

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
FACULTAD DE MEDICINA



TESIS DOCTORAL

**Estudio de factores que permitan la estratificación del riesgo
de leucoencefalopatía multifocal progresiva en pacientes con
esclerosis múltiple candidatos a recibir tratamiento con
Natalizumab**

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR

PRESENTADA POR

Inmaculada Toboso del Amo

Director

Luis María Villar Guimerans

Madrid

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE MEDICINA

Departamento de Microbiología I



**“ESTUDIO DE FACTORES QUE PERMITAN LA ESTRATIFICACIÓN DEL RIESGO DE
LEUCOENCEFALOPATÍA MULTIFOCAL PROGRESIVA EN PACIENTES CON
ESCLEROSIS MÚLTIPLE CANDIDATOS A RECIBIR TRATAMIENTO CON
NATALIZUMAB”**

Inmaculada Toboso de Lamo

MADRID 2019

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE MEDICINA

Departamento de Microbiología I



**“ESTUDIO DE FACTORES QUE PERMITAN LA ESTRATIFICACIÓN DEL RIESGO DE
LEUCOENCEFALOPATÍA MULTIFOCAL PROGRESIVA EN PACIENTES CON
ESCLEROSIS MÚLTIPLE CANDIDATOS A RECIBIR TRATAMIENTO CON
NATALIZUMAB”**

Tesis doctoral de:

Inmaculada Toboso de Lamo

Licenciada en Biología y Bioquímica

Directora:

Dra. Luisa María Villar Guimerans

Jefa del Servicio de Inmunología del Hospital Universitario Ramón y Cajal



U N I V E R S I D A D
COMPLUTENSE
M A D R I D

Dña. Luisa María Villar Guimerans, Doctora en Farmacia y jefa del Servicio de Inmunología del Hospital Ramón y Cajal de Madrid.

CERTIFICA: Que Doña Inmaculada Toboso de Lamo, ha realizado bajo su dirección la Tesis Doctoral titulada: **“ESTUDIO DE FACTORES QUE PERMITAN LA ESTRATIFICACIÓN DEL RIESGO DE LEUCOENCEFALOPATÍA MULTIFOCAL PROGRESIVA EN PACIENTES CON ESCLEROSIS MÚLTIPLE CANDIDATOS A RECIBIR TRATAMIENTO CON NATALIZUMAB”**.
Revisada la misma, reúne las condiciones necesarias para obtener el Grado de Doctor, por lo que doy mi conformidad para su presentación a tal fin.

En Madrid, a dos de julio del 2019

Fdo: Dña. LUISA MARÍA VILLAR GUIMERANS



**DECLARACIÓN DE AUTORÍA Y ORIGINALIDAD DE LA TESIS
PRESENTADA PARA OBTENER EL TÍTULO DE DOCTOR**

D./Dña. INMACULADA TOBOSO DE LAMO,
estudiante en el Programa de Doctorado EN INVESTIGACIÓN BIOMÉDICA,
de la Facultad de Medicina de la Universidad Complutense de
Madrid, como autor/a de la tesis presentada para la obtención del título de Doctor y
titulada:

ESTUDIO DE FACTORES QUE PERMITAN LA ESTRATIFICACIÓN DEL RIESGO DE LEUCOENCEFALOPATÍA
MULTIFOCAL PROGRESIVA EN PACIENTES CON ESCLEROSIS MÚLTIPLE CANDIDATOS A RECIBIR TRATAMIENTO CON NATALIZUMAB

y dirigida por: LUISA MARÍA VILLAR GUIMERANS

DECLARO QUE:

La tesis es una obra original que no infringe los derechos de propiedad intelectual ni los derechos de propiedad industrial u otros, de acuerdo con el ordenamiento jurídico vigente, en particular, la Ley de Propiedad Intelectual (R.D. legislativo 1/1996, de 12 de abril, por el que se aprueba el texto refundido de la Ley de Propiedad Intelectual, modificado por la Ley 2/2019, de 1 de marzo, regularizando, aclarando y armonizando las disposiciones legales vigentes sobre la materia), en particular, las disposiciones referidas al derecho de cita.

Del mismo modo, asumo frente a la Universidad cualquier responsabilidad que pudiera derivarse de la autoría o falta de originalidad del contenido de la tesis presentada de conformidad con el ordenamiento jurídico vigente.

En Madrid, a 10 de julio de 2019

Inmaculada
a Toboso
de Lamo

Firmado digitalmente
por Inmaculada
Toboso de Lamo
Fecha: 2019.06.27
23:52:15 +02'00'

Fdo.: _____

Esta DECLARACIÓN DE AUTORÍA Y ORIGINALIDAD debe ser insertada en
la primera página de la tesis presentada para la obtención del título de Doctor.

A Irene

AGRADECIMIENTOS

Me gustaría agradecer a mi directora de tesis, la Dra. Luisa María Villar Guimerans el haberme permitido seguir trabajando con ella en la realización de esta tesis doctoral. Por todo lo que me ha enseñado, no solo de inmunoquímica y de la EM, sino de cómo realizar una investigación de calidad. Además, me gustaría agradecerle a nivel personal su preocupación por todos los miembros del servicio de Inmunología del Hospital Universitario Ramón y Cajal y su dedicación al mismo. También al antiguo jefe de servicio, Dr. Javier Coll, que me acogió cuando llegué. Y a mi primera jefa, Lola, que junto a María, me enseñó que en sitios pequeños se pueden hacer grandes cosas.

Al Dr. Pedro González-Porqué, por sus enseñanzas del laboratorio, de las técnicas, del rigor y de la vida. Todo ello aderezado con una forma de ser excepcional. Gracias Pedro por preguntarme tantas veces por la tesis.

A mi tutor José Ramón Regueiro, primero por sus clases hace tantos años, gracias a ellas, hoy soy inmunóloga. Por ser tan resolutivo respondiendo mis múltiples dudas durante este proceso.

A mi actual jefe, Fernando Cava, por apoyarme en mi trabajo. A Beatriz Ortega y a Rosa Pello por acogerme, rescatarme y ayudarme, qué gusto encontrar gente como vosotras. Especialmente a mi equipo: M^a José, Javi, Ari y María, es un lujo trabajar con vosotros, valéis oro.

Me gustaría agradecer especialmente su participación a todos los grupos que han colaborado en el estudio multicéntrico, en particular al Dr. Roberto Álvarez-Lafuente por su ayuda, sus ideas y su amabilidad. Y a todos los pacientes que han participado en

el estudio que conforma este trabajo, ya que, todo lo que hacemos persigue mejorar su calidad de vida.

A todo el servicio de Inmunología del Hospital Universitario Ramón y Cajal, especialmente a Ernesto Roldán, gracias por tu paciencia, por enseñarme tanto y corregirme, nunca podré devolverte el tiempo que empleaste en mi formación, pero siempre te lo agradeceré. A Garbiñe Roy, por enseñarme la prudencia que acarrea nuestro trabajo, no hay día que no me acuerde de ti.

A Lali, en primer lugar, porque junto con Raquel, sois las “culpables” de que acabara en el Pira, pero también por tu paciencia, por dejar todo siempre por ayudarnos a todos. A Mercedes por hacerme la vida siempre más fácil, eres una de las personas más resolutivas que conozco, gracias por ser mi mejor confidente. A todos los facultativos del servicio por enseñarme tanta inmunología: Ángela, Ana, JL. Castañer, Nora y a los técnicos por su paciencia, especialmente a Pilar y Carmen que me han “sufrido” mucho.

A todos los residentes, porque gracias a ellos la residencia ha sido una de las mejores experiencias de mi vida. A Raquel y Gabriela por ser las mejores R mayores que nadie pueda tener, a Silvia, Carmen y Cris, por tantísimos momentos. A Amalia y a Israel por echarme una mano con la estadística y los programas de la bibliografía.

A nivel personal me gustaría agradecer a mis amigos de la facultad: Lulu, Luis, Isra y en especial a Alba y a Sara por ser cabeza y corazón del equipo 15. Sin lugar a duda, sois lo mejor que me ha dado la Biología.

A mis "Maras" (Burbu, Tuki, Corita, Yas y Sofía) y a Nines y Pablo, por ser mi familia madrileña.

A mis amigos de toda la vida, la familia que se elige, Llanos, Ana, Juanma, José, Pedro: os quiero muchísimo y os lo digo poco. En especial a Mariquilla, porque pocas hijas únicas pueden tener una hermana como tú, por estar SIEMPRE, incluso antes de oír el silbidito, por cuidarme, por las risas, por los achuchones y por Eva y Mateo.

Sobre todo, quiero agradecer a mis padres todo lo que han hecho y siguen haciendo por mí y mi familia. Sin vosotros no sería quien soy, ni habría tenido y disfrutado las oportunidades que he tenido. Gracias.-

Para finalizar, Gabi sólo puedo darte gracias por ser mi pilar y mi refugio siempre, un faro cuando ni yo sé por dónde ir. Y a Irene, mi pequeño torbellino, eres lo mejor que me ha pasado, me enseñas más tú a mí. Os quiero.

ÍNDICE

Índice

ABREVIATURAS	25
RESUMEN.....	31
I. INTRODUCCIÓN	39
1.1. HISTORIA DE LA ESCLEROSIS MÚLTIPLE	42
1.2. EPIDEMIOLOGÍA DE LA ENFERMEDAD	43
1.3. ETIOLOGÍA	44
1.3.1. Factores genéticos.....	44
1.3.2. Factores epigenéticos.....	45
1.3.3. Factores ambientales	46
1.4. PATOLOGÍA DE LA EM.....	48
1.4.1. Papel de los anticuerpos en la EM.....	51
1.5. FORMAS CLÍNICAS DE LA ESCLEROSIS MÚLTIPLE	51
1.6. DIAGNÓSTICO DE LA EM.....	53
1.6.1. Resonancia magnética nuclear (RMN)	54
1.6.2. Estudio de líquido cefalorraquídeo (LCR)	55
1.6.3. Potenciales evocados	57
1.7. MARCADORES PRONÓSTICOS EN LA EM.....	58
1.7.1. Cadena ligera de los neurofilamentos.....	58
1.7.2. Quitinasa 3 like 1	59

1.7.3. Bandas oligoclonales IgM lípido-específicas	59
1.8. TRATAMIENTOS DE LA EM.....	60
1.8.1. IFN beta (Rebif/ Avonex/ Plegridy/Extavia/Betaferon).....	61
1.8.2. Acetato de glatiramero (Copaxone/ Glatopa).....	62
1.8.3. Teriflunomida (Aubagio).....	62
1.8.4. Fingolimod (Gilenya).....	63
1.8.5. Dimetil fumarato (Tecfidera/BG-12)	64
1.8.6 Alemtuzumab (Lemtrada).....	65
1.8.7. Ocrelizumab.....	65
1.8.8. Mitoxantrona (Novantrone)	66
1.8.9. Natalizumab (Tysabri).....	66
1.9. LEUCOENCEFALOPATÍA MULTIFOCAL PROGRESIVA	70
1.9.1. Epidemiología de virus John Cunningham (VJC).....	71
1.9.2. Diagnóstico de la LMP	72
1.9.3. LMP en otras opciones terapéuticas	72
1.9.4. Estratificación del riesgo de desarrollar LMP	73
II. HIPÓTESIS	77
III. OBJETIVOS	81
IV. MATERIALES Y MÉTODOS.....	85
4.1. DISEÑO DEL ESTUDIO	87

4.1.1. Criterios de inclusión de los centros	87
4.1.2. Criterios de inclusión de pacientes.....	87
4.1.3. Variables clínicas solicitadas a los centros participantes	88
4.1.4. Variables de laboratorio solicitadas a los centros participantes.....	88
4.1.5. Duración del estudio	89
4.2. PACIENTES	89
4.2.1. Inclusión de pacientes	89
4.2.2. Datos clínicos	91
4.2.3. Muestras biológicas.....	93
4.3. MATERIALES.....	94
4.3.1. Materiales usados en la detección de bandas oligoclonales IgG (BOCG), IgM totales (BOCM) e IgM específicas frente a lípidos de mielina (BOCM-LE)	94
4.3.2. Materiales utilizados en la determinación de albúmina, IgG y IgM en las muestras de suero y LCR	96
4.4 MÉTODOS	96
4.4.1. Estudio de variables clínicas	96
4.4.2. Estudio de variables de laboratorio.....	100
4.5. ANÁLISIS ESTADÍSTICO.....	105
V. RESULTADOS.....	109
5.1. ESTUDIO MULTICÉNTRICO DE FACTORES CLÍNICOS Y DE LABORATORIO QUE SE ASOCIAN AL RIESGO DE LMP	111

5.2. PRIMERA RONDA DE DEPURACIÓN DE RESULTADOS	114
5.2.1. Datos obligatorios.....	114
5.2.2. Datos optativos.....	115
5.3. SEGUNDA RONDA DE DEPURACIÓN DE RESULTADOS	116
5.3.1. Datos obligatorios.....	116
5.3.2. Datos optativos.....	117
5.4. BASE DE DATOS FINAL	117
5.4.1. Datos obligatorios.....	117
5.4.2. Datos optativos.....	120
5.5. ANÁLISIS ESTADÍSTICO.....	122
5.5.1. Análisis univariante en la cohorte total de pacientes	122
5.5.2. Análisis univariante en la cohorte de pacientes con estudio de BOCM.....	135
5.5.3. Análisis multivariante en la cohorte total	147
5.5.4. Análisis multivariante de la cohorte con estudio de BOCM.....	154
VI. DISCUSIÓN	163
6.1. ANÁLISIS UNIVARIANTE	169
6.1.1. Título de Ac anti-JC.....	169
6.1.2. Edad y duración de la enfermedad al inicio del tratamiento con NTZ.....	170
6.1.3. Duración del tratamiento con NTZ.....	173
6.1.4. Tratamiento con inmunosupresores previo al tratamiento con NTZ	174

6.1.5. Tasa de brotes	176
6.1.6. Sexo de los pacientes	177
6.1.7. MSSS	177
6.2. COHORTE DE PACIENTES CON ESTUDIO DE BOCM-LE	178
6.3. ANÁLISIS MULTIVARIANTE.....	179
6.3.1. Cohorte total	179
6.3.2. Cohorte de pacientes con estudio de BOCM	180
VII. CONCLUSIONES	183
VIII. BIBLIOGRAFÍA	187

ABREVIATURAS

Abreviaturas

ABC: Área Bajo la curva ROC

Ac: Anticuerpo

AcMo: Anticuerpo monoclonal

BHE: Barrera hematoencefálica

BOC: Bandas oligoclonales

BOCG: Bandas oligoclonales IgG

BOCM: Bandas oligoclonales IgM

BOCM-LE: Bandas oligoclonales IgM lípido-específicas

CHI3L1: Proteína Quitinasa 3 like 1

CI: Intervalo de confianza

CIS: Síndrome clínico aislado

DE: Desviación Estándar

DTT: Ditiotreitól

EAE: Encefalomiелitis experimental autoinmune

EBV: Virus de Epstein-Barr

EM: Esclerosis múltiple

EMA: Agencia Europea del medicamento

EMPP: Esclerosis múltiple primariamente progresiva

EMRR: Esclerosis múltiple recurrente-recidivante

EMSP: Esclerosis múltiple secundariamente progresiva

FDA: Food and Drug Administration

FLAIR: Resonancia por recuperación de inversión atenuada de fluido

HHV-6: Virus del Herpes humano tipo 6

ICAM-1: Molécula de adhesión intercelular 1

IEF: Isoelectroenfoque

IFN: Interferón

LCR: Líquido cefalorraquídeo

LMP: Leucoencefalopatía multifocal progresiva

MBP: Proteína básica de la mielina

miRNA: microRNA

NF-L: Cadena ligera de los neurofilamentos

NTZ: Natalizumab

PBS: Tampón fosfato salino

PMN: Células polimorfonucleares

RMN: Resonancia Magnética Nuclear

RNA: Ácido ribonucleico

TAC: Tomografía computarizada axial

TME: Tratamientos modificadores de la enfermedad

TNF: Factor de necrosis tumoral

VCAM-1: Molécula de adhesión celular vascular 1

VJC ó Virus JC: virus John Cunningham

VLA-4: very late antigen 4

RESUMEN

Resumen

Introducción

El riesgo de desarrollar leucoencefalopatía multifocal progresiva (LMP), una infección oportunista causada por el virus John Cunningham (JC), restringe el uso del natalizumab (NTZ), un tratamiento altamente eficaz para la esclerosis múltiple (EM). La presencia de anticuerpos anti-JC, la inmunosupresión previa y la duración del tratamiento se han identificado como variables que contribuyen a estratificar el riesgo de LMP. Sin embargo, se ha prestado menos atención al estado inmunológico del paciente. Este hecho es sorprendente, ya que la aparición de la LMP se suele asociar con una respuesta inmune comprometida. En esta línea, se ha descrito que, en pacientes con una EM con baja actividad inflamatoria, que se asocia con una ausencia de bandas oligoclonales IgM lípido-específicas (BOCM-LE) en líquido cefalorraquídeo (LCR), presentan un mayor riesgo de desarrollar LMP de manera secundaria al tratamiento con NTZ. Este hecho podría explicarse debido a que el NTZ actúa como un potente antiinflamatorio, pudiendo inducir una inmunosupresión excesiva en pacientes con un curso de EM más benigno. Para evaluar esta asociación, exploramos si las variables clínicas y demográficas asociadas con el curso de la EM pueden contribuir a identificar a los pacientes con un riesgo bajo de LMP antes del inicio del tratamiento con NTZ.

Materiales y métodos

Se incluyeron 1240 pacientes con EM tratados con natalizumab durante 3,76 años de media, procedentes de 36 hospitales europeos. 876 (70,8%) mostraron anticuerpos anti-JC positivos. Los criterios de inclusión fueron: estar más de un año en tratamiento con natalizumab y contar con datos de seguimiento prospectivo de los pacientes recopilados desde el inicio de la enfermedad. Se exploraron diferentes variables epidemiológicas, clínicas y de laboratorio. En un subgrupo de 277 pacientes, también estaba disponible el estudio BOCM-LE. Los factores asociados con el inicio de la LMP fueron analizados mediante las pruebas U de Mann-Whitney, curvas ROC, regresión logística uni y multivariante y el análisis de nomogramas.

Resultados

El estudio univariante identificó los niveles de anticuerpos contra el virus JC, la tasa de brotes global desde el inicio de la enfermedad y el inicio de natalizumab y la edad al inicio de natalizumab, como los mejores predictores para el inicio de LMP en la cohorte global. La tasa de brotes y los niveles de anticuerpos anti-JC siguieron siendo significativos en el análisis multivariante y constituyeron el modelo mínimo para la predicción del riesgo de LMP (área bajo la curva = 0,85). En el nomograma, el rango varió de 1/3300 en pacientes con niveles de anti-JC por debajo de 0.9 y una tasa de brotes superior a 0.5, hasta un riesgo de LMP de 1/50 en el caso opuesto.

La edad de inicio del tratamiento, la tasa de brotes antes del inicio de natalizumab, los niveles de anticuerpos anti-JC y la presencia de BOCM-LE también demostraron ser útiles para predecir el riesgo de LMP en el análisis univariante de pacientes con estudio

de BOCM-LE disponible, siendo la ausencia de estos anticuerpos el mejor factor de riesgo individual de LMP en el análisis univariante (OR = 40.94, intervalo de confianza: 5.4-308.2). El modelo mínimo identificó que la ausencia de BOCM-LE, la edad al inicio del natalizumab mayor de 45 años y los niveles de anti-JC superiores a 0.9, son los mejores predictores del riesgo de LMP (AUC = 0.92). El riesgo de LMP individual obtenido en el análisis del nomograma varió desde menos de 1/10000 en pacientes con BOCM-LE positivo, niveles de anti-JC inferiores a 0.9 y menores de 45 años hasta un riesgo de 1/33 en el caso opuesto.

Discusión y conclusiones

El estado inflamatorio del paciente, los niveles de anti-JC y la edad, parecen ser los mejores factores predictivos del riesgo de PML en pacientes con EM que inician el tratamiento con natalizumab, de manera independiente de la duración del tratamiento.

Abstract

Introduction

The risk to develop progressive multifocal leucoencephalopathy (PML), an opportunistic infection caused by the John Cunningham (JC) virus, restricts the use of Natalizumab, a very efficient treatment for multiple sclerosis (MS). The presence of anti-JC antibodies, prior immunosuppression and treatment duration, were identified as variables that contribute to stratify PML risk. However, the patient's immunological status hasn't been considered. This is surprising, since the appearance of PML commonly associates with a compromised immune response. In this line, it was reported that to having a low inflammatory disease, revealed by the absence of lipid specific oligoclonal IgM bands (LS-OCMB) in cerebrospinal fluid (CSF), increases PML risk. This may indicate that natalizumab, a potent anti-inflammatory therapy, may induce an excessive immunosuppression in more benign MS patients. To assess this, we explored if clinical and demographic variables associated with MS course may contribute to identify those patients with a low risk to develop PML before treatment onset.

Methods

1240 MS patients treated with natalizumab for 3.76 [2.06-4.82] years (mean [25-75 interquartile range (IQR) in 36 European hospitals were included in the study. 876 (70.8%) showed presence of anti-JC antibodies. Inclusion criteria were: patients undergoing natalizumab treatment for more than a year with prospective follow-up data collected since disease onset. We explored different epidemiological, clinical and laboratory variables. In a subgroup of 277 patients, LS-OCMB status was also available.

Factors associated with PML onset were explored by Mann-Whitney T tests, ROC-curves, uni- and multivariate logistic regression and nomogram analyses.

Results

The univariate study identified anti-JC virus antibody levels, relapse rate from disease onset to natalizumab treatment onset, and age at natalizumab onset as the best predictors for PML onset in the total cohort. Relapse rate and anti JC levels remained significant in the multivariate analysis and constituted the minimal model for PML risk prediction (Area under the curve, AUC=0.85). The nomogram analysis allowed to stratify PML risk before natalizumab initiation in individual patients using these two variables. It ranged from 1/3300, in patients with anti JC levels below 0.9 and relapse rate higher than 0.5, to 1/50 in the opposite case.

Age at onset, relapse rate prior to natalizumab onset, anti JC levels and LS-OCMB also proved to be useful in predicting PML risk in the univariate analysis of patients with LS-OCMB assessment, being the absence of these antibodies the best individual PML risk factor in the univariate studies (OR=40.94, Confidence interval: 5.4-308.2). The minimal model identified the absence of LS-OCMB, age at natalizumab onset older than 45 years and anti JC levels higher than 0.9 as the best predictors of PML onset (AUC=0.92). The individual PML risk obtained in the nomogram analysis ranged from less than 1/10000 in patients with positive LS-OCMB, anti JC levels lower than 0.9 and age younger than 45, to 1/33 in the opposite case.

Conclusions

Patient's inflammatory status, anti JC levels and age seem to be the best predictors of PML risk in MS patients who start natalizumab treatment, independently of treatment duration.

I. INTRODUCCIÓN

La esclerosis múltiple (EM) es la enfermedad inflamatoria crónica más prevalente del sistema nervioso central. Afecta a más de dos millones de individuos en el mundo y a más de 47000 en nuestro país. Esta enfermedad, se caracteriza por producir desmielinización y daño axonal, que causan los déficits neurológicos permanentes asociados a la EM (1).

Esta patología suele cursar en brotes seguidos de periodos de remisión, aunque alrededor del 10% de los pacientes tiene un inicio progresivo con empeoramiento continuo de la enfermedad, sin periodos de remisión. Transcurridos 10-20 años del comienzo de la enfermedad, en un alto número de personas afectadas, la EM suele desarrollar un curso progresivo, con o sin brotes sobreañadidos (2).

Esta enfermedad suele aparecer entre los 20 y los 40 años, siendo la causa más frecuente de discapacidad no-traumática en adultos jóvenes. La EM afecta más frecuentemente a mujeres que a hombres, con una ratio aproximada 3:1 (3).

Aunque la etiología de la enfermedad aún se desconoce, distintas pruebas sugieren que la EM es fruto de una predisposición genética (4) y una serie de factores ambientales que predisponen a sufrir la misma (5) junto con un déficit de células T reguladoras (6).

Distintos estudios demuestran que la EM es una enfermedad autoinmune en la que juegan un papel importante los linfocitos T y B autorreactivos, así como distintas células de la respuesta innata como microglía y macrófagos (7).

Aunque esta enfermedad todavía no tiene cura, en los últimos 20 años se han aprobado más de 12 fármacos modificadores del curso de la enfermedad para el

tratamiento de la esclerosis múltiple. Estos tratamientos reducen la frecuencia de brotes, la acumulación de lesiones en la sustancia blanca y el avance de la discapacidad neurológica y, por tanto, cambian la historia natural de la enfermedad (8).

1.1. HISTORIA DE LA ESCLEROSIS MÚLTIPLE

Carswell y Cruveilhier describieron por primera vez las lesiones anatomopatológicas características de estos pacientes en 1838 y 1941 respectivamente (9) (10). En 1868, Jean Martín Charcot describió la esclerosis múltiple clínicamente (11).

En 1884 Pierre Marie describió que los pacientes con EM sufrían un empeoramiento de sus síntomas tras infecciones o fiebre, por lo que asoció esta enfermedad con una posible etiología infecciosa (12). No fue hasta transcurridos 50 años, en 1935, cuando Rivers demostró la etiología autoinmune de la EM, describiendo que el modelo animal de la EM (encefalitis experimental autoinmune EAE), se producía por una respuesta autoinmune frente a sustancias propias del SNC (13). Este hecho, fue corroborado por Kabat, que determinó un aumento de inmunoglobulinas en LCR de estos pacientes en 1942 (14).

En 1955, Kurtzke, describió una escala para la evaluación de la discapacidad de los pacientes con EM, la Disability Status Scale (DSS), que contemplaba 10 grados de discapacidad. Esta escala fue revisada en 1982, creándose la escala expandida o EDSS (Expanded Disability Status Scale) (15). Esta escala se emplea actualmente para la evaluación de los pacientes con EM.

Durante los años 60 aparecieron las técnicas de imagen como la tomografía computarizada y en el año 1981 se desarrolló la resonancia magnética nuclear (RMN) que revolucionó el diagnóstico y pronóstico de la EM, mediante la identificación y cuantificación de las lesiones desmielinizantes (16).

En cuanto al tratamiento de la EM, hasta el año 1990, se realizaba un manejo de los síntomas de la enfermedad con esteroides y tratamientos sintomáticos. Sin embargo, en 1993 la FDA aprobó el primer fármaco modificador de la enfermedad (TME) para la EM, el interferón beta, que redujo el número de brotes y el avance de la discapacidad (17).

En el año 2004 se aprobó el Natalizumab (NTZ) como TME. Este fue el primer fármaco de alta actividad aprobado para el tratamiento de la EM, mostrando una alta eficacia en la inhibición de la tasa de brotes, reduciendo el número de nuevas lesiones y retrasando el empeoramiento de la discapacidad (18). Hoy en día, contamos con más de una docena de fármacos aprobados para las formas de EM que cursan en brotes.

En 2018 se aprobó el primer fármaco efectivo para las formas primariamente progresivas de la EM (Ocrelizumab) (19).

1.2. EPIDEMIOLOGÍA DE LA ENFERMEDAD

La prevalencia de la EM varía según distintas zonas geográficas de acuerdo a la latitud, presentándose con mayor frecuencia en zonas templadas (20). Las áreas más prevalentes son Europa del Norte, Norteamérica y sur de Australia (21).

Diversos estudios muestran que dicha prevalencia está aumentando en los últimos años y lo hace principalmente en mujeres. Sin embargo, la mortalidad por EM se mantiene estable o incluso está decreciendo en los últimos años (22).

En España los primeros estudios epidemiológicos situaron la prevalencia en 50-60 casos por cada 100.000 habitantes, mientras que estudios más recientes la sitúan entre 100 y 120 casos por cada 100.000 habitantes (23). Aproximadamente el 75% de los pacientes afectados por EM son mujeres. Esta mayor incidencia en el sexo femenino es habitual en otras patologías autoinmunes (3).

1.3. ETIOLOGÍA

En la actualidad se desconoce si la EM tiene una única o varias causas, ni se ha identificado una etiología específica que la desencadene. Sin embargo, se han descrito varios factores genéticos y ambientales asociados al riesgo de desarrollar esta patología (5).

1.3.1. Factores genéticos

La susceptibilidad de padecer EM se asocia de forma modesta con más de 200 polimorfismos genéticos, la mayoría de los cuales están en genes que codifican proteínas implicadas en la respuesta inmunitaria. El factor de riesgo genético que se asocia más fuertemente con la susceptibilidad de EM es el haplotipo de HLA DRB1*1501, con una Odds ratio de aproximadamente tres (24). Existe también una asociación, aunque menos potente, con otros alelos HLA como HLA-DRB1*13:03,

DRB1*03:01 y HLA-A*02:01. Otros genes con polimorfismos asociados con una mayor susceptibilidad de desarrollar EM incluyen receptores de citoquinas (IL-2, IL-7, TNF α), y otros genes que codifican moléculas relacionadas con la respuesta inmune como CD25 o CD58 (25).

Aunque la EM no es una enfermedad hereditaria, sí se hereda la predisposición a padecerla, es decir, existe cierto grado de agregación familiar. Así, los familiares de primer grado de pacientes con EM presentan un riesgo de desarrollar la enfermedad entre 2% y 4% veces superiores a los individuos no relacionados (0.1%) y existe una concordancia del 25-30% en gemelos monocigóticos respecto al 5% en gemelos dicigóticos (26). Sin embargo, los genes no explican la etiología de la EM por completo, ya que el 70% de gemelos monocigóticos son discordantes. Cada vez hay más datos que avalan el papel de distintos factores ambientales en desarrollo de la enfermedad (27) (28).

1.3.2. Factores epigenéticos

Los microARNs (miRNAs) son moléculas pequeñas de ARN no-codificantes que ejercen una regulación post-transcripcional de la expresión génica. De manera, que su unión a sus ARN mensajero dianas, induce su represión o degradación (29). La presencia de estos miRNA en el LCR es una buena herramienta para detectar alteraciones en el SNC, aunque aún hace falta profundizar en su estudio. Algunos investigadores muestran que los miRNA-922, miRNA-181c y miRNA-633, presentan una expresión diferencial en los pacientes con EM (30,31). Así mismo, se postuló el miRNA-150 como un biomarcador que identifica formas agresivas de esta enfermedad (32) (33).

La metilación de ADN podría también jugar un papel en la EM. Así, se han visto diferencias en el estado de metilación de distintos genes en pacientes en brote o remisión (34).

1.3.3. Factores ambientales

La EM se ha asociado a diversos factores ambientales (35). A continuación, se resumen los más relevantes:

1.3.3.1. Infecciones virales

La EM se ha relacionado con distintos virus, especialmente de la familia Herpesviridae. El que se ha asociado más fuertemente con la EM es el virus de Epstein-Barr (EBV) (36).

La totalidad de pacientes con EM presentan anticuerpos frente al EBV, respecto al 90% de sujetos sanos (37). También se ha detectado la presencia de anticuerpos frente al antígeno nuclear EBNA-1 en suero y LCR de los pacientes con EM (38) , y se ha visto una asociación entre periodos de reactivación del EBV y los brotes de la enfermedad (39). El herpes virus 6 (HHV-6) es otro virus de esta misma familia, que también se ha asociado con la EM (40).

1.3.3.2. Vitamina D

Debido a la asociación entre la EM y la latitud, se estableció la hipótesis de que los déficits de vitamina D podrían estar implicados en la patogenia de la EM (41). En un estudio realizado en sujetos caucásicos, se postuló que existía una relación inversa entre los niveles séricos 25-hidroxivitamina D y el riesgo de padecer EM (42). Estudios posteriores mostraron que el riesgo de EM se incrementa en sujetos con insuficiencia

de esta vitamina (43). Se han observado niveles inferiores de esta vitamina en pacientes en brote y se han correlacionado inversamente sus valores séricos con la actividad de la enfermedad, medida mediante el aumento de la discapacidad, la tasa de brotes y la aparición de nuevas lesiones en RMN (44).

Se han hecho distintos estudios para demostrar la conveniencia de suplementar con vitamina D a los pacientes con EM, pero hasta el momento no se ha podido demostrar el efecto beneficioso de los tratamientos con vitamina D en esta patología (45) (46) (47).

1.3.3.3. Tabaco

Se ha descrito que el tabaco aumenta el riesgo de desarrollar EM de manera dosis dependiente (48). Además, el consumo de tabaco también aumenta el riesgo de brotes y de progresión de la enfermedad (49).

1.3.3.4. Obesidad

La obesidad se ha relacionado con un aumento del riesgo de desarrollar EM. Este riesgo se incrementa especialmente en personas con mayor índice de masa corporal, sobre todo en la adolescencia y juventud (50).

1.3.3.5. Microbiota intestinal

Distintos estudios en modelos murinos han mostrado que existen diferencias en la microbiota entre los ratones con EAE y los grupos control. En la EAE se ha observado una desregulación de la microbiota, que resulta en un incremento de géneros como Akkermansia y Acinetobacter respecto a ratones control (51) (52). Además, se ha demostrado que estos géneros son capaces de mediar la diferenciación de linfocitos

Th1 y de suprimir los linfocitos T reguladores productores de IL-10, es decir, de promover un estado proinflamatorio en la EAE (51).

Los estudios de la microbiota en pacientes con EM no tratados, revelan aumento en los niveles de Methanobrevibacter y Akkermansia y disminución de Butyricimonas. Cuando se analiza la microbiota de pacientes con EM en tratamientos con fármacos modificadores de la enfermedad, se observa un aumento en el género Prevotella, que está implicado en la generación de metabolitos con acción inmunomoduladora (53).

1.4. PATOLOGÍA DE LA EM

La EM es una enfermedad autoinmune inducida por linfocitos T y B autorreactivos que se activan en los ganglios linfáticos fuera del sistema nervioso central y migran al mismo, contribuyendo a producir desmielinización, inflamación y daño axonal. Los antígenos que median esta patología no son aún conocidos y tampoco se conoce si la enfermedad se produce por liberación de antígenos del SNC hacia la periferia o por mimetismo molecular tras un proceso infeccioso (54).

El inicio de la EM se caracteriza por la aparición de placas de desmielinización preferentemente en la sustancia blanca perivascular donde se produce desmielinización, inflamación y daño axonal.

Los linfocitos T autorreactivos se activan en los ganglios linfáticos sistémicos y atraviesan la barrera hematoencefálica mediante la unión de la integrina VLA-4 de su membrana, a las moléculas VCAM-1 del endotelio activado (55) . Una vez allí, se desencadena una respuesta inmune que conduce a la liberación de citoquinas

proinflamatorias tales como INF- γ y TNF- α . Estas citoquinas, activan las células de la microglía y los astrocitos e inducen el reclutamiento de otras células del sistema inmune tales como linfocitos T, linfocitos B y monocitos hacia el SNC (56), que mediante la producción de citoquinas proinflamatorias y quimiocinas, perpetúan la inflamación en el mismo y la aparición de daño axonal (57) (58,7).

El daño tisular observado en la esclerosis múltiple resulta, por tanto, de una interacción compleja y dinámica entre las células de la respuesta inmune adaptativa que migran al SNC y las de la respuesta innata residentes (microglía y astrocitos) que inducen daño axonal, que es la causa del déficit neurológico permanente de los pacientes. (59).

Diversos estudios genéticos, muestran que la EM comparte algunas características con otras enfermedades autoinmunes, como el déficit de células reguladoras o la interacción entre la respuesta inmune innata y adaptativa (60).

En las lesiones de la EM se han descrito tanto linfocitos T CD4+ como CD8+, si bien estos últimos son los más abundantes (61). La presencia de linfocitos CD8+ se asocia a daño axonal y se localizan no sólo en las lesiones sino en todo el parénquima (61). Los linfocitos B también juegan un papel importante en la fisiopatología de la EM. La presencia de linfocitos B activados (plasmablastos) en LCR se asocia con mayor inflamación (62). Así mismo, la formación de folículos linfoides ectópicos en las meninges se ha asociado con la aparición de lesiones corticales y con formas más graves de la enfermedad (63). Los linfocitos B tienen un triple papel en la EM. Así, pueden producir citoquinas proinflamatorias que activan a los linfocitos T y a las células de la respuesta innata (64), presentan antígenos a los linfocitos T y secretan

anticuerpos. Se ha visto que la unión de anticuerpos a los axones y a los oligodendrocitos en las lesiones induce la fijación de complemento y, por tanto, un daño axonal y oligodendroglial directo (65). Además, la fijación de complemento puede activar, junto con las citoquinas producidas por los linfocitos T y B, a la microglía y los macrófagos que producen especies reactivas de oxígeno y proteasas que también inducen daño axonal (66,67,68) (69).

Además, en todo este proceso hay que tener en cuenta que la edad va acompañada de procesos de inmunosenescencia, por lo que, con la edad, disminuye la eficacia de la respuesta adaptativa y de la fagocitosis de la respuesta innata. Esta respuesta innata aumenta su estado inflamatorio, produciendo una inflamación crónica asociada a los procesos de envejecimiento (“Inflammaging”) (70). En algunas infecciones crónicas y enfermedades autoinmunes como la EM, distintos datos apuntan a que se produce una inmunosenescencia precoz (71) (72). Además, se ha observado que la edad va disminuyendo la capacidad de reparación de las áreas dañadas en la EM (73). Por último, los pacientes con EM presentan acúmulos de hierro en el SNC, lo que produce un aumento del estrés oxidativo y un mayor daño a los oligodendrocitos, con la consiguiente falta de remielinización. Todos estos mecanismos contribuyen al aumento de la neurodegeneración en estos pacientes según avanza la edad (61).

Por todo ello, los tratamientos modificadores de la enfermedad basados principalmente en el control de la respuesta adaptativa, son más eficaces en las etapas iniciales de la EMRR que una vez que avanza la enfermedad y la edad de los pacientes (74) (70).

