

VALOR PRONÓSTICO DEL GLUTAMATO EN EL LÍQUIDO CEFALORRAQUÍDEO EN ESCLEROSIS MÚLTIPLE

AGUSTÍN PAPPOLLA¹, FRANCISCO SÁNCHEZ², LILIANA PATRUCCO¹, LUCIA VARELA¹, CLARA CASTAÑARES³, PABLO H. LOPEZ⁴, EDGARDO CRISTIANO², JUAN I. ROJAS²

¹Servicio de Neurología, Hospital Italiano de Buenos Aires, ²Centro de Esclerosis Múltiple de Buenos Aires, ³Laboratorio de Neurobiología, Instituto de Investigación Médica Mercedes y Martín Ferreyra, INIMEC-CONICET-Universidad Nacional de Córdoba, ⁴Laboratorio de Inmunomoduladores, CEFYBO-CONICET-UBA, Buenos Aires, Argentina

Resumen El objetivo del trabajo fue evaluar la asociación entre el nivel de glutamato en el líquido cefalorraquídeo (LCR) al inicio de la enfermedad y la progresión de la enfermedad durante el seguimiento en una cohorte de pacientes con esclerosis múltiple (EM). Se determinaron niveles de glutamato (Glu) en LCR al inicio de la enfermedad. Se realizó una resonancia basal y durante el seguimiento cada 12 meses con el objeto de determinar el porcentaje de cambio de volumen cerebral (PCVC), grosor cortical (GC) y volumen lesional cerebral en secuencia T2 (VLT2). Los predictores primarios de interés fueron los niveles basales de Glu en LCR, PCVC Y GC, así como la progresión clínica de la enfermedad [medida por *Expanded Disability Status Scale* (EDSS) y tasa anual de recaídas]. Un total de 26 pacientes fueron incluidos. La concentración media de Glu fue de $5.3 \pm 0.4 \mu\text{M/l}$. Se encontró una asociación significativa entre concentraciones basales elevadas de Glu y la progresión del EDSS ($b = 1.06$, IC 95% 0.47-1.66, $p = 0.003$), así como también el PCVC ($b = -0.71$, IC 95% -0.56-1.38, $p = 0.002$) y CG ($b = -0.15$, IC 95% -0.06-0.33, $p = 0.01$). No se encontró asociación entre los niveles de Glu y la tasa anual de recaídas como tampoco el VLT2 ($b = 0.08$, IC 95% -0.11-0.43, $p = 0.11$ y $b = 195$, IC -39-330, $p = 0.22$, respectivamente). Los niveles aumentados de Glu se asociaron con un mayor cambio en el PCVC y progresión del EDSS durante el seguimiento.

Palabras clave: glutamato, atrofia cerebral, volumen cerebral, esclerosis múltiple, líquido cefalorraquídeo

Abstract *Prognostic value of cerebrospinal fluid glutamate in multiple sclerosis.* The objective of this study was to evaluate the association between glutamate (Glu) levels in cerebrospinal fluid (CSF) at disease onset and disease progression during follow up in a cohort of multiple sclerosis (MS) patients. Glu level was measured at disease onset (first relapse). MRI was obtained at baseline and follow-up (every 12 months) to determine the percent of brain volume change (PBVC), cortical thickness (CT), and T2 lesion volume (T2LV). The primary predictors of interest were baseline CSF Glu levels, PBVC and CT, as well as clinical disease progression [measured by Expanded Disability Status Scale (EDSS) and annualized relapse rate] during follow-up. A total of 26 MS patients were included. Mean concentration of Glu in CSF at diagnosis was $5.3 \pm 0.4 \mu\text{M/l}$. A significant association was observed between higher baseline levels of Glu and an increase in EDSS during follow up ($b = 1.06$, 95%CI 0.47-1.66, $p = 0.003$) as well as PBVC ($b = -0.71$ 95%CI -0.56-1.38, $p = 0.002$) and CT ($b = -0.15$, 95%CI -0.06-0.33, $p = 0.01$). We did not observe an association between baseline Glu levels and relapse rate or T2LV during follow-up ($b = 0.08$, 95%CI -0.11-0.43, $p = 0.11$ and $b = 195$, 95%CI -39-330, $p = 0.22$, respectively). Higher Glu concentrations at disease onset were associated with an increase in PBVC and EDSS progression during follow-up in MS patients.

