UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE MEDICINA



TESIS DOCTORAL

BÚSQUEDA DE BIOMARCADORES Y NUEVAS DIANAS PARA UNA TERAPIA PERSONALIZADA EN LA ESCLEROSIS MÚLTIPLE

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR PRESENTADA POR:

Alexander Rodero Romero

DIRIGIDA POR:

Luisa María Villar Guimerans

© Alexander Rodero Romero, 2026

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE MEDICINA

PROGRAMA DE INVESTIGACIÓN BIOMÉDICA



TESIS DOCTORAL

BÚSQUEDA DE BIOMARCADORES Y NUEVAS DIANAS PARA UNA TERAPIA PERSONALIZADA EN LA ESCLEROSIS MÚLTIPLE

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR PRESENTADA POR:

Alexander Rodero Romero

DIRIGIDA POR:

Luisa María Villar Guimerans

A mi familia,

AGRADECIMIENTOS

Esta tesis no habría sido posible sin el apoyo y el afecto de todas las personas que me han acompañado a lo largo de este camino. Quiero expresar mi más sincero agradecimiento a quienes, de una u otra manera, han contribuido a hacer posible esta etapa tan significativa de mi vida.

En primer lugar, quiero agradecer a todos los integrantes del grupo de investigación en Esclerosis Múltiple del Hospital Ramón y Cajal por su compromiso y dedicación con la investigación. En particular, a mi directora de tesis, la Dra. Luisa María Villar Guimerans, por brindarme la oportunidad de realizar este trabajo bajo su dirección y por la confianza depositada en mí para llevarlo a cabo. A Noelia Villarrubia, por supervisar los experimentos de esta tesis con tanta dedicación. Sin tu organización, empatía y compañerismo, no habría llegado hasta aquí. Gracias por cuidarme durante este proceso. A José Ignacio Fernández por su paciencia para enseñarme y por ser un mentor ejemplar. A los neurólogos, por su gran labor en el reclutamiento de pacientes y datos clínicos. A Sonia y Cristal, por vuestra amabilidad y disponibilidad con el grupo. A los técnicos de celular e inmunohistoquímica, por vuestra simpatía y comprensión durante mis experimentos. Al resto de los integrantes de los Servicios de Inmunología y Neurología por vuestra colaboración con el grupo. Al grupo del Dr. Reynolds y de la Dra. Magliozzi, por acogerme y enseñarme tanto en su grupo en Londres durante unos meses. Y a los pacientes, ya que sin su colaboración ninguno de los estudios habría sido posible.

A mis queridísimos amigos de inmuno, por acompañarme, entenderme y apoyarme durante este camino. Buena parte de mi doctorado ha cobrado sentido gracias a vuestro cariño y paciencia conmigo. Habéis conseguido que el hospital se convirtiera, en cierta forma, en un hogar para mí.

A lo largo de estos años, también he tenido la fortuna de llamar hogar a varios lugares y personas.

Als meus amics de Calp, us agraïsc de cor per estar sempre ací i per oferir-me un lloc de suport constant. Heu sigut la meua via de fuita, i una part fonamental d'aquestos anys. Tinc la grandíssima sort de mantindre-vos en la meua vida. Poc es pot dir en contra de les nostres amistats, és igual quant temps passe o quanta distància hi haja, que és baixar a Calp i sentir-me una altra

vegada a casa, com si el temps no haguera passat entre nosaltres. Gràcies per tot el que hem viscut. Sou llar, i això no hi ha situació que ho puga canviar. Vos estime.

Als meus amics de Barcelona, per ajudar-me a créixer personalment durant aquest temps. Gràcies pel vostre suport i per potenciar qui veritablement sóc. Sou la família que es tria, i us triaria una i mil vegades. El que ha unit la ciutat que em va canviar la vida ja no hi ha qui ho separi. Com diu Fabio, sou el grup amb qui puc ser el jo més real. Estic convençut que ens anirà a tots molt bé, que ens ho mereixem. Estic molt orgullós de tots vosaltres. Us estimo, i a Barcelona també.

A mis amigos de Madrid. Jamás imaginé que una residencia estudiantil en el extrarradio de Praga me pudiese aportar tanto. Por capricho del destino, la mayoría hemos acabado en la misma ciudad, afianzando unas amistades que ya eran mucho más que simples amistades. Sois quienes habéis estado siempre en primera fila, apoyándome, aconsejándome y acompañándome en cada paso de mi vida y de este proyecto. En este camino no solo habéis estado vosotros, sino también muchas personas que, por un motivo u otro, se han ido sumando al grupo, hasta construir entre todos un hogar en Madrid. Cada uno de vosotros ha sido, y es, una parte esencial de mi vida. Me habéis dado amor, cobijo y alegría. Os habéis convertido en mi familia. Os quiero.

A mi familia, mis tios y primos. Gracias a todos por tratarme como a un hijo y a un hermano más. Siempre estaré agradecido de tener una familía tan unida como la nuestra. Gracias por criarme y quererme incondicionalmente. Vuestro apoyo ha sido un refugio constante, la certeza a la que siempre puedo volver. Desde nuestro Palaciosrubios, donde empezó todo y donde siempre nos encontramos, llevo conmigo vuestras risas, vuestras historias y el calor de nuestra tierra. Mis logros también van por vosotros. Os quiero.

A mi hermano, Cristian, gracias por ser siempre el hermano mayor. Has ejercido ese papel desde que tengo memoria, protegiéndome y ayudándome. Eres un apoyo constante en todos los aspectos de mi vida. Dicen que los hermanos son los amigos que la vida te impone, pero que acaban siendo los que más te sostienen. Y el mío ha estado siempre ahí, con un amor que solo puede venir de un hermano. Siempre he estado orgulloso de ti, pero ahora, viendo lo padrazo que eres, lo estoy aún más. Gracias por poner en mi vida a mi cuñada, Yaiza, que desde que nos conocimos me ha

tratado como a un hermano, y a ambos por hacerme tío de las personas que más quiero en el universo: Thiago y Enzo. Aunque no seáis conscientes del esfuerzo que me ha costado terminar esta tesis, habéis sido mi mayor apoyo. Veros crecer me ha dado la energía y la motivación necesarias para seguir adelante. Habéis sido mi único amor a primera vista. Os quiero con todo mi corazón.

Al amor de mi vida, Fabio. Por ser y por estar. Por llegar cuando menos lo esperaba y quedarte para siempre. Cinco años después de aquel primer encuentro en el Jimmy, seguimos caminando juntos, compartiendo una vida que ya no concibo sin ti. Gracias por tu paciencia infinita, por sostenerme incluso cuando yo no sabía cómo hacerlo, por permanecer a mi lado en mis momentos más oscuros y por enseñarme cada día a ser una mejor persona. Has sido, y eres, mi refugio, mi calma y mi fuerza. Tus abrazos han sido todo lo que he necesitado para no desistir de la tesis. Eres mi pilar, mi compañero de vida y mi ser de luz.

Gracias, mi niño, por dejarme soñar contigo. Has conseguido que crea en el amor y que viva la vida como siempre he querido, libre. Te quiero.

Gracias también por mostrarme la calidez de tu tierra, Canarias, y de su gente, tu familia. Gracias a todos por acogerme como uno más. Sois islas pequeñas, pero de corazón inmenso.

A mis padres, Obdulia y Ramiro, por confiar siempre en mi y permitirme llegar hasta aquí. Sois los mejores padres que una persona podría desear. No estaría donde estoy si no fuese por el esfuerzo que habéis hecho diariamente. Sois un ejemplo a seguir de superación y perseverancia, y por ello os estaré eternamente agradecidos. Ojalá os pudiese devolver una mínima parte de todo lo que me habéis dado. Gracias por vuestro amor infinito. Gracias por estar a mi lado en cada paso de mi vida, esta tesis y todos los logros que consiga van por vosotros. Os quiero.

Finalmente, para mi el mar lo significa todo. No recuerdo dónde escuché una frase que me encantó: el mar siempre tiene la razón. Te enseña cuando es necesario, muchas veces te cura y te sana; otras, te hiere si lo subestimas. Pero una cosa está clara: el mar te da, te da y te da. Y a mi, me lo ha dado todo.

Gracias.

ÍNDICE

RESUMEN ..... -03-

ABREVIATURAS ..... -19-

1. INTRODUCCIÓN ..... -23-

1.1. Definición ..... -25-

1.2. Aspectos históricos ..... -26-

1.3. Epidemiología ..... -28-

1.4. Etiología ..... -30-

1.4.1 Factores genéticos ..... -30-

1.4.2. Factores epigenéticos ..... -31-

1.4.3. Factores ambientales ..... -32-

1.5. Formas clínicas ..... -35-

1.6. Diagnóstico ..... -39-

1.6.1. Criterios de McDonald vigentes ..... -42-

1.7. Tratamiento ..... -42-

1.8. Neuropatología ..... -48-

1.9. Fisiopatología ..... -49-

1.9.1. Sistema inmunitario adaptativo ..... -52-

1.9.2. Sistema inmunitario innato ..... -56-

1.10. Pronóstico ..... -59-

1.10.1. Biomarcadores ..... -62-

1.10.1.1. Biomarcadores en líquido cefalorraquídeo ..... -63-

1.10.1.2. Biomarcadores sanguíneos ..... -65-

2. JUSTIFICACIÓN DE LA TESIS ..... -69-

3. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS ..... -73-

3.1. Hipótesis ..... -75-

3.2. Objetivos ..... -75-

4. PUBLICACIONES ..... -77-

4.1. Objetivo 1: Delimitar los valores normales de sNfL y sGFAP en una cohorte de individuos sanos teniendo en cuenta variables que puedan influir en sus niveles, como la edad, el índice de masa corporal y otras características demográficas y clínicas ..... -79-

4.2. Objetivo 2: Estudiar la respuesta inmunológica celular en sangre periférica en pacientes con EM estratificados por sNfL y sGFAP, y compararlos con individuos sanos ..... -93-

4.3. Objetivo 3: Estudiar factores solubles en suero que podrían estar relacionados con los mecanismos de inflamación, migración celular y reparación que caracterizan a los distintos subtipos de EM definidos por de sNfL y sGFAP, y compararlos con individuos sanos .... -117-

5. DISCUSIÓN ..... -142-

5.1. Establecimiento de valores séricos normales de cadenas ligeras de neurofilamentos y proteína ácida fibrilar glial considerando los efectos de la edad y otros factores demográficos en adultos sanos ..... -145-

5.2. Identificación de factores celulares y moleculares asociados a la inflamación y la neurodegeneración en la esclerosis múltiple ..... -150-

5.3. Nuevos factores solubles en serum que predicen el empeoramiento de la discapacidad inflamatoria y no inflamatoria en la esclerosis múltiple ..... -157-

6. CONCLUSIONES ..... -164-

7. BIBLIOGRAFÍA ..... -168-

8. ANEXO: OTROS ARTÍCULOS PUBLICADOS ..... -210-

RESUMEN

Introducción

La esclerosis múltiple (EM) es una enfermedad autoinmune crónica del sistema nervioso central (SNC), caracterizada por inflamación, desmielinización y neurodegeneración. Clínicamente, se clasifica en formas recidivante-remitente (EMRR), primariamente progresiva (EMPP) y secundariamente progresiva (EMSP). La EMRR, la variante más frecuente, representa alrededor del 85% de los casos y se manifiesta mediante brotes seguidos de recuperación parcial o completa.

En la EM, las lesiones desmielinizantes se originan por la infiltración de células inmunitarias del sistema innato y adaptativo en el SNC. La evidencia actual indica que la activación inicial de linfocitos autorreactivos ocurre en la periferia, posiblemente mediada por mecanismos de mimetismo molecular. Una vez activados, estos linfocitos contribuyen a la disrupción de la barrera hematoencefálica (BHE), lo que facilita su entrada masiva en el SNC. Allí, la liberación de mediadores neurotóxicos y autoanticuerpos impulsa la desmielinización y el daño axonal.

A pesar de los avances en su comprensión, la EM es una enfermedad muy heterogénea, reflejada tanto en su evolución como en sus manifestaciones clínicas, y los mecanismos biológicos subyacentes a esta variabilidad aún no están completamente definidos.

En este contexto, los biomarcadores sanguíneos se han consolidado como herramientas clave para explorar la variabilidad en los procesos inflamatorios y neurodegenerativos característicos de la enfermedad desde etapas tempranas. Entre ellos, destacan la cadena ligera de neurofilamentos sérica (sNfL) y la proteína ácida fibrilar glial sérica (sGFAP por sus siglas en inglés de *glial fibrillary acidic protein*). El sNfL es un marcador sensible de daño axonal agudo y se correlaciona estrechamente con la actividad inflamatoria clínica y radiológica, mientras que la sGFAP refleja la activación astrocitaria y mecanismos relacionados con la neurodegeneración. Pese a su creciente aplicabilidad, la ausencia de valores de referencia validados en individuos sanos teniendo en cuenta factores demográficos relevantes limita la interpretación de sus concentraciones.

Su combinación ha mostrado un notable potencial para estratificar a los pacientes e identificar de forma más precisa el riesgo de empeoramiento, ya sea asociado a recaídas (RAW, por sus siglas en inglés de *relapse-associated worsening*) o independiente de ellas (PIRA por sus siglas en inglés de *progression independent of relapse activity*), incluyendo formas inflamatorias y no inflamatorias vinculadas a la actividad radiológica. Sin embargo, los mecanismos celulares y moleculares asociados siguen siendo objeto de investigación.

Objetivos

Los objetivos de esta tesis fueron:

1) Establecer valores de referencia para sNfL y sGFAP en una cohorte de individuos sanos, teniendo en cuenta variables demográficas que puedan influir en sus niveles.

2) Estudiar la respuesta inmunológica celular en sangre periférica en pacientes con EM estratificados por sNfL y sGFAP, y compararlos con individuos sanos.

3) Estudiar los factores solubles relacionados con la inflamación y la reparación tisular en los grupos de pacientes estratificados según sus niveles de sNfL y sGFAP, y compararlos con individuos sanos

Métodos

Para abordar el primer objetivo, se realizó un estudio transversal y multicéntrico en una cohorte de 116 voluntarios sanos, con edades comprendidas entre 18 y 69 años (67,5% mujeres). Se obtuvieron muestras de suero periférico y se cuantificaron las concentraciones de sNfL y sGFAP mediante la tecnología ultrasensible SIMOA. Se recopilaron variables demográficas básicas y se evaluó su relación con los niveles de ambos biomarcadores utilizando modelos de regresión lineal, análisis de correlación y regresión logística. Se examinaron las diferencias en los niveles de los biomarcadores en los participantes estratificados por grupos de edad.

De cara al segundo objetivo del estudio, se empleó un diseño multicéntrico y transversal centrado en el análisis de perfiles celulares e inmunológicos en sangre periférica de pacientes con EMRR y de individuos sanos y líquido cefalorraquídeo (LCR) únicamente de los pacientes. Se incluyeron 84 participantes sanos y 117 pacientes con EMRR de diagnóstico reciente y libres de tratamiento modificador de la enfermedad. Se obtuvieron muestras de suero y células de todos los participantes. Los niveles séricos de sNfL y de sGFAP se cuantificaron utilizando tecnología ultrasensible SIMOA. Los pacientes fueron estratificados en tres grupos según sus niveles séricos de sNfL y sGFAP: NLGL (ambos biomarcadores bajos), NH (sNfL alto independientemente del sGFAP) y NLGH (sNfL bajo y sGFAP alto). Las subpoblaciones leucocitarias se caracterizaron mediante citometría de flujo y se compararon entre grupos.

Finalmente, para abordar el tercer objetivo del estudio se llevó a cabo un análisis transversal y multicéntrico centrado en moléculas solubles en suero de pacientes con EM y controles sanos. La cohorte incluyó 253 pacientes con EMRR de diagnóstico reciente y libres de tratamiento, así como 180 controles sanos. Los pacientes se estratificaron como en el objetivo previo según sNfL y sGFAP. En este caso, el grupo NH se subdividió en dos grupos, NHGL y NHGH, de acuerdo con niveles bajos y altos de sGFAP, respectivamente. Los niveles de sNfL y sGFAP se cuantificaron mediante SIMOA. La proteómica sérica se analizó con el panel Olink™ 48 Cytokine y se compararon entre grupos.

Resultados

Con respecto al primer objetivo del estudio, el análisis de los biomarcadores en la cohorte de individuos sanos mostró que la edad y IMC influyen en los niveles de sNfL, siendo la edad el factor más determinante. Se observaron cambios en los valores normales de sNfL según la edad, estableciéndose un límite de referencia de <10 pg/mL para personas menores de 45 años y de <15 pg/mL para aquellos mayores. Además, un *Z-score* de 1,5 se consideró relevante para todos los controles, independientemente de la edad. En cuanto a sGFAP, su concentración se vio afectada únicamente por la edad, con diferencias significativas a partir de los 55 años. Los límites de normalidad definidos fueron

de 140 pg/mL para individuos menores de 55 años y de 280 pg/mL para los mayores, proporcionando así un marco de referencia claro para la estratificación de pacientes en los objetivos posteriores.

Con relación al segundo objetivo, todos los pacientes con EM mostraron un patrón inflamatorio común en sangre periférica, caracterizado por un aumento de células T y B efectoras y de memoria, así como de células productoras de citoquinas pro-inflamatorias como el interferón gamma (IFNγ), el factor de necrosis tumoral alfa (TNFα, por sus siglas en inglés de *Tumor necrosis factor alpha*) y la interleuquina 7 (IL-7). El grupo NH, mostró un perfil altamente inflamatorio con reducción de células reguladoras, principalmente de linfocitos T reguladores, junto con un incremento de células *Natural Killer* (NK) $CD56^{dim}$ y linfocitos T $CD4^{+}$ y $CD8^{+}$ productores del factor estimulante de colonias de granulocitos y macrófagos (GM-CSF por sus siglas en inglés de *Granulocyte Macrophage Colony-Stimulating Factor*). Los análisis del LCR reforzaron estas observaciones, mostrando una menor proporción de linfocitos T reguladores en comparación con el grupo NLGL. Este perfil inflamatorio concuerda con su asociación con RAW y PIRA inflamatorio previamente descrito. En contraste, el grupo NLGL presentó valores de células Treg similares a los de los controles sanos y un aumento de células NK $CD56^{dim}$ $NKG2A^{+}$ en sangre, sugiriendo funciones inmunorreguladoras conservadas. El grupo NLGH no mostró alteraciones periféricas destacables, lo que apunta a una inflamación probablemente confinada al SNC.

Finalmente, en cuanto al tercer objetivo, el análisis de moléculas solubles en suero reveló diferencias significativas entre los grupos de pacientes y los controles sanos, relacionadas con los niveles de sGFAP. Los pacientes con sGFAP bajos (NLGL y NHGL) mostraron niveles reducidos de GM-CSF, una citoquina clave en la activación de células innatas. Por el contrario, los pacientes con sGFAP elevado (NHGH y NLGH) presentaron una marcada disminución del factor de crecimiento epidérmico (EGF por las siglas en inglés de E*pidermal growth factor*), implicado en la remielinización y reparación axonal. El grupo NLGH, en particular, mostró reducciones pronunciadas en mediadores esenciales para la activación de la inmunidad adaptativa, así como disminuciones generalizadas en quimiocinas de ligando, especialmente de CCL2. Estos hallazgos sugieren que los pacientes con NLGH presentan una disminución de la inflamación periférica y de la atracción de células inmunitarias, acompañada de una

menor capacidad de reparación tisular. El grupo NLGH exhibe un perfil fisiopatológico diferenciado respecto a los otros grupos, posiblemente vinculado con la aparición de PIRA no inflamatorio en estos pacientes.

Conclusiones

-La edad es el factor que más influye en los niveles de sNfL y sGFAP, lo que permitió definir rangos de normalidad ajustados por edad para ambos biomarcadores.

- Los pacientes con EM comparten un perfil inflamatorio periférico caracterizado por la expansión de linfocitos T y B efectores y de memoria, así como por el aumento de células productoras de citocinas pro-inflamatorias.

-El grupo NH presenta un perfil claramente inflamatorio, con un aumento significativo de NK $CD56^{dim}$, y con pérdida de control inmunológico periférico y en LCR, tal y como muestra la disminución de Treg.

-El grupo NLGL mantiene un mejor equilibrio inmunológico, pero presenta las capacidades de reparación reducidas.

-El grupo NLGH no muestra cambios periféricos evidentes, lo que sugiere una inflamación limitada al SNC. Estos pacientes presentan además una reducción de EGF y de quimiocinas como CCL2, lo que indica una menor capacidad de reparación y menor reclutamiento inmunitario que podría estar relacionado con PIRA no inflamatorio.

-La combinación de sNfL y sGFAP permite identificar distintos mecanismos biológicos implicados en la progresión de la discapacidad en la EM.

ABSTRACT

Introduction

Multiple sclerosis (MS) is a chronic autoimmune disease of the central nervous system (CNS), characterised by inflammation, demyelination and neurodegeneration. Clinically, it is classified into relapsing-remitting (RRMS), primary progressive (PPMS) and secondary progressive (SPMS) forms. RRMS, the most common variant, represents about 85% of cases and presents as relapses followed by partial or complete recovery.

In MS, demyelinating lesions are caused by the infiltration of innate and adaptive immune cells into the CNS. Current evidence indicates that the initial activation of autoreactive lymphocytes occurs in the periphery, possibly mediated by molecular mimicry mechanisms. Once activated, these lymphocytes contribute to the disruption of the blood-brain barrier (BBB), facilitating their massive entry into the CNS. There, the release of neurotoxic mediators and autoantibodies drives demyelination and axonal damage.

Despite advances in our understanding, MS is a highly heterogeneous disease, reflected in both its progression and clinical manifestations, and the biological mechanisms underlying this variability are not yet fully defined.

In this context, blood biomarkers have emerged as key tools for exploring the variability in the inflammatory and neurodegenerative processes characteristic of the disease from early stages. Among these, serum neurofilament light chain (sNfL) and serum glial fibrillary acidic protein (sGFAP) are particularly noteworthy. sNfL is a sensitive marker of acute axonal damage and correlates closely with clinical and radiological inflammatory activity, while sGFAP reflects astrocytic activation and neurodegeneration-related mechanisms. Despite their growing applicability, the absence of validated reference values in healthy individuals, considering relevant demographic factors, limits the interpretation of their concentrations.

The combination of these two markers has shown a notable potential in stratifying patients and identifying the risk of worsening in a more accurate way, either associated with relapses (RAW) or independent of them (PIRA), including inflammatory and non-inflammatory forms linked to radiological activity. However, the underlying cellular and molecular mechanisms remain under investigation.

Objectives

The objectives of this thesis were:

1) To establish reference values for sNfL and sGFAP in a healthy cohort, taking into account demographic variables that may influence their levels.

2) To study the cellular immune response in peripheral blood in MS patients stratified by sNfL and sGFAP, and compare them with healthy individuals.

3) To study soluble factors related to inflammation and tissue repair in patient groups stratified according to their sNfL and sGFAP levels, and compare them with healthy individuals.

Methods

To address the first objective, a cross-sectional, multicenter study was conducted in a cohort of 116 healthy volunteers aged between 18 and 69 years (67.5% women). Peripheral serum samples were obtained, and sNfL and sGFAP concentrations were quantified using ultrasensitive SIMOA technology. Basic demographic variables were collected, and their relationship with the levels of both biomarkers was evaluated using linear regression models, correlation analysis, and logistic regression. Differences in biomarker levels were examined in participants stratified by age groups.

For the second objective of the study, a multicenter, cross-sectional design was used, focusing on the analysis of cellular and immunological profiles in peripheral blood from patients with RRMS and

healthy individuals, and cerebrospinal fluid (CSF) from patients only. Eighty-four healthy participants and 117 patients with newly diagnosed RRMS free of disease-modifying treatment were included. Serum and cell samples were obtained from all participants. Serum levels of sNfL and sGFAP were quantified using ultrasensitive SIMOA technology. Patients were stratified into three groups according to their serum sNfL and sGFAP levels: NLGL (both biomarkers low), NH (sNfL high regardless of sGFAP), and NLGH (sNfL low and sGFAP high). Leukocyte subpopulations were analyzed by flow cytometry and compared between groups.

Finally, to address the third objective of the study, a cross-sectional, multicenter analysis was conducted on serum-soluble molecules in patients with MS and healthy controls. The cohort included 253 patients with newly diagnosed RRMS who were treatment-free, as well as 180 healthy controls. Patients were stratified as in the previous objective according to sNfL and sGFAP. In this case, the NH group was divided into two groups, NHGL and NHGH, according to low and high levels of sGFAP, respectively. sNfL and sGFAP levels were quantified using SIMOA. Serum proteomics were analysed with the Olink™ 48 Cytokine panel and compared between groups.

Results

With regard to the first objective of the study, analysis of biomarkers in the cohort of healthy individuals showed that age and BMI influence sNfL levels, with age being the most determining factor. Changes in normal sNfL values were observed according to age, with a reference limit of <10 pg/mL for people under 45 years of age and <15 pg/mL for those over 45. In addition, a Z-score of 1.5 was considered relevant for all controls, regardless of age. As for sGFAP, its concentration was affected only by age, with significant differences from the age of 55 onwards. The defined normal limits were 140 pg/mL for individuals under 55 years of age and 280 pg/mL for those over 55, thus providing a clear reference framework for the stratification of patients in subsequent objectives.

Regarding the second objective, all MS patients showed a common inflammatory pattern in peripheral blood, characterised by an increase in effector and memory T and B cells, as well as cells producing

proinflammatory cytokines such as interferon gamma (IFNγ), tumour necrosis factor alpha (TNFα) and interleukin 7 (IL-7). The NH group showed a highly inflammatory profile with a reduction in regulatory cells, mainly regulatory T lymphocytes, together with an increase in Natural Killer (NK) cells and granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF)-producing $CD4^+$ and $CD8^+$ T lymphocytes. CSF analyses reinforced these observations, showing a lower proportion of regulatory T cells compared to the NLGL group. This inflammatory profile is consistent with its association with RAW and inflammatory PIRA, as previously described. In contrast, the NLGL group had Treg cell values similar to those of healthy controls and an increase in $CD56^{dim}$ $NKG2A^+$ NK cells in the blood, suggesting preserved immunoregulatory functions. The NLGH group showed no remarkable peripheral alterations, suggesting a likely CNS-confined inflammation.

Finally, regarding the third objective, the analysis of soluble molecules in serum revealed significant differences between the patient groups and healthy controls, related to sGFAP levels. Patients with low sGFAP (NLGL and NHGL) showed reduced levels of GM-CSF, a key cytokine in the activation of innate cells. In contrast, patients with elevated sGFAP (NHGH and NLGH) showed a marked decrease in epidermal growth factor (EGF), which is involved in remyelination and axonal repair. The NLGH group, in particular, showed pronounced reductions in mediators essential for adaptive immunity activation, as well as generalised decreases in ligand chemokines, especially CCL2. These findings suggest that patients with NLGH have reduced peripheral inflammation and immune cell attraction, accompanied by a lower capacity for tissue repair. The NLGH group exhibits a distinct pathophysiological profile compared to the other groups, possibly linked to the onset of non-inflammatory PIRA in these patients.

Conclusions

-Age is the factor that most influences sNfL and sGFAP levels, which allowed age-adjusted normal ranges to be defined for both biomarkers.

- MS patients share a peripheral inflammatory profile characterised by the expansion of effector and memory T and B lymphocytes, as well as an increase in pro-inflammatory cytokine-producing cells.

-The NH group has a clearly inflammatory profile, with a significant increase in CD56dim NK cells and loss of peripheral and CSF immune control, as shown by the decrease in Treg cells.

-The NLGL group maintains a better immune balance but has reduced repair capabilities.

-The NLGH group shows no obvious peripheral changes, suggesting inflammation limited to the CNS. These patients also show a reduction in EGF and chemokines such as CCL2, indicating reduced repair capacity and reduced immune recruitment, which could be related to non-inflammatory PIRA.

-The combination of sNfL and sGFAP allows the identification of different biological mechanisms involved in the progression of disability in MS.

ABREVIATURAS

ARN	Ácido ribonucleico
ARNm	Ácido ribonucleico mensajero
BHE	Barrera hematoencefálica
BOC	Bandas oligoclonales
BOCG	Bandas oligoclonales de inmunoglobulina G
BOCM	Bandas oligoclonales de inmunoglobulina M
BOCMLE	Bandas oligoclonales de inmunoglobulina M lípido específicas
CCL	*C-C Motif Chemokine Ligand*
CHI3L1	*Chitinasa 3-like 1*
CS	Controles sanos
DIS	Diseminación en espacio
DIT	Diseminación en tiempo
EAE	*Experimental autoimmune encephalomyelitis*
EBNA-1	*Epstein-Barr virus nuclear antigen*
EDSS	*Expanded Disability Status Scale*
EGF	*Epidermal Growth Factor*
EM	Esclerosis múltiple
EMPP	Esclerosis múltiple primariamente progresiva
EMPR	Esclerosis múltiple progresiva-recidivante
EMRR	Esclerosis múltiple recidivante remitente
EMSP	Esclerosis múltiple secundariamente progresiva
FLT3LG	*Fms-related tyrosine kinase 3 ligand*
GFAP	*Glial fribillary acidic protein*
GlialCAM	*Glial Cell Adhesion Molecule*
GM-CSF	*Granulocyte Macrophage Colony-Stimulating Factor*
HLA	*Human leukocyte antigen*
IFNβ	Interferón beta
IFNγ	Interferón gamma
Ig	Inmunoglobulina
IL	Interleuquina

IMC	Índice de masa corporal
LCR	Líquido cefalorraquídeo
LMP	Leucoencefalopatía multifocal progresiva
MMP	Metaloproteinasa de matriz
NfL	Cadena ligera de los neurofilamentos
NK	Células Natural Killer
Nrf2	*Nuclear Factor Erythroid 2-Related Factor 2*
PD-L1	*Programmed Death-Ligand 1*
PRL	*Paramagnetic iron rim lesions*
PIRA	*Progression independent of relapse activity*
RAW	*Relapse-associated worsening*
RM	Resonancia Magnética
S1PR	Sphingosine-1-Phosphate Receptor
SCA	Síndrome clínicamente aislado
SEL	*Slowly expanding lesions*
SRA	Síndrome radiológico aislado
SIMOA	*Single Molecule Array*
SIT	Síntesis intratecal
SNC	Sistema nervioso central
sGFAP	*Glial fribillary acidic protein* en suero
sNfL	Cadena ligera de los neurofilamentos en suero
TGFβ	*Transforming growth factor beta*
TME	Tratamiento modificador de la enfermedad
TNFα	*Tumor necrosis factor alpha*
TNFSF12	*TNF superfamily member 12*
Treg	Célula T reguladora
TWEAK	*TNF-related weak inducer of apoptosis*
VCAM-1	*Vascular cell adhesion molecule 1*
VEB	Virus Epstein Barr
VLA-4	*Very late antigen-4*

1.INTRODUCCIÓN

1.1. DEFINICIÓN

La esclerosis múltiple (EM) es una enfermedad autoinmune crónica del sistema nervioso central (SNC) que cursa con inflamación, desmielinización y neurodegeneración [1]. La enfermedad afecta a más de 2,9 millones de personas en el mundo, y en países desarrollados supone la principal causa no traumática de discapacidad en adultos jóvenes [2]. La edad de debut más frecuente es entre los 15 y los 45 años [2,3], aunque en menor medida también se observan debuts en casos pediátricos [4] y en población mayor de 50 años [5]. Como sucede en un gran número de enfermedades autoinmunes, tiene un predominio femenino, ya que afecta de 2 a 3 veces más a mujeres que a hombres [1,3].

Las causas de la EM no están del todo establecidas, pero se han identificado ciertos factores, tanto genéticos como ambientales, que aumentan la probabilidad de desarrollarla [6]. Entre los factores genéticos, destaca la fuerte asociación de la enfermedad con alelos del complejo principal de histocompatibilidad (HLA por sus siglas en inglés de *Human Leukocyte Antigen*), particularmente el HLA-DRB1*15:01, así como con otros loci que participan en funciones mayoritariamente inmunológicas, lo que sugiere una base poligénica compleja [7]. También se han identificado factores ambientales, como los niveles de vitamina D, la infección por el virus de Epstein-Barr (VEB), la obesidad, el tabaquismo y la latitud geográfica [8]. Así mismo, se asocia la enfermedad con un déficit de células T reguladoras (Treg), que desempeñan un papel clave en el mantenimiento de la tolerancia inmunológica [9].

La EM se caracteriza por la aparición de lesiones desmielinizantes focales en distintas áreas del SNC, las cuales son responsables de los principales síntomas, que incluyen problemas visuales, ataxia, debilidad en las extremidades y déficits sensoriales. Estas lesiones se originan a partir de un proceso inflamatorio mediado por el sistema inmunitario, en el que participan tanto células del sistema inmunitario adaptativo como del innato, que atraviesan la barrera hematoencefálica (BHE) y atacan antígenos específicos de la mielina, así como las células encargadas de su mantenimiento, como los oligodendrocitos [1,6].

Clínicamente, la EM se clasifica en las formas recidivante-remitente (EMRR) y primariamente progresiva (EMPP). La forma más común de EM es la EMRR, que representa el 85% de los casos. Se caracteriza por episodios de empeoramiento conocidos como brotes, seguidos de periodos de recuperación parcial o completa. Con el tiempo, una gran parte de los pacientes con EMRR evolucionan hacia la forma secundariamente progresiva (EMSP), la cual se manifiesta como un avance constante de la discapacidad, con o sin brotes sobreañadidos. La EMPP representa aproximadamente un 15% de los pacientes con EM. Se caracteriza por una progresión continua de la discapacidad neurológica sin brotes [10,11].

La EM es una enfermedad altamente variable tanto en su evolución como en sus manifestaciones clínicas. Los pacientes experimentan una evolución heterogénea de la discapacidad, que puede asociarse o no a la presencia de brotes [12]. Dado que el avance de la discapacidad es en su mayoría irreversible en la EM, es crucial identificar a los pacientes con mayor riesgo de desarrollar una forma más agresiva de la enfermedad desde las primeras etapas y estudiar los mecanismos fisiopatológicos que la inducen, lo que permitirá implementar el tratamiento modificador de la enfermedad (TME) más adecuado.

1.2. ASPECTOS HISTÓRICOS

Aunque las primeras observaciones de lesiones desmielinizantes fueron documentadas con anterioridad [13], no fue sino hasta 1868 cuando el doctor Jean-Martin Charcot realizó la primera descripción clínica y anatómica de un paciente vivo con EM. La enfermedad fue denominada como “esclerosis en placas” hasta 1954 [14].

En 1884, el doctor Pierre Marie, discípulo de Charcot, observó que los pacientes con “esclerosis en placas” empeoraron después de procesos infecciones o episodios febriles [15], lo que asoció por primera vez la relación entre la EM y las infecciones virales. Posteriormente, en 1935, Thomas M. Rivers desarrolló el modelo experimental de la enfermedad, conocido como encefalomielitis autoinmune experimental (EAE por sus siglas en inglés de *experimental autoimmune encephalomyelitis*), y

demostró por primera vez la capacidad de células inmunitarias para dañar el cerebro, sugiriendo así la hipótesis del origen autoinmune de la EM [16].

En cuanto a los avances diagnósticos, Heinrich I. Quincke realizó la primera punción lumbar en 1891 para extraer líquido cefalorraquídeo (LCR) con fines diagnósticos y terapéuticos [17]. Sin embargo, no fue hasta 1942 cuando se detectó un aumento de inmunoglobulina (Ig) G (IgG) en el LCR de pacientes con EM, lo que respaldó el papel del sistema inmunológico en la fisiopatología de la enfermedad [18]. John F. Kurtzke desarrolló en 1955 la primera escala para medir el grado de discapacidad en pacientes con EM, conocida como *Disability Status Scale* [19]. Años más tarde, en 1983, Kurtzke mejoró su escala y la renombró como Escala Expandida del Estado de Discapacidad (EDSS por sus siglas en inglés de *Expanded Disability Status Scale*), que sigue siendo el estándar actual para evaluar la discapacidad (Figura 1) [20].

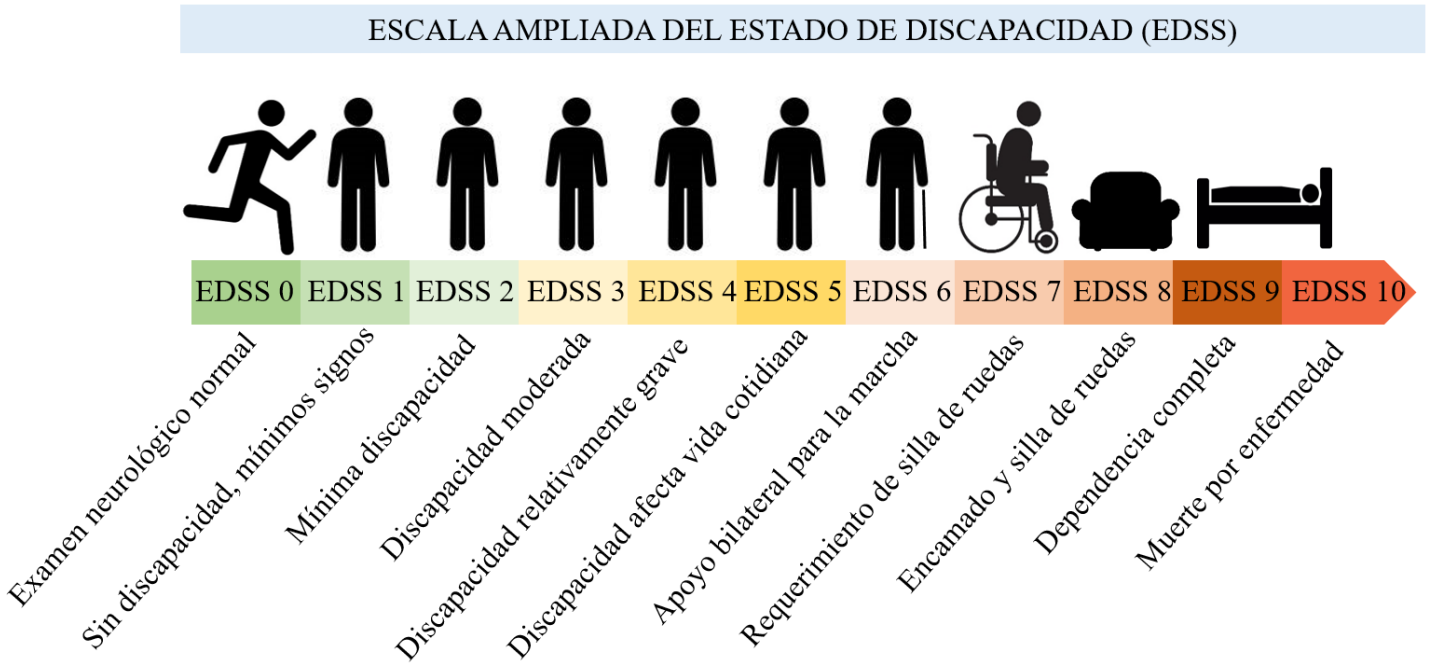


Figura 1. Representación gráfica de la escala EDSS. Basada en: Kurtzke JF. Rating neurologic impairment in multiple sclerosis: an expanded disability status scale (EDSS). Neurology. 1983;33(11):1444-1452. doi:10.1212/wnl.33.11.1444 [20].

Los primeros criterios diagnósticos de la EM fueron presentados en 1954 por Sydney Allison y Harold Millard [21], pero debido a su subjetividad, fueron sustituidos en 1965 por los de George A. Schumacher. En 1983 los criterios de Poser introdujeron por primera vez el estudio del LCR en los criterios diagnósticos de la EM [22]. La introducción de la resonancia magnética (RM) supuso un punto de inflexión en la comprensión de la EM, al permitir detectar las lesiones del SNC de forma no invasiva [23]. A partir de 2001, en los criterios de McDonald, la RM se consolidó como una herramienta fundamental para el diagnóstico de la EM [24]. Los criterios de McDonald son los principales referentes actuales para el diagnóstico y se revisan de forma periódica para incorporar los nuevos avances en la enfermedad. La revisión más reciente, la de 2024, se ha publicado a finales de 2025 [25,26].

1.3. EPIDEMIOLOGÍA

En diciembre de 2020, la Organización Mundial de la Salud (OMS) publicó la tercera edición de su atlas sobre la EM, proporcionando una actualización de los datos epidemiológicos de las ediciones previas de 2008 y 2013 (Figura 2). Según este informe, la prevalencia mundial estimada de la EM es de 36 personas por cada 100.000 habitantes, lo que equivale a una persona afectada por cada 2.800 habitantes a nivel global, y un total aproximado de 2,9 millones de personas afectadas por esta enfermedad en todo el mundo. El incremento significativo en el número de casos, en comparación con los 2,1 millones registrados en 2008 y los 2,3 millones estimados en 2013 [2,27], se atribuye a varias causas, entre ellas la mejora de los métodos de recolección de datos a nivel nacional e internacional, el perfeccionamiento de las técnicas diagnósticas y el aumento de la esperanza de vida de los pacientes con EM [28].

En cuanto a los estudios de prevalencia realizados en España, los primeros análisis datan de 1968, y en ellos se reportaron cifras significativamente inferiores a las actuales. Durante la década de 1980, varios estudios estimaron una prevalencia de entre 5 y 20 casos de EM por cada 100.000 habitantes [29,30]. No obstante, no fue hasta la década de 1990 cuando se publicaron estudios con mayor precisión metodológica, en los cuales la prevalencia se situaba en torno a los 60 casos por cada 100.000 habitantes

[30-32]. A partir del año 2000, las cifras de prevalencia se han estabilizado en niveles afines a los actuales, con datos que indican una prevalencia que oscila entre 80 y 180 casos de EM por cada 100.000 individuos [30-35]. El estudio de 2020 de la OMS estimó una prevalencia en España de 120 casos por cada 100.000 habitantes, lo que equivale aproximadamente a una persona afectada por cada 800 habitantes [27].

Es importante destacar que la prevalencia de la EM no presenta una distribución geográfica homogénea. Estudios previos han demostrado una correlación significativa entre la prevalencia de la enfermedad y la latitud geográfica, observándose un incremento de la prevalencia a medida que se aumenta la distancia respecto al ecuador [35,36]. Este fenómeno ha sido asociado a factores ambientales, como la exposición a la radiación solar y, consecuentemente, a los niveles de vitamina D, y la trasmisión genética asociada a las migraciones [6,37]. En este sentido, varios estudios han concluido que las personas menores de 15 años que migran a zonas con diferente prevalencia adoptan la prevalencia del lugar de destino, mientras que los individuos que se trasladan en la edad adulta tienden a mantener la prevalencia de su lugar de origen [1,37,38].

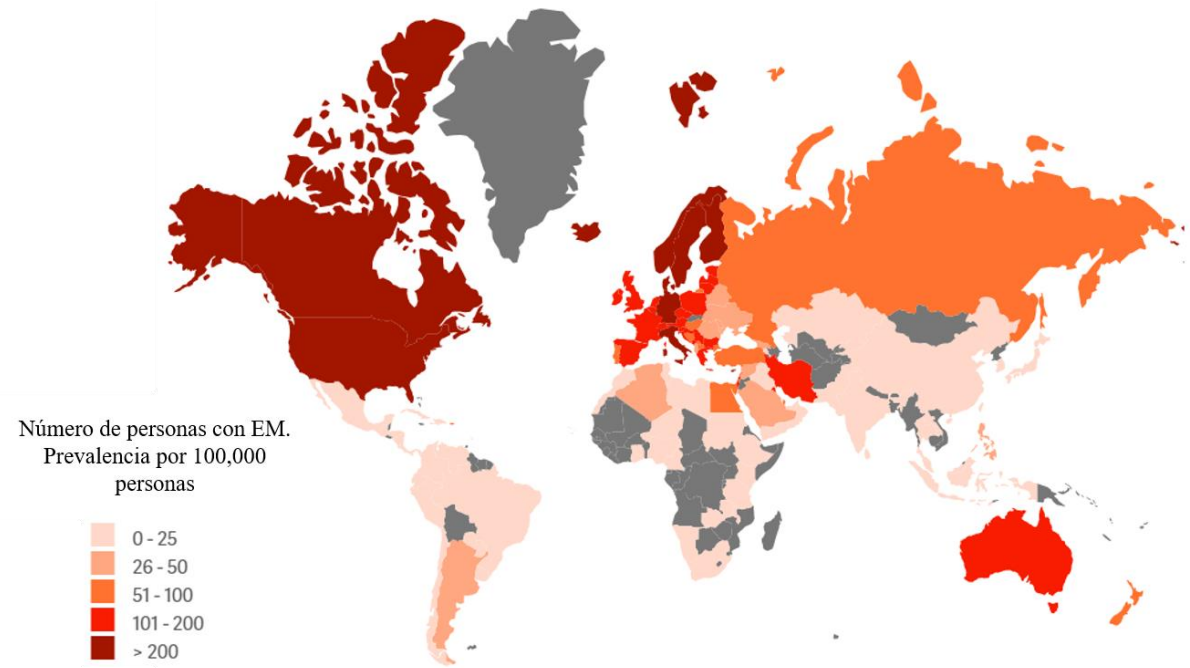


Figura 2. Prevalencia mundial de la EM. Modificada de: Federación Internacional de Esclerosis Múltiple, Atlas de EM, 3.ª Edición, septiembre de 2020, https://www.atlasofms.org/

Así mismo, la EM muestra una prevalencia significativamente mayor en mujeres, una tendencia que ha ido incrementándose desde 1955. En ese año, la relación entre mujeres y hombres afectados era de 1,4:1, mientras que para el año 2000 esta ratio había aumentado a 2,3:1 [39,40]. No obstante, esta diferencia no se observa en los pacientes con EMPP, donde la prevalencia es similar entre ambos sexos [41]. La edad promedio de aparición de la enfermedad se sitúa entre los 28 y 31 años, con un rango de presentación más habitual entre los 15 y 45 años, siendo las formas pediátricas y de inicio tardío menos frecuentes [3-5,42]. Aun así, existen variaciones en la edad de inicio según la forma clínica de la EM. En el caso de la EMRR los síntomas suelen aparecer entre los 25 y 29 años, mientras que la EMPP se presenta típicamente alrededor de los 39 a 41 años [43].

La incidencia y prevalencia de la EM también varía en función de otros factores como los raciales, ya que suele ser más común entre personas de la raza caucásica [44-45]. Ciertos grupos étnicos, como los gitanos, esquimales, lapones y aborígenes australianos, presentan un riesgo extremadamente bajo de desarrollar la enfermedad a lo largo de su vida [27,46].

1.4. ETIOLOGÍA

La causa de la EM es a día de hoy desconocida, aunque todos los estudios apuntan a un origen multifactorial, en el que la combinación de diversos factores aumenta el riesgo de padecer la enfermedad. La predisposición puede explicarse tanto con componentes genéticos, epigenéticos como ambientales [1,37,47].

1.4.1 Factores genéticos

El componente genético desempeña un papel fundamental en la susceptibilidad a padecer la EM, como lo demuestran estudios epidemiológicos en familiares [48]. La prevalencia de la enfermedad en la población general es de entre el 0.1% y el 0.3% pero aumenta hasta un 3.5% en familiares de primer grado [49,50]. La evidencia del impacto genético moderado se observa gracias al estudio de gemelos monocigóticos y dicigóticos. Mientras que los gemelos dicigóticos presentan una concordancia de en

torno al 5%, los gemelos monocigóticos presentan una concordancia clínica de alrededor del 30% [51,52]. El hecho de que la concordancia no sea completa, resalta la importancia de los factores ambientales en el desarrollo de la enfermedad.

El modelo genético que mejor explica la predisposición en la EM es el modelo poligenético, según el cual no existe un único gen responsable de la enfermedad, sino que múltiples variantes genéticas contribuyen de forma modesta y colectiva al riesgo de desarrollarla [53,54]. Las asociaciones más fuertes se han establecido con el HLA, que codifica proteínas implicadas en la presentación antigénica. El alelo *HLA-DRB1*15:01* se ha identificado como el factor genético de riesgo más fuerte para la EM, con un riesgo tres veces superior para los portadores [54,55]. Sin embargo, es importante señalar que el *HLA-DRB1 15:01* por sí solo no es suficiente para causar la enfermedad, y que la interacción con ciertos factores ambientales, como infecciones virales o deficiencia de vitamina D, aumenta aún más el riesgo de desarrollar EM para los portadores del alelo [56]. La presencia del elemento de respuesta a la vitamina D (VDRE) ubicada en la región promotora de algunos HLA-DRB1 corrobora las implicaciones de estas interacciones [57]. Otros alelos como el HLA-DRB1*03:01, HLA-DRB1*13:03 y *HLA-DQB1*03:02* se han asociado también con un mayor riesgo de padecer la enfermedad [58], mientras que otros como el *HLA-A*02:01* o el *HLA-B*44:02* se han asociado a un menor riesgo [50,59].

La investigación en genética de la EM ha avanzado significativamente en las últimas décadas, gracias a estudios de GWAS y análisis de polimorfismos, que han identificado más de 200 polimorfismos asociados al riesgo de desarrollar la enfermedad, proporcionando una mejor comprensión de su compleja base genética [60,61]. Muchos de estos polimorfismos se localizan en genes relacionados con la regulación y función del sistema inmunitario, lo que refuerza la implicación de mecanismos inmunológicos en la patogénesis de la enfermedad [7,60].

1.4.2 Factores epigenéticos

La epigenética juega un papel fundamental en la mediación entre los factores genéticos y ambientales que influyen en la susceptibilidad de padecer EM. Las modificaciones epigenéticas como la metilación del ADN, la modificación postraduccional de histonas y la regulación de micro ácidos ribonucleicos

(ARN) permiten la alteración de la expresión génica sin modificar directamente la secuencia del ADN, lo que puede tener un impacto significativo en los procesos biológicos que caracterizan a la EM [62].

La metilación del ADN implica la adición de un grupo metilo a la citosina de los dinucleótidos CpG, generalmente resultando en la supresión de la expresión génica [62,63]. En el contexto de la EM, se observado que el grado de metilación del ADN en regiones vinculadas a la expresión del alelo HLA DRB1*15:01 se ha relacionado con la incidencia de la EM [64]. Asimismo, también se ha observado que la hipermetilación de ciertos genes que regulan la integridad de la BHE está asociada con un aumento de su permeabilidad y la infiltración de células inmunitarias en el SNC [62,65].

Las modificaciones post-traduccionales de histonas, como la acetilación y la metilación, parecen jugar un papel importante en el desarrollo de la EM [62]. El aumento en la acetilación de las histonas en los oligodendrocitos, por ejemplo, se ha asociado con una reducción de la diferenciación de estas células, afectando a su capacidad de reparación de la mielina en las lesiones de EM [62,66].

Finalmente, los microARNs, que son pequeños ácidos ARN no codificantes que se unen a ARN mensajeros (ARNm) específicos generando su degradación o la inhibición de su traducción [67], están también asociados a la enfermedad [62,68]. En la EM, se ha observado que el patrón de expresión genética implicado en la inflamación difiere del de los controles sanos (CS), debido, en parte, a la sobreexpresión de microARNs involucrados en su regulación [69,70].

1.4.3 Factores ambientales

Los factores ambientales juegan un papel crucial en la susceptibilidad a desarrollar la enfermedad. Se han descrito varios factores que influyen de manera significativa en la aparición y en la progresión de la EM (Figura 3).

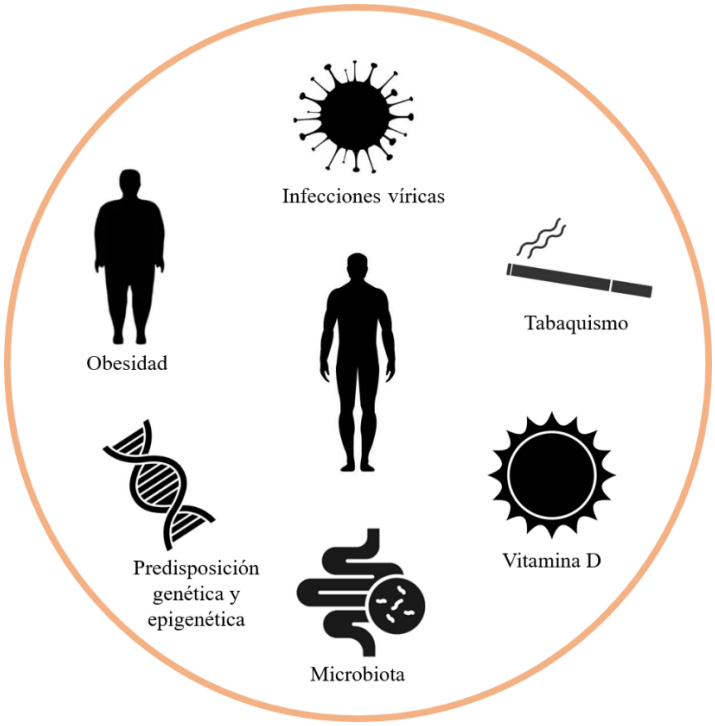


Figura 3. Factores de riesgo para el desarrollo de la EM. Adaptada de: Landry RL, Embers ME. The Probable Infectious Origin of Multiple Sclerosis. *NeuroSci*. 2023;4(3):211-234. doi:10.3390/neurosci4030019

·*Infecciones víricas*

Entre los factores ambientales implicados en la susceptibilidad a la EM, las infecciones virales, y en particular la producida por el VEB, destacan por su fuerte asociación con el riesgo de desarrollar la enfermedad [71].

Este virus, responsable en la mayoría de los casos de la mononucleosis infecciosa, infecta aproximadamente al 85–90 % de la población en los países occidentales, y se ha detectado en prácticamente la totalidad de los pacientes con EM, lo que sugiere que constituye un factor necesario para el desarrollo de la enfermedad [71,72]. Distintos estudios han mostrado que los individuos con antecedente de mononucleosis infecciosa presentan un riesgo significativamente mayor de desarrollar EM [72]. Recientemente, en un estudio longitudinal estadounidense se ha descrito que la seroconversión frente al VEB se asocia con un claro aumento en el riesgo de desarrollar la enfermedad [73]. Asimismo, se ha observado que los pacientes con EM presentan títulos más altos de anticuerpos contra el antígeno nuclear del VEB (EBNA-1, por sus siglas en inglés de *Epstein-Barr virus Nuclear Antigen*), con una

correlación positiva entre el título de anticuerpos y el riesgo de EM [73,74]. Estos hallazgos respaldan la hipótesis de que el VEB es un desencadenante indispensable, aunque no suficiente por sí solo, para el desarrollo de la EM, posiblemente a través de mecanismos como el mimetismo molecular y el control defectuoso por el sistema inmunológico. Uno de los ejemplos más estudiados de mimetismo molecular, en el que el sistema inmunológico confunde los antígenos virales con los propios del SNC, es la similitud estructural entre fragmentos del EBNA-1 y la molécula de adhesión de células gliales (GlialCAM, por sus siglas en inglés de *Glial Cell Adhesion Molecule*). Se ha descrito que en modelos experimentales de EAE, la inmunización con EBNA-1 agrava la enfermedad y, que los pacientes con EM presentan frecuentemente anticuerpos anti-EBNA-1 y anti-GlialCAM [71,75].

El papel de otros virus en la fisiopatología de la EM es menos evidente. En muestras de LCR de pacientes con brote, se han observado niveles elevados de virus del herpes humano 6 [76] y del virus de la varicela-zoster [77], sugiriendo un posible papel de estos virus en el desarrollo de la enfermedad. Sin embargo, la infección por citomegalovirus podría tener un papel protector, con un mayor riesgo entre los individuos no infectados por el virus [78,79].

-Exposición solar y vitamina D

La incidencia de la EM muestra un notable gradiente latitudinal, siendo más alta en regiones alejadas del ecuador. Este patrón se asocia con una menor exposición solar, lo que sugiere un vínculo directo con los niveles de vitamina D, cuya activación depende de la luz ultravioleta [80]. Los estudios observacionales han demostrado una correlación significativa entre los niveles bajos de vitamina D en suero y el mayor riesgo de desarrollar la enfermedad [81,82], así como con una mayor actividad de la misma [83,84]. El posible papel protector de esta vitamina podría ser debido a su papel en la regulación de la respuesta inmunológica, aunque la suplementación en pacientes con EM aún no ha mostrado resultados prometedores [85,86]. Estos hallazgos podrían explicarse en parte a que la baja exposición solar podría también influir en otros mediadores inmunológicos, como la melatonina o diversos metabolitos lipídicos, modulando de manera indirecta la inflamación y la respuesta inmune [87,88].

-Obesidad

La obesidad se ha propuesto como uno de los principales factores ambientales asociados al riesgo de desarrollar EM [89,90], especialmente cuando esta condición se presenta durante la adolescencia [91]. La relación casual no se comprende completamente, pero se ha sugerido que la obesidad provoca una inflamación crónica de bajo grado que altera la función del sistema inmunológico, así como la biodisponibilidad de la vitamina D, lo que podría contribuir a la patogénesis de la enfermedad [92,93].

-Tabaquismo

El tabaquismo se ha postulado como uno de los factores de estilo de vida más fuertemente asociados con el aumento del riesgo de EM [94,95]. El impacto de este factor parece estar mediado por su papel en el sistema inmunológico, ya que el humo del tabaco contiene radicales libres que generan estrés oxidativo, agravando la inflamación [95]. Se ha observado que no solo el riesgo relativo de padecer la enfermedad aumenta entre los fumadores, sino que también presentan una peor progresión de la enfermedad [95,96].

-Otros factores

Aunque los factores ambientales más asociados son los expuestos previamente, la microbiota intestinal ha emergido como un factor clave en la fisiopatología de diferentes enfermedades autoinmunes [97,98]. En pacientes con EM se ha observado disbiosis intestinal, caracterizada por una disminución de géneros bacterianos productores de ácidos grasos de cadena corta (AGCC) [99,100] y un aumento de otros géneros con efectos pro-inflamatorios sobre el sistema inmunológico [97,99]. Otros factores como la ingesta de sal [101,102], el estrés [103,104] y la contaminación ambiental [105,106], también parecen estar relacionados con la fisiopatología de la enfermedad, pero los resultados obtenidos aún no son consistentes.

1.5. FORMAS CLÍNICAS

La EM es una enfermedad con una amplia variabilidad clínica, lo que permite distinguir diferentes formas clínicas de la enfermedad. La primera clasificación fue propuesta en 1996 por el Comité Asesor

sobre Ensayos Clínicos en Esclerosis Múltiple de la Sociedad Nacional de Esclerosis Múltiple de Estados Unidos, que definió cuatro formas clínicas: la EMRR, la EMPP, la EMSP y la EM progresiva-recidivante (EMPR) [10]. Esta clasificación sufrió modificaciones posteriores, en las cuales la EMPR se incluyó dentro de la categoría de EMPP, y se introdujeron nuevos descriptores de actividad y progresión de la discapacidad basados en hallazgos de RM y otros biomarcadores. La actividad se definió como la presencia de brotes y/o el hallazgo de nuevas o aumentadas lesiones hiperintensas en secuencias ponderadas en T2 o lesiones captantes de gadolinio en secuencias ponderadas en T1. La progresión de la discapacidad se estableció como el empeoramiento confirmado de la discapacidad asociado a los brotes o independiente de los mismos [107]. En función de los datos de actividad y progresión, los pacientes con EMRR, EMPP o EMSP se subclasificaron en activos o no activos, y con o sin progresión [11, 107].