1.4.1. Papel de los anticuerpos en la EM

En más del 95% de los pacientes con EM se produce síntesis intratecal de IgG. Aunque la síntesis de estos anticuerpos no es patognomónica de la EM, su detección mediante el estudio de bandas oligoclonales (BOC) representa una herramienta importante para el diagnóstico de la EM (75). Sin embargo, no queda claro que las BOC de IgG se asocien con un peor curso de la enfermedad. Por el contrario, la síntesis intratecal de IgM se ha asociado con una evolución más agresiva de la EM (76) (77), sobre todo cuando reconocen lípidos (78). La desaparición de estos anticuerpos se asocia con una respuesta óptima a tratamientos de alta eficacia en la EMRR (79) y la EMPP (80).

Por último, se ha descrito que la presencia de plasmablastos o células plasmáticas productoras de IgA procedentes del intestino, podrían jugar un papel tolerogénico en la EM, induciendo la producción de IL-10 (81). Todos estos datos, hacen pensar que el estudio combinado de la síntesis intratecal de inmunoglobulinas podrá ayudar en próximos estudios a evaluar el papel de los anticuerpos en la EM. En cualquier caso, la detección de anticuerpos IgG y sobre todo IgM, junto con factores activados del complemento en los axones y los oligodendrocitos presentes en las lesiones de EM, muestran que IgG e IgM podrían jugar un papel en la inducción de daño axonal (65).

1.5. FORMAS CLÍNICAS DE LA ESCLEROSIS MÚLTIPLE

-Síndrome clínicamente aislado: La EM es una enfermedad con un curso muy heterogéneo, que suele comenzar como un síndrome clínico aislado (CIS) que puede ser mono o polisintomático, dependiendo de la localización de las lesiones. Las presentaciones clínicas más frecuentes son: neuritis óptica, síndrome de tronco o

medular (82). El CIS puede ser un proceso autolimitado o representar el primer brote de una EM (83).

-Esclerosis múltiple recurrente-recidivante (EMRR): La mayoría de pacientes con EM debuta con este tipo de EMRR, llegando a representar al 85% de los pacientes con EM. Esta forma de la enfermedad suele aparecer entre los 20 y los 40 años, y se caracteriza por fases agudas en las que se produce un empeoramiento de la función neurológica (brotes) seguidas de una recuperación completa o con secuelas residuales (84). La caracterización de la EMRR incluye la diseminación en el espacio (desarrollo de lesiones en distintas áreas del SNC) y en el tiempo (desarrollo de nuevas lesiones en el SNC a lo largo del tiempo) (83).

En la revisión de los criterios de McDonald del 2017 se define brote, como aquel episodio clínico monofásico que es detectado por el paciente y que presenta hallazgos típicos de la EM que reflejan un evento desmielinizante inflamatorio en el SNC. Los brotes se pueden desarrollar de manera aguda o subaguda durante al menos 24 horas en ausencia de fiebre o infección (83).

Un número considerable de pacientes con EMRR presentan, después de un tiempo, una progresión continua de la enfermedad con o sin brotes sobreañadidos. Se conoce a esta forma como *secundariamente progresiva* (EMSP) y suele progresar cuando los pacientes llegan a la cuarta o quinta década de la vida (85).

-EM primariamente progresiva (EMPP): En torno al 15% de los pacientes con EM debutan con un empeoramiento continuo de la discapacidad sin que existan periodos

de remisión. Se ha definido a este tipo de evolución como primariamente progresiva (PP).

Recientemente se ha publicado una nueva forma de clasificar la progresión de la enfermedad, dependiendo de si los pacientes presentan actividad clínica en forma de brotes o en resonancia en forma de lesiones captantes (86):

- EM activa con progresión: El paciente tiene un brote a partir del cual se produce un empeoramiento gradual.

- EM activa sin progresión: El paciente tiene un brote que no se asocia con un empeoramiento de la discapacidad en un periodo de tiempo amplio y definido (1-2 años).

- EM no activa pero con progresión: No se detectan brotes como tales, pero la discapacidad va progresando.

- Enfermedad estable (EM no activa y sin progresión).

1.6. DIAGNÓSTICO DE LA EM

El diagnóstico de la EM se realiza en base a signos clínicos y síntomas que sugieran un proceso desmielinizante inflamatorio del SNC que presente diseminación en el espacio y en el tiempo, siempre y cuando, se haya descartado que dichos síntomas no sean atribuibles a otras patologías (87). En los últimos años distintas pruebas paraclínicas, así como los criterios diagnósticos, han contribuido a un diagnóstico precoz de la enfermedad.

Los criterios de McDonald se desarrollaron en el año 2001 por el comité internacional de diagnóstico de la EM. La última revisión data de 2017, constituyendo una guía esencial para el diagnóstico de la EM, ya que incluye criterios clínicos, de laboratorio y de RMN. Estos criterios son sensibles y específicos, lo que ha permitido un diagnóstico temprano y certero de la EM (87) (83). Para ello, es muy importante distinguir entre EM y otras enfermedades con características clínicas y/o de imagen solapantes con la esclerosis, como puede ser la neuromielitis óptica u otras posibles causas de desmielinización como otras enfermedades autoinmunes o infecciosas (como síndrome de Sjögren, lupus eritematoso sistémico, etc.) (88).

Los criterios diagnósticos de la EM actuales combinan pruebas clínicas, de imagen y de laboratorio (RMN, estudio de LCR y potenciales evocados) (83).

1.6.1. Resonancia magnética nuclear (RMN)

La RMN ha sido el test clave tanto para el diagnóstico de pacientes con un síndrome clínico sugestivo de EM, como para el desarrollo de nuevos fármacos modificadores del curso de la enfermedad que reduzcan la magnitud y frecuencia de las nuevas lesiones (83). La sensibilidad de la RMN es alta, sin embargo, no hay que olvidar que las técnicas de imagen pueden dar los mismos patrones en distintas patologías como isquemia u otras patologías inflamatorias (89) (90).

Recientemente se ha propuesto estandarizar los protocolos de RMN para el diagnóstico, pronóstico y seguimiento de la EM (91) (92) (93). La resonancia del sistema nervioso central constituye una herramienta muy útil en el diagnóstico de la

EM ya que puede determinar hallazgos tanto de diseminación en el espacio (una o más lesiones en T2 en las regiones características de la enfermedad) como en el tiempo (una o más nuevas lesiones respecto a la resonancia anterior) (87).

1.6.2. Estudio de líquido cefalorraquídeo (LCR)

Aunque el estudio del LCR ha sido un tema controvertido en los criterios diagnósticos de McDonald, actualmente continúa siendo un test con un gran valor diagnóstico (94).

La expansión clonal de células plasmáticas en el SNC produce las inmunoglobulinas que detectaremos como BOC en LCR, que constituye un hallazgo característico en EM (95).

Aunque la diana de estos Ac sea probablemente múltiple, su presencia indica que se produce una respuesta inmune restringida al SNC.

La evidencia de síntesis intratecal de IgG, aunque no sea específica de la EM, apoya fuertemente el diagnóstico de esta enfermedad (96). Sin embargo, para valorar correctamente la presencia de síntesis intratecal en LCR es muy importante el uso de tecnologías apropiadas y estandarizadas (97).

Además, el estudio del LCR sirve para realizar un diagnóstico de exclusión cuando se observan hallazgos que sean atípicos en la EM y sugieran otro tipo de patologías (como puede ser una proteinorraquia >100 mg/dl, pleocitosis >50 células/mm³, presencia en LCR de neutrófilos o eosinófilos, etc.) (98).

La demostración cualitativa de la presencia de dos o más bandas oligoclonales (BOC) exclusivas en el LCR y no en el suero del paciente, indica que existe síntesis intratecal de anticuerpos, más que cualquier otro test que tengamos disponible, como por ejemplo los índices de IgG (96) (97) (98). Los resultados positivos de otros test que

sirven para valorar el LCR en el diagnóstico de EM, deben tomarse con precaución cuando el estudio de bandas oligoclonales en LCR sea negativo o no se haya realizado.

Cerca del 96% de los pacientes presentan BOC IgG en LCR (99), sin embargo, la sensibilidad del estudio de las BOC depende del método empleado en su realización. Así, el isoelectroenfoque en gel de agarosa e inmunodetección o inmunofijación de IgG, es el método más sensible del que disponemos actualmente (75) (83). El análisis pareado de muestras de suero y LCR de los pacientes es esencial para confirmar que las BOC se encuentran exclusivamente en LCR.

Aunque el estudio de BOC de IgG no es esencial en algunos casos, la determinación de BOC aumenta la especificidad del diagnóstico, por lo que es altamente recomendable para realizar un diagnóstico precoz y específico de la enfermedad. Este estudio se hace especialmente importante cuando la EM debuta con un curso atípico, en las formas progresivas o cuando los pacientes pertenecen a segmentos de la población en los que la EM es menos común (como EM pediátrica, geriátricos, etc.) (83).

Multitud de estudios evidencian que en los pacientes adultos con un síndrome clínicamente aislado (CIS), la presencia de BOC en LCR es un factor independiente que predice el riesgo de sufrir un segundo ataque (100) (101).

La ausencia de BOC en LCR no descarta por completo el diagnóstico de esclerosis múltiple (sobre todo en casos de EM pediátrica), pero este debería hacerse con cautela en estos casos con BOC negativas en LCR, sobre todo en casos en los que los pacientes presenten hallazgos clínicos o de imagen atípicos (83). En el estudio del LCR, también podemos valorar la síntesis IgG en el SNC por test semicuantitativos como los índices

de IgG de Reiber (102) y de Tibbling (103), que no son tan sensibles como la presencia de BOC de IgG en LCR.

El estudio de las cadenas ligeras kappa de las inmunoglobulinas en LCR también podría contribuir al diagnóstico de la EM, sin embargo, de obtenerse valores altos de estas moléculas, los resultados deberían confirmarse mediante el estudio de BOC de IgG, ya que estos valores elevados también se observan en otras enfermedades inflamatorias del SNC (104) (105).

1.6.3. Potenciales evocados

Los potenciales evocados valoran la transmisión del impulso eléctrico en el SNC, de manera que, si el nervio a valorar sufre un proceso de desmielinización, dichos potenciales estarán alterados. El sistema visual se suele ver afectado de forma temprana en la EM, por lo que suele ser uno de los primeros signos clínicos de la enfermedad (106). El uso de los potenciales evocados en el diagnóstico de la EM se ha discutido ampliamente por expertos en las últimas revisiones de los criterios de McDonald (107). Aunque la afectación del nervio óptico es una característica muy importante de la enfermedad, los datos aportados por el estudio de potenciales evocados no parecen hoy en día aportar un valor sustancial a los datos clínicos y paraclínicos mencionados en los párrafos anteriores en el algoritmo diagnóstico de la EM (83).

1.7. MARCADORES PRONÓSTICOS EN LA EM

Se define como biomarcador a una sustancia utilizada como indicador de un estado biológico. Debe poder medirse objetivamente. (108).

Puede servir como indicador de:

- Un proceso biológico normal
- Un estado patológico
- Respuesta a un tratamiento.

En la esclerosis múltiple, la búsqueda de biomarcadores pronósticos es de gran utilidad clínica. Dada la heterogeneidad de la enfermedad estas moléculas revisten gran importancia para tomar decisiones terapéuticas adecuadas de modo precoz. Entre las moléculas que han demostrado valor pronóstico en la EM tenemos:

1.7.1. Cadena ligera de los neurofilamentos

Los neurofilamentos son componentes del citoesqueleto de las neuronas. Estos filamentos proteicos son muy abundantes en los axones donde mantienen su estructura, tamaño y calibre (109). La cadena ligera de los neurofilamentos (NF-L) de 68 kDa se libera al LCR en los procesos de daño axonal del SNC.

Algunos estudios determinaron que los pacientes con neuritis óptica o CIS, que posteriormente desarrollaban EM, presentaban mayores niveles de NF-L en LCR, sin embargo, no se correlacionaban los niveles de neurofilamentos con la gravedad de los síntomas ni con las lesiones de RMN (110) (111). Los niveles de NF-L son un marcador del riesgo de conversión a EM débil en comparación con las lesiones en T2 o las BOC.

Sin embargo, fueron un excelente biomarcador para predecir la aparición de atrofia a corto y medio plazo (112).

Esto se corroboró en los nuevos estudios en los que se miden los NF-L en suero mediante métodos de alta sensibilidad. Los niveles de NF-L en suero se correlacionan estrechamente con los de LCR y los estudios preliminares apuntan a que se asocian con la actividad clínica y radiológica, así como con la atrofia y el avance de la discapacidad (113).

1.7.2. Quitinasa 3 like 1

La quitinasa 3 like 1 (CHI3L1 o YKL-40) es un marcador de actividad glial que expresan los astrocitos y microglía durante la inflamación de la sustancia blanca en la EM. Niveles aumentados de esta molécula en LCR predicen un tiempo más corto de conversión a EM tras un CIS y un avance más rápido de la discapacidad (114) (115).

En pacientes con EMSP, los niveles de CHI3L1 se correlacionan con la presencia de inflamación (116).

1.7.3. Bandas oligoclonales IgM lípido-específicas

La presencia de bandas oligoclonales (BOC) en el LCR se considera uno de los biomarcadores independientes más importantes en la EM (117). Se estudia mediante isoelectroenfoque e inmunodetección (118) (119). Se ha demostrado que la naturaleza de esta IgM intratecal es persistente, por lo que no se consideran anticuerpos fruto de una respuesta primaria, ya que proceden de linfocitos B que han sufrido una hipermutación somática a nivel de SNC (117).

La presencia de estas BOC IgM se asocian a un mayor riesgo de conversión de CIS a EM (76). En su mayoría estos anticuerpos reconocen lípidos. Las BOC de IgM lípido-específicas (BOCM-LE) se asocian estrechamente con una peor evolución clínica de la enfermedad (78) (120) (77) (121). Los pacientes con BOC IgM presentan una mayor carga lesional en T2, una mayor tasa de brotes (77), mayor atrofia cerebral (122), un mayor avance de la discapacidad y una conversión temprana a EMSP (80) (123).

En pacientes con EMPP, la presencia de BOC IgM también se asocia a un curso clínico más agresivo y a la presencia de lesiones captantes en resonancia (80).

1.8. TRATAMIENTOS DE LA EM

Aunque no existe una cura para la EM, el manejo adecuado de la patología disminuye el número de brotes y retrasa el avance de la discapacidad, permitiendo una mejor calidad de vida a los pacientes (124) (125). El tratamiento de la EM engloba tres abordajes diferentes: Tratamientos modificadores de la enfermedad (TME), tratamientos de los brotes, y tratamientos sintomáticos:

1. **Tratamiento de los brotes:** Disminuyen los síntomas y la duración de los mismos. Se basa en el uso de corticoides intravenosos a grandes dosis.
2. **Tratamiento de los síntomas:** Persiguen mejorar la calidad de vida del paciente y conlleva un abordaje farmacológico, psicoterapéutico y rehabilitador.
3. **Tratamientos modificadores de la enfermedad (TME):** Modulan la respuesta inmune de los pacientes, ralentizando el avance de la enfermedad.

Actualmente existen al menos 15 fármacos modificadores de la enfermedad aprobados para el tratamiento de la EMRR: En primer lugar, aparecieron los fármacos

inyectables. Actualmente existen en el mercado cuatro preparados de interferón beta, dos preparaciones de acetato de glatirámero, cuatro fármacos orales (Fingolimod, Dimetil-fumarato, Cladribina y Teriflunomida) y tres anticuerpos monoclonales (Natalizumab, Alemtuzumab, y Ocrelizumab). Otros agentes como los inmunosupresores azatioprina y mitoxantrona apenas se usan en la actualidad. (1)

Algunos estudios de pequeña escala muestran que la inmunoblación seguida de un trasplante de precursores hematopoyéticos autólogo puede aportar efectos con alta eficacia y durabilidad. En la actualidad este tratamiento es cada vez más seguro, aunque su uso en la clínica aún es bastante limitado (126).

También se han invertido muchos esfuerzos en desarrollar fármacos para modular la producción de citoquinas, pero hasta ahora no han tenido éxito (1).

A continuación, se resumen los TME que se utilizan en la práctica clínica diaria (127) para el tratamiento de la EM:

1.8.1. IFN beta (Rebif/ Avonex/ Plegridy/Extavia/Betaferon)

Los interferones (128) (129) (130) (131) (132), junto con el acetato de glatirámero, fueron los primeros TME aprobados para el tratamiento de la EMRR (133). Los estudios pivotaes describieron que estos fármacos disminuyen en alrededor de un 30% la tasa de brotes, el avance de la discapacidad y la aparición de nuevas lesiones en RMN (134) (135). El mecanismo de acción del interferón beta no se conoce en su totalidad, pero se cree que su eficacia se debe a sus efectos inmunomoduladores. Sobre todo, inhibe

la respuesta Th1, disminuye la transmigración de linfocitos al SNC y aumenta la producción de células reguladoras como la IL-10 (136).

El IFN beta es un fármaco generalmente muy seguro. Sus efectos adversos han sido ampliamente estudiados y rara vez son graves. Entre los más frecuentes encontramos: reacción pseudogripal, descenso reversible de leucocitos, elevación de transaminasas. En raras ocasiones se ha asociado el uso de IFN beta a reacciones graves como anafilaxia o daño hepático (137). Alrededor del 10% de los pacientes tratados con IFN beta pueden desarrollar Ac neutralizantes frente al fármaco que pierde así su eficacia (138).

1.8.2. Acetato de glatirámero (Copaxone/ Glatopa)

Existen dos formas de Acetato de glatirámero aprobadas por la FDA para el tratamiento de la EMRR (139). Ambas estas constituidas por un conjunto de péptidos de la proteína básica de la mielina con potencial efecto tolerogénico. Se ha demostrado su efectividad a dosis de 20 mg/ml y 40/mg/ml (más prescrito), con una reducción de la tasa de brotes de alrededor del 30%, un retraso del tiempo al brote e inhibición de la aparición de nuevas lesiones de RNM (137).

Los efectos adversos más frecuentes asociados al acetato de glatirámero suelen asociarse a lesiones en la zona de inyección (140).

1.8.3. Teriflunomida (Aubagio)

La Teriflunomida es un inhibidor de la síntesis de novo de pirimidinas que actúa bloqueando la proliferación de los linfocitos activados y reduciendo la presencia de los mismos en el SNC (141). Los efectos adversos de este tratamiento son secundarios a su

capacidad para inducir el citocromo CYP1A2, por lo que este fármaco puede causar secundariamente diarrea, náuseas y hepatotoxicidad en aproximadamente el 7% de los pacientes tratados (142).

La Teriflunomida se ha estudiado en varios ensayos clínicos de pacientes con EMRR, mostrando una reducción de la tasa de brotes de aproximadamente el 30% según la dosis de fármaco utilizada (143).

1.8.4. Fingolimod (Gilenya)

El Fingolimod es el primer fármaco oral que se aprobó para el tratamiento de la EM. Actúa como un inhibidor competitivo de la esfingosina-1-fosfato, uniéndose a sus receptores, induciendo su internalización e impide su expresión en la membrana plasmática (144). De esta forma, bloquea la salida de los linfocitos vírgenes y de memoria central de los ganglios linfáticos, esto reduce el número de linfocitos circulantes (linfopenia) y, por tanto, su migración al SNC. Además, este tratamiento podría actuar sobre los receptores de esfingosina-1-fosfato en el SNC, donde tendría efectos neuroprotectores y remielinizantes (145). El Fingolimod induce una inhibición de la tasa de brotes de alrededor del 50%, superior a la del interferón-beta (146).

Concentraciones elevadas de este fármaco en suero, pueden producir bradicardia y bloqueo de la conducción atrioventricular (145), por lo que obliga a la monitorización de la función cardíaca previamente y durante las primeras tomas del fármaco. También se han detectado algunas infecciones graves y de forma mucho más rara varios casos de leucoencefalopatía multifocal progresiva (LMP). La LMP es una infección

oportunistas del SNC causada por el virus JC que aparecen en alrededor de 1/11000 pacientes tratados (147). Esta infección puede causar la muerte entre un 20-50% de los pacientes afectados.

1.8.5. Dimetil fumarato (Tecfidera/BG-12)

El dimetil fumarato es un éster del ácido fumárico capaz de activar al factor nuclear Nrf2 asociado a la respuesta frente al estrés oxidativo (148). En los ensayos clínicos, este fármaco reduce la tasa de brote alrededor del 50% comparado con placebo (149).

El dimetil fumarato presenta propiedades antioxidantes e inmunomoduladoras, ya que induce un cambio en la producción de citoquinas desde un perfil pro-inflamatorio a uno regulador (150) (151).

Entre los efectos adversos más frecuentes del dimetil fumarato se encuentran la rubefacción y las molestias gastrointestinales, sobre todo en las primeras etapas del tratamiento. Además, en alrededor del 5% de los casos este fármaco produce linfopenia de grado 3, que aparece principalmente en individuos mayores y con bajo recuento linfocitario antes de la administración del fármaco. Además, se han descrito por el momento seis casos de LMP (alrededor de 1/80000 pacientes tratados), que han aparecido siempre en pacientes mayores de 50 años y con linfopenia grado 3 mantenida (137).

1.8.6 Alemtuzumab (Lemtrada)

El Alemtuzumab es un anticuerpo monoclonal humanizado frente a CD52 (152). Se une a la molécula CD52 en la superficie de los linfocitos induciendo la lisis de los linfocitos T CD4+, CD8+ y de las células B y bloquea su posterior repoblación induciendo una respuesta tolerogénica. Los ensayos clínicos mostraron que este fármaco induce una reducción de la tasa de brotes mayor del 70%. Además, se ha descrito que el tratamiento con Alemtuzumab, así como de otros TME como el NTZ, reducen el riesgo de progresión a EMSP (153).

Entre los efectos adversos de este fármaco, que han limitado su uso, están el desarrollo de tiroiditis autoinmune, púrpura trombocitopénica autoinmune, o enfermedad de goodpasture (137). Además, recientemente se han encontrado otros efectos adversos de este fármaco como enfermedades inflamatorias o episodios isquémicos, que han hecho que su uso se vea restringido temporalmente a segunda línea por una alerta de la EMA (154).

1.8.7 Ocrelizumab

El Ocrelizumab es un Ac monoclonal humanizado frente a CD20 desarrollado para el tratamiento de EMRR Y EMPP (155). Este fármaco elimina de forma selectiva a los linfocitos B y ha mostrado una alta eficacia en la reducción de la tasa de brotes y del avance de la discapacidad. También muestra una eficacia altísima en la reducción en el número de lesiones por RMN.

Los efectos adversos más frecuentes durante este tratamiento suelen deberse a reacciones infusionales y sólo se han descrito efectos graves infecciones en un bajo porcentaje de pacientes (156).

1.8.8. Mitoxantrona (Novantrone)

La Mitoxantrona es un antineoplásico sintético que inhibe la proliferación de los linfocitos activados, ya que bloquea el complejo topoisomerasa II-Hsp90. (142). Su uso es extremadamente limitado en la EM debido a los efectos adversos graves y dosis-dependientes, pudiendo ocasionar cardiomiopatía y leucemia aguda (137).

1.8.9. Natalizumab (Tysabri)

Natalizumab (NTZ) fue el primer fármaco de alta actividad aprobado para el tratamiento de la EM en el año 2004. Ya los resultados del ensayo clínico AFFIRM, mostraron una alta eficacia con una inhibición de un 68% de la tasa de brotes, de un 83% en la aparición de nuevas lesiones y un 42% en el retraso del empeoramiento de la discapacidad a los dos años de tratamiento (18) (157) (158) (159). Estos datos han sido aún mejores en estudios de vida real, que muestran que alrededor del 60% de los pacientes tratados con NTZ, se muestran libres de la actividad de la enfermedad (160) (161). Además, distintos trabajos han demostrado una mayor eficacia de Natalizumab en comparación no sólo con los fármacos inyectables, sino con otras moléculas comercializadas posteriormente como Fingolimod o Tecfidera (162) (127).

El cambio a Natalizumab tras un fracaso de tratamientos de primera línea, ha mostrado ser altamente efectivo (163). Actualmente, sólo hay comercializado un

tratamiento con una eficacia comparable a Natalizumab, el Alemtuzumab, si bien se ha descrito que Natalizumab podría ser más eficaz permitiendo la recuperación de la discapacidad (164). Por otra parte, el tratamiento con Alemtuzumab se ha asociado con efectos secundarios como el desarrollo de nuevas patologías autoinmunes en más del 40% de pacientes tratados, que pueden ser potencialmente graves en alrededor del 1% de los pacientes. Además, la aparición de nuevas complicaciones asociadas con este tratamiento como el síndrome de activación macrofágica y episodios de ictus, han hecho que la EMA limite el uso del fármaco de forma temporal (154). El Ocrelizumab también ha presentado en los ensayos clínicos una alta eficacia en la EM, pero aún no tenemos datos de práctica clínica real que nos muestren el perfil prolongado beneficio/riesgo de este fármaco.

A pesar de su alta eficacia, el uso de NTZ como tratamiento de pacientes con EM, se ha limitado debido a su principal efecto secundario, la aparición de LMP, que aparece en 4.22 por cada 1000 pacientes tratados con NTZ (165), es decir, aproximadamente en uno por cada 250 paciente tratados (147). La LMP es una infección oportunista causada por el virus John Cunningham (JC) que aparece generalmente en individuos inmunocomprometidos. Este virus actúa infectando y destruyendo los oligodendrocitos en el SNC (166).

Los primeros dos casos de LMP aparecieron ya en los ensayos clínicos e indujeron una retirada temporal del producto por parte de la empresa que lo comercializa. Posteriormente, tras la realización de estudios de seguridad (18), la FDA aprobó el uso del NTZ como tratamiento para la EMRR.

1.8.9.1. Descripción del NTZ

El NTZ es un Ac monoclonal humanizado recombinante, que impide el paso de células del sistema inmune a través de la barrera hematoencefálica (BHE), mediante el bloqueo de la subunidad $\alpha 4$ de las integrinas. Estas moléculas están implicadas en la adhesión y migración celular desde el endotelio a los tejidos inflamados.

Las integrinas $\alpha 4\beta 1$ (como VLA-4) son heterodímeros de membrana expresados por la mayoría de leucocitos mononucleares. La molécula de adhesión VLA-4 se caracterizó en células linfoides, en las que mediaba su unión a las células del endotelio a través de la molécula VCAM-1. Esta unión VLA-4/VCAM-1 es esencial en el reclutamiento de los leucocitos a las zonas de inflamación (167).

Yednock fue el primero que describió que los anticuerpos monoclonales (AcMo) que bloqueaban la unión VLA-4/VCAM-1 tenían efectos terapéuticos en modelos de encefalomiелitis autoinmune experimental (EAE), retrasando la aparición de la parálisis en estos roedores (168). Otros estudios confirmaron estos resultados, demostrando que los responsables de la inducción de la EAE eran los linfocitos con fenotipo Th1 y que dicha inducción se correlacionaba con la expresión de integrina $\alpha 4$ en la superficie celular de estos linfocitos (56). Ambos estudios evidencian que la molécula VCAM-1 del endotelio inflamado del SNC, actúa reclutando linfocitos T específicos y otros leucocitos inflamatorios al SNC por vía VLA-4 (169).

El bloqueo de las $\alpha 4$ integrinas por los AcMo sugiere que las vías dependientes de esta unión son críticas en varias patologías inflamatorias y autoinmunes, ya que la interacción VLA-4/VCAM-1 induce la producción de señales de coestimulación y

proliferación de linfocitos T y la producción de citoquinas/mediadores inflamatorios (170).

Una de las principales ventajas del NTZ es que únicamente bloquea la migración de los linfocitos activados al SNC, pero no produce el descenso de los mismos a nivel sistémico (137).

1.8.9.2. Biomarcadores de respuesta al NTZ

El tratamiento con NTZ conlleva cambios en el sistema inmune que pueden monitorizar la respuesta al fármaco. Así, en aquellos pacientes que responden de manera óptima, se detecta un descenso de: la cadena ligera de los neurofilamentos en LCR (113) (171), la quitinasa 3 like 1 en LCR (172), la expresión de CD49 en células mononucleares circulantes (integrina $\alpha 2$) (173) (174) (175) (176), los niveles de fetuina-A en LCR (177).

El inconveniente de estos biomarcadores es que requieren de numerosas punciones lumbares, lo cual los hace poco deseables como marcadores de seguimiento.

1.8.9.3. Efectos secundarios del NTZ

Se ha encontrado que entre el 4-14% de los pacientes tratados con NTZ desarrollan Ac anti-NTZ, aunque, solo aquellos Ac persistentes se asocian con efectos adversos en el tratamiento, como es el descenso en la eficacia del mismo o el desarrollo de reacciones infusionales (178) (179).

Sin embargo, el tratamiento con Natalizumab se ha visto limitado por la aparición de su principal efecto secundario, la LMP. Para minimizar la aparición de esta infección, se han creado diversos algoritmos de estratificación de riesgo que han permitido el uso más seguro del fármaco (180). A continuación, se profundizará en las características de la LMP.

1.9. LEUCOENCEFALOPATÍA MULTIFOCAL PROGRESIVA

Antes de la epidemia del SIDA, la LMP se consideraba una enfermedad rara, que se asociaba de manera secundaria a procesos como leucemia linfocítica crónica (LLC-B) y linfoma no Hodgkin (LNH). Sin embargo, a finales de los años 90, se estimaba que el 5% de los pacientes con SIDA desarrollaban LMP (181). Aunque suele tener lugar en estadios de inmunosupresión avanzados, también se han descrito casos de LMP en paciente con recuentos de linfocitos CD4 superiores a 200 células/mm³ (182). Sin embargo, rara vez se han descrito casos de LMP en pacientes sin ningún síntoma de inmunodeficiencia (183).

Actualmente, la LMP ha surgido como una complicación rara pero potencialmente fatal en los tratamientos con inmunomoduladores en distintas patologías. En la EM aparecen más frecuentemente en pacientes tratados con NTZ (184), (147).

La LMP fue descrita en 1930 por el neuropatólogo alemán Hallervorden (185) y en 1958 Astrom la clasificó en base a tres características histopatológicas: desmielinización, alargamiento del núcleo de los oligodendrocitos y núcleos atípicos de

los astrocitos (186). La etiología viral de esta patología se descubrió gracias a la descripción de los cuerpos de inclusión de los núcleos de células neurales (187).

ZuRhein postuló la LMP como una infección mediada por *Polyomaviridae* en base a criterios de microscopia electrónica (188). Esto posteriormente fue confirmado al aislarse el papovirus John Cunningham (JC) de cultivos de cerebro humanos (189).

1.9.1. Epidemiología de virus John Cunningham (VJC)

El virus John Cunningham (VJC) pertenece a la familia de los *Papoviridae*, dentro del género de los *Polyomaviridae*. Estos virus presentan DNA de doble cadena de 5.1 Kb encapsulada en una estructura proteica con simetría icosaédrica. Este DNA codifica una proteína no estructural (proteína T) y tres proteínas de la cápside (VP1, VP2 y VP3) (189) (190).

El virus John Cunningham (VJC) infecta a más de la mitad de la población adulta a lo largo de todo el mundo (191). De hecho, la infección por VJC suele presentar un curso subclínico. La LMP se considera un evento poco frecuente pero muy grave, debido a la infección por el VJC que aparece casi exclusivamente en pacientes inmunocomprometidos (191).

La prevalencia del virus JC en la población sana es de alrededor el 60-80% (192). El VJC infecta a las amígdalas durante la infancia, por lo que la primoinfección es similar a cualquier otra infección de vías altas (193). Tras la primoinfección, el VJC permanece latente en el retículo endotelial de diferentes órganos como el riñón (194). Cuando aparece la LMP, el virus se reactiva y es capaz de cruzar la BHE infectando a los

linfocitos que la atraviesan. Una vez en el SNC infecta y destruye a los oligodendrocitos (195).

1.9.2. Diagnóstico de la LMP

Se consideran pacientes de alto riesgo a desarrollar LMP de manera secundaria al tratamiento con NTZ, a aquellos pacientes con Ac anti-JC positivos, con tratamientos inmunosupresores previos y con más de 24 infusiones de NTZ (196). Los casos de LMP asociados al tratamiento con NTZ presentan unas tasas de supervivencia mucho mayores a las observadas en las LMP que se desarrollan en otras condiciones (197).

La LMP se diagnostica según los siguientes criterios diagnósticos (198):

-Clínica progresiva compatible con la LMP: Anomalías cognitivas y/o del comportamiento (199).

-Estudio de resonancia compatible (200): Lesiones hiperintensas en secuencias T2.

-Criterios de laboratorio (201): Detección de la presencia del virus JC en el LCR mediante PCR.

1.9.3. LMP en otras opciones terapéuticas

El NTZ no es el único tratamiento para la EMRR que se ha asociado al desarrollo de LMP, ya que se han reportado casos en pacientes con EM tratados con Fingolimod y Dimetil fumarato, aunque con mucha menor frecuencia (alrededor de 1/10000) (147).

En el 90% de los casos de LMP secundaria al tratamiento con Fingolimod, esta tuvo lugar en pacientes con edades comprendidas entre los 49-63 años (202) y en el 100% de los casos de LMP secundaria al tratamiento con Dimetilfumarato, tuvo lugar en

pacientes con edades comprendidas entre los 54-66 años (203). Estos datos inducen a pensar que el papel de la inmunosenescencia está muy implicado en el riesgo de desarrollar LMP de manera secundaria al tratamiento con TME.

1.9.4. Estratificación del riesgo de desarrollar LMP

Los datos de seguridad acumulada del NTZ identificaron diversos factores de riesgo para desarrollar LMP de manera secundaria al tratamiento. El factor más claramente asociado al riesgo de LMP fue la positividad para los Ac anti-JC (184) (204), también se ha visto un riesgo mayor de LMP en tratamientos con NTZ de larga duración (superior a 2 años o a 24 infusiones) y cuando se había realizado un tratamiento previo al NTZ con fármacos inmunosupresores (205) (206).

1.9.4.1. Positividad para los Ac anti-virus JC

La prevalencia de los Ac anti-JC usando el ELISA de dos pasos de segunda generación (STRATIFY JCV DxSelect; Focus Diagnostics, Cypress, CA) (207), en pacientes con EM tratados con NTZ es del 50-70% de los casos (208). Esta prevalencia no se diferencia de la de individuos sanos y menos del 1% de estos pacientes seropositivos desarrollará LMP (209) (165).

El índice de Ac anti-JC contribuye a la estratificación del riesgo de desarrollar LMP, ya que se ha descrito que esta infección oportunista rara vez aparece cuando el índice de Ac es inferior a 0.9 (210).

Según los datos de un amplio estudio prospectivo (STRATIFY-2), el riesgo de desarrollar LMP en pacientes seronegativos para Ac anti-JC es $<1/10000$ pacientes tratados (208).

Una pequeña proporción de pacientes han presentado un estado fluctuante de Ac anti-JC a lo largo del tratamiento con NTZ, por lo que el cálculo del riesgo de LMP en estos pacientes es poco claro (204).

TYGRIS es un estudio observacional multinacional diseñado para obtener datos de seguridad a largo plazo en pacientes tratados con NTZ del que se asume que es representativo de la población global de pacientes (211). En este estudio se estimó que la prevalencia de la presencia de Ac anti-JC en la población general de pacientes con EM es del 54.9% (212). Esta prevalencia va aumentando con la edad ya que la tasa de seroconversión anual es aproximadamente del 2% (213).

Los pacientes con LMP presentan una respuesta proliferativa frente a partículas virales JC disminuida respecto a donantes sanos, tanto a nivel de respuesta inmune humoral como celular, lo que reduce el control de la infección por el VJC en estos pacientes (214). El elevado título de IgG específica frente a las partículas VP1 virales en pacientes que desarrollan LMP comparados con donantes sanos, hace evidente la respuesta humoral antiviral, pero a su vez, sugiere que debe existir un defecto en la respuesta inmune celular que propicie la reactivación del VJC que tiene lugar en la LMP (215).

Los factores que desencadenan dicha reactivación de la infección del VJC en pacientes tratados con NTZ aún son parcialmente desconocidos, ya que la mayoría de los pacientes seropositivos tratados con este fármaco no llega a desarrollar la enfermedad (216).

1.9.4.2. Tratamientos inmunosupresores previos al tratamiento con NTZ

En los primeros estudios de seguridad del NTZ más del 30% de los pacientes que iniciaron el tratamiento habían recibido un tratamiento previo inmunosupresor (184). Esta inmunosupresión previa se asociaba con un mayor riesgo de LMP. Sin embargo, gracias a la aparición de nuevas terapias para la EM y tras la notificación de la EMA confirmando el aumento del riesgo de LMP en pacientes tratados con inmunosupresores previamente al NTZ (196), ha aumentado su uso como tratamiento de primera o de segunda línea y se ha reducido notablemente el uso de tratamientos inmunosupresores previo a NTZ (menos del 10% en nuestra cohorte).

1.9.4.3. Tiempo de tratamiento con NTZ

La exposición prolongada a natalizumab aumenta el riesgo de LMP (217), en pacientes con anticuerpos anti-JC (218). Sin embargo, la interrupción del tratamiento con NTZ en estos pacientes, conlleva la reactivación de la enfermedad en cuanto a brotes y lesiones desmielinizantes (219).

Esto hace patente la necesidad de buscar biomarcadores adicionales para la estratificación del riesgo de la LMP en estos pacientes, con el fin de evitar que aquellos enfermos con un curso agresivo de la enfermedad que se puedan beneficiar del tratamiento con NTZ, tengan que interrumpir el mismo.

1.9.4.4. Efectos de la edad en la LMP

Debido a que los ensayos clínicos de los TME para la EM suelen excluir a pacientes mayores, nuestro conocimiento de la eficacia y seguridad de los fármacos en estos pacientes es a menudo insuficiente.