Key words: glutamate, brain atrophy, brain volume, multiple sclerosis, cerebrospinal fluid

PUNTOS CLAVE

- Existe un creciente interés por la identificación de biomarcadores que faciliten el entendimiento de la esclerosis múltiple y así lograr identificar factores diagnósticos y pronósticos que permitan un mejor tratamiento del paciente. Se ha demostrado en estudios previos que concentraciones elevadas de glutamato son responsables de la pérdida neuronal.
- A través de este estudio se demuestra la relación existente entre niveles elevados de glutamato en líquido cefalorraquídeo y el pronóstico y evolución de pacientes con esclerosis múltiple, incidiendo tanto en la evolución clínica medida por el Expanded Disability Status Scale así como en la progresión de la atrofia cortical y cambio del volumen cerebral.

Durante los últimos años se ha generado un creciente interés por la identificación de biomarcadores que faciliten el entendimiento de la progresión de la enfermedad en sujetos con esclerosis múltiple (EM)¹⁻³. En este sentido, la determinación de algunos metabolitos en el líquido cefalorraquídeo (LCR) proporcionó información importante en lo que respecta al proceso inmunológico y degenerativo subyacente, lo que podría presentar un elevado valor diagnóstico y pronóstico^{2,3}. El glutamato (Glu), principal neurotransmisor excitatorio del sistema nervioso central (SNC), es una de estas moléculas^{4,6}. Estudios previos mostraron que el incremento en las concentraciones de Glu es responsable de la pérdida neuronal tanto en etapas agudas como crónicas de la EM^{4,5}. En consecuencia, los niveles de Glu en LCR podrían ser utilizados desde el momento del diagnóstico de EM como un importante biomarcador de progresión de la enfermedad⁴.

El objetivo de este trabajo fue evaluar la asociación entre niveles de Glu en LCR al momento del diagnóstico y la progresión de la enfermedad (medida por parámetros clínicos y radiológicos) en una cohorte prospectiva de individuos con EM.

Materiales y métodos

Se realizó un estudio de cohorte prospectivo con pacientes que consultaron en el servicio de Neurología del Hospital Italiano de Buenos Aires. Se incluyeron mayores de 18 años con diagnóstico de EM, fenotipo recaída remisión (EMRR) según los criterios validados de McDonald del año 2010⁷. Se realizó seguimiento por cinco años. El comienzo de la enfermedad fue definido como la aparición del primer signo o síntoma sugestivo de desmielinización del SNC comprometiendo nervios ópticos, tronco cerebral, médula espinal u otras regiones, y no atribuible a otras enfermedades⁸. La evaluación clínica inicial fue realizada en todos los casos por un neurólogo con experiencia en el tratamiento de enfermedades desmielinizantes, considerando aspectos demográficos, clínicos y estudios complementarios. Durante el seguimiento, los pacientes fueron evaluados clínica y radiológicamente. Se evaluó la presencia de recaídas y se midió el EDSS (*Expanded Disability Status*

Scale) de forma trimestral. Asimismo, se realizó una resonancia (RM) basal dentro de los primeros 30 días del ingreso al estudio y cada 12 meses durante su seguimiento con el objeto de determinar el porcentaje de cambio de volumen cerebral (PCVC), grosor cortical (GC) y volumen lesional cerebral en secuencia T2 (VLT2) mediante modelos lineales. La misma se efectuó con resonador Siemens 1.5 Tesla con técnicas de adquisición estandarizadas de imágenes para pacientes con enfermedades desmielinizantes (densidad protónica, T2 convencional, FLAIR, T1 sin y con contraste endovenoso) y secuencia volumétrica 3D. Todas las RM fueron realizadas en periodos fuera de exacerbaciones de la enfermedad, con al menos dos meses de diferencia en aquellos que presentaron recaídas. No se realizó actualización del *hardware* durante el periodo del estudio.