El empeoramiento y la progresión de la discapacidad se evalúan mediante exploración física, usando la escala EDSS [107-110]. Sin embargo, a pesar de su uso clínico extendido, la escala EDSS depende de una evaluación subjetiva, puede verse influenciada por factores externos y se centra principalmente en la movilidad del paciente, dejando de lado aspectos como la cognición y la fatiga, que también son síntomas clave de la enfermedad [110]. Por ello, cada vez es más común el uso de escalas más completas, como la EDSS+ y otras herramientas multidimensionales, que ofrecen una valoración más global y precisa de la discapacidad del paciente [111-113].

La acumulación y el aumento de la discapacidad se puede explicar por dos mecanismos principales: asociado a las recaídas (RAW, por las siglas en inglés de *relapse-associated worsening*) y a través de una progresión independiente de la actividad de recaídas (PIRA, por las siglas en inglés de *progression independent of relapse activity*) [13]. Alrededor de un 3%-4% de los pacientes con EM desarrollan PIRA cada año, lo que hace de este fenómeno un importante factor en la acumulación de discapacidad a largo plazo [113,114].

Antes del desarrollo de las distintas formas clínicas de la enfermedad, puede manifestarse un síndrome clínicamente aislado (SCA). Este se define como el primer episodio de síntomas neurológicos atribuible a una lesión desmielinizante en el SNC. Aunque el SCA se considera una forma temprana de la EM, no

todos los pacientes que lo presentan desarrollan la enfermedad. Por tanto, el SCA no se considera una forma clínica de la EM en sí misma, sino el primer evento desmielinizante que puede preceder a su diagnóstico. Tal y como se definía anteriormente, las formas clínicas consideradas actualmente son las siguientes (Figura 4):

-Esclerosis múltiple recidivante-remitente

Forma más común de EM que representa aproximadamente el 85% de los casos. Caracterizada por la presencia de episodios de disfunción neurológica (conocidos como brotes o recaídas), seguidos de períodos de estabilidad clínica con mejoría parcial o completa (remisiones) [115,116].

Los brotes deben durar al menos 24 horas y ocurrir sin presencia de infecciones o alteraciones metabólicas. Los brotes suelen ir acompañados de diversos síntomas, entre los que destacan deterioro visual, debilidad en las extremidades y problemas de equilibrio [25]. Con el tiempo, los episodios pueden dejar secuelas en los pacientes, lo que en casi la mitad de los casos contribuye a un aumento de la discapacidad [117]. A medida que avanza la enfermedad y el paciente envejece, la frecuencia de los brotes tiende a disminuir [118,119]. Sin embargo, en un número considerable de casos, la EMRR no tratada puede evolucionar hacia una forma progresiva, conocida como EMSP [120].

- Esclerosis múltiple secundariamente progresiva

Se caracteriza por un aumento continuado de la discapacidad con o sin brotes sobreañadidos. La definición más usada de la EMSP se ha basado en los últimos años en los criterios de Lublin [107]. Fenotípicamente, la EMSP es heterogénea y cursa con períodos de progresión con posible actividad de recaída superpuesta, pero también con períodos de discapacidad de relativa estabilidad [121]. La definición más comúnmente utilizada del curso de EMSP se basa en el juicio subjetivo del neurólogo tratante que define retrospectivamente la EMSP como una historia de progresión gradual después de un curso inicial de EMRR [122]. Sin embargo, la identificación del momento exacto en el que comienza la transición es complicada debido a la heterogeneidad de la enfermedad, lo que presenta graves implicaciones clínicas [123].

-Esclerosis múltiple primariamente progresiva

La EMPP supone alrededor del 10-15% de los pacientes con EM, caracterizado por un aumento progresivo de la discapacidad desde el inicio de la enfermedad con o sin la presencia de brotes [124]. La progresión no es lineal, sino que la evolución de los pacientes incluye periodos de relativa estabilidad y otros de mayor empeoramiento [125,126]. La incidencia de la enfermedad es similar entre hombres y mujeres [125] y algunos estudios han evaluado que la progresión de la enfermedad se da en paralelo al de la EMSP, lo que sugiere que ambos son un mismo estadio evolutivo, en el cual en uno se observan periodos iniciales de recaídas mientras que en el otro no [125,127].

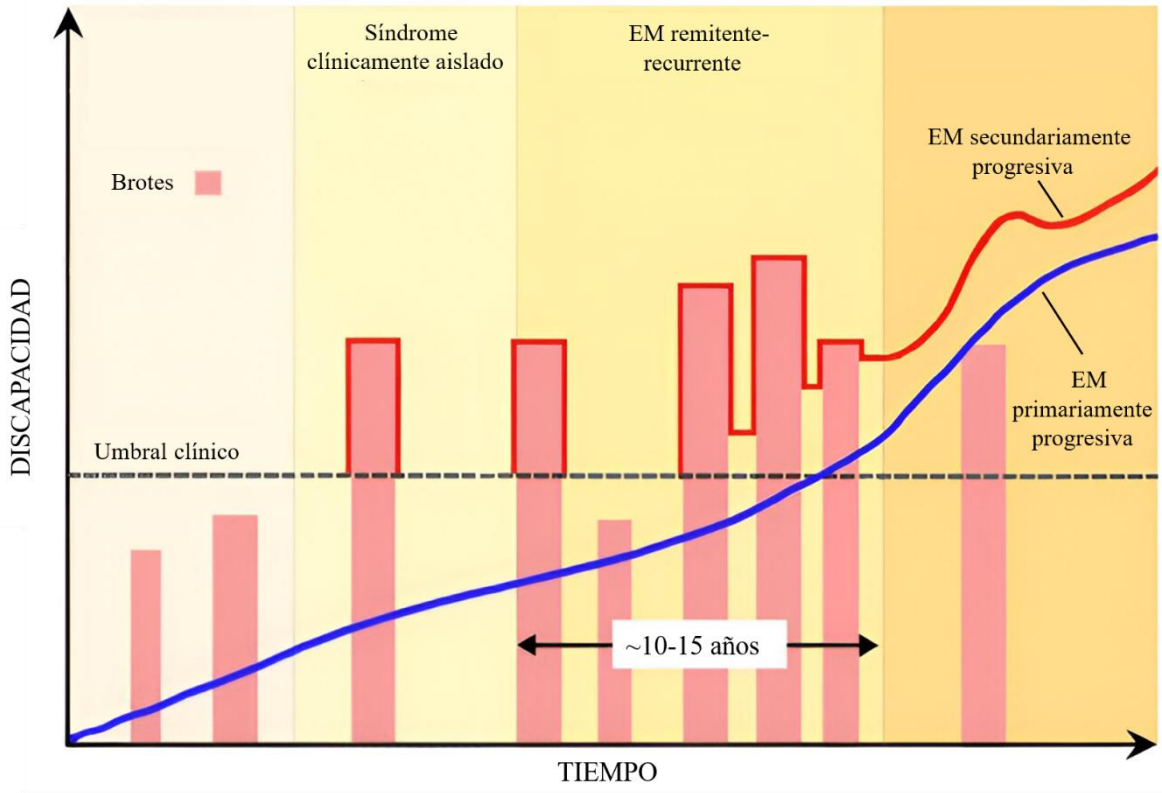


Figura 4. Representación gráfica de las formas clínicas de EM. Adaptada de: Filippi, M., Bar-Or, A., Piehl, F. et al. Multiple sclerosis. Nat Rev Dis Primers 4, 43 (2018). doi: 10.1038/s41572-018-0041-4 [120]

A pesar del actual consenso alcanzado en las formas clínicas propuestas para la EM, en los últimos años se ha intentado redefinir su conceptualización mediante enfoques más integradores que reflejen con mayor precisión la complejidad biológica y la heterogeneidad de su curso. Recientemente, se ha propuesto una reclasificación de la EM basada en inteligencia artificial que replantea la visión tradicional de la enfermedad como un conjunto de subtipos discretos e introduce el concepto de

continuidad en su evolución. Según esta nueva perspectiva, la EM abarca un espectro que va desde estados tempranos o leves, caracterizados por mínima discapacidad y escaso daño cerebral, hasta fases avanzadas con discapacidad moderada o alta, elevada carga lesional y progresión independiente de los brotes. La transición hacia etapas más avanzadas se asocia con la acumulación progresiva de daño cerebral mediada por procesos inflamatorios, tanto clínicamente evidentes como subclínicos, y presenta escasa probabilidad de reversión. Esta nueva clasificación redefine la EM como un proceso continuo y dinámico, con implicaciones relevantes para la estratificación de pacientes y el desarrollo más eficiente de terapias dirigidas [115]. En conjunto, estas aproximaciones refuerzan la idea de que las formas clínicas de la EM deben entenderse como un proceso evolutivo, dinámico y continuo.

1.6. DIAGNÓSTICO

Desde la década de 1950 se han desarrollado diversos criterios diagnósticos para la EM, los cuales han mejorado progresivamente la sensibilidad y la especificidad, permitiendo un diagnóstico más rápido y preciso. Hasta agosto de 2025, los criterios vigentes para el diagnóstico de la EM eran los de McDonald 2017 [25]. Posteriormente, con la publicación de los criterios McDonald 2024, se introdujeron modificaciones importantes para permitir un diagnóstico más temprano y preciso de la EM [26]. Los criterios utilizados para el diagnóstico de los pacientes incluidos en los ensayos de esta tesis doctoral fueron los de 2017, vigentes durante la realización de la misma (resumidas en la Tabla 1).

Dado que no existe una característica patognomónica específica de la EM, el diagnóstico se basa en la combinación de criterios clínicos y pruebas complementarias que permitan demostrar la diseminación en el espacio (DIS) y en el tiempo (DIT) de la enfermedad, siempre que los hallazgos no puedan atribuirse a otras patologías. Entre las herramientas más utilizadas para esta labor, destacan las pruebas de imagen como la RM cerebral y medular, el análisis de las bandas oligoclonales (BOC) de IgG (BOCG) en el LCR para evaluar la síntesis intratecal de Ig (SIT), y los potenciales evocados. Además, otras técnicas, como la tomografía de coherencia óptica (OCT), han demostrado un valor complementario en la evaluación del daño axonal y la neurodegeneración [25,26].

Tabla 1. Criterios diagnósticos de McDonald (revisión 2017)		
Episodios	Número de lesiones	Requerimientos adicionales para el diagnóstico
≥2	≥2	Ninguno
≥2	1	Evidencia clara de ataque previo con una lesión en una localización anatómica distinta
≥2	1	DIS. Alguno de los siguientes motivos: -Episodio afectando a otra área del SNC -Evidencia de al menos una lesión hiperintensa en T2 en al menos 2 de las siguientes 4 áreas: periventricular, cortical/yuxtacortical, infratentorial y medular
≥1	≥2	DIT. Alguno de los siguientes motivos: -Episodio afectando a otra parte del SNC -Demostración de coexistencia de lesiones captantes y no captantes de gadolinio -Demostración de BOCG
≥1	1	DIS y DIT.
0	1	Un año de progresión de la enfermedad y dos de los siguientes motivos: -lesiones hiperintensas en T2 en una de las áreas cerebrales típicas (periventricular, cortical/yuxtacortical e infratentorial) -lesiones hiperintensas en T2 en ≥2 áreas medulares -Demostración de BOCG

Tabla 1. Criterios diagnósticos de McDonald 2017. Adaptado de: Thompson AJ, Banwell BL, Barkhof F, Carroll WM, Coetzee T, Comi G, et al. Diagnosis of multiple sclerosis: 2017 revisions of the McDonald criteria. *Lancet Neurol.* 2018;17:162–173 [25]. Abreviaturas: BOCG, bandas oligoclonales de IgG; DIS, diseminación en espacio; DIT, diseminación en tiempo; SNC, sistema nervioso central.

- Pruebas de imagen

La prueba complementaria más utilizada para el diagnóstico de la EM es la RM, necesaria para demostrar la DIS y la DIT [25]. La DIS puede evidenciarse por la presencia de una o más lesiones en T2 en al menos dos de las cuatro áreas características de la enfermedad en el SNC (cortical o yuxtacortical, infratentorial, periventricular y médula espinal). La DIT se observa por la coexistencia de lesiones con y sin captación de gadolinio en una primera RM, o bien mediante la aparición de nuevas lesiones hiperintensas en T2 o captantes de gadolinio en RM sucesivas [25,128,129]. La RM es también

útil para el seguimiento de la actividad de la enfermedad y la respuesta a los TMEs [130-132]. Asimismo, aunque con un uso clínico limitado, existen numerosas técnicas no convencionales de RM, como la secuencia de susceptibilidad magnética, la medición de la atrofia global y regional, las secuencias de difusión o la RM funcional, que permiten tanto el diagnóstico diferencial de la enfermedad como el estudio de los procesos fisiopatológicos subyacentes [133].

-Estudios de líquido cefalorraquídeo

El análisis del LCR constituye una herramienta clave para evaluar la actividad inflamatoria en el SNC de pacientes con EM. Su estudio proporciona una mayor especificidad a los hallazgos de la RM. Generalmente, las muestras de LCR de pacientes con EM muestran un aspecto macroscópico normal con la celularidad habitual, aunque en la mayoría de los pacientes se observa SIT de IgG. Esta puede demostrarse mediante métodos cuantitativos, semicuantitativos y cualitativos, siendo estos últimos los más sensibles. Tanto los métodos cuantitativos (índices de Tourtellotte [134] o Reiber [135]) como semicuantitativos (índices de Tibbling [136]) se basan en la corrección de los valores de IgG en LCR usando los valores de la albúmina, sintetizada exclusivamente en el hígado, como factor de corrección para evaluar la integridad de la BHE. Estos métodos muestran generalmente buena especificidad, pero una sensibilidad limitada [137].

Los métodos cualitativos están basados en la determinación de BOCG en LCR mediante isoelectroenfoque [138]. Este método es muy sensible y se detecta en un 95% de los pacientes con EM, aunque no son exclusivas de esta enfermedad ya que pueden detectarse en otras patologías como en ciertas infecciones del SNC [139,140]. Sin embargo, la determinación de las BOCG requiere un laboratorio especializado, lo que puede afectar su valor diagnóstico debido a la variabilidad en la sensibilidad (entre el 53% y 100%) y especificidad (entre el 26% y 100%) reportadas en distintos estudios [141]. Debido a estas limitaciones, se han explorado métodos alternativos, como la cuantificación de las cadenas ligeras libres kappa de las Ig (índice kappa) [142]. Este método, automatizado mediante kits de nefelometría o turbidimetría, ofrece una mayor rentabilidad y reproducibilidad, además de reducir significativamente el tiempo de análisis [143-145]. Aunque su uso

diagnóstico aún no es equivalente a las BOCG, cada vez son más los estudios que concluyen que la sensibilidad y especificidad del índice kappa es similar al de las BOCG [145-147].

-Potenciales evocados

Los potenciales evocados son una prueba neurofisiológica que mide la velocidad de conducción de los impulsos eléctricos en el SNC tras una estimulación sensorial. En casos de desmielinización axonal, la conducción de las señales puede retrasarse o atenuarse, afectando a las latencias y la amplitud de las ondas de los potenciales evocados. Los potenciales evocados, aunque no específicos de la EM, se usan para evaluar la integridad de vías neuronales, especialmente la óptica, como indicio de la presencia de brotes previos [148-150].

1.6.1. Criterios de McDonald vigentes

La revisión de 2024 de los criterios de McDonald ha introducido importantes novedades para el diagnóstico de la EM. Entre ellas se incluyen el concepto de síndrome radiológico aislado (SRA) como posible forma de inicio de la enfermedad, la incorporación de la detección de cadenas ligeras kappas libres en el LCR como biomarcador en LCR alternativo, el reconocimiento del valor del signo de la vena central y de las lesiones con anillo paramagnético para aumentar la especificidad frente a enfermedades mimetizadoras, y la integración explícita del nervio óptico en la definición de DIS [26].

1.7. TRATAMIENTO

Los tratamientos para la EM han evolucionado significativamente en las últimas décadas en paralelo a la mayor comprensión de la fisiopatología de la enfermedad. Las estrategias terapéuticas se enfocan en la reducción de la actividad biológica de las recaídas y en la ralentización de la progresión de la enfermedad a través de TMEs, complementadas con tratamientos para los brotes agudos y la sintomatología asociada [151,152].

Los TMEs alteran el curso de la EM mediante diferentes mecanismos de acción. En primer lugar, se encuentran los fármacos administrados en pulsos que eliminan total o parcialmente los linfocitos de la sangre periférica, entre los cuales destacan alemtuzumab, cladribina y los anticuerpos anti-CD20. En

segundo lugar, existen los fármacos de administración continua que bloquean el tráfico linfocitario hacia el SNC, como natalizumab y los moduladores del receptor de esfingosina-1-fosfato (S1PR por sus siglas en inglés de *Sphingosine-1-Phosphate Receptor*). Por último, se incluyen los fármacos de administración continuada que modulan la respuesta inmune anómala, entre ellos teriflunomida y los ésteres del ácido fumárico [151-154].

La mayoría de los TME aprobados están dirigidos al tratamiento de la EMRR [153]. No obstante, existen dos fármacos con indicación para las formas progresivas: siponimod, aprobado para la EMSP en fases iniciales, y ocrelizumab, aprobado para la EMPP [152].

Los TMEs también pueden clasificarse en tres categorías según su eficacia: baja, moderada y alta. En función de esta clasificación, existen dos estrategias terapéuticas principales: la terapia escalonada y el tratamiento temprano con alta eficacia [153,154].

En la terapia escalonada, se inicia el tratamiento con TMEs de menor eficacia y menor riesgo de efectos secundarios graves y se procede a una escalada hacia terapias más eficaces en los que no presentan una respuesta adecuada. La estrategia es útil para pacientes con formas más leves de EM [153].

El tratamiento temprano de alta eficacia aboga por el uso de TMEs eficaces desde el inicio de la enfermedad, donde la actividad inflamatoria es mayor [155]. Estudios observacionales han demostrado que el uso temprano de medicamentos de alta eficacia reduce considerablemente las tasas de recaída y el riesgo de discapacidad a largo plazo [155-157].

-Fármacos de baja eficacia o fármacos plataforma.

Los fármacos considerados de baja eficacia en EM incluyen el interferón beta (IFNβ), el acetato de glatirámero, y la teriflunomida.

El IFNβ es un fármaco inyectable de administración subcutánea o intramuscular con frecuencia de administración variable, cuyo mecanismo de acción implica la regulación a la baja de la expresión de moléculas HLA en las células presentadoras de antígenos, la disminución de citoquinas pro-inflamatorias, proteínas que permiten la comunicación celular y regulan la inflamación y la respuesta

inmune, y la inhibición de la proliferación de células T, así como la disminución del tráfico de células inflamatorias hacia el SNC [158].

El acetato de glatirámero es también un fármaco inyectable que polariza la respuesta inmunológica hacia un fenotipo Th2 mediante su unión a moléculas HLA de clase II [159].

Ambos tratamientos presentan una eficacia comparable, logrando una reducción de aproximadamente el 30% en la actividad biológica de la enfermedad [160-163]. Sin embargo, su efecto en la prevención de la progresión de la discapacidad a largo plazo es limitado [164,165]. Estos fármacos presentan un perfil de seguridad relativamente bueno, dado que su impacto sobre el sistema inmune limitado y revierte tras su suspensión. Su uso es bastante limitado en la actualidad y suelen indicarse para formas leves de la enfermedad [166,167].

La teriflunomida es el metabolito activo de la leflunomida. Este fármaco inhibe reversiblemente a la dihidroorotato-deshidrogenasa, enzima mitocondrial implicada en la síntesis de pirimidinas, inhibiendo la producción de ácidos nucleicos necesarios para la proliferación de células T y B activadas [168]. El uso del fármaco en ensayos clínicos de fase III ha demostrado reducir considerablemente la atrofia cerebral observada en los pacientes [169,170]. Este fármaco se usa generalmente en pacientes con formas leves de la enfermedad, donde presenta eficacia en controlar la actividad de la misma [168].

-Fármacos de eficacia moderada

Entre los principales fármacos de eficacia moderada encontramos los ésteres del ácido fumárico, los moduladores del receptor de S1PR y la cladribina. Todos los fármacos de eficacia moderada son de administración oral y ofrecen una combinación de eficacia razonable y perfil de seguridad aceptable [157,171].

El dimetilfumarato y el diroximelfumarato son los ésteres del ácido fumárico. Se cree que el modo de acción de ambos fármacos involucra vías dependientes e independientes del factor 2 relacionado con el factor nuclear eritroide 2 (Nrf2 por sus siglas en inglés de *Nuclear Factor Erythroid 2-Related Factor 2*), que activan vías antioxidantes y citoprotectoras, e inducen una modulación inmunitaria caracterizada por la inhibición de señales pro-inflamatorias y el favorecimiento de poblaciones celulares con un

fenotipo más tolerogénico [172,173]. Tras la administración de los fármacos, se ha observado una reducción de la tasa de recaídas y de la aparición de nuevas lesiones en RM razonable [174,175]. El perfil de seguridad de este fármaco es bueno, con efectos adversos generalmente leves. Sin embargo, hasta en un 6% de los pacientes se ha observado linfopenia persistente, que aumenta el riesgo de desarrollar leucoencefalopatía multifocal progresiva (LMP) [176]

Los moduladores del receptor S1PR son fármacos que impiden la salida de los linfocitos de los órganos linfoides secundarios, evitando así la infiltración de linfocitos autorreactivos al SNC. Entre este grupo de fármacos se encuentran fingolimod, ozanimod, ponesimod y siponimod [177]. Fingolimod, ozanimod y ponesimod han sido aprobados para el tratamiento de la EMRR, mientras que siponimod se ha consolidado como una de las pocas opciones terapéuticas disponibles para el manejo de la EMSP [178-180]. Los ensayos clínicos con fingolimod demostraron una reducción de la tasa anualizada de recaídas, así como un mayor efecto en la disminución de nuevas lesiones detectadas por RM en comparación con IFN intramuscular y placebo [180,181]. De forma similar, ozanimod y ponesimod han mostrado resultados comparables en ensayos clínicos de fase III respecto a IFNβ intramuscular y teriflunomida, respectivamente [182,183]. Los ensayos clínicos con Siponimod también han demostrado resultados prometedores al reducir la progresión de la discapacidad y la actividad inflamatoria frente a placebo en la EMSP en sus fases iniciales [184]. En general, estos fármacos son bien tolerados, aunque el tratamiento con fingolimod requiere de monitorización del electrocardiograma, ya que puede provocar bradicardia transitoria tras la primera dosis [178].

Cladribina es un análogo de la desoxiadenosina que, tras su fosforilación intracelular mediada por la enzima desoxicitidina-quinasa, se convierte en su forma activa, induciendo apoptosis selectiva de linfocitos T y B. Posteriormente, la molécula es inactivada por una fosfatasa, de modo que el efecto citotóxico depende del equilibrio entre la actividad de quinasas y fosfatasas en cada tipo celular. Los estudios disponibles muestran que la cladribina reduce de forma consistente la tasa de brotes y la actividad inflamatoria en RM en la EM [185-188].

-Fármacos de alta eficacia

Los fármacos de alta eficacia constituyen una estrategia terapéutica avanzada en el manejo de la EM, especialmente indicada para pacientes con alta actividad inflamatoria o respuesta subóptima a tratamientos de primera línea. Estos fármacos disminuyen notablemente la tasa de recaídas y la aparición de nuevas lesiones en la RM [157,189,190]. Entre ellos tenemos alemtuzumab, natalizumab y los anticuerpos anti-CD20 [189–191].

Natalizumab, el primer anticuerpo monoclonal humanizado aprobado para la EMRR, bloquea la migración de linfocitos y monocitos al SNC al inhibir la interacción entre la integrina α4β1 (VLA-4 por sus siglas en inglés de *very late antigen-4*) y su ligando la molécula de adhesión celular vascular 1 (VCAM-1 por sus siglas en inglés de *vascular cell adhesion molecule 1*), evitando la migración de células del sistema inmunitario a través de la BHE [192,193]. Los datos disponibles muestran que natalizumab reduce de forma muy marcada la actividad de la EM, con una inhibición casi completa de la aparición de nuevas lesiones en RM y una disminución sustancial y sostenida de la tasa de brotes [193,194]. Su uso se ha visto disminuido por el principal efecto adverso de este fármaco, el riesgo de LMP, con una incidencia aproximada de 2,5 casos por cada 1000 pacientes tratados. Este riesgo aumenta significativamente en presencia de anticuerpos frente al virus John Cunningham, tras inmunosupresión previa y cuando el tratamiento supera los dos años de duración. Por ello, su utilización requiere una estrecha monitorización del paciente y la implementación de algoritmos de manejo destinados a minimizar al máximo la probabilidad de desarrollar LMP [194–196].

Alemtuzumab es un anticuerpo monoclonal dirigido frente a la proteína CD52, expresada en la mayoría de los linfocitos. Su administración causa una depleción masiva de estas células y una reprogramación de la respuesta inmunitaria hacia un perfil tolerogénico [197]. El fármaco muestra una eficacia comparable a la de natalizumab [198,199], pero su uso se asocia a un riesgo elevado de desarrollar enfermedades autoinmunes secundarias, principalmente de origen tiroideo, lo que hace necesaria una monitorización prolongada y regular del paciente [200].

Los fármacos anti-CD20 actúan mediante la depleción selectiva de linfocitos B, mostrando una elevada eficacia tanto en la reducción de la actividad inflamatoria como en la ralentización de la progresión de

la discapacidad. Actualmente, están aprobados para el tratamiento de la EMRR ocrelizumab, ofatumumab y ublituximab, siendo ocrelizumab el único autorizado también para EMPP [201]

Ocrelizumab es un anticuerpo monoclonal humanizado administrado por vía intravenosa que produce una depleción rápida y sostenida de células B $CD20^{+}$. Ha demostrado una alta eficacia en la reducción de recaídas, lesiones activas en RM y progresión de la discapacidad, con evidencia sólida tanto en EMRR como en EMPP [201,202].

Ofatumumab es un anticuerpo monoclonal totalmente humano administrado por vía subcutánea. Permite una dosificación mensual y genera una depleción profunda y mantenida de células B, con un perfil de seguridad favorable y una eficacia comparable a otros anti-CD20 de alta potencia en EMRR [202-205].

Ublituximab, un anticuerpo monoclonal quimérico modificado por glicoingeniería de administración intravenosa, ofrece una depleción de células B eficiente y rápida. En los ensayos clínicos ha demostrado una notable reducción de la tasa anualizada de brotes y de las lesiones nuevas en RM, consolidándose como otra alternativa de alta eficacia en EMRR [201,202].

-Nuevas estrategias terapéuticas

Aunque los TMEs actualmente aprobados han demostrado reducir de forma significativa la actividad inflamatoria y las recaídas en la EM [153,154], su efecto se centra principalmente en la modulación de la inmunidad adaptativa periférica, ejerciendo una mayor eficacia sobre la inflamación aguda. Sin embargo, el impacto sobre el PIRA es más limitado, lo que sugiere que, a pesar del control efectivo de la inflamación, persisten procesos neurodegenerativos que afectan la evolución de la enfermedad [206,207]. Por este motivo, se están desarrollando nuevas estrategias terapéuticas dirigidas específicamente a los procesos subyacentes a este tipo de progresión, incluyendo fármacos con potenciales efectos anti-neurodegenerativos, remielinizantes y neuroprotectores. Sin embargo, el beneficio clínico de estas aproximaciones sigue siendo incierto [208,209]. En los últimos años ha crecido el interés por los inhibidores de la tirosina quinasa de Bruton (BTK), debido a su potencial efecto inmunomodulador y neuroprotector [210]. Estos fármacos modulan tanto la inmunidad

adaptativa como la innata al bloquear la señalización de linfocitos B y microglía. A diferencia de la mayoría de los TMEs actuales, pueden atravesar la BHE, actuando directamente sobre células inmunes residentes en el SNC implicadas en la inflamación crónica y el daño neuroaxonal. De entre los inhibidores de la BTK destacan tolebrutinib, evobrutinib y fenebrutinib. De entre estos fármacos, tolebrutinib ha superado favorablemente los ensayos clínicos de fase III. Este compuesto destaca por su capacidad para atravesar la BHE y actuar directamente sobre la microglía y los linfocitos B meníngeos, reduciendo su activación y supervivencia. Los resultados obtenidos han mostrado un retraso significativo en la progresión de la discapacidad, especialmente en la EMSP, donde las opciones terapéuticas continúan siendo muy limitadas [211]. Asimismo, datos recientes aún no publicados sugieren que fenebrutinib podría ofrecer resultados positivos en ensayos fase III tanto en EMRR como en EMPP, con buena tolerabilidad [212]. Evobrutinib, por su parte, no mostró eficacia en los ensayos fase III realizados en pacientes con EMRR [210].

En conjunto, los inhibidores de BTK constituyen una nueva clase terapéutica con potencial para actuar sobre la inflamación periférica y sobre los procesos neurodegenerativos centrales de la EM, lo que podría suponer una mejora en los pacientes con PIRA [211].

1.8. NEUROPATOLOGÍA

La EM es un trastorno heterogéneo con características clínicas y patológicas variables que reflejan distintos procesos fisiopatológicos responsables del daño tisular en el SNC. La inflamación, la desmielinización y la degeneración axonal constituyen los principales mecanismos patológicos que explican las manifestaciones clínicas de la enfermedad [213,214].

Las lesiones desmielinizantes se originan preferentemente alrededor de los capilares y vénulas, donde se produce una alteración de la permeabilidad de la BHE [215]. Aunque el mecanismo exacto de este daño no se comprende completamente, la evidencia sugiere que deriva de la liberación de mediadores inflamatorios resultantes de la interacción entre células inmunes hemáticas y residentes del SNC. La activación astrocítica y la formación de cicatrices gliales desempeñan un papel clave en este proceso

[127,216,217]. Una vez comprometida la integridad de la BHE, los linfocitos autorreactivos pueden infiltrarse en el parénquima cerebral, desencadenando una respuesta inflamatoria que provoca la pérdida de oligodendrocitos, la destrucción de la mielina y el daño axonal, interrumpiendo la conducción de los impulsos eléctricos entre las neuronas [215-218]. En algunas lesiones, especialmente en las fases tempranas de la enfermedad, se observan fenómenos de remielinización como mecanismo compensatorio, mediados por el reclutamiento y diferenciación de progenitores de oligodendrocitos [219-221].

El patrón de diseminación de las lesiones varía a lo largo de la evolución de la enfermedad. En las fases iniciales, las lesiones de sustancia blanca son más activas y numerosas, mientras que, en las etapas avanzadas, se incrementan las lesiones corticales, especialmente en la sustancia gris [222,223]. Estas lesiones corticales están estrechamente relacionadas con la formación de acúmulos linfoides en las meninges [224-226]. Además, a medida que la enfermedad progresa, aumenta el número de lesiones crónicas activas, las cuales se caracterizan por la presencia de un núcleo central desmielinizado con poca o nula inflamación, rodeado por un borde donde persiste la inflamación activa, con una alta densidad de células fagocíticas [227]. Clínicamente, las lesiones crónicas activas son indicativas de actividad inflamatoria persistente, lo que está asociado con las fases progresivas de la enfermedad [228,229]. Con el avance de la enfermedad, las lesiones se vuelven crónicas inactivas, con áreas hipocelulares bien delimitadas, sin una degradación activa de mielina. Estas lesiones desarrollan fibrosis y gliosis en su núcleo, lo que, aunque limita la expansión del daño, también dificulta una adecuada remielinización, contribuyendo a la progresión de la discapacidad [215,228,229].

1.9. FISIOPATOLOGÍA

La EM se manifiesta por la infiltración de células inmunitarias en el SNC, lo que conduce a la destrucción de la mielina, a la neuroinflamación y al daño axonal característicos de la enfermedad [6]. Aunque los mecanismos implicados en este proceso no se conocen con exactitud, la hipótesis más aceptada hasta la fecha sostiene que el inicio de la EM es desencadenado por la activación de linfocitos

autorreactivos en órganos linfoides periféricos por parte de células presentadoras de antígeno, como células dendríticas, linfocitos B y macrófagos. Se han propuesto dos hipótesis principales para explicar la activación de dichas células en la EM: una sugiere la reactividad inmunitaria cruzada con antígenos extraños, mientras que la otra plantea el reconocimiento de antígenos derivados del SNC que se filtran hacia los ganglios linfáticos cervicales. Según la hipótesis más aceptada en la actualidad, los linfocitos que se activan en la periferia frente a distintos patógenos muestran reactividad cruzada frente a antígenos propios del SNC mediante mimetismo molecular [6,213]. En este contexto, se ha demostrado que antígenos del VEB como EBNA-1 presentan mimetismo molecular con GlialCAM, y que en pacientes con EM existen células B clonales expandidas cuyos anticuerpos reconocen simultáneamente EBNA-1 y GlialCAM, lo que refuerza el vínculo etiopatogénico entre la infección por VEB y la enfermedad [71–75,230–232].

Independientemente del mecanismo subyacente a la activación de los linfocitos T autorreactivos, mayoritariamente linfocitos T $CD4^+$, una vez que se inicia la presentación antigénica, estos linfocitos T podrían diferenciarse hacia fenotipos pro-inflamatorios, como Th1 y Th17. Estas células activarían a linfocitos T $CD8^+$, linfocitos B y células del sistema inmunitario innato, que a través de la liberación de citoquinas y otros mediadores pro-inflamatorios, provocarían una disrupción de la BHE y la infiltración de las células activadas en el SNC [213,233,234].

Una vez en el SNC, las células inmunitarias autorreactivas se reactivan por microglía y otras células presentadoras de antígeno, lo que impulsa la expansión de linfocitos T pro-inflamatorios y la llegada de nuevas células desde la periferia [235–239]. Tanto las células infiltradas como las residentes activadas liberan diversos mediadores neurotóxicos y pro-inflamatorios que contribuyen a la desmielinización y al daño neuronal [213,239–241]. A ello se suma la acción de autoanticuerpos que favorecen la activación del complemento y la citotoxicidad dependiente de los mismos, amplificando la lesión axonal [242,243]. Este microambiente inflamatorio altera la función de oligodendrocitos y astrocitos, favorece la destrucción tisular y la neurodegeneración [213,244,245], y expone nuevos antígenos que amplían las dianas de los linfocitos T autorreactivos, un proceso conocido como propagación de epítopos, perpetuando así la respuesta autoinmune [246] (resumido en la Figura 5).

A medida que avanza la enfermedad, emerge un componente de inflamación crónica y sostenida en el SNC. La fisiopatología subyacente a la progresión se relaciona con una baja infiltración de células inmunes periféricas y una inflamación compartimentada y localizada en el SNC, impulsada principalmente por células innatas residentes y astrocitos [213,247]. Las células de la inmunidad adaptativa previamente infiltradas pueden contribuir a la inflamación a largo plazo mediante el establecimiento de estructuras linfoides terciarias en el SNC [248]. Las células del sistema innato y los astrocitos inducen un proceso neurodegenerativo autosostenido que agrava el daño neuroaxonal a largo plazo en el SNC a través de la liberación de mediadores neurotóxicos. De hecho, el aumento en el número de células de microglía, macrófagos y astrocitos en lesiones desmielinizantes se ha asociado con una mayor progresión de la enfermedad y con la gravedad del daño tisular [249-250].

A pesar de que las hipótesis propuestas sobre su fisiopatología, la EM es una enfermedad marcadamente heterogénea [12,121], y aún no se comprenden con claridad los mecanismos celulares y moleculares responsables de esta variabilidad.

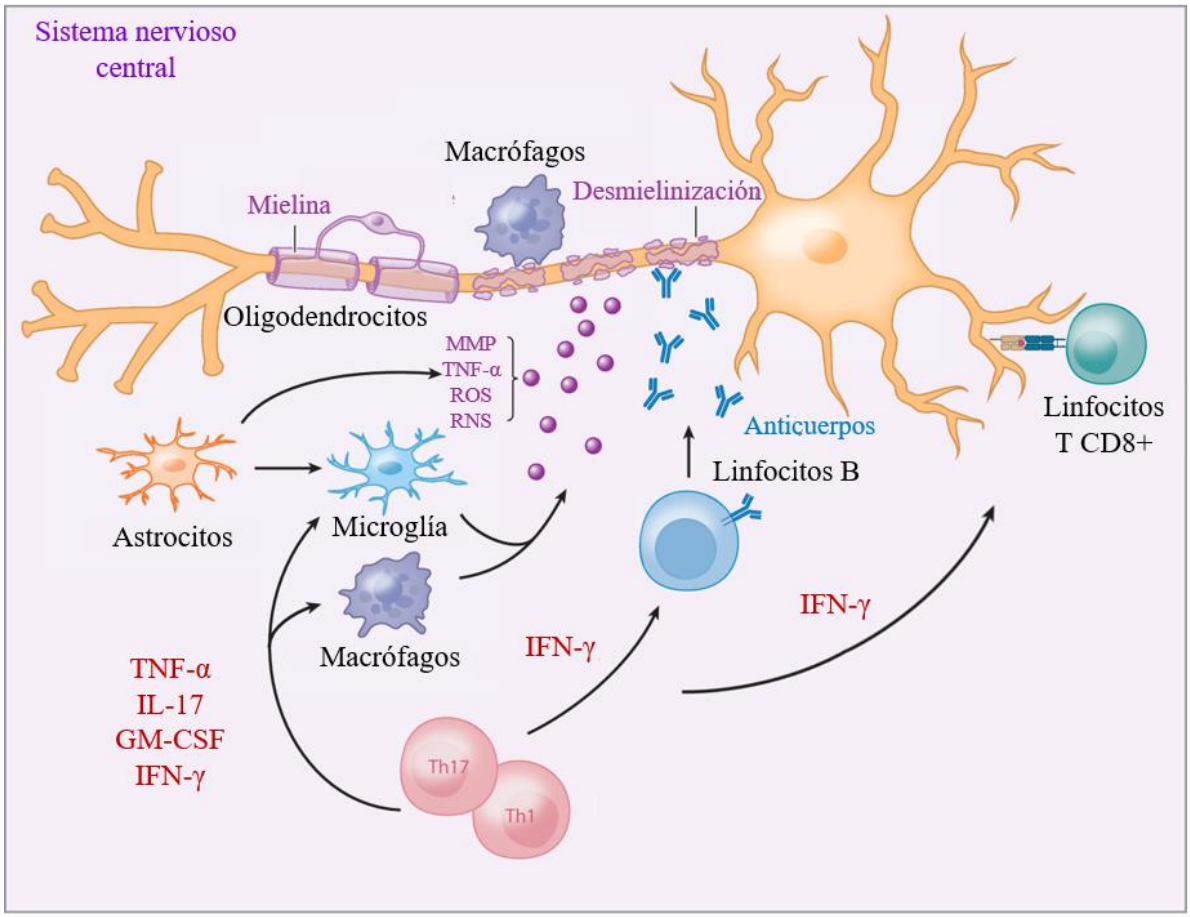


Figura 5. Representación de la fisiopatología de la EM en el SNC. Adaptada de: Rodríguez Murúa S, Farez MF, Quintana FJ. The Immune Response in Multiple Sclerosis. *Annu Rev Pathol*. 2022;17:121-139. doi:10.1146/annurev-pathol-052920-04031 [213]. Abreviaturas: GM-CSF: factor estimulante de colonias de granulocitos y macrófagos (por sus siglas en inglés de *Granulocyte Macrophage Colony-Stimulating Factor*); IFNγ: interferón gamma; IL: interleucina; MMP: metaloproteinasa de matriz; RNS: especies reactivas de nitrógeno (por sus siglas en inglés de *Reactive Nitrogen Species*); ROS: especies reactivas de oxígeno (por sus siglas en inglés de *Reactive Oxygen Species*); TGFβ: factor de crecimiento transformante beta (por sus siglas en inglés de *Transforming Growth Factor beta*); TNFα: factor de necrosis tumoral, (por sus siglas en inglés de *Tumor Necrosis Factor*); Treg: célula T reguladora.

1.9.1. Sistema inmunitario adaptativo

El sistema inmunitario adaptativo constituye la defensa específica del organismo frente a antígenos, caracterizándose por la generación de respuestas altamente especializadas y memoria inmunológica tras la exposición a los patógenos. Las células del sistema adaptativo, los linfocitos T y B, desempeñan un papel central en la patogénesis de la EM, mediando la activación de respuestas autorreactivas y contribuyendo a la inflamación y daño del SNC.

· *Linfocitos T*

Históricamente se ha considerado la EM como una enfermedad mediada principalmente por linfocitos T. No obstante, la evidencia acumulada en los últimos años muestra que su participación en la fisiopatología es mucho más compleja y que intervienen numerosos componentes del sistema inmunitario. La consideración temprana de los linfocitos T como actores centrales en la EM surgió a raíz de la demostración de que la transferencia de linfocitos T autoreactivos específicos frente a la proteína básica de la mielina era aparentemente suficiente para desencadenar la enfermedad en el modelo murino de EAE [251,252], así como por la detección inmunohistoquímica de infiltrados de linfocitos T en lesiones desmielinizantes [253] y en LCR de pacientes con EM [254,255].

Los linfocitos T se clasifican en dos grandes grupos: los linfocitos T $CD4^+$, o cooperadores (Th, T helper), que reconocen antígenos presentados a través de moléculas HLA de clase II; y los linfocitos T $CD8^+$, o citotóxicos, que reconocen antígenos presentados por moléculas HLA de clase I. Cada uno de

estos grupos puede dividirse, además, en cuatro subpoblaciones: linfocitos T vírgenes (naïve), de memoria central, de memoria efectora y terminalmente diferenciados, que se identifican según la expresión de superficie de las moléculas CCR7 y CD45RO. Mientras que en el LCR de personas sanas predominan las subpoblaciones naïve y de memoria central [256], en los pacientes con EM se han observado incrementos en las poblaciones efectoras, tanto en linfocitos T $CD4^+$ [254] como en $CD8^+$ [255].

-Linfocitos T $CD4^+$

Las células $CD4^+$ Th1 y $CD4^+$ Th17 se han considerado tradicionalmente como poblaciones linfocitarias implicadas en la fisiopatología de la EM, ya que presentan una alta frecuencia tanto en modelos experimentales de EAE como en pacientes con la enfermedad [233,234,253].

Las células Th1, diferenciadas en respuesta a la acción de interleuquina (IL)-12, se caracterizan por la secreción de citoquinas pro-inflamatorias, como el interferón gamma (IFNγ), y el factor de necrosis tumoral alfa (TNFα, por sus siglas en inglés de *Tumor necrosis factor alpha*) implicadas en los procesos de desmielinización y neurodegeneración propios de la enfermedad [256]. El aumento de IFNγ y TNFα se ha asociado con una mayor frecuencia de lesiones activas en la EM [257,258]. Las células Th17, diferenciadas ante IL-6 y el factor de crecimiento transformante beta (TGF-β por sus siglas en inglés de *Transforming growth factor beta*), promueven la liberación de IL-17, IL-22 y el factor estimulante de colonias de granulocitos y macrófagos (GM-CSF por sus siglas en inglés de *Granulocyte Macrophage Colony-Stimulating Factor*) [256]. La IL-17 se ha asociado con una mayor actividad de la enfermedad, ya que se han detectado niveles elevados de esta citoquina en las lesiones, el suero y el LCR de pacientes con EM [258]. Asimismo, la secreción de GM-CSF por las células Th17 puede desempeñar un papel fundamental en la activación de células mieloides del SNC para exacerbar el proceso inflamatorio [259]. Algunos estudios en modelo animal sugieren que el GM-CSF es necesario para inducir EAE [260].

Las células Th1 y Th17 también liberan quimiocinas, pequeñas proteínas que facilitan la migración de células inmunitarias hacia el foco inflamatorio, generando un entorno pro-inflamatorio que contribuye a la disrupción de la BHE [239,256].

Además de las subpoblaciones de células T $CD4^+$ efectoras con funciones predominantemente pro-inflamatorias, también existen las células Treg, que desempeñan un papel fundamental en el equilibrio inmunológico, al promover la tolerancia periférica frente a antígenos propios, suprimiendo la actividad de células T y B autorreactivas y limitando así respuestas inflamatorias excesivas. Estas células expresan el receptor de alta afinidad para la IL-2, conocido como CD25, así como el factor de transcripción FoxP3. También existen células Treg capaces de liberar IL-10, una citoquina anti-inflamatoria que inhibe la función de las células T efectoras al bloquear la coestimulación mediada por CD28, así como perforina y granzima B, proteínas citotóxicas implicadas en la eliminación de células B autorreactivas [261,262]. En el contexto de la EM, se ha propuesto que las células T efectoras desarrollan una resistencia relativa a la supresión mediada por las células Treg [263,264], lo que podría estar relacionado con un deterioro en la capacidad funcional de las Tregs para controlar la respuesta inflamatoria. De hecho, se han descrito alteraciones en la expresión del receptor de la IL-2 (CD25) [265] y de FoxP3 [266,267].

-Linfocitos T $CD8^+$

A pesar de que los linfocitos T $CD4^+$ han sido tradicionalmente considerados las poblaciones celulares más relevantes en la EM, existe un predominio de linfocitos T $CD8^+$ en el LCR [268] y en lesiones desmielinizantes [253]. Esto destaca la importancia de esta población celular en la fisiopatología de la enfermedad. En el entorno inflamatorio del SNC en los pacientes con EM se observa un aumento de la actividad citolítica de las células T $CD8^+$ efectoras [269]. Las moléculas HLA de clase I presentan antígenos a las células T $CD8^+$ para que ejerzan sus funciones citotóxicas. En condiciones basales sólo las células endoteliales y de la microglía expresan HLA de clase I en el SNC, pero en situaciones inflamatorias, astrocitos, neuronas y oligodendrocitos también pueden expresarlo [270]. La presentación antigénica desencadena la liberación de una serie de proteínas citotóxicas, como perforinas y granzimas, que pueden inducir la muerte directa de oligodendrocitos y neuronas, contribuyendo significativamente al daño axonal [268,271]. Las células T $CD8^+$ también liberan mediadores inflamatorios, como citoquinas [272], cuyos niveles, así como el de las células productoras, se encuentran aumentados en el suero de pacientes con EM [171,273].

·Linfocitos B

A medida que se ha ido adquiriendo conocimiento sobre la EM, los linfocitos B han surgido como una de las células clave en su patogénesis. Estas células desempeñan funciones esenciales en la producción de anticuerpos, la presentación de antígenos y la modulación de la respuesta inmune. Según su expresión de CD38 y CD27, los linfocitos B se clasifican en naïve, transicionales, de memoria y plasmablastos, cada subpoblación con roles específicos en la activación y regulación inmunitaria.

Su participación en la enfermedad se ha descrito de manera dinámica. Por un lado, en fases agudas de la enfermedad, se han observado depósitos de moléculas de complemento y anticuerpos IgG e IgM en cortes histológicos de lesiones focales [274]. La SIT de IgG por parte de estas poblaciones celulares está tan bien documentada que la presencia de BOC de IgG en el LCR forma parte de los criterios diagnósticos actuales de la EM [141]. Esta SIT de IgG induce la activación del complemento y la citotoxicidad dependiente anticuerpos por parte de células *Natural Killer* (NK) [242,243]. Por otro, en fases avanzadas de la enfermedad, se ha observado un aumento de linfocitos B de memoria en sangre [275] y LCR de pacientes con EM [254], así como de agregados meníngeos inflamatorios ricos en células B con características de folículos linfoides terciarios en el SNC [248]. La abundancia de estos acúmulos de linfocitos B en las meninges se correlaciona con las lesiones corticales y con la acumulación de la discapacidad en pacientes con EM, y se han postulado como una de las principales fuentes de factores quimioatrayentes intratecales, que promueven la migración, la activación y desarrollo de las células T y B [276,277].

Los linfocitos B también actúan como células presentadoras de antígeno, promoviendo la proliferación y activación de células T autorreactivas [6]. Además, cumplen funciones inmunomoduladoras mediante la liberación de factores solubles. Entre ellos, producen citoquinas pro-inflamatorias como GM-CSF, cuyos niveles se encuentran elevados en LCR y suero de pacientes con EM [278]. En condiciones fisiológicas, las células B también sintetizan citoquinas anti-inflamatorias como IL-10, que contribuyen al control de la respuesta inmune [6]. Sin embargo, en la EM se ha descrito una menor producción de IL-10, lo que podría favorecer el desequilibrio entre linfocitos T efectores y reguladores característico de la enfermedad [279].

1.9.2. Sistema inmunitario innato

El sistema inmunitario innato constituye la primera línea de defensa del cuerpo contra agentes patógenos, reconociendo y respondiendo rápidamente a los invasores potenciales sin requerir una exposición previa. En la EM, las células del sistema inmunitario innato, como los monocitos, macrófagos, microglía y las NK han sido asociados con diferentes estadíos de la enfermedad [280].

·Monocitos, macrófagos y microglía

Los macrófagos se originan a partir de monocitos circulantes en la sangre periférica que atraviesan la BHE para diferenciarse en macrófagos residentes del SNC, mientras que la microglía proviene de precursores mieloides que migran al SNC durante el desarrollo embrionario. En la EM, se ha descrito una elevada presencia de células fagocíticas, principalmente macrófagos y microglía activada, en las lesiones activas. Tanto los macrófagos como la microglía son células versátiles cuyas funciones dependen en gran medida del microambiente en el que se encuentran. Ambos tipos celulares pueden polarizarse hacia un fenotipo pro-inflamatorio (M1) o reparador (M2) [281].

Las células M1, inducidas in vitro por IFNγ y lipopolisacáridos, se caracterizan por una marcada actividad pro-inflamatoria, destacando la secreción de citoquinas y la producción de especies reactivas de oxígeno, altamente neurotóxicas [281]. Además, liberan quimioquinas y metaloproteínasas (MMPs), cuyos niveles aumentados en suero y LCR se han asociado con una mayor infiltración celular y un incremento en el número de lesiones activas [282,283]. Lejos de limitarse a las fases iniciales de la enfermedad, las células fagocíticas M1 también contribuyen a su progresión: a medida que la degeneración neuroaxonal se extiende, la microglía y los macrófagos en la vecindad de los axones dañados pueden activarse de forma distal y actuar como foco para la formación de nuevas lesiones desmielinizantes. Incluso tras las primeras manifestaciones clínicas, se observa un aumento tanto en el número como en el estado de activación de estas células fagocíticas, no solo en las lesiones desmielinizantes sino también en la sustancia blanca aparentemente normal [284].

En cambio, las células M2, inducidas por ILs como IL-4, IL-10 o IL-13, liberan mediadores inmunorreguladores como IL-10, factor de crecimiento transformante beta (TGFβ por sus siglas en

inglés de *Transforming Growth Factor beta*) y otros factores solubles [285], desempeñando un papel neuroprotector al promover una correcta homeostasis inmune y remielinización axonal [286].

·Astrocitos

Los astrocitos son las células gliales mayoritarias del SNC y desempeñan funciones esenciales para la homeostasis neuronal. Proporcionan soporte metabólico y estructural a las neuronas, y son fundamentales para la integridad de la BHE, ya que los podocitos de los astrocitos rodean las células endoteliales y forman uniones estrechas entre ellos. En respuesta al daño en el SNC y ante la presencia de citoquinas pro-inflamatorias y patrones moleculares asociados a patógenos, se ha observado que los astrocitos se vuelven reactivos, experimentando cambios morfológicos, bioquímicos y funcionales que generan excitotoxicidad y muerte neuronal en la EM [159,287]. Aunque no derivan de precursores inmunitarios ni son células inmunitarias innatas, los astrocitos reactivos promueven la inflamación, la neurodegeneración y la progresión de la enfermedad al producir citoquinas pro-inflamatorias, quimiocinas, especies reactivas de oxígeno y MMPs, como lo hacen las células inmunitarias.

El incremento en la liberación de estos mediadores inflamatorios al inicio de la enfermedad ha sido observado tanto en suero como en LCR de pacientes con EM, facilitando el tránsito de células inmunitarias a través de la BHE y agravando el daño neuroaxonal [283,287,288]. En etapas más avanzadas de la EM, los astrocitos reactivos emergen como mediadores clave en la inflamación compartimentalizada del SNC y por lo tanto en la progresión asociada a la enfermedad [250, 289]. Asimismo, los astrocitos se han implicado en procesos de remielinización gracias a su capacidad de liberar factores neuroprotectores y de crecimiento, esenciales para la proliferación y diferenciación de las células precursoras de oligodendrocitos [287].

·Células Natural Killer

Las células NK son linfocitos citotóxicos que desempeñan un papel esencial en la respuesta inmune innata. Su actividad se basa en la capacidad de detectar alteraciones en la expresión de moléculas de superficie celular, lo que les permite identificar y eliminar de manera eficiente células anómalas, incluidas aquellas infectadas por virus o que han adquirido características tumorales.

Dentro de la población de las NK se distinguen dos subtipos principales, las NK CD56^{bright} y las NK CD56^{dim} [290]. Las células NK también se clasifican según la expresión de moléculas que regulan su actividad, como receptores inhibidores y activadores, lo que determina su capacidad citotóxica y de producción de citoquinas en diferentes contextos inmunológicos [291].

Las células NK CD56^{bright}, caracterizadas por una alta expresión de CD56, podrían estar relacionadas con funciones predominantemente reguladoras gracias a su capacidad de liberar citoquinas inmunomoduladoras como IL-10, IL-13 y TGFβ [290]. Aunque sus roles exactos en la EM no se conocen completamente, se ha sugerido que podrían estar relacionados con la modulación de la actividad de células T autorreactivas y la regulación de la inflamación. Se ha observado un aumento de la población NK CD56^{bright} en pacientes tratados con diferentes fármacos, como dimetilfumarato [171], alemtuzumab [292] y otros fármacos [293], siendo particularmente elevados los números en aquellos pacientes que respondieron de forma óptima al tratamiento [294]. El aumento de estas células en el LCR también se ha correlacionado inversamente con el número de lesiones en RM [295].

Por otro lado, las células NK CD56^{dim} que tienen una menor expresión de CD56, son citotóxicas y se encargan de eliminar células infectadas o tumorales mediante la liberación de granzimas y perforinas y son las principales responsables de la citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos [291]. Aunque su papel en la EM no ha sido aún dilucidado, estudios en modelos de EAE han mostrado que la infiltración de células NK CD56^{dim} y la generación de citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos se asocian con un mayor número de lesiones corticales. En este sentido, el agotamiento de estas células parece reducir significativamente la desmielinización cortical perivascular en estos modelos [296]. Los estudios post mortem también han detectado la presencia de células NK CD56^{dim} en lesiones corticales desmielinizantes, lo que podría sugerir su posible participación en la fisiopatología de la enfermedad [297].

Por último, existe una población celular conocida como NKT, que coexpresan los marcadores CD3 y CD56^{dim}. Su función en la EM no está del todo definida, aunque se ha observado que el porcentaje de NKT en el LCR de pacientes con EMRR es inferior al de controles con enfermedad neurológica no inflamatoria, pero similar al encontrado en otras enfermedades neurológicas inflamatorias [298].

1.10. PRONÓSTICO

La EM presenta un pronóstico muy variable debido a su naturaleza heterogénea, resultado de la combinación de factores genéticos, ambientales y clínicos que influyen en el curso de la enfermedad. En general, se considera que un paciente tiene un mal pronóstico cuando acumula una discapacidad significativa en un corto periodo de evolución. El mal pronóstico puede asociarse a características específicas de la enfermedad que anticipan un curso más agresivo y resaltan la necesidad de un manejo terapéutico optimizado, ya que la discapacidad resultante es a menudo irreversible [126,299].

En este escenario, resulta crucial distinguir entre los principales mecanismos asociados a un mal pronóstico, RAW y PIRA (Figura 6).

El RAW se ha relacionado con una inflamación sistémica derivada de la activación periférica de células inmunitarias adaptativas y su posterior migración al SNC [12], mientras el PIRA puede estar impulsada por inflamación subclínica con actividad lesional en RM, o ser independiente de esta, dando lugar a los conceptos de PIRA inflamatorio (o activo) y PIRA no inflamatorio [300]. El PIRA no inflamatorio parece estar más asociado a una inflamación innata compartimentalizada en el SNC [128]. Dado que los TMEs actuales actúan principalmente sobre la inmunidad adaptativa, los pacientes con RAW responden con mayor eficacia que aquellos con PIRA [300,301]. Identificar los procesos inflamatorios y neurodegenerativos que controlan el PIRA es clave, ya que permitiría diseñar TMEs más orientados a evitar este proceso [302,303]. En resumen, el conocimiento de factores pronósticos es esencial para la predicción del tipo de progresión y la elección del tratamiento más adecuado en la EM.

Para ello existe una serie de factores epidemiológicos que son útiles a nivel poblacional y de factores clínicos que implican cierto daño neurológico previo. Sin embargo, cada vez es más común el uso de biomarcadores, que permiten una pronóstico más temprano y preciso de la enfermedad [304].

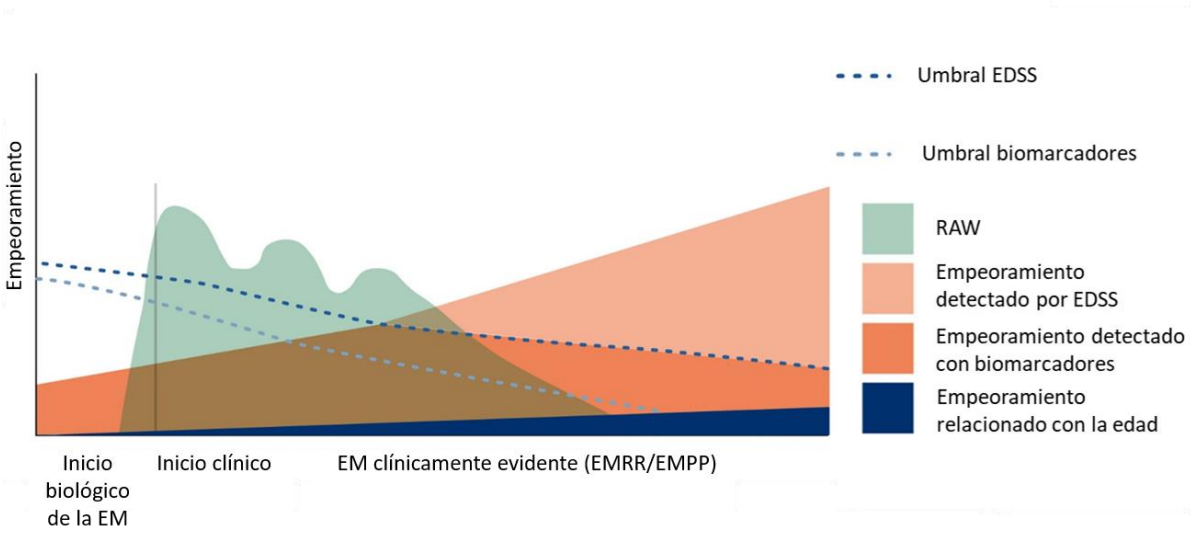


Figura 6. Representación gráfica de las formas de empeoramiento asociadas a la enfermedad. Adaptada de: Scalfari A, Traboulsee A, Oh J, et al. Smouldering-Associated Worsening in Multiple Sclerosis: An International Consensus Statement on Definition, Biology, Clinical Implications, and Future Directions. Ann Neurol. 2024;96(5):826-845. doi:10.1002/ana.27034 [302]. Abreviaturas: EDSS: Escala Expandida del Estado de Discapacidad (por sus siglas en inglés de *Expanded Disability Status Scale*); EM: esclerosis múltiple; EMRR: esclerosis múltiple recidivante-remitente; EMPP: esclerosis múltiple primariamente progresiva (EMPP); PIRA: progresión independiente de la actividad de recaídas (por las siglas en inglés de *progression independent of relapse activity*) y RAW: empeoramiento asociado a las recaídas (por las siglas en inglés de *relapse-associated worsening*).