Algunos trabajos describen que el riesgo de desarrollar LMP en pacientes tratados con Natalizumab aumenta con la edad y este riesgo llega a duplicarse si se inicia el tratamiento a edades superiores a 50 años (72).

Un trabajo previo de nuestro grupo confirma el posible papel de la edad en el riesgo de LMP, ya que estableció que la edad media de los pacientes tratados con NTZ que desarrollan esta infección oportunista es mayor que la de aquellos que no la desarrollan (220).

1.9.4.5. BOCM

La presencia de bandas oligoclonales IgM (BOCM) se asocia con un menor riesgo de desarrollar LMP de manera secundaria al tratamiento con NTZ. El curso altamente inflamatorio que presentan estos pacientes podría hacerlos menos propensos a sufrir una inmunosupresión al ser tratados con NTZ, por lo que podrían mantener una correcta inmunovigilancia frente al virus JC (220).

II. HIPÓTESIS

Hipótesis

Distintos factores como la presencia de anticuerpos anti-JC, el uso de inmunosupresores previos o la duración del tratamiento, han probado ser útiles para la estratificación del riesgo de LMP en pacientes con EM tratados con NTZ. Sin embargo, la alta prevalencia de anticuerpos anti-JC y el tiempo de tratamiento seguro restringido a dos años en los pacientes que los presentan, limitan en gran medida la utilidad de este fármaco a largo plazo.

Un estudio reciente de nuestro grupo (220) demostró que una enfermedad altamente inflamatoria, medida por la presencia de BOCM-LE, se asocia con un menor riesgo de LMP independientemente de la duración del tratamiento. Por otra parte, la edad, que se asocia con un descenso de la inflamación en la EM, parece aumentar el riesgo de LMP tras los tratamientos inmunomoduladores. Sin embargo, hasta ahora, estos factores que han mostrado ser importantes en el reflejo del estatus inmunológico de los pacientes, no se han integrado en los algoritmos previos de estratificación del riesgo de LMP. Tampoco se ha estudiado si las medidas clínicas asociadas al curso de la enfermedad podrían modificar el riesgo de LMP.

Nosotros nos propusimos estudiar la combinación de los biomarcadores clásicos de estratificación de riesgo de LMP con estos nuevos factores en una cohorte multicéntrica de pacientes tratados con NTZ.

III. OBJETIVOS

En la realización de esta tesis nos planteamos dos objetivos principales:

1.- Establecer nuevos factores pronósticos para estratificar el riesgo de desarrollar LMP, en pacientes de EM candidatos a tratamiento con Natalizumab, para poder aplicar dicho tratamiento con el mejor perfil riesgo/beneficio.

2.- Estimar el valor de la presencia de bandas oligoclonales IgM lípido-específicas para predecir el riesgo de LMP, en pacientes con EM tratados con Natalizumab, en un modelo multivariante incluyendo otras variables clínicas y de laboratorio.

IV. MATERIALES Y MÉTODOS

4.1. DISEÑO DEL ESTUDIO

Estudio multicéntrico transversal para evaluar nuevos biomarcadores clínicos y de laboratorio para la estratificación del riesgo de LMP en pacientes con EMRR en tratamiento con NTZ.

Evaluación de la interacción de la presencia de BOCM-LE con otros datos clínicos y de laboratorio para el pronóstico de EM.

4.1.1. Criterios de inclusión de los centros

Hospitales pertenecientes al BioMS: consorcio europeo para la búsqueda de biomarcadores en EM o a la REEM: Red Española de Esclerosis Múltiple (Grupos de investigación y grupos clínicos asociados).

4.1.2. Criterios de inclusión de pacientes

-Aprobación del comité ético de cada hospital y consentimiento informado de los pacientes.

-Pacientes con EMRR tratados con NTZ por un tiempo mínimo de un año.

-Datos clínicos y de laboratorio recogidos prospectivamente desde el diagnóstico de la enfermedad.

-Visitas a su neurólogo de referencia al menos dos veces al año.

4.1.3. Variables clínicas solicitadas a los centros participantes

En la visita basal debía constar la edad, sexo y grado de discapacidad. En las visitas consecutivas los siguientes datos: aparición de nuevos brotes, avance de la discapacidad, inicio o cambio de tratamiento, inicio de tratamiento con NTZ. A partir del inicio de NTZ debían tener los siguientes datos adicionales: Título de Ac anti-JC, suspensión o no del tratamiento y su causa.

4.1.4. Variables de laboratorio solicitadas a los centros participantes

Se solicitó a aquellos centros que tuvieran un estudio de LCR realizado, que nos proporcionarían los valores de las siguientes variables: Nº de células en LCR, índices de IgG, IgM y albúmina y BOC de IgG e IgM.

En el caso de 155 pacientes que tenían muestras pareadas de LCR y suero almacenadas a -80°C y no tenían disponible el estudio de BOC de IgG en su centro, éste se realizó en el centro coordinador.

En el caso de 119 pacientes tenían muestras pareadas de LCR y suero almacenadas a -80°C y que no tenían disponible el estudio de BOC de IgM lípido-específicas en su centro, éste se realizó en el centro coordinador.

4.1.5. Duración del estudio

La inclusión de centros y obtención de datos clínicos se realizó a lo largo de 2016 y el primer trimestre de 2017. Durante el resto de 2017 se solicitaron los datos no enviados y se realizó la depuración de las bases de datos. En los siguientes 6 meses se realizó el análisis de resultados. Los estudios de LCR realizados en el centro coordinador se efectuaron durante los dos primeros años.

4.2. PACIENTES

4.2.1. Inclusión de pacientes

En este estudio se incluyeron 1307 pacientes diagnosticados con EMRR siguiendo los criterios diagnósticos vigentes en el momento del diagnóstico (87)(221)(222) y tratados con NTZ durante un tiempo medio de: 3.73 ± 2.13 años (Media \pm DE). Tras depurar la base de datos en tres ocasiones, completando datos y corrigiendo datos inconsistentes, finalmente excluimos 69 pacientes de la base de datos definitiva, que incluyó a 1240 pacientes de EMRR.

El estudio se realizó en 36 centros de cinco países europeos, a saber: Alemania (1 centro), Austria (1 centro), Dinamarca (1 centro), Italia (3 centros) y España (30 centros de 9 comunidades autónomas). Los centros participantes se muestran en la tabla 1. El mayor número de pacientes se recogió en España (949 pacientes, 76.5%), seguida por Italia (143 pacientes, 11.5%) y Austria (119 pacientes, 9.6%).

Tabla 1 Listado de centros participantes en el estudio multicéntrico

Centros participantes en el reclutamiento de pacientes
Charité Universitäts Medizin, Berlin (Alemania)
Glostrup Hospital, University of Copenhagen (Dinamarca)
Hospital Universitario Álvaro Cunqueiro, Vigo
Hospital Universitario Clínic, Barcelona
Hospital Universitario Clínico de Santiago de Compostela
Hospital Universitario Clínico San Carlos, Madrid
Hospital Universitario General de Asturias, Oviedo.
Hospital Universitario de Torrejón, Madrid
Hospital Universitario de Valme, Sevilla
Hospital del Bierzo. Ponferrada, León
Hospital del Mar, Barcelona
Hospital Doctor José Molina Orosa, Lanzarote
Hospital Universitario Dr. Peset, Valencia
Hospital Universitario General de Castellón
Hospital Universitario General de Elche
Hospital Universitario General, Alicante
Hospital Universitario la Fe, Valencia
Hospital Ntra. Sra. De Sonsoles, Ávila
Hospital Universitario Puerta de Hierro, Majadahonda
Hospital Universitario Regional Universitario, Málaga
Hospital Universitario Doctor Josep Trueta, Girona

Hospital Universitario Germans Trias i Pujol, Barcelona
Hospital Universitario Gregorio Marañón, Madrid
Hospital Universitario Marqués de Valdecilla, Santander
Hospital Universitario Ntra. Sra. De la Candelaria, Tenerife
Hospital Universitario Ramón y Cajal, Madrid
Hospital Universitario Reina Sofía, Córdoba
Hospital Universitario Son Espases, Mallorca
Hospital Universitario Virgen de la Macarena, Sevilla
Hospital Universitario de Getafe
Hospital Universitario Vall d'Hebron, Barcelona
Hospital Universitario Clínico Virgen de la Victoria, Málaga
Medizinische Universität, Innsbruck (Austria)
Neurological Institute, Pavia (Italia)
Università degli Studi di Genova, Génova (Italia)
University of Milan (Italia)

4.2.2. Datos clínicos

Los datos demográficos, clínicos y de laboratorio se recogieron y anonimizaron en cada centro y se mandaron al centro coordinador (tabla 2).

Tabla 2 Variables totales analizadas en el estudio multicéntrico

Variables analizadas en el estudio multicéntrico
Sexo
Edad al debut de la EM
Edad al inicio del tratamiento de NTZ
Edad en la última visita registrada
Tiempo de evolución de la enfermedad al inicio del tratamiento de NTZ
Grado de discapacidad al inicio del tratamiento de NTZ (EDSS)
Grado de discapacidad al inicio del tratamiento de NTZ (MSSS)
Número de brotes antes de iniciar el tratamiento de NTZ
Tasa de brotes antes de iniciar el tratamiento de NTZ
Tratamientos previos
Presencia de BOC IgG
Presencia de BOC IgM lípido-específicas
Serología para el virus JC (título de Anticuerpos anti-JC)
Índices IgG, IgM y albúmina
Nº de células en LCR
Tiempo total de tratamiento de NTZ
Desarrollo de LMP

LMP: Leucoencefalopatía multifocal progresiva, EM: Esclerosis múltiple; NTZ: Natalizumab, JC: virus John Cunningham, BOC: bandas oligoclonales

4.2.3. Muestras biológicas

Este estudio multicéntrico fue aprobado por los comités éticos de los distintos hospitales participantes.

Las muestras utilizadas para la determinación de BOCG, BOCM y BOCM-LE se obtuvieron con fines diagnósticos. El material sobrante se utilizó para este estudio tras la obtención del consentimiento informado por parte de los pacientes.

Las muestras de LCR y suero empleadas en la determinación de BOC fueron alicuotadas y congeladas (-80°C) tras su recepción y se mantuvieron congeladas hasta su uso. Para la cuantificación de IgG, IgM y albúmina en LCR y suero y para el estudio de BOC se recogieron dos alícuotas de 500µl de LCR y de suero.

Una pareja de alícuotas de suero y LCR se usó para la cuantificación de IgG, IgM y albúmina y para el estudio de BOCG y BOCM, mientras que la segunda alícuota de LCR se mantuvo congelada hasta el momento de la determinación de BOCM-LE en aquellos casos en los que los pacientes presentaran BOCM positivas en LCR.

4.3. MATERIALES

4.3.1. Materiales usados en la detección de bandas oligoclonales IgG (BOCG), IgM totales (BOCM) e IgM específicas frente a lípidos de mielina (BOCM-LE)

- Ácido clorhídrico 36% (Merck).
- Ácido sulfúrico 98% (Merck).
- Agarosa IEF (GE healthcare).
- Anti- IgM humana marcada con biotina (Sigma Aldrich Química SA).
- Anti-IgG humana marcada con fosfatasa alcalina (Jackson Immunoresearch Laboratories).
- Baño refrigerador Multitemp II (GE Healthcare).
- Bromo, cloroindoleil fosfato, p-toluidil sal (BCIP). (Sigma Aldrich Química SA).
- Cloroformo (Merk).
- Cristales y moldes de metacrilato para hacer los geles.
- Cubeta para IEF Multiphor II (GE Healthcare).
- Dimetilformamida (Merk).
- Ditiotreitól (DTT). (Sigma Aldrich Química SA).
- Estreptavidina conjugada con fosfatasa alcalina. (Sigma Aldrich Química SA).
- Fosfatidilcolina Tipo III-L (Sigma AldrichQuimica SA).
- Fosfato dipotásico (Panreac).

- Fosfato monopotásico (Panreac).
- Fuente para electroforesis EPS 3500 (GE Healthcare).
- Gel Bond (GE Healthcare).
- Glicerol (Merck).
- Hidróxido sódico (Merck).
- Leche desnatada en polvo (Central Lechera Asturiana).
- Nitroazul de tetrazolio (NBT). (Sigma Aldrich Química SA).
- Nitrocelulosa (GE healthcare).
- Papel Whatman (Millipore).
- Pharmalyte 3-10 (GE healthcare).
- Pharmalyte 4,2-4,9 (GE healthcare).
- Pharmalyte 5-8 (GE healthcare).
- Pharmalyte 8-10.5 (GE healthcare).
- PVDF (GE healthcare).
- Sorbitol (Sigma Aldrich Química SA).
- Suero salino isotónico (Fresenius-Kabi).
- Tris Base (Sigma Aldrich Química SA).

4.3.2. Materiales utilizados en la determinación de albúmina, IgG y IgM en las muestras de suero y LCR

Las concentraciones de IgG, IgM y albúmina se determinaron en un turbidímetro SPA PLUS® (de Binding site) usando los siguientes reactivos de la misma casa comercial (tabla 3).

Tabla 3 Reactivos utilizados en la determinación de IgG, IgM y albúmina en suero y LCR

Nombre	Código del producto
Antisuero anti-IgG suero y LCR	NK004.S
Antisuero anti-Albúmina suero y LCR	NK032.S
Antisuero anti-IgM en LCR	LK012.L.S
Antisuero anti-IgM en suero	NK012.S

LCR: líquido cefalorraquídeo

4.4 MÉTODOS

4.4.1. Estudio de variables clínicas

Las principales variables clínicas usadas en el seguimiento de los pacientes fueron los brotes y la evaluación de la discapacidad.

-Definición de brote: aparición de un nuevo síntoma neurológico de al menos 24 horas de duración, siempre que este nuevo evento estuviera precedido de al menos 1 mes de estabilidad neurológica (222).

-Estudio de la progresión de la discapacidad. En cada visita se midió el grado de discapacidad según las escalas EDSS y MSSS. La escala EDSS mide la discapacidad con valores de cero a diez, correspondiendo 0 a "No afectación neurológica" y 10 a "muerte por EM" (figura 1).

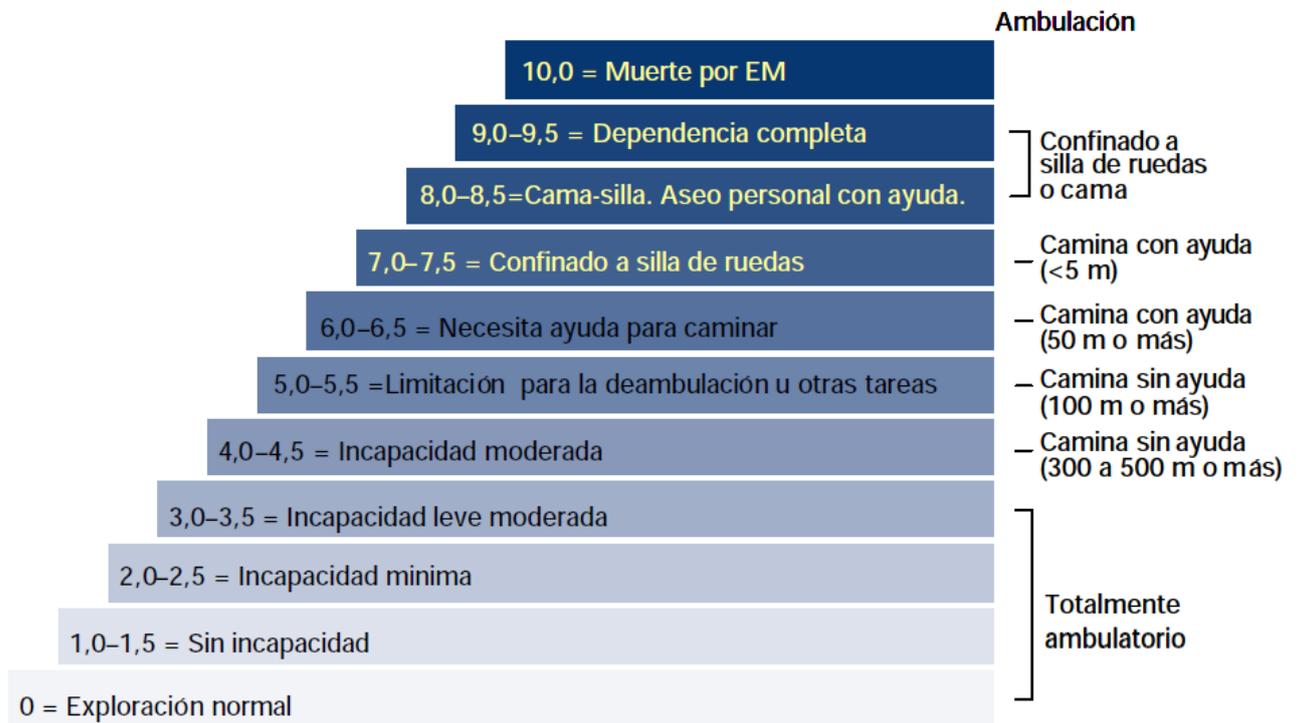


Figura 1 EDSS y su relación con la de ambulación (15)

La escala MSSS se basa en la escala EDSS y la modifica en función del tiempo de evolución de la enfermedad (Figura 2).

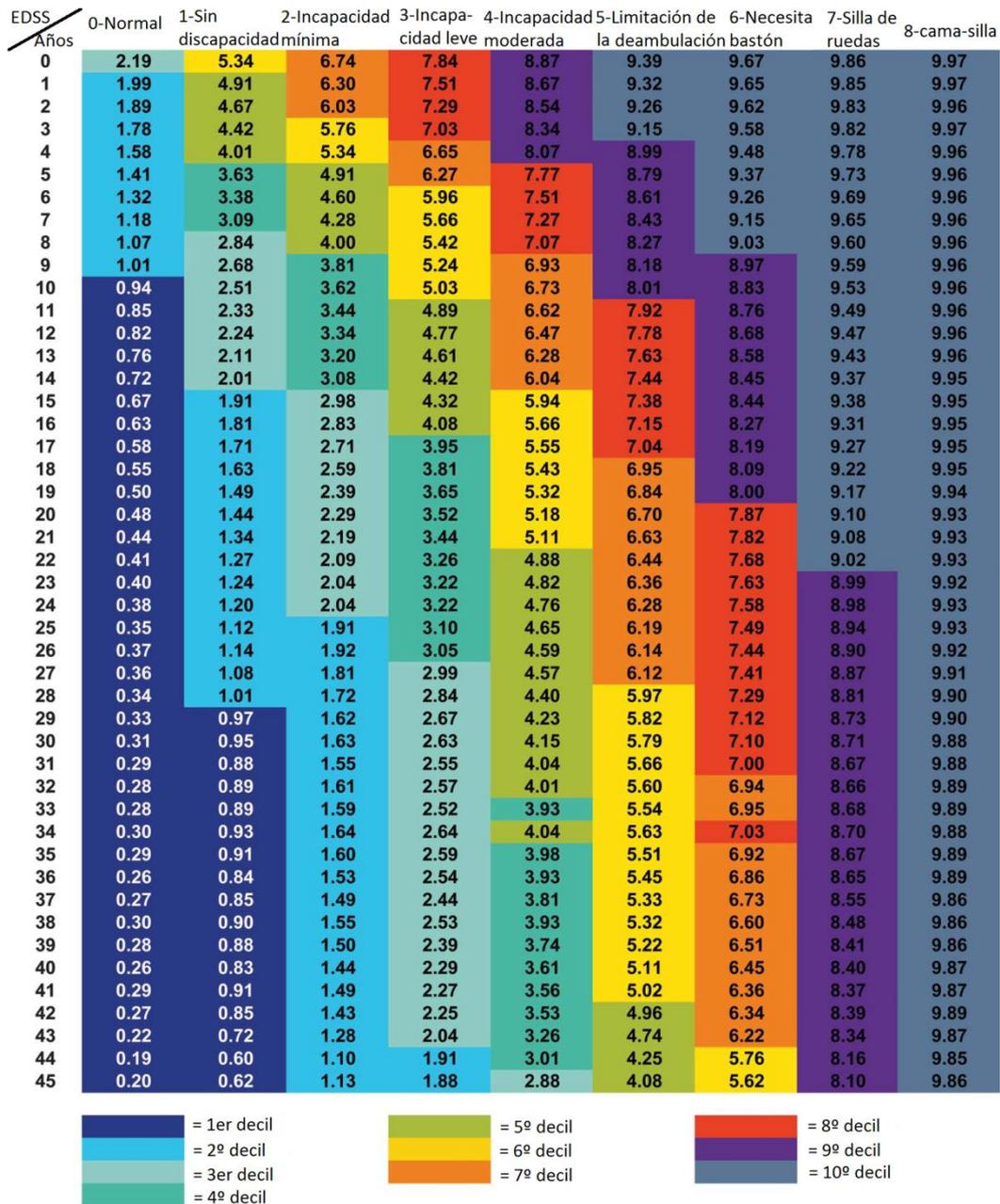


Figura 2 Escala MSSS (223)

4.4.1.1. Diagnóstico de la LMP

Todas las LMP se diagnosticaron siguiendo los criterios diagnósticos actualmente vigentes (198). Estos criterios incluyen:

-Clínica progresiva compatible con la LMP. Entre el 30%-50% de los pacientes presentan anormalidades cognitivas y/o del comportamiento. Las alteraciones más frecuentes son: debilidad motora, alteraciones de la marcha, déficit del campo visual y alteraciones del lenguaje. Con mucha menos frecuencia se observan alteraciones como pérdida sensorial, dolor de cabeza o diplopía (199).

-Estudio de resonancia compatible (200): Lesiones hiperintensas en secuencias T2 o FLAIR que aparecen predominantemente en la sustancia blanca, en la región yuxtacortical o en tronco cerebral. En el 40% de los casos de LMP secundarios al tratamiento con NTZ, se detectan lesiones captantes de gadolinio en RMN en el momento del diagnóstico de la LMP (estas lesiones suelen ser monofocales y predominan en el lóbulo frontal). Hay que tener en cuenta que distinguir las lesiones causadas por LMP de las causadas por EM suele ser complicado, por lo que se considera como técnica más sensible en el diagnóstico de LMP la RMN por FLAIR (lesiones en la unión entre sustancia gris-blanca, monofocales y localizadas en el lóbulo frontal).

-Criterios de laboratorio (201): El principal criterio diagnóstico de LMP es la detección de la presencia del virus JC en el LCR mediante técnicas de amplificación por PCR (más de 200 copias de DNA del VJC/ml LCR).

Teniendo en cuenta todos estos criterios se puede establecer un diagnóstico de LMP definitivo, probable, posible o descartar LMP como se muestra en la tabla 4.

Tabla 4 Diagnóstico diferencial de LMP en base a datos clínicos, radiológicos y de laboratorio. Tabla tomada de Berger *et al.* (198).

Diagnóstico diferencial de LMP en base a datos clínicos, radiológicos y de laboratorio			
Certeza del Dx	Características clínicas compatibles	Hallazgos de imagen compatibles	PCR para el VJC en LCR
Definitivo	+	+	+
Probable	+	-	+
	-	+	+
Posible	+	+	- / E
	-	-	+
No LMP	-	-	-
	+	-	-
	-	+	-

Dx: Diagnóstico; +: Positivo; -: Negativo; VJC: Virus John Cunningham; E: Equívoco

4.4.2. Estudio de variables de laboratorio

4.4.2.1. Anticuerpos anti-JC

La determinación de los anticuerpos anti-JC en suero se realizó en el laboratorio europeo de referencia (Unilabs) en Dinamarca. Cada centro se encargó del envío periódico de las muestras de sus pacientes, como parte del seguimiento clínico de los

mismos. La detección de los anticuerpos se realizó mediante un ELISA doble (STRATIFY JCV™ o STRATIFY JCV™ DxSelect™) previamente descrito (212), (224).

Para este estudio consideramos la determinación de Ac obtenido en la fecha más próxima a la última visita registrada o, en caso de LMP, el valor más reciente obtenido previo a la aparición de la misma.

4.4.2.2. Cálculo de los índices de Ac anti-JC

Los índices de Ac anti-JC se calcularon según se ha descrito anteriormente (212), (224). Para este estudio consideramos el título de Ac obtenido en la determinación más próxima a la última visita registrada o, en caso de LMP, el valor más reciente obtenido previo a la aparición de la misma. Los índices de Ac anti-JC se calculan dividiendo la densidad óptica (DO) de las muestras de los pacientes por la DO del calibrador de punto de corte que incluye el ELISA, de esta forma se normalizan los resultados obtenidos en cada ensayo. Se considera positivo un índice de Ac anti-JC superior a 0.40, mientras que índices inferiores a 0.20 de Ac anti-JC se consideran negativos. Los índices con valores intermedios entre 0.20-0.40 requirieron un test de confirmación (210).

4.4.2.3. Cálculo de índices de IgG, IgM y albúmina

Se realizó usando las fórmulas que se muestran a continuación, según lo descrito previamente (103):

$$\text{-Índice de IgG} = ([\text{IgG LCR}] / [\text{IgG suero}]) / ([\text{Albúmina LCR}] / [\text{Albúmina suero}])$$

$$\text{-Índice de IgM} = ([\text{IgM LCR}] / [\text{IgM suero}]) / ([\text{Albúmina LCR}] / [\text{Albúmina suero}])$$

4.4.2.4. Método utilizado en la detección de bandas oligoclonales IgG

El estudio de bandas oligoclonales de IgG se realizó en base a un método de isoelectroenfoque (IEF) e inmunodetección descrito previamente (75).

Brevemente, el gel de IEF se preparó con agarosa IEF (de muy baja electroendósmosis) al 1.2%, sorbitol al 10% y anfolinas 3-10 al 8% y 8-10.5 al 2%. Se estudiaron muestras pareadas de LCR y suero de cada paciente de LCR. El suero se diluyó hasta alcanzar la misma concentración de IgG que el LCR. Tras realizar el IEF se transfirieron las proteínas a una membrana de nitrocelulosa y se bloqueó la misma 30 minutos en agitación con 2% de leche en polvo desnatada diluida en suero salino. La inmunodetección se realizó con anti-IgG humana marcada con fosfatasa alcalina diluida en 0.2% de leche desnatada en suero salino, durante 1 hora a temperatura ambiente en agitación. Finalmente, la membrana se reveló con el sustrato de fosfatasa alcalina (Nitro azul de tetrazolio (NBT) 1% y Bromo, cloro, indoleil fosfato (BCIP) 1% diluidos en Tris 0.1M pH 9,7. (Figura 3).

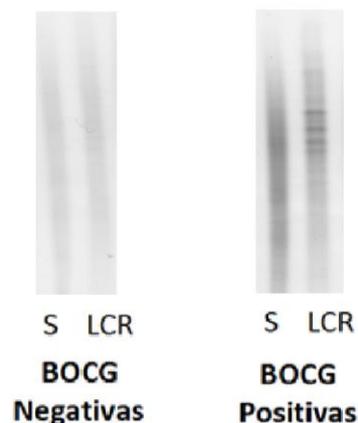


Figura 3. Ejemplo representativo de patrones de bandas oligoclonales IgG (BOCG) en suero (S), y líquido cefalorraquídeo (LCR) de pacientes neurológicos con EMRR

4.4.2.5. Método utilizado en la detección de bandas oligoclonales IgM

El estudio de BOC IgM se realizó mediante un método puesto a punto en nuestro laboratorio (118). De igual manera que las BOCG, las BOCM se estudiaron mediante un IEF seguido de la inmunodetección. El gel de IEF se preparó con agarosa IEF (de muy baja electroendósmosis) al 1.2%, sorbitol al 10% y anfolinas 5-8al 8% y 4.2-4.9 al 1%. Se estudiaron muestras pareadas de LCR y suero de cada paciente de LCR. El suero se diluyó hasta alcanzar la misma concentración de IgM que el LCR (reduciéndolas previamente al IEF con DTT). Tras el IEF se transfirieron las proteínas a una membrana de PDVF (activada con metanol los 15 minutos previos a la transferencia). Tras la transferencia, se bloqueó la membrana 30 minutos en agitación con 2% de leche en polvo desnatada en suero salino. La inmunodetección se realizó incubando la membrana de PVDF durante toda la noche con el Ac anti-IgM biotinilado a 4°C en agitación con una dilución 1/5000 en 0.2% de leche desnatada. Posteriormente, se incubó dicha membrana con estreptavidina unida a fosfatasa alcalina durante una hora a temperatura ambiente y se revelaron con el sustrato de fosfatasa alcalina (Nitro azul de tetrazolio (NBT) 1% y Bromo, cloro, indoleil fosfato (BCIP) 1% diluidos en Tris 0.1M pH 9,7. (Figura 4).

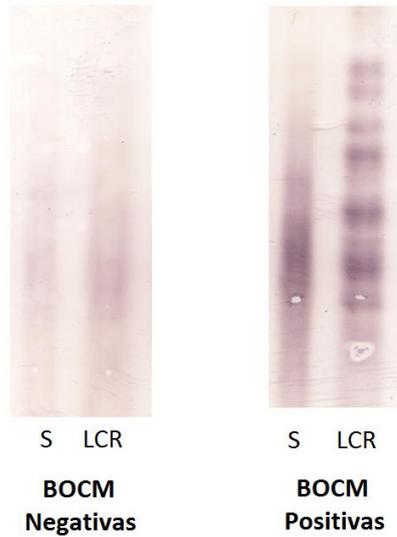


Figura 4 Ejemplo representativo de patrones de bandas oligoclonales IgM (BOCM) en suero (S), y líquido cefalorraquídeo (LCR) de pacientes neurológicos con EMRR

4.4.2.6. Método para la detección de bandas oligoclonales IgM lípido-específicas

La detección de BOC IgM lípido-específicas se realizó mediante un método puesto a punto en nuestro laboratorio (78). La primera parte del ensayo es igual a la descrita en el apartado anterior con la siguiente salvedad: se ensayan muestras triplicadas de LCR de cada paciente. Una vez realizado el IEF, las proteínas se transfieren en el primer caso a una membrana tapizada con una solución de fosfatidilcolina (concentración 20µg/ml) en PBS toda la noche en agitación a 4°C y bloqueada 18 horas con una solución de Polypep al 3% en suero salino a 4°C en agitación. La segunda muestra (control negativo), se transfiere a una membrana bloqueada con Polypep al 3% en suero salino a 4°C en agitación. La última se transfiere a una membrana de

nitrocelulosa sin procesamiento previo (control positivo). Para el bloqueo y revelado e sigue el mismo protocolo descrito en el apartado anterior. (figura5).

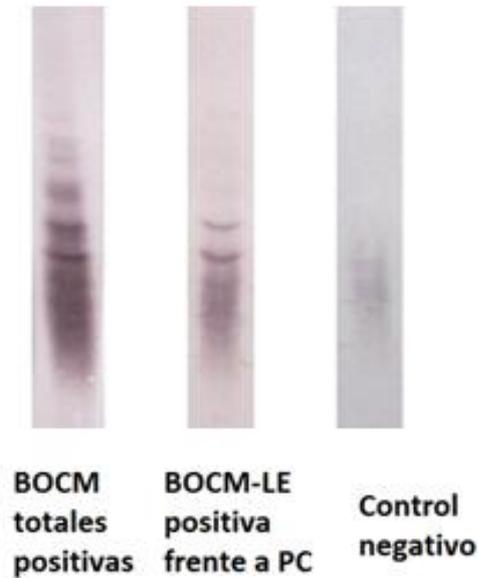


Figura 5 Ejemplo representativo de patrones de bandas oligoclonales IgM lípido-específicas (BOCM-LE) en líquido cefalorraquídeo (LCR) frente a fosfatidilcolina (PC) de la mielina en pacientes neurológicos con EMRR

4.5. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Para describir variables categóricas se usó la frecuencia absoluta y relativa. Para las variables continuas se usó la media \pm desviación típica o mediana \pm percentiles 25 y 75.

Para evaluar la asociación estadística entre variable categóricas y la presencia de LMP se utilizó Chi-cuadrado o test exacto de Fisher si la frecuencia esperada era menor de 5 en al menos un 20% de las casillas. Se estudió la normalidad de las distintas variables

en los grupos de LMP y NO-LMP mediante el test Kolmogorov-Smirnov. Ninguna de las variables estudiadas cumplía criterios de normalidad en el grupo LMP, por tanto, se estudiaron las diferencias entre variables en los dos grupos (LMP/No LMP) usando el test no paramétrico de U de Mann Whitney para variables continuas.

Para establecer el punto de corte más adecuado para diferenciar los casos de LMP de los pacientes LMP-negativos, se utilizaron curvas ROC en la edad de inicio de natalizumab y la tasa de brotes previa al tratamiento (maximizando la sensibilidad/especificidad y aproximando los puntos de corte a parámetros fácilmente utilizables en la práctica clínica diaria).

Para estimar el efecto de las variables en el riesgo de desarrollar LMP se utilizó modelos de regresión logística binaria, estimando los Odds Ratio y los intervalos de confianza (IC) y la significación para cada una de las variables.

Finalmente, se realizó un análisis multivariante incluyendo las variables con significación estadística en el análisis univariante. Se utilizó una estrategia hacia atrás, hasta establecer un modelo final con todas las variables con significación estadística (modelo mínimo).

Se generaron nomogramas que representan de forma gráfica el peso de cada una de las variables incluidas en el modelo final para predecir el desarrollo de LMP. Este modelo, asigna un valor a cada variable y crea dos escalas paralelas una con la puntuación asignada y otra con el riesgo de LMP. Gracias a ello, con la puntuación asignada a cada paciente, podemos calcular de modo individual su riesgo de LMP.

Debido al reclutamiento activo de pacientes con LMP, nuestra cohorte de pacientes presentaba una tasa más elevada de LMP que la descrita en la bibliografía (165), por ello, creamos un factor de corrección que nos permitiera ajustar nuestros resultados a la realidad. Para determinar el riesgo de desarrollar LMP real de cada individuo y evitar sobrestimaciones, su puntuación total se corrigió mediante un factor obtenido mediante la división: frecuencia de LMP descrita previamente en pacientes tratados con NTZ (165) y frecuencia de LMP en pacientes tratados con NTZ de nuestras cohortes.

Para el análisis estadístico utilizamos el paquete estadístico STATA v.15.1 (StataCorp.2014. College Station, TX, USA). Se consideraron estadísticamente significativos los valores de p menores a 0.05.

V. RESULTADOS

5.1. ESTUDIO MULTICÉNTRICO DE FACTORES CLÍNICOS Y DE LABORATORIO QUE SE ASOCIAN AL RIESGO DE LMP

Para la realización del estudio, se envió el proyecto al comité ejecutivo de BioMS y al coordinador de la red española de EM (REEM). Una vez aprobada su difusión por ambas partes, se difundió a los hospitales pertenecientes a ambos consorcios. Recibimos respuesta positiva de 36 hospitales (Tabla 5). Nuestro objetivo era la inclusión de al menos 1000 pacientes tratados con NTZ. Se pidió a los centros que incluyeran, a ser posible, todos sus casos de LMP, ya que dada su baja prevalencia era necesario reclutar tantos pacientes como fuera posible para obtener una cohorte representativa. Nos propusimos obtener datos de al menos 30 pacientes con LMP.

Tabla 5 Listado de centros participantes en el reclutamiento de pacientes

Centros participantes en el reclutamiento de pacientes	Número de pacientes
Alemania (1 centro)	24 pacientes (2%)
Austria (1 centro)	119 pacientes (9.6%)
Dinamarca (1 centro)	5 pacientes (0.5%)
Italia (3 centros)	143 pacientes (11.5%)
España (30 centros de 9 comunidades autónomas)	949 pacientes (76.5%)

Se anonimizaron todos los centros participantes y a cada centro se le asignó una numeración aleatoria. A partir de este momento nos referiremos a cada hospital con dicho código.

Para la recogida de datos se diseñó una base de datos en la que se establecieron dos tipos de variables: Obligatorias y Optativas (Tablas 6 y 7).

Tabla 6 Datos obligatorios

Datos obligatorios
Sexo
Edad al debut de la EM
Edad al inicio del tratamiento con EM
Tratamientos previos al NTZ (inmunosupresores o inmunomoduladores)
Tiempo de evolución de la enfermedad al inicio del tratamiento de NTZ
Serología para el virus JC (Positivo/Negativo)
Título de Anticuerpos anti-JC
Número de brotes totales antes de iniciar el tratamiento de NTZ
Grado de discapacidad al inicio del tratamiento de NTZ
Desarrollo de LMP

NTZ: Natalizumab, EM: Esclerosis múltiple; LMP: Leucoencefalopatía multifocal progresiva

Tabla 7 Datos optativos

Datos de laboratorio optativos relativos a LCR
Número de leucocitos en LCR
Índice de IgG
Índice de IgM
Presencia de BOC IgG
Presencia de BOC IgM y lípido-específicas

LCR: Líquido cefalorraquídeo, BOC: Bandas oligoclonales

A partir de todos los datos recogidos se calcularon otra serie de variables (Tabla 8) que también se incluyeron en la base de datos.

Tabla 8 Variables calculadas a partir de los datos recogidos en el estudio

Variables calculadas a partir de los datos recogidos
Edad del paciente en el primer brote
Edad del paciente al inicio del tratamiento de NTZ
Edad actual del paciente (en la última visita registrada).
Tiempo de evolución de la EM hasta el inicio del tratamiento de NTZ
Tiempo de evolución total de la EM
Tiempo total de tratamiento de NTZ
MSSS
Tasa de brotes

NTZ: Natalizumab, EM: Esclerosis múltiple; MSSS: grado de discapacidad

5.2. PRIMERA RONDA DE DEPURACIÓN DE RESULTADOS

5.2.1. Datos obligatorios

Recibimos datos de un total de 1307 pacientes de los distintos centros participantes. De estos, solamente 815 mostraban todos los registros obligatorios completos y correctamente rellenados. En los 492 restantes observamos las incidencias que se muestran en la tabla 9.

