatinasa de las MMPs en el LCR. MMP-2 (72 kDa) y MMP-9 (92 kDa).

Se analizó la relación entre los RF de los PM que fueron corridos, se compararon con los RF de las bandas de proteólisis en la zimografía para su identificación. Los geles fueron leídos en densitómetro DESAGA a una amplificación de 8. La cuantificación de la actividad de MMP-9 y MMP-2 se realizó midiendo las alturas de los picos en mm. Se calculó la relación entre las alturas de ambas, por estar la fracción MMP-2 expresada constitucionalmente en todos los fluidos biológicos y servir como estándar interno⁽³⁷⁾.

RESULTADOS

Predominaron las personas del sexo femenino tanto en los pacientes como en los controles. La edad promedio fue de 40 años.

Tabla 1. Distribución de pacientes y controles por edad y sexo.

Pacientes	N	Edad	Sexo	
			F	M
Controles	21	41,4 ± 13,6	11	10
Pacientes EM	31	41,7 ± 10,0	23	8
B-R	18	39,8 ± 7,6	15	3
P-P	4	44,5 ± 11,5	4	0
S-P	9	44,3 ± 13,7	4	5

En la cuantificación de las proteínas totales en pacientes y controles se observaron diferencias entre las medias en ambos grupos, los valores de proteínas totales en LCR, fueron mayores en pacientes (25 %) que en controles, teniendo en cuenta que no hubo diferencias significativas entre la edad en ambos grupos.

Tabla 2. Proteínas totales en pacientes y controles.

Proteínas totales del LCR(mg/dl)	N	Media	Desviación estándar
Controles	21	34,50	8,14
Pacientes	31	43,75	15,07

$t = 2.565; p = 0.013$

Todos los sujetos del grupo control presentaron un patrón electroforético normal, mientras que en los pacientes el patrón normal fue observado en el 61,3 % (19 casos). Entre los patrones patológicos predominó el de bandas oligoclonales en un 22,6 % (7 casos), el DBHE estuvo presente en 9,7 % (3 casos), mientras que en DBHE y bandas oligoclonales se observó en 6,5 % (2 casos). En total se detectó la presencia de bandas oligoclonales en 9 pacientes (29 %). No se observó el

patrón degenerativo en la electroforesis del LCR de los pacientes.

La MMP-72 kDa (MMP-2), estuvo presente en el 100 % de los controles y pacientes estudiados. La MMP-64 kDa, que representa la forma activa de la MMP-2, estuvo en bajo porcentaje de ambos grupos (14,3 y 9,7 % respectivamente). La MMP-92 kDa (MMP-9) se encontró en el 61,3 % de los pacientes, mientras que en el grupo control no se detectó. En solo un paciente se observó la MMP-84 kDa.

Tabla No.3. Patrón de metaloproteinasas en pacientes y controles.

	MMP-64 kDa	MMP-72 kDa	MMP-84 kDa	MMP-92 kDa
Controles	14,3 % (3)	100 % (21)	0 %	0 %
Pacientes	9,7 % (3)	100 % (31)	3,2 % (1)	61,3 % (19)

* Chi Cuadrado = 20,28, p = 0,00001

Nota: Entre paréntesis número de pacientes (N)

No se encontró asociación (p > 0,05) entre las formas clínicas de la EM y la presencia de MMP-9

Tabla 4. Presencia de MMP-9 en relación con las formas clínicas en pacientes con esclerosis múltiple.

Formas clínicas	MMP-9	
	NO	SI
B-R	38,9 % (7)	61,1 % (11)
P-P	50 % (2)	50 % (2)
S-P	33,3 % (3)	66,7 % (6)
TOTAL	38,7 % (12)	61,3 % (19)

Chi Cuadrado = 0,325, p > 0,05

Nota: Entre paréntesis número de pacientes (N)

La MMP-9 estuvo presente en el 88,9 % de los paciente que tenían patrones electroforéticos con bandas oligoclonales, más que en aquellos en los cuales no se detectaron bandas, por lo que hay asociación (p = 0,04) entre MMP-9 y bandas oligoclonales.

Al comparar los resultados obtenidos entre pacientes con tratamiento y sin tratamiento inmunomodulador: no se observaron diferencias significativas (p>0,05) entre el DBHE y el tratamiento inmunomodulador, aunque se aprecia una ligera diferencia; ni en la presencia de

bandas oligoclonales; en los pacientes sometidos a tratamiento inmunomodulador 88,9 % no presentaban DBHE. La relación entre la presencia de MM-9 y el tratamiento inmunomodulador, mostró diferencias significativas: menos del 50 % de los pacientes con tratamiento presentó actividad de MMP-9 en el LCR.