·*Factores demográficos.*

Entre los factores demográficos más asociados al pronóstico de la EM se encuentran la edad al inicio de la enfermedad, el sexo y el origen étnico.

La edad pediátrica en el primer síntoma de EM se asocia con un menor riesgo de desarrollar discapacidad a medio plazo y con una relativa protección frente a la aparición de PIRA a medio plazo [305]. Por otro lado, se ha descrito una menor respuesta a TMEs en individuos mayores de 50 años [306]. Esto podría deberse a mecanismos de inmunosenescencia, a la inflamación crónica que acompaña el envejecimiento y la menor capacidad de remielinización que se asocia a una mayor edad [306-309].

Aunque la EM es más prevalente en mujeres, los hombres presentan un peor pronóstico, lo que podría estar relacionado con los distintos niveles hormonales en cada sexo [310,311].

Las razas afroamericana y norteafricana también se han asociado con un peor pronóstico en la EM [312,313].

Además, otros factores ambientales, como los niveles de vitamina D [84], el tabaquismo [98] y ciertas comorbilidades, como hipertensión, hiperlipidemia, enfermedades cardiovasculares, ictus, diabetes y enfermedades psiquiátricas, también se relacionan con un peor pronóstico en la EM [314,315].

·*Factores clínicos.*

Los brotes o recaídas de EM tienen un impacto significativo en la progresión de la enfermedad y la discapacidad a largo plazo, ya que son responsables de la progresión mediada por RAW [12,316]. Un menor tiempo entre el primer y segundo brote y una mayor tasa anualizada de brotes se ha relacionado con un peor pronóstico [317]. La recuperación incompleta de los brotes se ha asociado con una mayor probabilidad de discapacidad permanente [318,320-322]. De hecho, la reducción de la tasa de brotes mediante TMEs se ha correlacionado con una menor discapacidad a largo plazo [318,319]

·*Factores radiológicos.*

El efecto de las variables radiológicas en el pronóstico a largo plazo ha sido ampliamente estudiado, aunque la mayoría de los factores de RM convencional, especialmente la carga lesional en T2, muestran una correlación baja con la discapacidad. La carga lesional en T2 al inicio de la enfermedad se ha relacionado con un riesgo incrementado de un segundo brote [323-325], así como con una mayor atrofia cerebral, lo que implica una pérdida neuronal significativa y se asocia con la adquisición de mayor discapacidad a largo plazo [326]. La atrofia de sustancia gris es un indicador crítico del avance de la enfermedad y se relaciona estrechamente con la neurodegeneración y el deterioro cognitivo en EM, pero solo se puede observar tras un tiempo de evolución [327-329].

Las lesiones captantes de gadolinio se asocian con mayor riesgo de un segundo brote y de discapacidad a largo plazo [330]. La presencia de dos o más lesiones basales se relaciona con formas agresivas de EM y con mayor riesgo de transición a EM secundaria progresiva tras 15 años, aunque no predicen discapacidad a corto plazo [331].

Finalmente, las lesiones con borde paramagnético (PRLs por sus siglas en inglés de *paramagnetic iron rim lesions*) y las lesiones de expansión lenta (SELs por sus siglas en inglés de *slowly expanding lesions*) representan marcadores clave de daño crónico y mal pronóstico en la EM. Las PRLs reflejan inflamación compartimentalizada mediada por microglía/macrófagos cargados de hierro y se han relacionado de manera consistente con mayor discapacidad física y cognitiva, PIRA y atrofia cerebral acelerada [332]. Por su parte, las SELs evidencian una expansión lesional gradual que indica daño tisular sostenido y una elevada probabilidad de evolucionar a lesiones irreversibles crónicas, también conocidas como "agujeros negros" [333].

En conjunto, la presencia de lesiones T2, lesiones T1 captantes, PRLs y SELs constituye un conjunto de marcadores radiológicos que indican un peor pronóstico, integrando tanto la actividad inflamatoria temprana como la neurodegeneración acumulativa.

1.10.1. Biomarcadores

Los biomarcadores solubles están ganando cada vez más relevancia en el diagnóstico, pronóstico y en la monitorización de la respuesta al tratamiento en la EM de la enfermedad. Los avances en su cuantificación han potenciado el conocimiento de los mecanismos implicados en la fisiopatología de la EM, abriendo nuevas oportunidades para desarrollar terapias más efectivas para los pacientes [334,335].

La determinación de los biomarcadores solubles se realiza principalmente en LCR y en suero (Figura 7).

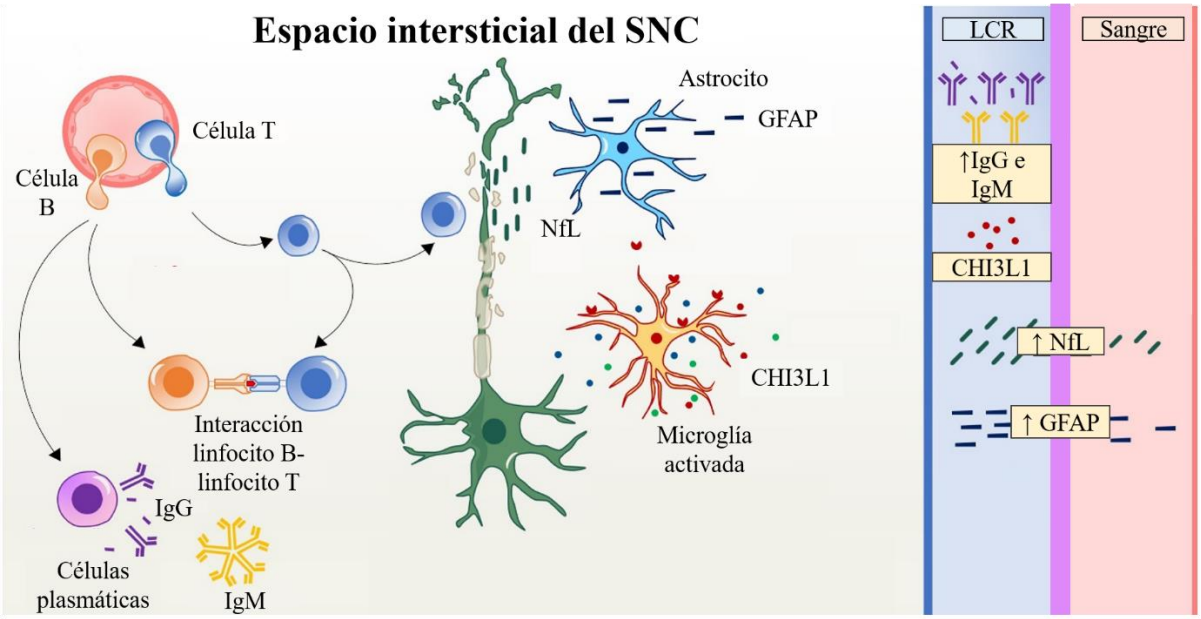


Figura 7. Base fisiopatológica de los biomarcadores en fluidos en EM. Adaptada de: Di Filippo M, Gaetani L, Centonze D, et al. Fluid biomarkers in multiple sclerosis: from current to future applications. Lancet Reg Health Eur. 2024;44:101009. doi:10.1016/j.lanepe.2024.101009 [333]. Abreviaturas: CHI3L1: proteína similar a quitinasa 3 (por sus siglas en inglés de *Chitinasa 3-like 1)*; GFAP: proteína fibrilar ácida glial (por sus siglas en inglés de *Glial fribillary acidic protein)*; Ig: inmunoglobulina; LCR: líquido cefalorraquídeo; NfL: cadena ligera de neurofilamento; SNC: sistema nervioso central.

1.10.1.1. Biomarcadores en líquido cefalorraquídeo.

Los biomarcadores en LCR con mayor valor pronóstico en a EM se dividen en tres grupos principales: los asociados con la inmunidad adaptativa, como las BOC de IgM totales (BOCM) y específicas; los relacionados con la activación de las células gliales, incluyendo la proteína fibrilar ácida glial (GFAP, por sus siglas en inglés de *Glial Fibrillary Acidic Protein*) y la *Chitinase 3-like 1* (CHI3L1, por sus siglas en inglés), indicadores de la activación de astrocitos y microglía; y, por último, aquellos que permiten medir el daño axonal, como las cadenas ligeras de neurofilamentos (NfL), que proporcionan una evaluación precisa del daño axonal agudo [334,335].

-Biomarcadores relacionados con la inmunidad adaptativa

La presencia de SIT de IgM, se asocia con un pronóstico desfavorable de la enfermedad. En particular, la identificación de BOCM, se ha relacionado con un curso clínico más agresivo, caracterizado por un

mayor riesgo de progresión de la discapacidad [336,337]. Este efecto se debe principalmente a las BOCM que reconocen a lípidos de la mielina (BOCMLE), que se asocia de modo más estrecho con una aparición precoz de un segundo brote en comparación con las BOCM totales [338,339], así como con un mayor empeoramiento de la discapacidad [339,340].

-Biomarcadores relacionados con activación glial

Los biomarcadores relacionados con la inmunidad innata son fundamentales para evaluar el estado de activación de las células gliales del SNC, como los astrocitos y la microglía. Entre los biomarcadores más relevantes se encuentran la CHI3L1 y GFAP.

La CHI3L1 es una proteína secretada por varios tipos de células en condiciones normales, pero liberada principalmente por células gliales activadas en procesos inflamatorios como los de la EM. La concentración de esta proteína en el LCR se mide mediante enzimoinmunoensayo, y se ha observado que sus niveles elevados se asocian con un mayor número de lesiones en T2 [341] y lesiones captantes de gadolinio [342], con un mayor grado de atrofia medular [343] y con una mayor probabilidad de alcanzar un EDSS de 3 de forma precoz [344].

La GFAP es una proteína intermedia del citoesqueleto de los astrocitos cuya expresión aumenta en la astrogliosis y la activación de los astrocitos [345]. Su cuantificación se realiza con técnicas de enzimoinmunoensayo y el aumento de sus niveles en el LCR se han relacionado con un aumento de la discapacidad [346-348]. El aumento de sus niveles también se ha asociado con una mayor atrofia cerebral y con marcadores de inflamación crónica meníngea, lo que sugiere que los astrocitos activados pueden actuar como mediadores de la progresión de la enfermedad [345].

-Biomarcadores relacionados con el daño axonal

Finalmente, cuando la respuesta inflamatoria desencadenada genera daño axonal, se liberan en el LCR proteínas estructurales del citoesqueleto de las neuronas, como son los neurofilamentos. Estas proteínas están compuestas por tres subunidades: pesada, intermedia y ligera, según su peso molecular. La subunidad que se cuantifica más comúnmente es la cadena ligera, NfL [334,349]. La concentración de NfL en el LCR se mide a través de enzimoinmunoensayo, y sus niveles aumentados reflejan la magnitud

del daño axonal. Se asocian con el número y la intensidad de los brotes [350,351], el número de lesiones en RM [352], y la puntuación de la EDSS [353]. Asimismo, se ha observado que los niveles de NfL en el LCR se asocian con un mayor porcentaje de pérdida de volumen cerebral a corto y medio plazo [354].

Estos datos muestran que los biomarcadores en LCR son útiles para contribuir al pronóstico de la enfermedad. Sin embargo, su uso para monitorizar la evolución de la misma se ve restringido por la necesidad de realizar una punción lumbar. Por ello, en los últimos años han cobrado relevancia los biomarcadores hemáticos.

1.10.1.2 Biomarcadores hemáticos

El avance en las técnicas analíticas ha transformado el estudio de los biomarcadores en enfermedades neurológicas, permitiendo una monitorización más sensible y menos invasiva de los procesos patológicos. El desarrollo de tecnologías de inmunoensayo ultrasensible de alto rendimiento, como la tecnología SIMOA (por sus siglas en inglés de *Single Molecule Array*), ha posibilitado la detección y cuantificación precisa de biomarcadores en sangre, a pesar de que se encuentren en concentraciones notablemente inferiores a las del LCR [355,356]. Esta capacidad de detección en sangre no solo facilita el seguimiento longitudinal de los pacientes, gracias a la accesibilidad de la muestra, sino que además presenta una sólida correlación con los niveles de dichos biomarcadores en el LCR [357,358].

Entre los más relevantes, los niveles séricos de NfL (sNfL) y GFAP (sGFAP) se han consolidado como los indicadores más prometedores para evaluar la actividad y la progresión de la EM, incluso en fases tempranas de la enfermedad [359].

La sólida evidencia científica ha establecido los sNfL como el principal biomarcador sanguíneo relacionado con la EM [349,360]. El aumento de sNfL no es específico de una enfermedad concreta, sino que puede observarse en una amplia gama de patologías en las que se desarrolla daño axonal [358].

En la EM, los niveles elevados de sNfL reflejan daño axonal debido a la inflamación aguda. Sus niveles se asocian tanto con inflamación clínica como radiológica, evidenciada por una mayor frecuencia de brotes agudos [360,361], mayor número y volumen de lesiones en T2 [362] y captantes de gadolinio en RM [361,363]. En pacientes con SCA, los niveles elevados de sNfL se correlacionan con una mayor

tasa de conversión a EM [364], mientras que los pacientes ya diagnosticados presentan concentraciones significativamente más altas que los CS, aunque existe un solapamiento parcial que impide su uso como marcador diagnóstico [360,363,364]. El incremento temprano en los niveles de sNfL parece preceder a la aparición clínica de un brote. Se ha observado que los niveles aumentan hasta dos meses antes de un brote inflamatorio agudo en pacientes con EMRR [365]. En cuanto a su utilidad como biomarcador pronóstico, unos niveles basales elevados de sNfL predicen un mayor riesgo de avance de la discapacidad en la enfermedad [366-369]. En concreto se ha observado que dichos valores altos se asocian con la progresión asociada a la inflamación aguda, y por tanto con el riesgo de RAW y PIRA inflamatorio [370-373]. Finalmente, los sNfL también son útiles para monitorizar la respuesta a los tratamientos, reflejando cambios en la actividad inflamatoria. Varios estudios han mostrado que la bajada de los sNfL tras el uso de TMEs de moderada y alta eficacia se asocia con una mejor respuesta a tratamiento [371,373-376].

A pesar de los resultados prometedores de los sNfL en la EM, su estandarización sigue siendo un desafío que limita su aplicabilidad. Los niveles de sNfL pueden medirse mediante diversas técnicas [377] y están influenciados por determinadas variables como el índice de masa corporal (IMC) y la edad [366,378]. Para paliar el efecto de dichas variables se ha desarrollado un *Z-score* que normaliza los valores de los sNfL corrigiéndolos según los valores de controles emparejados por edad y IMC, lo que permite una interpretación más precisa del biomarcador [366]. Sin embargo, los intervalos de normalidad para este marcador no han sido aun claramente definidos en una cohorte de individuos sanos, más allá de la creada para elaborar la herramienta.

Además de los sNfL, la sGFAP ha surgido como un biomarcador clave en la evaluación de la progresión de la EM, proporcionando información valiosa sobre la activación astrocítica, la astrogliosis y reflejando procesos neurodegenerativos asociados con la inmunidad innata [368,379]. A diferencia de los sNfL, que están más vinculados a daño axonal agudo, la sGFAP se asocia con mecanismos neurodegenerativos relacionados con la inflamación compartimentalizada e independientes de la inflamación aguda. Los niveles elevados de sGFAP se han asociado con un mayor número de lesiones crónicas y una mayor acumulación de discapacidad [380-383]. Los niveles elevados de sGFAP han

resultado ser particularmente útiles para predecir el PIRA no inflamatorio, que cursa sin la presencia de lesiones detectables por neuroimagen [370].

A diferencia de los sNfL, la utilidad de la sGFAP para monitorizar la respuesta al tratamiento aún no es uniforme, probablemente debido a su relación con la inflamación intratecal, un proceso sobre el que los TMEs actuales tienen escasa influencia [373,374,384].

El uso de sGFAP como biomarcador de progresión en la EM todavía enfrenta dificultades por la estandarización de su medición y la interpretación de los valores en distintos contextos clínicos. Dado que el uso de sGFAP para monitorizar la progresión de la enfermedad es relativamente nuevo, sus valores normales siguen siendo objeto de estudio, y los puntos de corte utilizados se han establecido a partir de diferentes percentiles en cohortes de pacientes con EM. Aunque los niveles de sGFAP aumentan fisiológicamente con la edad [368], aún no se ha esclarecido si este aumento se produce de forma gradual o si muestra una distribución bimodal. Otros factores que pueden influir en estos niveles, como el IMC, siguen siendo motivo de debate [383]. Asimismo, la utilidad del *Z-score* aún no ha sido validada, debido a la escasa y reciente bibliografía disponible [371], lo que pone de manifiesto la necesidad de desarrollar valores de referencia en CS ajustados a las variables que pueden influir en sus niveles.

A partir de estos resultados, la combinación de sNfL y sGFAP posibilita una estratificación más precisa de los pacientes según su tipo de progresión. Sin embargo, los valores normales de estos biomarcadores en una cohorte sana no están del todo definidos, y aunque se sugiere una posible asociación de los biomarcadores con el tipo de inflamación, los mecanismos fisiopatológicos subyacentes a la asociación clínica descrita por la combinación de ambos biomarcadores aún no se han estudiado. La investigación de estos mecanismos es necesaria no solo para obtener una mejor comprensión de la enfermedad, sino para desarrollar nuevas dianas terapéuticas dirigidas a aquellos pacientes con PIRA no inflamatorio, que muestran a menudo una respuesta subóptima a los TMEs actuales.

2. JUSTIFICACIÓN DE LA TESIS

La EM es una enfermedad crónica, heterogénea y compleja, tanto en su presentación clínica como en su progresión. La variabilidad en la enfermedad plantea importantes desafíos para el diagnóstico, el manejo y el tratamiento de los pacientes, ya que los síntomas, la velocidad de progresión y la respuesta a las terapias pueden diferir significativamente entre individuos. El pronóstico de la EM se ha basado históricamente en la combinación de factores clínicos, radiológicos y biomarcadores en LCR. No obstante, en los últimos años ha ganado protagonismo el papel de los biomarcadores séricos, cuya accesibilidad y facilidad de obtención permiten no solo un pronóstico precoz de la enfermedad, sino también el seguimiento dinámico de su evolución.

Entre los biomarcadores más prometedores destacan los sNfL y la sGFAP. Los sNfL se han establecido como marcador de daño axonal mediado por inflamación aguda, mientras que la sGFAP de neurodegeneración independiente de la inflamación. La cuantificación combinada de ambos factores nos ofrece una información importante sobre el curso de la enfermedad, ya que nos permite clasificar a los pacientes según su fenotipo inflamatorio. Sin embargo, los mecanismos patológicos que subyacen a estas asociaciones aún no se han determinado.

Tradicionalmente, los estudios han abordado los mecanismos patológicos de la EM de manera global, sin considerar la heterogeneidad de la enfermedad. En este contexto, resulta necesario estudiar los mecanismos patológicos asociados a los distintos cursos de la enfermedad definidos por la combinación de sNfL y sGFAP, mediante el establecimiento de puntos de corte para ambos biomarcadores y el análisis de los mecanismos inmunológicos vinculados a cada fenotipo. Este enfoque contribuye a una mejor comprensión de la fisiopatología de la enfermedad y a la identificación de posibles dianas con relevancia clínica en la EM.

3. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

3.1. Hipótesis

La estratificación de los pacientes con EM según los niveles de sNfL y sGFAP podría identificar distintos mecanismos fisiopatológicos que contribuyen a los diferentes tipos de evolución de la discapacidad en la EM.

3.2. Objetivos

1. Delimitar los valores normales de sNfL y sGFAP en una cohorte de individuos sanos teniendo en cuenta variables que puedan influir en sus niveles, como la edad, el índice de masa corporal y otras características demográficas y clínicas.

2. Estudiar la respuesta inmunológica celular en sangre periférica en pacientes con EM estratificados por sNfL y sGFAP, y compararlos con individuos sanos.

3. Estudiar factores solubles en suero que podrían estar relacionados con los mecanismos de inflamación, migración celular y reparación que caracterizan a los distintos subtipos de EM definidos por los niveles de sNfL y sGFAP, y compararlos con individuos sanos.

4.PUBLICACIONES

4.1. Objetivo 1: Delimitar los valores normales de sNfL y sGFAP en una cohorte de individuos sanos teniendo en cuenta variables que puedan influir en sus niveles, como la edad, el índice de masa corporal y otras características demográficas y clínicas.

Artículo: Rodero-Romero A, Monreal E, Sainz-Amo R, García Domínguez JM, Villarrubia N, Veiga-González JL, Fernández-Velasco JI, Goicochea-Briceño H, Rodríguez-Jorge F, Sainz de la Maza S, Chico-García JL, Muriel A, Masjuan J, Costa-Frossard L, Villar LM. Establishing Normal Serum Values of Neurofilament Light Chains and Glial Fibrillary Acidic Protein Considering the Effects of Age and Other Demographic Factors in Healthy Adults. Int J Mol Sci. 2024 Jul 17;25(14):7808. doi: 10.3390/ijms25147808.

Resumen

Antecedentes: Múltiples estudios han demostrado la importancia de los biomarcadores sanguíneos que indican daño axonal (sNfL) o activación de la astroglia (sGFAP) para el seguimiento de diferentes enfermedades neurológicas. Sin embargo, los valores normales de estas variables aún no se han definido claramente, en parte debido a la influencia de diferentes factores demográficos.

Diseño del estudio: Estudio transversal, multicéntrico que analiza los niveles de sNfL y sGFAP en sangre periférica de CS.

Cohorte: Se incluyeron 116 CS con edades comprometidas entre 18 y 69 años (67,5% mujeres).

Métodos: Se obtuvieron muestras de suero de los CS y se analizaron las concentraciones de sNfL y sGFAP utilizando la tecnología ultrasensible SIMOA. La relación entre las variables demográficas recopiladas y los niveles de estos biomarcadores se evaluó mediante pruebas de regresión lineal, correlación de Spearman y regresión logística. Los participantes se estratificaron por grupos de edad, y las diferencias entre estos grupos se analizaron utilizando las pruebas U de Mann-Whitney, Kruskal-Wallis y el test post hoc de Dunn.

Resultados: La edad y el IMC influyeron en los niveles de sNfL, siendo la edad el factor más determinante. Se observaron cambios en los valores normales de sNfL según la edad, estableciéndose un límite de <10 pg/mL para individuos menores de 45 años y de <15 pg/mL para aquellos mayores de 45 años. Además, un *Z-score* de 1,5 resultó ser un punto de corte adecuado para los controles, independientemente de la edad.

Los niveles de sGFAP estuvieron exclusivamente influenciados por la edad, observándose una distribución bimodal, con diferencias significativas observadas a partir de los 55 años. El límite de normalidad para sGFAP se definió en 140 pg/mL para individuos menores de 55 años y en 280 pg/mL para aquellos mayores de dicha edad.

Conclusiones: Se definen los niveles normales para sNfL y sGFAP en una cohorte de CS y su relación con la edad. Estos hallazgos reflejan la necesidad de ajustar los rangos de normalidad en función de la edad, lo que podría optimizar la incorporación de estos biomarcadores en protocolos clínicos para el seguimiento de enfermedades neurológicas.

International Journal of
Molecular Sciences

MDPI

Article

Establishing Normal Serum Values of Neurofilament Light Chains and Glial Fibrillary Acidic Protein Considering the Effects of Age and Other Demographic Factors in Healthy Adults

Alexander Rodero-Romero [1], Enric Monreal [2], Raquel Sainz-Amo [2], José Manuel García Domínguez [3], Noelia Villarrubia [1], Jose Luís Veiga-González [1], José Ignacio Fernández-Velasco [1], Haydee Goicochea-Briceño [3], Fernando Rodríguez-Jorge [2], Susana Sainz de la Maza [2], Juan Luís Chico-García [2], Alfonso Muriel [4], Jaime Masjuan [2], Lucienne Costa-Frossard [2] and Luisa María Villar [1,*]

[1] Department of Immunology, Hospital Universitario Ramón y Cajal, Red Española de Esclerosis Múltiple (REEM), Red de Enfermedades Inflamatorias (REI), ISCIII, Instituto Ramón y Cajal de Investigación Sanitaria, 28034 Madrid, Spain; alexander.rodero@salud.madrid.org (A.R.-R.); noelia.villarrubia@salud.madrid.org (N.V.); joseluis.veiga@salud.madrid.org (J.L.V.-G.); jfvelasco@salud.madrid.org (J.I.F.-V.)
[2] Department of Neurology, Hospital Universitario Ramón y Cajal, Red Española de Esclerosis Múltiple (REEM), Red de Enfermedades Inflamatorias (REI), ISCIII, Instituto Ramón y Cajal de Investigación Sanitaria, 28034 Madrid, Spain; penry02@hotmail.com (E.M.); raquelsainzamo@gmail.com (R.S.-A.); deterodriguez@hotmail.com (F.R.-J.); susana.sainzdelamaza@salud.madrid.org (S.S.d.l.M.); juanluis.chico.garcia@gmail.com (J.L.C.-G.); jaime.masjuan@salud.madrid.org (J.M.); lucienne.costa@salud.madrid.org (L.C.-F.)
[3] Department of Neurology, Hospital General Universitario Gregorio Marañón, 28007 Madrid, Spain; jgarciadominguez@salud.madrid.org (J.M.G.D.)
[4] Department of Biostatistics, Hospital Universitario Ramón y Cajal, CIBERESP, Instituto Ramón y Cajal de Investigación Sanitaria, 28034 Madrid, Spain; alfonso.muriel@uah.es
* Correspondence: luisamaria.villar@salud.madrid.org

check for updates

Citation: Rodero-Romero, A.; Monreal, E.; Sainz-Amo, R.; García Domínguez, J.M.; Villarrubia, N.; Veiga-González, J.L.; Fernández-Velasco, J.I.; Goicochea-Briceño, H.; Rodríguez-Jorge, F.; Sainz de la Maza, S.; et al. Establishing Normal Serum Values of Neurofilament Light Chains and Glial Fibrillary Acidic Protein Considering the Effects of Age and Other Demographic Factors in Healthy Adults. *Int. J. Mol. Sci.* **2024**, *25*, 7808. https://doi.org/10.3390/ijms25147808

Academic Editor: Anna-Leena Sirén

Received: 21 June 2024
Revised: 11 July 2024
Accepted: 15 July 2024
Published: 17 July 2024

Copyright: © 2024 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/).

Abstract: Multiple studies have shown the importance of blood-based biomarkers indicating axonal damage (serum neurofilament light chains [sNfL]) or astroglia activation (serum glial fibrillary acidic protein [sGFAP]) for monitoring different neurological diseases. However, normal values of these variables remain to be clearly defined, partly due to the influence of different demographic factors. We investigated demographic differences in a cohort of healthy volunteers. A cross-sectional study was conducted including 116 healthy controls with ages between 18 and 69 years (67.5% females; n = 79). sNfL and sGFAP concentrations were measured using single-molecule arrays. Age and body mass index affected sNfL values, and age was found to be the most important factor. The normal values changed with age, and we established normal values for individuals younger than 45 years as <10 pg/mL and for controls older than 45 years as <15 pg/mL. We established normal values at <10 pg/mL for individuals younger than 45 years and <15 pg/mL for older individuals. Alternatively, a Z-score of 1.5 was relevant for all controls. sGFAP was only affected by age. Differences in normal values were evident by 55 years. The highest normality limit for sGFAP was 140 pg/mL for controls under 55 years and 280 for older controls. We defined normal levels for sNfL and sGFAP and their corresponding age-associated changes. These data may contribute to the application of such variables in clinical practice.

Keywords: neurodegeneration; neuroinflammation; biomarkers; healthy controls

1. Introduction

Blood-based biomarkers in neurological diseases have recently gained considerable attention because of their accessibility and minimally invasive procedures. Neurofilaments and glial fibrillary acidic protein (GFAP) have emerged as promising candidates for

examining disease pathophysiology in neurological conditions, such as multiple sclerosis (MS), Alzheimer disease, Parkinson's disease, and others [1–5].

Neurofilaments are structural axonal cytoskeleton proteins composed of three subunits—(1) heavy, (2) intermediate, and (3) light chains—based on their molecular weights. These chains constitute polymers located under the plasma membrane. After axonal damage occurs, polymers become disorganized and are released into the extracellular space medium, as occurs in certain neurological diseases [6–8]. The most commonly detected subunit is the neurofilament light chain (NfL). Its levels were first evaluated in cerebrospinal fluid (CSF) [6,9]. However, the onset of a highly sensitive technique, the single-molecule array (SIMOA), allowed researchers to quantify NfL levels in serum (sNfL) [7–9]. A good correlation exists between NfL levels in CSF and serum, thus enabling the use of sNfL as a reliable biomarker of axonal damage [9].

The potential use of this biomarker has been observed in various neurological diseases. High levels of sNfL correlate with MS activity, predicting relapses, disease progression, and increases in disability along the disease course [4,8,10,11]. Recent research has demonstrated that elevated sNfL levels can also predict future brain volume loss in MS patients, highlighting its importance in long-term disease monitoring [12]. Additionally, elevated sNfL levels are linked with the presence of amyloid plaques and tau in Alzheimer's disease, making it a useful tool for early diagnosis and monitoring of disease progression [5,13]. sNfL levels are also known to predict cognitive decline and brain atrophy in Alzheimer's disease [13,14]. In Parkinson's disease, sNfL levels rise as the disease worsens, correlating with declining motor skills and cognitive abilities [15,16]. Moreover, sNfL can help to distinguish Parkinson's from similar conditions like multiple system atrophy (MSA) and progressive supranuclear palsy (PSP), as sNfL levels are much higher in MSA and PSP [16]. Overall, sNfL is a promising biomarker for various neurodegenerative and neuroinflammatory diseases, providing valuable insights into disease mechanisms and contributing to establishing personalized treatments. However, its normal values in healthy individuals are not fully defined, limiting the applicability of this biomarker in clinical practice. The normal values of sNfL have been difficult to determine due to its correlation with variables such as body mass index (BMI) and age [4,13,17–20]. Statistical tools, such as the Z-score, are used to standardize sNfL levels by comparing them to a reference group and adjusting for age and BMI [19,20]. However, despite this advancement, the Z-score values are not fully established in clinical practice, since their calculations remain cumbersome. Additionally, the interval of normality for this score remains to be clearly established.

GFAP, which is predominantly expressed in astrocytes, began to emerge as a biomarker for astrogliosis and CNS injury [5,21]. The serum values of sGFAP can be quantified by using highly sensitive techniques, such as SIMOA and the i-STAT TBI plasma assay. Elevated sGFAP levels correlate with micro-damage in normal-appearing white and grey matter, thus suggesting its involvement in the pathophysiology of different neurological diseases [5,21–23]. In MS, increased GFAP levels correlate with disease severity and progression, providing insights into the extent of astrocytic involvement [10,22,23]. In Alzheimer's disease, high GFAP levels are linked to amyloid plaque load and neurofibrillary tangles, suggesting its potential in early diagnosis and disease monitoring [21,24]. Elevated GFAP levels correlate with cognitive decline and brain atrophy, providing a non-invasive method to track disease progression [5,21]. Similarly, in Parkinson's disease, higher GFAP levels are associated with more severe motor dysfunction and cognitive decline, making it a potential marker for disease severity [5,25].

This growing body of research highlights the importance of GFAP in understanding and managing neurodegenerative and neuroautoimmune diseases, enhancing diagnostic accuracy and patient care. Since GFAP is a relatively novel biomarker, normal values are still under investigation. Currently, it has been observed that GFAP levels are associated with an individual's age [5,24–26], but while efforts are being made to establish a Z-score for this biomarker, results have not yet been published [5,24].

Despite the promising role of sNfL and sGFAP as biomarkers in neurodegenerative and neuroautoimmune diseases, a significant gap remains in terms of establishing their normal values in healthy individuals. A few studies use healthy controls to compare these biomarkers with patient cohorts, but they often do so without defining standardized normal ranges [27–29]. This limitation hinders the clinical applicability of sNfL and sGFAP, making it difficult to interpret elevated levels accurately.

This study aims to establish the normal values of sNfL and sGFAP in healthy individuals, examining the influence of putative confounding factors such as age, sex, and BMI on their levels.

2. Results

2.1. Serum Neurofilaments (sNfL)

2.1.1. Association with Sex

We explored differences in sNfL values among the 79 females (67.5%) and 38 males (32.5%) participating in the study. We did not find significant differences between sexes for sNFL. The median values for sNfL were 6.3 pg/mL, and the 25–75% interquartile range (25–75% IQR) was 4.3–9.8 pg/mL for males. These values were 7.20 pg/mL and 4.7–9.8 pg/mL for females ($p = 0.35$).

Then, to gain a comprehensive understanding of how sex, age, sGFAP, and BMI collectively and individually impact the sNfL values, and to avoid misinterpretation of the association of different factors with sNfL levels due to the interference of other variables, a logistic regression was also conducted (Table 1). The variance inflation factor (VIF) scores of these variables ranged from 1.05 to 1.16, indicating no multicollinearity between them. No association with sex was found using this method either.

Table 1. Results of the logistic regression analysis examining the associations between sNFL, sex, sGFAP, BMI, and age. The table displays the estimated coefficients, standard errors, *p*-values, and the 95% confidence interval for each predictor variable. sNFL: serum neurofilaments; sGFAP: serum glial acidic fibrillary protein; BMI: body mass index; SE: standard error.

sNFL	Coefficient	SE	*p*-Value	[95% Conf. Interval]	
sGFAP	0.010	0.005	0.077	−0.001	0.212
Age	0.162	0.023	0.000	0.116	0.208
BMI	−0.148	0.069	0.033	−0.285	−0.118
Sex	−0.393	0.555	0.994	−1.104	1.096

2.1.2. Association with BMI

We next explored the association of body mass index and sNfL values. We did not find any significant correlation when we evaluated them based on linear regression ($R^2 = 0.28$; $p = 0.68$, Figure 1A) and Spearman's ($r = 0.06$; $p = 0.50$) tests. However, the logistic regression showed a negative correlation between sNfL levels and BMI. For each point of BMI increase, sNfL values decreased by −0.15 pg/mL (Table 1).

2.1.3. Association with Age

To assess the relationship between sNfL levels and age, we first analyzed the linear regression between both variables. A positive correlation was found between sNfL and age ($R^2 = 0.41$, $p < 0.0001$, Figure 1B). The correlation analysis using Spearman's test revealed an even stronger positive correlation ($r = 0.67$; $p < 0.0001$). Finally, the logistic regression analysis also showed a significant correlation between sNFL levels and age (Table 1). This analysis indicated that sNfL levels increased by 0.16 pg/mL for every year of age.

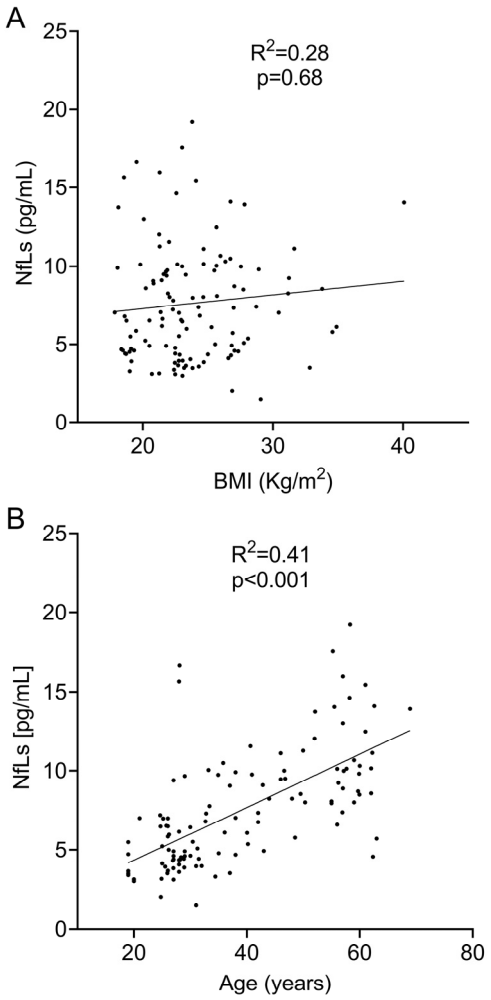


Figure 1. Linear regression analysis between sNfL levels and BMI (**A**) and age (**B**).

We then explored sNfL values in controls, which were classified according to the following age ranges: (1) ≤25 years, (2) 26–35 years, (3) 36–45 years, (4) 46–55 years, (5) 56–60 years, and (6) >60 years (Figure 2A). No significant differences in sNfL values were found between the first three groups. However, participants older than 45 years showed clearly higher values. Accordingly, we classified patients in two groups, those with ages ≤ 45 years and those with ages > 45. We found clear differences in sNfL values between them ($p < 0.0001$, Figure 2B). No group showed a normal distribution based on the Kolmogorov–Smirnov test ($p = 0.003$ for Group ≤ 45 and $p = 0.008$ for Group > 45), and thus, we calculated the median values and 25–75% IQR for both groups. Additionally, we explored 90% percentiles, which are commonly used to establish normal values in healthy cohorts showing non-normal distribution [23]. Our results were 4.9 pg/mL (3.9–7.0; median [25%–75% IQR]), with a 90th percentile of 10 pg/mL for Group ≤ 45, and 10.0 pg/mL (IQR = 8.4–12.6), with a 90th percentile of 15 pg/mL for Group > 45. Only 1 of 72 controls belonging to the first group showed values higher than the 90th percentile (10 pg/mL). Accordingly, only 4 out of the 43 participants older than 45 years had sNfL values higher than 15 pg/mL. We then established that sNfL values lower than 10 pg/mL can be considered normal for individuals aged ≤ 45 years, and values lower than 15 pg/mL are the normal range in older individuals. Notably, all participants under 25 years had sNfL values lower than 7.5 pg/mL, so special consideration could be given to younger individuals with sNfL levels above these values.

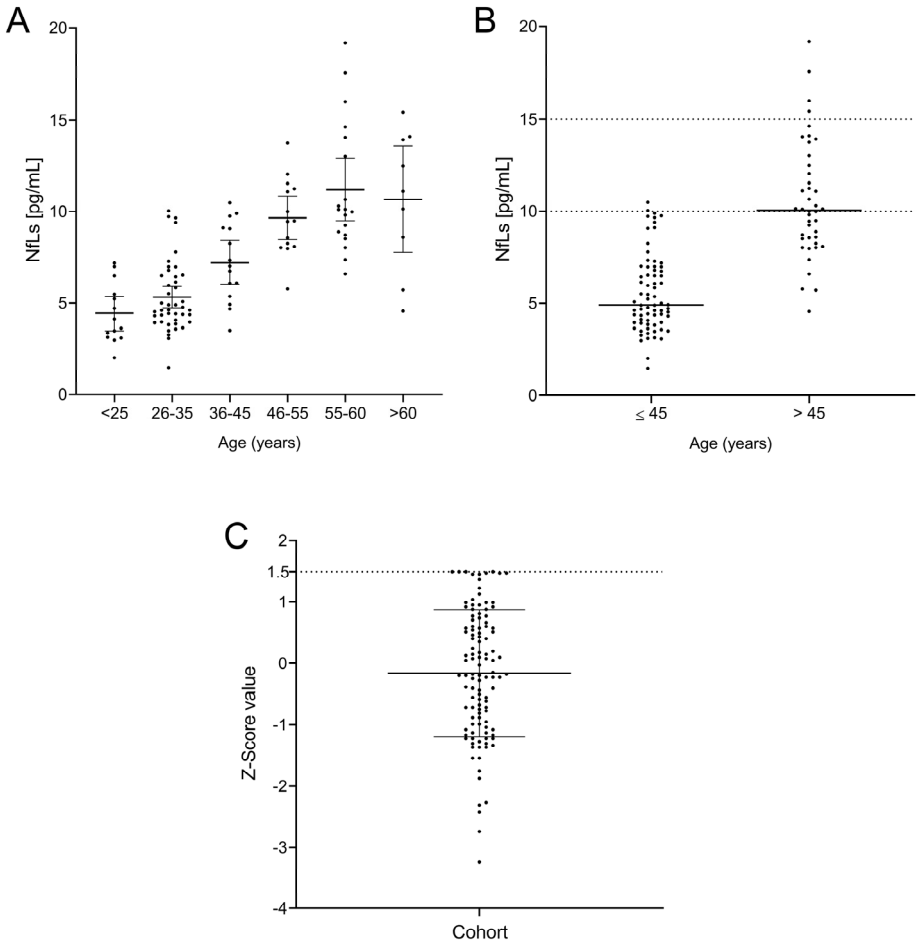


Figure 2. Levels of neurofilaments by age group (**A**), divided into individuals younger and older than 45 years, with their normal values as the 90th percentile (**B**) and Z-score (**C**) for the entire cohort.

We then examined the Z-scores in our cohort. All individuals showed values ≤ 1.5 (Figure 2C) independent of age. We then established that this value was the limit for healthy individuals.

2.2. Serum Glial Acidic Fibrillary Protein (sGFAP)

2.2.1. Association with Sex

We next explored the sGFAP values in controls classified by their sex. We did not find significant differences within males, with a median value of 92.1 pg/mL [25–27% IQR: 73.19–119.6], or females, with a median of 101.3 pg/mL [25–75% IQR: 80.4–137], $p = 0.25$. A logistic regression analysis including BMI and age was also carried out (Table 2). It confirmed that sex does not affect the sGFAP levels. No multicollinearity was observed between these variables, with a VIF score close to a value of 1.

Table 2. Summary of logistic regression analysis assessing the associations of sGFAP with sex, sNfL, BMI, and age. The table includes the estimated coefficients, standard errors, *p*-values, and 95% CI for each predictor variable. BMI: body mass index; SE: standard error.

sGFAP	Coefficient	SE	*p*-Value	[95% Conf. Interval]	
sNfL	2.771	1.550	0.077	−0.300	5.843
Age	1.645	0.432	<0.001	0.788	2.501
BMI	−1.436	1.160	0.218	−3.736	0.862
Sex	0.479	9.798	0.959	−17.748	18.707

2.2.2. Association with BMI

Likewise, we did not find a significant association between sGFAP and BMI when they were analyzed using linear regression (R^2 = 0.002; p = 0.66, Figure 3A) or a Spearman's test (r = 0.03; p = 0.76). No association was obtained on the logistic regression analysis (Table 2).

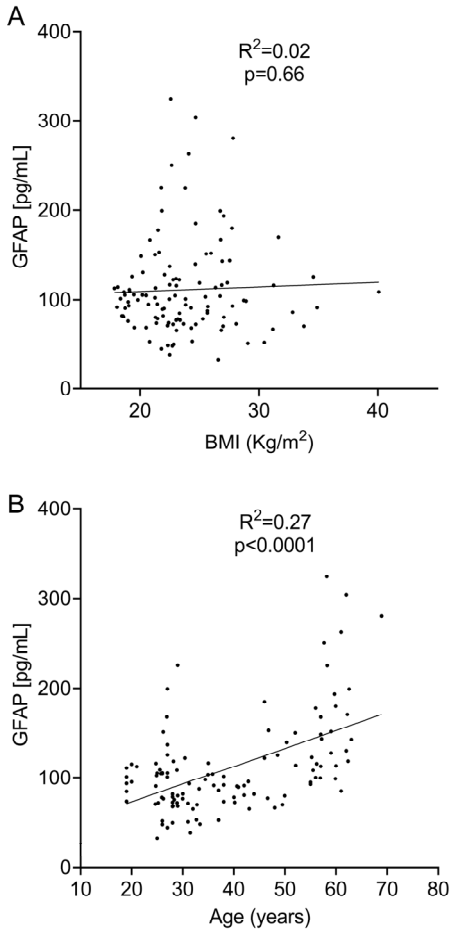


Figure 3. Linear regression analysis between sGFAP levels and BMI (**A**) and age (**B**).

2.2.3. Association with Age

We observed a clear correlation between sGFAP and age when they were analyzed using linear regression (R^2 = 0.4110; $p < 0.0001$, Figure 3B), Spearman's test (r = 0.42; $p < 0.0001$), and logistic regression (Table 2). This correlation indicates that the age range probably influences normal values. To explore this, we again divided the cohort into six different age groups. sGFAP values remained fairly stable in participants aged under 55 years and abruptly increased in controls older than 55 years (Figure 4A). Accordingly, we classified participants in two groups, those aged $\leq$ 55 years (Group $\leq$ 55) and older individuals (Group > 55). We again performed descriptive analyses and did not find a normal distribution in any group (p = 0.008 for Group $\leq$ 55 and p = 0.006 for Group > 55). The $\leq$55 group had a median value of 90.5 (25–75% IQR: 71.2–107.9) and a 90th percentile of 140 pg/mL. The >55 group showed a median value of 145.8 (25–75% IQR: 114.2–197.9) with a 90th percentile of 280 pg/mL (Figure 4B). We established values below the 90th percentile as the normal values for both age ranges. Only 6 of 88 controls in the $\leq$55 group showed values higher than the 90th percentile (140 pg/mL). Correspondingly, only 3 of 28 controls in the >55 group showed values higher than the 90th percentile (280 pg/mL). Notably, individuals under 25 years did not have particularly low sGFAP values.

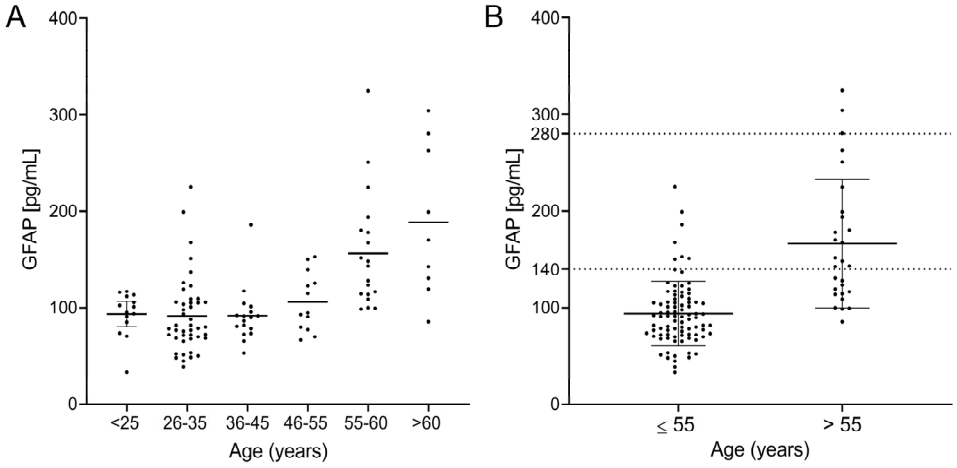


Figure 4. sGFAP levels according to age groups: (**A**) divided into individuals younger and older than 55 years with their normal values as the 90th percentile; (**B**) for the entire cohort.

3. Discussion

An increasing number of studies show that blood biomarkers, such as sNfl and sGFAP, are useful for the clinical assessment of patients with neurological diseases, including MS and Alzheimer's disease [1,7,10,13,19]. However, blood biomarkers' applicability remains limited, mainly because reference values are usually established according to specific studies' patient populations, which challenges their widespread use in clinical settings. In addition, many studies use a single cut-off point for the entire cohort without considering important demographic factors, such as age, sex, and/or BMI [17,30–32]. However, it is crucial to establish normal values for these variables in a cohort of healthy individuals after considering demographic factors. This type of consideration would provide reference values for examining the value of these biomarkers under different clinical conditions.

Age is the primary confounding factor when examining serum biomarkers in neurodegenerative diseases. Our results confirm previous findings that have determined that sNfL values increase with age [11,18,21,24]. In the case of sNfL, we observed that different normal values exist according to age. We observed that a cut-off value of 10 pg/mL, frequently used to differentiate low and high values of sNfL [8,11,19], only works for individuals $\leq$ 45 years. Even in this group, we noticed that individuals under 25 showed lower sNfL values, raising the question of whether separate normal values should be set for this age group in future studies to ensure appropriate usage. By contrast, for patients with ages > 45 years, the cut-off rose to 15 pg/mL. The positive correlation between sNfL and age corroborates that adjusting sNfL levels by age could improve the accuracy of this biomarker in clinical practice.

We also confirmed that BMI has a modest negative correlation with sNfL, although the effect of age was clearly higher. The cut-off values established in our work could be useful in clinical practice for rapid patient assessment. However, when more precise data are needed, the Z-score values, as previously described, could be the best option [20,31] The z-scores correct raw data by age and also by BMI values. It avoids overestimation of the values of SnfL in aged individuals, and may also avoid underestimation of sNfL data in patients with very high BMIs. We explored the normal values for the z-score. A value of 1.5 clearly defines healthy controls. Different studies have indicated that values between 1 and 2 can be good cut-off values for the z-score in MS [19,31]. Our data reinforce that the value of 1.5 can discriminate high from normal values. S. This may contribute to higher consistency and reproducibility of z-score values across different diseases.

sGFAP, a marker of astrogliosis/astrocyte activation, also represents a promising biomarker for predicting innate cell activation in different neurological diseases. However, normal values of this protein, in addition to the influence of demographic factors on normal values, have been far less studied [5,23,33–35]. We observed that only age had a significant

influence on sGFAP levels. Unlike the gradual variations seen in sNfL across age ranges, sGFAP showed a more striking change at an age around 55 years. Below this age, the values remained stable across the studied ranges, while a clear increase occurred in individuals who were older than 55 years old. These data are interesting, since recent data suggest that GFAP plays a role in the immune senescence process [36,37]. Consequently, we established a cut-off value of 140 pg/mL for individuals younger than 55 years and 280 pg/mL for those who were older. Since the changes are very evident at 55 years of age, we believe that it may not be necessary to establish a reference Z-score for sGFAPs, since the normal levels established in the two age groups can be widely applied.

We describe now that the two cut-off values are essential for GFAP analyses. If a control cohort not separated by age is used, most healthy individuals should show high values at ages older than 55, and this would make the study of neurodegenerative diseases such as Alzheimer's, where high sGFAP values have proven to be essential for the formation of Tau tangles, difficult [21]. Having age-stratified values should be very important in evaluating the impact of new treatments on the disease. The same is true for MS, where sGFAP, usually associated with older age, may play an important role in the progressive phase of the disease [23–25].

Our study has some limitations. The number of controls included was relatively low, and the data obtained should be validated in larger cohorts. Additionally, the study population may not be representative of the broader population in terms of age, sex, and BMI. In case of age, we wanted to cover an adult population ranging from 18 to 69 years, which may be useful for studying different neurological diseases in this age range. Future studies are warranted to explore the control values of pediatric patients and controls of older ages. Regarding sex, we were limited by donations, and a predominance of the female sex (67.5%) was observed in our cohort. However, as 32.5% males were included, we could clearly analyze the differences between sexes. The BMI value was not a prerequisite for inclusion in the study, and thus, it ranged between 17.85 and 40.08, which represents the general population in our environment, but does not reflect values in other settings.

Other limitations of the study were other potential confounding factors such as lifestyle, diet, physical activity, and genetic predispositions, which were not controlled. However, we asked the participants about toxic habits such as drug or alcohol intake, which could influence the results. They were included as exclusion criteria. Finally, all individuals included in the study were Caucasians living in Spain. We did not include other ethnic groups or geographic localizations. Further studies will demonstrate how these factors can influence sNfL and sGFAP values in a more general setting.

In summary, this work confirmed the influence of age and, to a lesser extent, BMI on the sNfL levels of healthy individuals. It describes the cut-off values of this variable depending on age. Additionally, we confirmed the importance of the Z-score to accurately determine the normal values of sNfL and established the best cut-off for this variable. On the other hand, we examined the normal values of sGFAP and determined their associations with age. The normal values defined for sNfL and sGFAP, considering age and demographic factors, enhance the accuracy of these biomarkers, enabling a more precise assessment of pathological conditions.

4. Materials and Methods

4.1. Study Design

This multi-center, cross-sectional study was approved by the Ethics Committee of the Ramón y Cajal University Hospital in Madrid (Ethics Committee approval number: 237–27). It was performed in the Hospital Universitario Ramón y Cajal and the Hospital General Universitario Gregorio Marañón, which shared the inclusion criteria and sample processing. All participants signed an informed consent form prior to entering the study.

4.2. Participants

A total of 116 healthy volunteers were enrolled in our study between August 2023 and February 2024. All participants were volunteers recruited among the personnel and students of both hospitals.

The inclusion criteria were age of 18 years or older, no evidence of disease, and absence of toxic habits (alcoholism or drug consumption).

The exclusion criteria were treatment with immunosuppressive drugs or chemotherapeutic agents.

A physician interviewed each control, although they did not conduct in-depth medical examinations.

Demographic information on every participant, including age, sex, and BMI (weight [kg]/height [m^2]), was collected. The participants' ages ranged from 18 to 69 years. The median age was 35 years [25–75% IQR: 27–55 years]. In total, 38 males (32.5%) and 79 females (67.5%) with a median BMI of 23.03 [25–75% IQR: 21.28–26.47] participated.

When needed, the participants were stratified by age into the following groups: (1) $\leq$25 years (n = 14), (2) 26–35 years (n = 43), (3) 36–45 years (n = 15), (4) 46–55 years (n = 14), (5) 56–60 years (n = 19), and (6) >65 years (n = 9).

4.3. Sample Processing

Serum samples were collected from the study participants by extracting 10 mL of blood into dry tubes. The tubes were kept for 30 min at room temperature to allow coagulation, then centrifuged at 3000$\times$ g for 5 min. After centrifugation, the serum was collected, aliquoted in 250 µL aliquots, and stored at -80 °C until analysis.

The concentrations of sNfL and sGFAP were assessed using the SIMOA NF-light™ Advantage Kit and the Simoa™ GFAP Discovery Kit, respectively (Quanterix, Billerica, MA, USA), on an SR-X instrument (Quanterix, Billerica, MA, USA) following the manufacturer's instructions. SIMOA is an ultrasensitive immunoassay technology used to detect and quantify biomolecules at extremely low levels. The analysis followed a two-step assay protocol performed following the manufacturer's instructions. In summary, paramagnetic beads coated alternatively with anti-NfL or anti-GFAP capture antibodies were incubated with the calibrators (undiluted), controls, and samples (diluted 1:4), always in duplicate, and with biotinylated detection antibodies. After incubation, the beads were washed and incubated with streptavidin-conjugated β-galactosidase. Then, they were washed again and incubated with the fluorimetric substrate. Finally, the plates were introduced into the SR-X instrument, where the microbeads were distributed into an array with 200.000 individual wells, each sized to hold a single microbead in a final volume of 50 fl. This small volume greatly increased the signal and the sensitivity of the detection. sNfl and sGFAP concentrations were automatically calculated using the standard curve.

This approach significantly increased the sensitivity and precision of the assay compared to traditional immunoassay techniques. The lower limits of quantification and detection were, respectively, 0.345 pg/mL and 0.085 pg/mL for the NF-L assay. For the GFAP test, they were 0.686 pg/mL and 0.211 and pg/mL, respectively.

4.4. Statistical Analysis

All statistical analyses were performed using GraphPad Prism 9.0 (GraphPad Prism Inc., San Diego, CA, USA) and Stata, version 14 (StataCorp LLC, Cambridge, MA, USA). All tests were two-tailed, and $p < 0.05$ was considered significant.

We performed descriptive analyses and expressed continuous variables as the median and 25–75% IQR values and assessed normality using the Kolmogorov–Smirnov test. We analyzed the association between demographic variables and sNfL or sGFAP levels by means of linear regression, Spearman correlation, and logistic regression tests.

Differences between groups were examined using the Mann–Whitney U and the Kruskal–Wallis multiple comparisons tests, along with Dunn's post hoc test.

5. Conclusions

In this study, we established the normal values of sNfL and sGFAP in a cohort of healthy individuals and established their different associations with age. sNfL values increased gradually, thus reinforcing the usefulness of a z-score for their fine evaluation, at least for ages above 45 years. By contrast, sGFAP values remained stable for many years and increased abruptly at the age of 55 years. These data reinforce the utility of using two different normality values for evaluating this variable. When confirmed in larger cohorts, our results will improve the integration of these biomarkers in clinical protocols to improve the monitorization of different neurological conditions.

Author Contributions: Conceptualization: A.R.-R. and L.M.V.; formal analysis: A.R.-R., E.M., N.V., A.M. and L.M.V.; investigation: A.R.-R. and L.M.V.; data curation: A.R.-R., E.M., N.V. and L.M.V.; writing—review and editing: A.R.-R., E.M., J.M.G.D., N.V., R.S.-A., J.L.V.-G., J.I.F.-V., F.R.-J., S.S.d.l.M., H.G.-B., J.L.C.-G., J.M., L.C.-F. and L.M.V.; supervision: L.M.V. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This work was supported by grants RD21/0002/0053 from La Red de Enfermedades Inflamatorias; grant PI21/00828, integrated in the Plan Estatal I+D+i, cofunded by Instituto de Salud Carlos III (ISCIII)-Subdirección General de Evaluación and Fondo Europeo de Desarrollo Regional (FEDER; "Otra manera de hacer Europa").

Institutional Review Board Statement: The study was conducted in accordance with the Declaration of Helsinki and approved by the Ethics Committee of the Ramón y Cajal University Hospital in Madrid (protocol code 237-23, 3 October 2023).

Informed Consent Statement: Written informed consent has been obtained from the subjects involved in the study to publish this paper.

Data Availability Statement: The raw data can be obtained from the corresponding author upon reasonable request in the three years following the manuscript's publication.

Acknowledgments: The authors acknowledge the nurses Maria Angeles De Santos, Pilar de Nicolás Santos (Transplant Coordination, Ramón y Cajal University Hospital, Madrid, Spain), Silvia Morel, and Ana María Pérez Macias, MSc (Neurology Dept, Ramón y Cajal University Hospital, Madrid, Spain), for their help in obtaining the blood samples, as well as the technicians Paloma Nuera and Sonia Ortega (Inmunology Dept, Ramón y Cajal University Hospital, Madrid, Spain) for their technical support.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflicts of interest.