Tabla 9 Pacientes con datos obligatorios incompletos

Pacientes con datos obligatorios incompletos
366 pacientes con datos incompletos (título de Ac anti-JC, tiempo de evolución de EM, etc.)
79 pacientes con errores tipográficos (en fechas, decimales, EDSS, etc.)
27 pacientes con datos clínicos incongruentes
20 pacientes con tratamiento de NTZ inferior a 1 año

NTZ: Natalizumab, EM: Esclerosis múltiple; EDSS: grado de discapacidad

Los 20 pacientes con un tiempo de tratamiento con NTZ inferior a un año no cumplían los criterios de inclusión del estudio. Se confirmó este dato con los centros de origen y se eliminaron estos pacientes del estudio (ninguno de ellos había desarrollado LMP). Para resolver el resto de las incidencias se escribió a los centros de origen de los pacientes para completar, corregir y confirmar los datos enviados.

5.2.2. Datos optativos

Los datos de LRC se habían cumplimentado en un número de pacientes muy inferior a los cumplimentados en los datos obligatorios (Tabla 10).

Tabla 10 Pacientes con datos optativos

Pacientes con datos incompletos	Pacientes con datos completos
587 pacientes sin datos de BOCG	700 pacientes con datos de BOCG
1026 pacientes sin datos de BOCM	161 pacientes con datos de BOCM
776 pacientes sin datos del Nº de leucocitos en LCR	511 pacientes con Nº de leucocitos en LCR
49 pacientes con datos incompletos de índices de IgG	445 pacientes con datos de índices de IgG
26 pacientes con datos incompletos de índices de IgM	165 pacientes con datos de índices de IgM

BOCG: Bandas oligoclonales IgG; BOCM: Bandas oligoclonales IgM; LCR: líquido cefalorraquídeo

Escribimos a los centros participantes para completar y verificar los valores de los índices de IgG e IgM, aunque muchos de los datos de laboratorio incompletos/erróneos no se subsanaron. Detectamos que había cierta confusión en los centros de origen a la hora de aplicar las fórmulas para el cálculo de estos datos. Tampoco disponían de los valores de IgG, IgM y albúmina en suero para que pudiéramos calcularlos en el centro coordinador. Por tanto, para evitar sesgos en el análisis de resultados eliminamos estas variables del estudio.

Respecto al número de células en LCR y a las BOC de IgG e IgM pedimos a los centros de origen que completaran estos resultados.

5.3. SEGUNDA RONDA DE DEPURACIÓN DE RESULTADOS

5.3.1. Datos obligatorios

Obtuvimos datos clínicos completos correctos de 1049 pacientes, aunque faltaban 191 pacientes con datos por depurar (tabla 11), por lo que volvimos a escribir a los centros de origen para corregirlos.

Tabla 11 Pacientes con datos obligatorios incompletos

Pacientes con datos obligatorios incompletos
152 pacientes con datos incompletos (título de Ac anti-JC, tratamientos previos, etc.)
22 pacientes con errores tipográficos (en fechas, decimales, EDSS, etc.)
17 pacientes con datos clínicos incongruentes (Nº brotes recogidos sólo en el año previo)

NTZ: Natalizumab, EM: Esclerosis múltiple; EDSS: grado de discapacidad

Los errores tipográficos se corrigieron en gran medida respecto a la ronda anterior. Por lo que, desde el centro coordinador mandamos una base de datos corregida de cada uno de los centros para su validación.

5.3.2. Datos optativos

Se detectaron varios fallos en la recolección de los datos de laboratorio, por lo que se escribió a los centros de origen de dichos pacientes para corregir y confirmar dichos datos. Sólo aumentamos en 24 casos los pacientes con datos de BOCG y en ningún caso el número de pacientes con datos de BOCM.

Dado el interés que tenía el estudio de LCR se ofreció a los centros con muestras pareadas de LCR y suero congeladas a -80°C la realización de las BOCM-LE en el centro coordinador (recibimos muestras de 119 pacientes para la realización de las mismas).

5.4. BASE DE DATOS FINAL

5.4.1. Datos obligatorios

Tras las rondas de depuración, se eliminaron un total de 69 pacientes (Tabla 12), creando una base de datos que recogía los todos los datos completos de las variables clínicas y epidemiológicas de 1240 pacientes que cumplían todos los criterios de inclusión del estudio. Treinta y cinco de ellos habían desarrollado LMP (Tabla13).

Tabla 12 Pacientes eliminados de la base de datos final

Pacientes eliminados de la base de datos final
20 pacientes con tratamiento de NTZ inferior a 1 año en la primera ronda de resultados
17 pacientes con razón para la suspensión del tratamiento de NTZ no recogida
12 pacientes con EDSS no valorado/inconsistente
6 pacientes con número de brotes no recogido/desconocido
5 pacientes con edad del primer brote desconocido (debut EM)
5 pacientes con tratamientos previos no recogidos/desconocidos
4 pacientes con fecha final del tratamiento de NTZ no recogido/ desconocido

NTZ: Natalizumab, EM: Esclerosis múltiple; EDSS: grado de discapacidad

Tabla 13 Número total de pacientes aportados por cada hospital en la cohorte total.

Código de Hospital	Nº pacientes totales	Nº pacientes que presentaron LMP
1	24	0
2	5	0
3	23	0
4	34	1
5	2	2

6	151	2
7	94	2
8	9	0
9	1	1
10	2	2
11	9	0
12	11	0
13	5	1
14	10	1
15	1	1
16	35	0
17	73	0
18	16	0
19	2	2
20	65	1
21	9	2
22	17	2

23	47	1
24	7	1
25	2	2
26	98	1
27	73	1
28	13	0
29	97	2
30	13	1
31	29	0
32	1	1
33	119	2
34	66	0
35	43	1
36	34	2

5.4.2. Datos optativos

Tras las rondas de depuración, finalmente obtuvimos 756 pacientes con datos del estudio de BOCG y 277 pacientes con datos del estudio de BOCM (Tabla 14).

Únicamente conseguimos aumentar en 15 casos el dato correspondiente al número de células en LCR (7 de ellos correspondieron a pacientes que desarrollaron LMP). Debido a la gran confusión en la recogida de esta variable decidimos eliminarla del estudio estadístico (aunque si realizamos un subanálisis de los datos recogidos y no se observaban diferencias significativas entre los dos grupos).

Tabla 14 Pacientes con datos relativos a BOC

Pacientes con datos relativos a BOC			
		BOCG	BOCM
Número de pacientes con datos de BOC	Pacientes LMP	32	24
	Pacientes no LMP	724	253
Número de pacientes sin datos de BOC	Pacientes LMP	3	11
	Pacientes no LMP	481	952

BOC: Bandas oligoclonales; BOCG: Bandas oligoclonales IgG; BOCM: Bandas oligoclonales IgM

Atendiendo a los pacientes que presentaban datos del estudio de BOCM (ya fueran positivas o negativas en LCR), construimos una subcohorte para realizar el análisis estadístico que nos permitiera confirmar el papel de las bandas oligoclonales IgM lípido-específicas frente a la aparición de LMP en pacientes con EM tratados con Natalizumab.

De todos los pacientes con estudio de BOCM que desarrollaron LMP, únicamente un paciente presentó BOCM-LE positivas en LCR.

5.5. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

5.5.1. Análisis univariante en la cohorte total de pacientes

5.5.1.1. Comparación de grupos

A continuación, estudiamos las variables continuas incluidas en el estudio. Los resultados se muestran en la tabla 15.

Tabla 15 Variables continuas analizadas en la cohorte total de pacientes y significación estadística

Variables continuas analizadas en la cohorte total de pacientes			
	LMP (n=35)	No LMP (n=1205)	<i>p</i>
Edad al primer brote (años)	30.09±9.51	28.16±8.68	0.33
Edad al inicio de NTZ (años)	41.28±8.92	36.49±9.39	0.004
Tiempo evolución de EM al inicio de NTZ (años)	11.19±7.45	8.33±6.30	0.02
Duración del tratamiento de NTZ (años)	3.45±1.53	3.77±2.12	0.77
EDSS al inicio del tratamiento de NTZ	3.31±1.43	3.22±1.61	0.68
MSSS al inicio del tratamiento de NTZ	4.28±2.53	4.78±2.44	0.24
Tasa de brotes antes del tratamiento de NTZ	0.76±0.95	1.36±1.44	<0.0001
Índice de anticuerpos Anti-JC	2.17±1.21	0.86±1.12	<0.0001

NTZ: Natalizumab, EM: Esclerosis múltiple; EDSS y MSSS: grado de discapacidad; JC: Virus John

Cunningham

Obtuvimos diferencias significativas en la edad, el tiempo de evolución y el índice de anticuerpos Anti-JC al inicio del tratamiento con Natalizumab, y en la tasa de brotes previa a este tratamiento (Figura 6).

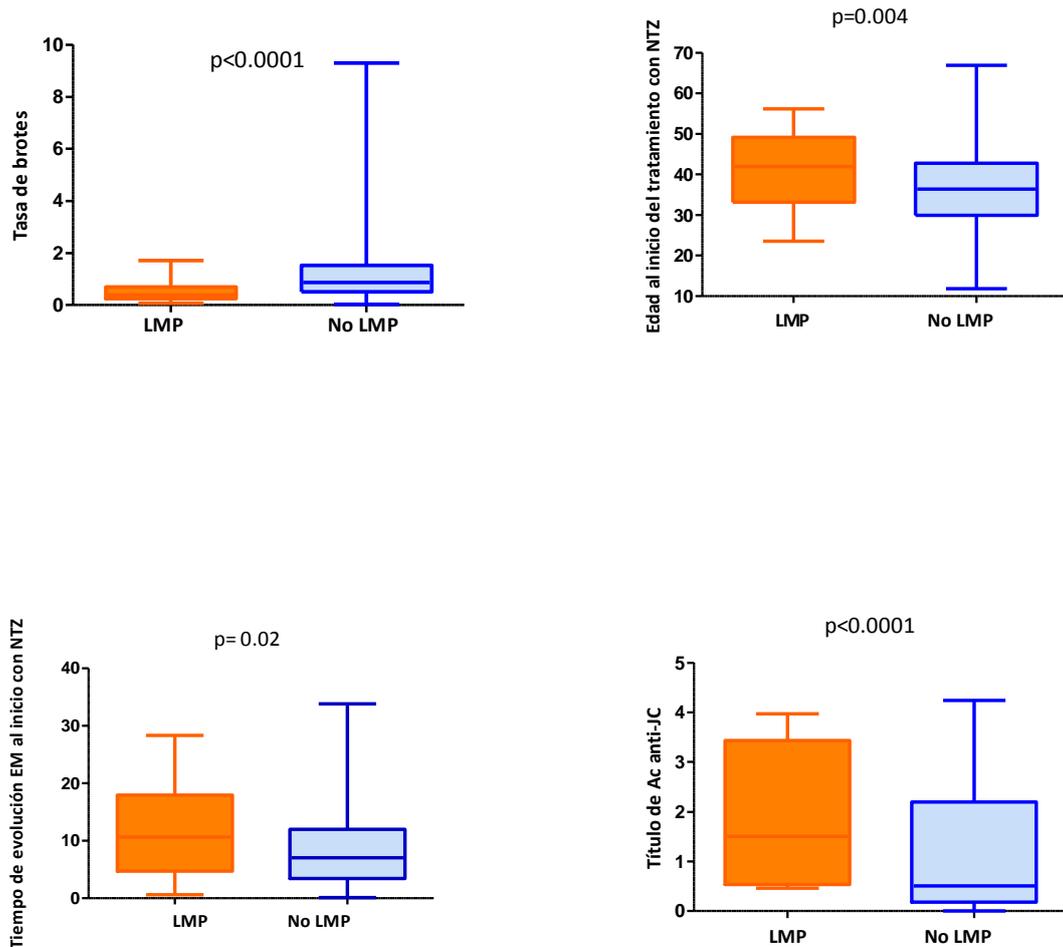


Figura 6 Representación gráfica de las diferencias significativas obtenidas en la comparación entre grupos. NTZ: Natalizumab, EM: Esclerosis múltiple; LMP: Leucoencefalopatía multifocal progresiva; JC: Virus John Cunningham

A continuación, estudiamos las variables categóricas. Los resultados se muestran en la tabla 16

Tabla 16 Variables categóricas analizadas en la cohorte total de pacientes y significación estadística

Variables categóricas analizadas en la cohorte total de pacientes			
	LMP (n=35)	No LMP (n=1205)	p
Sexo (Masculino/Femenino)	16/19	358/847	0.046
Inmunosupresión previa (sí/no)	7/28	139/1066	0.13
Anticuerpos Anti-JC (pos/neg)	32/2	844/331	0.004
BOCG (pos/neg)	30/2	651/73	0.48

NTZ: Natalizumab, EM: Esclerosis múltiple, BOCG: bandas oligoclonales IgG

Observamos un predominio del sexo masculino en los casos de LMP, si bien las diferencias no eran muy notables. Además, había un claro aumento de pacientes con anticuerpos anti-JC positivos en la LMP, como ya se describió en otros estudios (225). No encontramos diferencias significativas en el resto de variables estudiadas.

A continuación, establecimos el punto de corte más adecuado en la edad de inicio de Natalizumab, tiempo de evolución de la enfermedad al inicio de Natalizumab y la tasa de brotes previa mediante curvas ROC (Figura 7).

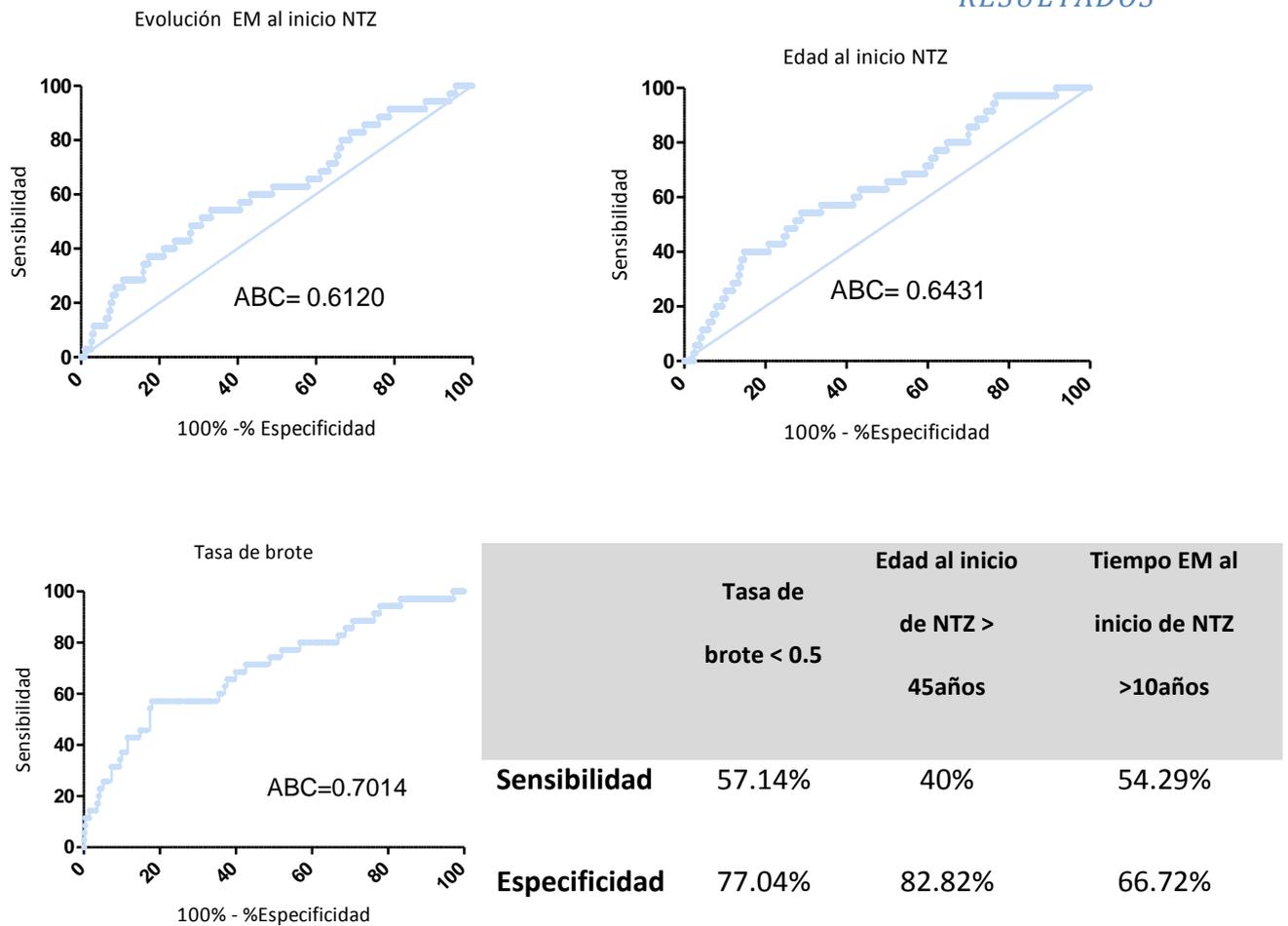


Figura 7 Curvas ROC empleadas en el cálculo de los puntos de corte en las variables continuas. En la tabla se muestran la sensibilidad/especificidad para cada punto de corte.

En el caso de los títulos de Ac anti virus JC, establecimos dos puntos de corte (0.9 y 1.5) en base a lo descrito previamente en la literatura (210).

Además, aunque no habíamos obtenido diferencias significativas en las variables que medían el grado de discapacidad (EDSS y MSSS), realizamos un estudio empírico usando los puntos de corte más ampliamente usados en estudios clínicos, (EDSS y MSSS de tres y seis) (226).

5.5.1.2. Análisis univariante

En el análisis univariante, determinamos las variables que podrían ser útiles para predecir un mayor riesgo de LMP. Los resultados se muestran en la tabla 17.

Tabla 17 Variables estudiadas en el análisis univariante.

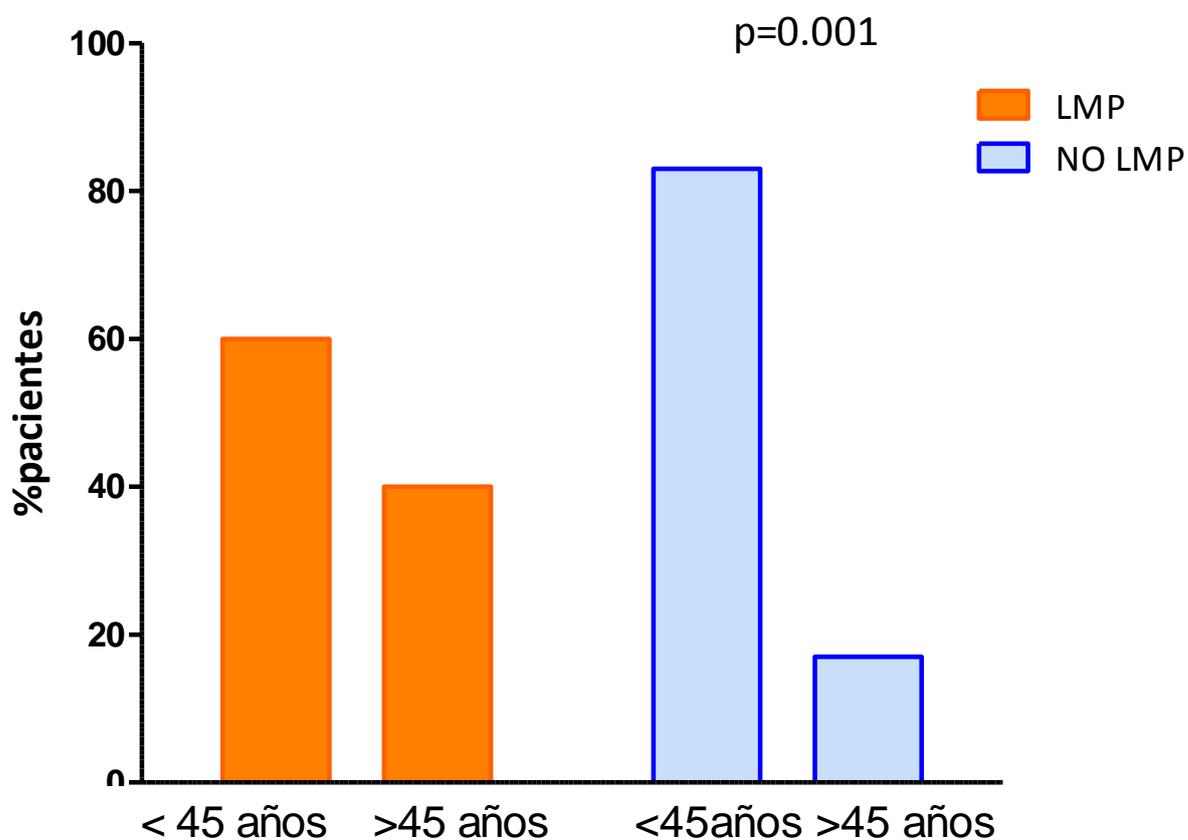
Análisis univariante			
	Odds Ratio	95% IC	p
Edad de inicio NTZ≥45 años	3.20	1.60-6.39	0.001
Duración de la EM al inicio de NTZ≥10 años	2.37	1.21-4.66	0.012
Duración del tratamiento de NTZ>2 años	1.02	0.46-2.27	0.96
Duración del tratamiento de NTZ>3 años	1.25	0.63-2.48	0.53
Duración del tratamiento de NTZ>4 años	0.99	0.43-1.98	0.97
Duración del tratamiento de NTZ>5 años	0.43	0.15-1.23	0.12
Ac anti JC positivos	6.27	1.50-26.33	0.012
Niveles Ac Anti JC ≥0.9	18.29	5.46-61.19	<0.001
Niveles Ac Anti JC ≥1.5	8.58	3.59-20.54	<0.001
EDSS al inicio de NTZ ≥3	1.33	0.66-2.66	0.42
EDSS al inicio de NTZ ≥6	0.87	0.26-2.88	0.82
MSSS al inicio de NTZ<3	2.25	1.14-4.43	0.019
MSSS al inicio de NTZ<6	0.95	0.47-1.94	0.90
Tasa de brote antes del inicio de NTZ <0.5	4.47	2.26-8.86	<0.001
Sexo masculino	1.99	1.06-4.17	0.046

NTZ: Natalizumab, EM: Esclerosis múltiple, BOCG: bandas oligoclonales IgG; CI: Intervalo de confianza. Ac: Anticuerpo

Anticuerpo

A continuación, se representan las variables cuyo análisis estadístico presentó diferencias significativas.

Más del 40% de los pacientes con LMP tenían una edad mayor de 45 años al inicio del tratamiento con NTZ. Esto sólo se observó en el 17% de los pacientes que no desarrollaron LMP. (Figura 8).



OR=3.2; IC=1.6-6.4

Figura 8 Representación gráfica de las diferencias en la edad al inicio de Natalizumab (NTZ), LMP: Leucoencefalopatía multifocal progresiva, OR: Odds Ratio; IC: Intervalo de confianza

La tasa de brotes antes del inicio de NTZ era mayor de 0.5 en alrededor del 80% de los pacientes que no desarrollaron LMP. Este porcentaje bajaba al 43% en los pacientes que hicieron LMP. (Figura 9).

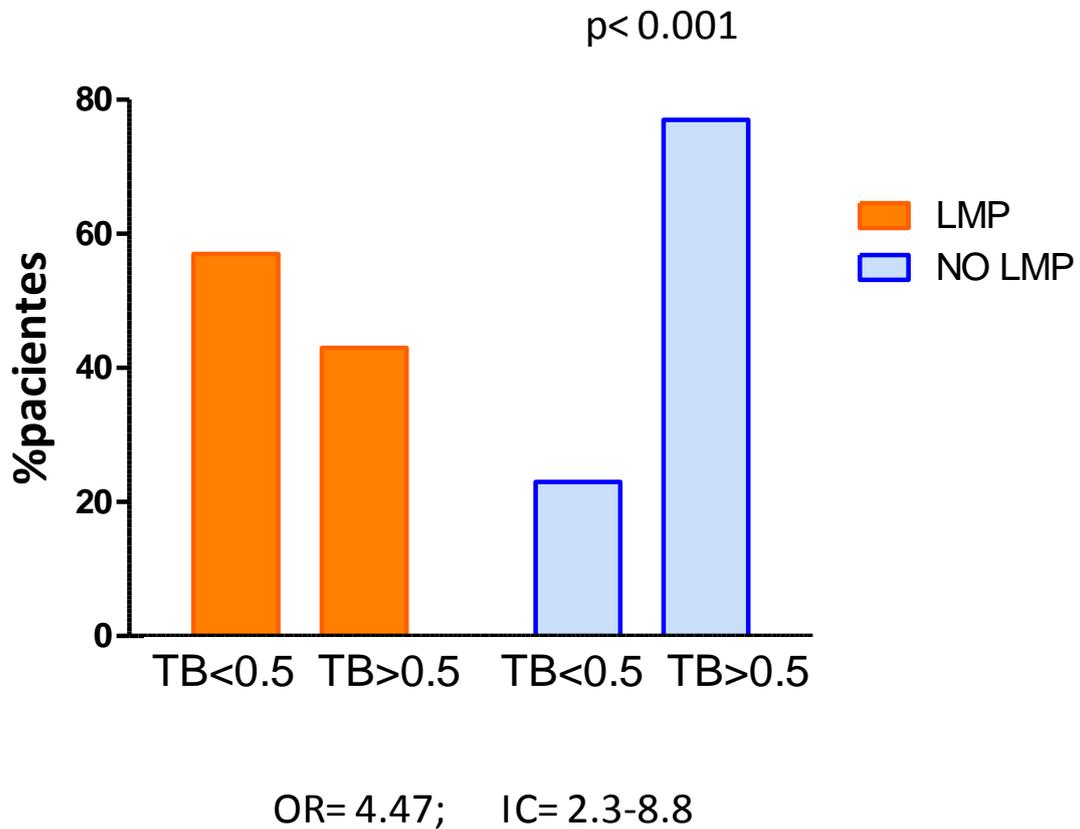


Figura 9 Representación gráfica de las diferencias estadísticamente significativas en la tasa de brote mayor a 0.5 al inicio del tratamiento con NTZ en los pacientes de la cohorte total. LMP: Leucoencefalopatía multifocal progresiva; OR: Odds Ratio; IC: Intervalo de confianza

La positividad de los Ac anti-JC antes del inicio del tratamiento con NTZ de los pacientes que no desarrollaron LMP alcanzó el 72%, mientras que el 94% de los pacientes que desarrolló LMP presentó Ac anti-JC positivos. (Figura 10).

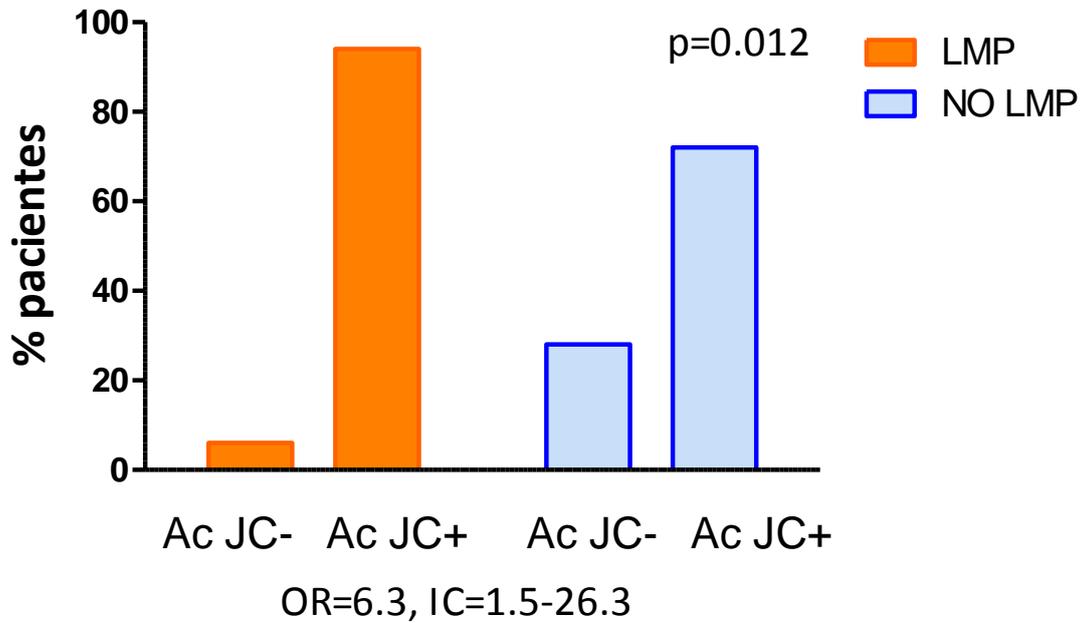


Figura 10 Representación gráfica de las diferencias estadísticamente significativas en la positividad para Ac anti-JC al inicio del tratamiento con NTZ en los pacientes de la cohorte total. Ac: Anticuerpo; LMP: Leucoencefalopatía multifocal progresiva; OR: Odds Ratio; IC: Intervalo de confianza; JC: Virus John Cunningham

El 98% de los pacientes que desarrolló LMP, presentó un título de los Ac anti-JC superior a 0.9 antes del inicio del tratamiento con NTZ, mientras que sólo el 38% de los pacientes que no desarrollaron LMP presentó un título de los Ac anti-JC superior a 0.9. (Figura 11).

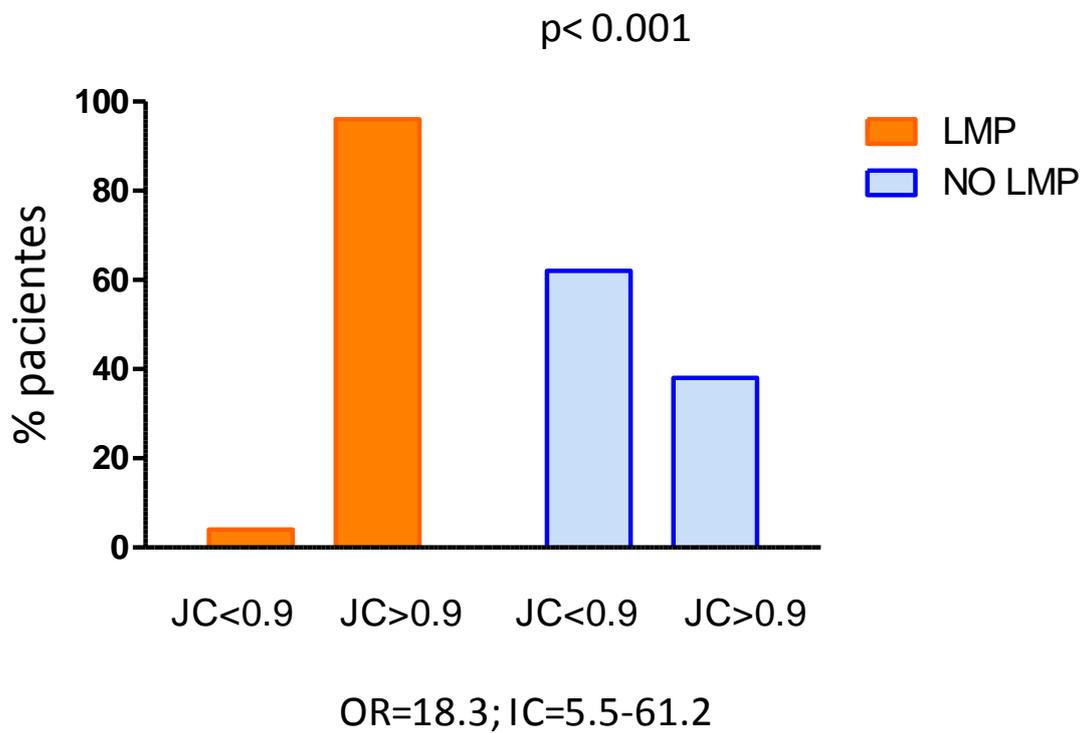


Figura 11 Representación gráfica de las diferencias estadísticamente significativas en el título de los Ac anti-JC mayores a 0.9 al inicio del tratamiento con NTZ en los pacientes de la cohorte total. LMP: Leucoencefalopatía multifocal progresiva; OR: Odds Ratio; IC: Intervalo de confianza; JC: Anticuerpo frente al virus John Cunningham

El 78% de los pacientes que desarrolló LMP, presentó un título de los Ac anti-JC superior a 1.5 antes del inicio del tratamiento con NTZ, mientras que sólo el 32% de los pacientes que no desarrollaron LMP presentó un título de los Ac anti-JC superior a 1.5. (Figura 12).

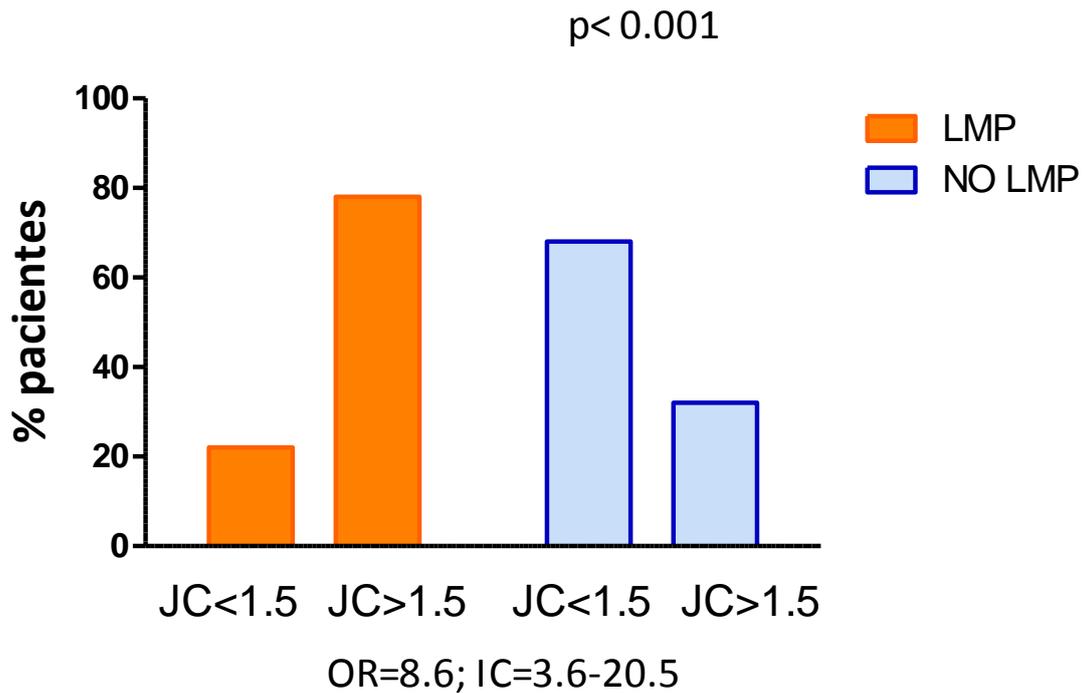


Figura 12 Representación gráfica de las diferencias estadísticamente significativas en el título de los Ac anti-JC mayores a 1.5 al inicio del tratamiento con NTZ en los pacientes de la cohorte total. LMP: Leucoencefalopatía multifocal progresiva; OR: Odds Ratio; IC: Intervalo de confianza; JC: Anticuerpo frente al virus John Cunningham

El tiempo de evolución de la EM antes del inicio del tratamiento con NTZ superó los 10 años en el 33% de los pacientes que no desarrollaron LMP, mientras que el 54 % de los pacientes que desarrolló LMP superó los 10 años de evolución de la enfermedad al inicio del tratamiento. (Figura 13).

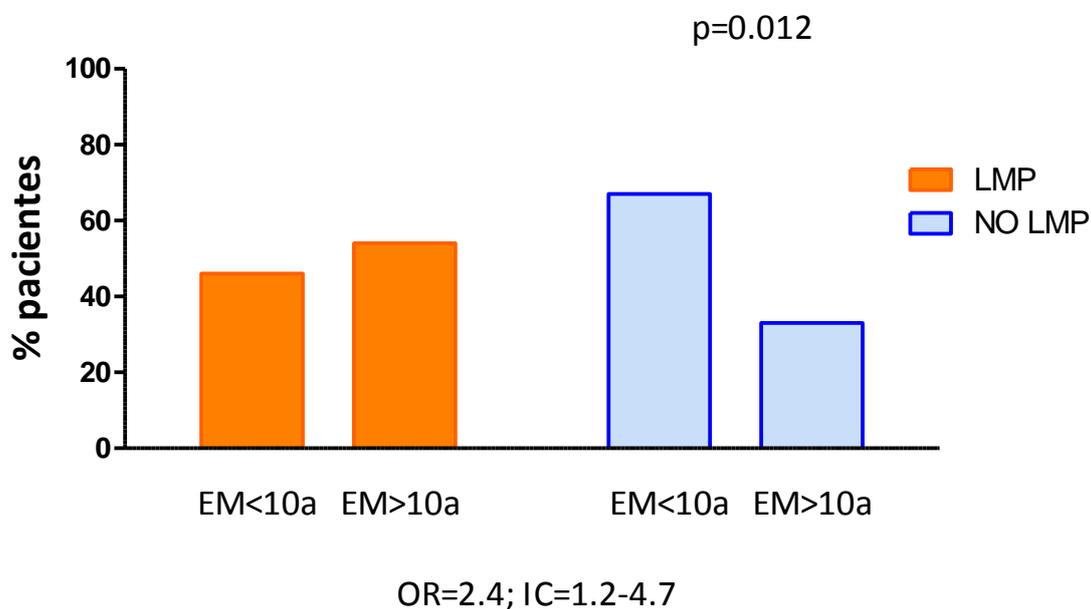


Figura 13 Representación gráfica de las diferencias estadísticamente significativas en el tiempo de evolución de la EM al inicio del tratamiento con NTZ en los pacientes de la cohorte total. NTZ: Natalizumab; LMP: Leucoencefalopatía multifocal progresiva; OR: Odds Ratio; IC: Intervalo de confianza; EM: tiempo de evolución de la esclerosis múltiple; a: años

El 46% de los pacientes que desarrollaron LMP presentaron un MSSS menor de 3 antes del inicio del tratamiento con NTZ, mientras que en los pacientes que no desarrollaron LMP sólo el 27% presentó el MSSS menor de 3. (Figura 14).