Utilizando las secuencias T1 de la RM, se realizó la medición del volumen cerebral (VC) global aplicando el método y el *software* automatizado de medición de atrofia cerebral SIENAXr⁹. Para realizar la medición, SIENAXr utiliza la herramienta BET (*brain extraction tool*), parte del *software* de la librería FSL-FMRIB para extraer el cerebro y el cráneo de las imágenes de RM. Una vez extraído, un programa de segmentación tisular (FAST, otro *software* de la librería FSL) segmenta la imagen obtenida en GC, sustancia blanca (SB) y LCR¹⁰. Mediante ese proceso, SIENAXr, es capaz de obtener volúmenes cerebrales precisos de manera automatizada. El VC global obtenido es luego multiplicado por un factor de normalización preestablecido y ya incorporado al *software* que determina los volúmenes cerebrales finales normalizados para el paciente. Para eliminar los errores atribuibles a lesiones de SB, SIENAXr oculta y rellena con intensidades que coincidían con la SB normal circundante antes de cada análisis de segmentación por tipo de tejido.

Se estimó el PCVC entre las RM con el *software* SIENA (*Structural Image Evaluation using Normalisation of Atrophy*), incorporado dentro de la biblioteca FSL. El *software* realiza la extracción de las imágenes del cerebro y del cráneo de las secuencias axiales de T1 obtenidas en los dos puntos separados del tiempo¹⁰. Esas imágenes son luego alineadas entre sí y posteriormente segmentadas con el objeto de diferenciar tejido cerebral de tejido no cerebral y desplazamientos perpendiculares. Luego de la segmentación y alineación, el programa compara los diferentes segmentos para detectar el porcentaje de cambio del parénquima cerebral entre las sucesivas RM. Esta técnica es utilizada actualmente como referencia para cuantificar el cambio del VC y atrofia en pacientes con EM.

Para la medición del VLT2, se utilizó el *software* *Lesion Segmentation Tool* (version 3.0.0), una caja de herramientas SPM (*Statistical Parametric Mapping*) que segmenta las lesiones hiperintensas en T2 en la secuencia FLAIR¹¹.

Para la obtención del GC en cada individuo de forma rápida y confiable, se implementó el *software* *Computational Anatomy Toolbox* (CAT12) para SPM basado en la técnica *Projection-based Thickness* (PBT)¹².

Los niveles de Glu fueron determinados mediante fluorimetría en LCR al inicio de la enfermedad (primera recaída). Se analizaron los valores del metabolito en comparación con datos obtenidos de otro estudio en población sana (valor normal de glutamato en población sana de 3.399 + 1.63 µM/l). Se consideró como punto de corte 4.55 µM/l¹³.

Una vez recolectados los datos demográficos, clínicos y de RM al inicio de la enfermedad, se realizó un seguimiento prospectivo durante al menos 5 años. Los predictores primarios de interés fueron los niveles basales de Glu en LCR, el PCVC y la progresión de la enfermedad (medida por EDSS y tasa anual de recaídas) durante el seguimiento.