References

1. Young, A.L.; Marinescu, R.V.; Oxtoby, N.P.; Bocchetta, M.; Yong, K.; Firth, N.C.; Cash, D.M.; Thomas, D.L.; Dick, K.M.; Cardoso, J.; et al. Uncovering the heterogeneity and temporal complexity of neurodegenerative diseases with Subtype and Stage Inference. *Nat. Commun.* **2018**, *9*, 4273. [CrossRef] [PubMed]
2. Hansson, O. Biomarkers for neurodegenerative diseases. *Nat. Med.* **2021**, *27*, 954–963. [CrossRef] [PubMed]
3. Ehrenberg, A.J.; Khatun, A.; Coomans, E.; Betts, M.J.; Capraro, F.; Thijssen, E.H.; Senkevich, K.; Bharucha, T.; Jafarpour, M.; Young, P.N.E.; et al. Relevance of biomarkers across different neurodegenerative diseases. *Alzheimer's Res. Ther.* **2020**, *12*, 56. [CrossRef] [PubMed]
4. Barro, C.; Healy, B.C.; Liu, Y.; Saxena, S.; Paul, A.; Polgar-Turcsanyi, M.; Guttmann, C.R.G.; Bakshi, R.; Kropshofer, H.; Weiner, H.L.; et al. Serum GFAP and NfL Levels Differentiate Subsequent Progression and Disease Activity in Patients with Progressive Multiple Sclerosis. *Neurol. Neuroimmunol. Neuroinflamm.* **2022**, *10*, e200052. [CrossRef] [PubMed]
5. Abdelhak, A.; Foschi, M.; Abu-Rumeileh, S.; Yue, J.K.; D'Anna, L.; Huss, A.; Oeckl, P.; Ludolph, A.C.; Kuhle, J.; Petzold, A.; et al. Blood GFAP as an emerging biomarker in brain and spinal cord disorders. *Nat. Rev. Neurol.* **2022**, *18*, 158–172. [CrossRef] [PubMed]
6. Thebault, S.; Bose, G.; Booth, R.; Freedman, M.S. Serum neurofilament light in MS: The first true blood-based biomarker? *Mult. Scler. J.* **2022**, *28*, 1491–1497. [CrossRef] [PubMed]
7. Yuan, A.; Nixon, R.A. Neurofilament Proteins as Biomarkers to Monitor Neurological Diseases and the Efficacy of Therapies. *Front. Neurosci.* **2021**, *15*, 689938. [CrossRef]
8. Thebault, S.; Abdoli, M.; Fereshtehnejad, S.M.; Tessier, D.; Tabard-Cossa, V.; Freedman, M.S. Serum neurofilament light chain predicts long term clinical outcomes in multiple sclerosis. *Sci. Rep.* **2020**, *10*, 10381. [CrossRef] [PubMed]

9. Kuhle, J.; Barro, C.; Andreasson, U.; Derfuss, T.; Lindberg, R.; Sandelius, Å.; Liman, V.; Norgren, N.; Blennow, K.; Zetterberg, H. Comparison of three analytical platforms for quantification of the neurofilament light chain in blood samples: ELISA, electrochemiluminescence immunoassay and Simoa. *Clin. Chem. Lab. Med.* **2016**, *54*, 1655–1661. [CrossRef]
10. Meier, S.; Willemse, E.A.J.; Schaedelin, S.; Oechtering, J.; Lorscheider, J.; Melie-Garcia, L.; Cagol, A.; Barakovic, M.; Galbusera, R.; Subramaniam, S.; et al. Serum Glial Fibrillary Acidic Protein Compared with Neurofilament Light Chain as a Biomarker for Disease Progression in Multiple Sclerosis. *JAMA Neurol.* **2023**, *80*, 287–297. [CrossRef]
11. Yalachkov, Y.; Schäfer, J.H.; Jakob, J.; Friedauer, L.; Steffen, F.; Bittner, S.; Foerch, C.; Schaller-Paule, M.A. Effect of Estimated Blood Volume and Body Mass Index on GFAP and NfL Levels in the Serum and CSF of Patients with Multiple Sclerosis. *Neurol. Neuroimmunol. Neuroinflamm.* **2022**, *10*, e200045. [CrossRef]
12. Solís-Tarazona, L.; Raket, L.L.; Cabello-Murgui, J.; Reddam, S.; Navarro-Quevedo, S.; Gil-Perotin, S. Predictive value of individual serum neurofilament light chain levels in short-term disease activity in relapsing multiple sclerosis. *Front. Neurol.* **2024**, *15*, 1354431. [CrossRef] [PubMed]
13. Fang, T.; Dai, Y.; Hu, X.; Xu, Y.; Qiao, J. Evaluation of serum neurofilament light chain and glial fibrillary acidic protein in the diagnosis of Alzheimer's disease. *Front. Neurol.* **2024**, *15*, 1320653. [CrossRef] [PubMed]
14. Mazzeo, S.; Ingannato, A.; Giacomucci, G.; Manganelli, A.; Moschini, V.; Balestrini, J.; Cavaliere, A.; Morinelli, C.; Galdo, G.; Emiliani, F.; et al. Plasma neurofilament light chain predicts Alzheimer's disease in patients with subjective cognitive decline and mild cognitive impairment: A cross-sectional and longitudinal study. *Eur. J. Neurol.* **2024**, *31*, e16089. [CrossRef] [PubMed]
15. Buhmann, C.; Magnus, T.; Choe, C.U. Blood neurofilament light chain in Parkinson's disease. *J. Neural Transm.* **2023**, *130*, 755–762. [CrossRef] [PubMed]
16. Hansson, O.; Janelidze, S.; Hall, S.; Magdalinou, N.; Lees, A.J.; Andreasson, U.; Norgren, N.; Linder, J.; Forsgren, L.; Constantinescu, R.; et al. Blood-based NfL: A biomarker for differential diagnosis of parkinsonian disorder. *Neurology* **2017**, *88*, 930–937. [CrossRef] [PubMed]
17. Khalil, M.; Teunissen, C.E.; Lehmann, S.; Otto, M.; Piehl, F.; Ziemssen, T.; Bittner, S.; Sormani, M.P.; Gattringer, T.; Abu-Rumeileh, S.; et al. Neurofilaments as biomarkers in neurological disorders—Towards clinical application. *Nat Rev Neurol.* **2024**, *20*, 269–287. [CrossRef] [PubMed]
18. Capo, X.; Galmes-Panades, A.M.; Navas-Enamorado, C.; Ortega-Moral, A.; Marín, S.; Cascante, M.; Sánchez-Polo, A.; Masmiquel, L.; Torrens-Mas, M.; Gonzalez-Freire, M. Circulating Neurofilament Light Chain Levels Increase with Age and Are Associated with Worse Physical Function and Body Composition in Men but Not in Women. *Int. J. Mol. Sci.* **2023**, *24*, 12751. [CrossRef] [PubMed]
19. Monreal, E.; Fernández-Velasco, J.I.; García-Sánchez, M.I.; Sainz de la Maza, S.; Llufriu, S.; Álvarez-Lafuente, R.; Casanova, B.; Comabella, M.; Ramió-Torrentà, L.; Martínez-Rodríguez, J.E.; et al. Association of Serum Neurofilament Light Chain Levels at Disease Onset With Disability Worsening in Patients With a First Demyelinating Multiple Sclerosis Event Not Treated with High-Efficacy Drugs. *JAMA Neurol.* **2023**, *80*, 397–403. [CrossRef] [PubMed]
20. Pafiti, A.; Krashias, G.; Tzartos, J.; Tzartos, S.; Stergiou, C.; Gaglia, E.; Smoleski, I.; Christodoulou, C.; Pantzaris, M.; Lambrianides, A. A Comparison of Two Analytical Approaches for the Quantification of Neurofilament Light Chain, a Biomarker of Axonal Damage in Multiple Sclerosis. *Int. J. Mol. Sci.* **2023**, *24*, 10787. [CrossRef]
21. Sánchez-Juan, P.; Valeriano-Lorenzo, E.; Ruiz-González, A.; Pastor, A.B.; Rodrigo Lara, H.; López-González, F.; Zea-Sevilla, M.A.; Valentí, M.; Frades, B.; Ruiz, P.; et al. Serum GFAP levels correlate with astrocyte reactivity, post-mortem brain atrophy and neurofibrillary tangles. *Brain* **2024**, *147*, 1667–1679. [CrossRef] [PubMed]
22. Saraste, M.; Bezukladova, S.; Matilainen, M.; Sucksdorff, M.; Kuhle, J.; Leppert, D.; Airas, L. Increased serum glial fibrillary acidic protein associates with microstructural white matter damage in multiple sclerosis: GFAP and DTI. *Mult. Scler. Relat. Disord.* **2021**, *50*, 102810. [CrossRef] [PubMed]
23. Abdelhak, A.; Antweiler, K.; Kowarik, M.C.; Senel, M.; Havla, J.; Zettl, U.K.; Kleiter, I.; Skripuletz, T.; Haarmann, A.; Stahmann, A.; et al. Serum glial fibrillary acidic protein and disability progression in progressive multiple sclerosis. *Ann. Clin. Transl. Neurol.* **2024**, *11*, 477–485. [CrossRef] [PubMed]
24. Chatterjee, P.; Pedrini, S.; Stoops, E.; Goozee, K.; Villemagne, V.L.; Asih, P.R.; Verberk, I.M.W.; Dave, P.; Taddei, K.; Sohrabi, H.R.; et al. Plasma glial fibrillary acidic protein is elevated in cognitively normal older adults at risk of Alzheimer's disease. *Transl. Psychiatry* **2021**, *11*, 27. [CrossRef] [PubMed]
25. Lin, J.; Ou, R.; Li, C.; Hou, Y.; Zhang, L.; Wei, Q.; Pang, D.; Liu, K.; Jiang, Q.; Yang, T.; et al. Plasma glial fibrillary acidic protein as a biomarker of disease progression in Parkinson's disease: A prospective cohort study. *BMC Med.* **2023**, *21*, 420. [CrossRef] [PubMed]
26. Azzolini, F.; Gilio, L.; Pavone, L.; Iezzi, E.; Dolcetti, E.; Bruno, A.; Buttari, F.; Musella, A.; Mandolesi, G.; Guadalupi, L.; et al. Neuroinflammation Is Associated with GFAP and sTREM2 Levels in Multiple Sclerosis. *Biomolecules* **2022**, *12*, 222. [CrossRef] [PubMed]
27. Ma, L.Z.; Zhang, C.; Wang, H.; Ma, Y.H.; Shen, X.N.; Wang, J.; Tan, L.; Dong, Q.; Yu, J.T. Serum neurofilament dynamics predicts cognitive progression in de novo Parkinson's disease. *J. Park. Dis.* **2021**, *11*, 1117–1127. [CrossRef]
28. Verde, F.; Milone, I.; Maranzano, A.; Colombo, E.; Torre, S.; Solca, F.; Doretti, A.; Gentile, F.; Manini, A.; Bonetti, R.; et al. Serum levels of glial fibrillary acidic protein in patients with amyotrophic lateral sclerosis. *Ann. Clin. Transl. Neurol.* **2023**, *10*, 118–129. [CrossRef] [PubMed]

29. Mørk, F.B.; Madsen, J.O.B.; Pilgaard, K.A.; Jensen, A.K.; Klakk, H.; Tarp, J.; Bugge, A.; Heidemann, M.; Van Hall, G.; Pociot, F.; et al. The metabolic syndrome is frequent in children and adolescents with type 1 diabetes compared to healthy controls. *Pediatr. Diabetes* **2022**, *23*, 1064–1072. [CrossRef]
30. Sellebjerg, F.; Magyari, M. The prognostic value of neurofilament light chain in serum. *Lancet. Neurol.* **2022**, *21*, 207–208. [CrossRef]
31. Benkert, P.; Meier, S.; Schaedelin, S.; Manouchehrinia, A.; Yaldizli, Ö.; Maceski, A.; Oechtering, J.; Achtnichts, L.; Conen, D.; Derfuss, T.; et al. Serum neurofilament light chain for individual prognostication of disease activity in people with multiple sclerosis: A retrospective modelling and validation study. *Lancet Neurol.* **2022**, *21*, 246–257. [CrossRef] [PubMed]
32. Liu, C.; Lu, Y.; Wang, J.; Chang, Y.; Wang, Y.; Chen, C.; Liu, Z.; Kermode, A.G.; Zhang, Y.; Qiu, W. Serum neurofilament light chain and glial fibrillary acidic protein in AQP4-IgG-seropositive neuromyelitis optica spectrum disorders and multiple sclerosis: A cohort study. *J. Neurochem.* **2021**, *159*, 913–922. [CrossRef] [PubMed]
33. Loonstra, F.C.; de Ruiter, L.R.J.; Koel-Simmelink, M.J.A.; Schoonheim, M.M.; Strijbis, E.M.M.; Moraal, B.; Barkhof, F.; Uitdehaag, B.M.J.; Teunissen, C.; Killestein, J. Neuroaxonal and Glial Markers in Patients of the Same Age With Multiple Sclerosis. *Neurol. Neuroimmunol. Neuroinflamm.* **2022**, *10*, e200078. [CrossRef] [PubMed]
34. Chatterjee, P.; Pedrini, S.; Ashton, N.J.; Tegg, M.; Goozee, K.; Singh, A.K.; Karikari, T.K.; Simrén, J.; Vanmechelen, E.; Armstrong, N.J.; et al. Diagnostic and prognostic plasma biomarkers for preclinical Alzheimer's disease. *Alzheimer's Dement.* **2022**, *18*, 1141–1154. [CrossRef] [PubMed]
35. Mak, G.; Menon, S.; Lu, J.Q. Neurofilaments in neurologic disorders and beyond. *J. Neurol. Sci.* **2022**, *441*, 120380. [CrossRef] [PubMed]
36. Stojiljkovic, M.R.; Schmeer, C.; Witte, O.W. Pharmacological Depletion of Microglia Leads to a Dose-Dependent Reduction in Inflammation and Senescence in the Aged Murine Brain. *Neuroscience* **2022**, *488*, 1–9. [CrossRef]
37. Roda, E.; De Luca, F.; Ratto, D.; Priori, E.C.; Savino, E.; Bottone, M.G.; Rossi, P. Cognitive Healthy Aging in Mice: Boosting Memory by an Ergothioneine-Rich Hericium erinaceus Primordium Extract. *Biology* **2023**, *12*, 196. [CrossRef]

Disclaimer/Publisher's Note: The statements, opinions and data contained in all publications are solely those of the individual author(s) and contributor(s) and not of MDPI and/or the editor(s). MDPI and/or the editor(s) disclaim responsibility for any injury to people or property resulting from any ideas, methods, instructions or products referred to in the content.

4.2. Objetivo 2: Estudiar la respuesta inmunológica celular en sangre periférica en pacientes con EM estratificados por los niveles de sNfL y sGFAP, y compararlos con individuos sanos.

Artículo: Rodero-Romero A, Fernández-Velasco JI, Monreal E, Sainz-Amo R, Álvarez-Lafuente R, Comabella M, Ramió-Torrentà L, García-Domínguez JM, Villarrubia N, Sainz de la Maza S, Domínguez-Mozo M, Quiroga-Varela A, Chico-García JL, Rodriguez-Jorge F, Veiga-Gonzalez JL, Roldán-Santiago E, Espiño M, Rodríguez-Martín E, Álvarez G, Masjuan J, Montalban X, Costa-Frossard L, Villar LM. Identification of cellular factors associated with inflammation and neurodegeneration in multiple sclerosis. Front Immunol. 2025 Aug 7;16:1648725. doi: 10.3389/fimmu.2025.1648725.

Resumen

Antecedentes: La EM es una enfermedad autoinmune del SNC que causa inflamación y daño axonal, con una evolución clínica muy variable entre pacientes. Los biomarcadores séricos sNfL y sGFAP permiten identificar el riesgo de empeoramiento temprano, ya sea por RAW o por PIRA. Sin embargo, aún se desconocen los mecanismos inmunológicos que sustentan estos distintos perfiles clínicos. Este estudio busca caracterizar las alteraciones celulares e inmunológicas asociadas a esos fenotipos, según los niveles de sNfL y sGFAP, en pacientes con EM de reciente diagnóstico.

Diseño del estudio: Estudio multicéntrico, transversal que analiza perfiles celulares e inmunológicos en sangre y LCR de pacientes con EM, estratificados según niveles séricos de sNfL y sGFAP, y CS.

Participantes: Se incluyeron 84 CS y 117 pacientes con EMRR de diagnóstico reciente y sin haber recibido TME previamente. Los pacientes fueron divididos en tres grupos según sus niveles de sNfL y sGFAP en: NLGL (sNfL y sGFAP bajos), NH (sNfL alto), NLGH (sNfL bajo y sGFAP alto).

Métodos: Se obtuvieron muestras de suero y células de los CS y de los pacientes con EM para cuantificar los niveles de sNfL (posteriormente ajustados por edad e IMC mediante el *Z-score*) y sGFAP mediante inmunoensayo (SIMOA). Se analizaron distintas subpoblaciones leucocitarias de cada uno de

las cohortes mediante citometría de flujo, tanto en sangre periférica como en LCR. Se realizó un análisis estadístico con pruebas no paramétricas y corrección por comparaciones múltiples.

Resultados: Todos los grupos de pacientes con EM presentaron un perfil inflamatorio común en sangre periférica caracterizado por un aumento de células T y B efectoras y de memoria, así como un mayor porcentaje de células productoras de citoquinas pro-inflamatorias como TNF-α, IL-17 e IFN-γ. El grupo NH mostró un perfil altamente inflamatorio, con una reducción significativa de tres subpoblaciones de células reguladoras, incluyendo linfocitos Treg, células B transicionales y monocitos que expresan el ligando 1 de muerte programada (PD-L1 por sus siglas en inglés de *Programmed Death-Ligand 1*), además de un incremento en células citotóxicas NK $CD56^{dim}$ y linfocitos T $CD4^{+}$ y $CD8^{+}$ productores de GM-CSF. En contraste, el grupo NLGL presentó unos valores similares de Treg que los CS, así como una mayor proporción de células NK $CD56^{dim}$ $NKG2A^{+}$, asociadas con funciones inmunorreguladoras. Por su parte, el grupo NLGH no mostró alteraciones destacadas en el perfil inmunológico en sangre periférica lo que sugiere una inflamación compartimentalizada restringida al SNC, relacionado con sus niveles elevados de sGFAP. En el LCR, el grupo NH mostró una menor proporción de Treg en comparación con el grupo NLGL, reforzando la idea de una pérdida del control inmunológico en los pacientes con fenotipo más inflamatorio.

Conclusiones: Todos los pacientes con EM comparten un perfil inflamatorio común. Sin embargo, las diferencias observadas en las poblaciones de células reguladoras y células NK permiten distinguir entre formas clínicas de la enfermedad más benignas y aquellas con un curso altamente inflamatorio. Estos resultados muestran que la estratificación de los pacientes según los niveles de sNfL y la sGFAP contribuyen a la caracterización inmunológica de los mecanismos que median la heterogeneidad de esta enfermedad.

frontiers | Frontiers in Immunology

TYPE Original Research
PUBLISHED 07 August 2025
DOI 10.3389/fimmu.2025.1648725

Check for updates

OPEN ACCESS

EDITED BY
Marija Mostarica-Stojkovic,
University of Belgrade, Serbia

REVIEWED BY
Marco Aurelio Tapia-Maltos,
Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán (INCMNSZ), Mexico
Aleksandra Pogoda-Wesołowska,
Military Institute of Medicine (Poland), Poland

*CORRESPONDENCE
Luisa María Villar
luisamaria.villar@salud.madrid.org

RECEIVED 17 June 2025
ACCEPTED 24 July 2025
PUBLISHED 07 August 2025

CITATION
Rodero-Romero A, Fernández-Velasco JI, Monreal E, Sainz-Amo R, Álvarez-Lafuente R, Comabella M, Ramió-Torrentà L, García-Domínguez JM, Villarrubia N, Sainz de la Maza S, Domínguez-Mozo M, Quiroga-Varela A, Chico-García JL, Rodriguez-Jorge F, Veiga-Gonzalez JL, Roldán-Santiago E, Espiño M, Rodríguez-Martín E, Álvarez G, Masjuan J, Montalban X, Costa-Frossard L and Villar LM (2025) Identification of cellular factors associated with inflammation and neurodegeneration in multiple sclerosis. *Front. Immunol.* 16:1648725. doi: 10.3389/fimmu.2025.1648725

COPYRIGHT
© 2025 Rodero-Romero, Fernández-Velasco, Monreal, Sainz-Amo, Álvarez-Lafuente, Comabella, Ramió-Torrentà, García-Domínguez, Villarrubia, Sainz de la Maza, Domínguez-Mozo, Quiroga-Varela, Chico-García, Rodriguez-Jorge, Veiga-Gonzalez, Roldán-Santiago, Espiño, Rodríguez-Martín, Álvarez, Masjuan, Montalban, Costa-Frossard and Villar. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (CC BY). The use, distribution or reproduction in other forums is permitted, provided the original author(s) and the copyright owner(s) are credited and that the original publication in this journal is cited, in accordance with accepted academic practice. No use, distribution or reproduction is permitted which does not comply with these terms.

Identification of cellular factors associated with inflammation and neurodegeneration in multiple sclerosis

Alexander Rodero-Romero[1], José Ignacio Fernández-Velasco[1], Enric Monreal[2], Raquel Sainz-Amo[2], Roberto Álvarez-Lafuente[3], Manuel Comabella[4,5], Lluís Ramió-Torrentà[6,7,8], José M. García-Domínguez[9], Noelia Villarrubia[1], Susana Sainz de la Maza[2], María Domínguez-Mozo[3], Ana Quiroga-Varela[6], Juan Luís Chico-García[2], Fernando Rodriguez-Jorge[2], José Luis Veiga-Gonzalez[1], Ernesto Roldán-Santiago[1], Mercedes Espiño[1], Eulalia Rodríguez-Martín[1], Gary Álvarez[6], Jaime Masjuan[2], Xavier Montalban[4,5], Lucienne Costa-Frossard[2] and Luisa María Villar[1]*

[1]Department of Immunology, Hospital Universitario Ramón y Cajal, Red Española de Esclerosis Múltiple (REEM), Red de Enfermedades Inflamatorias (REI), ISCIII, Instituto Ramón y Cajal de Investigación Sanitaria, Madrid, Spain, [2]Department of Neurology, Hospital Universitario Ramón y Cajal, Red Española de Esclerosis Múltiple (REEM), Red de Enfermedades Inflamatorias (REI), ISCIII, Instituto Ramón y Cajal de Investigación Sanitaria, Madrid, Spain, [3]Grupo Investigación de Factores Ambientales en Enfermedades Degenerativas, Instituto de Investigación Sanitaria del Hospital Clínico San Carlos, Madrid, Spain, [4]Servei de Neurologia, Centre d'Esclerosi Múltiple de Catalunya, Institut de Recerca Vall d'Hebron, Hospital Universitari Vall d'Hebron, Universitat Autònoma de Barcelona, Barcelona, Spain, [5]Center for Networked Biomedical Research on Neurodegenerative Diseases (CIBERNED) - ISCIII, Madrid, Spain, [6]Neurodegeneration and Neuroinflammation Research Group, Girona Biomedical Research Institute (IDIBGI-CERCA), Salt, Spain, [7]Red de Enfermedades inflamatorias (RD24/0007/0005), Instituto de Salud Carlos III, Madrid, Spain, [8]Medical Sciences Department, Faculty of Medicine, Universitat de Girona, Girona, Spain, [9]Department of Neurology, Hospital General Universitario Gregorio Marañón, Madrid, Spain

Background: Serum biomarkers as neurofilament light chain (sNfL) and glial fibrillary acidic protein (sGFAP) enabled early identification of multiple sclerosis (MS) patients at risk of relapse-associated worsening (RAW) or progression independent of relapses (PIRA). However, the immunological mechanisms underlying these clinical phenotypes remain unclear.

Methods: We conducted a cross-sectional study including 117 MS patients and 84 healthy controls (HC). Patients were stratified as NLGL (low sNfL and sGFAP), NH (high sNfL at different levels of sGFAP), and NLGH (low sNfL and high sGFAP). Percentages of blood and cerebrospinal fluid (CSF) mononuclear cells, and intracellular production of cytokines by T and B cells after "*in vitro*" stimulation were analyzed by flow cytometry.

Results: We identified a common inflammatory profile present in the blood of all MS groups comprising significant increases of effector $CD4^+$ and $CD8^+$ T cells, of memory and antigen-presenting B cells, of $CD4^+$ and $CD8^+$ T cells producing interferon-gamma, interleukin-17 and tumor necrosis factor-alpha (TNF-α) and of B cells producing TNF-α. Additionally, the highly inflammatory NH group

showed lower frequencies of different regulatory subsets (transitional B cells, PDL1$^+$ monocytes and Treg cells) compared to HC and increased percentages of CD4$^+$ and CD8$^+$ T cells producing granulocyte-macrophage colony-stimulating factor and of effector CD56^{dim} NK cells. They also showed lower percentages of Treg in blood and CSF compared to the low inflammatory NLGL group, which also displayed higher frequencies of regulatory CD56^{dim}, NKG2A$^+$ cells.
Conclusion: All MS patients share increased inflammatory B and T cells, but differ in regulatory or NK subsets, which identify highly inflammatory or benign disease courses.

KEYWORDS

multiple sclerosis, serum biomarkers, cellular phenotype and function, neurofilament light chain, glial fibrillary acidic protein, demyelinating disease of central nervous system

1 Introduction

MS is the most frequent demyelinating disease of the central nervous system (CNS). It causes inflammation and axonal damage, which are the main causes of disability in MS patients (1, 2).

It is an autoimmune disease caused by a combination of environmental and genetic factors. The immune mechanisms involved in MS have not yet been fully elucidated (1, 3, 4). Multiple studies showed that the disease initiates with peripheral lymphocytic activation in the absence of sufficient regulatory activity (5–7). Stimulated lymphocytes migrate to the CNS, where they are reactivated **by** microglia and resident macrophages. In turn, these lymphocytes further activate these innate immune cells and astrocytes (7–9). Innate and adaptive immune cells release cytokines, chemokines, and other inflammatory mediators, which promote the recruitment of additional immune cells into the CNS. This perpetuates the abnormal immune response that drives inflammation and tissue damage (8, 9).

The course of MS is heterogeneous, ranging from a relatively benign disease to a rapid disability worsening. Identifying patients at risk of having an aggressive disease course is crucial to establish an early-personalized treatment (10). Different immune cell mechanisms have been associated with disease severity. The accumulation of T- and B-cells in the meninges correlates with a worse disease course, indicating the association of intrathecal T- and B-cells with an active disease (11).

Biomarkers in both cerebrospinal fluid (CSF) and serum have been also associated with disease severity and prognosis in MS. These include markers of intrathecal inflammation such as IgM oligoclonal bands (12, 13), activation of the classical and alternative complement pathways (14, 15), chitinase 3-like 1 (CHI3L1), and chemokine ligand 13 (CXCL13) (16, 17), which have been primarily studied in the CSF but can also be detected in serum. Similarly, neurofilament light chains (NfL), components of the axonal cytoskeleton, and glial fibrillary acidic protein (GFAP), a marker of astrogliosis, are detectable in both CSF and serum. When measured in serum, sNfL and sGFAP, offer a less invasive and more accessible alternative to CSF analysis, contributing to identify patients at risk of relapse-associated worsening (RAW) and progression independent of relapse activity (PIRA), respectively (10, 17–24).

The combined assessment of these biomarkers helps to identify distinct disease phenotypes (10, 22, 23). Patients with low levels of both sNfL and sGFAP tend to have a relatively benign disease and respond well to low-, medium-, and high-efficacy treatments. In contrast, patients with elevated sNfL levels, regardless of their sGFAP values, have a worse prognosis, as elevated sNfL has been associated with both RAW, and inflammatory-mediated PIRA (24). These patients typically respond best to high-efficacy therapies, underscoring the importance of systematic monitoring. Finally, patients with low sNfL but high sGFAP levels are at significant risk for non-inflammatory PIRA, which is likely driven by astroglial mechanisms, and these patients tend to have poor responses to current therapies (20, 24).

Although these phenotypes have been well defined, the underlying immunological mechanisms necessary to understand the pathophysiology of the disease and achieve personalized treatments remain unknown. Our aim was to characterize these mechanisms by studying leukocyte subpopulations and cytokine profiles in different clinical groups.

2 Methods

2.1 Patients and controls

This was a multicenter cross-sectional study including 117 patients with relapsing remitting MS (RRMS) and 84 healthy controls (HC). The Ethics Committee of the Ramon y Cajal University Hospital approved it. Patients and HC were recruited

in four university hospitals and all of them provided written informed consent.

The inclusion criteria for MS patients were: to fulfill the 2017 McDonald diagnostic MS criteria (25); age between 18 and 55 years; not having any comorbidities; not being under treatment with any disease-modifying therapy (DMT); having a disease duration of less than a year; and not having received corticosteroids within two months prior to sample collection.

The inclusion criteria for HC were: age between 18 and 55 years; lack of evidence of any disease; absence of toxic habits (alcoholism or drug consumption); and not being under treatment with immunosuppressive drugs or chemotherapeutic agents.

A physician interviewed each candidate before entering in the HC group, although they did not conduct in-depth medical examinations. Participants in the HC group were chosen to be sex- and age-matched compared to MS patients.

We defined a relapse as the emergence of a new neurological symptom or the worsening of an existing symptom, persisting for at least 24 h, in the absence of infection or fever. MS patients were classified as in a relapse if the sample was obtained within 1 month of the attack. Samples collected between 1 and 2 months after a relapse were excluded only when studying differences between patients in a relapse or in remission. No samples were excluded in the remaining analyses performed in this study.

2.2 Samples

Sixteen milliliters of peripheral blood were collected from each study participant using two sodium heparin tubes (Sarstedt AG & Co., Nümbrecht, Germany) along with an additional 8 millilitres in a separate dry tube (Sarstedt). Peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) were isolated from the heparinised blood using Ficoll/Hypaque (Abbott Laboratories St. Louis, MO, United States) density gradient centrifugation and cryopreserved until analysis in fetal bovine serum (Sigma–Aldrich, Chicago, United States) supplemented with 20% dimethyl-sulfoxide (Sigma–Aldrich). Serum was aliquoted, and stored at −80°C until analysis. Moreover, a lumbar puncture was performed on 82 patients to collect CSF samples.

2.3 Monoclonal antibodies

The monoclonal antibodies used in the analysis of PBMCs in this study included CD4 FITC, CCR7 PE, CD3 PE-Cy5-5, CD45RO APC, CD8 APC-Cy7, PD1 BV421, CD45 V500, CD24 FITC, CD27 PE, CD38 PeCy5-5, CD19 PE-Cy7, IgM APC, CD86 APC-Cy7, CD80 Pacific Blue, CD14 FITC, CD25 PE, CD16 PeCy7, CD56 APC, CD127 Pacific Blue-A, CD57 PE, PD-L1 PE-Cy7, CD3 BV421, IFN-γ FITC, GM-CSF PE, TNF-α PerCP-Cy5.5, CD122 PE, NKG2D APC, NKG2C BV421, CD158a FITC, CD158b PE, CD158e APC, NKG2A BV421 (BD Biosciences, San Jose, CA, USA), CXCR5-PE-Cy7 (BioLegend, San Diego, CA, USA) and IL-17 APC (R&D Systems, Minneapolis, MN, USA).

The monoclonal antibodies used in the analysis of CSF cells included CD3-PerCP, CD8-APC-H7, CD27-FITC, CD19-PE-Cy7, CD25-PE, CD14-APC, CD45-V500 and CD127-BV421 (BD Biosciences).

2.4 Labelling of surface molecules

The cryopreserved PBMCs were thawed, and viability was evaluated in a Neubauer chamber by the Trypan blue dye exclusion test to assess cell viability (Merck, Darmstadt, Germany). A minimum of 2 x 10^5 viable cells per tube were labelled with adequate amounts of fluorescence-labelled monoclonal antibodies for 30 min at 4°C in the dark. The cells were washed twice with phosphate-buffered saline (PBS) and analyzed by flow cytometry as described below.

Fresh CSF samples were centrifuged at 500 × g for 10 min. Cellular pellets were resuspended in their residual volume (approximately 100 µl), stained with the appropriate amounts of monoclonal antibodies for 30 min at 4°C in the dark, washed twice with PBS and analyzed by flow cytometry as detailed below.

2.5 *In vitro* stimulation and intracellular cytokine staining of PBMCs

We studied the intracellular production of cytokines such as tumour necrosis factor-alpha (TNF-α), interleukin 17 (IL-17), interferon-gamma (IFN-γ) and granulocyte macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF).

Aliquots containing 5 x 10^6 PBMCs were suspended in 1 ml of complete medium (2 mM L-glutamine and 10% fetal bovine serum (Sigma–Aldrich)) supplemented with 50 ng/ml phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA) (Sigma–Aldrich) and 750 ng/ml ionomycin (Sigma–Aldrich). Additionally, 2 µg/ml brefeldin A (GolgiPlug, BD Biosciences) and 2.1 µM Monesin (GolgiStop, BD Biosciences) were added. The suspension was incubated in polypropylene tubes at 37°C in a 5% CO2 atmosphere for 4 h.

Following the incubation period, the PBMCs were washed with phosphate-buffered saline (PBS), resuspended and stained in the dark for 30 min at 4°C with appropriate amounts of monoclonal antibodies targeting surface antigens. The cells were subsequently washed with PBS, fixed, and permeabilized for 20 min at 4°C in the dark using a Cytofix/Cytoperm Kit (BD Biosciences). After two washes with Perm/Wash solution (BD Biosciences), the cells were stained intracellularly for 30 min at 4°C in the dark with monoclonal antibodies specific to the following cytokines: IFN-γ, GM-CSF, TNF-α, and IL-17. Two additional washes were subsequently performed, and the PBMCs were analyzed by flow cytometry. Nonstimulated PBMCs were used as controls for basal production.

2.6 Flow cytometry

A minimum of 1 x 10^5 events in PBMC and at least 10^2 events in CSF were analyzed within 1 h after antigen labeling using a

FACSCanto II. (BD, Bioscence). Isotype controls were used to set the mean autofluorescence values. The percentages of every subset of total mononuclear cells obtained were analyzed by the FACSDiva software V.8.0 (BD Biosciences, San Jose, CA, USA).

The gating strategies for the PBMC subsets are shown in Supplementary Figures S1, S2, and those for the CSF cell subsets are shown in Supplementary Figure S3.

2.7 sNfL and sGFAP quantification

sNfL and sGFAP levels were assessed by a Simoa NF-light™ Advantage Kit and a Simoa™ GFAP Discovery Kit, respectively (Quanterix, Billerica, MA, USA), on an SR-X instrument (Quanterix, Billerica, MA, USA) following the manufacturer's instructions.

sNfL values were expressed via the Z-score, which corrects raw values according to age and body mass index (26). Z-scores were calculated using the Serum Neurofilament Light Chain Reference App. Patients were classified according to Z-score and sGFAP levels into one of three groups: NLGL, NH, and NLGH. We established a Z-score < 1.5 for sNfL and 140 pg/ml for sGFAP following normal values established for HC as cut-off values (27).

2.8 Statistical analysis

Statistical analyses were performed via GraphPad Prism 9.0 (GraphPad Prism Inc., San Diego, CA, USA). All tests were two-tailed, and $p < 0.05$ was considered significant.

Categorical variables are expressed as numbers and percentages [n(%)] and differences between groups were analyzed using the chi-square test. Continuous variables were tested for normality using the Shapiro-Wilk test. As not all followed a normal distribution, they were presented as median (interquartile range). Group comparisons for continuous variables were performed using the Kruskal-Wallis test with Dunns *post-hoc* analysis to explore inter-group comparisons.

2.9 Data availability

Original data will be available to any researcher in the field for three years by request to the corresponding author.

3 Results

We classified the 117 MS patients into three groups on the basis of their sNfL and sGFAP levels, using the cut-off values previously established (27).The first group (n=45) included patients with low sNfL (Z score < 1.5) and low sGFAP (< 140 pg/ml) values (NLGL). The second group (n=53) included patients with high sNfL values (Z score ≥ 1.5, NH). The third one (n=19) included patients with low sNfL values (Z score < 1.5) and high sGFAP ones (≥ 140 pg/ml) (NLGH). The demographic and baseline clinical characteristics of the HC and MS patients are summarized in Table 1. No differences in sex or age were found. However, we detected differences in disease duration and gadolinium-enhancing lesions. Disease duration was slightly longer in the NLGH group than in the NH group (p=0.01) and there were more gadolinium-enhancing lesions in the NH group than in the NLGL group (p=0.0001).

3.1 Differences in peripheral blood immune cell subsets

We next explored the different immune cell subsets in the three patient groups and in HC. The results of immune cells subsets are shown in Table 2 and the results of the cytokine-producing blood immune cells in Supplementary Table S1.

All MS groups presented some common differences compared to HC. They showed an increase in the percentages of effector memory $CD4^+$ T-cells (the difference was most notable in the NH cohort), memory B-cells, and $CD86^+$ antigen-presenting B-cells. MS groups also presented increased percentages of effector $CD8^+$ T-cells. Differences were due to effector memory $CD8^+$ T-cells in the NH and NLGH groups (p=0.001 for both) and to terminally differentiated $CD8^+$ T-cells (p=0.0001) in the NLGL group.

Additionally, all groups presented increased percentages of $CD4^+$ and $CD8^+$ T-cells that produced TNF-α (Figures 1A, D), IL-17 (Figures 1B, E), and IFN-γ (Figures 1C, F) and increased percentages of $CD19^+$ B-cells that produced TNF-α (Figure 1G).

On the other hand, the NLGL and NH groups presented specific differences with HC, not observed for the NLGH group. They showed increased percentages of $CD80^+$ antigen-presenting B cells (p=0.01 for both groups) and a decrease in the proportion of naïve $CD8^+$ T-cells (p=0.001 for both groups).

We also identified unique characteristics for different MS groups. Thus, the NLGL group presented a marked increase in the percentages of regulatory $CD56^{dim}$ $NKG2A^+$ NK cells compared with the HC (p=0.0001) and the NH groups (p=0.0001) (Supplementary Table S2). By contrast, the NH group displayed notable reductions in the proportions of the following regulatory cells: transitional $CD19^+$ B-cells (p=0.002), programmed death-ligand 1^+ (PD-L1) monocytes (p=0.01), and regulatory $CD4^+$ T-cells (Treg) (p=0.0001, Figure 2A) compared with HC, being the differences in Treg also observed when compared NH with NLGL patients (p=0.017).

NH patients also presented increased percentages of $CD4^+$ (p=0.004, Figure 1H) and $CD8^+$ (p<0.0001, Figure 1I) T-cells that produce GM-CSF.

The most clear differences observed in NH group were the increase in the proportion of $CD56^{dim}$ NK cells compared to HC (p=0.002), NLGL (p=0.001) and NLGH (p=0.0002) groups (Figure 2B). This was mainly due to CD56 ^{dim} cells expressing $CD122^+$ (p=0.0004, compared to HC, p<0.0001 compared to NLGL and p=0.0001 compared to NLGH, Figure 2C).

We further explored if sGFAP could identify some differences in NH group and studied the differences in blood immune cell subsets in NH patients with low (NHGL, n=19) and high (NHGH, n=34)

TABLE 1 Demographic and clinical data of the cohorts included in the study.

Demographic and clinical data	HC (n=84)	NLGL (n=45)	NH (n=53)	NLGH (n=19)
Age (years)	34.5 [26-45]	40 [36-47]	42 [35.5-47]	38.5 [32-44]
Sex female	55, 65%	30, 67%	36, 68%	13, 68%
Disease duration (days)		54.1 [27.7-72.6]	27.6 [5.6-56.7]	**67.1 [12.3-123] #***
Patients with relapse		23, 51.1%	25, 47.2%	11, 57.9%
EDSS at baseline		1.5 [1-2]	1.5 [1.5-2]	1.5 [1.5-2]
Gd-enhancing lesions		0 [0-1]	**2 [0-5]¶******	0 [0-2]
IgG oligoclonal bands		41 (93)	48 (91)	17 (89)
sNfL levels (pg/ml)	6.2 [4.4-9.2]	6.6 [4.4-7.8]	**20.1[15-34.6] ץ******	7.3 [5.9-8.6]
Z-Score	-0.2 [-1.1-0.65]	-0.8 [-1.6-0.1]	**2.4 [2.0-3.0] ץ******	0.5 [-0.6-0.99]
sGFAP levels (pg/ml)	95 [74.6-116.2]	98.5 [81-114]	**158.3 [116.7-259.6] ¶****** **ł******	**194.4 [153.9-290.1] ¶****** **ł******
Topography of first relapse				
Optic nerve		15, (33.3)	8, (15)	3, (15.8)
Brainstem		9, (20)	14, (26.4)	5, (26.3)
Spinal cord		16, (35.7)	20, (37.8)	10, (52.6)
Multifocal		2, (4.4)	2, (3.8)	0, (0)
Others		3, (6.6)	9, (17)	1, (5.3)
T2 lesions at baseline				
0		1 (2.2)	1 (1.9)	0 (0)
1-3		8 (17.8)	4 (7.5)	0 (0)
4-9		16 (35.6)	9 (17)	5 (26)
10-50		19 (42.2)	31 (58.5)	12 (63)
<50		1 (2.2)	8 (15.1)	2 (11)

Continuous variables are expressed as medians and 25-75% interquartile ranges (25-75% IQRs). Differences between groups were examined via the Kruskal–Wallis multiple comparisons test, with Dunn's *post hoc* test. Continuous variables are presented as medians [25-75% IQR]. Significant comparisons are highlighted in bold. EDSS, Expanded Disability Status Scale; Gd, Gadolinium; HC, Healthy Controls; IQR, Interquartile Range; NH, Patients with high sNfL Z-scores; NLGH, Patients with low sNfL Z-scores and high GFAP levels; NLGL, Patients with low sNfL Z-scores and GFAP values. **ł**: significant difference with the HC group; ץ: significant difference compared with all three groups; **¶**: significant difference compared with the NLGL group; *: p<0.05, **: p<0.01, ***: p<0.001, and ****: p<0.0001 according to Dunn's test. In all cases, significant p values in Dunn's test implied p values < 0.05 in the associated Kruskal–Wallis test.

sGFAP values. We did not find any differences between them in any of the immune cells explored in this study (Supplementary Table S3).

3.2 Differences in the immune cell subsets present in CSF

We also performed CSF immune cell staining in 82 of our patients. Forty-four patients belonged to the NH group, 30 to the NLGL group and 8 to the NLGH group. A protocol was established for the analysis of $CD4^+$, $CD8^+$, $CD14^+$ and $CD19^+$ cell subsets. The results are shown in Supplementary Table S4.

The only difference observed between groups was a clear decrease in the percentage of Treg showed by NH patients compared with that in NLGL patients (p=0.0019, Figure 3), thus confirming the results obtained in the peripheral blood.

4 Discussion

The discovery of serum biomarkers has changed the prognosis and follow-up of MS patients. They helped identify, at disease onset, patients with a relatively benign course, those at risk for RAW and those prone to PIRA (19, 22, 24). However, much less is known about the biological processes underlying these different disease trajectories. Understanding the immunological basis behind MS phenotypes is of utmost clinical relevance, as it may facilitate more accurate treatment decisions and uncover novel therapeutic targets.

To explore this, we analyzed leukocyte subpopulations and cytokine profiles in recently diagnosed MS patients, stratified according to sNfL and sGFAP levels (24) and age- and sex-matched HC for comparison.

We found that all MS subgroups showed increased percentages of effector T cells, memory and antigen-presenting B cells, and $CD4^+$ and $CD8^+$ T cells producing TNF-α, IL-17, and IFN-γ, as well

10.3389/fimmu.2025.1648725

TABLE 2 Percentages of peripheral mononuclear blood cell subsets.

Cell population	HC (n=84)	NLGL (n=45)	NH (n=53)	NLGH (n=19)
Lymphocytes	85.9 [81.9-88.3]	86.9 [80.7-90.9]	84.6 [80.2-89]	86.9 [80-90.3]
$CD4^+$ T cells	35.7 [29.4-40.8]	35.2 [31.1-42.7]	36.3 [28.9-43.5]	35.6 [31.6-41.7]
Naïve	12.3 [10.3-16.2]	13.4 [8.4-15.3]	10.7 [5.2-15.9]	13.8 [8.9-18.7]
Central Memory	9.1 [6.4-11.8]	7.1 [5.0-12.4]	7.5 [4.3-12.8]	7.2 [3.7-12.7]
Terminally differentiated	5.1 [1.3-7.9]	3.9 [0.7-5.8]	2.8 [1.6-5.7]	4.8 [1.6-7.3]
Effector Memory	4.5 [2.5-9.5]	**8.4 [4.7-10.9] ǂ***	**12.0 [5.3-17] ǂ*****	**9.9 [6.7-14.5]ǂ***
Regulatory	1.1 [0.8-1.4]	**0.7 [0.5-1.4]#***	**0.6 [0.4-1.1]ǂ******	1.0 [0.8-1.6]
$CD8^+$ T cells	16.5 [14.7-19.7]	17.4 [14.6-23.3]	19.0 [15.4-25.2]	18.4 [15.7-21.2]
Naïve	8.0 [5.3-9.7]	**4.2 [2.6-7.8] ǂ****	**4.5 [2.8-7.6] ǂ*****	5.6 [4-8.3]
Central Memory	0.7 [0.5-1.1]	0.7 [0.4-1.2]	0.7 [0.5-1.3]	0.6 [0.4-1.2]
Terminally differentiated	3.6 [2.2-5.3]	**5.4 [4.4-8.9] ǂ*****	4.6 [2.6-8]	4.9 [3.1-8.3]
Effector Memory	4.1 [2.6-6.1]	5.2 [3.3-8.6]	**6.6 [4.1-9.2] ǂ******	**7.3 [3.9-10.3] ǂ***
$CD19^+$ cells	6.0 [4.9-8.5]	5.9 [4.6-8.2]	6.4 [4.5-9.2]	6.4 [5.5-8.4]
Naive	3.8 [2.9-5.6]	2.9 [2.5-5.1]	3.4 [2.2-5.2]	3.8 [2.6-5.6]
Memory	1.6 [1.3-2.5]	**2.3 [1.8-3.4] ǂ***	**2.4 [1.6-3.4] ǂ***	**3 [1.6-3.6] ǂ***
Plasmablasts	0.08 [0.05-0.14]	0.06 [0.03-0.1]	0.07 [0.04-0.11]	0.07 [0.04-0.12]
Transitional	0.3 [0.1-0.6]	0.2 [0.07-0.4]	**0.1 [0.06-0.3] ǂ****	0.2 [0.1-0.4]
$CD80^+$	0.8 [0.6-1.2]	**1.2 [0.7-1.7] ǂ***	**1.2 [0.9-1.7] ǂ*****	1.1 [0.8-1.3]
$CD86^+$	1.8 [1.4-2.7]	**2.9 [1.6-4.9] ǂ***	**3.5 [1.1-4.8] ǂ****	**3.5 [2.7-5.3] ǂ***
NK $CD56^{dim}$	11.2 [8.2-14.8]	**8.9 [6.6-12.8] #********	**14.8 [11.2-19.5] ǂ****	**9.1 [7.1-11.2] #*****
NK $CD56^{dim}$ $CD122^+$	9.7 [7.1-13]	**8.5 [6.9-11.7] #*****	**12.6 [9.9-18.4] ǂ***	**8.5 [5.8-11.5] #*****
NK $CD56^{bright}$	0.8 [0.4-1.1]	0.9 [0.7-1.6]	0.7 [0.4-1.1]	0.7 [0.5-1.2]
NKT	2.3 [1.2-3.6]	2.6 [1.5-3.8]	2.8 [1.9-4.4]	2.7 [1.3-8.5]
Monocytes	12.5 [10.2-16.3]	9.7 [6.7-16.0]	12.7 [6.3-18.5]	12.2 [7.2-17.1]
$PD\text{-}L1^+$	0.3 [0.1-1.2]	0.2 [0.1-0.5]	**0.2 [0.1-0.3] ǂ***	0.4 [0.1-0.9]

The percentage values are expressed as medians [25-75% IQR]. We calculated all percentages of $CD45^+$ cells. Significant comparisons are highlighted in bold. HC, healthy controls; IQR, interquartile range; NH, patients with high sNfL Z-scores; NKs, natural killer cells; NLGH, patients with low sNfL Z-scores and high GFAP levels; NLGL, patients with low sNfL Z-scores and GFAP values; PD-L1, programmed death-Ligand 1. **ǂ**: significant difference with the HC group; #: significant difference with the NH group; *p<0.05, ** p<0.01, *** p<0.001, and **** p<0.0001 by Dunn's test. In all cases, significant p values in Dunn's test implied p values < 0.05 in the associated Kruskal–Wallis test.

as $CD19^+$ B cells secreting TNF-α compared with HC. Previous studies described the expansion of effector and pro-inflammatory T cells in both blood and CNS tissue of MS patients (28–30). Additionally, MS patients showed increased memory B cells in the CSF, and higher percentages of antigen-presenting B cells in the peripheral blood (31, 32). However, little is known about the association of any of these T and B cell subsets with the different inflammatory or neurodegenerative profiles. Our work shows that the blood upregulation of these activated and memory T and B cell subsets is a common feature of the disease, and even patients with low risk of RAW and high probability of a smoldering disease (24) share this proinflammatory lymphocyte profile. This highly suggests that differences between the different clinical profiles may be associated to other immune cell subsets. In this line, we identified distinct immunological profiles between the MS subgroups. In particular, the NH group showed a clear reduction in the percentages of regulatory T cells (Treg) in peripheral blood compared to HC and in both blood and CSF compared to the NLGL group. Several studies suggested that changes in the number or function of Treg may play a role in MS pathology (33–37). However this data could not be reproduced in different works. Some studies reported no significant differences in Treg frequency in MS patients (33), or even reported that Treg may convert into activated, pro-inflammatory T cells in other neurological diseases (37). Others described functional deficit in the Treg subset (34–37), rather than a simple decrease in Treg numbers. These previous studies analyzed total MS patients. We observed that low Treg values clearly associate with a highly inflammatory disease, demonstrated by elevated sNfL values (NH group). This shows that low Treg numbers is not a common characteristic of all MS patients but of

10.3389/fimmu.2025.1648725

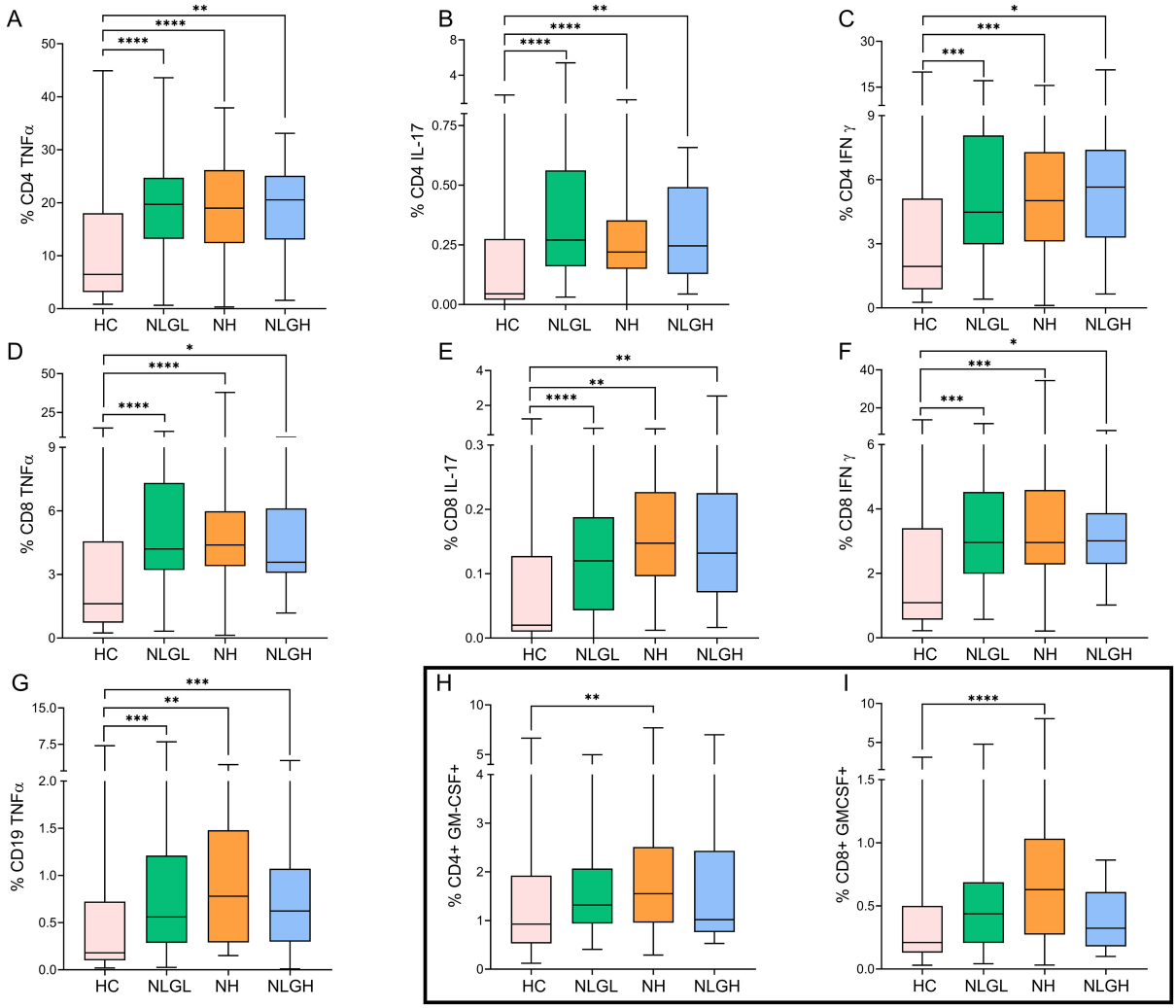


FIGURE 1
Blood percentages of intracellular cytokine-producing cells in the MS group and HC. Percentages of $CD4^+$ T cells producing TNFα **(A)**, IL-17 **(B)**, or IFN-γ **(C)**; $CD8^+$ T cells producing TNFα **(D)**, IL-17 **(E)**, or IFN-γ **(F)**; $CD19^+$ B cells producing TNFα **(G)**; and $CD4^+$ **(H)** and $CD8^+$ **(I)** T cells producing GM-CSF. The percentages of the subpopulations are shown on $CD45^+$ cells. HC, healthy controls; MS, multiple sclerosis; NH, patients with high sNfL Z-scores; NLGH, patients with low sNfL Z-scores and high GFAP levels; NLGL, patients with low sNfL Z-scores and GFAP values. *p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001, and ****p<0.0001 according to Dunn's multiple comparisons test.

highly inflammatory ones. This reduction was also found in the CSF, suggesting that the lack of Treg in the blood may also affect the immune environment within the CNS. This supports the idea that a decrease in regulatory T cells could lead to poor control of inflammation both in the periphery and in the CNS, contributing to the highly inflammatory profile shown by this group of patients (24).

NH patients also exhibited decreased counts of transitional B cells, known for their regulatory properties and potential to ameliorate MS severity (38), as well as reduced percentages of PD-L1$^+$ monocytes, which exert immunomodulatory effects through inhibition of T cell activity (39). The reduction of these additional regulatory subsets may contribute to poor regulation of the inflammatory response, contributing to the highly inflammatory course in the NH group. Supporting this, NH patients also displayed an increased frequency of GM-CSF–producing $CD4^+$ and $CD8^+$ T cells, which have been implicated in the activation of innate immune cells and correlate with MS disease activity, as high blood and CSF levels associate with worse outcomes (40, 41).

Finally, NH patients also exhibited a marked increase in the percentage of $CD56^{dim}$ NK cells. Although data on this NK cell subset in MS are limited, these cells have been shown to induce perivascular cortical demyelination, both in biopsies from MS patients and in an experimental model of the disease (42). In contrast, $CD56^{bright}$ NK cells are typically associated with regulatory functions, and their expansion has been observed in optimal responders to certain disease-modifying therapies (43). In our study, the majority of $CD56^{dim}$ NK cells expanded in NH patients expressed CD122, the intermediate-affinity IL-2 receptor (44). Given the pronounced reduction of Treg, which express high

10.3389/fimmu.2025.1648725

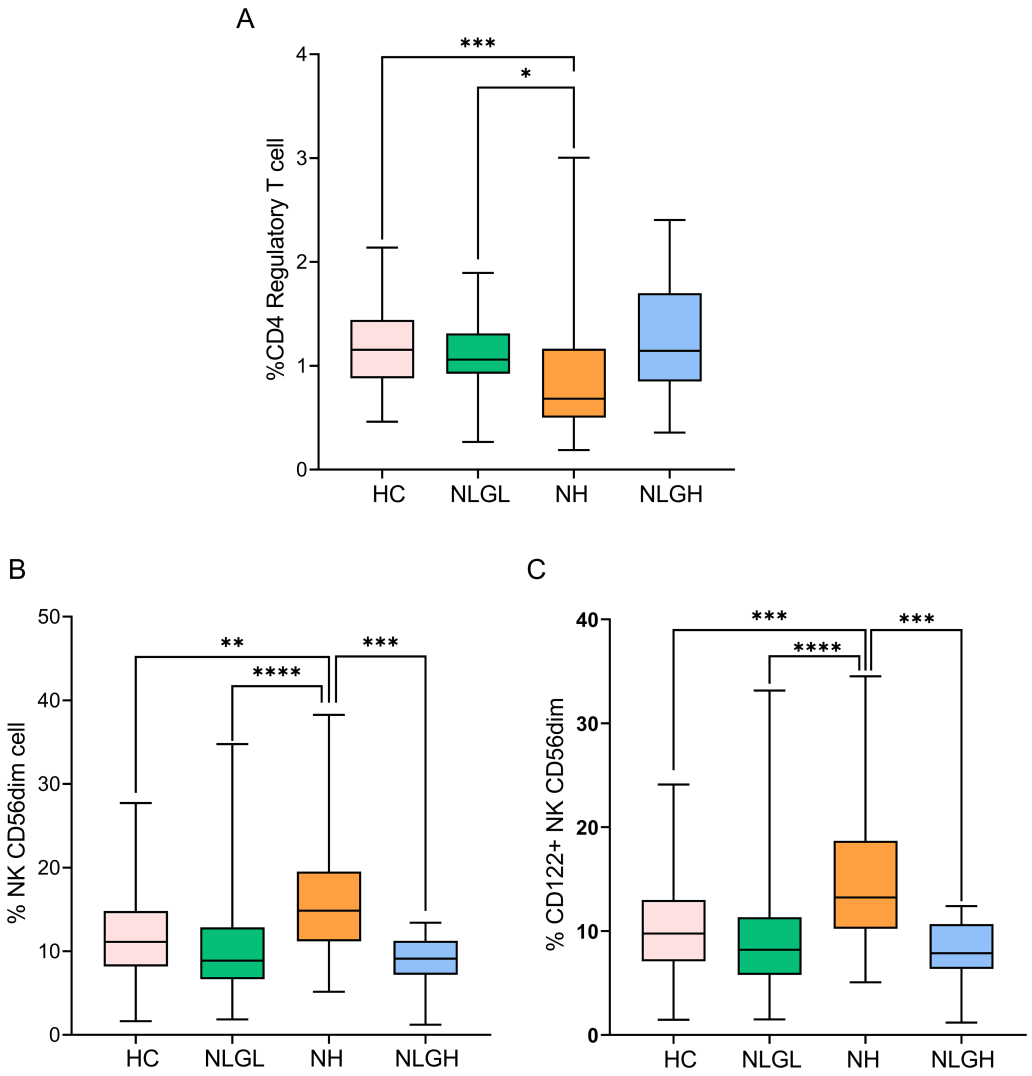


FIGURE 2
Blood percentages of CD4+ regulatory T-cells **(A)**, NK $CD56^{dim}$ cells **(B)**, and $CD122^{+}$ NK $CD56^{dim}$ cells **(C)**. The percentages of the subpopulations are shown on $CD45^{+}$ cells. HC, healthy controls; NH, patients with high sNfL Z-scores; NLGH, patients with low sNfL Z-scores and high GFAP levels; NLGL, patients with low sNfL Z-scores and GFAP values. *p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001, and ****p<0.0001 according to Dunn's multiple comparisons test.

levels of CD25, the high-affinity IL-2 receptor (33) in NH patients, it is plausible that $CD56^{dim}$ NK cells have increased access to IL-2 in this context, promoting their expansion and cytotoxic potential. These findings further support the notion of a dysregulated immune environment in NH patients, where a loss of regulatory control coincides with the expansion of potentially pathogenic subsets. In this inflammatory milieu, CD56dim NK cells may actively contribute to axonal damage.