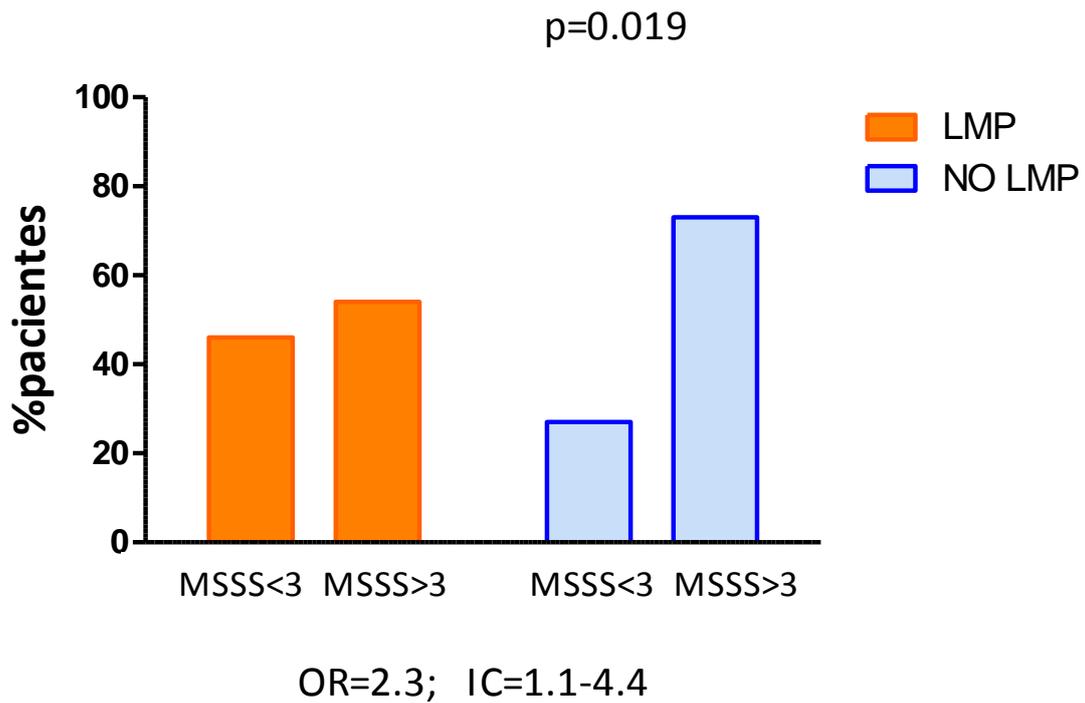


Figura 14 Representación de las diferencias estadísticamente significativas en el MSSS al inicio del tratamiento con NTZ en los pacientes de la cohorte total. MSSS: escala de discapacidad; LMP: Leucoencefalopatía multifocal progresiva; OR: Odds Ratio; IC: Intervalo de confianza.

Este análisis nos permitió definir qué variables de las estudiadas se asocian al desarrollo de LMP durante el tratamiento con NTZ. En la tabla 18 se muestra el resumen de las variables relevantes de mayor a menor significación estadística.

Tabla 18 Resumen de las variables relevantes en el desarrollo de LMP en el análisis univariante en la cohorte total de pacientes

Resumen de las variables relevantes en el desarrollo de LMP				
		Odds Ratio	IC	p
Título de Ac anti-JC	Ac anti JC ≥ 0.9	18.29	5.5-61.2	< 0.001
	Ac anti JC ≥ 1.5	8.58	3.6-20.5	<0.001
Tasa de brote < 0.5		4.47	2.2-8.9	<0.001
Edad al inicio NTZ ≥ 45 años		3.20	1.6-6.4	0.001
Duración EM ≥ 10 años antes del inicio NTZ		2.37	1.2-4.7	0.012
MSSS <3		2.25	1.1-4.4	0.019
Positividad para Ac anti-JC		6.27	1.5-26.3	0.012
Sexo masculino		1.99	1.06-4.17	0.046

Ac: Anticuerpo; MSSS: escala de discapacidad; LMP: Leucoencefalopatía multifocal progresiva;

NTZ: Natalizumab

5.5.2. Análisis univariante en la cohorte de pacientes con estudio de BOCM

5.5.2.1. Comparación de grupos

En el análisis univariante de la cohorte de pacientes que presentaban datos de BOCM, obtuvimos diferencias significativas en las siguientes variables continuas (tabla 19) y categóricas (tabla 20).

Tabla 19 Variables continuas analizadas en la cohorte de pacientes con BOCM y significación estadística

Variables continuas analizadas en la cohorte de pacientes con BOCM			
	LMP (n=24)	NO LMP (n=253)	p
Edad al primer brote (años)	31.13±9.55	28.09±8.41	0.14
Duración de EM al inicio de NTZ (años)	12.71±7.82	6.72±5.70	0.0002
Edad al inicio del tratamiento de NTZ (años)	43.84±8.73	34.81±8.90	<0.0001
Duración del tratamiento de NTZ (años)	3.31±1.57	3.47±2.03	0.82
EDSS al inicio del tratamiento de NTZ	3.58±1.40	3.07±1.57	0.07
MSSS al inicio del tratamiento con NTZ	4.42±2.56	5.09±2.39	0.23
Tasa de brote al inicio NTZ	0.59±0.52	1.57±1.68	<0.0001
Título de Ac Anti-JC	1.94±1.30	0.98±1.14	0.0047

Ac: Anticuerpo; EDSS y MSSS: escala de discapacidad; LMP: Leucoencefalopatía multifocal progresiva; NTZ: Natalizumab

De nuevo obtuvimos diferencias significativas en la edad, el tiempo de evolución de EM, el índice de anticuerpos Anti-JC al inicio del tratamiento con natalizumab y en la tasa de brotes previa a este tratamiento (Figura 15).

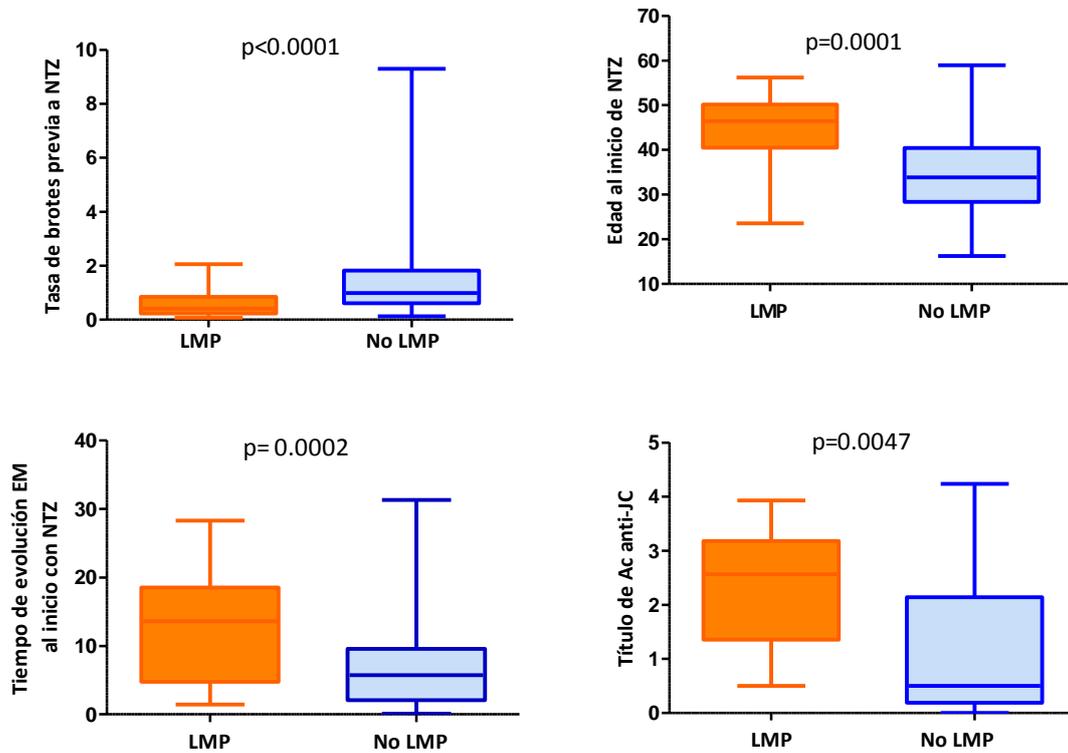


Figura 15 Representación gráfica de las diferencias significativas obtenidas en la comparación entre grupos en la cohorte de pacientes con estudio de BOCM. NTZ: Natalizumab, EM: Esclerosis múltiple; LMP: Leucoencefalopatía multifocal progresiva; JC: Virus John Cunningham

Tabla 20 Variables categóricas analizadas en la cohorte de pacientes con BOCM y significación estadística

Variables categóricas analizadas en la cohorte de pacientes con BOCM			
	LMP (n=24)	NO LMP (n=253)	p
Sexo (Masculino/Femenino)	10/14	78/175	0.28
Inmunosupresión previa (Si/No)	5/19	34/219	0.32
Ac Anti-JC (positivos/negativos)	21/2	162/87	0.010
BOCG (positivas/negativas)	22/2	234/19	0.88
BOCM-LE(positivas/negativas)	1/23	162/91	<0.0001

Ac: Anticuerpos; MSSS: escala de discapacidad; LMP: Leucoencefalopatía multifocal progresiva;

BOCG: bandas oligoclonales IgG, BOCM-LE: bandas oligoclonales IgM lípido-específicas

5.5.2.2. Análisis univariante

A continuación, se detallan las variables estudiadas y su significación estadística (tabla 21).

Tabla 21 Variables estudiadas

Análisis univariante en cohorte de pacientes con BOCM			
	Odds Ratio	95% IC	p
BOCM-LE negativas	40.94	5.44-308.20	<0.001
Sexo masculino	1.60	0.68-3.77	0.28
Edad de inicio de NTZ \geq 45 años	7.36	3.06-17.72	<0.001
Duración de la EM al inicio de NTZ \geq 10 años	4.60	1.94-10.90	0.001
Duración del tratamiento de NTZ $>$ 2 años	1.69	0.61-4.70	0.31
Duración del tratamiento de NTZ $>$ 3 años	1.29	0.56-2.99	0.55
Duración del tratamiento de NTZ $>$ 4 años	0.91	0.36-2.27	0.84
Duración del tratamiento de NTZ $>$ 5 años	0.41	0.09-1.80	0.24
Ac anti JC positivos	5.64	1.29-24.61	0.021
Niveles Ac Anti JC \geq 0.9	9.08	2.54-32.45	0.001
Niveles Ac Anti JC \geq 1.5	4.78	1.71-13.33	0.003
EDSS al inicio de NTZ \geq 3	2.33	0.94-5.82	0.07
EDSS al inicio de NTZ \geq 6	0.76	0.17-3.42	0.72
MSSS al inicio de NTZ $<$ 3	2.25	0.95-5.32	0.06
MSSS al inicio de NTZ $<$ 6	0.86	0.35-2.09	0.74
Tasa de brote antes del inicio de NTZ $<$ 0.5	6.77	2.80-16.35	<0.001
Inmunosupresión previa	1.70	0.59-4.84	0.32

Ac: Anticuerpos; MSSS y EDSS: escala de discapacidad; LMP: Leucoencefalopatía multifocal progresiva; BOCM-LE: bandas oligoclonales IgM lípido-específicas; CI: intervalo de confianza

A continuación, detallaremos las variables cuyo análisis estadístico presentó diferencias significativas.

De manera similar a la cohorte global, sólo el 14% de los pacientes que no desarrollaron LMP presentaron una edad de inicio del tratamiento con NTZ superior a los 45 años, mientras que el 57% de los pacientes que desarrolló LMP en los pacientes con estudio de BOCM superó esta edad al inicio del tratamiento. (Figura 16).

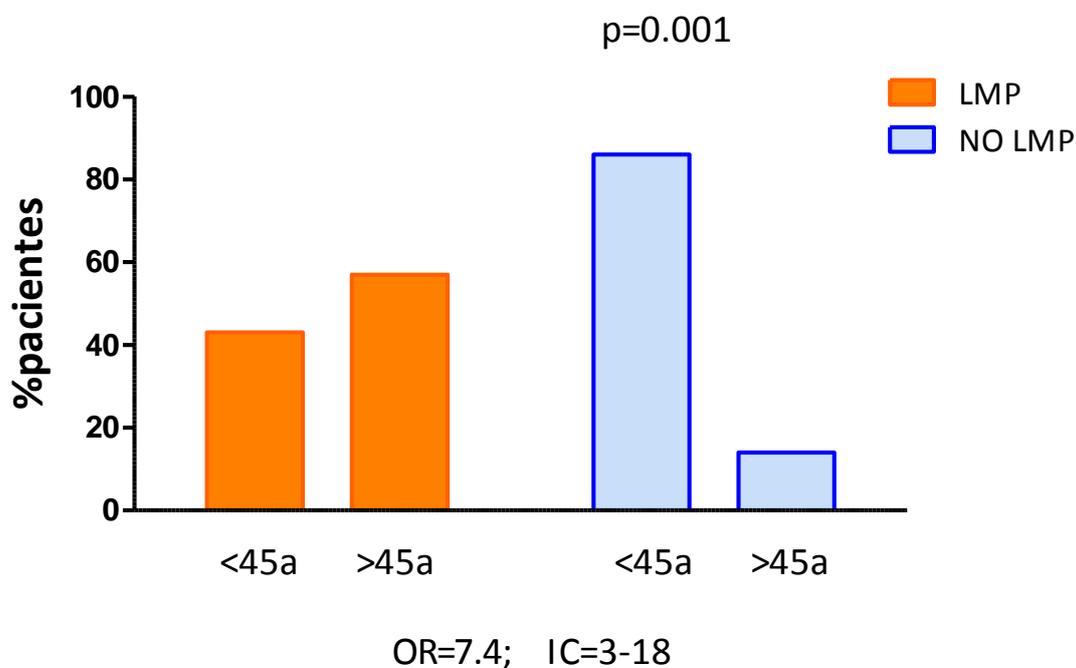


Figura 16 Representación gráfica de las diferencias estadísticamente significativas en la edad mayor a 45 años al inicio del tratamiento con NTZ en los pacientes de la cohorte de pacientes con estudio de BOCM. LMP: Leucoencefalopatía multifocal progresiva; NTZ: Natalizumab; a: años; OR: Odds Ratio; IC: intervalo de confianza

El 81% de los pacientes que no desarrollaron LMP, presentaron una tasa de brote total antes del inicio del tratamiento con NTZ mayor de 0.5, es decir, más de 2 brotes/año. Sólo el 38% de los pacientes que desarrolló LMP superó la tasa de brote de 0.5. (Figura 17).

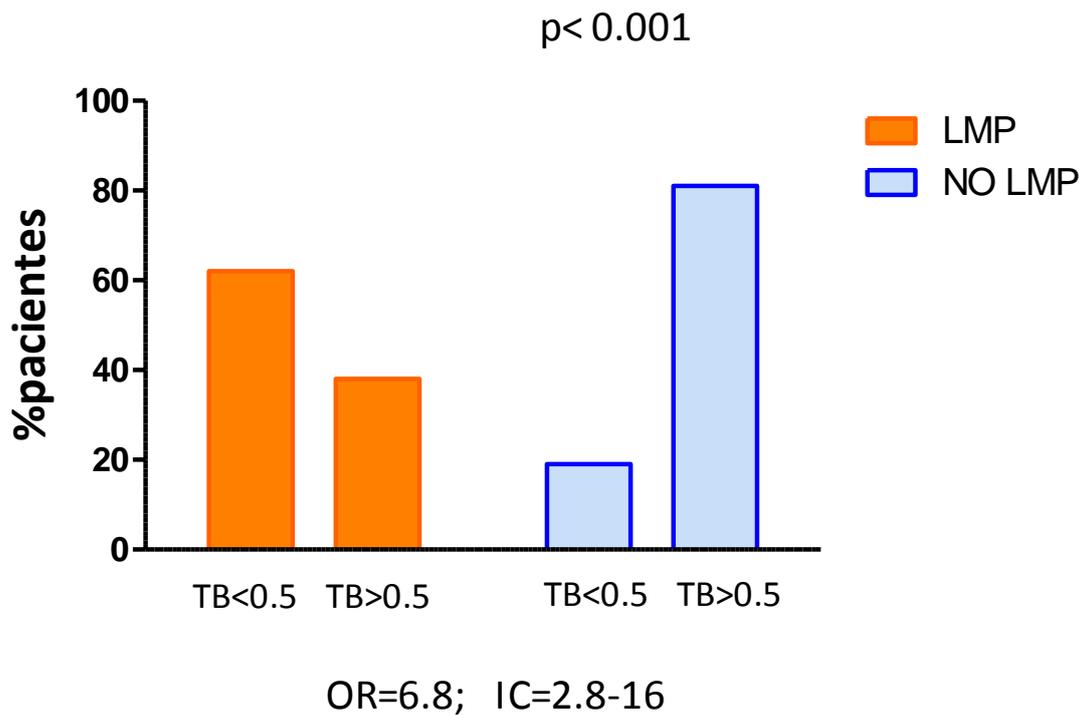


Figura 17 Representación gráfica de las diferencias estadísticamente significativas en la tasa de brote menor a 0.5 inicio del tratamiento con NTZ en los pacientes de la cohorte de pacientes con estudio de BOCM. LMP: Leucoencefalopatía multifocal progresiva; OR: Odds Ratio; IC: intervalo de confianza; TB: Tasa de brote

El 91% de los pacientes que desarrollaron LMP presentaron positividad de los Ac anti-JC antes del inicio del tratamiento con NTZ, mientras que este porcentaje bajaba al 65% en los pacientes que no desarrollaron LMP. (Figura 18).

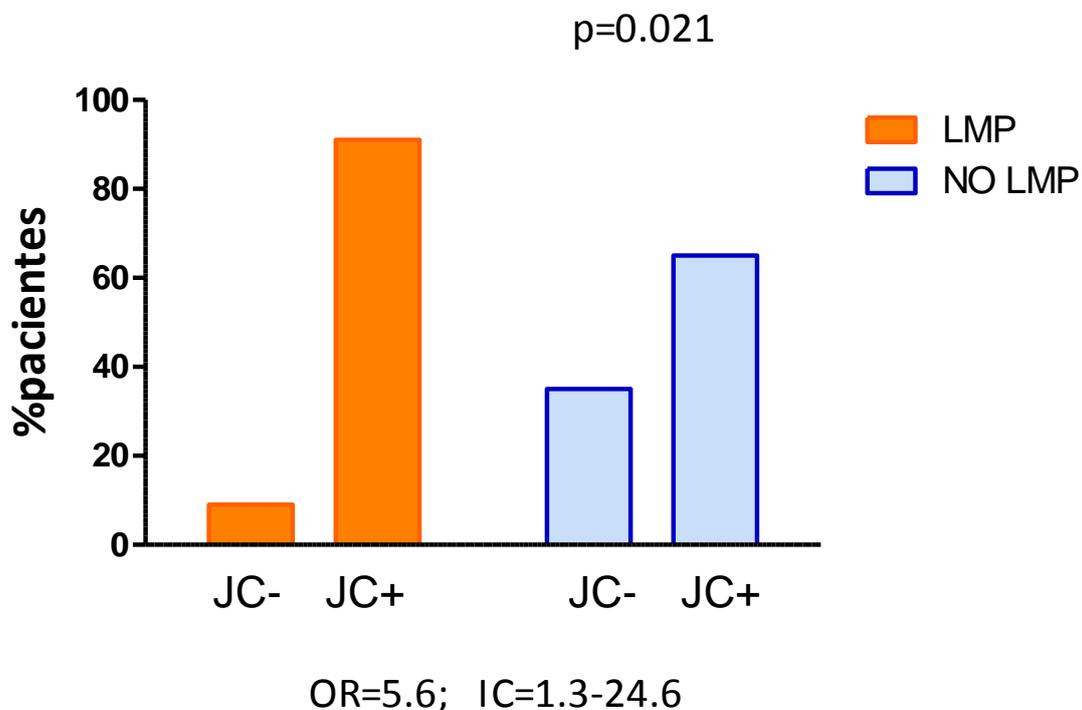


Figura 18 Representación gráfica de las diferencias estadísticamente significativas en la positividad de Ac anti JC al inicio del tratamiento con NTZ en los pacientes de la cohorte de pacientes con estudio de BOCM. LMP: Leucoencefalopatía multifocal progresiva; JC: Anticuerpos anti-JC; -: negativo; +: positivos; OR: Odds Ratio; IC: intervalo de confianza

En nuestro estudio la tasa de seroconversión fue del 4.1% si consideramos el positivar los anticuerpos, pero sólo la mitad de ellos presentaron un índice superior a 0.9.

El 93% de pacientes que desarrolló LMP presentó un título de los Ac anti-JC superior a 0.9 antes del inicio del tratamiento con NTZ, mientras que sólo el 41% de los pacientes que no desarrollaron LMP presentó este título de Ac anti-JC. (Figura 19).

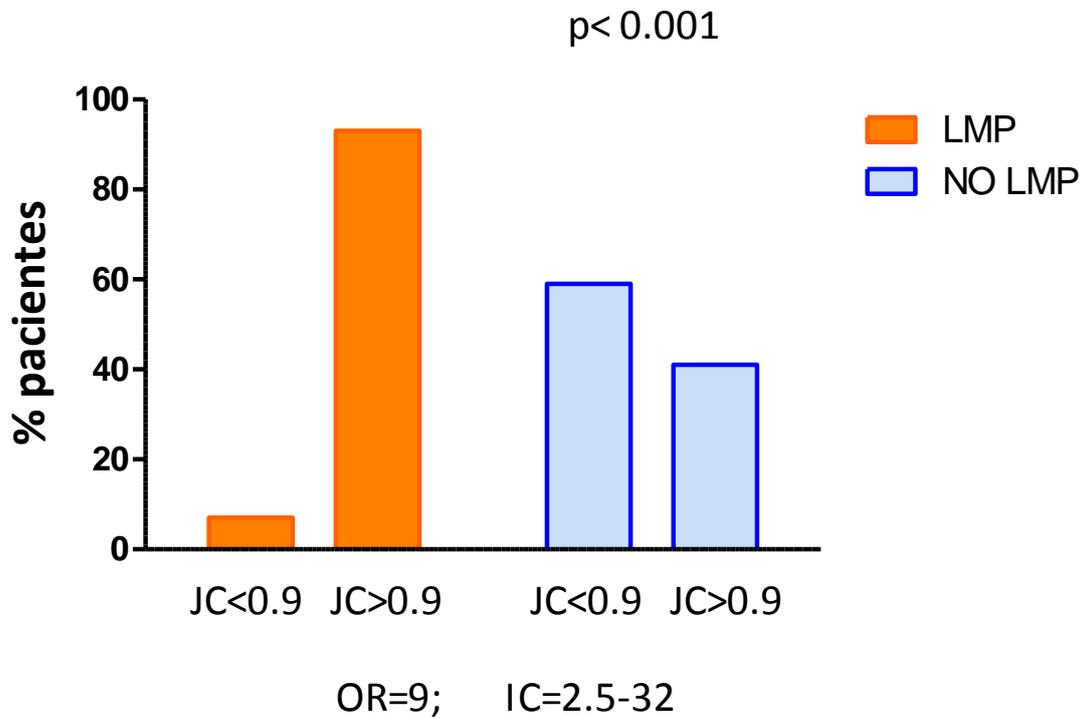


Figura 19 Representación gráfica de las diferencias estadísticamente significativas en el título de Ac anti-JC mayores a 0.9 al inicio del tratamiento con NTZ en los pacientes de la cohorte de pacientes con estudio de BOCM. LMP: Leucoencefalopatía multifocal progresiva; JC: Anticuerpos anti-JC; OR: Odds Ratio; IC: intervalo de confianza

El 71% de pacientes que desarrolló LMP presentó un título de los Ac anti-JC superior a 1.5 antes del inicio del tratamiento con NTZ, mientras que sólo el 35% de los pacientes que no desarrollaron LMP presentó este título de Ac anti-JC. (Figura 20).

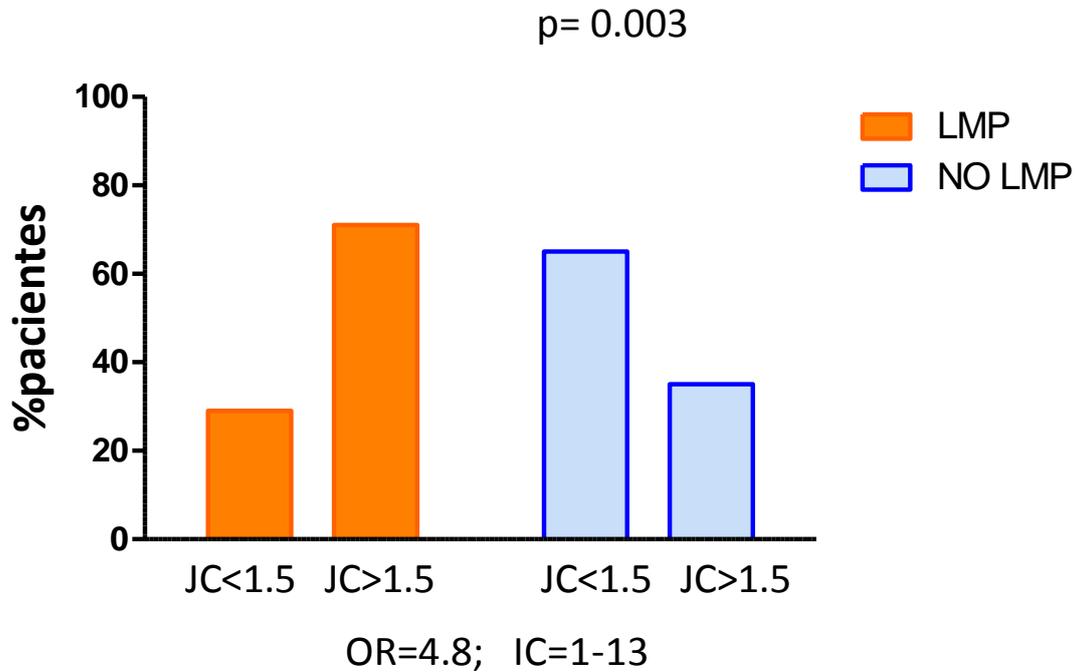


Figura 20 Representación gráfica de las diferencias estadísticamente significativas en el título de Ac anti-JC mayores a 1.5 al inicio del tratamiento con NTZ en los pacientes de la cohorte de pacientes con estudio de BOCM. LMP: Leucoencefalopatía multifocal progresiva; Ac: Anticuerpos; JC: Anticuerpos anti-JC; OR: Odds Ratio; IC: intervalo de confianza

El 61% de los pacientes que desarrollaron LMP, presentaron un tiempo de evolución de la EM antes del inicio del tratamiento con NTZ superior a los 10 años, mientras que sólo superaban este tiempo de evolución de la enfermedad el 23% de los pacientes que no desarrollaron LMP. (Figura 21).

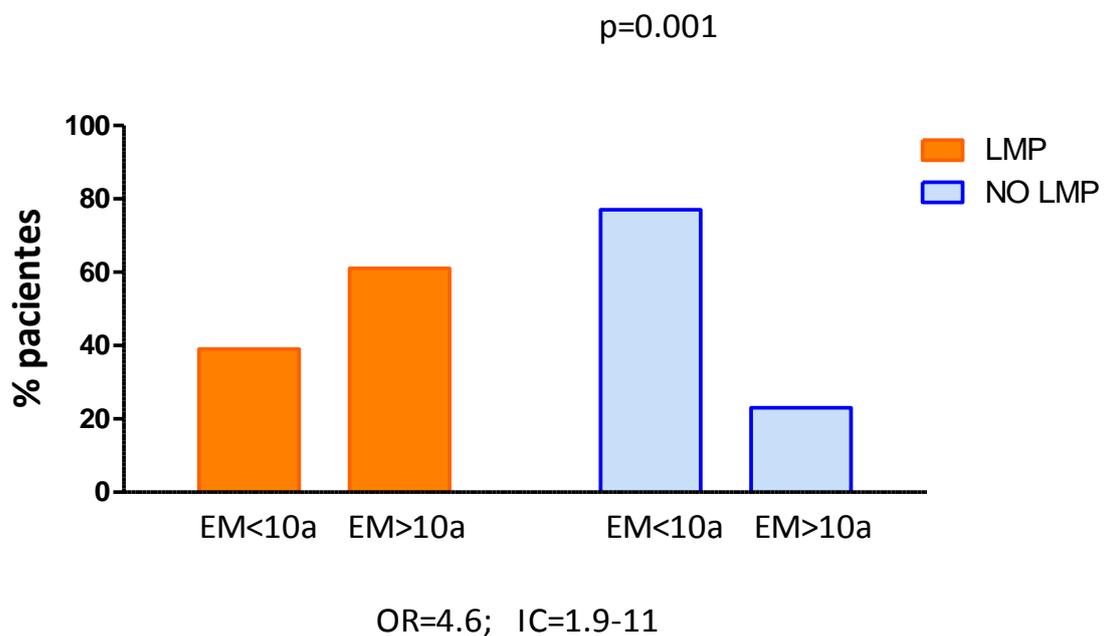


Figura 21 Representación gráfica de las diferencias estadísticamente significativas en el tiempo de evolución de la EM superior a 10 años al inicio del tratamiento con NTZ en los pacientes de la cohorte de pacientes con estudio de BOCM. LMP: Leucoencefalopatía multifocal progresiva; NTZ: Natalizumab; OR: Odds Ratio; IC: intervalo de confianza; EM: Tiempo de evolución de la esclerosis múltiple; a: años.

El 96% de los pacientes que desarrollaron LMP presentaron BOCM-LE negativas en LCR antes del inicio del tratamiento con NTZ, mientras que sólo el 36% de los pacientes que no desarrollaron LMP presentó BOCM-LE negativas (y más del 60% de los pacientes que no desarrollaron LMP presentaron BOCM-LE positivas en LCR). (Figura22).

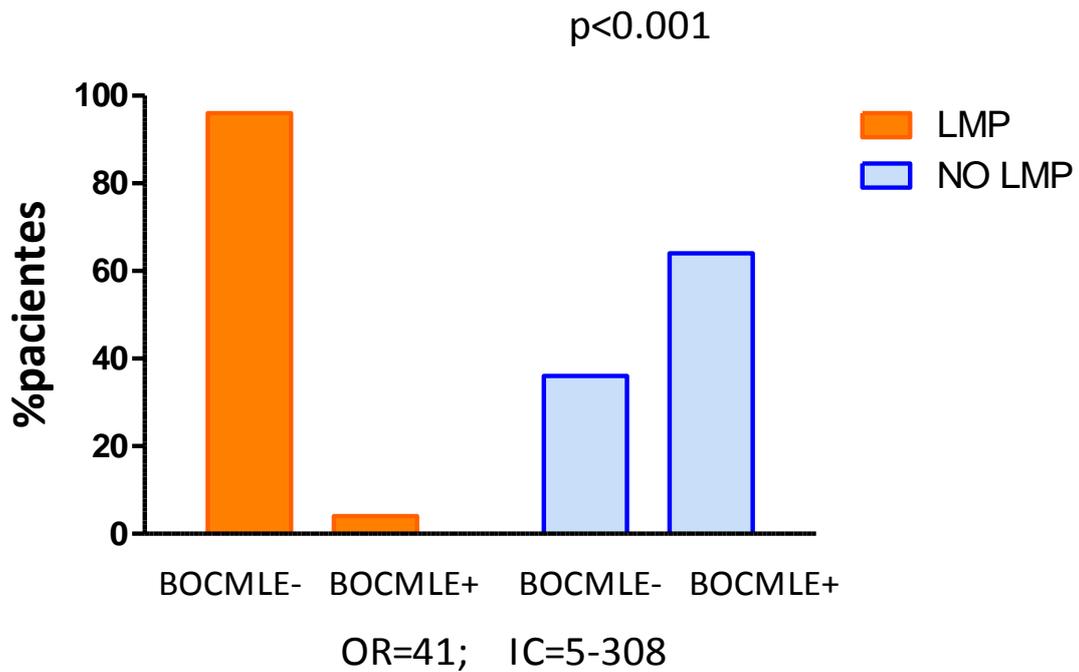


Figura 22 Representación gráfica de las diferencias estadísticamente significativas en la positividad para BOCM-LE en LCR al inicio del tratamiento con NTZ en los pacientes de la cohorte de pacientes con estudio de BOCM. LMP: Leucoencefalopatía multifocal progresiva; BOCM-LE: bandas oligoclonales IgM lípido-específicas; OR: Odds Ratio; IC: intervalo de confianza: +: positivas; -: negativas.

Las variables que se asocian al desarrollo de LMP durante el tratamiento con NTZ son las mismas que en la cohorte total de pacientes con la excepción del sexo masculino (posiblemente por la n más baja) y la inclusión de las BOCM, que fue la variable que se relacionó más estrechamente con el riesgo de LMP. En la tabla 22 se muestra el resumen de las variables relevantes de mayor a menor significación estadística.

Tabla 22 Resumen de las variables relevantes en el desarrollo de LMP en el análisis univariante de la cohorte de pacientes con estudio de BOCM

Variables relevantes en el desarrollo de LMP en cohorte con estudio de BOCM			
	Odds Ratio	IC	p
BOCM-LE negativas	40.94	5.4-308	<0.001
Niveles Ac Anti JC ≥ 0.9	9.08	2.5-32.5	0.001
Niveles Ac Anti JC ≥ 1.5	4.78	1.7-13.3	0.0094
Ac anti JC positivos	5.64	1.3-24.6	0.0096
Tasa de brote antes del inicio de NTZ <0.5	6.77	2.8-16	<0.001
Edad de inicio NTZ ≥ 45 años	7.36	3.1-17.7	<0.001
Duración de la EM al inicio de NTZ ≥ 10 años	4.60	1.9-11	0.003

Ac: Anticuerpos; MSSS: escala de discapacidad; LMP: Leucoencefalopatía multifocal progresiva;

BOCG: bandas oligoclonales IgG, BOCM-LE: bandas oligoclonales IgM lípido-específicas

5.5.3. Análisis multivariante en la cohorte total

Actualmente los modelos multivariantes de regresión son una de las partes más importantes en la investigación clínica para la creación de puntuaciones fiables con fines pronósticos. Considerando una capacidad pronóstica del test buena con un ABC 0.75-0.89 y una capacidad pronóstica del test muy buena con un ABC 0.90-0.97 (227).

Basándonos en los resultados del análisis univariante, desarrollamos tres análisis multivariantes diferentes según la clasificación de los anticuerpos anti-JC.

Primeramente, incluimos todas las variables estadísticamente significativas y los anticuerpos anti-JC clasificados según los resultados positivos o negativos. En el modelo mínimo, detectamos que las variables que influyen positivamente en el desarrollo de LMP fueron las que se muestran en la Tabla 23. Con este modelo mínimo, el ABC ROC resultó de 0.78 (Figura 23).

Tabla 23 Modelo mínimo cuando se consideran los Ac anti-JC como positivos/negativos

Modelo mínimo cuando se consideran los Ac anti-JC como positivos/negativos			
	Odds Ratio	Intervalo de confianza 95%	p
Ac anti-JC (positivos)	6.04	1.43-25.53	0.014
Tasa de brote al inicio de NTZ<0.5	4.25	2.08-8.69	<0.001
Edad al inicio de NTZ ≥45 años	2.33	1.13-4.80	0.022
Área bajo la curva ROC: 0.78			

Ac: Anticuerpos; NTZ: Natalizumab

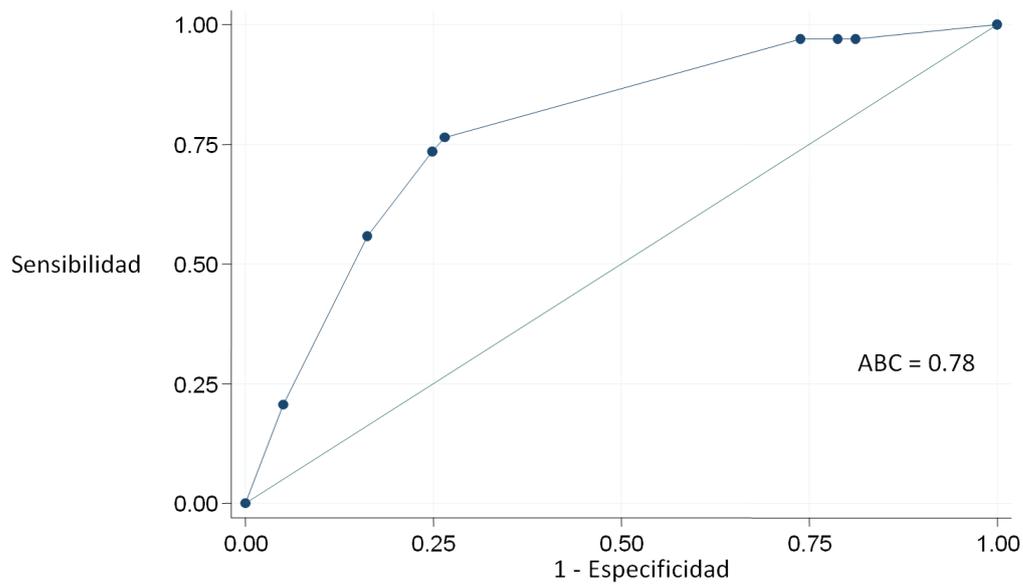


Figura 23 Curva ROC del modelo mínimo cuando se consideran los Ac anti-JC como positivos/negativos. ABC: Área bajo la curva ROC.