Para el análisis estadístico, las características basales demográficas y clínicas de la cohorte evaluada fueron infor-

medas en porcentajes para los datos categóricos y en media con su desvío estándar (DE) para los datos continuos. Con el objetivo de realizar el mejor análisis de los datos obtenidos durante los cinco años de seguimiento, la asociación de niveles de Glu al inicio de enfermedad, el EDSS, VLT2 y GC al inicio y durante el seguimiento y el PCVC y recaídas durante el seguimiento, fueron evaluados mediante un modelo lineal con ecuaciones de estimación generalizadas (EEG), ajustadas mediante una estructura de correlación intercambiable por edad y sexo¹⁴. En este modelo, el PCVC y VLT2 se calcularon a partir de la RM basal y la última RM del seguimiento. Por su parte, el GC se obtuvo a partir de la RM basal y la diferencia entre la RM inicial y la última obtenida. Los resultados se expresaron como coeficientes beta (b), error estándar de la media (EE) e intervalos de confianza (IC) del 95%.

El estudio fue aprobado por el Comité de Ética de Protocolos de Investigación del Hospital Italiano de Buenos Aires. Todos los sujetos fueron informados y firmaron el consentimiento informado previo a la incorporación al estudio.

Resultados

Se incluyeron un total de 26 pacientes con EM. La media de edad fue de 35 ± 3 años, 17 fueron mujeres, con una media de seguimiento de 71 ± 4 meses. El tiempo medio de evolución de la enfermedad al ingreso fue de 16 ± 4 meses y todos los casos eran pacientes con EMRR. El EDSS al momento del ingreso fue de 1.5 ± 1 . La concentración media de Glu en LCR en el inicio de la enfermedad fue de 5.3 ± 0.4 $\mu\text{M/L}$ (rango de 1.1 a 9.4 $\mu\text{M/L}$) (Tabla 1). Al momento del diagnóstico y posterior a la medición de Glu en LCR, todos recibieron tratamiento modificador de la enfermedad: 13 recibieron interferón, 10 fingolimod y 3 natalizumab. Durante el seguimiento, se encontró una fuerte correlación entre la concentración elevada de Glu y la progresión en el EDSS ($b = 1.06$, IC 95% 0.47-1.66, $p = 0.003$) (Fig. 1). Respecto al volumen de estructuras cerebrales, se encontró una asociación significativa en-

tre niveles elevados de Glu al inicio de la enfermedad y una reducción en el volumen de SB, aumentando así el PCVC ($b = -0.71$, IC 95% -0.56-1.38, $p = 0.002$). De forma concordante, el GC se encontró reducido en aquellos pacientes con una concentración de Glu elevada ($b = -0.15$, IC 95% -0.06-0.33, $p = 0.01$). No se encontró durante el seguimiento una relación significativa entre los niveles de Glu y la tasa anualizada de recaídas, ni el VLT2 ($b = 0.08$, IC 95% -0.11-0.43, $p = 0.11$ y $b = 195$, IC 95% -39-330, $p = 0.22$, respectivamente) (Tabla 2, Fig. 1).

Discusión

En los últimos años se han tratado de identificar distintos biomarcadores en pacientes con EM que contribuyan al diagnóstico y predicción de la progresión de la enfermedad. Entre ellos, existen algunos bien conocidos y utilizados en la práctica diaria como son las bandas oligoclonales (BOC) y secuencias específicas de RM, mientras que otros se encuentran actualmente en estudio, como los neurofilamentos y la proteína ácida fibrilar glial (GFAP)¹.

En el presente estudio se analizó la relación existente entre las concentraciones biológicas de Glu en LCR al inicio de la enfermedad y el pronóstico clínico y radiológico de pacientes con EMRR. Se observó una asociación significativa entre niveles iniciales elevados de Glu al inicio de la enfermedad y un mayor PCVC y GC, así como una mayor progresión del EDSS durante el seguimiento.