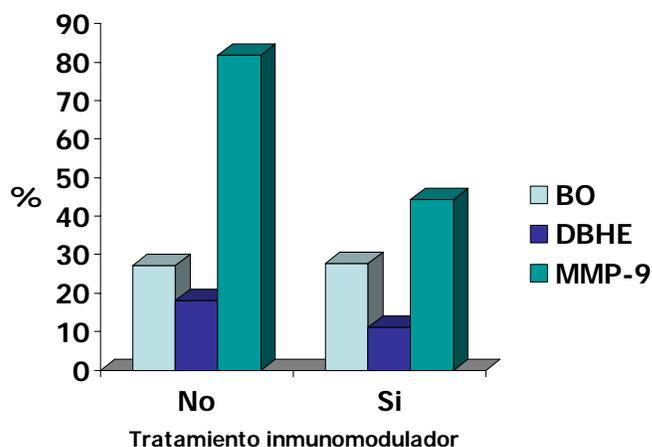


Gráfico 1. Presencia de bandas oligoclonales, daño de BHE y de MMP-9 en pacientes con EM de acuerdo al tratamiento inmunomodulador.

DISCUSIÓN

En los pacientes con EM no es frecuente el aumento significativo de las PT, pero sí pueden estar fuera del rango normal, considerándose que concentraciones mayores de 100 mg/dL generalmente excluyen el diagnóstico de EM en el paciente⁽³⁸⁾. Ningún paciente de los estudiados presentó valores por encima de 100 mg/dL. En estudio anterior realizado en Cuba en 1998 en el que nuestro laboratorio realizó las muestras de LCR, encontramos la presencia de bandas oligoclonales en un 60 % de los casos, mientras que el DBHE solo en el 5 % de los pacientes⁽³⁹⁾. Según la literatura revisada, las bandas oligoclonales, son un marcador de la enfermedad que se encuentra en entre un 60-80 % de los pacientes con EM, aunque no son patognomónicas de la enfermedad^(38, 40-43). Mientras que algunos estudios aún permanecen sin precisar la variabilidad de la bandas oligoclonales en relación con el curso, severidad o tratamiento de la EM⁽²⁾, y que ellas tienden a mantenerse estables, pueden exhibir ligeras variaciones individuales. El bajo porcentaje de bandas oligoclonales encontradas en nuestro estudio pudiera relacionarse con la menor severidad en la muestra estudiada, donde predominó la forma clínica brote-remisión. La presencia de MMP-2 en el LCR de todos los controles y pacientes concuerda con la literatura revisada, pues aunque ambas han sido implicadas en la ruptura de la BHE, migración de leucocitos y destrucción de la mielina, el papel fundamental de la MMP-2 está relacionado con la remodelación de la matriz extracelular⁽²⁵⁾. La presencia de MMP-2 en el LCR se relaciona con su expresión

constitutiva^(15, 16), siendo la cuantía de su actividad y no su presencia lo que se ha reportado que varía entre pacientes y controles^(21, 37). La presencia de MMP-9 con el diagnóstico de EM ha sido señalado por otros autores, en que han encontrado incrementos significativos de MMP-9 en el LCR de pacientes con EM comparados con sujetos sanos y pacientes con enfermedades neurológicas no inflamatorias, lo cual se relaciona con la inducción de la expresión de MMP-9 por condiciones proinflamatorias en pacientes con EM^(14, 19, 20). Aunque no se encontró asociación entre las formas clínicas y la presencia de MMP-9, se demuestra que es un buen marcador de la enfermedad, pero no distingue ninguna de las 3 formas clínicas. Existen reportes de frecuencia de MMP-9 en la forma brote-remisión durante las exacerbaciones de la enfermedad^(20, 21, 37). Fue significativa la asociación encontrada entre las bandas oligoclonales y la presencia de MMP-9, asociación que

habíamos encontrado en un estudio anterior⁽⁴⁴⁾ y apoya otro reportes^(21, 37) que implican a la MMP-9 con las alteraciones disímunes, características de esta enfermedad. La presencia de bandas oligoclonales en el LCR de pacientes con EM es frecuente y ha sugerido fuertemente su relación con los mecanismos inmunológicos que participan en la fisiopatología de la enfermedad^(17, 19, 41). El tratamiento inmunomodulador no modificó la presencia de bandas oligoclonales. Mientras Rosenberg⁽⁴⁵⁾, tampoco encontró diferencias significativas entre tratamiento inmunomodulador y presencia de bandas oligoclonales, otros autores reportan un 30 % de reducción de las bandas oligoclonales en tratamientos con esteroides.