En el segundo análisis multivariante incluimos el título de anti-JC con el punto de corte 0.9. En el modelo mínimo, detectamos que las variables que influyen positivamente en el desarrollo de LMP fueron las que se muestran en la Tabla 24. Con este modelo mínimo, el ABC ROC resultó de 0.85 (Figura 24).

Tabla 24 Modelo mínimo cuando se consideran el título de Ac anti-JC con punto de corte 0.9

Modelo mínimo cuando se considera el título de Ac anti-JC con un punto de corte 0.9			
	Odds Ratio	Intervalo de confianza 95%	p
Ac Anti JC con título ≥ 0.9	18.72	5.56-63.02	<0.001
Tasa de brote antes del inicio de NTZ < 0.5	4.66	2.10-10.35	<0.001
Área bajo la curva ROC: 0.85			

Ac: Anticuerpos; NTZ: Natalizumab

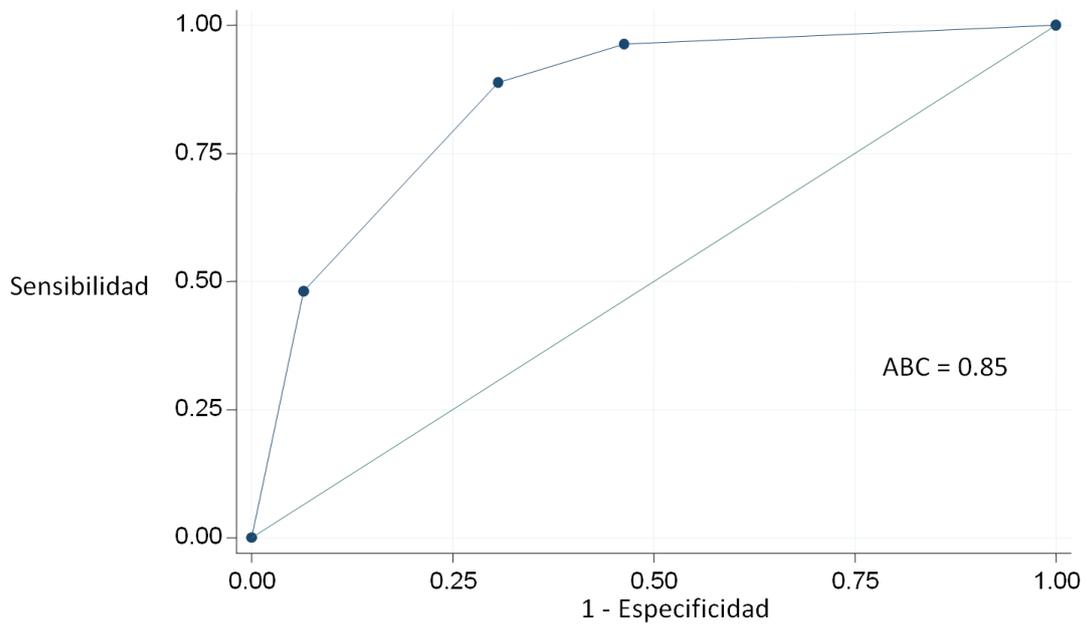


Figura 24 Curva ROC del modelo mínimo cuando se consideran el título de Ac anti-JC con punto de corte 0.9. ABC: Área bajo la curva ROC.

Por último, realizamos el análisis multivariante incluyendo el título Ac anti-JC con el punto de corte de 1.5. En el modelo mínimo, detectamos que las variables que influyen positivamente en el desarrollo de LMP fueron las que se muestran en la Tabla 25. Con este modelo mínimo, el ABC ROC resultó de 0.84 (Figura 25).

Tabla 25 Modelo mínimo cuando se consideran el título de Ac anti-JC con punto de corte 1.5

Modelo mínimo cuando se considera el título de Ac anti-JC con un punto de corte 1.5			
	Odds Ratio	Intervalo de confianza 95%	p
Ac anti-JC con título \geq 1.5	7.85	3.25-19.00	<0.001
Tasa de brote al inicio de NTZ $<$ 0.5	3.73	1.67-8.34	0.001
Edad al inicio de NTZ \geq 45 años	2.31	1.01-5.28	0.048
Área bajo la curva ROC: 0.84			

Ac: Anticuerpos; NTZ: Natalizumab

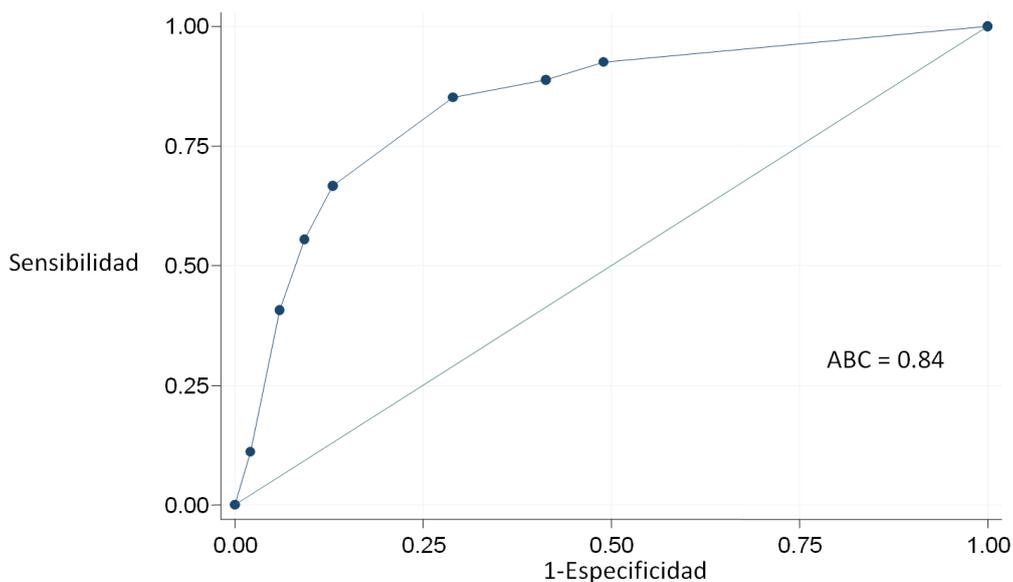


Figura 25 Curva ROC del modelo mínimo cuando se consideran el título de Ac anti-JC con punto de corte 1.5. ABC: Área bajo la curva ROC.

5.5.3.1. Nomograma cohorte total

Con el segundo análisis multivariante que contemplaba el título de Ac anti-JC con un punto de corte 0.9 (tabla 24) realizamos un nomograma para determinar el peso de cada una de las variables en el riesgo de desarrollar LMP (Figura 26).

En este nomograma ajustamos el riesgo de LMP mediante un factor de corrección que obtuvimos de calcular la ratio entre el número de casos de LMP por cada 1000 pacientes reportados tras la comercialización del NTZ (4.16‰) y en nuestra cohorte total de pacientes (28‰).

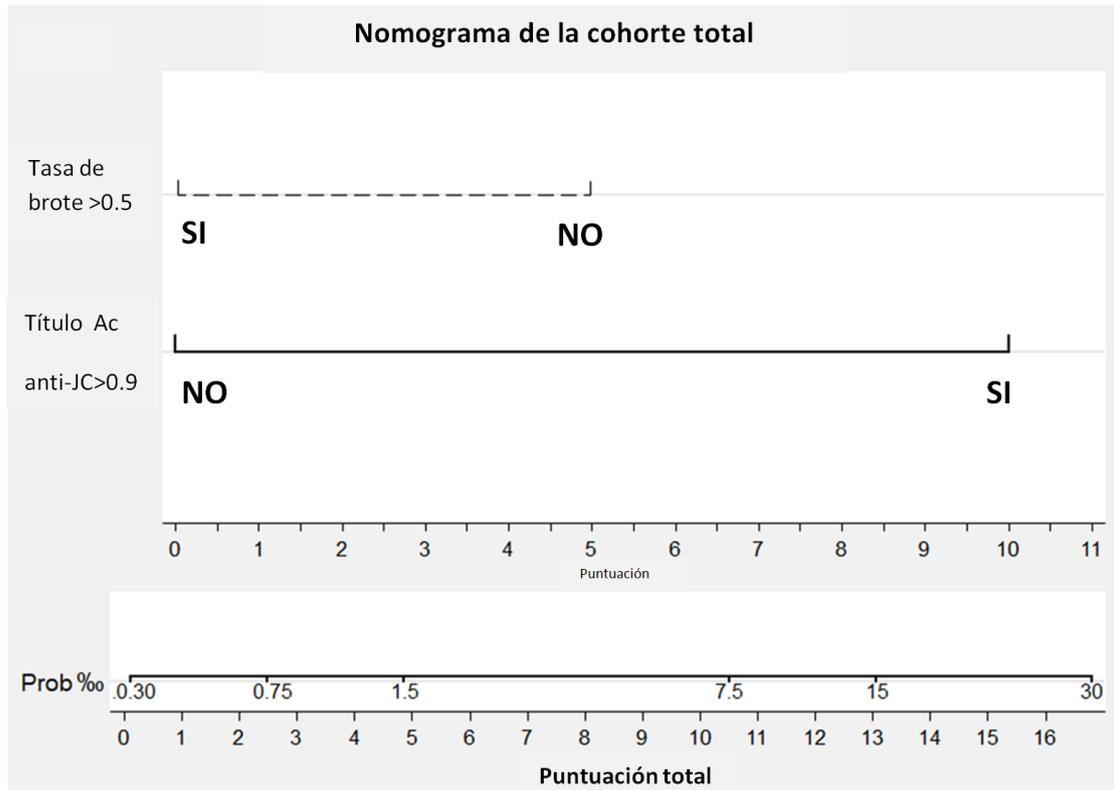


Figura 26 Nomograma realizado con la cohorte total considerando el título de Ac anti-JC para discriminar las diferencias. Permite determinar la probabilidad teórica de desarrollar LMP mediante la puntuación total obtenida según el título de Ac anti-JC y la tasa de brote. Ac: Anticuerpos

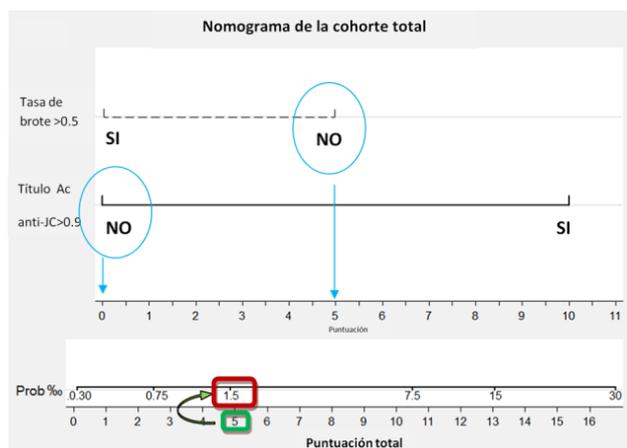
El modelo asignó una puntuación de 5 a la tasa de brotes menor de 0.5 y de 10 a un índice de anticuerpos anti JC superior a 0.9. Cuando ambos factores se dan en un paciente, el riesgo de LMP se obtiene al cotejar la puntuación obtenida en la escala de riesgo. Los pacientes con un título de Ac anti-JC menor de 0.9 previo al tratamiento con NTZ y una tasa de brotes superior a 0.5, presentaban un riesgo de desarrollar LMP menor del 0.3%. Si la tasa de brotes previa al inicio del tratamiento con NTZ era menor de 0.5 previo, el riesgo de desarrollar LMP se incrementaba hasta el 1.5%.

Además, si el título de Ac anti-JC era superior a 0.9, el riesgo de desarrollar LMP de manera secundaria al tratamiento con NTZ aumentaba hasta el 2%. Todos estos porcentajes de riesgo resultaron independientes del tiempo de tratamiento con NTZ o de si los pacientes habían recibido tratamientos inmunosupresores previamente al tratamiento con NTZ.

5.5.3.2. Ejemplo del uso del nomograma con un caso clínico real

A continuación, describiremos un ejemplo del uso del nomograma con un supuesto clínico: paciente varón de 32 años, que fue diagnosticado de EM con 27 años, con un EDSS de 1.5 y un índice de Ac anti-JC de 0.7. Ha tenido un brote en el último año, dos en total desde el inicio de la enfermedad (tasa de brotes=0.4). Para valorar el riesgo estimado de LMP antes del inicio de tratamiento con NTZ, interpolamos los datos en el nomograma de la siguiente manera:

- Tasa de brotes > 0.5: NO → puntuación 5
- Título Ac anti-JC > 0.9: NO → puntuación 0
- Puntuación total (5+0): 5



Si cotejamos la puntuación total (5) en la barra de probabilidad, obtendremos una probabilidad de LMP de 1.5‰ para este paciente.

5.5.4. Análisis multivariante de la cohorte con estudio de BOCM

Basándonos en los resultados del análisis univariante de la cohorte de pacientes que tuvieran realizado el estudio de BOCM, desarrollamos tres análisis multivariantes diferentes según la clasificación de los anticuerpos anti-JC.

Primeramente, incluimos las todas las variables estadísticamente significativas y los anticuerpos anti-JC clasificados según los resultados positivos o negativos.

En el modelo mínimo, detectamos que las variables que influyen positivamente en el desarrollo de LMP fueron las que se muestran en la Tabla 26. Con este modelo mínimo, el ABC ROC resultó de 0.90 (Figura 27).

Tabla 26 Modelo mínimo cuando se consideran los Ac anti-JC como positivos/negativos

Modelo mínimo cuando se consideran los Ac anti-JC como positivos/negativos			
	Odds Ratio	Intervalo de confianza 95%	p
BOCM-LE negativas	30.44	3.94-234.91	<0.001
Edad al inicio de NTZ ≥ 45 años	4.80	1.76-13.14	0.002
Tasa de brote al inicio de NTZ < 0.5	3.21	1.19-8.66	0.022
Área bajo la curva ROC: 0.90			

NTZ: Natalizumab, BOCM-LE: bandas oligoclonales IgM lípido-específicas

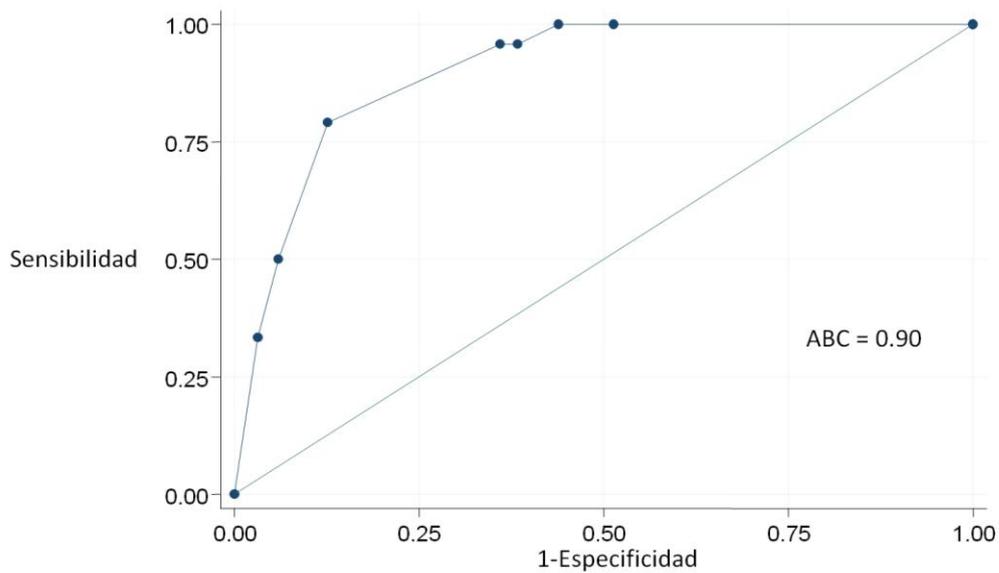


Figura 27 Curva ROC del modelo mínimo cuando se consideran los Ac anti-JC como positivos/negativos. ABC: Área bajo la curva ROC.

En el segundo análisis multivariante incluimos el título de anti-JC con el punto de corte 0.9. En el modelo mínimo, detectamos que las variables que influyen positivamente en el desarrollo de LMP fueron las que se muestran en la Tabla 27. Con este modelo mínimo, el ABC ROC resultó de 0.92 (Figura 28).

Tabla 27 Modelo mínimo cuando se consideran el título de Ac anti-JC con punto de corte 0.9

Modelo mínimo cuando se considera el título de Ac anti-JC con un punto de corte 0.9			
	Odds Ratio	Intervalo de confianza 95%	p
BOCM-LE negativas	26.83	3.33-216.29	0.002
Edad al inicio de NTZ ≥ 45 años	6.74	2.00-22.73	0.002
Título de Ac anti-JC ≥ 0.9	6.52	1.64-25.85	0.008
Área bajo la curva ROC: 0.92			

NTZ: Natalizumab, BOCM-LE: bandas oligoclonales IgM lípido-específicas; Ac: Anticuerpos

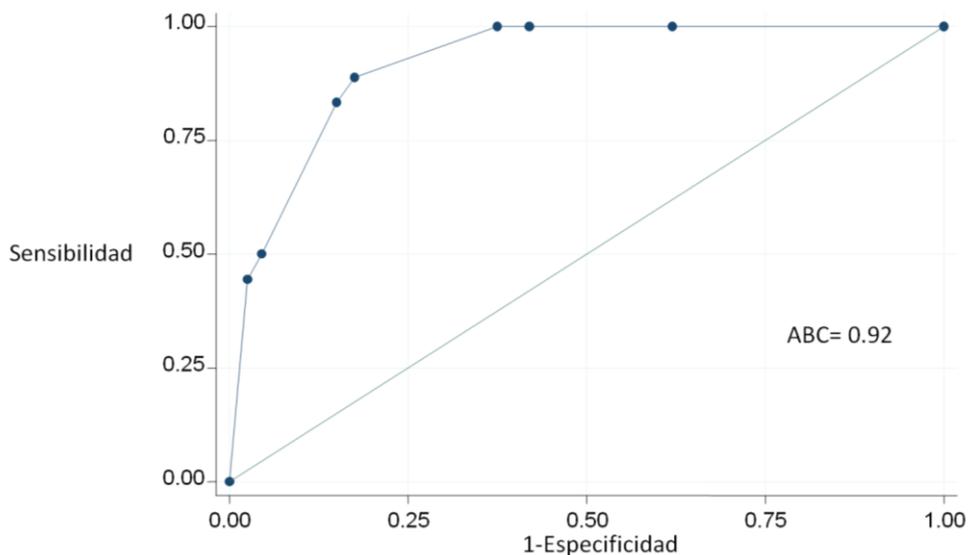


Figura 28 Curva ROC del modelo mínimo cuando se consideran el título de Ac anti-JC con punto de corte 0.9. ABC: Área bajo la curva ROC.

Por último, realizamos el análisis multivariante incluyendo el título Ac anti-JC con el punto de corte 1.5. En el modelo mínimo, detectamos que las variables que influyen positivamente en el desarrollo de LMP fueron las que se muestran en la Tabla 28. Con este modelo mínimo, el ABC ROC resultó de 0.92 (Figura 29).

Tabla 28 Modelo mínimo cuando se consideran el título de Ac anti-JC con punto de corte 1.5

Modelo mínimo cuando se considera el título de Ac anti-JC con un punto de corte 1.5			
	Odds Ratio	Intervalo de confianza 95%	p
BOCM-LE negativas	31.18	3.81-255.16	0.001
Edad al inicio de NTZ \geq 45 años	8.85	2.64-29.60	<0.001
Título de Ac anti-JC \geq 1.5	4.38	1.33-14.43	0.015
Área bajo la curva ROC: 0.92			

NTZ: Natalizumab, BOCM-LE: bandas oligoclonales IgM lípido-específicas; Ac: Anticuerpos

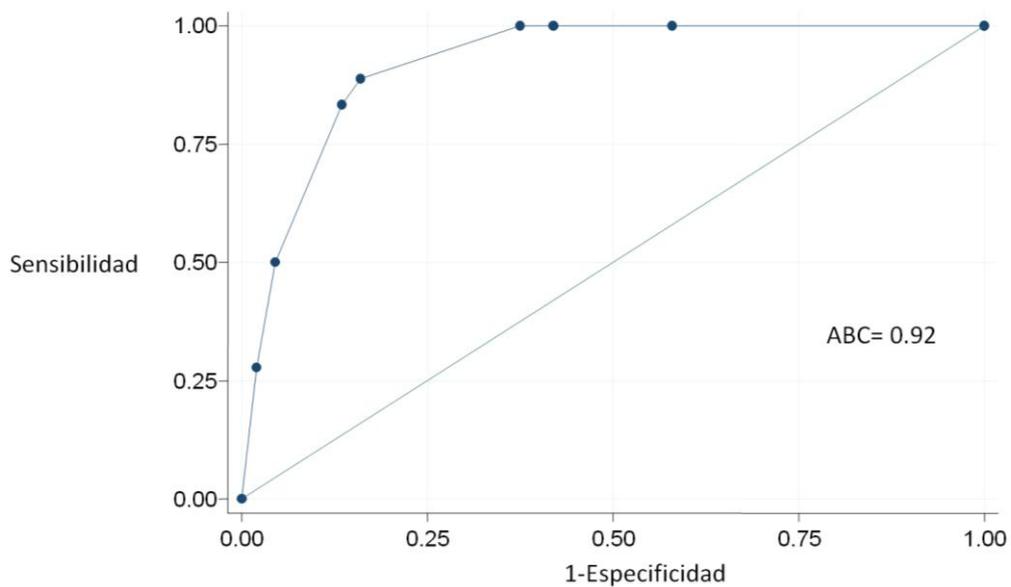


Figura 29 Curva ROC del modelo mínimo cuando se consideran el título de Ac anti-JC con punto de corte 1.5. ABC: Área bajo la curva ROC.

5.5.4.1. Nomograma cohorte con estudio de BOCM

Con el segundo análisis multivariante que contemplaba el título de Ac anti-JC con un punto de corte 0.9 (tabla 27) realizamos un nomograma que nos permitiera determinar el peso de cada una de las variables al riesgo de desarrollar LMP de manera secundaria al tratamiento con NTZ en la cohorte de pacientes con estudio de BOCM (Figura 30).

En este nomograma ajustamos el riesgo de desarrollar LMP mediante un factor de corrección que obtuvimos de calcular la ratio entre el número de casos de LMP por cada 1000 pacientes reportados tras la comercialización del NTZ (4.16‰) y en nuestra cohorte de pacientes con estudio de BOCM (87‰).

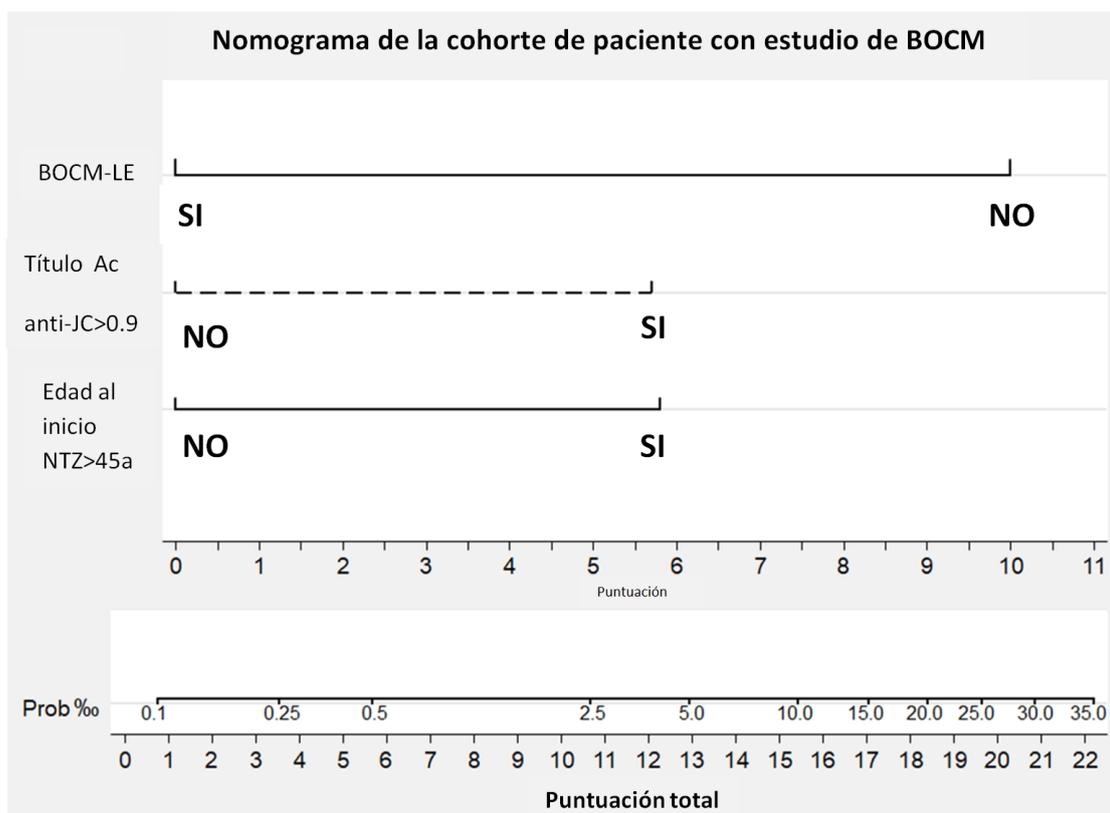


Figura 30 Nomograma realizado con la cohorte de pacientes con estudio de BOCM considerando el título de Ac anti-JC para discriminar las diferencias. Permite determinar la probabilidad teórica de desarrollar LMP mediante la puntuación total obtenida según el título de Ac anti-JC, la positividad de BOCM-LE y la edad al inicio del tratamiento con NTZ

El modelo asignó una puntuación de 10 a los pacientes con BOCM-LE negativas, puntuación de 6 a un índice de anticuerpos anti-JC superior a 0.9 y puntuación de 6 si la edad de inicio al tratamiento era superior a 45 años. Cuando los tres factores se dan en un paciente el riesgo de LMP se obtiene al cotejar la puntuación obtenida en la escala de riesgo. Los pacientes con un título de Ac anti-JC menor de 0.9 previo al tratamiento con NTZ, BOCM-LE positivas en LCR y una edad de inicio al tratamiento inferior a 45 años, presentaban un riesgo de desarrollar LMP menor del 0.1%. Mientras que si el título de Ac anti-JC era superior a 0.9 o eran mayores de 45 años al inicio del tratamiento con NTZ, el riesgo de desarrollar LMP de manera secundaria al tratamiento aumentaba hasta el 0.5%. Si se cumplían ambas condiciones (título de Ac superior a 0.9 y edad mayor a 45 años), el riesgo de desarrollar LMP de aumentaba hasta el 3.5%.

Además, si las BOCM-LE eran negativas en LCR, el riesgo de desarrollar LMP de manera secundaria al tratamiento por NTZ aumentaba hasta el 3%. Todos estos porcentajes de riesgo resultaron independientes del tiempo de tratamiento con NTZ o de si los pacientes habían recibido tratamientos inmunosupresores previamente al tratamiento con NTZ. El uso de este nomograma es análogo al ejemplo descrito en la cohorte total.

En la figura 31 se representa gráficamente La estratificación del riesgo de desarrollar LMP de acuerdo con las variables encontradas en el estudio multivariante de las dos cohortes analizadas en este trabajo.

En resumen, este trabajo muestra que la edad, la tasa de brote, el índice de anticuerpos anti-JC y las BOCM-LE contribuyen a estratificar el riesgo de LMP en pacientes que van a iniciar tratamiento con Natalizumab.

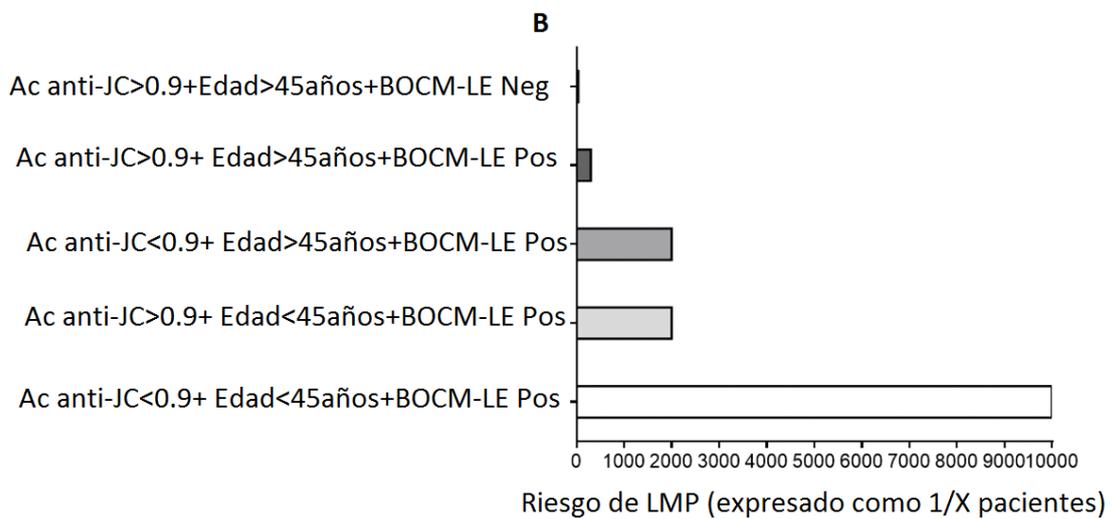
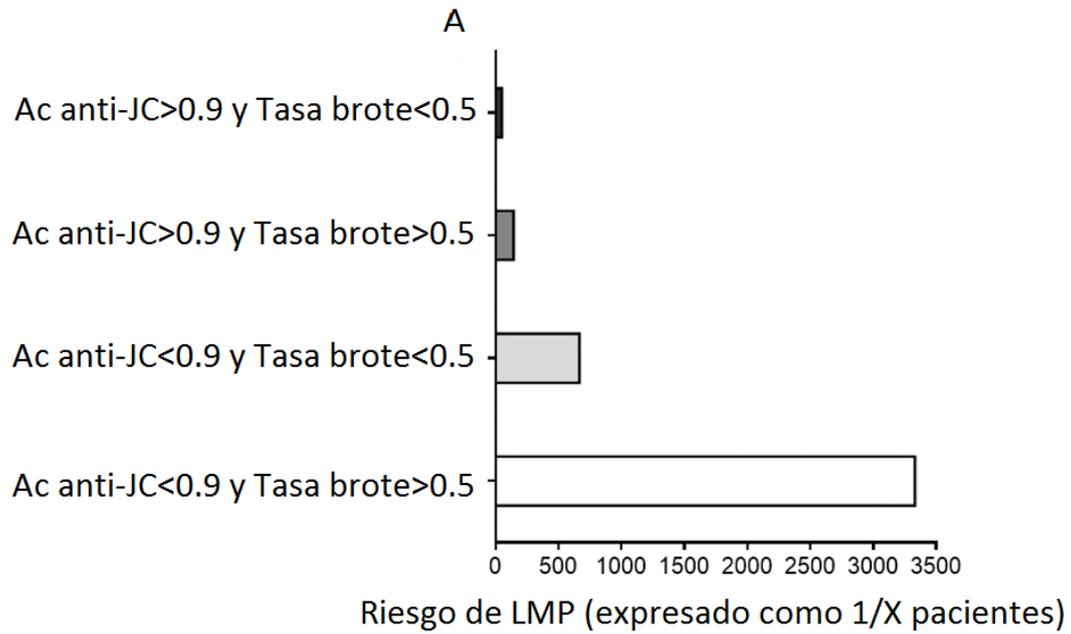


Figura 31 Representación gráfica del riesgo de desarrollar LMP en la cohorte total de pacientes (A) y en la cohorte de pacientes con estudio de BOCM (B).

VI. DISCUSIÓN

El Natalizumab fue el primer fármaco de alta actividad aprobado para el tratamiento de la EM. Se aprobó por la FDA en 2004 y ya en los ensayos clínicos mostró una alta eficacia en la inhibición de la tasa de brotes y en el retraso del progreso de la discapacidad (18) (157) (158) (159). Estos datos han sido aún mejores en estudios de vida real y distintos trabajos han demostrado una mayor eficacia de Natalizumab en comparación, no sólo con los fármacos inyectables, sino con otras moléculas de alta actividad comercializadas posteriormente (162).

El cambio a Natalizumab tras un fracaso de tratamientos de primera línea para la EMRR, ha mostrado ser altamente efectivo (163). Actualmente, sólo hay comercializado un tratamiento con una eficacia comparable a Natalizumab, el Alemtuzumab, que presenta como contrapartida la aparición de otras enfermedades autoinmunes, algunas de las cuales son potencialmente graves (153).

A pesar de su alta eficacia, el uso de NTZ como tratamiento de pacientes con EMRR, se ha limitado debido a su principal efecto secundario, la aparición de leucoencefalopatía multifocal progresiva (LMP), una infección oportunista del SNC causada por el virus JC con una incidencia de 4.22 por cada 1000 pacientes tratados con NTZ (165), es decir, aproximadamente 1 paciente por cada 250 tratados con NTZ (147).

Los factores que desencadenan el desarrollo de LMP en pacientes tratados con NTZ aún son parcialmente desconocidos, ya que la mayoría de los pacientes seropositivos para el virus JC y que son tratados con este fármaco no llega a desarrollar la LMP. Se han realizado múltiples estudios para estratificar el riesgo de LMP en pacientes tratados con Natalizumab. El factor de riesgo más importante es la presencia de anticuerpos anti-JC en sangre. Otros factores que también juegan un papel importante

para estratificar el riesgo de LMP son el tratamiento previo con agentes inmunosupresores y la duración del tratamiento con Natalizumab (228,208,209,184). (197)

Hasta el momento, este modelo ha ofrecido información importante para el manejo del tratamiento con Natalizumab en la EM. Así, el número de pacientes con inmunosupresores clásicos se ha disminuido en esta enfermedad (197) y eso minimiza la inmunosupresión previa como factor de riesgo. Sin embargo, los otros dos factores que juegan un papel relevante en este proceso presentan algunos inconvenientes importantes. A saber, entre el 60 y el 80% de la población presenta anticuerpos anti-JC (215) (229). El uso de este criterio limitaría el uso del Natalizumab a la mayoría de pacientes con EM. Además, un porcentaje variable de pacientes seroconvierte a lo largo de los años (212), lo que hace que la presencia o ausencia de anticuerpos anti-JC deba testarse periódicamente en los pacientes y a veces la aparición de la LMP precede a la constatación de la presencia de anticuerpos anti JC.

El siguiente factor usado para la estratificación de riesgo de LMP es la duración del tratamiento con Natalizumab. El riesgo aumenta claramente en pacientes con Ac anti-JC positivos tratados más de dos años (184). Esta premisa, junto con la anterior, hacen que Natalizumab sea considerado como un tratamiento temporal y que muchos pacientes altamente inflamatorios sufran rebrotes de la actividad de la enfermedad tras la retirada del fármaco, lo que replantea su uso a muchos neurólogos, especialmente en el caso de pacientes con Ac anti-JC positivos. Por ello, distintos estudios han profundizado en la búsqueda de nuevos biomarcadores que indiquen de forma más específica el riesgo de LMP (72) (18) (196).

Los estudios se han centrado principalmente en el virus, los anticuerpos frente al mismo y distintas variables inmunológicas.

Respecto al virus, se han estudiado las mutaciones en el VP1 (proteína mayoritaria de la cápside) que se asocian con la variante más neurotrópica del VJC. Se ha observado que dichas mutaciones se correlacionan con la gravedad de la LMP, pero no hemos encontrado ningún estudio que asocie dichas mutaciones con un mayor riesgo de contraer la enfermedad (230).

El estudio de anticuerpos anti-JC ha evolucionado con el tiempo y distintas publicaciones avalan que títulos inferiores a 0.9 no implican un mayor riesgo de LMP en pacientes con Ac anti-JC, lo que amplía el espectro de pacientes que podrían ser tratados de forma segura con el fármaco (210). Sin embargo, las fluctuaciones que presentan los títulos en algunos pacientes limitan en parte la utilidad de su estudio.

La capacidad migratoria de los linfocitos CD4 también se ha considerado como un factor determinante en la estratificación del riesgo a desarrollar LMP, ya que son un reflejo del estatus de inmunovigilancia del SNC. Así, se postuló que un descenso de linfocitos CD4+ que expresaban la L-selectina (CD62-L), una molécula de adhesión celular se asociaba a un mayor riesgo de desarrollar LMP (231). Sin embargo, estos hallazgos no han sido finalmente validados, ya que se trata de un método poco reproducible al actuar la L-selectina como molécula indicadora de estrés celular (232).

Los neurofilamentos son elementos estructurales que se liberan al espacio extracelular cuando se produce un daño axonal, similar al que se produce en la LMP (233). En estudios recientes, se ha descrito que la cadena ligera de los neurofilamentos aumenta

en suero en el debut de la LMP. Este aumento es de 10 veces lo observado en pacientes tratados con NTZ en brote que no desarrollaron LMP, por lo que, de validarse estos datos, los neurofilamentos podrían ser un buen biomarcador precoz de LMP (234). Sin embargo, este biomarcador no nos permitiría anticiparnos al desarrollo de la LMP, es decir, a poder realizar la selección de pacientes que son tratados con NTZ asumiendo el menor riesgo de LMP posible.