Nuestro trabajo se encuentra en línea con estudios previos que vinculan al Glu con la patogénesis de la EM. Sarchielli y col., evaluaron sus niveles en LCR de pacientes con EMRR y EM secundaria progresiva (EMSP) en relación a controles sin enfermedad. Los autores concluyeron que los niveles del metabolito en LCR se encontraban significativamente más elevados en pacien-

TABLA 1.— Datos basales de los sujetos incluidos en el estudio

Variable	n = 26
Edad (años \pm DE)	35 ± 3
Sexo femenino, n (%)	17 (66)
Media de seguimiento (meses)	71.4 ± 4
Duración de la enfermedad (meses)	16 ± 4
Fenotipo de EM (recaída-remisión), n (%)	26 (100)
EDSS al ingreso del estudio \pm DE	1.5 ± 1
Niveles basales de Glu ($\mu\text{M/l}$)	5.3 ± 0.4 (range 1.1 to 9.4)
VLT2 media \pm DE (mm^3)	432 ± 123
GC (mm^3)	3.1
Tratamiento farmacológico, n (%)	26 (100)

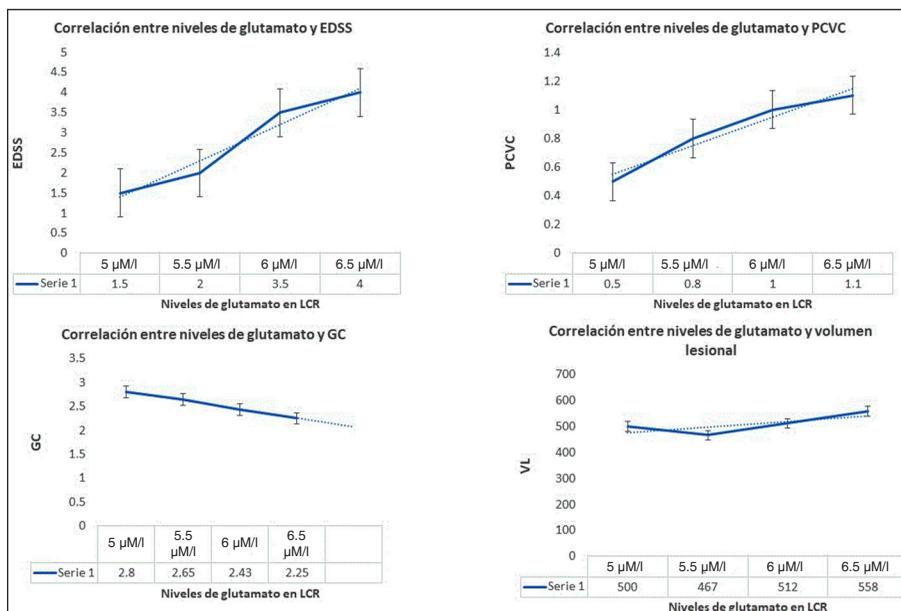
DE: desviación estándar; EM: esclerosis múltiple; Glu: Glutamato; VLT2: volumen lesional en T2; GC: grosor cortical

TABLA 2.– Estimación ecuacional generalizada de niveles de glutamato en relación a parámetros clínicos y radiológicos a los 5 años de seguimiento

Variable	b ± SE (95%CI)	p
EDSS al inicio	0.34 ± 0.23 (-0.04-0.66)	0.19
EDSS a los 5 años	1.06 ± 0.3 (0.47-1.66)	0.003
PCVC	-0.71 ± 0.17 (-0.56-1.38)	0.002
GC al inicio	-0.10 ± 0.05 (-0.02-0.18)	0.04
GC a los 5 años	-0.15 ± 0.09 (-0.06-0.33)	0.01
Tasa de recaída	0.08 ± 0.03 (-0.11-0.43)	0.11
VLT2 al inicio	103 ± 78 (-10-210)	0.34
VLT2 a los 5 años	195 ± 119 (-39-330)	0.22

PCVC: porcentaje de cambio de volumen cerebral; VLT2: volumen lesional en T2; GC: grosor cortical, EDSS: expanded disability status scale

Fig. 1.– Correlación entre niveles de glutamato al inicio de la enfermedad, volúmenes cerebrales y Expanded Disability Status Scale