To rule out if differences found in the NH group could be dynamic and secondary to the proximity to the relapse or an intrinsic characteristic of the patient's immune milieu in the long term we explored differences in time from a relapse in our three groups. No differences between NLGH and NH groups were found despite the different immune cell profiles found in these groups. We did not find differences in the proportion of patients being in a relapse in the three groups either. This strongly suggests that differences found in NH group associate with a higher inflammatory disease course independently of the presence of clinical relapses.

We also observed an interesting NK cell profile in the NLGL group. These patients presented increased percentages of $CD56^{dim}$ cells expressing NKG2A, compared to HC and to NH. NKG2A serves as a key inhibitory checkpoint that can limit NK cell–mediated cytotoxicity and proinflammatory responses, thus promoting immune tolerance (45). This may contribute to a better control of inflammatory activity in these patients, who show a relatively benign disease course.

Finally, we did not detect unique peripheral immune characteristics in the NLGH group, apart from the common inflammatory profile observed in all MS groups. The elevated sGFAP levels shown by these patients could indicate a CNS-restricted inflammatory process (46, 47). Indeed, they reflect

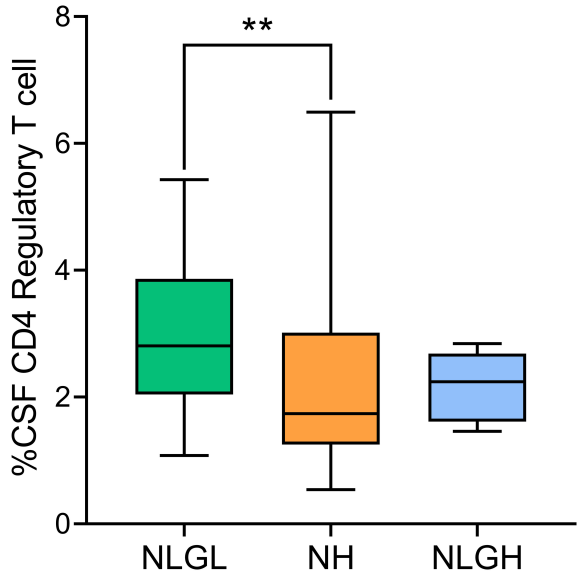


FIGURE 3
Percentages of regulatory T-cells in the cerebrospinal fluid (CSF) of MS patients. Regulatory T-cells were defined as $CD25^{high}$ $CD127^{-}$ cells. NH, high sNfL Z score group; NLGH, patients with low sNfL Z-scores and high GFAP levels; NLGL, patients with low sNfL Z-scores and low GFAP levels; **p<0.01 according to Dunn's multiple comparisons test.

astrocyte activation, which has been linked to disease progression and to chronic tissue injury, particularly in the setting of smoldering, compartmentalized inflammation within the CNS (22, 24, 44, 47). However, progression in these patients could also be mediated by a non-immune mediated process. Future studies in CSF with a wider panel of immune cell subsets analysed will further elucidate this.

This study has some limitations. The number of patients in the NLGH group was relatively small, especially for CSF analyses. This could prevent us from finding additional differences in this group of patients. In addition, a prospective follow-up was not made to explore the association of any of the cellular biomarkers described in this study with patient outcomes. Moreover, although we did not find differences in the proportion of patients in which samples were obtained during a relapse, the higher number of gadolinium-enhancing lesions in the NH group may indicate that findings observed in this group of patients could associate with increased disease activity at sampling. This could be a potential limitation of the study. Finally, our results were not validated in independent cohorts. Future research will address these issues to further demonstrate the association of the blood leukocyte subsets and patient outcomes.

In summary, our results show common immune mechanisms characteristic of all MS patients and particular subsets associated with highly inflammatory and benign disease courses. These findings demonstrate that stratification by sNfL and sGFAP levels is associated with distinct immunological mechanisms and support the utility of serum biomarkers not only for prognosis but also for biological characterization of MS phenotypes. Validation of these findings in independent multicenter cohorts is needed to further demonstrate their potential for guiding personalized treatment strategies.

Data availability statement

The raw data supporting the conclusions of this article will be made available by the authors, without undue reservation.

Ethics statement

The studies involving humans were approved by President: Sonsoles Sancho García, Radiation Oncology, Ramón y Cajal University Hospital. Vice President: M&z.ausco; Ángeles Gálvez, Clinical Pharmacology, Member of the Research Committee, Ramón y Cajal University Hospital. Technical Secretary: Itziar de Pablo López de Abechuco, Clinical Pharmacology, Ramón y Cajal University Hospital. Board Members: M&z.ausco; Jesús Blanchard Rodríguez, Hematology, Ramón y Cajal University Hospital; Irene Cabrera Troye, Law graduate, not professionally linked to the Hospital, Non-scientific member, representative of patient interests, expert in data protection regulations; Yolanda de Blas Fernández, Nurse, Emergency Department, Ramón y Cajal University Hospital; Victoria Gómez dos Santos, Urology, Ramón y Cajal University Hospital; Antonio Guerrero García, Gastroenterology, Ramón y Cajal University Hospital; Carmen Guillén Ponce, Medical Oncology, Ramón y Cajal University Hospital; María Muñoz García, Hospital Pharmacy, Ramón y Cajal University Hospital; Alfonso Muriel García, Clinical Biostatistics, Ramón y Cajal University Hospital; Cristina Pueyo López, Hospital Pharmacy and Master's in Bioethics, Member of the Healthcare Ethics Committee, Ramón y Cajal University Hospital; Carmen Ruiz Ballesteros, Law graduate, not professionally linked to the Hospital, Non-scientific member; José Luis San Millán López, Genetics Department, Ramón y Cajal University Hospital; Sonia Soto Díaz, Family and Community Medicine, Ramón y Cajal University Hospital; Carmen Herrero Domínguez-Berrueta, Primary Care Pharmacist, Northwest Healthcare Directorate; Ana Jiménez Gordo, Medical Oncology, Infanta Sofía University Hospital; Raúl Antonio Ruiz Ortega, Internal Medicine, Ramón y Cajal University Hospital; M&z.ausco; del Carmen Barriocanal Fernández, Tourism graduate, not professionally linked to the Hospital, Non-scientific member, representative of patient interests. The studies were conducted in accordance with the local legislation and institutional requirements. The participants provided their written informed consent to participate in this study.

Author contributions

AR: Methodology, Writing – original draft, Data curation, Conceptualization, Investigation, Resources, Writing – review &

editing, Formal Analysis. JF: Methodology, Writing – review & editing, Investigation. EM: Data curation, Conceptualization, Funding acquisition, Writing – review & editing, Formal Analysis. RS: Methodology, Writing – review & editing, Investigation, Data curation. RA: Data curation, Writing – review & editing, Resources. MC: Writing – review & editing, Resources, Data curation. LR: Resources, Data curation, Writing – review & editing. JG: Data curation, Writing – review & editing, Resources. NV: Formal Analysis, Project administration, Writing – review & editing. SD: Resources, Writing – review & editing, Data curation. MD: Resources, Writing – review & editing, Data curation. AQ: Data curation, Resources, Writing – review & editing. JC: Resources, Data curation, Writing – review & editing. FR: Writing – review & editing, Data curation, Resources. JV: Writing – review & editing, Investigation, Formal Analysis. ER-S: Writing – review & editing, Conceptualization, Investigation. ME: Writing – review & editing, Formal Analysis, Methodology, Investigation. ER-M: Writing – review & editing, Conceptualization, Investigation. GÁ: Data curation, Resources, Writing – review & editing. JM: Data curation, Writing – review & editing. XM: Data curation, Resources, Writing – review & editing. LC: Resources, Data curation, Writing – review & editing. LV: Supervision, Data curation, Formal Analysis, Investigation, Writing – review & editing, Funding acquisition, Conceptualization, Writing – original draft.

Funding

The authors declare financial support was received for the research, authorship, and/or publication of this article. This study has been funded by Instituto de Salud Carlos III (ISCIII) through the project "PI21/00828" and by grant RD21/0002/0053 from La Red Española de Enfermedades Inflamatorias and cofunded by the European Union.

Acknowledgments

The authors acknowledge the nurses Maria Angeles De Santos, Pilar de Nicolás Santos (Transplant Coordination, Ramón y Cajal University Hospital, Madrid, Spain), Silvia Morel, and Ana María Pérez Macias, (Neurology Department, Ramón y Cajal University Hospital, Madrid, Spain), for their help in obtaining the blood samples, as well as the technicians Paloma Nuera and Sonia Ortega (Inmunology Department, Ramón y Cajal University Hospital, Madrid, Spain) for their technical support.

Conflict of interest

The authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest. EM has received speaking honoraria and travel expenses for participation in scientific meetings and has served as a steering committee member or participated in advisory boards of clinical trials in the past 3 years with Biogen, Merck, Novartis, Roche, Almirall, Johnson & Johnson, Bristol-Myers Squibb, Sanofi, and Neuraxpharma. He has also acted as a scientific advisor for the CRO PSI. JIFV reported no competing interests. RAL has received support for attending meetings from Biogen, Merck, Novartis and Sanofi-Genzyme. MC reported no competing interests to declare that are relevant to the content of this article. RS reported receiving research travel support from Roche and Janssen outside the submitted work. LRT has received speaking or consulting honoraria, attended scientific activities organized by Merck, Biogen, Novartis, Sanofi, Roche, Bristol-Myers-Squibb, Sandoz, and Horizon and participated in advisory boards organized by Sanofi, Merck, Roche, Biogen, Novartis and Bristol-Myers-Squibb. JMGD reported no competing interests. NV reported no competing interests. SSM received research grants, travel support or honoraria for speaking engagements from Almirall, Biogen, Bristol Myers Squibb, Janssen, Merck, Neuraxpharm, Novartis, Roche and Sanofi-Genzyme. IDM has received travel support for attending conferences from Neuraxpharm. AQV is funded by a Fundación Francisco Soria y Melguizo grant and has received funding from Merck, Novartis, and Horizon Therapeutics to attend conferences. JLCG has received honorary for speaking engagements or consulting services from Biogen, Bayer, Bial, Bristol Myers Squibb, Johnson & Johnson, Roche, and Sanofi Genzyme. FRJ received research grants and travel support for speaking engagements from Janssen, Biogen, Novartis, Roche, Sanofi-Genzyme, Bristol-Myers-Squibb and Merck. JLVG reported no competing interests. ERS reported no competing interests. ME reported no competing interests. ERM reported no competing interests. JM reported no competing interests. XM has received compensation for lecture honoraria and travel expenses, participation in scientific meetings, clinical trial steering committee membership, or clinical advisory board participation in recent years from Abbvie, Actelion, Alexion, Bial PD, Biogen, Bristol-Myers Squibb/Celgene, EMD Serono, Genzyme, Hoffmann-La Roche, Immunic Therapeutics, Janssen Pharmaceuticals, Medday, Medscape, Merck, Mylan, Nervgen, Neuraxpharm, Novartis, Peervoice, Samsung-Biosys, Sandoz, Sanofi-Genzyme, Teva Pharmaceutical, TG Therapeutics, Excemed, ECTRIMS, MSIF, and NMSS or any of their affiliates. LCF received speaker fees, travel support, and/or served on advisory boards by Biogen, Sanofi, Merck, Bayer, Novartis, Roche, Teva, Celgene, Ipsen, Biopas, Almirall. LV, reported receiving grants and personal fees from Merck, Roche, Sanofi Genzyme, Bristol Myers 257 Squibb, Celgene, Biogen, and Novartis outside the submitted work. The authors declared that they were an editorial board member of Frontiers, at the time of submission. This had no impact on the peer review process and the final decision.

Generative AI statement

The authors declare that no Generative AI was used in the creation of this manuscript.

Publisher's note

All claims expressed in this article are solely those of the authors and do not necessarily represent those of their affiliated organizations, or those of the publisher, the editors and the reviewers. Any product that may be evaluated in this article, or claim that may be made by its manufacturer, is not guaranteed or endorsed by the publisher.

Supplementary material

The Supplementary Material for this article can be found online at: https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fimmu.2025.1648725/full#supplementary-material

References

1. Young AL, Marinescu RV, Oxtoby NP, Bocchetta M, Yong K, Firth NC, et al. Uncovering the heterogeneity and temporal complexity of neurodegenerative diseases with Subtype and Stage Inference. *Nat Commun*. (2018) 9:4273. doi: 10.1038/s41467-018-05892-0

2. Goris A, Vandebergh M, McCauley JL, Saarela J, Cotsapas C. Genetics of multiple sclerosis: lessons from polygenicity. *Lancet Neurol*. (2022) 21:830–42. doi: 10.1016/S1474-4422(22)00255-1

3. Shams H, Shao X, Santaniello A, Kirkish G, Harroud A, Ma Q, et al. Polygenic risk score association with multiple sclerosis susceptibility and phenotype in Europeans. *Brain*. (2023) 146:645–56. doi: 10.1093/brain/awac092

4. Bar-Or A, Li R. Cellular immunology of relapsing multiple sclerosis: interactions, checks, and balances. *Lancet Neurol*. (2021) 20:470–83. doi: 10.1016/S1474-4422(21)00063-6

5. Hemmer B, Kerschensteiner M, Korn T. Role of the innate and adaptive immune responses in the course of multiple sclerosis. *Lancet Neurol*. (2015) 14:406–19. doi: 10.1016/S1474-4422(14)70305-9

6. Rodríguez Murúa S, Farez MF, Quintana FJ. The immune response in multiple sclerosis. *Annu Rev Pathol*. (2022) 17:121–39. doi: 10.1146/annurev-pathol-052920-040318

7. Absinta M, Maric D, Gharagozloo M, Garton T, Smith MD, Jin J, et al. A lymphocyte-microglia-astrocyte axis in chronic active multiple sclerosis. *Nature*. (2021) 597:709–14. doi: 10.1038/s41586-021-03892-7

8. Horng S, Therattil A, Moyon S, Gordon A, Kim K, Argaw AT, et al. Astrocytic tight junctions control inflammatory CNS lesion pathogenesis. *J Clin Invest*. (2017) 127:3136–51. doi: 10.1172/JCI91301

9. Rabin A, Bello E, Kumar S, Zeki DA, Afshari K, Deshpande M, et al. Targeted proteomics of cerebrospinal fluid in treatment naïve multiple sclerosis patients identifies immune biomarkers of clinical phenotypes. *Sci Rep*. (2024) 14:21793. doi: 10.1038/s41598-024-67769-1

10. Monreal E, Fernández-Velasco JI, García-Sánchez MI, Sainz de la Maza S, Llufriu S, Álvarez-Lafuente R, et al. Association of serum neurofilament light chain levels at disease onset with disability worsening in patients with a first demyelinating multiple sclerosis event not treated with high-efficacy drugs. *JAMA Neurol*. (2023) 80:397–403. doi: 10.1001/jamaneurol.2023.0010

11. Ahmed SM, Fransen NL, Touil H, Michailidou I, Huitinga I, Gommerman JL, et al. Accumulation of meningeal lymphocytes correlates with white matter lesion activity in progressive multiple sclerosis. *JCI Insight*. (2022) 7:e151683. doi: 10.1172/jci.insight.151683

12. Monreal E, Sainz de la Maza S, Costa-Frossard L, Walo-Delgado P, Zamora J, Fernández-Velasco JI, et al. Predicting aggressive multiple sclerosis with intrathecal IgM synthesis among patients with a clinically isolated syndrome. *Neurol Neuroimmunol Neuroinflamm*. (2021) 8:e1047. doi: 10.1212/NXI.0000000000001047

13. Picón C, Tejeda-Velarde A, Fernández-Velasco JI, Comabella M, Álvarez-Lafuente R, Quintana E, et al. Identification of the immunological changes appearing in the CSF during the early immunosenescence process occurring in multiple sclerosis. *Front Immunol*. (2021) 12:685139. doi: 10.3389/fimmu.2021.685139

14. Oechtering J, Stein K, Schaedelin SA, Maceski AM, Orleth A, Meier S, et al. Complement activation is associated with disease severity in multiple sclerosis. *Neurol Neuroimmunol Neuroinflamm*. (2024) 11:e200212. doi: 10.1212/NXI.0000000000200212

15. Lunemann JD, Hegen H, Villar LM, Rejdak K, Sao-Aviles A, Carbonell-Mirabent P, et al. Association of complement factors with disability progression in primary progressive multiple sclerosis. *Neurol Neuroimmunol Neuroinflamm*. (2024) 11:e200270. doi: 10.1212/NXI.0000000000200270

16. Cantó E, Tintoré M, Villar LM, Costa C, Nurtdinov R, Álvarez-Cermeño JC, et al. Chitinase 3-like 1: prognostic biomarker in clinically isolated syndromes. *Brain*. (2015) 138:918–31. doi: 10.1093/brain/awv017

17. Lublin FD, Häring DA, Ganjgahi H, Ocampo A, Hatami F, Čuklina J, et al. How patients with multiple sclerosis acquire disability. *Brain*. (2022) 145:3147–61. doi: 10.1093/brain/awac016

18. Abdelhak A, Benkert P, Schaedelin S, Boscardin WJ, Cordano C, Oechtering J, et al. Neurofilament light chain elevation and disability progression in multiple sclerosis. *JAMA Neurol*. (2023) 80:1317–25. doi: 10.1001/jamaneurol.2023.3997

19. Meier S, Willemse EAJ, Schaedelin S, Oechtering J, Lorscheider J, Melie-Garcia L, et al. Serum glial fibrillary acidic protein compared with neurofilament light chain as a biomarker for disease progression in multiple sclerosis. *JAMA Neurol*. (2023) 80:287–97. doi: 10.1001/jamaneurol.2022.5250

20. Barro C, Healy BC, Liu Y, Saxena S, Paul A, Polgar-Turcsanyi M, et al. Serum GFAP and nfL levels differentiate subsequent progression and disease activity in patients with progressive multiple sclerosis. *Neurol(R) Neuroimmunol Neuroinflamm*. (2022) 10:e200052. doi: 10.1212/NXI.0000000000200052

21. Tur C, Carbonell-Mirabent P, Cobo-Calvo Á, Otero-Romero S, Arrambide G, Midaglia L, et al. Association of early progression independent of relapse activity with long-term disability after a first demyelinating event in multiple sclerosis. *JAMA Neurol*. (2023) 80:151–60. doi: 10.1001/jamaneurol.2022.4655

22. Loonstra FC, de Ruiter LRJ, Koel-Simmelink MJA, Schoonheim MM, Strijbis EMM, Moraal B, et al. Neuroaxonal and glial markers in patients of the same age with multiple sclerosis. *Neurol Neuroimmunol Neuroinflamm*. (2022) 10:e200078. doi: 10.1212/NXI.0000000000200078

23. Bose G, Healy BC, Saxena S, Saleh F, Glanz BI, Bakshi R, et al. Increasing neurofilament and glial fibrillary acidic protein after treatment discontinuation predicts multiple sclerosis disease activity. *Neurol Neuroimmunol Neuroinflamm*. (2023) 10:e200167. doi: 10.1212/NXI.0000000000200167

24. Monreal E, Fernández-Velasco JI, Álvarez-Lafuente R, Sainz de la Maza S, García-Sánchez MI, Llufriu S, et al. Serum biomarkers at disease onset for personalized therapy in multiple sclerosis. *Brain*. (2024) 147:4084–93. doi: 10.1093/brain/awae260

25. Thompson AJ, Banwell BL, Barkhof F, Carroll WM, Coetzee T, Comi G, et al. Diagnosis of multiple sclerosis: 2017 revisions of the McDonald criteria. *Lancet Neurol*. (2018) 17:162–73. doi: 10.1016/S1474-4422(17)30470-2

26. Benkert P, Meier S, Schaedelin S, Manouchehrinia A, Yaldizli Ö, Maceski A, et al. Serum neurofilament light chain for individual prognostication of disease activity in people with multiple sclerosis: a retrospective modelling and validation study. *Lancet Neurol*. (2022) 21:246–257. 34. doi: 10.1016/S1474-4422(22)00009-6

27. Rodero-Romero A, Monreal E, Sainz-Amo R, García Domínguez JM, Villarrubia N, Veiga-González JL, et al. Establishing normal serum values of neurofilament light chains and glial fibrillary acidic protein considering the effects of age and other demographic factors in healthy adults. *Int J Mol Sci*. (2024) 25:7808. doi: 10.3390/ijms25147808

28. Kaskow BJ, Baecher-Allan C. Effector T cells in multiple sclerosis. *Cold Spring Harb Perspect Med*. (2018) 8:a 029025. doi: 10.1101/cshperspect.a029025

29. Hrastelj J, Andrews R, Loveless S, Morgan J, Bishop SM, Bray NJ, et al. CSF-resident CD4+ T-cells display a distinct gene expression profile with relevance to immune surveillance and multiple sclerosis. *Brain Commun*. (2021) 3:fcab155. doi: 10.1093/braincomms/fcab155

30. Morille J, Mandon M, Rodriguez S, Roulois D, Leonard S, Garcia A, et al. Multiple sclerosis CSF is enriched with follicular T cells displaying a Th1/eomes signature. *Neurol Neuroimmunol Neuroinflamm*. (2022) 9:e200033. doi: 10.1212/NXI.0000000000200033

31. Straeten F, Zhu J, Börsch AL, Zhang B, Li K, Lu IN, et al. Integrated single-cell transcriptomics of cerebrospinal fluid cells in treatment-naïve multiple sclerosis. *J Neuroinflamm*. (2022) 19:306. doi: 10.1186/s12974-022-02667-9

32. Mathias A, Perriard G, Canales M, Soneson C, Delorenzi M, Schluep M, et al. Increased ex vivo antigen presentation profile of B cells in multiple sclerosis. *Mult Scler*. (2017) 23:802–9. doi: 10.1177/1352458516664210

33. Li YF, Zhang SX, Ma XW, Xue YL, Gao C, Li XY, et al. The proportion of peripheral regulatory T cells in patients with Multiple Sclerosis: A meta-analysis. *Mult Scler Relat Disord*. (2019) 28:75–80. doi: 10.1016/j.msard.2018.12.019

34. Liu Y, Carlsson R, Comabella M, Wang J, Kosicki M, Carrion B, et al. FoxA1 directs the lineage and immunosuppressive properties of a novel regulatory T cell population in EAE and MS. *Nat Med*. (2014) 20:272–82. doi: 10.1038/nm.3485

35. Tapia-Maltos MA, Treviño-Frenk I, García-González HB, Rosetti M, Barriga-Maldonado V, Morales-Ramírez F, et al. Identification of regulatory T cell molecules associated with severity of multiple sclerosis. *Mult Scler*. (2021) 27:1695–705. doi: 10.1177/1352458520977045

36. Mexhitaj I, Nyirenda MH, Li R, O'Mahony J, Rezk A, Rozenberg A, et al. Abnormal effector and regulatory T cell subsets in paediatric-onset multiple sclerosis. *Brain*. (2019) 142:617–32. doi: 10.1093/brain/awz017

37. Ciccocioppo F, Lanuti P, Pierdomenico L, Simeone P, Bologna G, Ercolino E, et al. The characterization of regulatory T-cell profiles in Alzheimer's disease and multiple sclerosis. *Sci Rep*. (2019) 9:8788. doi: 10.1038/s41598-019-45433-3

38. Correale J, Farez M, Razzitte G. Helminth infections associated with multiple sclerosis induce regulatory B cells. *Ann Neurol*. (2018) 64:187–99. doi: 10.1002/ana.21438

39. Medina S, Sainz de la Maza S, Villarrubia N, Álvarez-Lafuente R, Costa-Frossard L, Arroyo R, et al. Teriflunomide induces a tolerogenic bias in blood immune cells of MS patients. *Ann Clin Transl Neurol*. (2019) 6:355–63. doi: 10.1002/acn3.711

40. Rasouli J, Ciric B, Imitola J, Gonnella P, Hwang D, Mahajan K, et al. Expression of GM-CSF in T cells is increased in multiple sclerosis and suppressed by IFN-β Therapy. *J Immunol*. (2015) 194:5085–93. doi: 10.4049/jimmunol.1403243

41. Ghezzi L, Cantoni C, Cignarella F, Bollman B, Cross AH, Salter A, et al. T cells producing GM-CSF and IL-13 are enriched in the cerebrospinal fluid of relapsing MS patients. *Mult Scler*. (2020) 26:1172–86. doi: 10.1177/1352458519852092

42. Lagumersindez-Denis N, Wrzos C, Mack M, Winkler A, van der Meer F, Reinert MC, et al. Differential contribution of immune effector mechanisms to cortical demyelination in multiple sclerosis. *Acta Neuropathol*. (2017) 134:15–34. doi: 10.1007/s00401-017-1706-x

43. 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. *Mult Scler*. (2018) 24:1317–27. doi: 10.1177/1352458517717088

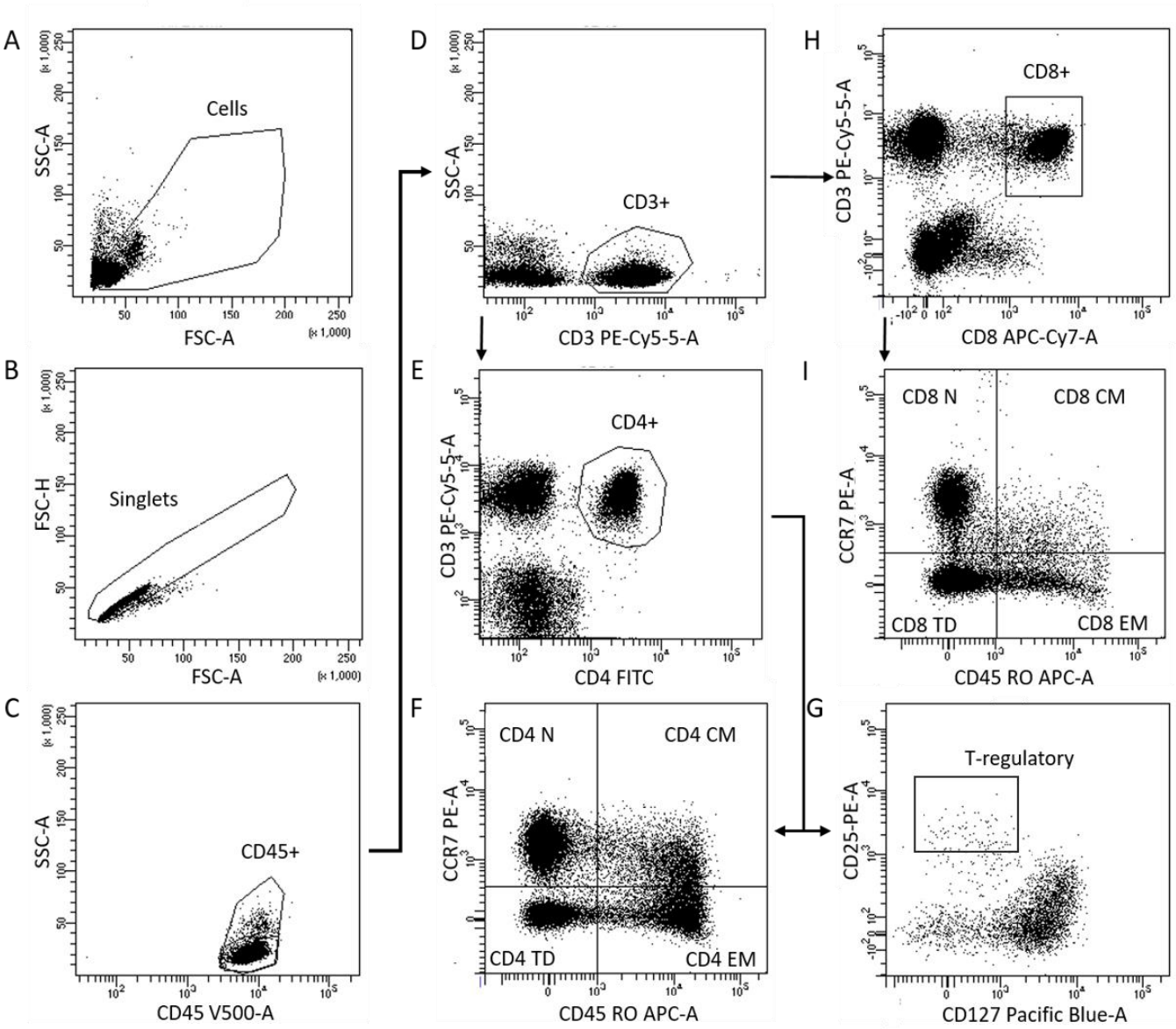
44. Kaur G, Trowsdale J, Fugger L. Natural killer cells and their receptors in multiple sclerosis. *Brain*. (2013) 136:2657–76. doi: 10.1093/brain/aws159

45. Kaulfuss M, Mietz J, Fabri A, Vom Berg J, Münz C, Chijioke O. The NK cell checkpoint NKG2A maintains expansion capacity of human NK cells. *Sci Rep*. (2023) 13:10555. doi: 10.1038/s41598-023-37779-6

46. Azzolini F, Gilio L, Pavone L, Iezzi E, Dolcetti E, Bruno A, et al. Neuroinflammation is associated with GFAP and sTREM2 levels in multiple sclerosis. *Biomolecules*. (2022) 12:222. doi: 10.3390/biom12020222

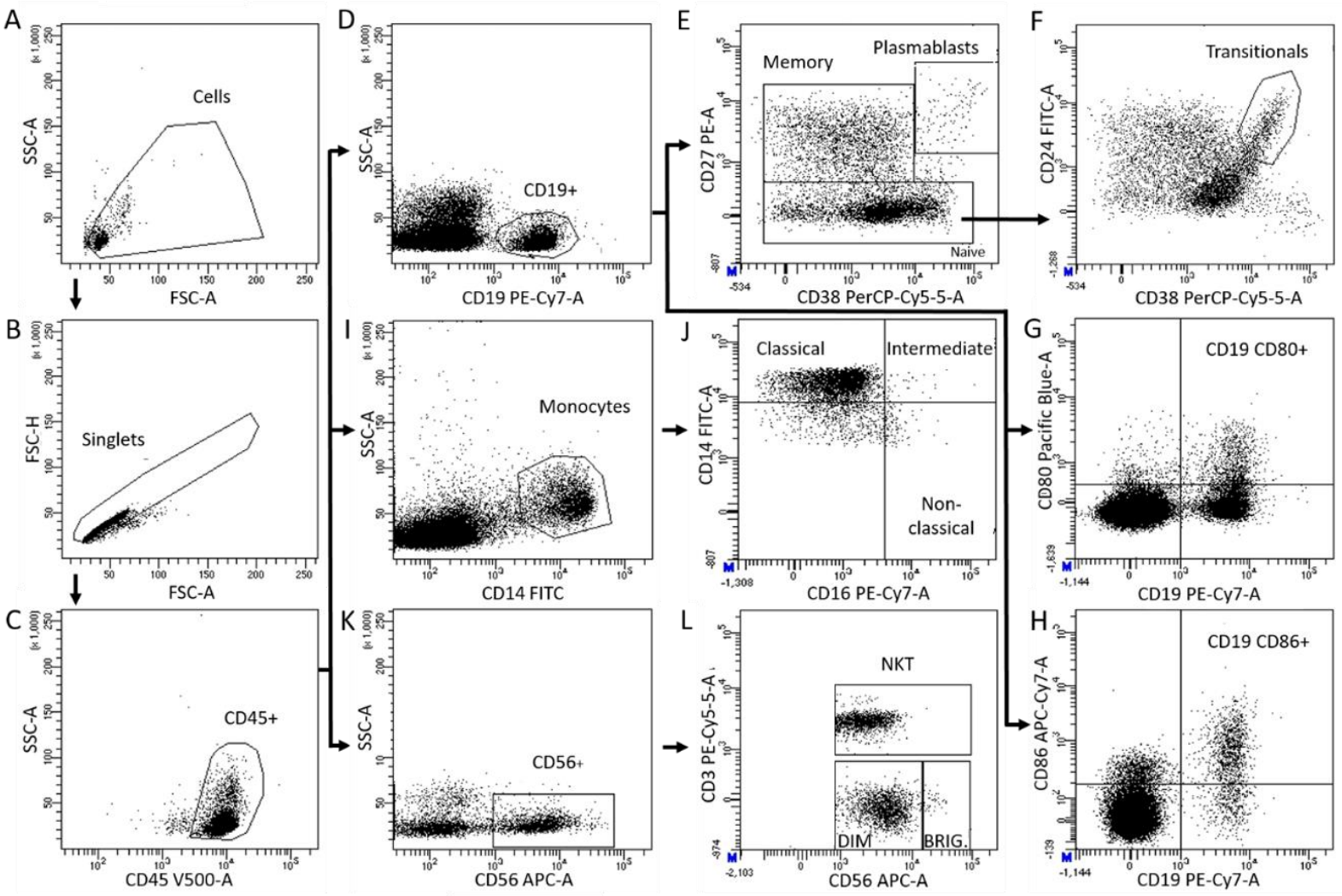
47. Abdelhak A, Antweiler K, Kowarik MC, Senel M, Havla J, Zettl UK, et al. Serum glial fibrillary acidic protein and disability progression in progressive multiple sclerosis. *Ann Clin Trans Neurol*. (2024) 11:477–85. doi: 10.1002/acn3.51969

Supplementary Material



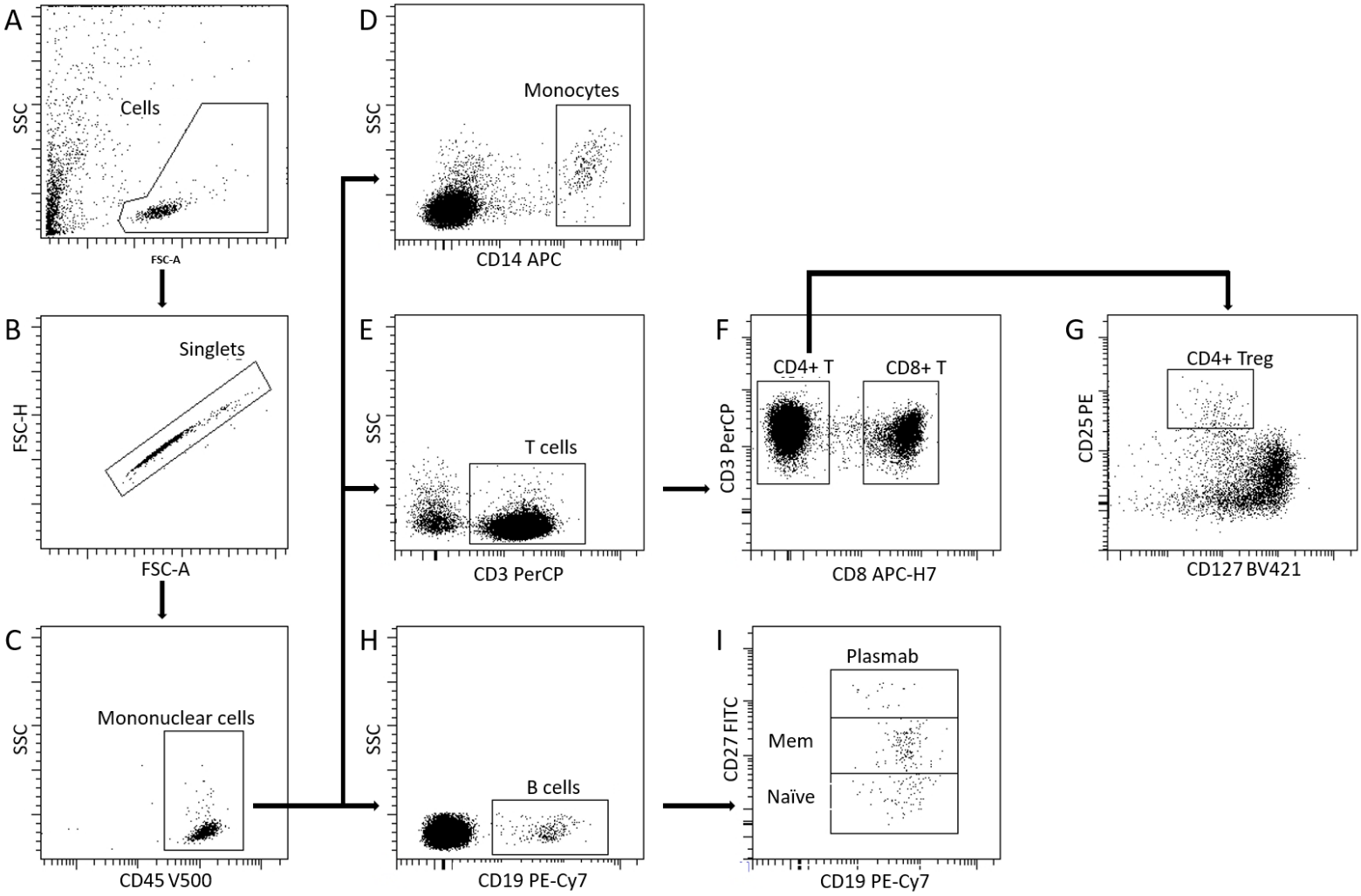
Supplementary Figure 1. Gating strategy for T-cells. Selection of viable cells based on forward scatter (FSC) and side scatter (SSC) characteristics (A). Doublets were excluded from the analysis (B). $CD45^+$ cells were gated (C). T-cells were identified as $CD45^+$ and $CD3^+$ cells (D). T helper cells were defined as $CD4^+$ cells (E), and their subpopulations were categorised as naïve (N; $CCR7^+$, $CD45RO^-$), central memory (CM; $CCR7^+$, $CD45RO^+$), effector memory (EM; $CCR7^-$, $CD45RO^+$), and terminally differentiated (TD; $CCR7^-$, $CD45RO^-$; F). Regulatory T-cells were defined as $CD3^+$,

$CD4^+$, $CD25^{high}$, $CD127^-$ cells (G). $CD8^+$ T-cells were gated within T-cells (H), and their subpopulations were categorised as naïve (N; $CCR7^+$,$CD45RO^-$), central memory (CM; $CCR7^+$,$CD45RO^+$), effector memory (EM; $CCR7^-$,$CD45RO^+$), and terminally differentiated (TD; $CCR7^-$,$CD45RO^-$; I).



Supplementary Figure 2. Gating strategy for the identification of monocytes, B-cells and $CD56^{+}$ cells. Total events were first gated to exclude apoptotic cells and debris (A) and then gated for doublet discrimination (B). The peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) were $CD45^{+}$ (C). B-cells were identified as $CD19^{+}$ (D). B-cells were divided into four subsets: naïve B-cells ($CD19^{+}$, $CD38^{-}$, and $CD27^{-}$), memory B-cells ($CD19^{+}$, $CD27^{dim}$, and $CD38^{dim}$), plasmablasts ($CD19^{+}$, $CD27^{high}$, and $CD38^{high}$; E), and transitional B-cells ($CD19^{+}$, $CD27^{-}$, and $CD24^{high}$, and $CD38^{high}$; F). Antigen-presenting B-cells were identified as $CD80^{+}$ (G) and $CD86^{+}$ (H) cells. Monocytes were defined as $CD14^{+}$ cells (I). Within the monocyte subset, the expression of CD14 and CD16 was used to gate classic ($CD14^{high}$, $CD16^{-/low}$), intermediate ($CD14^{high}$, $CD16^{high}$), and

nonclassic ($CD14^{+}$, $CD16^{high}$) populations (J). $CD56^{+}$ cells were gated (K), and according to the expression of CD3 and CD56, natural killer T-cells (NKTs; $CD56^{+}$ and $CD3^{+}$); NK CD56dim cells ($CD3^{-}$ and $CD56^{+/low}$); and NK $CD56^{bright}$ cells ($CD3^{-}$ and $CD56^{high}$) were identified (L).



Supplementary Figure 3. Gating strategy employed for the identification of CSF leukocyte subsets by flow cytometry. An initial region was set on the forward-area (FSC-A) vs. side-area (SSC) scatter dot plot to exclude debris or apoptotic cells (A), and then a second region was drawn on the FSC-A vs. FSC-height (FSC-H) scatter plot to exclude duplets (B). A third region was set around cells expressing intermediate-to-high CD45 with low-to-intermediate side scatter to select total mononuclear cells (C). Total monocytes were identified as cells expressing high levels of CD14 with intermediate SSC (D). T-cells (E) were selected on the basis of their CD3 expression and classified as $CD4^+$ T-cells ($CD3^+$ $CD8^-$) or $CD8^+$ T-cells ($CD3^+$ $CD8^+$, F). $CD4^+$ regulatory T-cells were gated as $CD25^{high}$ cells with $CD127^-$ expression (G). B

lymphocytes were identified as $CD19^+$ cells (H) and subdivided by their CD27 (I) expression into naïve B-cells ($CD27^-$), memory B-cells ($CD27^+$), and plasmablasts ($CD27^{++}$).

Supplementary table 1. Percentage of cytokine-producing blood immune cells.

Cell population	HC (n=84)	NLGL (n=45)	NH (n=53)	NLGH (n=19)
T $CD4^+$ TNF-α^+	6.6 [3.5-16.4]	**18.8 [13.2-24.8] ł******	**18.7 [12.4-26.3] ł******	**20.6 [14.6-25.9] ł****
T $CD4^+$ IL-17^+	0.04 [0.02-0.2]	**0.3 [0.2-0.5] ł******	**0.2 [0.1-0.4] ł*****	**0.2 [0.1-0.4] ł*****
T $CD4^+$ IFN-Υ^+	1.9 [1-4.9]	**4.2 [2.9-8] ł*****	**4.8 [2.9-7.3] ł*****	**5.4 [3.8-7.4] ł***
T $CD4^+$ GM-CSF^+	0.9 [0.5-1.9]	1.3 [0.9-2.1]	**1.5 [0.9-2.5] ł****	1 [0.8-2.4]
T $CD8^+$ TNF-α^+	1.7 [0.8-4.2]	**4.2 [3.2-7.4] ł******	**4.4 [3.5-5.9] ł******	**3.9 [3.2-6] ł***
T $CD8^+$ IL-17^+	0.02 [0.01-0.1]	**0.14 [0.1-0.2] ł****	**0.13 [0.05-0.2] ł******	**0.14 [0.08-0.23] ł****
T $CD8^+$ IFN-Υ^+	1.1 [0.6-3.3]	**2.8 [2.1-4.3] ł*****	**3.0 [2.3-4.6]ł*****	**3.1 [2.4-3.9] ł***
T $CD8^+$ GM-CSF^+	0.2 [0.1-0.5]	0.4 [0.2-0.7]	**0.6 [0.3-1.1] ł******	0.3 [0.2-0.6]
$CD19^+$ TNF-α^+	0.2 [0.1-0.5]	**0.8 [0.3-1.1] ł*****	**0.6 [0.3-1.2] ł*****	**0.9 [0.6-1.3] ł****

The values are shown as medians [25-75% IQR]. All cell percentages are shown relative to $CD45^+$ cells. Significant comparisons are highlighted in bold. Abbreviations: GM-CSF: granulocyte–macrophage colony–stimulating factor; HCs: healthy controls; IFN-γ: interferon gamma; IL-17: interleukin 17; IQR: interquartile range; NH: patients with high sNfL Z-scores; NLGH: patients with low sNfL Z-scores and high GFAP levels; NLGL: patients with low sNfL Z-scores and GFAP values; TNF-α: tumour necrosis factor alpha. ł: significant difference from the HC group *p<0.05, **p<0.01, *** p<0.001, and **** p<0.0001 according to Dunn's test. In all cases, significant p values in Dunn's test implied p values < 0.05 in the associated Kruskal–Wallis test.

Supplementary Table 2. Percentage of NK $CD56^{dim}$ receptors in MS patients and HC.

Cell population subsets	HC (n=84)	NLGL (n=45)	NH (n=53)	NLGH (n=19)
Activators				
$CD56^{dim}$ $NKG2D^{+}$	93.5 [91.7-94.7]	94.8 [94.0-95.0]	94.5 [92.8-94.9]	94.8 [93.8-94.9]
$CD56^{dim}$ $NKG2C^{+}$	15.2 [10.8-18.4]	12.5 [11.8-15.6]	15.5 [13.0-18.8]	13.9 [12.2-19.9]
Regulators				
$CD56^{dim}$ CD158a+	34.3 [29.2-39.8]	34.5 [28.8-39.2]	32.8 [30.7-36.3]	32.2 [29.4-36.7]
$CD56^{dim}$ $CD158b^{+}$	25.2 [23.8-26]	20.1 [17.4-27.1]	23.1 [18.8-30.7]	24.1 [19.1-31.8]
$CD56^{dim}$ $CD158e^{+}$	28.8 [26.7-31.3]	27.7 [23.5-31.6]	26.5 [23.6-31.6]	26.3 [23.3-32.7]
$CD56^{dim}$ $NKG2A^{+}$	12.4 [11.9-14.4]	**19.2 [14.4-26.8] ł** *** # ***	12.7 [5.9-21.3]	19.8 [10.8-30.6]

Values are expressed in median percentage [25%-75% IQR]. All percentages are represented on $CD56^{dim}$ Natural Killer cells. Significant comparisons are highlighted in bold. Abbreviations: HC: Healthy Controls; IQR: Interquartile Range; NH: Patients with high sNfL Z-score; NLGH Patients with normal sNfL Z-score values and high GFAP levels; NLGL: Patients with normal sNfL Z-score and GFAP values group. ł: significant comparison vs HC group; #: significant comparison with NH group; *p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001, and ****p<0.0001 Dunn's test. In all cases significant p values in Dunn's test implied p-values < 0.05 in the associated Kruskal-Wallis test.

Supplementary Table 3. Percentages of peripheral mononuclear blood cell subsets and intracellular cytokine production by T and B cells present in NH patients showing low (NHGL) and high (NHGH) sGFAP levels.

Cell population	NHGL (n=19)	NHGH (n=34)	p-value
Lymphocytes	84.5 [79.4-80.0]	85.0 [80-88.9]	0.95
$CD4^+$ T cells	36.2 [28.0-42.4]	35.4 [28.4-42.9]	0.86
Naïve	10.4 [4.9-15.0]	9.8 [4.9-15.7]	0.8
Central Memory	7.2 [2.7-12.8]	7.3 [3.6-11.9]	0.62
Terminally differentiated	2.4 [1.6-4.3]	2.9 [1.1-5.7]	0.90
Effector Memory	10.15 [5.1-20.9]	12.6 [5.8-16.0]	0.91
Regulatory	0.6 [0.5-1.3]	0.6 [0.4-0.9]	
$CD8^+$ T cells	20.3 [15.7-24.1]	19.07 [15.8-26.0]	0.82
Naïve	4.8 [2.2-8.1]	4.8 [3.1-7.5]	0.88
Central Memory	0.5 [0.4-1.3]	0.9 [0.6-1.4]	0.25
Terminally differentiated	4.0 [256-9.0]	4.6 [2.5-8.4]	0.82
Effector Memory	6.4 [4.2-9.1]	6.8 [5.2-12.1]	0.32
$CD19^+$ cells	6.0 [4.8-8.2]	6.7 [5.0-9.4]	0.31
Naive	3.3 [2.2-4.1]	3.6 [2.6-5.9]	0.25
Memory	2.3 [1.7-3.0]	2.4 [1.9-3.8]	0.47
Plasmablasts	0.07 [0.04-0.12]	0.06 [0.03-0.1]	0.61
Transitional	0.15 [0.08-0.3]	0.1 [0.05-0.3]	0.53
$CD80^+$	1.0 [0.8-1.7]	1.4 [0.9-1.9]	0.11
$CD86^+$	3.5 [1.7-5.0]	2.8 [1.4-4.5]	0.54
NK $CD56^{dim}$	14.8 [12.1-19.6]	14.6 [11.2-20.4]	0.68
NK $CD56^{dim}$ $CD122^+$	12.9 [9.0-18.9]	12.3 [9.9-18.4]	0.71
NK $CD56^{bright}$	0.7 [0.4-1.2]	0.6 [0.4-1.0]	0.3
NKT	3.5 [2.0-4.6]	2.8 [1.5-5.4]	0.99
Monocytes	10.7 [6.8-14.7]	13.8 [7.0-19.4]	0.11
PD-$L1^+$	0.15 [0.05-0.4]	0.2 [0.1-0.3]	0.49
T $CD4^+$ TNF-α^+	20.0 [8.4-28.3]	17.4 [13.1-21.8]	0.95
T $CD4^+$ IL-17^+	0.3 [0.2-0.4]	0.2 [0.1-0.3]	0.38

T $CD4^+$ IFN-Υ^+	4.9 [1.9-7.6]	4.5 [3.3-6.7]	0.90
T $CD4^+$ GM-CSF^+	1.6 [0.7-2.8]	1.4 [1.0-2.6]	0.81
T $CD8^+$ TNF-α^+	4.0 [2.8-5.3]	4.8 [3.7-5.9]	0.22
T $CD8^+$ IL-17^+	0.2 [0.1-0.3]	0.1 [0.06-0.18]	0.20
T $CD8^+$ IFN-Υ^+	2.9 [1.8-4.4]	2.9 [2.3-4.3]	0.89
T $CD8^+$ GM-CSF^+	0.7 [0.3-1.8]	0.6 [0.7-1.0]	0.20
$CD19^+$ TNF-α^+	0.5 [0.3-0.9]	0.6 [0.3-0.9]	0.58

The percentage values are expressed as medians [25–75% IQR]. All cell subset percentages were calculated within $CD45^+$ cells. Cytokine expression (GM-CSF, TNF-α, IFN-γ, and IL-17) was assessed in $CD4^+$, $CD8^+$ T cells, and B cells. Values represented the percentage of cytokine-producing cells within each subset. NHGH: patients with high sNfL Z-scores and high sGFAP levels; NHGL: patients with high sNfL Z-scores and low GFAP levels; NKs: natural killer cells; PD-L1: programmed death-ligand 1; GM-CSF: granulocyte-macrophage colony-stimulating factor; TNF-α: tumor necrosis factor alpha; IFN-γ: interferon gamma; IL-17: interleukin-17; IQR: interquartile range. Significant differences were calculated via Mann-Whitney test.

Supplementary Table 4. Percentages of cerebrospinal fluid cell subsets.

Cell population subsets	NLGL (n=30)	NH (n=44)	NLGH (n=8)
$CD4^+$ T cells	68.66 (62.78-73.58)	66.15 (60.19-71.10)	66.54 (60.32-72.04)
Regulatory T cells	2.81 (2.04-3.9)	**1.74 (1.2-3.0) ¶****	2.24 (1.61-2.68)
$CD8^+$ T cells	18.95 (16-21.86)	19.4 (16.05-24.11)	18.72 (15.75-21.42)
$CD19^+$ cells	2.81 (2.31-4.14)	2.61 (1.81-4.85)	2.42 (1.42-4.12)
Memory B cells	1.88 (1.38-2.82)	1.7 (1.2-2.79)	1.84 (1.25-2.71)
Monocytes	2.25 (1.37-3.84)	2.05 (0.99-3.99)	2.12 (1.07-3.78)

The values are shown as the median percentages [25-75% IQR]. All percentages are expressed as proportions of $CD45^+$ cells. Significant comparisons are highlighted in bold. Abbreviations: IQR: interquartile range; NH: patients with high sNfL Z-scores; NLGH: patients with low sNfL Z-scores and high GFAP levels; NLGL: patients with low sNfL Z-scores and GFAP values. ¶: significant difference compared with the NLGL group; **$p<0.01$ according to Dunn's test. A significant p value in Dunn's test implied a p-value < 0.05 in the associated Kruskal–Wallis test..

4.3. Objetivo 3: Estudiar factores solubles en suero que podrían estar relacionados con los mecanismos de inflamación, migración celular y reparación que caracterizan a los distintos subtipos de EM definidos por los niveles de sNfL y sGFAP, y compararlos con individuos sanos.

Artículo: Rodero-Romero Alexander , Domínguez-Mozo María , Monreal Enric , García-Domínguez José M. , Villarrubia Noelia , Fernández-Velasco José Ignacio , Comabella Manuel , de la Maza Susana Sainz , Goicochea Briceño Haydee , Chico-García Juan Luís , García-Martínez María Ángel , Rodriguez-Jorge Fernando , Veiga-Gonzalez José Luis , Sainz-Amo Raquel , Martínez Ginés María Luisa , Montalban Xavier , Masjuan Jaime , Costa-Frossard Lucienne , Álvarez-Lafuente Roberto , Villar Luisa María. New serum soluble factors predicting inflammatory and non-inflammatory disability worsening in multiple sclerosis. Front Immunol. 2025 Dec 16;1729500 doi: 10.3389/fimmu.2025.1729500

Resumen

Antecedentes: El análisis de factores inmunes solubles circulantes en la enfermedad sigue siendo un área poco explorada, pese a su potencial relevancia fisiopatológica. Paralelamente, los avances en biomarcadores séricos han mejorado la comprensión de la fisiopatología temprana de la EM. Los sNfL y la sGFAP permiten identificar procesos inflamatorios agudos y mecanismos crónicos asociados a la progresión. Por otra parte, las tecnologías proteómicas de alta sensibilidad ofrecen nuevas oportunidades para caracterizar los procesos moleculares implicados en la EM, en particular aquellos relacionados con la activación inmunitaria, la permeabilidad de la BHE y la reparación del daño tisular. En este contexto, la integración de los estudios de proteómica con la estratificación según sNfL y sGFAP permite estudiar los mecanismos moleculares relacionados con la heterogeneidad observada en la EM.

Diseño del estudio: Estudio transversal multicéntrico que analiza moléculas solubles en suero de pacientes con EM y CS.

Participantes: Se incluyeron 253 pacientes con EMRR de diagnóstico reciente y libre de tratamientos, así como 180 CS. Los pacientes se clasificaron según sus niveles en cuatro grupos: NLGL (sNfL y sGFAP normales), NHGL (sNfL alto/sGFAP normal), NHGH (sNfL y sGFAP altos) y NLGH (sNfL normal/sGFAP alto).

Métodos: Los niveles de sNfL y sGFAP se midieron mediante inmunoensayo, a través de la plataforma SIMOA. La proteómica sérica se midió utilizando el panel Olink™ 48 Cytokine. Los resultados se analizaron mediante pruebas de Kruskal-Wallis con análisis post hoc de Dunn y se corrigieron posteriormente mediante el análisis de la tasa de descubrimientos falsos (*False discovery rate*). Se consideraron significativos los valores Q inferiores a 0,05.

Resultados: En comparación con los CS, los pacientes con concentraciones bajas de sGFAP mostraron niveles reducidos de GM-CSF, una citoquina que induce la activación de granulocitos y macrófagos. Por el contrario, los pacientes con valores elevados de sGFAP mostraron una notable disminución del factor de crecimiento epidérmico (EGF por las siglas en inglés de E*pidermal growth factor*), una citoquina implicada en la remielinización y la reparación de los axones producida por la astroglía en reposo. Además, los pacientes con NLGH mostraron disminuciones pronunciadas en mediadores solubles esenciales para la activación inmunitaria adaptativa, incluidos TNFSF12 (por sus siglas en inglés de *Tumor necrosis factor ligand superfamily member 12*), FLT3LG (por sus siglas en inglés de *Fms-related tyrosine kinase 3 ligand)* y TNF-α, en comparación con los CS. También mostraron reducciones generalizadas en las quimiocinas implicadas en el reclutamiento de leucocitos, como la quimiocina de ligando (CCL)-3, CCL7 y CCL4. La disminución más importante se observó en CCL2, una quimiocina que atrae a los monocitos y a las células T de memoria al SNC. Los pacientes con NLGH mostraron valores más bajos que los CS y los pacientes NLGL, NHGL y NHGH. Estos hallazgos indicaron que los pacientes con NLGH experimentan una reducción de la respuesta inflamatoria en la sangre periférica y de la atracción de células inmunitarias hacia el SNC, combinada con una menor capacidad de reparación de los tejidos.

Conclusiones: La estratificación de los pacientes con EM según los niveles de sNfL y sGFAP revela distintos mecanismos inmunitarios y reparadores subyacentes a la heterogeneidad de la enfermedad e

identifica nuevos biomarcadores que podrían contribuir a mejorar la selección y el seguimiento del tratamiento de la EM.

frontiers | Frontiers in Immunology

TYPE Original Research
PUBLISHED 05 December 2025
DOI 10.3389/fimmu.2025.1729500

Check for updates

OPEN ACCESS

EDITED BY
Nuria Álvarez-Sánchez,
University of Toronto, Canada

REVIEWED BY
Sasidhar Manda,
Urvogelbio, India
Ana Londono,
Independent, Cocos Islands

*CORRESPONDENCE
Luisa María Villar
luisamaria.villar@salud.madrid.org

†PRESENT ADDRESS
Luisa M. Villar,
Immunology Department, Hospital Universitario Ramón y Cajal, Madrid, Spain; Red de Enfermedades Inflamatorias ISCIII (REI), Instituto Ramón y Cajal de Investigación Sanitaria (IRYCIS), Madrid, Spain

‡These authors have contributed equally to this work and share last authorship

RECEIVED 21 October 2025
REVISED 18 November 2025
ACCEPTED 20 November 2025
PUBLISHED 05 December 2025

CITATION
Rodero-Romero A, Domínguez-Mozo M, Monreal E, García-Domínguez JM, Villarrubia N, Fernández-Velasco JI, Comabella M, de la Maza SS, Goicochea Briceño H, Chico-García JL, García-Martínez MÁ, Rodriguez-Jorge F, Veiga-Gonzalez JL, Sainz-Amo R, Martínez Ginés ML, Montalban X, Masjuan J, Costa-Frossard L, Álvarez-Lafuente R and Villar LM (2025) New serum soluble factors predicting inflammatory and non-inflammatory disability worsening in multiple sclerosis. *Front. Immunol.* 16:1729500. doi: 10.3389/fimmu.2025.1729500

COPYRIGHT
© 2025 Rodero-Romero, Domínguez-Mozo, Monreal, García-Domínguez, Villarrubia, Fernández-Velasco, Comabella, de la Maza, Goicochea Briceño, Chico-García, García-Martínez, Rodriguez-Jorge, Veiga-Gonzalez, Sainz-Amo, Martínez Ginés, Montalban, Masjuan, Costa-Frossard, Álvarez-Lafuente and Villar. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (CC BY). The use, distribution or reproduction in other forums is permitted, provided the original author(s) and the copyright owner(s) are credited and that the original publication in this journal is cited, in accordance with accepted academic practice. No use, distribution or reproduction is permitted which does not comply with these terms.