Por último, se ha descrito que una enfermedad muy activa, valorada mediante la presencia de BOC de IgM líquido específicas (78), también disminuye el riesgo de LMP (220). Igualmente ocurre con el N° de linfocitos en LCR, ya que ambos parámetros permiten estimar el curso inflamatorio de la EM. Sin embargo, el uso de estos dos últimos parámetros está limitado en la práctica clínica diaria, ya que son técnicas de difícil realización.

Otro problema de muchos de los modelos usados para predecir el riesgo de desarrollar LMP, es que se han realizado estudiando datos de cohortes descritas en la literatura. Esto puede derivar en una recopilación incompleta de los datos. Sin embargo, para la realización de este trabajo utilizamos datos recogidos prospectivamente en nuestra propia cohorte multicéntrica de pacientes.

En este estudio nos centramos en la búsqueda de nuevos factores pronósticos para estratificar el riesgo de desarrollar LMP, en pacientes de EM candidatos al tratamiento con Natalizumab. De esta forma, se podría decidir la mejor opción terapéutica antes de aplicar dicho tratamiento con el mejor perfil riesgo/beneficio para el paciente.

Además, quisimos validar el papel de las bandas oligoclonales IgM lípido-específicas, como posible factor protector frente a la aparición de LMP en pacientes con EM tratados con Natalizumab y ajustar el mismo por otras variables clínicas y de laboratorio.

En el diseño de este estudio prospectivo, elegimos una serie de variables clínicas y epidemiológicas fáciles de obtener en la práctica clínica diaria. De igual modo, recopilamos aquellas variables que ya habían sido descritas en la literatura como factores que podrían tener un papel para determinar el riesgo de desarrollar LMP de manera secundaria al tratamiento con NTZ (184).

6.1. ANÁLISIS UNIVARIANTE

6.1.1. Título de Ac anti-JC

Los anticuerpos anti-JC han demostrado en distintos estudios su alta utilidad para estratificar el riesgo de LMP. Así, se ha descrito que pacientes que no presentan estos anticuerpos tienen un riesgo de LMP menor de 1.4/10000 durante más de 5 años (184,209). Esto se ha matizado con el estudio de la tasa de anticuerpos anti-JC. Así, se ha observado que pacientes con Ac anti-JC positivos que presentan bajos índices de anticuerpos tienen también un riesgo de LMP muy bajo. Se ha propuesto el valor de 0.9 en el índice de anticuerpos como un punto de corte que podría considerarse como “positivo biológico” (235). En nuestro estudio, analizamos la presencia o ausencia de anticuerpos anti-JC y los valores de los índices. Usamos dos puntos de corte 0.9 y 1.5 validados en distintos trabajos previos (204) (210) (197). Nuestro trabajo muestra que

el 98% de los pacientes que desarrollaron LMP presentaban un índice de Ac anti-JC \geq 0.9 y el 78% de ellos un índice de Ac anti-JC \geq 1.5. Estos resultados coinciden con los de otros autores que determinaron que el 96% de pacientes que desarrolló LMP presentó un índice de Ac anti-JC \geq 0.9 y el 84% era \geq 1.5 (210). Confirmamos, por tanto, la utilidad de los índices de Ac anti-JC para predecir el riesgo de LMP y observamos que el punto de corte de 0.9 es el que tiene mayor peso para discriminar a los pacientes en riesgo. Esto confirma los datos previos que sugerían este valor como positivo biológico para el índice de Ac anti-JC (235).

El uso del punto de corte de 0.9 para el índice de Ac anti-JC, permitiría ampliar el número de pacientes que podrían recibir tratamiento con un bajo riesgo de LMP.

La principal limitación de este biomarcador es la seroconversión. Distintos trabajos describen que se produce en un número variable de pacientes que oscila entre el 2 y el 6% (236,235,210). En nuestro estudio la tasa de seroconversión fue del 4.1% si consideramos el positivizar los anticuerpos (aunque solo la mitad de ellos alcanzaron índices superiores a 0.9). Esto hace importante la búsqueda de otros biomarcadores que contribuyan a estratificar el riesgo.

6.1.2. Edad y duración de la enfermedad al inicio del tratamiento con NTZ

Con la edad disminuye la inmunocompetencia en individuos sanos, lo que influye en la capacidad del sistema inmune para responder a infecciones y para generar memoria inmunológica a largo plazo (237). Además, durante la inmunosenescencia, se produce una expansión de linfocitos T CD8+, CD28-, CD27-CD57+, que se consideran linfocitos

disfuncionales, ya que pueden reducir el repertorio de otros linfocitos T disponibles que puedan actuar frente a diversas infecciones virales (238).

En la esclerosis múltiple, como en otras enfermedades autoinmunes, este fenómeno podría aparecer de forma precoz. Distintos trabajos realizados en necropsias de pacientes con esta patología demuestran que la enfermedad experimenta un cambio con la edad, observándose una disminución de la respuesta inmune adaptativa según avanza la misma (239). Además, los pacientes con EM muestran la expansión prematura de células T senescentes, independientemente del tratamiento recibido con fármacos modificadores de la enfermedad, que alteran la homeostasis de la respuesta inmune (240). Estos estudios sugieren que el cambio inmunológico se produce en los pacientes entre los 40 y 50 años, si bien, el bajo número de muestras que se estudia en este tipo de trabajos no ha permitido establecer de forma clara el momento de estos cambios.

Estos datos podrían asociarse con un mayor riesgo de infecciones en pacientes inmunosuprimidos. Así, algunos trabajos describen que el riesgo de desarrollar LMP en pacientes tratados con Natalizumab aumenta con la edad y este riesgo llega a duplicarse si se inicia el tratamiento a edades superiores a 50 años (72).

Un trabajo previo de nuestro grupo confirma el posible papel de la edad en el riesgo de LMP, ya que estableció que la edad media de los pacientes tratados con NTZ que desarrollan esta infección oportunista es mayor que la de aquellos que no la desarrollan. También se ha observado en pacientes que sufrieron LMP durante el tratamiento con NTZ, que el número medio de infusiones hasta la misma disminuye al aumentar la edad de inicio de tratamiento (220). En nuestro estudio, valoramos el

peso de la edad en el desarrollo de LMP tanto como una variable continua, como estratificada en varios puntos de corte en base a este trabajo y a otros previos de otros grupos. Los mejores resultados mediante curva ROC, se obtuvieron con la variable edad con un punto de corte de 45 años.

También se ha observado una asociación entre edad e infección por VJC, ya que, aunque la primoinfección por este virus puede tener lugar durante la infancia, la seroprevalencia va aumentando con la edad (241).

Nosotros quisimos establecer el papel de la edad en el riesgo de LMP en nuestra cohorte. En el estudio univariante encontramos que este factor era uno de los que más claramente influía en el riesgo de LMP. Dado que la edad y el tiempo de evolución de la enfermedad al inicio de NTZ están claramente relacionados, valoramos nuestros resultados detectando que la duración de la enfermedad es una variable subrogada a la edad del individuo. Nuestros datos muestran, por tanto, que la edad de inicio del tratamiento con NTZ tiene un mayor peso en el riesgo de desarrollar LMP que el tiempo de duración de la enfermedad.

En resumen, el estudio univariante mostró que la edad en el momento del inicio del tratamiento con NTZ, juega un papel importante para establecer el riesgo de LMP en pacientes de EM tratados con NTZ. Así mismo, establecimos la edad de 45 años como el punto de corte idóneo para establecer el riesgo de LMP en relación con la edad. Este dato es relevante, ya que hasta el momento no se había considerado la edad de inicio al tratamiento como factor a tener en cuenta en la estratificación del riesgo de desarrollar LMP antes del inicio del tratamiento con NTZ.

Además, según nuestros resultados, la edad al inicio del tratamiento parece ser una variable de mayor peso en la estratificación del riesgo de LMP que el tiempo de evolución de la enfermedad (en base a la Odds ratio y a la significación estadística). Este hecho es bastante relevante, ya que pacientes que presentan un debut temprano de la EM con un curso agresivo podrían beneficiarse del tratamiento con NTZ durante un mayor tiempo con un menor riesgo de desarrollar LMP.

6.1.3. Duración del tratamiento con NTZ

En los primeros estudios de seguridad del NTZ se determinó que el riesgo de desarrollar LMP aumenta de manera progresiva al tiempo de tratamiento con NTZ y es a partir de los dos años de tratamiento cuando se produce el mayor aumento del riesgo de desarrollar LMP (184).

Este hecho supone un problema, porque induce a la retirada del tratamiento a pacientes cuyo grado de avance de la enfermedad se ha frenado durante la terapia con NTZ. En nuestras cohortes no se corroboran estos datos, ya que no se observó una correlación entre el riesgo de LMP y la duración del tratamiento. Esto podría deberse a una falta de potencia estadística en nuestra serie. Sin embargo, no podemos descartar que los efectos encontrados en otras series en la duración del tiempo de tratamiento sean un efecto subrogado de la edad de los pacientes. Los datos de nuestra serie podrían corroborar esta hipótesis, ya que los pacientes incluidos eran relativamente jóvenes al inicio de tratamiento. Mostraban en ese momento una edad media de 36.6 años al menos 4 años menor que las series en las que se describió el efecto del tratamiento en el riesgo de LMP que mostraban edades de inicio entre 40 y 44 años

(242) (243) (244). Por último, otra posible causa de la falta de correlación con la duración del tratamiento podría ser nuestro criterio de inclusión de pacientes en el estudio que incluía sólo a pacientes tratados durante más de un año, ya que se ha observado el riesgo de LMP es extremadamente bajo ese primer año, de manera que los primeros estudios calcularon un riesgo de desarrollar LMP durante el primer año de tratamiento con NTZ (sin inmunosupresión previa) del 0.13% (184) y los estudios posteriores un riesgo del 0.01% (209). Estos datos sugieren que podría ser el primer año el que establece un menor riesgo de LMP y no los dos primeros como muestran algunos estudios. Es necesaria la realización de estudios multicéntricos que consideren estos posibles sesgos para evaluar de forma definitiva el papel de la duración del tratamiento en el riesgo de LMP.

6.1.4. Tratamiento con inmunosupresores previo al tratamiento con NTZ

En nuestro análisis encontramos una discrepancia respecto a estudios previos que atribuyen a la inmunosupresión previa al NTZ un peso determinante en la evaluación del riesgo a desarrollar LMP (184). Sin embargo, en nuestras cohortes no encontramos la inmunosupresión previa como factor implicado en el riesgo de desarrollar LMP.

Hasta la aparición de NTZ, los pacientes con formas muy activas de EM a menudo se trataban con inmunosupresores. Por tanto, en las primeras cohortes de pacientes tratados con NTZ, un número elevado de pacientes habían recibido estos tratamientos (en Europa el 15-23% de los pacientes con EM ha recibido un tratamiento inmunosupresor previamente al tratamiento con NTZ) y se observó que la inmunosupresión previa aumentaba el riesgo de LMP (184).

Actualmente, la disponibilidad de un amplio abanico terapéutico en la EM ha bajado el número de pacientes tratados con inmunosupresores, lo que podría ir disminuyendo el peso de esta variable para establecer el riesgo de LMP. Así, en un estudio de nuestro grupo cuya cohorte fue analizada entre los años 2012 y 2014, el número de pacientes inmunosuprimidos había descendido con respecto a estudios anteriores y también lo hacía el peso de esta variable, si bien la inmunosupresión previa al NTZ era significativamente mayor en pacientes con LMP (220). En esta nueva cohorte se ha reducido aún más la tasa de pacientes con un tratamiento inmunosupresor previo (de un 18% en la cohorte de 2014 a menos del 10% en la cohorte actual) y ya no se observan diferencias significativas al analizar pacientes clasificados según la presencia o no de LMP. Estos resultados indican el valor del tratamiento temprano con NTZ, que ha reducido sustancialmente el riesgo de LMP debido al uso previo de inmunosupresores clásicos.

El hecho de que actualmente se tienda a no administrar NTZ a pacientes inmunodeprimidos o con inmunosupresión previa, debido al amplio conocimiento de la reactivación del virus JC en inmunodeprimidos (VIH y trasplantados), podría corroborar lo que observamos en nuestras cohortes.

Además, en pacientes que recibieron un tratamiento inmunosupresor previo al tratamiento con NTZ, no se observó esta asociación entre altos índices de Ac anti-JC y mayor riesgo de desarrollar LMP. El mecanismo biológico que permita explicar este efecto es desconocido, aunque se postula que el tratamiento inmunosupresor afecte a la capacidad global de producción de Ac del paciente, provocando un detrimento en la producción de Ac anti-JC.

6.1.5. Tasa de brotes

En trabajos previos, se estudió la tasa de brotes anualizada, únicamente durante el año previo al inicio del tratamiento con NTZ y en los estudios de seguridad no se destacó como variable determinante del riesgo a desarrollar LMP (184) (208) (209).

No hemos encontrado ningún estudio en que describa el papel de la tasa de brotes global durante todo el curso de la enfermedad, ni siquiera en las cohortes originales de los estudios de bioseguridad en las que se incluían pacientes de larga evolución. Este hecho, introduce un sesgo importante, ya que frecuentemente los pacientes son tratados con NTZ después de un brote, por tanto, si sólo tenemos en cuenta el año previo al inicio del tratamiento, la mayoría de los pacientes tratados con NTZ tendrán una tasa de brotes elevada.

En nuestro estudio observamos que la tasa de brotes global es un factor determinante en la estratificación del riesgo de la LMP. De hecho, en nuestro modelo, tener una tasa de brote anualizada global menor de 0.5 (menor de un brote cada dos años) incrementa la probabilidad de desarrollar LMP. Pensamos que esto podría ser debido a que pacientes con un curso más inflamatorio de la enfermedad (mayor tasa de brotes), sufren menos los efectos del bloqueo de la migración linfocitaria inducida por el NTZ, que aquellos con un curso más benigno de la EMRR.

En cualquier caso, hay que tener en cuenta que la tasa de brotes es una variable dependiente de la edad y como hemos discutido en puntos anteriores el curso de la LMP se puede ver influenciado por la edad de los pacientes. Además, en estudios con cohortes grandes recopilar esta información puede ser muy complicado.

6.1.6. Sexo de los pacientes

No se ha descrito asociación entre el sexo y el riesgo de LMP en otras cohortes. Nosotros encontramos una asociación muy modesta con el sexo masculino que se pierde en los estudios multivariantes.

6.1.7. MSSS

Algunos investigadores han descrito que el mejor parámetro para valorar el avance de la discapacidad de la EM es el MSSS (Multiple Sclerosis Severity Score), que se define como el decil medio del EDSS en la población de pacientes con EM con el mismo tiempo de duración de la enfermedad, es decir, el MSSS nos permite comparar las distintas trayectorias de la enfermedad entre distintas poblaciones de pacientes con EM (245).

Por este motivo, quisimos contrastar en nuestras cohortes si el MSSS podría resultar un buen marcador en la estratificación del riesgo a desarrollar LMP. Encontramos que pacientes con un MSSS inferior a 3, que indica un curso más benigno de la enfermedad, presentan un mayor riesgo a desarrollar LMP de manera secundaria al tratamiento con NTZ.

Sin embargo, aunque el MSSS puede ser un parámetro útil y fácilmente obtenible en la práctica clínica diaria, consideramos que hay otros parámetros que reflejan mejor el estatus inflamatorio o de actividad de la enfermedad como pueden ser la tasa de brotes como ya se ha visto anteriormente.

6.2. COHORTE DE PACIENTES CON ESTUDIO DE BOCM-LE

Se ha descrito previamente que la presencia de BOCM-LE en LCR se asocia a un curso de EM altamente inflamatorio. Los pacientes con BOCM positivas presentan mayor tasa de brotes (78) y un número más elevado de linfocitos en LCR (220). Además, nuestro grupo describió que las BOCM-LE disminuyen el riesgo de LMP en pacientes de EM tratados con Natalizumab (220). En este trabajo, quisimos validar esos resultados en una cohorte de 277 pacientes, de los cuales 245 no se habían incluido en el estudio anterior (12 de ellos habían desarrollado LMP y 233 no). Nuestros resultados en esta nueva cohorte mostraron que las BOCM-LE constituyen el mejor biomarcador independiente de los estudiados para la estratificación del riesgo de LMP, por encima de la tasa de brotes y el índice de anticuerpos anti-JC. Sólo un 4.1 % de los pacientes que desarrollaron LMP presentaron BOCM-LE, mientras que un 64% de los que no sufrieron esta infección oportunista, presentaban estos anticuerpos IgM frente a los lípidos en LCR. Estos datos ratifican nuestros resultados previos (220), confirmando que la presencia de BOCM-LE identifica, de forma muy precisa, a pacientes con un curso agresivo de la EM, los cuales, presentan un riesgo muy bajo de desarrollar LMP secundaria al tratamiento con NTZ. Esto podría deberse al mayor número de linfocitos en LCR que presentan los pacientes con BOCM-LE positivos (78), lo que podría contribuir a que el tratamiento con NTZ no llegue a producir un exceso de inmunosupresión a nivel del SNC, manteniendo la inmunovigilancia frente al VJC y reduciendo la incidencia de LMP. En esta línea, se demostró en pacientes VIH+ que el riesgo de desarrollar LMP aumenta cuando el número de linfocitos CD4+ desciende por debajo de 200 células/mm³ (246).

Además, en esta cohorte volvieron a resultar significativas las variables descritas en la cohorte total como son: la edad al inicio del tratamiento con NTZ, años de evolución de la enfermedad, índice de Ac anti-JC y la tasa de brotes.

6.3. ANÁLISIS MULTIVARIANTE

Los modelos de regresión multivariante son una herramienta importante en la investigación clínica para la creación de modelos fiables con fines pronósticos. Este tipo de análisis permite identificar los criterios del algoritmo de riesgo, minimizando el error de cada variable de analizada. Con el modelo mínimo, se seleccionan criterios "duros" para el modelo pronóstico y se valora su capacidad de discriminación mediante el área bajo la curva (ABC) ROC (227).

6.3.1. Cohorte total

Realizamos tres modelos mínimos finales dependiendo del criterio usado para valorar los anticuerpos anti-JC. En cada caso se extrajeron del grupo de variables, aquellas que perdían significación estadística en el modelo múltiple, hasta quedarnos con la mejor combinación de variables. Cuando consideramos los anticuerpos anti-JC como positivos/negativos o como mayores/menores de 1.5 de índice de Ac anti-JC, las variables adicionales que quedaron incluidas en el modelo mínimo final fueron la edad al inicio de tratamiento y la tasa de brotes anterior al mismo. Cuando usamos los valores mayores/menores de 0.9 del índice de Ac anti-JC, el modelo mínimo final solo incluyó una variable adicional, la tasa de brotes menor de 0.5. Este modelo fue el que

presentó una mayor área bajo la curva ROC y consideramos que era el mejor modelo final para la construcción del nomograma.

6.3.2. Cohorte de pacientes con estudio de BOCM

De nuevo realizamos tres modelos mínimos finales atendiendo a las distintas clasificaciones de anticuerpos anti-JC. Cuando consideramos los anticuerpos anti-JC como positivos/negativos, esta variable desapareció del modelo y permanecieron las BOCM-LE, la edad al inicio de tratamiento y la tasa de brotes inferior a 0.5 anterior al mismo. Cuando usamos los índices de Ac anti-JC mayores de 0.9 o 1.5, el índice de Ac anti-JC permanecía en el modelo final y además lo hacía las BOCM-LE y la edad de inicio del tratamiento. Ambos mostraron un área bajo la curva ROC de 0.92 y escogimos el primero para construir el nomograma porque mostraba una mayor significación para el índice de Ac anti-JC.

Los trabajos previos que desarrollaron algoritmos para predecir el desarrollo de LMP de manera secundaria al tratamiento con NTZ (225) (147) (184) (243) (212) (209) (166) (206) (210) (72) (18) (242) han sido muy útiles hasta ahora, ya que han permitido el uso de este fármaco altamente efectivo con mayor seguridad para un gran número de pacientes.

Sin embargo, estos modelos no tienen en cuenta la actividad de la enfermedad y limitan el uso prolongado del NTZ en pacientes con Ac anti-JC positivos y más aún si presentan inmunosupresión previa. Nuestro modelo incluía datos de actividad de la enfermedad como la tasa de brotes global y la presencia de BOCM-LE, que hasta ahora

no se han tenido en cuenta en algoritmos previos. Estas variables reflejan el estatus inflamatorio de la enfermedad en cada paciente y nuestros datos indican que son relevantes a la hora de evaluar el riesgo de desarrollar LMP. Esto mismo se ha observado con la edad de los pacientes al iniciar el tratamiento, esta variable podría a su vez indicar la bajada en la respuesta inflamatoria que se produce en la EM con la edad (239).

En nuestro modelo, una variable utilizada hasta ahora en los algoritmos predictores del riesgo de desarrollar LMP, como es el tiempo de tratamiento con NTZ superior a los dos años, pierde significación. Estos resultados discordantes podrían deberse a que nuestra cohorte incluye un número relativamente alto de pacientes jóvenes y con una alta tasa de brotes. Además, nuestro estudio sólo incluyó a pacientes tratados más de un año, ya que el primer año de tratamiento es el periodo en el que el riesgo de LMP es menor (209). Sin embargo, no podemos descartar que se debiera a un tamaño muestral demasiado bajo en comparación a otras cohortes estudiadas. Futuros estudios con un mayor número de pacientes indicarán si la duración del tratamiento pierde valor en individuos jóvenes o con enfermedad más activa. En este sentido se ha publicado recientemente en pacientes de EM que desarrollaron LMP tras el tratamiento con NTZ que el número de ciclos del fármaco hasta la LMP descendió al aumentar la edad (72).

Como último paso de nuestro estudio construimos los nomogramas para cada modelo. Constituyen una herramienta básica y fácil de utilizar para calcular el riesgo de LMP en pacientes individuales antes de iniciar el tratamiento con Natalizumab. Su uso a modo de calculadora podría ser de gran utilidad en la práctica clínica diaria.

VII. CONCLUSIONES

Hemos estudiado los factores que se asocian a la aparición de LMP en 1240 pacientes tratados con NTZ por un tiempo medio de 3.5 años y en un subgrupo de 277 de estos pacientes con estudio de BOCM disponible.

1. En el estudio univariante de la cohorte total, los factores que se asociaron de forma más clara con el riesgo de LMP fueron la tasa de brotes previa al tratamiento con NTZ, la edad al inicio del mismo y la presencia de anticuerpos anti-JC.
2. En nuestra cohorte el número de pacientes con inmunosupresión previa era claramente menor al de otras anteriormente descritas y esta variable no influyó significativamente en el riesgo de LMP.
3. La duración del tratamiento con NTZ tampoco influyó en el riesgo de LMP. Esto podría deberse a haber incluido solo a pacientes tratados más de un año en nuestro estudio, a la relativa juventud de los pacientes y a su alta actividad, aunque no se puede descartar que se deba a un sesgo debido al tamaño muestral.
4. La valoración de los anticuerpos anti-JC usando como punto de corte valores del índice de Ac anti-JC de 0.9, ofreció los mejores resultados para medir esta variable.
5. El mejor punto de corte para medir la edad de inicio se estableció en 45 años y para la tasa de brotes previa al tratamiento en 0.5.
6. Estas variables continuaron siendo significativas en el análisis multivariante final y permitieron la estratificación del riesgo de desarrollar LMP desde 1/50 (pacientes con tasa de brotes previa menor de 0.5 y el índice de Ac anti-JC de

- mayor de 0.9) a menos de 1/3000 en el caso contrario.
7. Estos datos demuestran que la actividad de la enfermedad y la edad al inicio del tratamiento pueden contribuir a la estratificación del riesgo de LMP.
 8. El análisis del subgrupo de pacientes con BOCM confirmó la utilidad de esta variable para predecir el riesgo del LMP en pacientes de EM tratados con Natalizumab.
 9. Las BOC de IgM lípido-específicas ofrecieron los mejores resultados en el análisis univariante.
 10. Su inclusión en los modelos multivariantes mejoró la potencia de los mismos y contribuyeron a establecer de una forma más precisa el riesgo de desarrollar LMP.
 11. El desarrollo de nomogramas permite la utilización de estas variables para calcular el riesgo en pacientes individuales.

VIII. BIBLIOGRAFÍA

BIBLIOGRAFIA

1. Reich D, Lucchinetti C, Calabresi P. Multiple Sclerosis. *New England Journal Medicine*. 2018; 378(169-180).
2. Brownlee WHT, Fazekas F, Miller D. Diagnosis of multiple sclerosis: progress and challenges. *Lancet*. 2017; 389(1336-1346).
3. Wallin M, Culpepper W, Campbell J, Nelson L. The prevalence of MS in the United States. A population-based estimate using health claims data. *Neurology*. 2019; 92(1029-1049).
4. Genetics CIMS, Wellcome Trust Case Control Consortium 2 SS, Freeman C, Hunt S, Edkins S, Gray E, et al. Genetic risk and a primary role for cell-mediated immune mechanisms in multiple sclerosis. *Nature*. 2011; 10(214-219).
5. Ascherio A, Munger K. Epidemiology of multiple sclerosis: from risk factors to prevention-an update. *Seminars Neurology*. 2016; 36(103-114).
6. Dominguez-Villar M, Hafler D. Regulatory T cells in autoimmune disease. *Nature Immunology*. 2018; 19(665-673).
7. Hemmer T, Kerschensteiner M, Korn T. Role of the innate and adaptive immune responses in the course of multiple sclerosis. *Lancet Neurology*. 2015; 14(406-419).
8. Cree B, Gourraud P, Oksenberg J. Long-term evolution of multiple sclerosis disability in the treatment era. *Annals of neurology*. 2016; 80(499-510).

9. Carswell R. Pathological anatomy: illustrations of the elementary forms of disease. 1838.
10. Cruveilhier J. Anatomie pathologique du corps humain; descriptions avec figures lithograpiees et coloriees; des diverses alterations morbides dont le corps humain est susceptible. 1841.
11. Charcot J. Histologie de la sclerose en plaque. Gazette Hospital (Paris). 1868; 41(554-566).
12. Marie P. La sclerose en plaques et maladies infectieuses. La Progres Medicale. 1884; 12.
13. Rivers T, Schwentker F. Encephalomyelitis accompanied by myelin destruction experimentally produced in monkeys. Journal of experimental medicine. 1935; 61.
14. Kabat E, Moore D, Landow H. An electrophoretic study of the protein components in cerebrospinal fluid and their relationship to the serum proteins. Journal of clinical investigation. 1942; 21.
15. Kurtzke JF. Rating Neurological impairment in multiple sclerosis: an expanded disability status scale (EDSS).. Neurology. 1983; 33.
16. Young I, Hall A, Pallis C. Nuclear magnetic resonance imaging of the brain in multiple sclerosis. Lancet neurology. 1981; 318(1063-1066).

17. Group TIMSS. Interferon beta-1b is effective in relapsing-remitting multiple sclerosis. I. Clinical results of a multicenter, randomized, double-blind, placebo-controlled trial. *Neurology*. 1993; 43(655-661).
18. Polman CH, O'Connor PW, Havrdova E. A randomized, placebo-controlled trial of natalizumab for relapsing multiple sclerosis. *New England Journal of Medicine*. 2006; 354(899-910).
19. Mayer L, Kappos L, Racke M, Rammohan K, Traboulsee A, Hauser S, et al. Ocrelizumab infusion experience in patients with relapsing and primary progressive multiple sclerosis: Results from the phase 3 randomized OPERA I, OPERA II, and ORATORIO studies. *Multiple Sclerosis Related Disorders*. 2019; 30(236-243).
20. Rosati G. The prevalence of multiple sclerosis in the world: an update. *Neurological Sciences*. 2001; 22(117-139).
21. Handel A, Handunnetthi L, Giovannoni G, Ebers G, Ramagopalan S. Genetic and environmental factors and the distribution of multiple sclerosis in Europe. *European journal of neurology*. 2010; 17(1210-1214).
22. Vaughn V, Jakimovski D, Kavak K, Ramanathan M, Benedict R, Zivadinov R, et al. Epidemiology and treatment of multiple sclerosis in elderly populations. *Nature Reviews Neurology*. 2019.
23. Fernandez O, et al. Multiple sclerosis prevalence in Malaga, Southern Spain estimated by the capture-recapture method. *Multiple sclerosis*. 2012; 18(372-376).

24. Sawcer S, al. e. Genetic risk and a primary role for cell-mediated immune mechanisms in multiple sclerosis. *Nature*. 2011; 476(214-219).
25. Babron M, al. e. Determination of the real effect of genes identified in GWAS: the example of IL2RA in multiple sclerosis. *European Journal of Human Genetics-Nature*. 2012; 20(321-325).
26. Dyment D, Ebers G, Sadovnick A. Genetics of multiple sclerosis. *Lancet of Neurology*. 2004; 3(104-110).
27. Society NMS. Sociedad nacional de EM. [Online]. [cited 2019 05 12. Available from: <https://www.nationalmssociety.org/Resources-Support/Library-Education-Programs/Informacion-en-Espanol>.
28. Koch-Henriksen N, Sørensen P. The changing demographic pattern of multiple sclerosis epidemiology. *Lancet Neurology*. 2010; 9(520-532).
29. Mendell J, Olson E. MicroRNAs in stress signaling and human disease. *Cell*. 2012; 148(1172-1187).
30. Haghikia A, Hellwig K, Baraniskin Aea. Regulated microRNAs in the CSF of patients with multiple sclerosis: A case-control study. *Neurology*. 2012; 79(2166-2170).
31. Ahlbrecht J, Martino F, Pul R. Deregulation of microRNA-181c in cerebrospinal fluid of patients with clinically isolated syndrome is associated with early conversion to relapsing-remitting multiple sclerosis. *Multiple Sclerosis* 2016. 2016; 22(1202-1214).

32. Bergman P, Piket E, Khademi M. Circulating miR-150 in CSF is a novel candidate biomarker for multiple sclerosis. *Neurology Neuroimmunol inflammation*. 2016; 3.
33. Quintana E, Ortega F, Robles-Cedeño R, Villar M, Buxó M, Mercader J, et al. miRNAs in cerebrospinal fluid identify patients with MS and specifically those with lipid-specific oligoclonal IgM bands. *Multiple Sclerosis*. 2017; 23(1716-1726).
34. Liggett T. Methylation patterns of cell-free plasma DNA in relapsing- remitting multiple sclerosis. *Journal of Neurology Science*. 2010; 290(16-21).
35. Belbasis L, Bellou V, Evangelou E. Environmental risk factors and multiple sclerosis: an umbrella review of systematic reviews and meta-analyses. *Lancet Neurology*. 2015; 14(263-173).
36. Lindberg C, Andersen O, Vahlne A, Dalton M, Runmarker B. Epidemiological investigation of the association between infectious mononucleosis and multiple sclerosis. *Neuroepidemiology*. 1991; 10(62-65).
37. Wandinger K, Neurology. Association between clinical disease activity and Epstein-Barr virus reactivation in MS. *Neurology*. 2000; 55(178-184).
38. Levin L. Temporal relationship between elevation of epstein-barr virus antibody titers and initial onset of neurological symptoms in multiple sclerosis. *JAMA*. 2005; 293(2496-2500).

39. Haahr S, Hollsberg P. Multiple sclerosis is linked to Epstein-Barr virus infection. *Reviews medical virology*. 2006; 16(297-310).
40. Tejada-Simon M. Detection of viral DNA and immune responses to the human herpesvirus 6 101-kilodalton virion protein in patients with multiple sclerosis and in controls. *Journal of Virology*. 2002; 76(6147-6154).
41. Correale J, Ysraelit M, Gaitan M. Immunomodulatory effects of Vitamin D in multiple sclerosis. *Brain*. 2009; 132(1146-1160).
42. Munger K, Levin L, Hollis B, Howard N, Ascherio A. Serum 25-hydroxyvitamin D levels and risk of multiple sclerosis. *JAMA*. 2006; 296(2832-2838).
43. Rolf L, Muris A, Mathias A, Du Pasquier R, Konecny I, Disanto G, et al. Exploring the effect of vitamin D3 supplementation on the anti-EBV antibody response in relapsing-remitting multiple sclerosis. *Multiple Sclerosis Journal*. 2018; 24(1280-1287).
44. Simpson S. Higher 25-hydroxyvitamin D is associated with lower relapse risk in multiple sclerosis. *Annals of neurology*. 2010; 68(193-203).
45. James E, Dobson R, Kuhle J, Baker D, Giovannoni G, Ramagopalan S. The effect of vitamin D-related interventions on multiple sclerosis relapses: a meta-analysis. *Multiple Sclerosis Journal*. 2013; 19(1571-1579).
46. Zheng C, He L, Liu L, Zhu J, Jin T. The efficacy of vitamin D in multiple sclerosis: A meta-analysis. *Multiple Sclerosis Related Disorders*. 2018 Jul;23:56-61. 2018; 23(56-61).

47. Cochrane Database of Systematic Reviews. [Online].; 2018 [cited 2019 06 11]. Available _____ from: <https://www.cochranelibrary.com/cdsr/doi/10.1002/14651858.CD008422.pub>.
48. Hawkes C. Smoking is a risk factor for multiple sclerosis: a meta-analysis. *Multiple sclerosis*. 2007; 13(610-615).
49. Sundstrom P, Nystrom L. Smoking worsens the prognosis in multiple sclerosis. *Multiple sclerosis*. 2008; 14(1031-1035).
50. Kavak K, Teter B, Hagemeyer J, Zakalik K, Weinstock-Guttman B. Higher weight in adolescence and young adulthood is associated with an earlier age at multiple sclerosis onset. *Multiple sclerosis*. 2015; 21(858-865).
51. Cekanaviciute E, et al. Gut bacteria from multiple sclerosis patients modulate human T cells and exacerbate symptoms in mouse models. *PNAS*. 2017; 114(10713–10718.).
52. Berer K, et al. Gut microbiota from multiple sclerosis patients enables spontaneous autoimmune encephalomyelitis in mice. *PNAS*. 2017; 114(10719–10724).
53. Jangi S, Gandhi R, Cox L, Li N, von Glehn F, Yan R, et al. Alterations of the human gut microbiome in multiple sclerosis. *Nature Communications*. 2016; 28(1-11).
54. Srivastava R, Aslam M, Kalluri S. Potassium channel KIR4.1 as an immune target in multiple sclerosis. *New England Journal of Medicine*. 2012; 367(115-123).

55. Mackay C, Marston C, Dudlcr L. Naive and memory T cells show distinct pathways of lymphocyte recirculation. *Journal of experimental Medicine*. 1990; 171:801.
56. Baron J, Madri J, Ruddle N, Hashim G, Janeway C. Surface expression of alpha 4 integrin by CD4 T cells is required for their entry into brain parenchyma. *Journal of experimental Medicine*. 1993.
57. Lassmann H, Bruck W, Lucchinetti C. The immunopathology of multiple sclerosis: an overview. *Brain pathology*. 2007; 17(210-218).
58. Weissert R. The immune pathogenesis of multiple sclerosis. *Journal Neuroimmune Pharmacology*. 2013;(857-866).
59. Kipp M, van der Star B, Vogel D. Experimental in vivo and in vitro models of multiple sclerosis: EAE and beyond. *Multiple Sclerosis Related Disorders*. 2012; 1(15-28).
60. Farh K, Marson A, Zhu J. Genetic and epigenetic fine mapping of causal autoimmune disease variants. *Nature*. 2015; 518(337-343).
61. Lassmann H. Mechanisms of white matter damage in multiple sclerosis. *Glia*. 2014; 62(1816-1830).
62. Cepok S, Rosche B, Grummel V, Vogel F, Zhou D, Sayn J, et al. Short-lived plasma blasts are the main B cell effector subset during the course of multiple sclerosis. *Brain*. 2005; 128(1667-1676).

63. Magliozzi R. Meningeal B-cell follicles in secondary progressive multiple sclerosis associate with early onset of disease and severe cortical pathology. *Brain*. 2007; 130(1089-1104).
64. Li R, Patterson K, Bar-Or A. Reassessing B cell contributions in multiple sclerosis. *Nature Immunology*. 2018; 19(696-707).
65. Sádaba M, Tzartos J, Paíno C, García-Villanueva M, Alvarez-Cermeño J, Villar L, et al. Axonal and oligodendrocyte-localized IgM and IgG deposits in MS lesions. *Journal of Neuroimmunology*. 2012; 247(86-94).
66. Harp C, Lovett-Racke A, Racke M, Frohman E, Monson N. Impact of myelin-specific antigen presenting B cells on T cell activation in multiple sclerosis. *Clinical immunology*. 2008; 128(382-391).
67. Duddy M. Distinct effector cytokine profiles of memory and naive human B cell subsets and implication in multiple sclerosis. *Journal of immunology*. 2007; 178(6092-6099).
68. Correale J, Equiza T. Regulatory B cells, helminths, and multiple sclerosis. *Methods in molecular biology*. 2014; 1190(257-269).
69. Prinz M, Priller J, Sisodia S, Ransohoff R. Heterogeneity of CNS myeloid cells and their roles in neurodegeneration. *Nature Neuroscience*. 2011; 14(1227-1235).
70. Schweitzer F, Laurent S, Fink G, Barnett M, Reddel S, Hartung H, et al. Age and the risks of high-efficacy disease modifying drugs in multiple sclerosis. *Curr Opin Neurol*. 2019; 32(305-312).