Los resultados obtenidos apoyan la participación de la MMP-9 en los mecanismos inmunopatológicos en la EM y su posible utilidad como marcador en el seguimiento de esta enfermedad.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Opdenakker G, Nelissen I, Van Damme J. Functional roles and therapeutic targeting of gelatinase B and chemokines in multiple sclerosis. *Lancet Neurol*. 2003; (2): 747-56.
2. Cepok S, Jacobsen M, Schock S, Omer B, Jaekel S, Bøddeker I, Oertel WK, Sommer N, Hemmer B. Patterns of cerebrospinal fluid pathology correlate with disease progression in multiple sclerosis. *Brain*. 2001; 124: 2169-76.
3. Noseworthy JH. Progress in determining the causes and treatment of multiple sclerosis. (Review). *Nature*. 1999; 399 (6738 Suppl): A40-7.
4. McFarland H. Diseases of the central and peripheral nervous system. In: Frank M, Samter M, eds. *Immunologic Diseases*. Boston: Little Brown; 1995.p. 1081-1101.
5. Lublin FD, Reingold SC. Defining of clinical course of Multiple Sclerosis: results of an international survey. *Neurology*. 1996; 46:907-11.
6. Rolak AL. Multiple Sclerosis. In: Rolak AL, Harati Y. *Neuroimmunology for the clinician*. Boston: Butterworth-Heinemann ; 1997.p. 107-132.
7. Martin R, Holfeld R, McFarland HF. Multiple sclerosis. In: Brant T, Caplan L, Dichgans J, Diener H, Kennard C, eds. *Neurological Disorders: Course and Treatment*. San Diego: Academic Press; 1996.p. 483-505.
8. Poser CM, Paty DW, Scheinberg L. New diagnostic criteria for Multiple Sclerosis: Guidelines for research protocols. *Ann Neurol*. 1983; 13: 227-31.
9. Petereit HF, Heiss WD. New diagnostic criteria for multiple sclerosis [letter]. *Ann Neurol*. 2002; 51:533-34.
10. Cuzner ML, Opdenakker G. Plasminogen activators and matrix metalloproteases, mediators of extracellular proteolysis in inflammatory demyelination of the central nervous system (Review). *Ann Neurol*. 1999; 94: 1-14.
11. Kieseir BC, Seifert T, Giovannoni G, Hartung HP. Matrix metalloproteinases in inflammatory demyelination: targets for treatment (Review). *Neurol*. 1999; 53: 20-5.
12. Yong VW. Metalloproteinases: mediators of pathology and regeneration in the CNS. *Nature Neurosci* . 2005; (6): 931-44.
13. Bar-Or A, Nuttall RK, Duddy M, Alter A, Kim HJ, Ifergan I, et al. Analyses of all matrix metalloproteinase members in leukocytes emphasize monocytes as major inflammatory mediators in multiple sclerosis. *Brain*. 2003; 126: 2738-49.
14. Nagase H, Woessner F. Matrix metalloproteinases. [Review]. *J Biol Chem*. 1999; 274 (31): 21491-94.
15. Woessner JF Jr. The family of matrix metalloproteinases. *Ann NY Acad Sci*. 1994; 732:11-21
16. Petty MA, Lo EH. Junctional complexes of the blood-brain barrier: permeability changes in neuroinflammation. *Prog Neurobiol*. 2002; 68: 311-23.
17. Ovid H. Pathogenesis of multiple sclerosis: An update on immunology. *Curr Opin Neurol*. 2002; 15(3): 227-31.
18. Leppert D, Hughes P, Hubes S, Erne B, Grygar C, Said G, et al. Matrix metalloproteinase upregulation in chronic inflammatory demyelinating polyneuropathy and nonsystemic vasculitic neuropathy. *Neurol*. 1999; 53 (1): 62-70.
19. Kieseir BC, Storch MK, Archelos JJ, Martino G, Hartung H -P. Effector pathways in immune mediated central nervous system demyelination. *Curr Opin Neurol*. 1999; 12: 323-26.