EDSS: expanded disability status scale; PCVC: porcentaje de cambio de volumen cerebral; GC: grosor cortical; VL: volumen lesional

tes con EM (p < 0.001) y aún más elevados en pacientes con recaídas clínicas frecuentes, lesiones activas o EMSP (p<0.001), sugiriendo que el Glu se encuentra implicado tanto en la actividad inflamatoria de la enfermedad como en su componente degenerativo¹³. En concordancia, Azevedo y col. encontraron que concentraciones elevadas de Glu en LCR se relacionan con un descenso concomitante del N-acetilaspártato, provocando una alteración en la relación de ambas moléculas, lo que podría actuar como factor contribuyente a la progresión de la enfermedad¹⁵. Baranzini y col. encontraron unos 70 genes asociados a niveles incrementados de Glu cerebral, encontrándose

que individuos con mayor número de alelos presentaron concentraciones mayores de Glu y, en consecuencia, un descenso del N-acetilaspártato y VC a un año de seguimiento¹⁶. Por último, Srinivasan y col. encontraron niveles elevados de Glu en RM tanto en lesiones activas (p = 0.02) como en sustancia blanca normal de pacientes con EM (p = 0.03) en relación al grupo control¹⁷.

Publicaciones previas sugieren que la excitotoxicidad del Glu juega también un rol importante en otras enfermedades degenerativas del SNC, como la enfermedad de Parkinson, Alzheimer, enfermedad cerebrovascular isquémica y trastornos psiquiátricos^{4, 5, 18, 19}. El meca-

nismo principal por el cual esta molécula produce daño neuronal es mediante la activación de sus receptores de membrana, induciendo un aumento del calcio intracelular y llevando a la muerte celular^{4,6}. En el SNC, las neuronas son la mayor fuente de producción de Glu y los astrocitos juegan un rol central a la hora de regular su homeostasis, ingresándolo al compartimiento intracelular por medio de transportadores específicos en su membrana⁴. Una vez dentro del compartimiento intracelular, el Glu es convertido en glutamina no tóxica por la enzima astrocitaria glutamina sintetasa. Posteriormente, es liberado al espacio extracelular e incorporado nuevamente dentro de neuronas para ser reutilizado y así mantener estable el *pool*/intracelular de Glu¹⁸. Sinérgicamente, la mielina contribuye a neutralizar los efectos tóxicos del Glu mediante algunas de sus principales moléculas constituyentes, como la glicoproteína asociada a mielina (MAG)²⁰.

En la EM ocurren fenómenos inflamatorios que alteran la homeostasis fisiológica del Glu. En primer lugar, la microglía activada y los astrocitos producen una mayor concentración extracelular del neurotransmisor, anulando su rol protector natural. Además, los monocitos y macrófagos intervienen en la liberación de Glu por medio de transportadores de membrana⁴. Por último, los axones desmielinizados producto del ataque inflamatorio constituyen una fuente adicional de Glu intracelular¹⁵⁻²³. Esto se ha comprobado tanto para lesiones activas como crónicas de EM, donde estudios inmunohistoquímicos revelaron una actividad significativamente reducida de las enzimas encargadas de metabolizar el Glu a nivel local²⁴. La resultante de los factores antedichos es una mayor destrucción de oligodendrocitos, células particularmente vulnerables a los efectos deletéreos del Glu²⁵. En concordancia con estos hallazgos, estudios funcionales por RM han demostrado que las concentraciones de Glu y glutamina se encuentran significativamente aumentadas en la espectroscopía de lesiones activas y SB de apariencia normal de pacientes con EM en relación a controles^{17, 26-27}. Más aún, concentraciones elevadas de Glu en la espectroscopía se correlacionan con una mayor progresión de discapacidad, depresión y del MSSS (*score* de gravedad de EM)²⁷.