71. Grebenciucova EBJ. Immunosenescence: the role of aging in the predisposition to neuroneuroinfectious complications arising from the treatment of multiple sclerosis. *Current Neurology Neuroscience*. 2017; 17.
72. Prosperini L, Scarpazza C, Imberti L, Cordioli C, De Rossi N, Capra R. Age as a risk factor for early onset of natalizumab-related progressive multifocal leukoencephalopathy. *Journal of neurovirology*. 2017; 23(742-749).
73. Absinta M, Sati P, Reich D. Advanced MRI and staging of multiple sclerosis lesions. *Nature Review Neurology*. 2016; 12(358-368).
74. Weideman A, Tapia-Maltos M, Johnson K, Greenwood M, Bielekova B. Meta-analysis of the Age-Dependent Efficacy of Multiple Sclerosis Treatments. *Frontiers Neurology*. 2017; 8(577).
75. Villar LM, Abaira V, Alvarez-Cermeño JC, Arroyo R, Cámara C, Yagüe J. Utility of oligoclonal IgG band detection for MS diagnosis in daily clinical practice. *Journal of Immunological Methods*. 2011; 371; 1–2.
76. Huss A, Abdelhak A, Halbgebauer S, Mayer B, Senel M, Otto M, et al. Intrathecal immunoglobulin M production: A promising high-risk marker in clinically isolated syndrome patients. *Annals Neurology*. 2018; 83(1032-1036).
77. Villar L, Masjuan J, González-Porqué P, Plaza J, Sádaba M, Roldán E, et al. Intrathecal IgM synthesis is a prognostic factor in multiple sclerosis. *Annals Neurology*. 2003; 53(222-226).

78. Villar LM, Sábada MC, Roldán E. Intrathecal synthesis of oligoclonal IgM against myelin lipids predicts an aggressive disease course in MS. *Journal of Clinical Investigation*. 2005; 115: 187-194.
79. Villar L, García-Sánchez M, Costa-Frossard L, Espiño M, Roldán E, Páramo D, et al. Immunological markers of optimal response to natalizumab in multiple sclerosis. *Archives of neurology*. 2012; 69(191-197).
80. Villar L, Casanova B, Ouamara N, Comabella M, Jalili F, Leppert D, et al. Immunoglobulin M oligoclonal bands: biomarker of targetable inflammation in primary progressive multiple sclerosis. *Annals Neurology*. 2014; 76(231-240).
81. Rojas O, Pröbstel A, Porfilio E, Wang A, Charabati M, Sun T, et al. Recirculating Intestinal IgA-Producing Cells Regulate Neuroinflammation via IL-10. *Cell*. 2019; 24(610-624).
82. Dobsona R, Giovannoni G. Multiple sclerosis – a review. *European Journal of Neurology*. 2019; 26(27-40).
83. Thompson A, Banwell B, Barkhof F, Fujihara K, Galetta S, Hartung H, et al. Diagnosis of multiple sclerosis: 2017 revisions of the McDonald criteria. *Lancet Neurology*. 2018; 17(162-173).
84. Lublin F, Reingold S. Defining the clinical course of multiple sclerosis Results of an international survey. *Neurology*. 1996; 46(907-911).
85. Thompson A, Polman C, Miller D. Primary progressive multiple sclerosis. *Brain*. 1997; 120.

86. Lublin F. New Multiple Sclerosis Phenotypic Classification. *European Neurolog.* 2014; 72(1-5).
87. Polman. Diagnostic criteria for multiple sclerosis: 2010 revisions to the McDonald criteria. *Annals of neurology.* 2011; 69, 292-302.
88. Scolding N. The differential diagnosis of multiple sclerosis. *Journal of Neurology, Neurosurgery, and Psychiatry.* 2001; 71.
89. Barkhof F, al e. Relapsing-remitting multiple sclerosis: sequential enhanced MR imaging vs clinical findings in determining disease activity. *American Journal of Roentgenology.* 1992; 159(1041-1047).
90. Compston A, Coles A. Multiple sclerosis. *Lancet.* 2008; 372(1502-1517).
91. Rovira A, Wattjes M, Tintore M. MAGNIMS consensus guidelines on the use of MRI in multiple sclerosis—clinical implementation in the diagnostic process. *Nature Reviews Neurol.* 2015; 11(471-482).
92. Wattjes M, Rovira A, Miller D. Evidence-based guidelines: MAGNIMS consensus guidelines on the use of MRI in multiple sclerosis—establishing disease prognosis and monitoring patients. *Nature Reviews Neurology.* 2015; 11(597-606).
93. Traboulsee A, Simon J, Stone L. Revised recommendations of the Consortium of MS Centers task force for a standardized MRI protocol and clinical guidelines for the diagnosis and follow-up of multiple sclerosis. *AJNR Am J Neuroradiology.* 2016; 37(394-401).

94. Arrambide G, Tintore M. CSF examination still has value in the diagnosis of MS—commentary. *Multiple Sclerosis Journal*. 2016; 22(997-998).
95. Housley W, Pitt D, Hafler D. Biomarkers in multiple sclerosis. *Clinical Immunology*. 2015; 161(51-58).
96. Andersson M, Alvarez-Cermeno J, Bernardi G, al e. Cerebrospinal fluid in the diagnosis of multiple sclerosis: a consensus report. *Journal of Neurology Neurosurgery Psychiatry*. 1994; 57(897-902).
97. Freedman M, Thompson E, Deisenhammer F, al e. Recommended standard of cerebrospinal fluid analysis in the diagnosis of multiple sclerosis: a consensus statement. *American Neurological Association*. 2005; 62(865-870).
98. Stangel M, Fredrikson S, Meinl E, Petzold A, Stuve O, Tumani H. The utility of cerebrospinal fluid analysis in patients with multiple sclerosis. *Nature Reviews Neurology*. 2013; 9(267-276).
99. Villar L, al. e. Early differential diagnosis of multiple sclerosis using a new oligoclonal band test. *Archives of neurology*. 2005; 62(574-577).
100. Tintore M, Rovira A, Brieva L, al. e. Isolated demyelinating syndromes: comparison of CSF oligoclonal bands and different MRI criteria to predict conversion to CDMS 7: 359–63. *Multiple Sclerosis*. 2001; 7(359-363).
101. Arrambide G, Tintore M, Espejo C, Auger C, Castillo M, Río J, et al. The value of oligoclonal bands in the multiple sclerosis diagnostic criteria. *Brain*. 2018; 141(1075-1084).

102. Reiber H. Calculation of the IgG fraction of cerebrospinal fluid locally synthesized in the central nervous system (traducción del autor). *Journal of Clinical Chemistry and Clinical Biochemistry*. 1979; 17(587-591).
103. Link H, Tibbling G. Principles of albumin and IgG analyses in neurological disorders. Evaluation of IgG synthesis within the central nervous system in multiple sclerosis. *Scandinavian Journal of Clinical and Laboratory Investigation*. 1977; 37, 397-401.
104. Makshakov G, Nazarov V, Kochetova O, Surkova E, Lapin S, Evdoshenko E. Diagnostic and Prognostic Value of the Cerebrospinal Fluid Concentration of Immunoglobulin Free Light Chains in Clinically Isolated Syndrome with Conversion to Multiple Sclerosis. *PLoS One*. 2015; 10(e0143375).
105. Leurs C, Twaalfhoven H, Lissenberg-Witte B, van Pesch V, Dujmovic I, Drulovic J, et al. Kappa free light chains is a valid tool in the diagnostics of MS: A large multicenter study. *Multiple Sclerosis*. 2019 May;(1-12).
106. Balcer L, Miller D, Reingold S, Cohen J. Vision and vision-related outcome measures in multiple sclerosis. *Brain*. 2015; 138(11-27).
107. Filippi M, Preziosa P, Meani A, al. e. Prediction of a multiple sclerosis diagnosis in patients with clinically isolated syndrome using the 2016 MAGNIMS and 2010 McDonald criteria a retrospective study. *Lancet Neurology*. 2017.
108. Fernandez O, Tintore M, Saiz A, Calles-Hernandez M, Comabella M, Ramio-Torrenta L, et al. Review of the novelties presented at the 2018ECTRIMS

- Congress: 11th Post-ECTRIMS Meeting (I). *Revista de Neurología*. 2019; 68(431-441).
109. Lycke J, Karlsson J, Andersen O, Rosengren L. Neurofilament protein in cerebrospinal fluid: a potential marker of activity in multiple sclerosis. *Journal of Neurology, Neurosurgery Psychiatry*. 1998; 64(402-404).
110. Modvig S, Degn M, Horwitz H, Cramer S, Larsson H, Wanscher B, et al. Relationship between cerebrospinal fluid biomarkers for inflammation, demyelination and neurodegeneration in acute optic neuritis. *PLoS ONE*. 2013; 8(e77163).
111. Varhaug K, Torkildsen Ø, Myhr K, Vedeler C. Neurofilament Light Chain as a Biomarker in Multiple Sclerosis. *Frontiers Neurology*. 2019; 10(338).
112. Arrambide G, Espejo C, Eixarch H, Villar L, Alvarez-Cermeno J, Picon C. Neurofilament light chain level is a weak risk factor for the development of MS. *Neurology*. 2016; 87(1076-1084).
113. Kuhle J, Barro C, Disanto G. Serum neurofilament light chain in early relapsing remitting MS is increased and correlates with CSF levels and with MRI measures of disease severity. *Multiple Sclerosis*. 2016; 22(1550-1559).
114. Comabella M, Sastre-Garriga J, Montalban X. Precision medicine in multiple sclerosis: biomarkers for diagnosis, prognosis, and treatment response. *Current Opinion in Neurology*. 2016; 29(254-262).

115. Canto E, Tintoré M, Villar L, Costa C, Nurtdinov R, Álvarez- Cermeño J, et al. Chitinase 3-like 1: prognostic biomarker in clinically isolated syndromes. *Brain*. 2015; 138(918-931).
116. Burman J, Raininko R, Blennow K, Zetterberg H, Axelsson M, Malmstrom C. YKL-40 is a CSF biomarker of intrathecal inflammation in secondary progressive multiple sclerosis. *Journal of Neuroimmunology*. 2016; 292(52-57).
117. Beltrán E, Obermeier B, Moser M, Coretm F, Simó-Castelló M, Boscá I, et al. Intrathecal somatic hypermutation of IgM in multiple sclerosis and neuroinflammation. *Brain*. 2014; 137(2703-2714).
118. Villar LM, González-Porqué P, Masjuán J. A sensitive and reproducible method for the detection of oligoclonal IgM bands. *Journal of Immunological Methods*. 2001; 258: 151-155.
119. Sharief M, Keir G, Thompson E. Intrathecal synthesis of IgM in neurological diseases: a comparison between detection of oligoclonal bands and quantitative estimation. *Journal of the Neurological Sciences*. 1990; 96(131-142).
120. Villar LM. et al. Intrathecal IgM synthesis in neurologic diseases: relationship with disability in MS. *Neurology*. 2002; 58(824-826).
121. Mandrioli J, Sola P, Bedin R, Gambini M, Merelli E. A multifactorial prognostic index in multiple sclerosis. Cerebrospinal fluid IgM oligoclonal bands and clinical features to predict the evolution of the disease. *Journal of Neurology*. 2008; 255(1023-1031).

122. Durante L, Zaaraoui W, Rico A, al. e. Intrathecal synthesis of IgM measured after a first demyelinating event suggestive of multiple sclerosis is associated with subsequent MRI brain lesion accrual. *Multiple Sclerosis*. 2012; 18(587-591).
123. Thangarajh M, Gomez-Rial J, Hedström A, al. e. Lipid-specific immunoglobulin M in CSF predicts adverse long-term outcome in multiple sclerosis. *Multiple Sclerosis*. 2008; 14(1208-1213).
124. Berger J. Functional improvement and symptom management in multiple sclerosis: clinical efficacy of current therapies. *The American Journal of Managed Care*. 2011; 17(146-153).
125. Rieckmann P. Neurodegeneration and clinical relevance for early treatment in multiple sclerosis. *The International MS Journal*. 2005; 12(42-51).
126. Muraro P, Martin R, Mancardi G, Nicholas R, Sormani M, Saccardi R. Autologous haematopoietic stem cell transplantation for treatment of multiple sclerosis. *Nature Reviews Neurology*. 2017; 13(391-405).
127. Tintore M, Vidal-Jordana A, Sastre-Garriga J. Treatment of multiple sclerosis - success from bench to bedside. *Nature Reviews Neurology*. 2019; 15(53-58).
128. EMA. ficha técnica de Rebif. [Online].; 2008 [cited 2019 06 16. Available from: https://www.ema.europa.eu/en/documents/product-information/rebif-epar-product-information_es.pdf.

129. EMA. ficha técnica EMA Avonex. [Online].; 2007 [cited 2019 06 16. Available from: https://www.ema.europa.eu/en/documents/product-information/avonex-epar-product-information_es.pdf.
130. EMA. Ficha técnica Plegridy. [Online].; 2014 [cited 2019 06 16. Available from: https://www.ema.europa.eu/en/documents/product-information/plegridy-epar-product-information_es.pdf.
131. EMA. ficha técnica extavia. [Online].; 2013 [cited 2019 06 16. Available from: https://www.ema.europa.eu/en/documents/product-information/extavia-epar-product-information_es.pdf.
132. EMA. ficha técnica EMA betaferon. [Online].; 2013 [cited 2019 06 16. Available from: https://www.ema.europa.eu/en/documents/product-information/betaferon-epar-product-information_es.pdf.
133. La Mantia L, Di Pietrantonj C, Rovaris M. Interferons beta versus glatiramer acetate for relapsing-remitting multiple sclerosis. Cochrane Database Systematic Reviews. 2014; 7(CD009333).
134. Trojano M, Paolicelli D, Tortorella C, Iaffaldano P, Lucchese G, Di Renzo V, et al. Natural history of multiple sclerosis: have available therapies impacted long-term prognosis? Neurologic Clinics. 2011; 29(309-321).
135. Gerardi C, Bertele V, Rossi S, Garattini S, Banzi R. Preapproval and postapproval evidence on drugs for multiple sclerosis. Neurology. 2018; 90(964-973).

136. Jacobs L, Cookfair D, Rudick R, Herndon R, Richert J, Salazar A, et al. Intramuscular interferon beta-1a for disease progression in relapsing multiple sclerosis. The Multiple Sclerosis Collaborative Research Group (MSCRG). *Annals Neurology*. 1996; 39(285-294).
137. Hart F, Bainbridge J. *Current and Emerging Treatment of Multiple Sclerosis*. AJMC. 2016.
138. Alenda R, Costa-Frossard L, Alvarez-Lafuente R, Espejo C, Rodríguez-Martín E, de la Maza S, et al. Blood lymphocyte subsets identify optimal responders to IFN-beta in multiple sclerosis. *Journal of Neurology*. 2018; 265(24-31).
139. Agencia española del medicamento y productos sanitarios. Ficha técnica de copaxone. [Online].; 2007 [cited 2019 06 16. Available from: https://cima.aemps.es/cima/pdfs/es/ft/65983/65983_ft.pdf.
140. Oleen-Burkey M, Cyhaniuk A, Swallow E. Retrospective US database analysis of persistence with glatiramer acetate vs. available disease-modifying therapies for multiple sclerosis 2001–2010. *BMC Neurology*. 2014; 14.
141. EMA. Ficha técnica Teriflunomida. [Online].; 2013 [cited 2019 06 16. Available from: https://ec.europa.eu/health/documents/community-register/2015/20151216133467/anx_133467_es.pdf.
142. Brück W, Gold R, Lund B. Therapeutic decisions in multiple sclerosis: moving beyond efficacy. *JAMA Neurology*. 2013; 70(1315-1324).

143. O'Connor P, Wolinsky J, Confavreux C. Randomized trial of oral teriflunomide for relapsing multiple sclerosis. *New England Journal of Medicine*. 2011; 365(1293-1303).
144. EMA. ficha técnica fingolimod. [Online].; 2015 [cited 2019 06 16. Available from: https://www.ema.europa.eu/en/documents/product-information/gilenya-epar-product-information_es.pdf.
145. Brunkhorst R, Vutukuri R, Pfeilschifter W. Fingolimod for the treatment of neurological diseases-state of play and future perspectives. *Frontiers Cell Neuroscience*. 2014; 283.
146. Cohen J, Barkhof F, Comi G. TRANSFORMS Study Group. Oral fingolimod or intramuscular interferon for relapsing multiple sclerosis. *New England Journal of Medicine*. 2010; 362(402-415).
147. Berger JR. Classifying PML risk with disease modifying therapies. *Multiple sclerosis related disorders*. 2017; 12(59-63).
148. EMA. ficha técnica de Dimetil fumarato. [Online].; 2018 [cited 2019 06 16. Available from: https://www.ema.europa.eu/en/documents/product-information/tecfidera-epar-product-information_es.pdf.
149. Gold R, al. e. Placebo-controlled phase 3 study of oral BG-12 for relapsing multiple sclerosis. *New England journal of medicine*. 2012; 367(1098-1107).

150. Dubey D, al. e. Dimethyl fumarate in relapsing-remitting multiple sclerosis: rationale, mechanisms of action, pharmacokinetics, efficacy and safety. *Expert Review. Neurotherapeutics*. 2015; 15(339-346).
151. Medina S, Villarrubia N, Sainz de la Maza S, Lifante J, Costa-Frossard L, Roldán E, et al. Optimal response to dimethyl fumarate associates in MS with a shift from an inflammatory to a tolerogenic blood cell profile. *Multiple Sclerosis*. 2018; 24(1317-1327).
152. EMA. ficha técnica Alemtuzumab. [Online].; 2018 [cited 2019 06 16. Available from: https://www.ema.europa.eu/en/documents/product-information/lemtrada-epar-product-information_es.pdf.
153. Brown J, Coles A, Horakova D, Havrdova E, Izquierdo G, Prat A, et al. Association of Initial Disease-Modifying Therapy With Later Conversion to Secondary Progressive Multiple Sclerosis. *Journal of American Medical Association*. 2019; 321(2)(175-187).
154. McCall B. Alemtuzumab to be restricted pending review, says EMA. *Lancet*. 2019; 27.
155. EMA. ficha técnica ocrelizumab. [Online].; 2018 [cited 2019 06 16. Available from: https://www.ema.europa.eu/en/documents/product-information/ocrevus-epar-product-information_es.pdf.
156. Roche HL. Roche's ocrelizumab first investigational medicine to show positive pivotal study results in both relapsing and primary progressive forms of

- multiple sclerosis. [Online].; 2015 [cited 1019 05 25. Available from: <https://www.roche.com/media/releases/med-cor-2015-10-08.htm>.
157. Rudick RA, Stuart WH, Calabresi PA, Confavreux C, Galetta SL, Radue E. Natalizumab plus interferon beta-1a for relapsing multiple sclerosis. *New England Journal of Medicine*. 2006; 354(911–923).
 158. Wiendl H, Butzkueven H, Kappos L. Epoch analysis of on-treatment disability progression events over time in the Tysabri Observational Program (TOP). *PLoS One*. 2016; 11(e0144834).
 159. Butzkueven H, Kappos L, Pellegrini F. Efficacy and safety of natalizumab in multiple sclerosis: interim observational programme results. *Journal of Neurology and Neurosurgery and Psychiatry*. 2014; 85(1190-1197).
 160. Fernández O OGCARIGPJMX. Natalizumab treatment of multiple sclerosis in Spain: results of an extensive observational study. *Journal of Neurology*. 2012; 259(1814-1823).
 161. Prosperini L GCBVMCFFBG. Predictors of freedom from disease activity in natalizumab treated-patients with multiple sclerosis. *Journal Neurology Science*. 2012; 323(104-112).
 162. Lanzillo R, Bonavita S, Quarantelli M. Natalizumab is effective in multiple sclerosis patients switching from other disease modifying therapies in clinical practice. *Neurological Sciences*. 2013; 34(521–28).

163. Laroni A, Signori A, Maniscalco GT, Lanzillo R, Russo , Russco CV, et al. Assessing association of comorbidities with treatment choice and persistence in MS: A real-life multicenter study. *Neurology*. 2017; 28(2222-2229).
164. Kalincik T, Brown J, Robertson N, Willis M, Scolding N, Rice C, et al. Treatment effectiveness of alemtuzumab compared with natalizumab, fingolimod, and interferon beta in relapsing-remitting multiple sclerosis: a cohort study. *Lancet Neurology*. 2017;(271-281).
165. Schwab N, Schneider-Hohendorf T, Melzer N, Cutter G, Wiendl H. Natalizumab-associated PML: Challenges with incidence, resulting risk, and risk stratification. *Neurology*. 2017; 88(12):1197–205.
166. Major EO. Progressive multifocal leukoencephalopathy in patients on immunomodulatory therapies. *Annual Review of Medicine*. 2010; 61(35-47).
167. Bevilacqua M. Endothelial-leukocyte adhesion molecula. *Annual review Immunology*. 1993; 11(767-804).
168. Yednock T, Cannon C, Fritz L, Sanchez-Madrid F, Steinman L, Karin N. Prevention of experimental autoimmune encephalomyelitis by antibodies against $\alpha_4\beta_1$ integrin. *Nature*. 1992; 356(63-66).
169. Lobb R, Hemler M. The Pathophysiologic Role of α_4 Integrins In Vivo. *Journal of clinnical investigation*. 1994;(1722-1728).
170. Burkly L, Jakubowski A, Newman B, Rosa M, Chi-Rosso G, Lobb R. Signaling by vascular cell adhesion molecula-1 (VCAM-1) through VLA-4 promotes CD3-

- dependent T cell proliferation. *European Journal of immunology*. 1991; 21(2871-2875).
171. Gunnarsson M, Malmstrom C, Axelsson M, Sundstrom P, Dahle C, Vrethem M, et al. Axonal damage in relapsing multiple sclerosis is markedly reduced by natalizumab. *Annals of Neurology*. 2011; 69(83-89).
172. Stoop M, Singh V, Stingl C, Martin R, Khademi M, Olsson T, et al. Effects of natalizumab treatment on the cerebrospinal fluid proteome of multiple sclerosis patients. *Journal of Proteome Research*. 2013; 12(1101-1107).
173. Niino M, Bodner C, Simard M, Alatab S, Gano D, Kim H, et al. Natalizumab effects on immune cell responses in multiple sclerosis. *Annals of Neurology*. 2006; 59(748-754).
174. Wipfler P, Oppermann K, Pilz G, Afazel S, Haschke-Becher E, Harrer A, et al. Adhesion molecules are promising candidates to establish surrogate markers for natalizumab treatment. *Multiple Sclerosis*. 2011; 17(16-23).
175. Defer G, Mariotte D, Derache N, Toutirais O, Legros H, Cauquelin B, et al. CD49d expression as a promising biomarker to monitor natalizumab efficacy. *Journal of the Neurological Sciences*. 2012; 314(138-142).
176. Puñet-Ortiz J, Hervás-García J, Teniente-Serra A, Cano-Orgaz A, Mansilla M, Quirant-Sánchez B, et al. Monitoring CD49d Receptor Occupancy: A Method to Optimize and Personalize Natalizumab Therapy in Multiple Sclerosis Patients. *Cytometry Part B: Clinical Cytometry*. 2018; 94(327-333).

177. Harris V, Donelan N, Yan Q, Clark K, Touray A, Rammal M, et al. Cerebrospinal fluid fetuin-A is a biomarker of active multiple sclerosis. *Multiple Sclerosis*. 2013; 19(1462-1472).
178. Vennegoor A, Rispens T, Strijbis E, Seewann A, Uitdehaag B, Balk L, et al. Clinical relevance of serum natalizumab concentration and anti-natalizumab antibodies in multiple sclerosis. *Multiple Sclerosis*. 2013; 19(593-600).
179. Lundkvist M, Engdahl E, Holmén C, Movérare R, Olsson T, Hillert J, et al. Characterization of anti-natalizumab antibodies in multiple sclerosis patients. *Multiple Sclerosis*. 2013; 19(757-764).
180. Sellner J, Rommer P. A review of the evidence for a natalizumab exit strategy for patients with multiple sclerosis. *Autoimmune Reviews*. 2019; 18(255-261).
181. Ferenczy MW, Marshall LJ, Nelson CD, Atwood WJ, Nath A, Khalili K. Molecular biology, epidemiology, and pathogenesis of progressive multifocal leukoencephalopathy, the JC virus-induced demyelinating disease of the human brain. *Clinical Microbiology Reviews*. 2012; 25(471-506).
182. Berger J, Pall L, Lanska D. Progressive multifocal leukoencephalopathy in patients with HIV infection. *Journal of neurovirology*. 1998; 4(59-68).
183. Bolton C, Rozdilsky. Primary progressive multifocal leukoencephalopathy case report. *Neurology*. 1971; 21(72-7).

184. Bloomgren G, Richman S, Hotermans C. Risk of natalizumab-associated progressive multifocal leukoencephalopathy. *New England Journal of Medicine*. 2012; 366(1870-1880).
185. Hallervorden J. *Eigennartige und nicht rubrizierbare*. Springer. 1930.
186. Astrom K, EL M, Richardson E. Progressive multifocal leukoencephalopathy. *Brain*. 1958; 81(93-197).
187. Cavanaugh J, Greenbaum D, Marshall A. Cerebral demyelination associated with disorders of reticuloendothelial system. *Lancet*. 1959; 2(524-529).
188. ZuRhein G. Polyoma-like virions in a human demyelinating disease. *Acta Neuropathology*. 1967; 8(57-68).
189. Padgett BL, Walker DL, ZuRhein GM, Eckroade RJ, Dessel BH. Cultivation of papova-like virus from human brain with progressive multifocal leukoencephalopathy. *Lancet*. 1971; 1(1257–1260).
190. London W, Houff S, Madden D. Brains tumors in owl monkeys inoculated with a human polyomavirus (JC virus). *Science*. 1978; 201(1246-1249).
191. Tan CS, Koranik IJ. Progressive multifocal leukoencephalopathy and other disorders caused by JC virus: clinical features and pathogenesis. *Lancet of Neurology*. 2010; 9(425-437).
192. Achiron A, Miron G, Zilka-Falb R, Magalashvili D. Host cell virus entry mechanisms enhance anti-JCV-antibody switch in natalizumab-treated multiple sclerosis patients. *Journal of Neurovirology*. 2016; 22(736–746).

193. Rhiza H, Brinkamm G, ZurHausen H. Seroepidemiological studies and serologic response to viral infection. *Medical Microbiology Immunology*. 1978; 165(73-92).
194. Tornatore C, Berger J, Houff S. Detection of JC virus DNA in peripheral lymphocytes from patients with and without progressive multifocal leukoencephalopathy. *Annals of Neurology*. 1992; 31(454-462).
195. Perrons C, Fox J, Lucas S. Detection of polyomaviral DNA in clinical samples from immunocompromised patients: Correlation with clinical disease. *Journal of Infectology*. 1996; 32(205-209).
196. (EMA), European Medicines Agency. EMA confirms recommendations to minimise risk of brain infection PML with Tysabri. [Online].; 2016 [cited 2018 11 15]. Available from: www.ema.europa.eu/news/ema-confirms-recommendations-minimise-risk-brain-infection-pml-tysabri.
197. Vermersch P, Kappos L, Gold R, Foley J, Olsson T, Cadavid D. Clinical outcomes of natalizumab-associated progressive multifocal leukoencephalopathy. *Neurology*. 2011; 76(1697-1704).
198. Berger J, Aksamit AJ, Clifford D, Davis L, Koralnik I. PML diagnostic criteria. Consensus statement from the AAN Neuroinfectious Disease Section. *American Academy of Neurology*. 2013; 80:1430–1438.
199. Bernal-Cano JF, Joseph JT, Koralnik I. Spinal cord lesions of progressive multifocal leukoencephalopathy in an acquired immunodeficiency syndrome patient. *Journal of Neurovirology*. 2007; 13:474–476.

200. Whiteman ML, Post MJ, Berger JR, Tate LG, Bell MD, Limonte LP. Progressive multifocal leukoencephalopathy in 47 HIV-seropositive patients: neuroimaging with clinical and pathologic correlation. *Radiology*. 1993; 187:233–240.
201. Port JD, Miseljic S, Lee RR. Progressive multifocal leukoencephalopathy demonstrating contrast enhancement on MRI and uptake of thallium-201: a case report. *Neuroradiology*. 1999; 41:895–898.
202. Gyang TV, Hamel J, Goodman AD, Gross RA, Samkoff L. Fingolimod-associated PML in a patient with prior immunosuppression. *Neurology*. 2016; 86(1843-1845).
203. Baharnoori M, Lyons J, Dastagir A, Koralnik I, Stankiewicz JM. Nonfatal PML in a patient with multiple sclerosis treated with dimethyl fumarate. *Neurology Neuroimmunology Neuroinflammation*. 2016; 3(e274).
204. Plavina T, Lee S, Berman M. Longitudinal stability of anti-JC virus antibody status in multiple sclerosis patients: results of STRATIFY-1. *Neurology*. 2013; 80(30.001.).
205. Gorelik L, Bixler S, Lerner M. Assessment of the incidence of anti-JCV antibodies in a cohort of natalizumab-treated patients with multiple sclerosis. *Multiple Sclerosis Journal*. 2010; 16(306-307).
206. O'Connor P, Goodman A, Kappos L. Long-term safety and effectiveness of natalizumab redosing and treatment in the STRATA MS Study. *Neurology*. 2014; 83(78–86).

207. Focus Diagnostics. STRATIFY JCV DxSelect™ prescribing information. [Online].; 2013 [cited 2818 Octubre 10. Available from: <http://www.focusdx.com/pdfs/pi/US/EL1950.pdf>.
208. Bozic C, Richman S, Plavina T. Anti-JCV antibody prevalence in patients with relapsing multiple sclerosis receiving or considering treatment with natalizumab: baseline results of STRATIFY-2. *Neurology*. 2012; 78([Meeting Abstracts 1]:S41.002).
209. Ho PR, Koendgen H, Nolan C, Haddock B, Richman S, Chang I. Risk of natalizumab-associated progressive multifocal leukoencephalopathy in patients with multiple sclerosis: a retrospective analysis of data from four clinical studies. *Lancet Neurology* 2017. 2017; 16(925-933).
210. Plavina T, Subramanyam M, Bloomgren G, Richman S, Pace A. Anti-JC Virus Antibody Levels in Serum or Plasma Further Define Risk of Natalizumab-Associated Progressive Multifocal Leukoencephalopathy. *ANNALS of Neurology*. 2014; 76(802–812).
211. Biogen. estudio TYGRIS. [Online].; 2007 [cited 2019 06 23. Available from: <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT00483847>.
212. Gorelik L, Lerner M, Bixler S, et al. Anti-JC virus antibodies: implications for PML risk stratification. *Annals of Neurology*. 2010; 68:295-303.
213. Olsson T, Achiron A, Alfredsson L. Prevalence of anti-JCV antibodies in a multi-national cohort of multiple sclerosis patients. *Multiple sclerosis journal*. 2011; 17(S134-S135).

214. Frye S, Trebst C, Dittmer U. Efficient production of JC analysis of specific humoral and cellular immune response. *Journal Virology Methods*. 1997; 63(81–92).
215. Weber F, Goldmann C, Kramer M, Kaup F, Pickhardt M. Cellular and humoral immune response in progressive multifocal leukoencephalopathy. *Annals of Neurology*. 2001; 49(636-642).
216. Willoughby E, Price R, Padgett B. Progressive multifocal leukoencephalopathy: In vitro cell mediated immune responses to mitogens and JC virus. *Neurology*. 1980; 30(256-262).
217. Havrdova E, Galetta S, Hutchinson M, Stefoski D, Bates D, Polman CH. Effect of natalizumab on clinical and radiological disease activity in multiple sclerosis: a retrospective analysis of the natalizumab safety and efficacy in relapsing–remitting multiple sclerosis (AFFIRM) study. *Lancet of Neurology*. 2009; 8(254-2260).
218. Kean JM, Rao S, Wang M, Garcea RL. Seroepidemiology of human polyomaviruses. *PLoS Pathogens*. 2009; 5(e1000363).
219. O'Connor PW, Goodman A, Kappos L, Lublin FD, Miller DH, Polman C, et al. Disease activity return during natalizumab treatment interruption in patients with multiple sclerosis. *Neurology*. 2011; 76(1858-1865).
220. Villar L, Costa-Frossard L, Masterman T, Fernandez O, Montalban X, Casanova B, et al. Lipid-Specific Immunoglobulin M Bands in Cerebrospinal Fluid Are Associated with a Reduced Risk of Developing Progressive Multifocal

- Leukoencephalopathy during Treatment with Natalizumab. *Annals of Neurology*. 2015; 77(447-457).
221. Dalton CM, Brex PA, Miszkiel KA, Hickman SJ, MacManus DG, Plant GT, et al. Application of the new McDonald criteria to patients with clinically isolated syndromes suggestive of multiple sclerosis. *Annals of Neurology*. 2002; 52:47–53.
222. Poser CM, Paty DW, Scheinberg L, McDonald WI, Davis FA, Ebers GC, et al. New diagnostic criteria for multiple sclerosis: guidelines for research protocols. *Annals of Neurology*. 1983; 13:227–31.
223. Roxburgh R, Seaman S, Masterman T, al e. Multiple Sclerosis Severity Score: using disability and disease duration to rate disease severity. *Neurology*. 2005; 64(1144–1151).
224. Plavina T, Berman M, Njenga M, al e. Multi-site analytical validation of an assay to detect anti-JCV antibodies in human serum and plasma. *Journal of Clinical Virology*. 2012; 53:65-71.
225. (EMA) EMA. [www.ema.europa.eu](http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/Referrals_document/Tysabri_20/European_Commission_final_decision/WC500202394.pdf). [Online].; 2016 [cited 2017. Available from: http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/Referrals_document/Tysabri_20/European_Commission_final_decision/WC500202394.pdf.
226. Confavreux C, Vukusic S. Chapter 15: The clinical course of multiple sclerosis. In *Handbook of Clinical Neurology*.: Elsevier; 2014. p. Vol. 122.

227. Nuñez E, Ewout W, Steyeberg , Nuñez J. Estrategias para la elaboración de modelos estadísticos de regresión. *Revista española de cardiología*. 2011; 64:501-507.
228. Soelberg P, Bertolotto A, Edan G, Giovannoni G, Gold R, Havrdova E, et al. Risk stratification for progressive multifocal leukoencephalopathy in patients treated with natalizumab. *Multiple Sclerosis Journal*. 2012; 18(143–152).
229. Verbeeck J, Van A, Ryding J, Wollants E, Rans K, Vermeire S. JC viral loads in patients with Crohn's disease treated with immunosuppression: can we screen for elevated risk of progressive multifocal leukoencephalopathy? *Gut*. 2008; 57(1393–1397).
230. Sunyaev S, Lugovskoy A, Simon K, Gorelik L. Adaptive mutations in the JC virus protein capsid are associated with progressive multifocal leukoencephalopathy (PML). *PLoS Genetics*. 2009; 5(e1000368).
231. Pignolet B, N S, Schneider-Hohendorf T, Bucciarelli F, Biotti D, Averseng-Peureaux D, et al. CD62L test at 2 years of natalizumab predicts progressive multifocal leukoencephalopathy. *Neurology*. 2016; 87(2491-2494).
232. Schwab N, Schneider-Hohendorf T, Wiendl H. CD62L is not a reliable biomarker for predicting PML risk in natalizumab-treated R-MS patients. *Neurology*. 2016; 87(958-959).
233. Gaiottino J, Norgren N, Dobson R. Increased neurofilament light chain blood levels in neurodegenerative neurological diseases. *PLoS ONE*. 2013; 8(e75091).

234. Dalla Costa G, Martinelli V, Muiola L, Sangalli F, Colombo B, Finardi A, et al. Serum neurofilaments increase at progressive multifocal leukoencephalopathy onset in natalizumab-treated multiple sclerosis patients. *ANNALS OF NEUROLOGY*. 2019; 00.
235. Alroughani R, Akhtar S, Ahmed S, Al-Hashel J. A longitudinal study of JC virus serostatus stability among multiple sclerosis patients. *Multiple Sclerosis Related Disorders*. 2018; 20(132-135).
236. Outteryck O, Epher H, Salleron J, Ongagna J, Etxeberria A, Collongues N. JC-virus seroconversion in multiple sclerosis patients receiving natalizumab. *Multiple Sclerosis*. 2014; 20(822-829).
237. Deleidi M, Jäggle M, Rubino G. Immune aging, dysmetabolism, and inflammation in neurological diseases. *Frontiers in Neuroscience*. 2015; 9(172).
238. Ouyang Q, Wagner W, Wikby A, Walter S, Aubert Dodi A, Travers P, et al. Large number of dysfunctional CD8 +T lymphocytes bearing receptors for a single dominant CMV epitope in the very old. *Journal of Clinical Immunology*. 2003; 23(247-257).
239. Mahad D, Trapp B, Lassmann H. Pathological mechanisms in progressive multiple sclerosis. *Lancet of Neurology*. 2015; 14(183-193).
240. Du Pasquier RA, Pinschewer DD, Merkler D. Immunological mechanism of action and clinical profile of disease-modifying treatments in multiple sclerosis. *CNS Drugs*. 2014 ; 28(535-558).

241. Egli A, Infanti L, Dumoulin A, Buser A, Samaridis J, Stebler C. Prevalence of polyomavirus BK and JC infection and replication in 400 healthy blood donors. *The Journal of Infectious Diseases*. 2009; 199(837-846).
242. Svenningsson A, Falk E, Celius E, Fuchs S, Schreiber K. Natalizumab Treatment Reduces Fatigue in Multiple Sclerosis. Results from the TYNERGY Trial; A Study in the Real Life Setting. *PLOS ONE*. 2013; 8(8(3): e58643).
243. Goodman A, Rossman H, Bar-Or A, Miller A, Schmierer K, Lublin F, et al. GLANCE. Results of a phase 2, randomized, double-blind, placebo-controlled study. *Neurology*. 2009; 72(806-812).
244. Fox R, Cree B, De Sèze J, Gold R, et al. MS disease activity in RESTORE. A randomized 24-week natalizumab treatment interruption study. *Neurology*. 2014; 82(1491–1498).
245. Kister I, Chamot E, Salter A, Cutter G, Bacon T, Herbert J. Disability in multiple sclerosis: a reference for patients and clinicians. *Neurology*. 2013; 80(1018-1024).
246. Berger J, Major E. Progressive Multifocal Leukoencephalopathy. *Seminars in Neurology*. 1999; 19(2).