New serum soluble factors predicting inflammatory and non-inflammatory disability worsening in multiple sclerosis

Alexander Rodero-Romero[1], María Domínguez-Mozo[2], Enric Monreal[3], José M. García-Domínguez[4], Noelia Villarrubia[1], José Ignacio Fernández-Velasco[1], Manuel Comabella[5,6], Susana Sainz de la Maza[3], Haydee Goicochea Briceño[4], Juan Luís Chico-García[3], María Ángel García-Martínez[2], Fernando Rodriguez-Jorge[3], José Luis Veiga-Gonzalez[1], Raquel Sainz-Amo[3], María Luisa Martínez Ginés[4], Xavier Montalban[5,6], Jaime Masjuan[3], Lucienne Costa-Frossard[3], Roberto Álvarez-Lafuente[2‡] and Luisa María Villar[1*†‡]

[1]Department of Immunology, Hospital Universitario Ramón y Cajal, Red Española de Esclerosis Múltiple (REEM), Red de Enfermedades Inflamatorias (REI), Instituto de Salud Carlos III (ISCIII), Instituto Ramón y Cajal de Investigación Sanitaria, Madrid, Spain, [2]Grupo Investigación de Factores Ambientales en Enfermedades Degenerativas, Instituto de Investigación Sanitaria del Hospital Clínico San Carlos, Madrid, Spain, [3]Department of Neurology, Hospital Universitario Ramón y Cajal, Red Española de Esclerosis Múltiple (REEM), Red de Enfermedades Inflamatorias (REI), Instituto de Salud Carlos III (ISCIII), Instituto Ramón y Cajal de Investigación Sanitaria, Madrid, Spain, [4]Department of Neurology, Hospital General Universitario Gregorio Marañón, Madrid, Spain, [5]Servei de Neurologia, Centre d'Esclerosi Múltiple de Catalunya, Institut de Recerca Vall d'Hebron, Hospital Universitari Vall d'Hebron, Universitat Autònoma de Barcelona, Barcelona, Spain, [6]Center for Networked Biomedical Research on Neurodegenerative Diseases (CIBERNED) - Instituto de Salud Carlos III (ISCIII), Madrid, Spain

Introduction: Serum neurofilament light chains (sNfL) and glial fibrillary acidic protein (sGFAP) associate respectively with acute inflammation and smoldering disease in relapsing-remitting multiple sclerosis (MS) patients. We explored the proteomic profile associated with the different combinations of low or high levels of sNfL and sGFAP to explore immune mechanisms involved in different MS outcomes.

Methods: Multicenter cross-sectional study including 253 treatment-naïve PwMS, and 180 healthy controls (HCs). sNfL and sGFAP levels were measured via SIMOA and patients were classified according to their levels into four groups: NLGL (normal sNfL and sGFAP), NHGL (high sNfL/normal sGFAP), NHGH (high sNfL and sGFAP), and NLGH (normal sNfL/high sGFAP). Serum proteomics were measured using the Olink™ 48 Cytokine panel. Results were analyzed by Kruskal-Wallis tests with Dunn's *post hoc* analysis and further corrected by the False Discovery Rate analysis. Q-values below 0.05 were considered as significant.

Results: Compared with HC, patients with low sGFAP concentrations exhibited decreased levels of granulocyte-macrophage colony stimulating factor (GM-CSF), a cytokine inducing innate cell activation q=0.009 for NLGL and q=0.002 for NHGL groups). Conversely, patients with high sGFAP values showed a remarkable decrease of epidermal growth factor (EGF), a cytokine involved in remyelination and axon repair produced by resting astroglia (q<0.0001 for NHGH and NLGH

respectively). Additionally, NLGH patients exhibited pronounced decreases in soluble mediators essential for adaptive immune activation, including FLT3LG, TNFSF12, and TNF-α, compared to HC. They also showed broad reductions in chemokines involved in leukocyte recruitment as CCL3, CCL7, and CCL4. The most important decrease was found in CCL2, a chemokine that attracts monocytes and memory T cells to the CNS. NLGH patients showed lower values than HC ($q<0.0001$), NLGL ($q=0.02$), NHGL ($q=0.02$), and NHGH ($q=0.03$). These findings indicated that NLGH patients experience a reduction of the inflammatory response in the peripheral blood and a decreased immune cell attraction to the central nervous system combined with a lower ability of tissue repair.

Discussion: We identified new molecules implied in the different pathological mechanisms occurring in patients with MS. These biomarkers could improve patient stratification, outcome prediction, and treatment optimization.

KEYWORDS

multiple sclerosis, serum biomarkers, serum proteomics, neuroimmunology, demyelinated diseases

1 Introduction

Recent advances in serum biomarkers in multiple sclerosis (MS) contribute to establishing patient prognosis and monitoring treatment response (1–6). High serum neurofilament light chain (sNfL) levels are linked to neuroinflammation and identify patients at risk of relapse-associated worsening (RAW) (2–7). sNfL reflects acute axonal injury driven by focal inflammatory activity. Their levels associate with active demyelinating lesions and acute inflammation (8). Additionally, elevated serum glial fibrillary acidic protein (sGFAP) levels reflect astrogliosis and have been associated with a higher risk of progression independent of relapse activity (PIRA) (5–7). It reflects chronic, compartmentalized CNS inflammation, mediated by astrocytes, which contribute to ongoing tissue damage (9) and suggests a disbalance in astrocyte pro-inflammatory (A1) and neuroprotective (A2) states (10, 11). sGFAP provides, in junction with sNfL insights into the different mechanisms contributing to MS pathology.

We used these biomarkers to further investigate soluble factors present in the serum of patients with relapsing–remitting MS (PwMS) classified according to their sNfL and sGFAP values. Doing so allowed us to better understand the pathological processes underlying patients at risk of inflammatory and non-inflammatory worsening. This approach is useful for identifying novel biomarkers that refine patient stratification and may ultimately guide more precise therapeutic strategies for MS.

Soluble immune-related factors contribute to key processes such as immune cell activation, blood–brain barrier permeability, tissue damage and repair (12–15). Immune-related factors in MS have been mainly studied in the cerebrospinal fluid (CSF), since the effector mechanisms in MS are mostly confined to the central nervous system (CNS) (16–19). However, because inflammation in MS is believed to originate outside the CNS (12, 13), exploring the contribution of circulating immune-related molecules becomes essential to improving our understanding of the diverse pathological mechanisms driving the disease. Although several serum molecules (19, 20) and cellular markers (21) have been associated with MS, the overall understanding remains incomplete.

Recent advances in high-sensitivity proteomic technologies are creating new opportunities to investigate the immune landscape in MS (22, 23). In this context, we aimed to explore differences in soluble biomarkers between healthy controls (HCs) and PwMS, applying this technology and stratifying patients according to their sNfL and sGFAP values.

2 Methods

2.1 Study design and participants

This multicenter, cross-sectional study included individuals with PwMS and HCs. We adhered to the STrengthening the Reporting of OBservational studies in Epidemiology (STROBE).

The inclusion criteria for PwMS were as follows: an MS diagnosis according to the 2017 McDonald criteria at sample extraction or during follow-up (24), a relapsing remitting MS form, an age between 18 and 65 years, an absence of other neurodegenerative or autoimmune diseases, a lack of treatment with any disease-modifying therapies (DMTs), a disease duration of less than 1 year, and a lack of corticosteroids treatment for at least 2 months prior to sample collection.

The inclusion criteria for HCs were as follows: an age between 18 and 65 years, no history or evidence of any neurodegenerative or autoimmune disease, no alcohol abuse or illicit drug use, and no

current treatment with any immunosuppressive or chemotherapeutic agents. HCs were hospital employees who volunteered to participate by providing blood samples. Each HC underwent an interview conducted by a neurologist and showed normal sNfL values; however, no physical examination was performed.

Patients and HCs were recruited between January 2022 and December 2024 at three university hospitals in Spain. We included 253 PwMS recruited consecutively and 180 HCs. No participants were excluded from the final analysis.

2.2 Samples

We collected serum samples by drawing 10 ml of blood into dry tubes. The blood was then centrifuged at 3000×g for 5 minutes. After centrifugation, the serum was divided into 250 µl aliquots and stored at −80 °C until analysis. All of the samples were processed using standardized protocols by trained personnel, which reduced measurement bias.

2.3 sNfL and sGFAP quantification

sNfL and sGFAP were measured by single molecule array technique (SIMOA) using the SIMOA NF-light™ Advantage Plus Kit and the SIMOA™ GFAP Advantage Plus Kit, respectively (Quanterix, Billerica, MA, USA), on an HD-X instrument (Quanterix), according to the manufacturer's instructions. sNfL concentrations were normalized using z-scores adjusted for age and body mass index (BMI), as previously described (4). PwMS were classified into NLGL (normal sNfL and sGFAP), NHGL (high sNfL/normal sGFAP), NHGH (high sNfL and sGFAP) and NLGH (normal sNfL/high sGFAP) according to recent literature (6, 7). Cut-off values were defined as previously reported (25). A z-score ≥1.5 was considered indicative of elevated sNfL levels. High sGFAP levels were defined as concentrations above 140 pg/ml for individuals under 55 years of age and above 280 pg/ml for individuals aged 55 years or older.

2.4 Quantification of serum soluble factors

Serum soluble factors were quantified using the Olink™ Target 48 Cytokine panel on an Olink™ Signature Q100 instrument (Thermo Fisher, MA, USA). This platform allows for the simultaneous analysis of 45 immune-related factors, including cytokines, chemokines, and other pro- and anti-inflammatory proteins. Supplementary Table S1 provides a complete list of the soluble factors included in the panel.

The Olink® Target 48 Cytokine assay uses Proximity Extension Assay (PEA) technology with a two-step normalization and strict quality control framework to ensure precision and cross-run comparability. Each well contains internal controls to monitor the immunoreaction, extension, and qPCR phases. Normalization involves correcting analyte Cq values by the Extension Control (ΔCq), then by the median Calibrator ΔCq across plates (ΔΔCq), and finally adjusting by a bridging factor to align different kit lots. External controls (calibrator, sample, and negative controls) were used to assess precision, accuracy, and background. Quality control criteria required intra- and inter-assay CVs < 30%, control deviations within ±0.3 values, and exclusion of samples failing these limits.

Missing data were generally very low, below 1% in 42 out of the 45 proteins analyzed. Only three proteins (MMP1, TSLP, and IL33) exhibited missing data levels above 3% (see Supplementary Table S2). No assumptions were made for missing values.

2.5 Statistical analysis

Categorical variables are presented as numbers and percentages [n (%)]. Differences between groups were analyzed using the chi-squared test and Fisher's exact test.

We used the Mann-Whitney and Kruskal-Wallis tests to compare continuous variables. For the Kruskal-Wallis test, we conducted *post-hoc* analyses between groups using Dunn's Multiple Comparison Test. All statistical tests were two-tailed, and a p-value of less than 0.05 was considered to indicate statistical significance. P-values were corrected for multiple comparisons using the False Discovery Rate (FDR) method. After correction q values lower than 0.05 were considered as significant. Spearman test correlation was used to assess the relationships between soluble factors and clinical parameters. Volcano plots were generated to visualize the differential distribution between groups.

The statistical analyses were conducted using GraphPad Prism 9.0 (GraphPad Prism Inc., San Diego, CA, USA) and R software (version 4.3.2; R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria).

2.6 Ethics statement

The study was approved by the Ethics Committee of the Ramon y Cajal University Hospital. At the meeting held on 09/26/2023 record 459, it was decided to issue the positive report corresponding to the study. All participants provided written informed consent to participate.

2.7 Data availability

The original data will be accessible to any researcher in the field for 3 years upon request to the corresponding author.

3 Results

3.1 Characterization of the patient cohort

We included 253 PwMS (74% women, median age 37.9 years [IQR: 28.64–45.95]) and 180 HCs (72% women, median age 38.1

years [IQR: 28.9–48.2]). No statistical differences in sex or age were found between PwMS and HCs.

We classified PwMS according to their sNfL and sGFAP levels as NLGL (93 patients), NHGL (n=71), NHGH (n=55) and NLGH (n=34). Values of sNfL and sGFAP in every patient group and in HCs are shown in Supplementary Table S3.

Demographic and baseline clinical characteristics of the different groups of patients are summarized in Table 1. The only significant differences were observed in the number of gadolinium (Gd+) enhancing lesions, that were higher in the NHGH group compared with the NLGL (p=0.007) and NLGH (p=0.02) groups.

3.2 Association of soluble factors with the different MS profiles

We next explored the differences between the serum values of 45 soluble factors within the four groups of PwMS and with the HCs group. Results including Dunn's corrected p values are shown in Supplementary Table S4. Differences were further corrected using The FDR test and variables showing significant differences are shown in Table 2.

Our analysis revealed distinct patterns in inflammation-related soluble factors, chemokines, and repair-associated molecules among the PwMS and the HCs groups.

First, we observed decreased values of TH2 cytokines in all groups of PwMS patients compared with the HCs. IL-4 levels were higher in the HCs compared with the NLGL group (q=0.02), the NHGL group (q=0.04), the NHGH group (q=0.008), and the NLGH group (q=0.006). Similarly, the HCs exhibited higher IL-13 values than the NLGL group (q=0.003), the NHGL group (q=0.04), the NHGH group (q=0.002), and the NLGH group (q=0.002) (Supplementary Figure S1). We did not find any other common differences across all MS groups compared with the HCs.

However, when comparing controls with different MS groups, we identified distinct differences within these groups. Notably, GM-CSF levels were reduced in the NLGL (q=0.009) and NHGL (q=0.002) groups compared to HC. Of note, we found clear differences that were mainly restricted to NLGH group. Compared with the HCs, individuals in the NLGH group exhibited decreased levels of FLT3LG (q=0.003), a cytokine essential for dendritic cell immune response; TNFSF12 (q=0.004), a regulator of tissue remodeling and B cell activity; and TNF-α (q=0.004), a key mediator of Th1 immune response (Figures 1A–D).

TABLE 1 Demographic and clinical data of the cohorts included in the study.

Demographic and clinical data	NLGL(n=93)	NHGL (n=71)	NHGH (n=55)	NLGH (n=34)
Age (years)	36.4 [29.3-47.4]	37 [27-49.2]	38 [31.2-46]	40.2 [25.5-45.1]
Sex female	67 (72.1)	47 (69.1)	43 (78)	26 (76.5)
Disease duration (days)	71 [12-189]	60 [17-153]	82 [10-192]	97 [52.3-198.5]
EDSS at baseline	1.5 [1-2]	1.5 [1-2]	1.5 [1.5-2]	1.5 [1.5-2]
Topography of first relapse				
Optic nerve	22 (23.7)	11 (15.4)	9 (16.3)	6 (17.7)
Brainstem	20 (21.5)	18 (25.4)	12 (21.8)	8 (23.5)
Spinal cord	36 (38.7)	28 (39.4)	24 (43.6)	13 (38.2)
Multifocal	4 (4.3)	3 (4.2)	2 (3.6)	2 (5.9)
Others	11 (11.8)	11 (15.5)	8 (14.7)	5 (14.7)
T2 lesions at baseline				
0	5 (5.4)	0 (0)	1 (2.8)	2 (5.9)
1-3	18 (19.3)	9 (12.7)	4 (7.3)	4 (11.7)
4-9	23 (24.7)	21 (29.6)	11 (20)	10 (29.4)
10-50	41 (44.1)	36 (50.7)	30 (54.5)	14 (41.2)
>50	6 (6.5)	5 (7)	9 (16.4)	4 (11.8)
Gd+ enhancing lesions	**0 [0-1]**	1 [0-1]	**1 [0-3] ¶** θ***	**0 [0-1]**
IgG oligoclonal bands	87 (93.5)	66 (92.9)	50 (90.9)	31 (91.2)

Continuous variables are expressed as medians and 25-75% interquartile ranges (25-75% IQRs). Differences between groups were examined using the Kruskal–Wallis multiple comparisons test and, with Dunn's *post hoc* test. Significant comparisons are highlighted in bold. EDSS: Expanded Disability Status Scale; Gd: Gadolinium; IgG: Immunoglobulin G; IQR: Interquartile Range; NHGH: Patients with high sNfL Z-scores and sGFAP; NHGL: Patients with high sNfL Z-scores and normal sGFAP values; NLGH: Patients with low sNfL Z-scores and high GFAP levels; NLGL: Patients with low sNfL Z-scores and GFAP values. θ: difference with the NLGH group; PwMS: Patients with MS; ¶: difference with the NLGL group;*: p<0.05 and **: p<0.01 obtained with Dunn's test. In all cases, significant p values in Dunn's test implied p values < 0.05 in the associated Kruskal–Wallis test.

10.3389/fimmu.2025.1729500

TABLE 2 Serum soluble factors showing significant differences in our study.

Soluble factors (pg/ml)	HCs (n=180)	NLGL (n=93)	NHGL (n=71)	NHGH (n=55)	NLGH (n=34)
Factors associated with inflammation					
FLT3LG	**109 [93.4-130]**	99.4 [78.9-120]	99.5 [83.4-124]	102 [81.4-134	**87 [65-111] ɬ*** **
GM-CSF	**0.15 [0.1-0.2]**	**0.1[0.08-0.2] ɬ** **	**0.1[0.07-0.15] ɬ** **	0.1 [0.08-0.2]	0.1 [0.06-0.4]
IL-4	**0.05 [0.02-0.08]**	**0.03 [0.02-0.06] ɬ***	**0.03 [0.01-0.05] ɬ***	**0.02 [0.01-0.06] ɬ** **	**0.02 [0.01-0.04] ɬ** **
IL13	**0.5 [0.3-1.1]**	**0.3 [0.2-0.7] ɬ** **	**0.3 [0.2-0.7] ɬ***	**0.3 [0.2-0.7] ɬ** **	**0.2 [0.1-0.8] ɬ** **
TNF-α	**19.5 [16.7-23.5]**	18.4 [15.1-23.2]	17.6 [14.3-2.8]	17.3 [13.6-22.7]	**15 [12.7-20] ɬ** **
TNFSF12	**843 [726-1015]**	812 [671-960]	805 [672-951]	790 [646-945]	**734 [531-855] ɬ** **
Chemokines					
CCL2	**595 [477-769] θ**** **	**532 [397-754] θ***	**554 [405-714] θ***	**550 [383-716] θ***	**397 [209-536]**
CCL3	**9.4 [6.9-22.2]**	8.3 [5.8-13.1]	8.5 [5.9-16.1]	7.6 [5.8-10.3]	**6.2 [5.4-9.7] ɬ** **
CCL4	**135 [95.3-183]**	128 [95-182]	128 [93.8-170]	119 [94.4-172]	**99 [70.2-131] ɬ** **
CCL7	**1.1 [0.8-1.8]**	0.9 [0.7-1.4]	0.69 [0.6-1.3]	0.9 [0.6-1.4]	**0.7 [0.5-1.1] ɬ***
Factors involved in repair processes					
EGF	**604 [359-750]**	**383[209-614] ɬ** **	**512 [304-727]**	**343 [165-539] ɬ**** ϒ***	**311 [127-182] ɬ**** ϒ** **

Data are presented as median [25–75% IQR] in pg/ml, with statistically significant differences highlighted in bold. Q-values were calculated from Dunn's test p-values after adjustment with the False Discovery Rate (FDR) method. HCs: healthy controls; IQR: interquartile range; NHGH: patients with high sNfL Z-scores and sGFAP values; NHGL: patients with high sNfL Z-scores and normal sGFAP values; NLGH patients with normal sNfL Z-scores and high GFAP levels; NLGL: patients with normal sNfL Z-scores and GFAP values. ɬ: difference with the HCs group; θ: difference with the NLGH group; ϒ: difference with the NHGL group; * q<0.05, ** q<0.01, *** q<0.001, and **** q<0.0001 obtained from Dunn's *post-hoc* test and adjusted using the False Discovery Rate correction.

Additionally, patients in the NLGH group showed a clear decrease in various chemokines involved in immune cell recruitment compared with the HCs and other patients groups. Levels of CCL3 (q=0.009), CCL7 (q=0.02), and CCL4 (q=0.007) (Figures 2A–C). CCL2, showed the most clear differences, since its values in NLGH group were lower than those of all other groups (q<0.0001 vs HC, q=0.02 vs NLGL, q=0.04 vs NHGL, and q=0.04 vs NHGH, Figure 3A).

Finally, we analyzed soluble factors related to tissue repair; we found lower epidermal growth factor (EGF) levels in the NLGL (q=0.009), NHGH (q<0.0001), and NLGH (q<0.0001) groups compared with the HCs. In addition, the NHGH (q=0.03) and NLGH (q=0.009) groups exhibited decreased values compared with the NHGL group (Figure 3B).

To further visualize differences in the soluble factors between all groups, we performed Volcano plots. Differences with HC are shown in Figure 4.

Finally, we explored the correlation between key soluble factors and clinical markers including EDSS after the first relapse, sNfL and sGFAP. We found a moderate negative correlation between EGF and sGFAP (r=-0.32 and p<0.0001) thus suggesting that astroglial inflammation associates with lower ability for tissue repair.

4 Discussion

MS is a heterogeneous disease that ranges from a relatively benign course to high disability progression associated or independent of inflammatory activity (2, 6, 12). Different approaches have been made to find immunological factors associated with MS course. In this line, two serum soluble factors, sNfL and sGFAP, have been found to be closely associated with inflammation and neurodegeneration in MS (4–7). The combination of this factors helps to identify MS patients at risk of disease progression, associated or independent of inflammation (6).

We classified our patients according to the values of these biomarkers and explored the differences between inflammatory and non-inflammatory disability progression by studying various immune-related factors using the OLINK™ proteomics platform.

Our analysis revealed altered soluble factors in all PwMS as well as in specific patient groups. Across all of the MS patient groups, we noted lower values of serum IL-4 and IL-13 compared with the HCs. This finding suggests an inhibition of the TH2 response in MS; however, we did not find any increase in Th1 and TH17 cytokines associated with proinflammatory responses previously observed in the disease (21, 26–29). This finding is somewhat surprising, as PwMS individuals exhibit high percentages of T and B cells producing TNF-α, IFN-ϒ, or IL-17 cytokines in peripheral blood (21). However, this result can be explained by the need for reactivation of these cells to produce high levels of inflammatory cytokines, as the increase of their levels in CSF could suggest (16, 30).

Of note, the main differences in this study were observed when analyzed particular MS groups. Compared with HCs, NLGH patients showed decreased values of TNF-α, a potent inflammatory mediator, which contributes to immune cell infiltration into the CNS (26); of serum TNFSF12, involved in

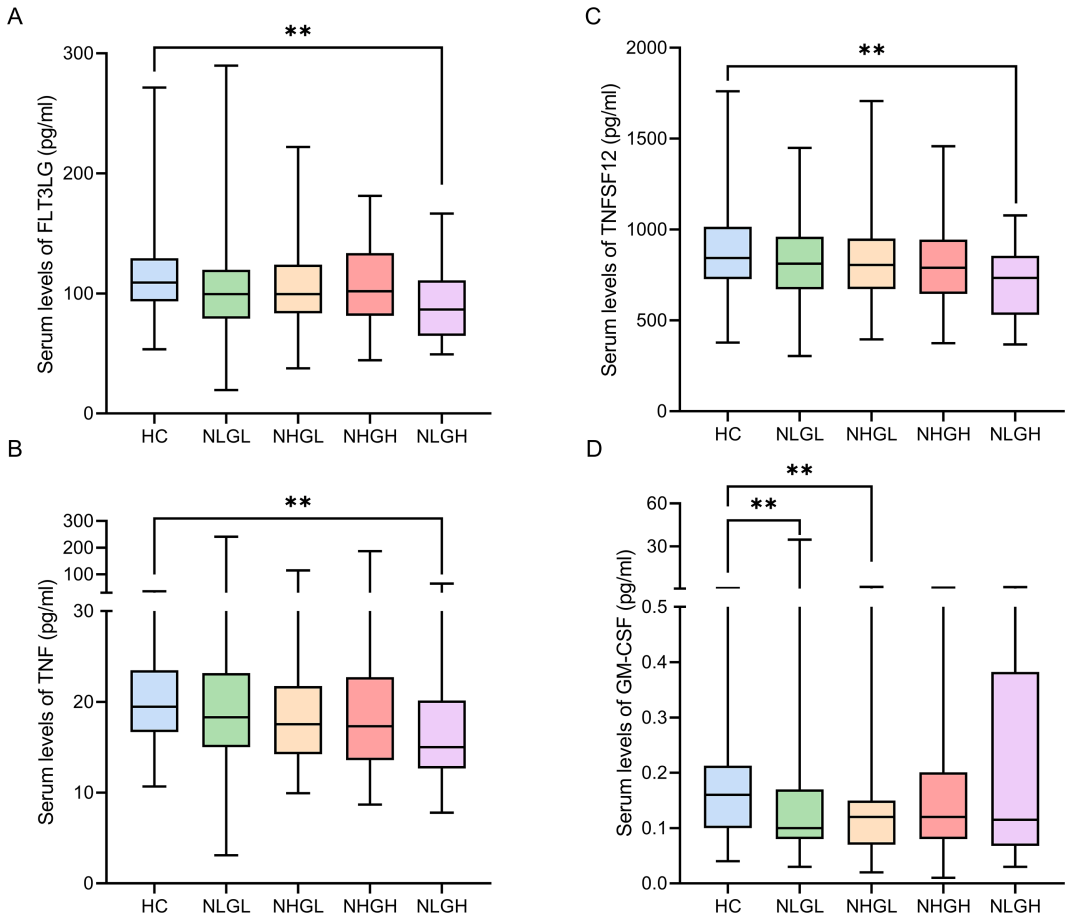


FIGURE 1
Serum levels (pg/ml) of inflammation-related soluble factors in PwMS groups and HCs: FLT3LG **(A)**, TNF-α **(B)**, TNFSF12 **(C)**, and GM-CSF **(D)**. FLT3LG: Fms-related tyrosine kinase 3 ligand; GM-CSF: Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor; HC: Healthy controls; NHGL: Patients with high sNfL z-scores and normal sGFAP values; NLGH: Patients with low sNfL z-scores and high GFAP levels; NLGL: Patients with low sNfL z-scores and GFAP values; PwMS: patients with MS; TNF-α: Tumor necrosis factor alpha; TNFSF12: Tumor necrosis factor ligand superfamily member 12; **q < 0.01, obtained from Dunn's *post-hoc* test and adjusted using the false discovery rate method.

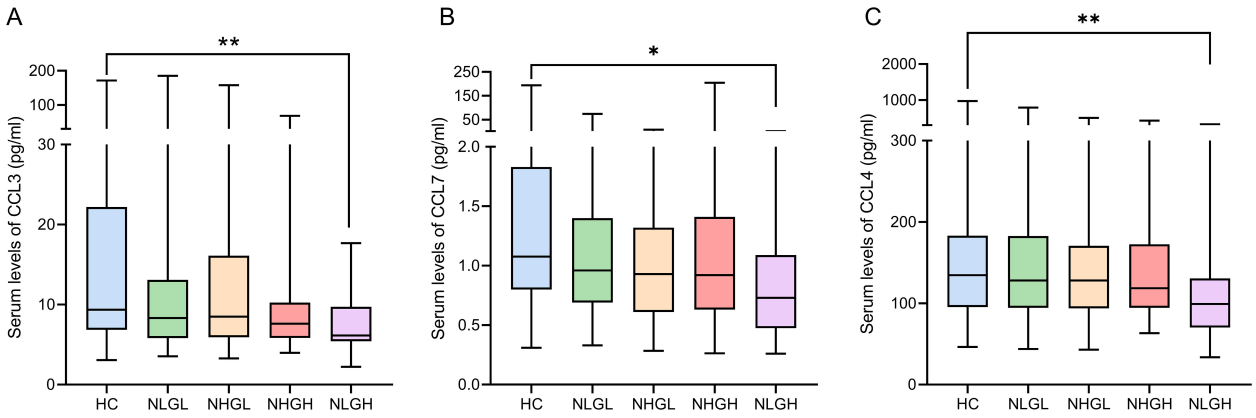


FIGURE 2
Serum levels (pg/mL) of chemokines in PwMS groups and HC: CCL3 **(A)**, CCL7 **(B)**, and CCL4 **(C)**. CCL3: C-C motif chemokine 3; CCL4: C-C motif chemokine 4; CCL7: C-C motif chemokine 7; HCs: Healthy controls; NHGL: Patients with high sNfL z-scores and normal sGFAP values; NLGH: Patients with low sNfL z-scores and high GFAP levels; NLGL: Patients with low sNfL z-scores and GFAP values; PwMS: patients with multiple sclerosis; *q<0.05; **q<0.01 obtained from Dunn's *post-hoc* test and adjusted using the false discovery rate correction.

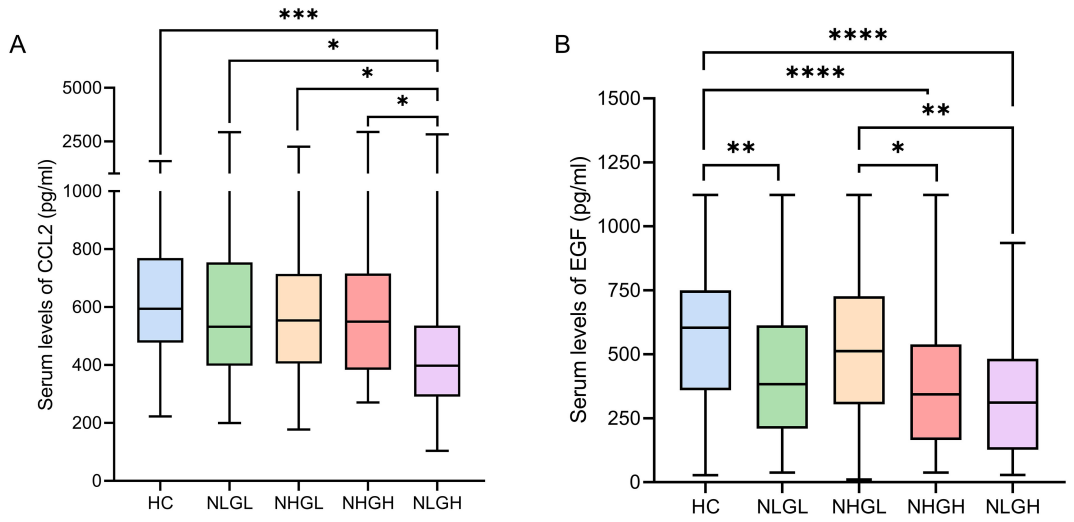


FIGURE 3
Serum levels (pg/ml) of the chemokine CCL2 **(A)** and the repair factor EGF **(B)** among PwMS groups and HCs. CCL2: C-C motif chemokine 2; EGF: Epidermal growth factor; HCs: Healthy controls; NHGL: Patients with high sNfL z-scores and normal sGFAP values; NLGH: Patients with low sNfL z-scores and high GFAP levels; NLGL: Patients with low sNfL z-scores and GFAP values; PwMS: patients with MS; VEGFA: Vascular endothelial growth factor A; *q<0.05, **q<0.01, ***q<0.001, and ****q<0.0001 obtained from Dunn's *post-hoc* test and adjusted using the False Discovery Rate method.

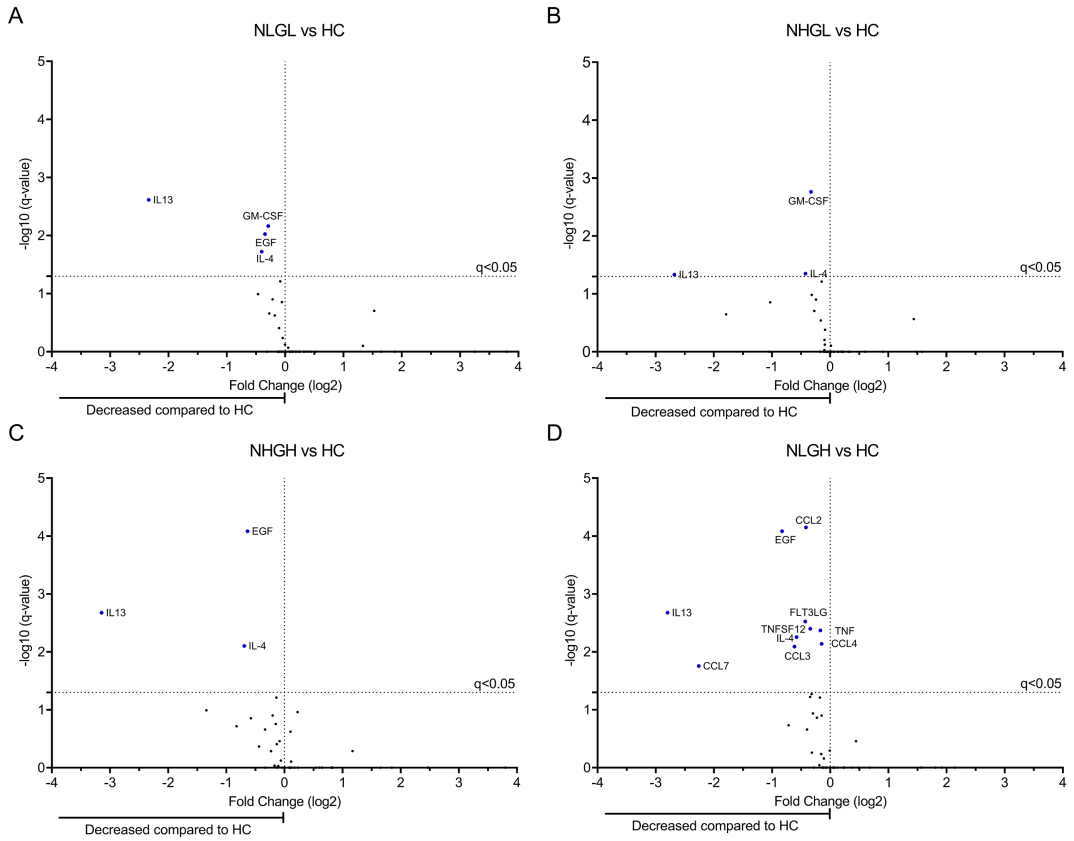


FIGURE 4
Volcano plots showing the differential levels of soluble factors between groups. Comparisons were performed between **(A)** NLGL vs HC, **(B)** NHGL vs HC, **(C)** NHGH vs HC, and **(D)** NLGH vs HC. The x-axis represents the $\log_2$ fold change in soluble factor levels between groups, while the y-axis represents the $-\log_{10}$ of the False Discovery Rate adjusted p-values (q-values). HCs: Healthy controls; NHGL: Patients with high sNfL z-scores and normal sGFAP values; NLGH: Patients with low sNfL z-scores and high GFAP levels; NLGL: Patients with low sNfL z-scores and GFAP values.

tissue remodeling and B cell activity, which is elevated in CSF of MS patients and associated with disease activity (31); and of FLT3LG, a key factor for the development and survival of dendritic cells which supports the adaptive immune responses (32). This may be consistent with the compartmentalization of the immune response and high risk of PIRA experienced by these patients (2, 6, 7, 33). We found that NLGH patients also showed a decrease of several chemokines related to the recruitment of immune cells. These individuals showed a decrease in CCL3, CCL7 and CCL4 compared with HC. These chemokines play key roles in recruitment of monocytes, T lymphocytes, and natural killer (NK) cells to sites of inflammation (34, 35). However, the most important results were observed with CCL2, a key chemokine in recruiting monocytes, memory T cells, and dendritic cells to the CNS (36). Previous studies have described a modest decrease of CCL2 in MS patients (37), but we observed that it was restrained to NLGH group, with values remarkably lower compared to all other MS groups and HCs. In junction, these data could be consistent with the compartmentalization of the immune response in these patients within the CNS with a clear reduction of leukocyte activation in the periphery and a drastic inhibition of their migration, which may contribute to the onset of PIRA (2, 6, 33, 38).

On the other hand, the two groups of patients with low sGFAP values (NLGL and NHGL) exhibited reduced serum levels of GM-CSF, a cytokine that plays a central role in amplifying astrocyte and microglial activation (39, 40). These findings could explain the low astrocyte activation experienced by these patients and their low risk of PIRA (33).

Finally, we observed changes in EGF, a soluble factor related to tissue repair. It supports oligodendrocyte proliferation, differentiation, and survival, which is essential for CNS remyelination (41), and for axonal repair (42). A reduction in EGF levels was previously found in the CSF and serum of MS patients, and its administration was shown to improve an experimental model of the disease (43). We observed a decrease in EGF in three of the MS groups. The NLGL patients exhibited a modest decrease compared with the HCs. This finding indicates that despite favorable clinical outcomes, the reduction in the capacity of these patients for CNS repair may render them susceptible to disease progression over time. On the other hand, the NHGL patients maintained relatively unchanged EGF levels, suggesting a retained reparative capacity. That situation may be associated with a lower risk of disease progression, regardless of inflammatory activity (29). Remarkably, the lower levels of EGF observed in NLGH and NHGH patients can associate with the higher risk of progression shown by these two groups of patients (4–7, 33). In fact, the negative association found between sGFAP and EGF in this study supports the data previously found in MS experimental models showing that astroglia activation reduces its reparative function (44, 45). In MS these data are consistent with the lack of repair as a cofactor with innate cell activation inducing a high risk of PIRA (7, 33). These findings highlight EGF as a putative biomarker of reparative potential and a therapeutic target to enhance remyelination, even in mild cases of MS.

The combination of EGF and CCL2 may differentiate patients at risk of PIRA who are susceptible of responding or not to drugs targeting the adaptive immune response in MS.

The study has some limitations. Its cross-sectional design does not allow longitudinal assessment of biomarker dynamics. Since a brain MRI was not performed in HC group the possibility of a radiologically isolated syndrome could not be completely excluded. Exploring CSF samples would further clarify changes associated with compartmentalized inflammation. Potential confounders, such as vitamin D levels and HbA1c, which could influence the biomarker levels were not explored. Finally, the NLGH subgroup had a limited sample size due to the low proportion of these patients at disease onset.

In summary, this study shows that stratifying MS patients by sNfL and sGFAP levels reveals distinct immune and reparative mechanisms underlying disease heterogeneity and identifies new biomarkers that might contribute to improving treatment selection and monitoring in MS. Further studies are warranted to explore the clinical utility of these molecules.

Data availability statement

The original data will be accessible to any researcher in the field for 3 years upon request to the corresponding author.

Ethics statement

The studies involving humans were approved by President: Sonsoles Sancho García, Radiation Oncology, Ramón y Cajal University Hospital. Vice President: M&z.ausco; Ángeles Gálvez, Clinical Pharmacology, Member of the Research Committee, Ramón y Cajal University Hospital. Technical Secretary: Itziar de Pablo López de Abechuco, Clinical Pharmacology, Ramón y Cajal University Hospital. Board Members: M&z.ausco; Jesús Blanchard Rodríguez, Hematology, Ramón y Cajal University Hospital; Irene Cabrera Troye, Law graduate, not professionally linked to the Hospital, Non-scientific member, representative of patient interests, expert in data protection regulations; Yolanda de Blas Fernández, Nurse, Emergency Department, Ramón y Cajal University Hospital; Victoria Gómez dos Santos, Urology, Ramón y Cajal University Hospital; Antonio Guerrero García, Gastroenterology, Ramón y Cajal University Hospital; Carmen Guillén Ponce, Medical Oncology, Ramón y Cajal University Hospital; María Muñoz García, Hospital Pharmacy, Ramón y Cajal University Hospital; Alfonso Muriel García, Clinical Biostatistics, Ramón y Cajal University Hospital; Cristina Pueyo López, Hospital Pharmacy and Master's in Bioethics, Member of the Healthcare Ethics Committee, Ramón y Cajal University Hospital; Carmen Ruiz Ballesteros, Law graduate, not professionally linked to the Hospital, Non-scientific member; José Luis San Millán López, Genetics Department, Ramón y Cajal University Hospital; Sonia Soto Díaz, Family and Community Medicine, Ramón y Cajal University Hospital; Carmen Herrero Domínguez-Berrueta, Primary Care Pharmacist, Northwest Healthcare Directorate; Ana Jiménez Gordo, Medical Oncology, Infanta Sofía University Hospital; Raúl Antonio Ruiz Ortega, Internal Medicine, Ramón y

Cajal University Hospital; M&z.ausco; del Carmen Barriocanal Fernández, Tourism graduate, not professionally linked to the Hospital, Non-scientific member, representative of patient interests. The studies were conducted in accordance with the local legislation and institutional requirements. The participants provided their written informed consent to participate in this study. The studies were conducted in accordance with the local legislation and institutional requirements. The participants provided their written informed consent to participate in this study.

Author contributions

AR-R: Conceptualization, Formal analysis, Writing – original draft, Writing – review & editing, Data curation, Investigation, Methodology, Visualization. MD-M: Conceptualization, Data curation, Formal analysis, Investigation, Methodology, Visualization, Writing – review & editing. EM: Resources, Writing – review & editing. JG-D: Resources, Writing – review & editing. NV: Formal analysis, Funding acquisition, Writing – review & editing. JF-V: Resources, Writing – review & editing. MC: Resources, Writing – review & editing. SS: Resources, Writing – review & editing. HG: Resources, Writing – review & editing. JC-G: Resources, Writing – review & editing. AG-M: Investigation, Methodology, Writing – review & editing. FR-J: Resources, Writing – review & editing. JV-G: Writing – review & editing. RS-A: Resources, Writing – review & editing. MM: Resources, Writing – review & editing. XM: Resources, Writing – review & editing. JM: Resources, Writing – review & editing. LC-F: Resources, Writing – review & editing. RÁ-L: Conceptualization, Resources, Visualization, Writing – review & editing. LV: Conceptualization, Data curation, Formal analysis, Funding acquisition, Investigation, Resources, Supervision, Visualization, Writing – original draft, Writing – review & editing.

Funding

The author(s) declared that financial support was received for this work and/or its publication. This study has been funded by Instituto de Salud Carlos III (ISCIII) through the projects "PI21/00828" and "PI24/01018", and by grants "RD21/0002/0053" and "RD24/0007/0013" from La Red Española de Enfermedades Inflamatorias and cofunded by the European Union.

Acknowledgments

The authors acknowledge the nurses Maria Angeles De Santos, Pilar de Nicolás Santos (Transplant Coordination, Ramón y Cajal University Hospital, Madrid, Spain), Silvia Morel, and Ana María Pérez Macias, (Neurology Department, Ramón y Cajal University Hospital, Madrid, Spain), for their help in obtaining the blood samples, as well as the technicians Paloma Nuera and Sonia Ortega (Inmunology Department, Ramón y Cajal University Hospital, Madrid, Spain) for their technical support.

Conflict of interest

EM has received speaking honoraria and travel expenses for participation in scientific meetings and has served as a steering committee member or participated in advisory boards of clinical trials in the past 3 years with Biogen, Merck, Novartis, Roche, Almirall, Johnson & Johnson, Bristol-Myers Squibb, Sanofi, and Neuraxpharma; He has also acted as a scientific advisor for the CRO PSI; SS received research grants, travel support or honoraria for speaking engagements from Almirall, Biogen, Bristol Myers Squibb, Janssen, Merck, Neuraxpharm, Novartis, Roche and Sanofi-Genzyme; JC-G has received honorary for speaking engagements or consulting services from Biogen, Bayer, Bial, Bristol Myers Squibb, Johnson & Johnson, Roche, and Sanofi Genzyme; FR-J received research grants and travel support for speaking engagements from Merck; XM has received compensation for lecture honoraria and travel expenses, participation in scientific meetings, clinical trial steering committee membership, or clinical advisory board participation in recent years from Abbvie, Actelion, Alexion, Bial PD, Biogen, Bristol-Myers Squibb/Celgene, EMD Serono, Genzyme, Hoffmann-La Roche, Immunic Therapeutics, Janssen Pharmaceuticals, Medday, Medscape, Merck, Mylan, Nervgen, Neuraxpharm, Novartis, Peervoice, Samsung-Biosys, Sandoz, Sanofi-Genzyme, Teva Pharmaceutical, TG Therapeutics, Excemed, ECTRIMS, MSIF, and NMSS or any of their affiliates; LC-F received speaker fees, travel support, and/or served on advisory boards by Biogen, Sanofi, Merck, Bayer, Novartis, Roche, Teva, Celgene, Ipsen, Biopas, Almirall; RÁ-L has received support for attending meetings from Biogen, Merck, Novartis and Sanofi-Genzyme; LV, reported receiving grants and personal fees from Merck, Roche, Sanofi Genzyme, Bristol Myers 257 Squibb, Celgene, Biogen, and Novartis outside the submitted work.

The remaining authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.

The authors LV, MC, RÁ -L declared that they were an editorial board member of Frontiers, at the time of submission. This had no impact on the peer review process and the final decision.

Generative AI statement

The author(s) declare that no Generative AI was used in the creation of this manuscript.

Any alternative text (alt text) provided alongside figures in this article has been generated by Frontiers with the support of artificial

intelligence and reasonable efforts have been made to ensure accuracy, including review by the authors wherever possible. If you identify any issues, please contact us.

Publisher's note

All claims expressed in this article are solely those of the authors and do not necessarily represent those of their affiliated organizations, or those of the publisher, the editors and the reviewers. Any product that may be evaluated in this article, or claim that may be made by its manufacturer, is not guaranteed or endorsed by the publisher.

Supplementary material

The Supplementary Material for this article can be found online at: https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fimmu.2025.1729500/full#supplementary-material

References

1. Kuhle J, Barro C, Andreasson U, Derfuss T, Lindberg R, Sandelius Å, et al. Comparison of three analytical platforms for quantification of the neurofilament light chain in blood samples: ELISA, electrochemiluminescence immunoassay and Simoa. *Clin Chem Lab Med*. (2016) 54:1655–61. doi: 10.1515/cclm-2015-1195

2. Lublin FD, Häring DA, Ganjgahi H, Ocampo A, Hatami F, Čuklina J, et al. How patients with multiple sclerosis acquire disability. *Brain*. (2022) 145:3147–61. doi: 10.1093/brain/awac016

3. Monreal E, Fernández Velasco JI, García Sánchez MI, Sainz de la Maza S, Llufriu S, Álvarez Lafuente R, et al. Association of serum neurofilament light chain levels at disease onset with disability worsening in patients with a first demyelinating multiple sclerosis event not treated with high-efficacy drugs. *JAMA Neurol*. (2023) 80:397–403. doi: 10.1001/jamaneurol.2023.0010

4. Benkert P, Meier S, Schaedelin S, Manouchehrinia A, Yaldizli Ö, Maceski A, et al. Serum neurofilament light chain for individual prognostication of disease activity in people with multiple sclerosis: a retrospective modelling and validation study. *Lancet Neurol*. (2022) 21:246–57. doi: 10.1016/S1474-4422(22)00009-6

5. Bose G, Healy BC, Saxena S, Saleh F, Glanz BI, Bakshi R, et al. Increasing neurofilament and glial fibrillary acidic protein after treatment discontinuation predicts multiple sclerosis disease activity. *Neurol Neuroimmunol Neuroinflamm*. (2023) 10: e200167. doi: 10.1212/NXI.0000000000200167

6. Monreal E, Fernández Velasco JI, Álvarez Lafuente R, Sainz de la Maza S, García Sánchez MI, Llufriu S, et al. Serum biomarkers at disease onset for personalized therapy in multiple sclerosis. *Brain*. (2024) 147:4084–93. doi: 10.1093/brain/awae260

7. Monreal E, Fernández Velasco JI, Sainz de la Maza S, Espiño M, Villarrubia N, Roldán Santiago E, et al. Combining CSF and serum biomarkers to differentiate mechanisms of disability worsening in multiple sclerosis. *Int J Mol Sci*. (2025) 26:6898. doi: 10.3390/ijms26146898

8. Freedman MS, Gnanapavan S, Booth RA, Calabresi PA, Khalil M, Kuhle J, et al. Guidance for use of neurofilament light chain as a cerebrospinal fluid and blood biomarker in multiple sclerosis management. *EbioMedicine*. (2024) 101:104970. doi: 10.1016/j.ebiom.2024.104970

9. Daponte A, Koros C, Skarlis C, Siozios D, Rentzos M, Papageorgiou SG, et al. Neurofilament biomarkers in neurology: from neuroinflammation to neurodegeneration, bridging established and novel analytical advances with clinical practice. *Int J Mol Sci*. (2025) 26:9739. doi: 10.3390/ijms26199739

10. Yang K, Liu Y, Zhang M. The diverse roles of reactive astrocytes in the pathogenesis of amyotrophic lateral sclerosis. *Brain Sci*. (2024) 14:158. doi: 10.3390/brainsci14020158

11. Ransohoff RM, Brown MA. Innate immunity in the central nervous system. *J Clin Invest*. (2012) 122:1164–71. doi: 10.1172/JCI58644

12. Woo MS, Engler JB, Friese MA. The neuropathobiology of multiple sclerosis. *Nat Rev Neurosci*. (2024) 25:493–513. doi: 10.1038/s41583-024-00823-z

13. Bar-Or A, Li R. Cellular immunology of relapsing multiple sclerosis: interactions, checks, and balances. *Lancet Neurol*. (2021) 20:470–83. doi: 10.1016/S1474-4422(21)00063-6

14. Palle P, Monaghan KL, Milne SM, Wan ECK. Cytokine signaling in multiple sclerosis and its therapeutic applications. *Med Sci (Basel)*. (2017) 5:23. doi: 10.3390/medsci5040023

15. Cui LY, Chu SF, Chen NH. The role of chemokines and chemokine receptors in multiple sclerosis. *Int Immunopharmacol*. (2020) 83:106314. doi: 10.1016/j.intimp.2020.106314

16. Berek K, Bauer A, Rudzki D, Auer M, Barket R, Zinganell A, et al. Immune profiling in multiple sclerosis: a single-center study of 65 cytokines, chemokines, and related molecules in cerebrospinal fluid and serum. *Front Immunol*. (2023) 14:1200146. doi: 10.3389/fimmu.2023.1200146

17. Rabin A, Bello E, Kumar S, Zeki DA, Afshari K, Deshpande M, et al. Targeted proteomics of cerebrospinal fluid in treatment naïve multiple sclerosis patients identifies immune biomarkers of clinical phenotypes. *Sci Rep*. (2024) 14:21793. doi: 10.1038/s41598-024-67769-1

18. Khademi M, Kockum I, Andersson ML, Iacobaeus E, Brundin L, Sellebjerg F, et al. Cerebrospinal fluid CXCL13 in multiple sclerosis: a suggestive prognostic marker for the disease course. *Mult Scler*. (2011) 17:335–43. doi: 10.1177/1352458510389102

19. Bai Z, Chen D, Wang L, Zhao Y, Liu T, Yu Y, et al. Cerebrospinal fluid and blood cytokines as biomarkers for multiple sclerosis: A systematic review and meta-analysis of 226 studies with 13,526 multiple sclerosis patients. *Front Neurosci*. (2019) 13:1026. doi: 10.3389/fnins.2019.01026

20. Košćak Lukač J, Baronica KB, Šućur A, Sremec J, Tomasović S, Baronica R, et al. Serum concentrations of chemokines CCL20, CXCL8 and CXCL10 in relapsing-remitting multiple sclerosis and their association with presence of antibodies against epstein-barr virus. *Int J Mol Sci*. (2024) 25:8064. doi: 10.3390/ijms25158064

21. Rodero-Romero A, Fernández Velasco JI, Monreal E, Sainz Amo R, Álvarez Lafuente R, Comabella M, et al. Identification of cellular factors associated with inflammation and neurodegeneration in multiple sclerosis. *Front Immunol*. (2025) 16:1648725. doi: 10.3389/fimmu.2025.1648725

22. Åkesson J, Hojjati S, Hellberg S, Raffetseder J, Khademi M, Rynkowski R, et al. Proteomics reveal biomarkers for diagnosis, disease activity and long-term disability outcomes in multiple sclerosis. *Nat Commun*. (2023) 14:6903. doi: 10.1038/s41467-023-42682-9

23. Qureshi F, Hu W, Loh L, Patel H, DeGuzman M, Becich M, et al. Analytical validation of a multi-protein, serum-based assay for disease activity assessments in multiple sclerosis. *Proteomics Clin Appl*. (2023) 17:e2200018. doi: 10.1002/prca.202200018

24. Thompson AJ, Banwell BL, Barkhof F, Carroll WM, Coetzee T, Comi G, et al. Diagnosis of multiple sclerosis: 2017 revisions of the McDonald criteria. *Lancet Neurol*. (2018) 17:162–73. doi: 10.1016/S1474-4422(17)30470-2

25. Rodero Romero A, Monreal E, Sainz Amo R, García Domínguez JM, Villarrubia N, Veiga González JL, et al. Establishing normal serum values of neurofilament light chains and glial fibrillary acidic protein considering the effects of age and other demographic factors in healthy adults. *Int J Mol Sci*. (2024) 25:7808. doi: 10.3390/ijms25147808

26. Prajeeth CK, Kronisch J, Khorooshi R, Knier B, Toft Hansen H, Gudi V, et al. Effectors of Th1 and Th17 cells act on astrocytes and augment their neuroinflammatory properties. *J Neuroinflamm*. (2017) 14:204. doi: 10.1186/s12974-017-0978-3

27. Wagner CA, Roqué PJ, Goverman JM. Pathogenic T cell cytokines in multiple sclerosis. *J Exp Med*. (2020) 217:e20190460. doi: 10.1084/jem.20190460

28. Khaibullin T, Ivanova V, Martynova E, Cherepnev G, Khabirov F, Granatov E, et al. Elevated levels of proinflammatory cytokines in cerebrospinal fluid of multiple sclerosis patients. *Front Immunol*. (2017) 8:531. doi: 10.3389/fimmu.2017.00531

29. Mado H, Stasiniewicz A, Adamczyk Sowa M, Sowa P. Selected interleukins relevant to multiple sclerosis: new directions, potential targets and therapeutic perspectives. *Int J Mol Sci*. (2024) 25:10931. doi: 10.3390/ijms252010931

30. Van Loo G, Bertrand MJM. Death by TNF: a road to inflammation. *Nat Rev Immunol*. (2023) 23:289–303. doi: 10.1038/s41577-022-00792-3

31. Magliozzi R, Scalfari A, Pisani AI, Ziccardi S, Marastoni D, Pizzini FB, et al. The CSF profile linked to cortical damage predicts multiple sclerosis activity. *Ann Neurol*. (2020) 88:562–73. doi: 10.1002/ana.25786

32. Momenilandi M, Lévy R, Sobrino S, Li J, Lagresle Peyrou C, Esmaeilzadeh H, et al. FLT3L governs the development of partially overlapping hematopoietic lineages in humans and mice. *Cell*. (2024) 187:2817–2837.e31. doi: 10.1016/j.cell.2024.04.009

33. Meier S, Willemse EAJ, Schaedelin S, Oechtering J, Lorscheider J, Melie Garcia L, et al. Serum glial fibrillary acidic protein compared with neurofilament light chain as a biomarker for disease progression in multiple sclerosis. *JAMA Neurol*. (2023) 80:287–97. doi: 10.1001/jamaneurol.2022.5250

34. Ramesh G, MacLean AG, Philipp MT. Cytokines and chemokines at the crossroads of neuroinflammation, neurodegeneration, and neuropathic pain. *Mediators Inflamm*. (2013) 2013:480739. doi: 10.1155/2013/480739

35. Estevao C, Bowers CE, Luo D, Sarker M, Hoeh AE, Frudd K, et al. CCL4 induces inflammatory signalling and barrier disruption in the neurovascular endothelium. *Brain Behav Immun Health*. (2021) 18:100370. doi: 10.1016/j.bbih.2021.100370

36. Mahad D, Callahan MK, Williams KA, Ubogu EE, Kivisäkk P, Tucky B, et al. Modulating CCR2 and CCL2 at the blood-brain barrier: relevance for multiple sclerosis pathogenesis. *Brain*. (2006) 129:212–23. doi: 10.1093/brain/awh655

37. Melamud MM, Ermakov EA, Boiko AS, Kamaeva DA, Sizikov AE, Ivanova SA, et al. Multiplex analysis of serum cytokine profiles in systemic lupus erythematosus and multiple sclerosis. *Int J Mol Sci*. (2022) 23:13829. doi: 10.3390/ijms232213829

38. Calabrese M, Preziosa P, Scalfari A, Colato E, Marastoni D, Absinta M, et al. Determinants and biomarkers of progression independent of relapses in multiple sclerosis. *Ann Neurol*. (2024) 96:1–20. doi: 10.1002/ana.26913

39. Mayo L, Trauger SA, Blain M, Nadeau M, Patel B, Álvarez JI, et al. Regulation of astrocyte activation by glycolipids drives chronic CNS inflammation. *Nat Med*. (2014) 20:1147–56. doi: 10.1038/nm.3681

40. Wheeler MA, Clark IC, Tjon EC, Li Z, Zandee SEJ, Couturier CP, et al. MAFG-driven astrocytes promote CNS inflammation. *Nature*. (2020) 578:593–9. doi: 10.1038/s41586-020-1999-0

41. Scalabrino G. New epidermal-growth-factor-related insights into the pathogenesis of multiple sclerosis: is it also epistemology? *Front Neurol*. (2021) 12:754270. doi: 10.3389/fneur.2021.754270

42. Scalabrino G. Epidermal growth factor in the CNS: A beguiling journey from integrated cell biology to multiple sclerosis. An extensive translational overview. *Cell Mol Neurobiol*. (2022) 42:891–916. doi: 10.1007/s10571-020-00989-x

43. Linnerbauer M, Lößlein L, Vandrey O, Peter A, Han Y, Tsaktanis T, et al. The astrocyte-produced growth factor HB-EGF limits autoimmune CNS pathology. *Nat Immunol*. (2024) 25:432–47. doi: 10.1038/s41590-024-01756-6

44. Chen C, Shu Y, Yan C, Li H, Huang Z, Shen S, et al. Astrocyte-derived clusterin disrupts glial physiology to obstruct remyelination in mouse models of demyelinating diseases. *Nat Commun*. (2024) 15:7791. doi: 10.1038/s41467-024-52142-7

45. Brambilla R, Morton PD, Ashbaugh JJ, Karmally S, Lambertsen KL, Bethea JR, et al. Astrocytes play a key role in EAE pathophysiology by orchestrating in the CNS the inflammatory response of resident and peripheral immune cells and by suppressing remyelination. *Glia*. (2014) 62:452–67. doi: 10.1002/glia.22616

Supplementary Material

Supplementary Table 1. Abbreviations and name of cytokines, chemokines and other immunological factors measured in serum using Olink™ Target 48 Cytokine on an Olink signature 100 device

Abbreviation	Name of the molecule
CCL2	C-C motif chemokine 2
CCL3	C-C motif chemokine 3
CCL4	C-C motif chemokine 4
CCL7	C-C motif chemokine 7
CCL8	C-C motif chemokine 8
CCL11	Eotaxin
CCL13	C-C motif chemokine 13
CCL19	C-C motif chemokine 19
CSF1	Macrophage colony-stimulating factor 1
CSF3	Granulocyte colony-stimulating factor
CXCL8	Interleukin-8
CXCL9	C-X-C motif chemokine 9
CXCL10	C-X-C motif chemokine 10
CXCL11	C-X-C motif chemokine 11
CXCL12	Stomal cell-derived factor 1
EGF	Pro-epidermal growth factor
FLT3LG	Fms-related tyrosine kinase 3 ligand

GM-CSF	Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor
HGF	Hepatocyte growth factor
IFNG	Interferon gamma
IL1B	Interleukin-1 beta
IL2	Interleukin-2
IL4	Interleukin-4
IL6	Interleukin-6
IL7	Interleukin-7
IL10	Interleukin-10
IL13	Interleukin-13
IL15	Interleukin-15
IL17A	Interleukin-17A
IL17C	Interleukin-17C
IL17F	Interleukin-17F
IL18	Interleukin-18
IL27	Interleukin-27
IL33	Interleukin-33
LTA	Lymphotoxin-alpha
MMP1	Interstitial collagenase
MMP12	Macrophage metalloelastase
OLR1	Oxidized low-density lipoprotein receptor 1
OSM	Oncostatin-M
TGFA	Protransforming growth factor alpha
TNF-α	Tumor necrosis factor alpha
TNFSF10	Tumor necrosis factor ligand superfamily member 10

TNFSF12	Tumor necrosis factor ligand superfamily member 12
TSLP	Thymic stromal lymphopoietin
VEGFA	Vascular endothelial growth factor A.

Supplementary Table 2. Missing data of serum levels of immune-related soluble factors.