20. Leppert D, Lindberg RLP, Kappos L, Leib SL. Matrix metalloproteinases: multifunctional effectors of inflammation in MS and bacterial meningitis. *Brain Res Reviews*. 2001; 36: 249-57.
21. Avolio C, Ruggieri M, Giuliani F, Liuzzi GM, Leante R, Riccio P, Livreas P, Trojano M. Serum MMP-2 and MMP-9 are elevated in different multiple sclerosis subtypes. *J Neuroimmunol*. 2003; 136: 46-53.
22. Rosenberg GA. Metalloproteinases biomarkers in multiple sclerosis. *Lancet*. 2005; 365 (9467): 1291-3.
23. Chandler S, Miller KM, Clements JM, Lury J, Corkill LD, Anthony DC, et al. Matrix metalloproteinases, tumor necrosis factor and multiple sclerosis: an overview. *J Neuroimmunol*. 1997; 72: 155-61
24. DeClerk YA. Interactions between tumor cells and stromal cells and proteolytic modification of the extracellular matrix by metalloproteinases in cancer. *Eur J Cancer*. 2000; 36: 1258-68.
25. Rosenberg GA, Dencoff JE, McGuire PG, Liotta LA, Stetler-Stevenson WG. Injury-induced 92-kilodalton gelatinase and urokinase expression in rat brain. *Lab Invest*. 1994; 71(3): 417-22
26. Rosenberg GA, Kornfeld M, Estrada E, Kelley RO, Liotta LA, Stetler-Stevenson WG. TIMP-2 reduces proteolytic opening of blood-brain barrier by type IV collagenase. *Brain Res*. 1992; 576: 203-7.
27. Rosenberg GA, Estrada EY, Dencoff JE, Stetler-Stevenson WG. Tumor necrosis factor- α -induced gelatinase B causes delayed opening of the blood-brain barrier: an expanded therapeutic window. *Brain Res*. 1995; 703:151-55.
28. Rosenberg GA. Matrix metalloproteinases and neuroinflammation in multiple sclerosis. *Neuroscientist*. 2002; 8(6): 586-95.
29. Opdenakker G, Van Damme J. Cytokine-regulated proteases in autoimmune diseases. *Immunol Today*. 1994; 15: 103-7.
30. Johnston JB, Zhang K, Silva C, Shalinsky DR, Conant K, Li LW, et al. HIV-1 Tat neurotoxicity is prevented by matrix metalloproteinase inhibitors. *Ann Neurol*. 2001; 49: 230-41.
31. Newman TA, Woolley ST, Hughes PM, Sibson NR, Anthony DC, Perry VH. T-cell and macrophage-mediated axon damage in the absence of a CNS-specific immune response: involvement of metalloproteinases. *Brain*. 2001; 124: 2203-14.
32. McDonald WI, Compston A, Edan G. Recommended diagnostic criteria for multiple sclerosis: guidelines from the International Panel on the diagnosis of multiple sclerosis. *Ann Neurol*. 2001; 50:121-7.
33. Smith I. Chromatographic and electrophoretic techniques. Vol 2. London: Pitman Press; 1968.p.369 – 383.
34. Evans JH, Quick DT. Polyacrylamide gel electrophoresis of spinal fluid proteins in neurological disorders. *Arch Neurol*. 1966, 14: 64-72.
35. Takeoka T, Shinohara Y, Furumi K, Mori K. Characteristic protein fractions of cerebrospinal fluid disc electrophoretic analysis. *Brain Res*. 1980; 198: 147 –56.
36. Lowry OH, Rosebrough RJ, Farr AL, Randall RJ. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem*. 1951; 193: 265-75.
37. Liuzzi GM, Trojano M, Fanelli M, Avolio C. Intrathecal synthesis of matrix metalloproteinase-9 in patients with multiple sclerosis: Implication for pathogenesis. *Mult Scler*. 2002; 8: 222-28.
38. Andersson M, Álvarez-Cermeno J, Bernardi G. Cerebrospinal fluid in the diagnosis of multiple sclerosis: a consensus report. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. 1994;57:897-902.
39. Cabrera Gómez JA, Santana Capote E, Echazábal Santana N. Estado actual de la esclerosis múltiple en Cuba. *Rev Neurol*. 2000; 31(5):482-493.
40. Cavuoti D, Baskin L, Jialal I. Detection of oligoclonal bands in cerebrospinal fluid by immunofixation electrophoresis. *Am J Clin Pathol*. 1998;109:585-588.
41. Lunding J, Midgard R, Vedeler CA. Oligoclonal bands in cerebrospinal fluid: a comparative study of isoelectric focusing, agarose gel electrophoresis and IgG index. *Acta Neurol Scand*. 2000; 102: 322-25.
42. Tintore M, Rovira A, Brieva L. Isolated demyelinating síndrome: comparison of CSF oligoclonal bands and different MR imaging criteria to predict conversión to CDMS. *Mult Scler*. 2001; 7: 359-63.
43. Marcheti P, Gutierrez J, Velia P. Identification of IgG-specific oligoclonal banding in serum and cerebrospinal fluid by isoelectric focusing: description of a simplified method for the diagnosis of neurological disorders. *Clin Chem Lab Med*. 1999; 37: 735-38.
44. Fernández Carriera R, González-Quevedo A, Alfaro I, Cabrera Gómez JA. CSF gelatinase A and B activity in patients with multiple sclerosis. Simposio Internacional. Avances recientes en neurología, CIMEQ.28-31 de julio de 1998, Ciudad de La Habana, Cuba
45. Rosenberg GA, Dencoff JE, Correa N, Reiners M, Ford CC. Effect of steroid on CSF matrix metalloproteinases in multiple sclerosis: relation of blood-brain barrier injury. *Neurol*. 1996; 46(6): 1626-32