El presente estudio arrojó una correlación lineal y significativa entre concentraciones biológicas basales aumentadas de Glu en LCR, la progresión de discapacidad medida por EDSS y la atrofia cerebral. Sin embargo, no se encontró relación entre los niveles de Glu en LCR y la tasa anualizada de recaídas ni el VLT2 durante el periodo de seguimiento. Una posible explicación para esto podría encontrarse en relación al hecho que los pacientes iniciaron inmediatamente tras el dosaje de Glu tratamiento con fármacos modificadores de enfermedad, disminuyendo así el riesgo de nuevas recaídas, y consecuentemente el daño de SB. Otra posible explicación podría ser que los niveles de Glu evidencian un proceso degenerativo

subyacente en lugar de un proceso inflamatorio focal, motivo por el cual la concentración de Glu se asociaría a la progresión de la discapacidad en lugar de la tasa anualizada de recaídas^{4,17}.

Nuestro trabajo presenta limitaciones. En primer lugar, fue realizado en un único centro de atención. Además, si bien fue un estudio prospectivo de al menos cinco años de seguimiento, fue observacional, con el sesgo que implica dicho diseño. Otra limitación del trabajo consistió en no contar con otros biomarcadores séricos o en LCR de la enfermedad (bandas oligoclonales o neurofilamentos) para poder comparar estos hallazgos con otros aspectos del proceso degenerativo en EM. Por último, el tamaño muestral fue pequeño, excluyendo pacientes con fenotipos primarios progresivos y secundarios progresivos de EM. Por esto, sería de importancia que otros grupos repliquen estos hallazgos.

En conclusión, este trabajo provee resultados que refuerzan nuestro conocimiento actual sobre la neurotoxicidad *in vivo* del Glu. Esto es de especial importancia a la hora de integrar conceptualmente aspectos fisiopatológicos, de biomarcadores por RM y de discapacidad para facilitar un mejor estudio y comprensión de la EM.

Conflicto de intereses: Ninguno para declarar

Bibliografía

1. Housley WJ, Pitt D, Hafler DA. Biomarkers in multiple sclerosis. *Clin Immunol* 2015; 161: 51-8.
2. Comabella M, Sastre-Garriga J, Montalban X. Precision medicine in multiple sclerosis: biomarkers for diagnosis, prognosis, and treatment response. *Curr Opin Neurol* 2016; 29: 254-62.
3. Martinelli V, Dalla Costa G, Messina MJ, et al. Multiple biomarkers improve the prediction of multiple sclerosis in clinically isolated syndromes. *Acta Neurol Scand* 2017; 136: 454-61.
4. Macrez R, Stys PK, Vivien D, Lipton SA, Docagne F. Mechanisms of glutamate toxicity in multiple sclerosis: biomarker and therapeutic opportunities. *Lancet Neurol* 2016; 15: 1089-102.
5. Luchtman D, Gollan R, Ellwardt E, et al. In vivo and in vitro effects of multiple sclerosis immunomodulatory therapeutics on glutamatergic excitotoxicity. *J Neurochem* 2016; 136: 971-80.
6. Kostic M, Zivkovic N, Stojanovic I. Multiple sclerosis and glutamate excitotoxicity. *Rev Neurosci* 2013; 24:71-88.
7. Polman CH, Reingold SC, Banwell B, et al. Diagnostic criteria for multiple sclerosis: 2010 revisions to the McDonald criteria. *Ann Neurol* 2011; 69: 292-302.
8. Miller D, Barkhof F, Montalban X, Thompson A, Filippi M. Clinically isolated syndromes suggestive of multiple sclerosis, part I: natural history, pathogenesis, diagnosis, and prognosis. *Lancet Neurol* 2005; 4: 281-8.
9. Fischl B, Dale AM. Measuring the thickness of the human cerebral cortex from magnetic resonance images. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2000; 97: 11050-5.
10. Fischl B, Salat DH, Busa E, et al. Whole brain segmentation: automated labeling of neuroanatomical structures in the human brain. *Neuron* 2002; 33: 341-55.