Soluble factors (pg/ml)	Individuals (n=433)
CSF1	0 (0%)
CSF3	1 (0.25%)
FLT3LG	0 (0%)
GM-CSF	2 (0.5%)
IFNG	0 (0%)
IL1B	0 (0%)
IL2	0 (0%)
IL-4	0 (0%)
IL6	1 (0.25%)
IL7	0 (0%)
IL10	0 (0%)
IL13	0 (0%)
IL15	0 (0%)
IL17A	1 (0.25%)
IL17C	0 (0%)
IL17F	0 (0%)
IL18	2 (0.5%)

IL27	0 (0%)
IL33	60 (14%)
LTA	0 (0%)
MMP1	13 (3.1%)
MMP12	0 (0%)
OLR1	0 (0%)
OSM	0 (0%)
TNF	0 (0%)
TNFSF10	0 (0%)
TNFSF12	0 (0%)
TSLP	32 (7.5%)
CCL2	3 (0.75%)
CCL3	0 (0%)
CCL4	0 (0%)
CCL7	0 (0%)
CCL8	0 (0%)
CCL13	0 (0%)
CCL11	0 (0%)
CCL19	0 (0%)
CXCL8	0 (0%)
CXCL9	2 (0.5%)
CXCL10	0 (0%)
CXCL11	4 (1%)
CXCL12	0 (0%)
EGF	4 (1%)

HGF	0 (0%)
TGFA	0 (0%)
VEGFA	0 (0%)

Values are expressed as the number of missing data (percentage of the total number of individuals in the study).

Supplementary Table 3. Levels of sNfL and sGFAP of MS group of patients and HC.

Soluble factors (pg/ml)	HCs (n=180)	NLGL (n=93)	NHGL (n=71)	NHGH (n=55)	NLGH (n=34)
sNfL	**5.7 (4.4-8.0)**	**6.5 (4.9-7.8)**	**16.9 (131-24.1) ɬ**** θ**** ¶******	**21.7 (15.2-43.6) ɬ**** θ**** ¶******	7.4 (6.1-8.8)
sNfL Z-score	**-0.4 [-1.2-0.4]**	**0.2 [-0.8-0.8]**	**2.3 [1.8-3.1] ɬ**** θ**** ¶******	**2.7 [2.2-3.3] ɬ**** θ**** ¶******	0.6 [-0.1-1.1]
sGFAP	**50.2 [62-109]**	**88.8 [65-109.5]**	100.7 [70.9-123.4]	**191.2 [155-285] ɬ**** θ**** ¶******	**181 [159-213] ɬ**** θ**** ¶******

Values are expressed as the median [25-75% IQR] in pg/ml. Significant comparisons are highlighted in bold. Abbreviations: HCs: healthy controls; IQR: interquartile range; NHGH: patients with high sNfL Z-scores and sGFAP values; NHGL: patients with high sNfL Z-scores and normal sGFAP values; NLGH patients with normal sNfL Z-scores and high GFAP levels; NLGL: patients with normal sNfL Z-scores and GFAP values. ɬ: difference with the HC group; θ: difference with the NLGH group; ¶: difference with the NLGL group; **** $p<0.0001$ according to Dunn's test. In all cases, significant p values in Dunn's test implied p values < 0.05 in the associated Kruskal–Wallis test.

Supplementary Table 4. Serum levels of serum soluble factors of MS group patients and HC.

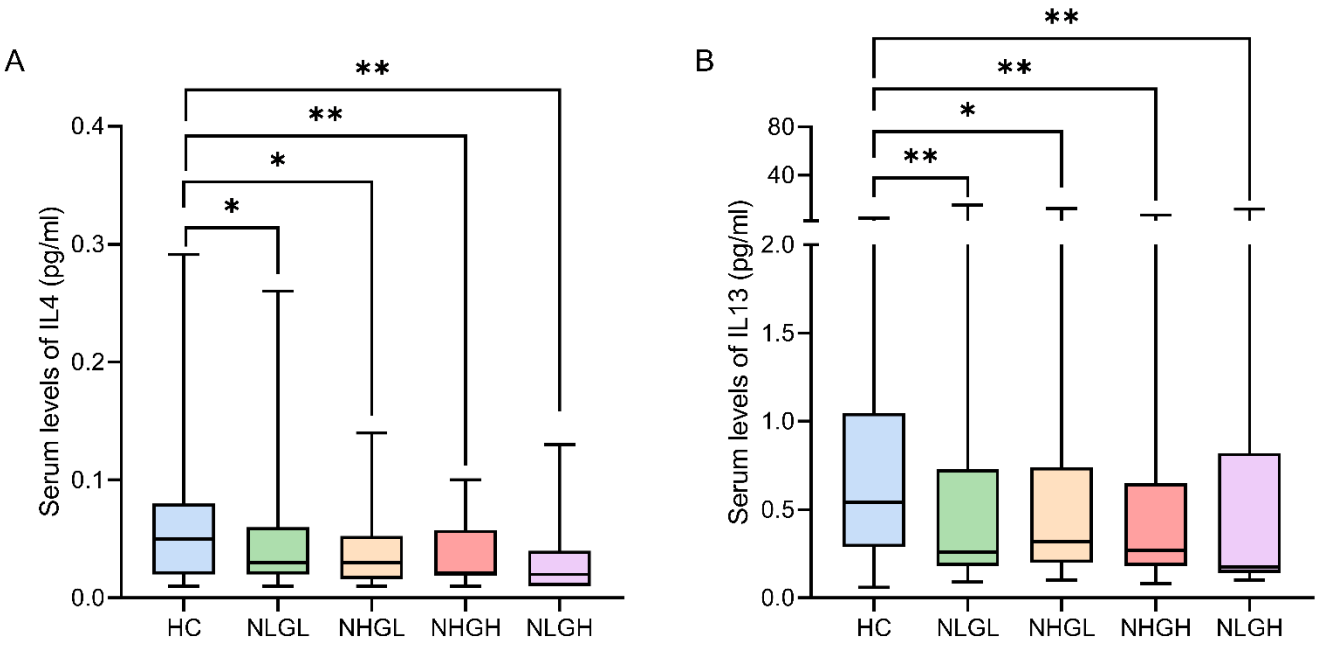
Soluble factors (pg/ml)	HCs (n=180)	NLGL (n=93)	NHGL (n=71)	NHGH (n=55)	NLGH (n=34)
		Factors associated with inflammation			
CSF1	137 [119-154]	129 [111-151]	131 [115-153]	132 [116-155]	125 [108-143]
CSF3	103 [80.8-126]	96.4 [75.5-144]	105 [78.7-127]	100 [85.4-147]	106 [75.8-144]
FLT3LG	**109 [93.4-130]**	99.4 [78.9-120]	99.5 [83.4-124]	102 [81.4-134	**86.6 [64.7-111] ł***
GM-CSF	**0.15 [0.1-0.2]**	**0.1[0.08-0.2] ł****	**0.1[0.07-0.15] ł*****	0.1 [0.08-0.2]	0.1 [0.06-0.4]
IFNG	0.2 [0.1-0.3]	0.2 [0.1-0.2]	0.2 [0.1-0.3]	0.2 [0.1-0.3]	0.2 [0.1-0.2]
IL1B	0.2 [0.01-0.6]	0.2 [0.1-0.4]	0.2 [0.1-0.5]	0.2 [0.1-0.3]	0.2 [0.1-0.4]
IL2	0.02 [0.01-0.04]	0.03 [0.02-0.05]	0.02 [0.01-0.04]	0.03 [0.02-0.04]	0.01 [0.02-0.03]
IL-4	**0.05 [0.02-0.08]**	**0.03 [0.02-0.06] ł***	**0.03 [0.01-0.05] ł***	**0.02 [0.01-0.06] ł****	**0.02 [0.01-0.04] ł****
IL6	2.2 [1.4-3.4]	2.4 [1.5-4.7]	1.8 [1.4-3]	2.2 [1.5-4.5]	1.9 [1.3-4]
IL7	5.5 [4-7.2]	5.5 [4.1-8]	5.5 [3.7-7.1]	4.8 [3.9-7.9]	5.7 [3.4-7.9]
IL10	7.7 [5.4-9.7]	7.4 [4.8-10.3]	8.1 [5.3-12]	8.3 [4.9-12.1]	5.8 [3.9-10.3]
IL13	**0.5 [0.3-1.1]**	**0.3 [0.2-0.7] ł****	**0.3 [0.2-0.7] ł***	**0.3 [0.2-0.7] ł****	**0.2 [0.1-0.8] ł*****
IL15	12.9 [10.7-15.1	12.7 [10.1-15.2]	12.9 [11.2-15.6]	12.4 [10.9-15.9]	12.2 [9.8-16.3]
IL17A	0.4 [0.2-0.7]	0.4[0.2-0.7]	0.5[0.2-0.9]	0.4 [0.2-0.8]	0.3[0.2-0.9]
IL17C	**19.8 [14.7-27.3]**	18.8 [11.9-29.7]	19.7 [13.6-26.3]	18.3 [14.2-27.7]	**15.6 [9.6-22.8] ł***

IL17F	0.9 [0.5-1.6]	0.9 [0.5-1.6]	1.1 [0.6-1.7]	0.9 [0.4-1.7]	0.8 [0.4-1.7]
IL18	279 [228-336]	270 [211-345]	268 [217-345]	261 [220-340]	241 [200-390]
IL27	6. [4.7-9.9]	5.8 [3.9-9.3]	5.7 [3.8-9.9]	5.4 [3.4-9.6]	6.3 [3.7-8]
IL33	0.1 [0.05-0.2]	0.1 [0.05-0.2]	0.1 [0.03-0.2]	0.1 [0.03-0.2]	0.1 [0.05-0.2]
LTA	9.4 [7.9-11.2]	8.4 [6.6-10.9]	7.9 [6.4-12.2]	8.3 [6.7-10.3]	8.3 [6.6-10.8]
MMP1	3142 [1982-5048]	2469 [1768-4181]	2677 [1775-4334]	2740 [1581-3583]	1972 [1690-3074]
MMP12	207 [153-270]	182 [139-254]	169 [140-218]	202 [134-257]	174 [137-229]
OLR1	437.9 [236.1-703.9]	386.9 [273.5-574.7]	467.6 [3068-732]	427.6 [271-607]	329.6 [208.4-546.3]
OSM	9.8 [6.3-19.3]	10.2 [6.9-16]	10.3 [6.9-15.9]	11.4 [6.8-14.5]	8.5 [5.8-12.4]
TNF-α	**19.5 [16.7-23.5]**	18.4 [15.1-23.2]	17.6 [14.3-2.8]	17.3 [13.6-22.7]	**15 [12.7-20.2] ł*** **
TNFSF10	483 [409-581]	440 [373-515]	430 [361-509]	417 [343-520]	417 [337-516]
TNFSF12	**843 [726-1015]**	812 [671-960]	805 [672-951]	790 [646-945]	**734 [531-855] ł*** **
TSLP	0.2 [0.07-0.4]	0.1 [0.05-0.26]	0.1 [0.05-0.2]	0.09 [0.05-0.2]	0.1 [0.04-0.2]
		Chemokines			
CCL2	**595 [477-769] θ**** **	**532 [397-754] θ**** **	**554 [405-714] θ***	**550 [383-716] θ***	**397 [209-536]**
CCL3	**9.4 [6.9-22.2]**	8.3 [5.8-13.1]	8.5 [5.9-16.1]	7.6 [5.8-10.3]	**6.2 [5.4-9.7] ł****
CCL4	**135 [95.3-183]**	**128 [95-182]θ***	128 [93.8-170]	119 [94.4-172]	**99 [70.2-131] ł****
CCL7	**1.1 [0.8-1.8]**	0.9 [0.7-1.4]	0.69 [0.6-1.3]	0.9 [0.6-1.4]	**0.7 [0.5-1.1] ł****
CCL8	61.4 [43.2-81.5]	58.8 [41.5-85.1]	60.7 [43.44-81.7]	63.2 [48.1-82.8]	50.9 [32.4-75.6]

CCL11	**154 [109-194]**	123 [102-172]	125 [95.2-171]	116 [100-171]	**113 [78.2-151] ɬ***
CCL13	**164 [117-223]**	151 [101-235]	141 [106-209]	149 [92.1-211]	**81.8 [120-176] ɬ***
CCL19	96.4 [78.7-138.6]	90.9 [70.1-138]	89.9 [68.4-151]	99.9 [70.6-153]	90.3 [69.7-121]
CXCL8	**21.2 [14.2-112]**	17.1 [12-28.9]	21.1 [13.1-59.7]	15.9 [13.1-24.6]	**10.1 [12.8-23.7] ɬ***
CXCL9	46.1 [35.7-73.6]	42.6 [33.7-65.1]	41.3 [29.3-59]	40.4 [28.8-71.3]	40.8 [32.3-65.1]
CXCL10	85.7 [63.7-125]	83.1 [59.5-120]	78.4 [59.3-117]	73.9 [58.6-118]	67.2 [46.3-127]
CXCL11	64.3 [47.3-88.8]	63.5 [43.1-94.3]	55.9 [37.9-78.9]	56.3 [37.3-75.6]	49.5 [37.2-103]
CXCL12	197.6 [161.9-233.2]	193.5 [158.9-236.5]	195.5 [169-227.3]	209 [155-245]	192.4 [164.6-219.8]
		Factors involved in repair processes			
EGF	**604 [359-750]**	**383[209-614] ɬ****	**512 [304-727]**	**343 [165-539] ɬ**** ϒ***	**311 [127-182] ɬ**** ϒ****
HGF	589 [451-817]	557 [445-761]	553 [426-779]	584 [483-774]	510 [410-680]
TGFA	22.6 [14.8-31.7]	24.3 [17.5-33.8]	24.5 [18-33.2]	26.1 [20-37.9]	21.8 [14.4-35.5]
VEGFA	**704 [454-981]**	612 [467-938]	570 [410-812]	575 [387-740]	**460 [345-778] ɬ***

Values are expressed as the median [25-75% IQR] in pg/ml. Significant comparisons are highlighted in bold. Abbreviations: HCs: healthy controls; IQR: interquartile range; NHGH: patients with high sNfL Z-scores and sGFAP values; NHGL: patients with high sNfL Z-scores and normal sGFAP values; NLGH patients with normal sNfL Z-scores and high GFAP levels; NLGL: patients with normal sNfL Z-scores and GFAP values. ɬ: difference with the HC group; θ: difference with the NLGH group; ϒ: difference with the NHGL group; * $p<0.05$, ** $p<0.01$, *** $p<0.001$, and **** $p<0.0001$ according to

Dunn's test. In all cases, significant p values in Dunn's test implied p values < 0.05 in the associated Kruskal–Wallis test.



Supplementary Figure 1. Serum levels (pg/mL) of Th2 cytokines in PwMS and HCs: IL13 (A) and IL4 (B). Abbreviations: HCs: Healthy controls; IL4: Interleukin-4; IL13: Interleukin-13 NHGL: Patients with high sNfL Z-scores and normal sGFAP values; NLGH: Patients with low sNfL Z-scores and high GFAP levels; NLGL: Patients with low sNfL Z-scores and GFAP values; PwMS: patients with multiple sclerosis; * $q<0.05$; and ** $q<0.01$ obtained from Dunn's post-hoc test and adjusted using the false discovery rate method.

5.DISCUSIÓN

A lo largo de las últimas décadas, se han realizado grandes avances en la comprensión de la fisiopatología de la EM, pero aún no existen evidencias solidas sobre los mecanismos patológicos asociados a su progresión y a la heterogeneidad clínica observada entre los pacientes [11,12,116]. Por ello, resulta fundamental identificar biomarcadores fiables que permitan estratificar a los pacientes de manera precisa para estudiar los mecanismos inmunológicos relacionados con la progresión y la respuesta a tratamiento.

Entre los biomarcadores emergentes en el ámbito de las enfermedades neurológicas, los sNfL y la sGFAP han mostrado un gran potencial en la monitorización de la enfermedad. Estos biomarcadores ofrecen la posibilidad de evaluar procesos patológicos en el SNC de manera no invasiva y precisa, a partir de muestras de sangre periférica [334,368]. Los sNfL son fragmentos proteicos del citoesqueleto axonal, cuya presencia en el suero refleja daño axonal relacionada con inflamación aguda [357,361]. La sGFAP es un marcador de la activación astrocítica, un proceso clave en la neurodegeneración [368,370]. A pesar de su relevancia, el uso clínico de estos biomarcadores presentaba importantes desafíos, particularmente debido a la ausencia de valores de referencia bien establecidos en cohortes de CS y a la influencia de factores demográficos como la edad [369] y el IMC [366,383].

La heterogeneidad clínica de la EM sugiere que su progresión no está impulsada por un único mecanismo patológico, sino por la interacción de múltiples procesos inflamatorios y degenerativos, tanto en la periferia como en el SNC [11, 213]. En este contexto, el uso de sNfL y sGFAP podría permitir estudiar estos mecanismos y mejorar la estratificación de los pacientes [370,372]. Su combinación al inicio de la enfermedad parece distinguir a aquellos con un mayor riesgo de progresión mediada por actividad inflamatoria (RAW o PIRA inflamatoria) de los que presentan progresión independiente de ella (PIRA no inflamatorio), así como anticipar su respuesta a los TMEs [370,372].

El uso de estos biomarcadores para la estratificación de los pacientes, así como el estudio de CS, nos han permitido identificar una serie de factores celulares y solubles que se asocian con distintos cursos de la enfermedad.

5.1. ESTABLECIMIENTO DE VALORES SÉRICOS NORMALES DE CADENAS LIGERAS DE NEUROFILAMENTOS Y PROTEÍNA ÁCIDA FIBRILAR GLIAL CONSIDERANDO LOS EFECTOS DE LA EDAD Y OTROS FACTORES DEMOGRÁFICOS EN ADULTOS SANOS.

En los últimos años, los biomarcadores sanguíneos, como el sNfL y el sGFAP, han emergido como herramientas prometedoras para la exploración de la fisiopatología de diversas enfermedades neurológicas como la EM, la enfermedad de Alzheimer, el Parkinson y otras patologías que afectan al SNC [358,365,371,373-376,384-392]. Sin embargo, su aplicabilidad seguía siendo limitada, principalmente por la falta de estandarización en los valores de referencia. Los valores considerados como patológicos en la mayoría de estudios se establecían en función de las poblaciones de pacientes específicas o mediante un único umbral aplicado a toda la cohorte sin tener en cuenta variables demográficas que pueden influir en sus niveles [358,366,369,370,384,393]. Por ello, era fundamental establecer los valores normales para estas variables en una cohorte de individuos sanos teniendo en cuenta factores demográficos.

La edad es el principal factor de confusión al analizar los niveles de sNfL en individuos sanos [394,395]. Este fenómeno refleja el daño axonal fisiológico acumulativo asociado al proceso natural de envejecimiento del SNC, tal y como se demuestra en estudios longitudinales realizados en individuos sanos sin evidencia clínica de enfermedad neurodegenerativa [396-399]. Sin embargo, estos estudios no habían alcanzado un consenso común respecto a los valores de referencia. Esto podría deberse a la presencia de algunas patologías leves en grupos control, a técnicas de sensibilidad intermedia o al uso de distintas matrices biológicas. En nuestro estudio, los sNfL se cuantificaron mediante SIMOA, y para evitar la variabilidad asociada a distintos tipos de matriz se usaron siempre muestras de suero. Asimismo, para evitar en lo posible la heterogeneidad debida a alguna patología, todos los CS fueron sometidos a una entrevista con un neurólogo para descartar posibles enfermedades leves.

En primer lugar, se observó una correlación positiva entre los sNfL y la edad. Al dividir los pacientes en diferentes grupos de edad, determinamos que un valor de corte de 10 pg/mL, utilizado con frecuencia para diferenciar los valores bajos y altos de sNfL en pacientes de EM [366,373,374], solo sería útil para personas de menos de 45 años, ya que, a partir de esta edad, el punto de corte más adecuado aumenta hasta los 15 pg/ml. La influencia de la edad no sólo se observó en individuos mayores de 45 años. Diversos estudios han descrito niveles de sNfL más bajos en individuos jóvenes, especialmente en menores de 25 años [366,397,400,401]. En concordancia con estos hallazgos, al analizar los CS menores de 25 años observamos niveles de sNfL inferiores en comparación con el grupo de 26–45 años. Estos datos confirmaron que el punto de corte de 10 pg/ml podría estar infraestimando la presencia de daño axonal en individuos muy jóvenes y muestra la necesidad de tener herramientas que ajusten los valores de sNfL con respecto a la edad en un rango etario amplio. Para ello se han desarrollado herramientas como el Z-score con el objetivo de ajustar los niveles de sNfL en función de variables demográficas y antropométricas, como la edad y el IMC, permitiendo una interpretación más precisa y personalizada del biomarcador [366,377,402].

La inclusión del IMC en estos modelos de ajuste se justifica por la correlación negativa, generalmente modesta, descrita entre el IMC y las concentraciones de sNfL. Diversos estudios han reportado una correlación negativa entre el IMC y las concentraciones de sNfL, donde individuos con un IMC elevado tienden a presentar niveles más bajos de este biomarcador [367,403,404]. Esta relación puede explicarse por un efecto de dilución metabólica, ya que un mayor volumen corporal podría reducir la concentración detectada en sangre, sin implicar necesariamente un menor grado de daño neuroaxonal [403]. En el contexto clínico, la influencia del IMC podría llevar a subestimaciones de los niveles de sNfL en individuos con IMC alto, lo que podría ocultar signos de daño axonal significativo. Por otro lado, valores elevados de sNfL en personas con IMC bajo podrían interpretarse de manera exagerada si no se ajustan correctamente.

El *Z-score* representa por tanto una herramienta importante para medir el daño axonal en la EM, pero para su aplicación en la clínica era necesario establecer valores de corte adecuados con respecto a los CS. Los estudios publicados al respecto mostraban cierta heterogeneidad, proponiendo valores de corte

entre 1 y 2 sin un consenso claramente establecido [366,405-407]. Nuestros resultados mostraron que un *Z-score* de 1,5 discrimina de manera robusta entre CS y aquellos individuos con niveles elevados de sNfL. Este umbral coincide con estudios en cohortes de EM donde valores superiores a 1,5 se han asociado con mayor actividad de la enfermedad y progresión de la discapacidad [367,369,407].

Finalmente, los niveles de sNfL no mostraron variaciones en función del sexo. Los resultados previamente publicados han sido contradictorios: mientras algunos estudios reportan niveles ligeramente más altos en hombres en comparación con mujeres [408,409], otros no encuentran diferencias significativas [410]. La discrepancia en los resultados podría deberse a que los estudios se han realizado en cohortes de pacientes y no de individuos sanos, como en nuestro caso, por lo que las variaciones de los niveles podrían ser originados por otras variables que no se están teniendo en cuenta en dichos estudios.

En conclusión, nuestros resultados confirman que la edad y, en menor medida, el IMC, son factores críticos en la interpretación de los niveles de sNfL en CS. Hemos establecido valores de referencia específicos por edad, con puntos de corte de 10 pg/mL en menores de 45 años y 15 pg/mL en mayores de esta edad, proporcionando una base sólida para el uso clínico de este biomarcador. Además, demostramos que el *Z-score* es una herramienta valiosa para corregir estos efectos y mejorar la precisión diagnóstica, estableciendo 1,5 como un valor óptimo para discriminar entre valores normales y patológicos. Estos hallazgos ofrecen una base para estandarizar el uso de sNfL en la monitorización de enfermedades neurodegenerativas y neuroinflamatorias como la EM.

Continuando con este enfoque, decidimos evaluar también los valores normales de sGFAP. La sGFAP también ha surgido como un biomarcador clave para evaluar astrogliosis en múltiples enfermedades neurológicas [380-382,411-420].

El envejecimiento también ha sido relacionado con un aumento significativo del sGFAP, tanto en individuos sanos como en pacientes con EM [347,368,382,418,421,422]. No obstante, como ocurría con los sNfL, el sGFAP tampoco presentaba unos valores normales estandarizados y la influencia de ciertos factores demográficos no están del todo establecidos. En nuestro estudio, al dividir a los pacientes en los mismos grupos de edad, nuestros resultados muestran que los niveles séricos de sGFAP

están significativamente influenciados por la edad. Los valores de referencia para este biomarcador muestran una distribución bimodal. En individuos menores de 55 años, los niveles de sGFAP se mantienen relativamente estables, mientras que en mayores de 55 años se produce un aumento significativo, lo que podría estar asociado a fenómenos de senescencia inmunológica y procesos degenerativos relacionados con el envejecimiento cerebral [307,422]. Con base en estos resultados, establecimos los valores de corte específicos de 140 pg/mL para individuos menores de 55 años y 280 pg/mL para los mayores de esta edad. Esta estratificación resulta esencial para evitar la sobreestimación de valores patológicos en adultos mayores y para mejorar la precisión diagnóstica en enfermedades neurológicas. Al igual que sucede con los sNfL, recientemente se ha creado una herramienta para calcular el *Z-score* para el sGFAP [371]. Dado el escaso tiempo transcurrido desde su publicación, aún no se ha podido evaluar su utilidad clínica. No obstante, el uso del *Z-score* para la sGFAP podría revestir menor utilidad que para los sNfL, dada su clara distribución bimodal.

Respecto a la relación entre los valores de sGFAP y el IMC, estudios previos reportaron una débil correlación negativa entre ambas variables, tanto en pacientes [421], como en controles [368]. Sin embargo, dicha correlación no pudo observarse en pacientes con EM cuando se estudiaron los valores de sGFAP en LCR. Estos datos muestran que, de existir dicha correlación, el efecto del IMC sobre los valores de la sGFAP sería muy discreto. En nuestro estudio, el IMC no mostró una correlación significativa con los niveles de sGFAP, dado que nuestra n fue similar a la de los otros estudios que exploraron esta correlación, nuestros datos muestran que de existir la misma, la correlación es baja, tal y como se demostró en muestras de LCR, y simplifican la implementación de sGFAP como biomarcador clínico, ya que, según lo observado, los niveles de sGFAP no requieren correcciones complejas para variables antropométricas.

Respecto al sexo, resultados previos muestran valores contradictorios al explorar la asociación de la sGFAP con el sexo. Algunos trabajos no muestran diferencias asociadas con esta variable [421], mientras que otros describen que las mujeres tienden a presentar niveles ligeramente más altos de sGFAP en comparación con los hombres, especialmente en edades avanzadas [368,382]. En nuestro estudio no observamos diferencias significativas. Esto podría deberse al bajo número de individuos

ancianos incluidos en el mismo. Las diferencias debidas al sexo en individuos mayores podrían estar relacionadas con la influencia de factores hormonales, como los estrógenos [423, 424], que modulan la respuesta astrocitaria [425], o a una el efecto confusor de la edad. Nuestros resultados sugieren que en el espectro de edad en el que se estudian habitualmente los pacientes con EM, el uso de herramientas que corrijan los valores con respecto al sexo podrían no ser necesarios en práctica clínica.

Nuestro estudio presenta algunas limitaciones que deben considerarse al interpretar los resultados. En primer lugar, el número de controles incluidos en ciertos grupos de edad fue relativamente bajo, lo que limita la potencia estadística de nuestros hallazgos. Si bien estos datos son valiosos, se requiere su validación en cohortes más grandes y diversas para confirmar su aplicabilidad y robustez. Además, la población de estudio puede no ser completamente representativa de la población general en términos de edad, sexo e IMC. Otras fuentes potenciales de confusión no controladas incluyen factores relacionados con el estilo de vida, como la dieta, la actividad física y las predisposiciones genéticas, que podrían influir en los niveles de biomarcadores séricos [366,378]. Aunque nos aseguramos de excluir participantes con hábitos tóxicos para minimizar estas posibles interferencias, como el consumo de drogas o alcohol [426], futuras validaciones deberían considerar de manera más sistemática el impacto de estos y otros factores sobre los niveles de los biomarcadores séricos estudiados. Finalmente, todos los individuos incluidos en nuestro estudio eran caucásicos residentes en España, lo que limita la generalización de los resultados a otras etnias y localizaciones geográficas.

En resumen, este estudio confirma que la edad es el principal determinante de los niveles de sNfL en individuos sanos, mientras que el IMC ejerce una influencia menor pero detectable. Se definen valores de corte de sNfL ajustados por edad, y se establece que el *Z-score* constituye una herramienta útil para identificar con mayor precisión los valores normales de este biomarcador, proponiéndose un umbral óptimo para su interpretación. Por otro lado, se examinan los valores normales de sGFAP, identificando su asociación con la edad y caracterizando su rango de referencia en población sana. La definición de valores normales para sNfL y sGFAP, considerando la edad y otros factores demográficos, contribuye a mejorar la aplicabilidad de estos biomarcadores, facilitando la evaluación de los procesos fisiopatológicos asociados a la variabilidad de enfermedades como la EM [369].

5.2. IDENTIFICACIÓN DE FACTORES CELULARES Y MOLECULARES ASOCIADOS A LA INFLAMACIÓN Y LA NEURODEGENERACIÓN EN LA ESCLEROSIS MÚLTIPLE.

Los mecanismos inmunológicos implicados en la fisiopatología de la EM aún no se comprenden por completo. Las hipótesis actuales derivan, en gran parte, de observaciones realizadas en modelos experimentales de la enfermedad [213,217,235,250] o en muestras de pacientes sin comparación con CS [239,242,247,248,270,273]. En este contexto, el análisis de los perfiles de células inmunitarias en sangre periférica de pacientes con EM frente a CS permite identificar características distintivas de la enfermedad.

En nuestro estudio, observamos que al comparar los pacientes de EM con CS, estos presentan porcentajes elevados de células T efectoras, células B de memoria, células B presentadoras de antígenos, células T $CD4^+$ y $CD8^+$ productoras de citoquinas pro-inflamatorias como TNF-α, IL-17 e IFN-γ y células B $CD19^+$ productoras de TNF-α. Estos resultados reflejan un estado pro-inflamatorio mediado por células T efectoras y células B, y son consistentes con estudios previos que han reportando una expansión de células B con capacidad de presentación antigénica, así como de células T efectoras productoras de citoquinas pro-inflamatorias en la sangre periférica de pacientes con EM [233,257,427].

Aunque estudios previos han observado subpoblaciones Th1 y Th17 en LCR e infiltración de células B de memoria en el tejido cerebral de pacientes con EM [224-226,428], nuestro análisis muestra que estas alteraciones también se reflejan en sangre periférica, lo que confirma la interconexión inmunológica entre el compartimento periférico y el SNC.

Estos resultados muestran la simultaneidad de estas subpoblaciones en sangre periférica como características comunes de los pacientes con EM en estadios basales, independientemente del tipo de evolución que acaben desarrollando.

A pesar de los hallazgos observados en la cohorte de pacientes global, se ha demostrado que el curso de la EM es altamente heterogéneo [370], lo que sugiere la existencia de mecanismos patológicos diferenciales que influyen en la gravedad, la progresión y la adquisición de discapacidad a largo plazo

[9,222]. Recientemente, se ha observado que la combinación de sNfL y sGFAP permite estratificar de una forma más precisa a los pacientes de la EM, asociándose a los distintos mecanismos de progresión de la enfermedad [12,127,370,429]. Los procesos biológicos responsables de las diferentes formas de la evolución de la enfermedad aún no están completamente establecidos.

Para explorar esto, analizamos los perfiles inmunológicos celulares asociados a los distintos grupos de pacientes estratificados según sus niveles séricos de sNfL y sGFAP, empleando los puntos de corte establecidos a partir de la cohorte de 116 CS utilizada en el estudio incluido en el apartado 5.1. Al clasificar a los pacientes según los niveles de ambos biomarcadores, observamos patrones celulares específicos de cada grupo.

El grupo NH mostró porcentajes significativamente más bajos de células Treg en comparación con los CS y el grupo NLGL en sangre periférica. Estos hallazgos son relevantes dado que las Tregs desempeñan un papel esencial en la tolerancia inmunológica al suprimir linfocitos T autoreactivos [261,430]. Varios estudios han señalado alteraciones en el número total de estas células [262,431], mientras que otros han observado alteraciones funcionales en las células Tregs [9,263-265,432] o en subtipos de células reguladoras asociadas a diversos factores de transcripción [433], en lugar de una reducción en su número total. Otros estudios, sin embargo, han sugerido que no existen diferencias significativas en estas células en sange periférica [434], e incluso se ha reportado la conversión de Tregs en células T activadas en otras patologías [435]. La heterogeneidad de estos resultados podría explicarse por el análisis de pacientes con EM no clasificados, ya que nuestros resultados muestran que la reducción de Tregs en sangre es específica del grupo NH, por lo que esta población celular podría ser una buena diana terapéutica para este grupo de pacientes. Igualmente, la disminución de estas células observada en los pacientes más inflamatorios podría facilitar el escape del control inmunológico de los linfocitos T autorreactivos en sangre periférica. Además, también observamos esta disminución en LCR al compararlo con el grupo NLGL, lo que sugiere que la disminución de estas células no solo influye en la inflamación periférica, sino que también podría desempeñar un papel directo en la inflamación del SNC.

En este grupo de pacientes también se observó una reducción de otras poblaciones celulares con funciones inmunorreguladoras. En primer lugar, se detectó una disminución de las células B transicionales, un subconjunto con propiedades reguladoras implicado en el mantenimiento de la tolerancia inmunológica [436]. Aunque la información sobre estas células es aún limitada, estudios recientes han destacado su relevancia funcional, refiriéndose a ellas como células B reguladoras. Este subgrupo, caracterizado por el fenotipo $CD19^{+}$ $CD24^{high}$ $CD38^{high}$, incluye principalmente células productoras de IL-10, y se ha descrito que su número se encuentra disminuido [437] o que presentan alteraciones funcionales [438] en pacientes con EM. Asimismo, se ha documentado un retraso en su maduración, lo que podría reflejar una pérdida de su capacidad inmunorreguladora y comprometer su papel en el mantenimiento del equilibrio inmunitario en la enfermedad [439]. De forma paralela, también se identificó una disminución de monocitos que expresan PD-L1, una molécula esencial para inhibir la activación de las células T y modular la respuesta inflamatoria [440]. Aunque los estudios sobre la expresión de PD-L1 en monocitos en el contexto de la EM son aún escasos, la vía PD-L1 ha sido ampliamente investigada en otras enfermedades autoinmunes, donde desempeña un papel central en la prevención de la autoinmunidad patológica. En patologías como el lupus eritematoso sistémico y la artritis reumatoide, se ha descrito una reducción de PD-L1 en monocitos circulantes, asociada a una mayor activación de linfocitos T autorreactivos y a la persistencia de la inflamación. De manera análoga, una disminución similar de monocitos $PD\text{-}L1^{+}$ en la EM podría contribuir a una regulación deficiente de la inflamación y, en consecuencia, a la perpetuación del daño tisular [440,441].

En conjunto, la reducción de las células Tregs, las B transicionales y los monocitos $PD\text{-}L1^{+}$ observada en nuestro estudio sugiere una pérdida general de los mecanismos inmunorreguladores, que podría favorecer la desregulación de la respuesta inmune y la exacerbación de la autoinmunidad. Este desequilibrio contribuiría a una inflamación, lo que refuerza su posible implicación en el RAW y PIRA inflamatorio observado en estos pacientes [370].

Asimismo, el grupo NH presenta de forma exclusiva un aumento en los porcentajes de células T $CD4^{+}$ y $CD8^{+}$ productoras de GM-CSF, una citoquina clave en los procesos inflamatorios del SNC. El GM-CSF activa células inmunitarias innatas, como la microglía, promoviendo un entorno inflamatorio que

potencia la desmielinización y contribuye a la progresión de la enfermedad [259]. El incremento de las células productoras de GM-CSF se ha observado tanto en sangre periférica [442] como en el LCR de pacientes con EM [443] y se asocia con una mayor actividad de la enfermedad. De hecho, en modelos murinos se ha demostrado que el GM-CSF es necesario para inducir la enfermedad ya que facilita la infiltración de monocitos pro-inflamatorios desde la médula ósea hacia el SNC [260].

Finalmente, en los pacientes NH también se ha definido un claro aumento en los porcentajes de células NK $CD56^{dim}$. Estas células se caracterizan por una elevada producción de perforinas y granzimas, moléculas esenciales para su actividad citotóxica [291]. Se han publicado pocos datos sobre este subconjunto de células inmunitarias en la EM, aunque se ha observado su posible papel en la desmielinización cortical perivascular en biopsias de pacientes post mortem con EM [297] y en modelos experimentales de la enfermedad, donde se ha correlacionado su infiltración con un mayor número de lesiones corticales [296]. La heterogeneidad funcional de las células NK ha sido mejor definida gracias a tecnologías avanzadas como la transcriptómica de célula única, que ha permitido ampliar nuestra comprensión más allá de la clásica dicotomía $CD56^{dim}$/$CD56^{bright}$. Estos avances han identificado múltiples subconjuntos funcionales de células NK, caracterizados principalmente por la expresión de receptores de membrana específicos, como los receptores KIR, NKG2A, y CD122 [291,444,445]. En esta línea, observamos que la mayoría de las células $CD56^{dim}$ aumentadas en el grupo NH expresaban CD122, el receptor de IL-2 de afinidad intermedia [291]. Este hallazgo podría sugerir que los bajos porcentajes de Treg que expresan el receptor de alta afinidad para IL-2 (CD25) observados en estos pacientes, podrían facilitar la mayor disponibilidad de IL-2, suficiente para favorecer la proliferación y la actividad citotóxica de las células NK $CD56^{dim}$. De hecho, esta misma hipótesis se ha corroborado en células NK $CD56^{bright}$ donde al bloquear el receptor CD25 en células T, aumentaba la disponibilidad de IL-2, favoreciendo la captación y activación de estas células NK [446]. Estos hallazgos sugieren que las células NK $CD56^{dim}$ podrían desempeñar un papel clave en la EM altamente inflamatoria y, en conjunto con otras células efectoras, contribuir a la aparición de la progresión mediada por RAW y por PIRA inflamatorio asociado a este grupo [370,372].

Nuestros datos también revelan que, dentro del grupo NH la estratificación basada en los niveles séricos de sGFAP (NHGL y NHGH) no permitió identificar diferencias significativas en las subpoblaciones inmunes circulantes analizadas mediante citometría de flujo. Esta ausencia de diferencias sugiere que, al menos en este contexto, sGFAP no refleja variabilidad en la inmunidad periférica, y podría estar más relacionado con procesos asociados la activación de astrocitos reactivos o con fenómenos intrínsecos del SNC [370]. Dada la falta de diferencias en este contexto agrupamos a los pacientes NHGL y NHGH en este estudio.

En conjunto, estos resultados en el grupo NH respaldan la existencia de un fenotipo caracterizado por una mayor actividad inflamatoria y una menor regulación de esta, lo que podría tener implicaciones relevantes en el RAW y PIRA inflamatorio observado en estos pacientes [370,372].

Al explorar el fenotipo celular del grupo NLGL, no observamos la disminución de los fenotipos reguladores observada en pacientes NH. De hecho, los niveles de estos subtipos celulares presentaban valores similares a los de CS siendo mayores que el del grupo NH en sangre y LCR. Por el contrario, los pacientes NLGL exhibieron porcentajes elevados de células NK $CD56^{dim}$ que expresan NKG2A, importante en la regulación de la respuesta inmunitaria. NKG2A es un receptor inhibitorio que forma un complejo con CD94 y se une al HLA-E, cuya expresión puede ser inducida en situaciones de inflamación crónica o daño tisular [290,291]. En el contexto de la EM, la interacción NKG2A/HLA-E puede actuar como un mecanismo inhibitorio que modula la citotoxicidad de las células NK y limita su actividad destructiva, contribuyendo a un mejor control de la inflamación en el SNC. Esta función resulta especialmente relevante en la EM, donde un desequilibrio en la activación de las células NK puede exacerbar la inflamación y el daño axonal. En efecto, estudios previos han demostrado que la terapia con TMEs, como el IFN-β, incrementa la expresión de NKG2A en las células NK, lo cual se correlaciona con una mejoría clínica en los pacientes tratados [447].

Estos hallazgos sugieren que el aumento de células $CD56^{dim}$ $NKG2A^{+}$ observado en el grupo NLGL y los valores similares a CS de células reguladoras, podría reflejar un entorno inmunorregulado, favoreciendo un curso menos agresivo de la enfermedad al limitar la citotoxicidad exacerbada y contribuir al mantenimiento de la homeostasis del SNC. Este equilibrio podría explicar el curso menos

grave de la enfermedad observado en estos individuos, así como su óptima respuesta a los TMEs actuales que frenan la actividad pro-inflamatoria observada en todos los grupos de EM.

En el grupo NLGH, no se identificaron alteraciones inmunológicas periféricas distintivas, lo que sugiere que la progresión de la enfermedad en estos pacientes no estaría impulsada por mecanismos inmunes sistémicos. La elevación de sGFAP, en ausencia de cambios en sNfL, apunta a una inflamación compartimentalizada en el SNC, probablemente mediada por células gliales reactivas y residentes, y a un daño neuroaxonal secundario a mecanismos intrínsecos, más que a una activación del sistema inmune periférico, lo que podría explicar su asociación con PIRA no inflamatorio [347,371].

En resumen, nuestros resultados destacan la relevancia de las células T efectoras, las células B de memoria y las células T y B productoras de citoquinas a nivel periférico en la fisiopatología de la EM. Si bien los hallazgos más destacados del trabajo revelan la existencia de mecanismos diferenciales entre los fenotipos de la EM, definidos según los niveles de sGFAP y sNfL. En el grupo NH, la marcada reducción de Treg junto con el aumento de células NK $CD56^{dim}$ activadas y linfocitos T productores de GM-CSF sugiere una respuesta inflamatoria periférica más diversa, que podría impulsar la progresión mediada por RAW y PIRA inflamatorio. Por el contrario, los pacientes NLGL muestran un perfil inmunológico más equilibrado, caracterizado por una mayor proporción de células reguladoras que el grupo NH y un incremento de células NK que expresan NKG2A, un receptor inhibitorio clave en el control de la respuesta inmune. Este equilibrio podría contribuir a una menor actividad inflamatoria y a un curso clínico más estable. Finalmente, en el grupo NLGH, la ausencia de alteraciones inmunológicas periféricas y la elevación de sGFAP apuntan a una inflamación compartimentalizada en el SNC, mediada principalmente por células gliales reactivas y procesos locales, más que por una activación inmune sistémica. Este patrón podría explicar su asociación con PIRA no inflamatorio [370,372].

Finalmente, este estudio presenta varias limitaciones que deben tenerse en cuenta a la hora de interpretar los hallazgos. En primer lugar, aunque se recogieron muestras de LCR en la mayoría de los pacientes, solo fue posible realizar análisis mediante citometría de flujo en aquellos que tenían una punción lumbar programada y firmaron el consentimiento informado específico. En los casos en los que la muestra se obtuvo en el contexto de una urgencia, no siempre fue factible realizar el análisis en fresco, lo que

impidió estudiar adecuadamente una parte importante del LCR disponible. En segundo lugar, el número de pacientes incluidos en el grupo NLGH fue relativamente reducido en comparación con el resto, lo que pudo limitar nuestra capacidad para detectar diferencias significativas dentro de este subgrupo. Para el estudio no se realizó una selección específica de pacientes, sino que se reclutaron todos los posibles durante los 3 años de reclutamiento. La baja representación de pacientes con niveles altos de sGFAP en ausencia de actividad inflamatoria podría haber enmascarado patrones relevantes en el análisis celular del LCR y de sangre periférica en este grupo. Dado el interés creciente por la estratificación temprana de pacientes con EM, esta limitación representa una oportunidad clara para estudios futuros. Por último, es importante señalar que los resultados obtenidos no han sido validados en cohortes independientes. Aunque los hallazgos ofrecen una visión novedosa sobre los mecanismos inmunológicos en fases tempranas de la EM, su generalización a otras poblaciones requiere replicación en estudios multicéntricos, con mayor número de pacientes.

A pesar de las limitaciones del estudio, nuestros hallazgos destacan que la estratificación basada en biomarcadores como sNfL y sGFAP podría ser una herramienta clave para identificar los mecanismos inmunológicos presentes al momento del diagnóstico de EM, contribuyendo a comprender la heterogeneidad biológica y clínica de la enfermedad

5.3. NUEVOS FACTORES SOLUBLES EN SERUM QUE PREDICEN EL EMPEORAMIENTO DE LA DISCAPACIDAD INFLAMATORIA Y NO INFLAMATORIA EN LA ESCLEROSIS MÚLTIPLE

La heterogeneidad inmunológica observada en las células periféricas en los grupos de pacientes divididos según sus niveles de sGFAP y sNfL plantea la necesidad de investigar otros niveles de regulación inmunológica, como podrían ser factores solubles que contribuyen a procesos clave como la activación de células inmunitarias, la permeabilidad de la BHE, el daño y la reparación tisular [283,288,448,449].

Los factores solubles relacionados con la respuesta inmune se han estudiado principalmente en el LCR, dado que los mecanismos efectores en la EM están en gran medida confinados al SNC [450-452]. Sin embargo, puesto que la inflamación en la EM parece originarse inicialmente fuera del SNC [6,213,285], explorar la contribución de factores solubles séricos resulta esencial para mejorar nuestra comprensión de los diversos mecanismos patológicos que impulsan la enfermedad. Si bien diversos factores solubles han sido asociados con la EM [213,239,240,283,288,452], la visión global de su papel sigue siendo limitada, y aún no existen evidencias sólidas que expliquen su relación con la heterogeneidad biológica de la enfermedad.

Los avances recientes en tecnologías proteómicas de alta sensibilidad están creando nuevas oportunidades para investigar el patrón inmunológico en los diferentes fenotipos de la EM [453]. En este estudio, aplicando la misma clasificación de pacientes según sus niveles de biomarcadores séricos, pretendíamos profundizar en el análisis de factores solubles en suero y explorar su posible relación con los perfiles inmunológicos observados.

A nivel global, no se observó un aumento de las citoquinas liberadas por linfocitos T y B, como podríamos esperar por el aumento de células T y B productoras de TNF-α, IFN-γ o IL-17 observada en sangre periférica, o por el incremento de citoquinas Th1 o Th17, habitualmente vinculadas a respuestas pro-inflamatorias en la enfermedad [234,238,240,256,454]. Esta contradicción podría deberse a que, como se ha postulado anteriormente [235-238], estas células requieran señales adicionales de

reactivación para secretar cantidades detectables de citoquinas en suero, tal como podría indicar la elevación de estas moléculas en el LCR [450,455]. Sin embargo, los pacientes presentaron valores más bajos de IL-4 e IL-13 en comparación con los CS, dos mediadores esenciales de las respuestas Th2. La IL-4 cumple una función central en la contención de la inflamación, y su deficiencia se asocia con una mayor gravedad clínica en modelos de EAE [456,457]. Por su parte, la IL-13 participa de manera decisiva en la regulación de la inmunidad tipo 2, favoreciendo la diferenciación Th2, la producción de anticuerpos y diversos mecanismos anti-inflamatorios y de reparación tisular [456]. La reducción simultánea de ambas citoquinas apunta hacia una inhibición significativa del eje Th2 en la EM, un aspecto que podría contribuir a la pérdida de mecanismos reguladores del daño tisular.

Cuando se examinaron los niveles de factores solubles en los distintos grupos, emergieron perfiles específicos diferenciados de los observados en el análisis de factores celulares.

Los principales hallazgos se observaron en el grupo NLGH, previamente asociado con un mayor riesgo de PIRA no inflamatorio [370]. Estos pacientes, presentaron una disminución marcada de varias quimiocinas implicadas en el reclutamiento de células inmunes en comparación con CS, con reducciones significativas de CCL3, CCL4 y CCL7. La quimiocina CCL3 es un mediador clave en el mantenimiento de la inflamación, ya que promueve el reclutamiento de macrófagos, linfocitos T efectores y células NK hacia el foco inflamatorio. Su producción, inducida por estímulos pro-inflamatorios, ocupa un papel central en la respuesta inmunitaria tanto innata como adaptativa [288,452]. En pacientes recién diagnosticados de EM, se ha descrito un aumento de CCL3 en el LCR, reflejando inflamación activa temprana en el SNC [458]. No obstante, también se han comunicado niveles disminuidos en sangre periférica [459] en comparación con los CS, lo que sugiere dinámicas compartimentalizadas de su producción. Por su parte, CCL4 participa de forma activa en la señalización inflamatoria y contribuye a la disrupción de la barrera del endotelio neurovascular, creando un entorno que facilita la penetración y activación de células inmunes en el SNC [460]. Este papel en la permeabilización de la barrera añade relevancia a su modulación en contextos neuroinflamatorios. Finalmente, CCL7 cumple funciones esenciales en la respuesta inmunitaria al favorecer el reclutamiento de monocitos inflamatorios, promover la migración de células dendríticas y modular la activación y

movilidad de linfocitos T, contribuyendo a la amplificación y mantenimiento de la inflamación. El aumento de sus niveles en la sustancia blanca del SNC en modelos de EAE aguda [449] refuerza su implicación en escenarios de daño neuroinflamatorio.

En conjunto, la disminución simultánea de CCL3, CCL4 y CCL7 en el grupo NLGH sugiere un menor reclutamiento celular y una reducción de la actividad inflamatoria periférica aguda en estos pacientes. Esta menor disponibilidad de señales quimiotácticas podría limitar la llegada de células efectoras al tejido, modulando así la magnitud de la respuesta inflamatoria periférica observada anteriormente en este grupo.

Además, este grupo presentó también una disminución significativa de CCL2 respecto a CS y al resto de grupos de EM. CCL2 es una quimiocina clave en el reclutamiento de monocitos, células T y otras células inmunitarias hacia los tejidos inflamados. CCL2 es producida por diversos tipos celulares, incluyendo astrocitos y microglía, en respuesta a estímulos inflamatorios [461]. En modelos de la enfermedad, la quimiocina CCL2 ha demostrado desempeñar un papel crucial en la fisiopatología de la enfermedad al promover la migración de células inmunitarias a través de la BHE en el SNC, exacerbando el daño neuronal y facilitando la formación de lesiones desmielinizantes [462]. Estudios previos han descrito una disminución de sus niveles en pacientes con EM [459], pero nosotros hemos observado que esta disminución está restringida únicamente al grupo NLGH. La disminución de CCL2 en este grupo refuerza el planteamiento de una escasa inflamación periférica que presentan estos pacientes, lo que apunta a una posible compartimentalización de la respuesta inmunitaria [370].

En sintonía con este planteamiento, la menor inflamación periférica observada en estos pacientes no solo se explica por la reducción de quimiocinas implicadas en la migración de linfocitos, sino también por la disminución de factores estrechamente relacionados con la activación inmunitaria periférica. En esta línea, observamos una caída en los niveles séricos de TNF-α, TNFSF12 y FLT3LG en este grupo. El TNF-α es una citoquina pro-inflamatoria fundamental en la patogénesis de la EM. Es producido por diversos tipos celulares, incluidas las células T activadas, macrófagos y astrocitos, y desempeña un papel central en procesos patológicos como la disrupción de la BHE y la activación de la microglía. Niveles elevados de TNF-α se han asociado con una mayor actividad de la enfermedad y con el

desarrollo de lesiones desmielinizantes en el SNC [257]. TNFSF12, también conocido como TWEAK (por sus siglas en inglés de *TNF-related weak inducer of apoptosis)*, es una citoquina de la familia del TNF que regula diversos procesos celulares, como la proliferación, migración, diferenciación, apoptosis y respuesta inflamatoria, mediante su unión a su receptor [463]. Este factor soluble se ha implicado en la disrupción de la BHE al inducir cambios en células endoteliales, lo que podría facilitar la infiltración de leucocitos en el SNC [464]. Además, en estudios de inmunohistoquímica e inmunofluoresencia se han reportado concentraciones elevadas de TWEAK y su receptor Fn14 en tejido cerebral de pacientes con EM, especialmente en lesiones corticales y perivasculares [465]. Por último, FLT3LG es un factor esencial para el desarrollo, expansión y supervivencia de las células dendríticas, que son fundamentales para la iniciación y modulación de las respuestas inmunitarias adaptativas [466]. La disminución de estos tres factores apunta a una señal pro-inflamatoria periférica debilitada y a una menor capacidad de migración inmunitaria hacia el SNC, reforzando los resultados obtenidos respecto a la disminución de quimiocinas.

El patrón observado en el grupo NLGH es compatible con una activación y migración leucocitaria periférica muy limitada, caracterizado por una reducción notable de factores solubles inmunológicamente relevantes, entre los cuales destaca la disminución de CCL2, en consonancia con la ausencia de un perfil leucocitario distintivo descrita en nuestro estudio previo de citometría. Este fenómeno podría contribuir al desarrollo de PIRA no inflamatorio en estos pacientes y, al mismo tiempo, ayudar a explicar la eficacia limitada de los TMEs actuales en este grupo [372], dado que estos tratamientos actúan principalmente sobre la respuesta inmunitaria adaptativa periférica [151,153]

Los grupos de pacientes con valores bajos de sGFAP (NLGL y NHGL) mostraron concentraciones séricas reducidas de GM-CSF. Los niveles reducidos de GM-CSF podrían estar limitando la activación astrocitaria [467,468], asociándose a las bajas concentraciones séricas de sGFAP observadas en estos pacientes. Esta menor activación de la glía parece concordar con el perfil clínico de estos grupos de pacientes, caracterizado por un riesgo reducido de PIRA no inflamatorio [372].

Finalmente, observamos alteraciones en los niveles de EGF, un factor soluble estrechamente relacionado con los procesos de reparación tisular. El EGF favorece la proliferación, diferenciación y

supervivencia de los oligodendrocitos, células con funciones esenciales para la remielinización del SNC [469], además de contribuir a la reparación axonal [470]. Estudios previos han descrito una reducción de EGF en LCR y suero de pacientes con EM, y su administración ha mostrado efectos beneficiosos en modelos experimentales [469,471]. En nuestro análisis detectamos un descenso de EGF en tres de los grupos de EM. Los pacientes NLGL presentaron una reducción moderada respecto a los CS, un hallazgo que sugiere que, pese a su evolución clínica favorable [372], presentan una menor capacidad intrínseca de reparación, lo que podría hacerlos más vulnerables a la progresión con el tiempo. Sin embargo, los niveles más bajos se encontraron en los grupos NLGH y NHGH. Esto está relacionado con el mayor riesgo de progresión descrito en estos pacientes [370,372], ya que una falta de reparación tisular puede implicar una menor capacidad para remielinizar y preservar la integridad axonal. Por otro lado, los pacientes NHGL mantuvieron niveles de EGF relativamente estables, lo que sugiere una capacidad reparadora conservada. Esta situación podría asociarse a un menor riesgo de progresión de la enfermedad, independiente de la actividad inflamatoria [372].

Al analizar la relación entre los distintos factores solubles y los niveles de sNfL y sGFAP, se observó una asociación negativa entre sGFAP y EGF, indicando que un aumento de la activación astrocitaria se acompaña de una disminución de la capacidad reparadora mediada por EGF. Este hallazgo coincide con lo demostrado en modelos experimentales de EM, donde la activación de la glía compromete sus funciones regenerativas [472,473].

En conjunto, nuestros resultados sitúan al EGF como un indicador clave de la capacidad reparadora en la EM. Su descenso, especialmente en los grupos con mayor riesgo de progresión, podría limitar la remielinización y favorecer la acumulación de daño tisular incluso en ausencia de brotes.

A pesar de los resultados prometedores, este estudio presenta limitaciones que deben ser consideradas. Estos resultados deberán ser validados en cohortes multicéntricas y el efecto de variables como CCL2 y EGF deberá ser estudiado en estudios longitudinales. Futuros estudios de proteómica en LCR mostrarán el papel de estos factores solubles en la respuesta inmunitaria restringida al SNC en la EM.

Pese a estas limitaciones, la combinación de EGF y CCL2 emerge como un posible biomarcador dual capaz de distinguir a los pacientes con riesgo de PIRA no inflamatorio que podrían ser o no

candidatos a beneficiarse de terapias dirigidas a la respuesta inmunitaria adaptativa. Estos hallazgos refuerzan el valor de la estratificación basada en sNfL y sGFAP basal para comprender la heterogeneidad de la EM e identificar nuevos biomarcadores con potencial para optimizar la selección y el seguimiento del tratamiento.

6.CONCLUSIONES

1. La edad es la variable con mayor impacto sobre los niveles de sNfL y sGFAP, mientras que el IMC muestra una influencia moderada únicamente sobre sNfL.
2. Los rangos de normalidad de sNfL ajustados por edad se establecieron en 10 pg/mL para individuos menores de 45 años y en 15 pg/mL para aquellos de mayor edad. El *Z-score* de sNfL ≥1,5 también es un punto de corte robusto en controles sanos.
3. Los valores de referencia de sGFAP se definieron en 140 pg/mL para individuos menores de 55 años y en 280 pg/mL para aquellos mayores de esta edad.
4. Los pacientes de EM comparten un perfil inflamatorio común caracterizado por la expansión de células T y B efectoras y de memoria, y el aumento de células productoras de TNF-α, IFN-γ o IL-17.
5. El grupo NH se caracteriza por la presencia de un fenotipo celular inflamatorio, con una pérdida marcada de mecanismos inmunorreguladores, entre los que destaca una disminución en células Treg en sangre y LCR.
6. Este grupo presenta además un aumento de células T productoras de GM-CSF y de células NK activadas.
7. El grupo NLGL muestra un mayor control inmunológico periférico, con niveles de Treg similares a los controles y un aumento de células NK reguladoras.
8. El grupo NLGH presentó una reducción de un amplio grupo de quimiocinas en suero, principalmente de CCL2, lo que podría reflejar una disminución del reclutamiento leucocitario hacia el SNC.
9. El grupo NLGH mostró una reducción de factores solubles estrechamente relacionados con la activación inmunitaria periférica.
10. Los grupos NHGH y NLGH presentaron una disminución significativa de los niveles EGF en los pacientes con EM, lo que sugiere una reducción en los mecanismos de remielinización y reparación axonal mediados por la astroglía, contribuyendo a aumentar el daño axonal.
11. La combinación de EGF y CCL2 se perfila como un potencial biomarcador capaz de identificar pacientes con riesgo de PIRA no inflamatorio.

12. La estratificación basal de los pacientes con EM según los niveles de sNfL y sGFAP permite identificar distintos mecanismos fisiopatológicos que contribuyen a los diferentes tipos de evolución de la discapacidad en la EM.