11. Schmidt, P. Bayesian inference for structured additive regression models for large-scale problems with applications to medical imaging (chapter 6.1). Dissertation at the Faculty of Mathematics, Computer Science and Statistics of the Ludwig Maximilians University in Munich. Nov 7, 2016. En: https://edoc.ub.uni-muenchen.de/20373/1/Schmidt_Paul.pdf; consultado marzo 2021.
12. Dahnke R, Aine Yotter R, Gaser C. Cortical thickness and central surface estimation. *Neuroimage* 2013; 65: 336-48.
13. Sarchielli P, Greco L, Floridi A, Floridi A, Virgilio G. Excitatory Amino Acids and Multiple Sclerosis. Evidence from cerebrospinal fluid. *Arch Neurol* 2003; 60: 1082-8.
14. Sinnecker T, Ruberte E, Schadelin S, et al. New and enlarging white matter lesions adjacent to the ventricle system and thalamic atrophy are independently associated with lateral ventricular enlargement in multiple sclerosis. *J Neurol* 2020; 267: 192-202.
15. Azevedo CJ, Kornak J, Chu P, et al. In vivo evidence of glutamate toxicity in multiple sclerosis. *Ann Neurol* 2014; 76:269-78.
16. Baranzini S, Srinivasan R, Khankhanian P, et al. Genetic variation influences glutamate concentration in brains of patients with multiple sclerosis. *Brain* 2010; 133: 2603-11.
17. Srinivasan R, Sailasuta N, Hurd R, Nelson S, Pelletier D. Evidence of elevated glutamate in multiple sclerosis using magnetic resonance spectroscopy at 3 T. *Brian* 2005; 128: 1016-25.
18. Lewerenz J, Klein M, Methner A. Cooperative action of glutamate transporters and cystine/glutamate antiporter system Xc⁻ protects from oxidative glutamate toxicity. *J Neurochem* 2006; 98: 916-25.
19. Wikinski SI, Acosta GB. Papel de los aminoácidos excitatorios en neuropatología. *Medicina (B Aires)* 1995; 55: 355-65.
20. Lopez PH, Ahmad AS, Mehta NR, et al. Myelin-associated glycoprotein protects neurons from excitotoxicity. *J Neurochem* 2011; 116: 900-8.
21. Pitt D, Werner P, Raine CS. Glutamate excitotoxicity in a model of multiple sclerosis. *Nat Med* 2000; 6: 67-70.
22. Kostic M, Zivkovic N, Cvetanovic A, Stojanovic I, Colic M. IL-17 signalling in astrocytes promotes glutamate excitotoxicity: Indications for the link between inflammatory and neurodegenerative events in multiple sclerosis. *Mult Scler Relat Disord* 2017; 11: 12-7.
23. Pampliega O, Domercq M, Soria FN, Villoslada P, Rodriguez-Antiguedad A, Matute C. Increased expression of cystine/glutamate antiporter in multiple sclerosis. *J Neuroinflammation* 2011; 8: 63.
24. Werner P, Pitt D, Raine CS. Multiple sclerosis: altered glutamate homeostasis in lesions correlates with oligodendrocyte and axonal damage. *Ann Neurol* 2001; 50: 169-80.
25. Rosin C, Bates TE, Skaper SD. Excitatory amino acid induced oligodendrocyte cell death in vitro: receptor-dependent and -independent mechanisms. *J Neurochem* 2004; 90: 1173-85.
26. Tisell A, Leinhard OD, Warntjes JB, et al. Increased concentrations of glutamate and glutamine in normal-appearing white matter of patients with multiple sclerosis and normal MR imaging brain scans. *PLoS One* 2013; 8: e61817.
27. Polacek H, Kantorova E, Hnilcova P, Grendar M, Zelenak K, Kurca E. Increased glutamate and deep brain atrophy can predict the severity of multiple sclerosis. *Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc Czech Repub* 2019; 163: 45-53.