7.BIBLIOGRAFÍA

1- Jakimovski D, Bittner S, Zivadinov R, et al. Multiple sclerosis. Lancet. 2024;403(10422):183- 202. doi:10.1016/S0140-6736(23)01473-3

2- Walton C, King R, Rechtman L, et al. Rising prevalence of multiple sclerosis worldwide: Insights from the Atlas of MS, third edition. Mult Scler. 2020;26(14):1816-1821. doi:10.1177/1352458520970841

3- Dobson R, Giovannoni G. Multiple sclerosis - a review. Eur J Neurol. 2019;26(1):27-40. doi:10.1111/ene.13819

4- Alroughani R, Boyko A. Pediatric multiple sclerosis: a review. BMC Neurol. 2018;18(1):27. doi:10.1186/s12883-018-1026-3

5- Naseri A, Nasiri E, Sahraian MA, Daneshvar S, Talebi M. Clinical Features of Late-Onset Multiple Sclerosis: a Systematic Review and Meta-analysis. Mult Scler Relat Disord. 2021;50:102816. doi:10.1016/j.msard.2021.102816

6- Charabati M, Wheeler MA, Weiner HL, Quintana FJ. Multiple sclerosis: Neuroimmune crosstalk and therapeutic targeting. Cell. 2023;186(7):1309-1327. doi:10.1016/j.cell.2023.03.008

7- International Multiple Sclerosis Genetics Consortium. A systems biology approach uncovers cell-specific gene regulatory effects of genetic associations in multiple sclerosis. Nat Commun. 2019;10(1):2236. doi:10.1038/s41467-019-09773-y

8- Hedström AK, Alfredsson L, Olsson T. Environmental factors and their interactions with risk genotypes in MS susceptibility. Curr Opin Neurol. 2016;29(3):293-298. doi:10.1097/WCO.0000000000000329

9- Calahorra L, Camacho-Toledano C, Serrano-Regal MP, Ortega MC, Clemente D. Regulatory Cells in Multiple Sclerosis: From Blood to Brain. Biomedicines. 2022;10(2):335. doi:10.3390/biomedicines10020335

10- Lublin FD, Reingold SC. Defining the clinical course of multiple sclerosis: results of an international survey. National Multiple Sclerosis Society (USA) Advisory Committee on Clinical Trials of New Agents in Multiple Sclerosis. Neurology. 1996;46(4):907-911. doi:10.1212/wnl.46.4.907

11- Pozzilli C, Pugliatti M, Vermersch P, et al. Diagnosis and treatment of progressive multiple sclerosis: A position paper. Eur J Neurol. 2023;30(1):9-21. doi:10.1111/ene.15593

12- Lublin FD, Häring DA, Ganjgahi H, et al. How patients with multiple sclerosis acquire disability. *Brain.* 2022;145(9):3147-3161. doi:10.1093/brain/awac016

13- Carswell R, Polman CH. Pathological anatomy: Ilustrations of the elementary forms of disease. London: Longman, Orme, Brown, Green and Longman. 1838.

14- Charcot JM. Histologie de la sclerose en plaques. Vol 41. *Gazette des hopitaux;* 1868.

15- Pierre M. La sclerose en plaques et maladies infectieuses. *La Progres Medicale.* 1884;12:287-289.

16- Rivers TM, Schwentke FF. Encephalomyelitis accompanied by myelin destruction experimentally produced in monkeys. *J Exp Med.* 1935;61(5):689. doi:10.1084/JEM.61.5.689

17- Quincke H. Die lumbalpunction des hydrocephalus. *Berliner Klinische Wochenschrift*. 1891;20:929-933.

18- Kabat EA, Moore DH, Landow H. An electrophoretic study of the protein components in cerebrospinal fluid and their relationship to the serum proteins. *J Clin Invest.* 1942;21(5):571-577. doi:10.1172/JCI101335

19- Kurtzke JF. A new scale for evaluating disability in multiple sclerosis. *Neurology.* 1955;5(8):580-583. doi:10.1212/wnl.5.8.580

20- Kurtzke JF. Rating neurologic impairment in multiple sclerosis: an expanded disability status scale (EDSS). *Neurology.* 1983;33(11):1444-1452. doi:10.1212/wnl.33.11.1444

21- Millar JH, Allison RS. Familial incidence of disseminated sclerosis in Northern Ireland. Ulster Med J. 1954;23(Suppl. 2):29-92.

22- Poser CM, Paty DW, Scheinberg L, et al. New diagnostic criteria for multiple sclerosis: guidelines for research protocols. *Ann Neurol*. 1983;13(3):227-231. doi:10.1002/ana.410130302

23- Young IR, Hall AS, Pallis CA, Legg NJ, Bydder GM, Steiner RE. Nuclear magnetic resonance imaging of the brain in multiple sclerosis. *Lancet.* 1981;2(8255):1063-1066. doi:10.1016/s0140-6736(81)91273-3

24- McDonald WI, Compston A, Edan G, et al. Recommended diagnostic criteria for multiple sclerosis: guidelines from the International Panel on the diagnosis of multiple sclerosis. *Ann Neurol.* 2001;50(1):121-127. doi:10.1002/ana.1032

25- Thompson AJ, Banwell BL, Barkhof F, et al. Diagnosis of multiple sclerosis: 2017 revisions of the McDonald criteria. *Lancet Neurol.* 2018;17(2):162-173. doi:10.1016/S1474-4422(17)30470-2

26- Montalban X, Lebrun-Frénay C, Oh J, et al. Diagnosis of multiple sclerosis: 2024 revisions of the McDonald criteria. Lancet Neurol. 2025;24(10):850-865. doi:10.1016/S1474-4422(25)00270-4

27- Atlas of MS. Number of people with MS. Accessed October 22, 2025. https://www.atlasofms.org/map/global/epidemiology/number-of-people-with-ms

28- Ferrand M, Epstein J, Soudant M, et al. Real-life evaluation of the 2017 McDonald criteria for relapsing-remitting multiple sclerosis after a clinically isolated syndrome confirms a gain in time-to-diagnosis. *J Neurol.* 2024;271(1):125-133. doi:10.1007/s00415-023-11905-w

29- Fernández O, Izquierdo G, Campos VM, Pastor M. [Epidemiology of multiple sclerosis in the province of Malaga (Spain). A prevalence study]. *Neurologia.* 1986;1(1):3-5.

30- Perez-Carmona N, Fernandez-Jover E, Sempere AP. Epidemiologia de la esclerosis multiple en España [Epidemiology of multiple sclerosis in Spain]. *Rev Neurol.* 2019;69(1):32-38. doi:10.33588/rn.6901.2018477

31- Uria DF, Abad P, Calatayud MT, et al. Multiple sclerosis in Gijon health district, Asturias, northern Spain. *Acta Neurol Scand*. 1997;96(6):375-379. doi:10.1111/j.1600-0404.1997.tb00301.x

32- Bufill E, Blesa R, Galan J, Dean G. Prevalence of multiple sclerosis in the region of Osona, Catalonia, northern Spain. *J Neurol Neurosurg Psychiatry.* 1995;58(5):577-581. doi:10.1136/JNNP.58.5.577

33- Fernández O, Luque G, San Román C, Bravo M, Dean G. The prevalence of multiple sclerosis in the Sanitary District of Vélez-Málaga, southern Spain. *Neurology.* 1994;44(3 Pt 1):425-429. doi:10.1212/wnl.44.3_part_1.425

34- Otero-Romero S, Roura P, Solà J, et al. Increase in the prevalence of multiple sclerosis over a 17-year period in Osona, Catalonia, Spain. *Mult Scler.* 2013;19(2):245-248. doi:10.1177/135245851244475

35- Simpson S, Wang W, Otahal P, Blizzard L, Van Der Mei IAF, Taylor B V. Latitude continues to be significantly associated with the prevalence of multiple sclerosis: an updated meta-analysis. *J Neurol Neurosurg Psychiatry.* 2019;90(11):1193-1200. doi:10.1136/JNNP-2018-320189

36- Tao C, Simpson S Jr, van der Mei I, et al. Higher latitude is significantly associated with an earlier age of disease onset in multiple sclerosis. *J Neurol Neurosurg Psychiatry.* 2016;87(12):1343-1349. doi:10.1136/jnnp-2016-314013

37- Alfredsson L, Olsson T. Lifestyle and Environmental Factors in Multiple Sclerosis. *Cold Spring Harb Perspect Med.* 2019;9(4):a028944. doi:10.1101/cshperspect.a028944

38- McLeod JG, Hammond SR, Kurtzke JF. Migration and multiple sclerosis in immigrants to Australia from United Kingdom and Ireland: a reassessment. I. Risk of MS by age at immigration. *J Neurol.* 2011;258(6):1140-1149. doi:10.1007/s00415-010-5898-4

39- Dunn SE, Steinman L. The gender gap in multiple sclerosis: intersection of science and society. *JAMA Neurol.* 2013;70(5):634-635. doi:10.1001/JAMANEUROL.2013.55

40- Koch-Henriksen N, Sørensen PS. The changing demographic pattern of multiple sclerosis epidemiology. *Lancet Neurol.* 2010;9(5):520-532. doi:10.1016/S1474-4422(10)70064-8

41- Miclea A, Salmen A, Zoehner G, et al. Age-dependent variation of female preponderance across different phenotypes of multiple sclerosis: A retrospective cross-sectional study. *CNS Neurosci Ther*. 2019;25(4):527-531. doi:10.1111/cns.13083

42- Portaccio E, Magyari M, Havrdova EK, et al. Multiple sclerosis: emerging epidemiological trends and redefining the clinical course. *Lancet Reg Health Eur*. 2024;44:100977. doi:10.1016/j.lanepe.2024.100977

43- Goodin DS. The epidemiology of multiple sclerosis: insights to disease pathogenesis. Handb *Clin Neurol.* 2014;122:231-266. doi:10.1016/B978-0-444-52001-2.00010-8

44- International Multiple Sclerosis Genetics Consortium, Hafler DA, Compston A, et al. Risk alleles for multiple sclerosis identified by a genomewide study. *N Engl J Med.* 2007;357(9):851-862. doi:10.1056/NEJMoa073493

45- Amezcua L, McCauley JL. Race and ethnicity on MS presentation and disease course. *Mult Scler*. 2020;26(5):561-567. doi:10.1177/1352458519887328

46- Langer-Gould AM, Gonzales EG, Smith JB, Li BH, Nelson LM. Racial and Ethnic Disparities in Multiple Sclerosis Prevalence. *Neurology.* 2022;98(18):e1818-e1827. doi: 10.1212/WNL.0000000000200151.

47- Landry RL, Embers ME. The Probable Infectious Origin of Multiple Sclerosis. *NeuroSci*. 2023;4(3):211-234. doi:10.3390/neurosci4030019

48- Nielsen NM, Westergaard T, Rostgaard K, et al. Familial risk of multiple sclerosis: a nationwide cohort study. *Am J Epidemiol.* 2005;162(8):774-778. doi:10.1093/AJE/KWI280

49- Hudson JI, Hiripi E, Pope HG Jr, Kessler RC. The prevalence and correlates of eating disorders in the National Comorbidity Survey Replication. *Biol Psychiatry*. 2007;61(3):348-358. doi:10.1016/j.biopsych.2006.03.040

50- Patsopoulos NA. Genetics of Multiple Sclerosis: An Overview and New Directions. Cold *Spring Harb Perspect Med.* 2018;8(7):a028951. doi:10.1101/cshperspect.a028951

51- Willer CJ, Dyment DA, Risch NJ, Sadovnick AD, Ebers GC; Canadian Collaborative Study Group. Twin concordance and sibling recurrence rates in multiple sclerosis. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2003;100(22):12877-12882. doi:10.1073/pnas.1932604100

52- Sadovnick AD, Armstrong H, Rice GP, et al. A population-based study of multiple sclerosis in twins: update. *Ann Neurol.* 1993;33(3):281-285. doi:10.1002/ana.410330309

53- Sawcer S, Franklin RJM, Ban M. Multiple sclerosis genetics. *Lancet Neurol.* 2014;13(7):700-709. doi:10.1016/S1474-4422(14)70041-9

54- Jacobs BM, Peter M, Giovannoni G, Noyce AJ, Morris HR, Dobson R. Towards a global view of multiple sclerosis genetics. *Nat Rev Neurol.* 2022;18(10):613-623. doi:10.1038/s41582-022-00704-y

55- Binder MD, Nwoke EC, Morwitch E, et al. HLA-DRB1*15:01 and the *MERTK* Gene Interact to Selectively Influence the Profile of MERTK-Expressing Monocytes in Both Health and MS. *Neurol Neuroimmunol Neuroinflamm*. 2024;11(2):e200190. doi:10.1212/NXI.0000000000200190

56- Hollenbach JA, Oksenberg JR. The immunogenetics of multiple sclerosis: A comprehensive review. *J Autoimmun.* 2015;64:13-25. doi:10.1016/j.jaut.2015.06.010

57- Cocco E, Meloni A, Murru MR, et al. Vitamin D responsive elements within the HLA-DRB1 promoter region in Sardinian multiple sclerosis associated alleles. *PLoS One.* 2012;7(7):e41678. doi:10.1371/journal.pone.0041678

58- Le Clerc S, Lombardi L, Baune BT, et al. HLA-DRB1 and HLA-DQB1 genetic diversity modulates response to lithium in bipolar affective disorders. *Sci Rep.* 2021;11(1):17823. doi:10.1038/s41598-021-97140-7

59- Moutsianas L, Jostins L, Beecham AH, et al. Class II HLA interactions modulate genetic risk for multiple sclerosis. *Nat Genet.* 2015;47(10):1107-1113. doi:10.1038/ng.3395

60- Sahi N, Ciccarelli O, Houlden H, Chard DT. Unlocking Multiple Sclerosis Genetics: From Susceptibility to Severity. *Neurology*. 2025;105(8):e214141. doi:10.1212/WNL.0000000000214141

61- Barrie W, Yang Y, Irving-Pease EK, et al. Elevated genetic risk for multiple sclerosis emerged in steppe pastoralist populations. *Nature.* 2024;625(7994):321-328. doi:10.1038/s41586-023-06618-z

62- Manna I, De Benedittis S, Porro D. A Comprehensive Examination of the Role of Epigenetic Factors in Multiple Sclerosis. *Int J Mol Sci.* 2024;25(16):8921. doi:10.3390/ijms25168921

63- Castro K, Casaccia P. Epigenetic modifications in brain and immune cells of multiple sclerosis patients. *Mult Scler*. 2018;24(1):69-74. doi:10.1177/1352458517737389

64- Kular L, Liu Y, Ruhrmann S, et al. DNA methylation as a mediator of HLA-DRB1*15:01 and a protective variant in multiple sclerosis. *Nat Commun.* 2018;9(1):2397. doi:10.1038/s41467-018-04732-5

65- Tiane A, Somers V, Hellings N, van den Hove DLA, Vanmierlo T. The Impact of Sample Storage on Blood Methylation: Towards Assessing Myelin Gene Methylation as a Biomarker for Progressive Multiple Sclerosis. *Int J Mol Sci.* 2024;25(6):3468. doi:10.3390/ijms25063468

66- Sternbach S, West N, Singhal NK, et al. The BHMT-betaine methylation pathway epigenetically modulates oligodendrocyte maturation. *PLoS One.* 2021;16(5):e0250486. doi:10.1371/journal.pone.0250486

67- Lu TX, Rothenberg ME. MicroRNA. *J Allergy Clin Immunol.* 2018;141(4):1202-1207. doi:10.1016/j.jaci.2017.08.034

68- Piotrzkowska D, Miller E, Kucharska E, Niwald M, Majsterek I. Association of miRNA and mRNA Levels of the Clinical Onset of Multiple Sclerosis Patients. *Biology (Basel).* 2021;10(6):554. doi:10.3390/biology10060554

69- Regev K, Healy BC, Paul A, et al. Identification of MS-specific serum miRNAs in an international multicenter study. *Neurol Neuroimmunol Neuroinflamm.* 2018;5(5):e491. doi:10.1212/NXI.0000000000000491

70- Wang L, Liang Y. MicroRNAs as T Lymphocyte Regulators in Multiple Sclerosis. *Front Mol Neurosci*. 2022;15:865529. doi:10.3389/fnmol.2022.865529

71- Soldan SS, Lieberman PM. Epstein-Barr virus and multiple sclerosis. *Nat Rev Microbiol.* 2023;21(1):51-64. doi:10.1038/s41579-022-00770-5

72- Levin LI, Munger KL, O'Reilly EJ, Falk KI, Ascherio A. Primary infection with the Epstein-Barr virus and risk of multiple sclerosis. *Ann Neurol.* 2010;67(6):824-830. doi:10.1002/ANA.21978

73- Bjornevik K, Cortese M, Healy BC, et al. Longitudinal analysis reveals high prevalence of Epstein-Barr virus associated with multiple sclerosis. *Science.* 2022;375(6578):296-301. doi:10.1126/science.abj8222

74- Kiani L. Genetic susceptibility determines Epstein-Barr-virus-associated risk of multiple sclerosis. *Nat Rev Neurol*. 2025;21(6):293. doi:10.1038/s41582-025-01099-2

75- Lanz TV, Brewer RC, Ho PP, et al. Clonally expanded B cells in multiple sclerosis bind EBV EBNA1 and GlialCAM. *Nature.* 2022;603(7900):321-327. doi:10.1038/s41586-022-04432-7

76- Yao K, Honarmand S, Espinosa A, Akhyani N, Glaser C, Jacobson S. Detection of human herpesvirus-6 in cerebrospinal fluid of patients with encephalitis. *Ann Neurol.* 2009;65(3):257-267. doi:10.1002/ana.21611

77- Hernández-González O, Martínez-Palomo A, Sotelo J, et al. Varicella-Zoster Virus in Cerebrospinal Fluid at Relapses of Multiple Sclerosis is Infective in Vitro. *Arch Med Res.* 2018;49(5):350-355. doi:10.1016/j.arcmed.2018.10.001

78- Sundqvist E, Bergström T, Daialhosein H, et al. Cytomegalovirus seropositivity is negatively associated with multiple sclerosis. *Mult Scler.* 2014;20(2):165-173. doi:10.1177/1352458513494489

79- Grut V, Biström M, Salzer J, et al. Cytomegalovirus seropositivity is associated with reduced risk of multiple sclerosis-a presymptomatic case-control study. *Eur J Neurol.* 2021;28(9):3072-3079. doi:10.1111/ene.14961

80- Sintzel MB, Rametta M, Reder AT. Vitamin D and Multiple Sclerosis: A Comprehensive Review. *Neurol Ther.* 2018;7(1):59-85. doi:10.1007/s40120-017-0086-4

81- Giordano A, Clarelli F, Pignolet B, et al. Vitamin D affects the risk of disease activity in multiple sclerosis. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. 2025;96(2):170-176. doi:10.1136/jnnp-2024-334062

82- Jacobs BM, Noyce AJ, Giovannoni G, Dobson R. BMI and low vitamin D are causal factors for multiple sclerosis: A Mendelian Randomization study. *Neurology(R) neuroimmunology & neuroinflammation.* 2020;7(2). doi:10.1212/NXI.0000000000000662

83- Mowry EM, Waubant E, McCulloch CE, et al. Vitamin D status predicts new brain magnetic resonance imaging activity in multiple sclerosis. *Ann Neurol*. 2012;72(2):234-240. doi:10.1002/ANA.23591

84- Ascherio A, Munger KL, White R, et al. Vitamin D as an early predictor of multiple sclerosis activity and progression. *JAMA Neurol.* 2014;71(3):306-314. doi:10.1001/JAMANEUROL.2013.5993

85- Butzkueven H, Ponsonby AL, Stein MS, et al. Vitamin D did not reduce multiple sclerosis disease activity after a clinically isolated syndrome. *Brain*. 2024;147(4):1206-1215. doi:10.1093/brain/awad409

86- Cassard SD, Fitzgerald KC, Qian P, et al. High-dose vitamin D3 supplementation in relapsing-remitting multiple sclerosis: a randomised clinical trial. *EClinicalMedicine.* 2023;59:101957. doi:10.1016/j.eclinm.2023.101957

87- Tse BCY, Ferguson AL, Koay YC, Grau GE, Don AS, Byrne SN. Exposure to solar ultraviolet radiation establishes a novel immune suppressive lipidome in skin-draining lymph nodes. *Front Immunol*. 2023;13:1045731. doi:10.3389/fimmu.2022.1045731

88- Skarlis C, Anagnostouli M. The role of melatonin in Multiple Sclerosis. *Neurol Sci*. 2020;41(4):769-781. doi:10.1007/s10072-019-04137-2

89- Høglund RAA, Meyer HE, Stigum H, et al. Association of Body Mass Index in Adolescence and Young Adulthood and Long-term Risk of Multiple Sclerosis: A Population-Based Study. *Neurology*. 2021;97(23):E2253-E2261. doi:10.1212/WNL.0000000000012957

90- Harroud A, Mitchell RE, Richardson TG, et al. Childhood obesity and multiple sclerosis: A Mendelian randomization study. *Mult Scler*. 2021;27(14):2150-2158. doi:10.1177/13524585211001781

91- Hedström AK, Olsson T, Alfredsson L. Body mass index during adolescence, rather than childhood, is critical in determining MS risk. *Mult Scler.* 2016;22(7):878-883. doi:10.1177/1352458515603798

92- Olsson T, Barcellos LF, Alfredsson L. Interactions between genetic, lifestyle and environmental risk factors for multiple sclerosis. *Nat Rev Neurol.* 2017;13(1):26-36. doi:10.1038/NRNEUROL.2016.187

93- Correale J, Marrodan M. Multiple sclerosis and obesity: The role of adipokines. *Front Immunol.* 2022;13:1038393. doi:10.3389/fimmu.2022.1038393

94- Rosso M, Chitnis T. Association Between Cigarette Smoking and Multiple Sclerosis: A Review. *JAMA Neurol*. 2020;77(2):245-253. doi:10.1001/jamaneurol.2019.4271

95- Hedström AK. Smoking and disability progression in multiple sclerosis. *Expert Rev Neurother.* 2020;20(8):739-741. doi:10.1080/14737175.2020.1743176

96- Zivadinov R, Weinstock-Guttman B, Hashmi K, et al. Smoking is associated with increased lesion volumes and brain atrophy in multiple sclerosis. *Neurology.* 2009;73(7):504-510. doi:10.1212/WNL.0b013e3181b2a706

97- Cekanaviciute E, Yoo BB, Runia TF, et al. Gut bacteria from multiple sclerosis patients modulate human T cells and exacerbate symptoms in mouse models. Proc Natl Acad Sci U S A. 2017;114(40):10713-10718. doi:10.1073/pnas.1711235114

98- Correale J, Hohlfeld R, Baranzini SE. The role of the gut microbiota in multiple sclerosis. Nat Rev Neurol. 2022;18(9):544-558. doi:10.1038/s41582-022-00697-8

99- Dominguez-Mozo MI, Perez-Perez S, Villarrubia N, et al. Herpesvirus Antibodies, Vitamin D and Short-Chain Fatty Acids: Their Correlation with Cell Subsets in Multiple Sclerosis Patients and Healthy Controls. Cells. 2021;10(1):119. doi:10.3390/cells10010119

100- Pérez-Pérez S, Domínguez-Mozo MI, Alonso-Gómez A, et al. Acetate correlates with disability and immune response in multiple sclerosis. *PeerJ.* 2020;8:e10220. doi:10.7717/peerj.10220

101- Fitzgerald KC, Munger KL, Hartung HP, et al. Sodium intake and multiple sclerosis activity and progression in BENEFIT. *Ann Neurol.* 2017;82(1):20-29. doi:10.1002/ana.24965

102- Farez MF, Fiol MP, Gaitán MI, Quintana FJ, Correale J. Sodium intake is associated with increased disease activity in multiple sclerosis. *J Neurol Neurosurg Psychiatry.* 2015;86(1):26-31. doi:10.1136/jnnp-2014-307928

103- von Drathen S, Gold SM, Peper J, et al. Stress and Multiple Sclerosis - Systematic review and meta-analysis of the association with disease onset, relapse risk and disability progression. *Brain Behav Immun.* 2024;120:620-629. doi:10.1016/j.bbi.2024.06.004

104- Sparaco M, Miele G, Lavorgna L, Abbadessa G, Bonavita S. Association between relapses, stress, and depression in people with multiple sclerosis during the COVID-19 pandemic. *Neurol Sci.* 2022;43(5):2935-2942. doi:10.1007/s10072-022-05917-z

105- Suzuki T, Hidaka T, Kumagai Y, Yamamoto M. Environmental pollutants and the immune response. *Nat Immunol.* 2020;21(12):1486-1495. doi:10.1038/s41590-020-0802-6

106- Cortese A, Lova L, Comoli P, et al. Air pollution as a contributor to the inflammatory activity of multiple sclerosis. *J Neuroinflammation.* 2020;17(1):334. doi:10.1186/s12974-020-01977-0

107- Lublin FD, Coetzee T, Cohen JA, Marrie RA, Thompson AJ. The 2013 clinical course descriptors for multiple sclerosis: A clarification. *Neurology.* 2020;94(24):1088-1092. doi:10.1212/WNL.0000000000009636

108- Sharmin S, Bovis F, Malpas C, et al. Confirmed disability progression as a marker of permanent disability in multiple sclerosis. *Eur J Neurol.* 2022;29(8):2321-2334. doi:10.1111/ene.15406

109- Kalincik T, Cutter G, Spelman T, et al. Defining reliable disability outcomes in multiple sclerosis. *Brain.* 2015;138(Pt 11):3287-3298. doi:10.1093/brain/awv258

110- Meyer-Moock S, Feng YS, Maeurer M, Dippel FW, Kohlmann T. Systematic literature review and validity evaluation of the Expanded Disability Status Scale (EDSS) and the Multiple Sclerosis Functional Composite (MSFC) in patients with multiple sclerosis. *BMC Neurol*. 2014;14:58. doi:10.1186/1471-2377-14-58

111- Alonso R, Eizaguirre MB, Casas M, et al. Determination of disability progression in moderately and highly disabled ambulatory patients with relapsing-remitting multiple sclerosis using the EDSS-Plus: A prospective study in Argentina. Mult Scler Relat Disord. 2025;99:106453. doi:10.1016/j.msard.2025.106453

112- Morrow SA, Conway D, Fuchs T, et al. Quantifying cognition and fatigue to enhance the sensitivity of the EDSS during relapses. *Mult Scler*. 2021;27(7):1077-1087. doi:10.1177/1352458520973618

113- Kappos L, Wolinsky JS, Giovannoni G, et al. Contribution of Relapse-Independent Progression vs Relapse-Associated Worsening to Overall Confirmed Disability Accumulation in Typical Relapsing Multiple Sclerosis in a Pooled Analysis of 2 Randomized Clinical Trials Supplemental content. *JAMA Neurol.* 2020;77(9):1132-1140. doi:10.1001/jamaneurol.2020.1568

114- Tur C, Carbonell-Mirabent P, Cobo-Calvo Á, et al. Association of Early Progression Independent of Relapse Activity With Long-term Disability After a First Demyelinating Event in Multiple Sclerosis. *JAMA Neurol.* 2023;80(2):151-160. doi:10.1001/JAMANEUROL.2022.4655

115- Ganjgahi H, Häring DA, Aarden P, et al. AI-driven reclassification of multiple sclerosis progression. *Nat Med.* 2025 Oct;31(10):3414-3424. doi: 10.1038/s41591-025-03901-6.

116- Klineova S, Lublin FD. Clinical Course of Multiple Sclerosis. *Cold Spring Harb Perspect Med*. 2018;8(9):a028928. doi:10.1101/cshperspect.a028928

117- Lublin FD, Baier M, Cutter G. Effect of relapses on development of residual deficit in multiple sclerosis. *Neurology.* 2003;61(11):1528-1532. doi:10.1212/01.wnl.0000096175.39831.21

118- Tremlett H, Zhao Y, Joseph J, Devonshire V; UBCMS Clinic Neurologists. Relapses in multiple sclerosis are age- and time-dependent. *J Neurol Neurosurg Psychiatry.* 2008;79(12):1368-1374. doi:10.1136/jnnp.2008.145805

119- Boiko A, Vorobeychik G, Paty D, Devonshire V, Sadovnick D; University of British Columbia MS Clinic Neurologists. Early onset multiple sclerosis: a longitudinal study. *Neurology*. 2002;59(7):1006-1010. doi:10.1212/wnl.59.7.1006

120- Cree BAC, Arnold DL, Chataway J, et al. Secondary Progressive Multiple Sclerosis: New Insights. *Neurology*. 2021;97(8):378-388. doi:10.1212/WNL.0000000000012323

121- Ziemssen T, Bhan V, Chataway J, et al. Secondary Progressive Multiple Sclerosis: A Review of Clinical Characteristics, Definition, Prognostic Tools, and Disease-Modifying Therapies. *Neurol Neuroimmunol Neuroinflamm.* 2022;10(1):e200064. doi:10.1212/NXI.0000000000200064

122- Katz Sand I, Krieger S, Farrell C, Miller AE. Diagnostic uncertainty during the transition to secondary progressive multiple sclerosis. *Mult Scler*. 2014;20(12):1654-1657. doi:10.1177/1352458514521517

123- Koch M, Kingwell E, Rieckmann P, Tremlett H. The natural history of primary progressive multiple sclerosis. *Neurology*. 2009;73(23):1996-2002. doi:10.1212/WNL.0B013E3181C5B47F

124- Wolinsky JS, PROMiSe Trial Study Group. The PROMiSe trial: baseline data review and progress report. *Mult Scler*. 2004;10 Suppl 1(1 suppl):S65-S72. doi:10.1177/135245850401000112

125- Amezcua L. Progressive Multiple Sclerosis. *Continuum (Minneap Minn).* 2022;28(4):1083-1103. doi:10.1212/CON.0000000000001157

126- Kremenchutzky M, Rice GPA, Baskerville J, Wingerchuk DM, Ebers GC. The natural history of multiple sclerosis: A geographically based study 9: Observations on the progressive phase of the disease. *Brain.* 2006;129(3):584-594. doi:10.1093/brain/awh721

127- Filippi M, Bar-Or A, Piehl F, et al. Multiple sclerosis. *Nat Rev Dis Primers*. 2018;4(1):43. doi:10.1038/s41572-018-0041-4

128- Filippi M, Rocca MA. MR imaging of multiple sclerosis. *Radiology*. 2011;259(3):659-681. doi:10.1148/RADIOL.11101362

129- Wattjes MP, Ciccarelli O, Reich DS, et al. 2021 MAGNIMS-CMSC-NAIMS consensus recommendations on the use of MRI in patients with multiple sclerosis. *Lancet Neurol.* 2021;20(8):653-670. doi:10.1016/S1474-4422(21)00095-8

130- McDonald WI, Miller DH, Thompson AJ. Are magnetic resonance findings predictive of clinical outcome in therapeutic trials in multiple sclerosis? The dilemma of interferon-beta. *Ann Neurol*. 1994;36(1):14-18. doi:10.1002/ANA.410360106

131- Gasperini C, Prosperini L, Tintoré M, et al. Unraveling treatment response in multiple sclerosis: A clinical and MRI challenge. *Neurology.* 2019;92(4):180-192. doi:10.1212/WNL.0000000000006810

132- Erbayat Altay E, Fisher E, Jones SE, Hara-Cleaver C, Lee JC, Rudick RA. Reliability of classifying multiple sclerosis disease activity using magnetic resonance imaging in a multiple sclerosis clinic. *JAMA Neurol.* 2013;70(3):338-344. doi:10.1001/2013.jamaneurol.211

133- Nistri R, Ianniello A, Pozzilli V, Giannì C, Pozzilli C. Advanced MRI Techniques: Diagnosis and Follow-Up of Multiple Sclerosis. *Diagnostics (Basel).* 2024;14(11):1120. doi:10.3390/diagnostics14111120

134- Tourtellotte WW, Potvin AR, Fleming JO, et al. Multiple sclerosis: measurement and validation of central nervous system IgG synthesis rate. *Neurology.* 1980;30(3):240-244. doi:10.1212/WNL.30.3.240

135- Reiber H. Quantitative Bestimmung der lokal im Zentralnervensystem synthetisierten Immunglobulin G-Fraktion des Liquors [Calculation of the IgG fraction of cerebrospinal fluid locally synthesized in the central nervous system (author's transl)]. *J Clin Chem Clin Biochem.* 1979;17(9):587-591.

136- Tibbling G, Link H, Öhman S. Principles of albumin and IgG analyses in neurological disorders. I. Establishment of reference values. *Scand J Clin Lab Invest.* 1977;37(5):385-390. doi:10.1080/00365517709091496

137- Boufidou F, Vakrakou AG, Anagnostouli M, et al. An Updated Evaluation of Intrathecal IgG Synthesis Markers in Relation to Oligoclonal Bands. *Diagnostics (Basel).* 2023;13(3):389. doi:10.3390/diagnostics13030389

138- Arrambide G, Tintore M, Espejo C, et al. The value of oligoclonal bands in the multiple sclerosis diagnostic criteria. *Brain.* 2018;141(4):1075-1084. doi:10.1093/brain/awy006

139- Villar LM, Masjuan J, Sádaba MC, et al. Early differential diagnosis of multiple sclerosis using a new oligoclonal band test. *Arch Neurol.* 2005;62(4):574-577. doi:10.1001/ARCHNEUR.62.4.574

140- Villar LM, García-Barragán N, Sádaba MC, et al. Accuracy of CSF and MRI criteria for dissemination in space in the diagnosis of multiple sclerosis. *J Neurol Sci.* 2008;266(1-2):34-37. doi:10.1016/J.JNS.2007.08.030

141- Petzold A. Intrathecal oligoclonal IgG synthesis in multiple sclerosis. *J Neuroimmunol.* 2013;262(1-2):1-10. doi:10.1016/j.jneuroim.2013.06.014

142- Sanz Diaz CT, de Las Heras Flórez S, Carretero Perez M, Hernández Pérez MÁ, Martín García V. Evaluation of Kappa Index as a Tool in the Diagnosis of Multiple Sclerosis: Implementation in Routine Screening Procedure. *Front Neurol.* 2021;12:676527. doi:10.3389/fneur.2021.676527

143- Beckmann Y, Düztaş D, Uzunköprü C, et al. Kappa-free light chain as a practical alternative to oligoclonal bands in the diagnosis of multiple sclerosis. *Mult Scler Relat Disord*. 2025;97:106377. doi:10.1016/j.msard.2025.106377

144- Rosenstein I, Rasch S, Axelsson M, et al. Kappa free light chain index as a diagnostic biomarker in multiple sclerosis: A real-world investigation. *J Neurochem*. 2021;159(3):618-628. doi:10.1111/jnc.15500

145- Levraut M, Laurent-Chabalier S, Ayrignac X, et al. Kappa Free Light Chain Biomarkers Are Efficient for the Diagnosis of Multiple Sclerosis: A Large Multicenter Cohort Study. *Neurol Neuroimmunol Neuroinflamm.* 2023;10(1). doi:10.1212/NXI.0000000000200049

146- Hegen H, Walde J, Berek K, et al. Cerebrospinal fluid kappa free light chains for the diagnosis of multiple sclerosis: A systematic review and meta-analysis. *Multiple Sclerosis Journal.* 2023;29(2):169-181. doi:10.1177/13524585221134213

147- Gudowska-Sawczuk M, Tarasiuk J, Kułakowska A, Kochanowicz J, Mroczko B. Kappa Free Light Chains and IgG Combined in a Novel Algorithm for the Detection of Multiple Sclerosis. *Brain Sci.* 2020;10(6):324. doi:10.3390/brainsci10060324

148- Barton JL, Garber JY, Klistorner A, Barnett MH. The electrophysiological assessment of visual function in Multiple Sclerosis. *Clin Neurophysiol Pract.* 2019;4:90-96. doi:10.1016/J.CNP.2019.03.002

149- Yperman J, Popescu V, Van Wijmeersch B, Becker T, Peeters LM. Motor evoked potentials for multiple sclerosis, a multiyear follow-up dataset. *Sci Data.* 2022;9(1):207. doi:10.1038/s41597-022-01335-0

150- Kraft GH. Evoked potentials in multiple sclerosis. *Phys Med Rehabil Clin N Am.* 2013;24(4):717-720. doi:10.1016/j.pmr.2013.07.001

151- Hauser SL, Cree BAC. Treatment of Multiple Sclerosis: A Review. *Am J Med.* 2020;133(12):1380-1390.e2. doi:10.1016/j.amjmed.2020.05.049

152- Sabatino JJ Jr, Cree BAC, Hauser SL. New Horizons for Multiple Sclerosis Therapy: 2025 and Beyond. *Ann Neurol*. 2025;98(2):317-328. doi:10.1002/ana.27270

153- Liu Z, Liao Q, Wen H, Zhang Y. Disease modifying therapies in relapsing-remitting multiple sclerosis: A systematic review and network meta-analysis. *Autoimmun Rev*. 2021;20(6):102826. doi:10.1016/j.autrev.2021.102826

154- Al-Araji S, Moccia M, Jha A, et al. Effectiveness of Disease-Modifying Therapies in Patients With Late-Onset Relapsing-Remitting Multiple Sclerosis. Neurology. 2025;105(4):e213967. doi:10.1212/WNL.0000000000213967

155- Giovannoni G, Butzkueven H, Dhib-Jalbut S, et al. Brain health: time matters in multiple sclerosis. *Mult Scler Relat Disord.* 2016;9 Suppl 1:S5-S48. doi:10.1016/J.MSARD.2016.07.003

156- Chalmer TA, Baggesen LM, Nørgaard M, Koch-Henriksen N, Magyari M, Sorensen PS. Early versus later treatment start in multiple sclerosis: a register-based cohort study. *Eur J Neurol.* 2018;25(10):1262-e110. doi:10.1111/ENE.13692

157- Longbrake EE, Kalincik T. Early Treatment for Multiple Sclerosis: Time Is Brain. *Neurology.* 2023;101(13):549-550. doi:10.1212/WNL.0000000000207754458516675039

158- Dhib-Jalbut S, Marks S. Interferon-beta mechanisms of action in multiple sclerosis. *Neurology.* 2010;74 Suppl 1:S17-S24. doi:10.1212/WNL.0b013e3181c97d99

159- Neuhaus O, Farina C, Wekerle H, Hohlfeld R. Mechanisms of action of glatiramer acetate in multiple sclerosis. *Neurology.* 2001;56(6):702-708. doi:10.1212/wnl.56.6.702

160- Interferon beta-1b is effective in relapsing-remitting multiple sclerosis. I. Clinical results of a multicenter, randomized, double-blind, placebo-controlled trial. The IFNB Multiple Sclerosis Study Group. *Neurology.* 1993;43(4):655-655. doi:10.1212/WNL.43.4.655

161- Calabresi PA, Kieseier BC, Arnold DL, et al. Pegylated interferon β-1a for relapsing-remitting multiple sclerosis (ADVANCE): a randomised, phase 3, double-blind study. *Lancet Neurol.* 2014;13(7):657-665. doi:10.1016/S1474-4422(14)70068-7

162- Jacobs LD, Beck RW, Simon JH, et al. Intramuscular interferon beta-1a therapy initiated during a first demyelinating event in multiple sclerosis. CHAMPS Study Group. *N Engl J Med.* 2000;343(13):898-904. doi:10.1056/NEJM200009283431301

163- Johnson KP, Brooks BR, Cohen JA, et al. Copolymer 1 reduces relapse rate and improves disability in relapsing-remitting multiple sclerosis: results of a phase III multicenter, double-blind placebo-controlled trial. The Copolymer 1 Multiple Sclerosis Study Group. *Neurology*. 1995;45(7):1268-1276. doi:10.1212/wnl.45.7.1268

164- Shirani A, Zhao Y, Karim ME, et al. Association between use of interferon beta and progression of disability in patients with relapsing-remitting multiple sclerosis. *JAMA.* 2012;308(3):247-256. doi:10.1001/jama.2012.7625

165- Izquierdo G, García-Agua Soler N, Rus M, García-Ruiz AJ. Effectiveness of glatiramer acetate compared to other multiple sclerosis therapies. *Brain Behav.* 2015;5(6):e00337. doi:10.1002/brb3.337

166- Luna G, Alping P, Burman J, et al. Infection Risks Among Patients With Multiple Sclerosis Treated With Fingolimod, Natalizumab, Rituximab, and Injectable Therapies. *JAMA Neurol.* 2020;77(2):184-191. doi:10.1001/JAMANEUROL.2019.3365

167- Cadavid D, Wolansky LJ, Skurnick J, et al. Efficacy of treatment of MS with IFNbeta-1b or glatiramer acetate by monthly brain MRI in the BECOME study. *Neurology.* 2009;72(23):1976-1983. doi:10.1212/01.wnl.0000345970.73354.17

168- Miller AE. An updated review of teriflunomide's use in multiple sclerosis. Neurodegener Dis Manag. 2021;11(5):387-409. doi:10.2217/nmt-2021-0014

169- O'Connor P, Comi G, Freedman MS, et al. Long-term safety and efficacy of teriflunomide: Nine-year follow-up of the randomized TEMSO study. *Neurology*. 2016;86(10):920-930. doi:10.1212/WNL.0000000000002441

170- Confavreux C, O'Connor P, Comi G, et al. Oral teriflunomide for patients with relapsing multiple sclerosis (TOWER): a randomised, double-blind, placebo-controlled, phase 3 trial. Lancet Neurol. 2014;13(3):247-256. doi:10.1016/S1474-4422(13)70308-9

171- Medina S, Villarrubia N, Sainz de la Maza S, et al. Optimal response to dimethyl fumarate associates in MS with a shift from an inflammatory to a tolerogenic blood cell profile. *Mult Scler*. 2018;24(10):1317-1327. doi:10.1177/1352458517717088

172- Dubey D, Kieseier BC, Hartung HP, et al. Dimethyl fumarate in relapsing-remitting multiple sclerosis: rationale, mechanisms of action, pharmacokinetics, efficacy and safety. *Expert Rev Neurother*. 2015;15(4):339-346. doi:10.1586/14737175.2015.1025755

173- Naismith RT, Wolinsky JS, Wundes A, et al. Diroximel fumarate (DRF) in patients with relapsing-remitting multiple sclerosis: Interim safety and efficacy results from the phase 3 EVOLVE-MS-1 study. *Mult Scler*. 2020;26(13):1729-1739. doi:10.1177/1352458519881761

174- Gold R, Kappos L, Arnold DL, et al. Placebo-controlled phase 3 study of oral BG-12 for relapsing multiple sclerosis. *N Engl J Med*. 2012;367(12):1098-1107. doi:10.1056/NEJMoa1114287

175- Fox RJ, Miller DH, Phillips JT, et al. Placebo-controlled phase 3 study of oral BG-12 or glatiramer in multiple sclerosis. *N Engl J Med*. 2012;367(12):1087-1097. doi:10.1056/NEJMoa1206328

176- Sainz de la Maza S, Sabin Muñoz J, Pilo de la Fuente B, et al. Early predictive risk factors for dimethyl fumarate-associated lymphopenia in patients with multiple sclerosis. *Mult Scler Relat Disord*. 2022;59:103669. doi:10.1016/j.msard.2022.103669

177- McGinley MP, Cohen JA. Sphingosine 1-phosphate receptor modulators in multiple sclerosis and other conditions. *Lancet*. 2021;398(10306):1184-1194. doi:10.1016/S0140-6736(21)00244-0

178- Subei AM, Cohen JA. Sphingosine 1-phosphate receptor modulators in multiple sclerosis. *CNS Drugs.* 2015;29(7):565-575. doi:10.1007/s40263-015-0261-z

179- Scott LJ. Siponimod: A Review in Secondary Progressive Multiple Sclerosis. *CNS Drugs*. 2020;34(11):1191-1200. doi:10.1007/s40263-020-00771-z

180- Cohen JA, Barkhof F, Comi G, et al. Oral fingolimod or intramuscular interferon for relapsing multiple sclerosis. *N Engl J Med*. 2010;362(5):402-415. doi:10.1056/NEJMOA0907839

181- Kappos L, Radue EW, O'Connor P, et al. A placebo-controlled trial of oral fingolimod in relapsing multiple sclerosis. *N Engl J Med.* 2010;362(5):387-401. doi:10.1056/NEJMOA0909494

182- Cohen JA, Comi G, Selmaj KW, et al. Safety and efficacy of ozanimod versus interferon beta-1a in relapsing multiple sclerosis (RADIANCE): a multicentre, randomised, 24-month, phase 3 trial. *Lancet Neurol*. 2019;18(11):1021-1033. doi:10.1016/S1474-4422(19)30238-8

183- Kappos L, Fox RJ, Burcklen M, et al. Ponesimod Compared With Teriflunomide in Patients With Relapsing Multiple Sclerosis in the Active-Comparator Phase 3 OPTIMUM Study: A Randomized Clinical Trial. *JAMA Neurol*. 2021;78(5):558-567. doi:10.1001/jamaneurol.2021.0405

184- Kappos L, Bar-Or A, Cree BAC, et al. Siponimod versus placebo in secondary progressive multiple sclerosis (EXPAND): a double-blind, randomised, phase 3 study. *Lancet.* 2018;391(10127):1263-1273. doi:10.1016/S0140-6736(18)30475-6

185- Signori A, Saccà F, Lanzillo R, et al. Cladribine vs other drugs in MS: Merging randomized trial with real-life data. Neurol Neuroimmunol Neuroinflamm. 2020;7(6):e878. doi:10.1212/NXI.0000000000000878

186- Rice GP, Filippi M, Comi G. Cladribine and progressive MS: clinical and MRI outcomes of a multicenter controlled trial. Cladribine MRI Study Group. Neurology. 2000;54(5):1145-1155. doi:10.1212/wnl.54.5.1145

187- Nabizadeh F, Mohamadi M, Rahmani S, et al. Safety and efficacy of cladribine in multiple sclerosis: a systematic review and meta-analysis. *Neurol Sci.* 2023;44(9):3045-3057. doi:10.1007/s10072-023-06794-w

188- Sorensen PS, Pontieri L, Joensen H, et al. Real-world experience of cladribine treatment in relapsing-remitting multiple sclerosis: A Danish nationwide study. *Mult Scler Relat Disord.* 2023;70:104491. doi:10.1016/j.msard.2022.104491

189- Buron MD, Chalmer TA, Sellebjerg F, et al. Initial high-efficacy disease-modifying therapy in multiple sclerosis: A nationwide cohort study. *Neurology*. 2020;95(8):e1041-e1051. doi:10.1212/WNL.0000000000010135

190- Filippi M, Amato MP, Centonze D, et al. Early use of high-efficacy disease-modifying therapies makes the difference in people with multiple sclerosis: an expert opinion. *J Neurol*. 2022;269(10):5382-5394. doi:10.1007/s00415-022-11193-w

191- Alroughani R, Inshasi JS, Deleu D, et al. An Overview of High-Efficacy Drugs for Multiple Sclerosis: Gulf Region Expert Opinion. *Neurol Ther*. 2019;8(1):13-23. doi:10.1007/s40120-019-0129-0

192- Morrow SA, Clift F, Devonshire V, et al. Use of natalizumab in persons with multiple sclerosis: 2022 update. *Mult Scler Relat Disord.* 2022;65:103995. doi:10.1016/j.msard.2022.103995

193- Khoy K, Mariotte D, Defer G, Petit G, Toutirais O, Le Mauff B. Natalizumab in Multiple Sclerosis Treatment: From Biological Effects to Immune Monitoring. *Front Immunol.* 2020;11:549842. doi:10.3389/fimmu.2020.549842

194- Butzkueven H, Kappos L, Pellegrini F, et al. Efficacy and safety of natalizumab in multiple sclerosis: interim observational programme results. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. 2014;85(11):1190-1197. doi:10.1136/jnnp-2013-306936

195- Toboso I, Tejeda-Velarde A, Alvarez-Lafuente R, et al. New Algorithms Improving PML Risk Stratification in MS Patients Treated With Natalizumab. *Front Neurol*. 2020;11:579438. doi:10.3389/fneur.2020.579438

196- Campagnolo D, Dong Q, Lee L, Ho PR, Amarante D, Koendgen H. Statistical analysis of PML incidences of natalizumab-treated patients from 2009 to 2016: outcomes after introduction of the Stratify JCV® DxSelect™ antibody assay. *J Neurovirol*. 2016;22(6):880-881. doi:10.1007/s13365-016-0482-z

197- Ruck T, Bittner S, Wiendl H, Meuth SG. Alemtuzumab in Multiple Sclerosis: Mechanism of Action and Beyond. *Int J Mol Sci*. 2015;16(7):16414-16439. doi:10.3390/ijms160716414

198- Kalincik T, Brown JWL, Robertson N, et al. Treatment effectiveness of alemtuzumab compared with natalizumab, fingolimod, and interferon beta in relapsing-remitting multiple sclerosis: a cohort study. *Lancet Neurol.* 2017;16(4):271-281. doi:10.1016/S1474-4422(17)30007-8

199- Coles AJ, Twyman CL, Arnold DL, et al. Alemtuzumab for patients with relapsing multiple sclerosis after disease-modifying therapy: a randomised controlled phase 3 trial. *Lancet*. 2012;380(9856):1829-1839. doi:10.1016/S0140-6736(12)61768-1

200- Yang J, Sun Y, Zhou X, et al. Risk of secondary autoimmune diseases with alemtuzumab treatment for multiple sclerosis: a systematic review and meta-analysis. *Front Immunol.* 2024;15:1343971. doi:10.3389/fimmu.2024.1343971

201- de Sèze J, Maillart E, Gueguen A, et al. Anti-CD20 therapies in multiple sclerosis: From pathology to the clinic. *Front Immunol.* 2023;14:1004795. doi:10.3389/fimmu.2023.1004795

202- Fernandes AA, Neves AL, Ferro D, et al. Clinical and analytical monitoring of patients with multiple sclerosis on anti-CD20 therapeutics: a real-world safety profile study. *Front Neurol*. 2025;15:1500763. doi:10.3389/fneur.2024.1500763

203- Baker D, Pryce G, James LK, Marta M, Schmierer K. The ocrelizumab phase II extension trial suggests the potential to improve the risk: Benefit balance in multiple sclerosis. *Mult Scler Relat Disord*. 2020;44:102279. doi:10.1016/j.msard.2020.102279

204- Bar-Or A, Grove RA, Austin DJ, et al. Subcutaneous ofatumumab in patients with relapsing-remitting multiple sclerosis: The MIRROR study. *Neurology*. 2018;90(20):e1805-e1814. doi:10.1212/WNL.0000000000005516

205- Sorensen PS, Lisby S, Grove R, et al. Safety and efficacy of ofatumumab in relapsing-remitting multiple sclerosis: a phase 2 study. *Neurology.* 2014;82(7):573-581. doi:10.1212/WNL.0000000000000125

206- Alonso R, Casas M, Rojas JI, et al. Progression independent of relapse activity (PIRA) in the Era of high-efficacy treatments. *Mult Scler Relat Disord*. 2025;104:106775. doi:10.1016/j.msard.2025.106775

207- Zhu C, Zhou Z, Kalincik T, et al. Persistent progression independent of relapse activity in multiple sclerosis. Brain Commun. 2025;7(5):fcaf306. doi:10.1093/braincomms/fcaf306

208- Cree BAC, Cutter G, Wolinsky JS, et al. Safety and efficacy of MD1003 (high-dose biotin) in patients with progressive multiple sclerosis (SPI2): a randomised, double-blind, placebo-controlled, phase 3 trial. Lancet Neurol. 2020;19(12):988-997. doi:10.1016/S1474-4422(20)30347-1

209- Chataway J, De Angelis F, Connick P, et al. Efficacy of three neuroprotective drugs in secondary progressive multiple sclerosis (MS-SMART): a phase 2b, multiarm, double-blind, randomised placebo-controlled trial. Lancet Neurol. 2020;19(3):214-225. doi:10.1016/S1474-4422(19)30485-5

210- Krämer J, Bar-Or A, Turner TJ, Wiendl H. Bruton tyrosine kinase inhibitors for multiple sclerosis. Nat Rev Neurol. 2023;19(5):289-304. doi:10.1038/s41582-023-00800-7

211- Fox RJ, Bar-Or A, Traboulsee A, et al. Tolebrutinib in Nonrelapsing Secondary Progressive Multiple Sclerosis. N Engl J Med. 2025;392(19):1883-1892. doi:10.1056/NEJMoa2415988

212- Roche. Resultados positivos del ensayo fase III fenebrutinib para tratar esclerosis múltiple. Comunicado de prensa. November 25, 2025. https://www.roche.es/actualidad/notas-prensa-producto/2025/noviembre/resultados-positivos-ensayo-fase-iii-fenebrutinib-roche-inhibidor-BTK-tratar-esclerosis-multiple

213- Rodríguez Murúa S, Farez MF, Quintana FJ. The Immune Response in Multiple Sclerosis. Annu Rev Pathol. 2022;17:121-139. doi:10.1146/annurev-pathol-052920-040318

214- Frischer JM, Bramow S, Dal-Bianco A, et al. The relation between inflammation and neurodegeneration in multiple sclerosis brains. *Brain.* 2009;132(Pt 5):1175-1189. doi:10.1093/brain/awp070

215- Kolb H, Al-Louzi O, Beck ES, Sati P, Absinta M, Reich DS. From pathology to MRI and back: Clinically relevant biomarkers of multiple sclerosis lesions. *Neuroimage Clin.* 2022;36:103194. doi:10.1016/j.nicl.2022.103194

216- Boutitah-Benyaich I, Eixarch H, Villacieros-Álvarez J, et al. Multiple sclerosis: molecular pathogenesis and therapeutic intervention. *Signal Transduct Target Ther*. 2025;10(1):324. doi:10.1038/s41392-025-02415-4

217- Attfield KE, Jensen LT, Kaufmann M, Friese MA, Fugger L. The immunology of multiple sclerosis. *Nat Rev Immunol.* 2022;22(12):734-750. doi:10.1038/s41577-022-00718-z

218- Molina-Gonzalez I, Miron VE, Antel JP. Chronic oligodendrocyte injury in central nervous system pathologies. *Commun Biol.* 2022;5(1):1274. doi:10.1038/s42003-022-04248-1

219- Lubetzki C, Zalc B, Williams A, Stadelmann C, Stankoff B. Remyelination in multiple sclerosis: from basic science to clinical translation. *Lancet Neurol.* 2020;19(8):678-688. doi:10.1016/S1474-4422(20)30140-X

220- Chang A, Tourtellotte WW, Rudick R, Trapp BD. Premyelinating oligodendrocytes in chronic lesions of multiple sclerosis. *N Engl J Med.* 2002;346(3):165-173. doi:10.1056/NEJMoa010994

221- Rouillard ME, Hu J, Sutter PA, Kim HW, Huang JK, Crocker SJ. The Cellular Senescence Factor Extracellular HMGB1 Directly Inhibits Oligodendrocyte Progenitor Cell Differentiation and Impairs CNS Remyelination. *Front Cell Neurosci.* 2022;16:833186. doi:10.3389/fncel.2022.833186

222- Kosa P, Barbour C, Varosanec M, et al. Molecular models of multiple sclerosis severity identify heterogeneity of pathogenic mechanisms. *Nat Commun*. 2022;13(1):7670. doi:10.1038/s41467-022-35357-4

223- Calabrese M, Magliozzi R, Ciccarelli O, Geurts JJ, Reynolds R, Martin R. Exploring the origins of grey matter damage in multiple sclerosis. *Nat Rev Neurosci.* 2015;16(3):147-158. doi:10.1038/nrn3900

224- Magliozzi R, Howell O, Vora A, et al. Meningeal B-cell follicles in secondary progressive multiple sclerosis associate with early onset of disease and severe cortical pathology. *Brain.* 2007;130(Pt 4):1089-1104. doi:10.1093/BRAIN/AWM038

225- Bevan RJ, Evans R, Griffiths L, et al. Meningeal inflammation and cortical demyelination in acute multiple sclerosis. *Ann Neurol.* 2018;84(6):829-842. doi:10.1002/ana.25365

226- Ransohoff RM. Multiple sclerosis: role of meningeal lymphoid aggregates in progression independent of relapse activity. *Trends Immunol*. 2023;44(4):266-275. doi:10.1016/j.it.2023.02.002

227- Dal-Bianco A, Grabner G, Kronnerwetter C, et al. Slow expansion of multiple sclerosis iron rim lesions: pathology and 7 T magnetic resonance imaging. *Acta Neuropathol.* 2017;133(1):25-42. doi:10.1007/s00401-016-1636-z

228- Jonkman LE, Soriano AL, Amor S, et al. Can MS lesion stages be distinguished with MRI? A postmortem MRI and histopathology study. *J Neurol.* 2015;262(4):1074-1080. doi:10.1007/s00415-015-7689-4

229- Sethi V, Nair G, Absinta M, et al. Slowly eroding lesions in multiple sclerosis. *Mult Scler.* 2017;23(3):464-472. doi:10.1177/1352458516655403

230- Dempsey LA. Molecular mimicry in MS. *Nat Immunol*. 2022;23(3):343. doi:10.1038/s41590-022-01156-8

231- Sattarnezhad N, Kockum I, Thomas OG, et al. Antibody reactivity against EBNA1 and GlialCAM differentiates multiple sclerosis patients from healthy controls. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2025;122(11):e2424986122. doi:10.1073/pnas.2424986122

232- Münz C, Lünemann JD, Getts MT, Miller SD. Antiviral immune responses: triggers of or triggered by autoimmunity? *Nat Rev Immunol.* 2009;9(4):246-258. doi:10.1038/NRI2527

233- Duffy SS, Lees JG, Moalem-Taylor G. The contribution of immune and glial cell types in experimental autoimmune encephalomyelitis and multiple sclerosis. *Mult Scler Int.* 2014;2014:285245. doi:10.1155/2014/285245

234- Sun L, Su Y, Jiao A, Wang X, Zhang B. T cells in health and disease. *Signal Transduct Target Ther.* 2023;8(1):235. doi:10.1038/s41392-023-01471-y

235- Van Kaer L, Postoak JL, Wang C, Yang G, Wu L. Innate, innate-like and adaptive lymphocytes in the pathogenesis of MS and EAE. *Cell Mol Immunol.* 2019;16(6):531-539. doi:10.1038/s41423-019-0221-5

236- Schetters STT, Gomez-Nicola D, Garcia-Vallejo JJ, Van Kooyk Y. Neuroinflammation: Microglia and T Cells Get Ready to Tango. *Front Immunol.* 2018;8:1905. doi:10.3389/fimmu.2017.01905

237- Gandhi R, Laroni A, Weiner HL. Role of the innate immune system in the pathogenesis of multiple sclerosis. *J Neuroimmunol*. 2010;221(1-2):7-14. doi:10.1016/j.jneuroim.2009.10.015

238- Liu R, Du S, Zhao L, et al. Autoreactive lymphocytes in multiple sclerosis: Pathogenesis and treatment target. *Front Immunol.* 2022;13:996469. doi:10.3389/fimmu.2022.996469

239- Yong VW, Zabad RK, Agrawal S, Goncalves Dasilva A, Metz LM. Elevation of matrix metalloproteinases (MMPs) in multiple sclerosis and impact of immunomodulators. *J Neurol Sci.* 2007;259(1-2):79-84. doi:10.1016/j.jns.2006.11.021

240- Khaibullin T, Ivanova V, Martynova E, et al. Elevated Levels of Proinflammatory Cytokines in Cerebrospinal Fluid of Multiple Sclerosis Patients. *Front Immunol.* 2017;8:531. doi:10.3389/fimmu.2017.00531

241- Herz J, Filiano AJ, Wiltbank AT, Yogev N, Kipnis J. Myeloid Cells in the Central Nervous System. *Immunity*. 2017;46(6):943-956. doi:10.1016/j.immuni.2017.06.007

242- Oechtering J, Stein K, Schaedelin SA, et al. Complement Activation Is Associated With Disease Severity in Multiple Sclerosis. *Neurol Neuroimmunol Neuroinflamm*. 2024;11(2):e200212. doi:10.1212/NXI.0000000000200212

243- Comi G, Bar-Or A, Lassmann H, et al. Role of B Cells in Multiple Sclerosis and Related Disorders. *Ann Neurol.* 2021;89(1):13-23. doi:10.1002/ana.25927

244- López-Muguruza E, Matute C. Alterations of Oligodendrocyte and Myelin Energy Metabolism in Multiple Sclerosis. *Int J Mol Sci.* 2023;24(16):12912. doi:10.3390/ijms241612912

245- Mulica P, Grünewald A, Pereira SL. Astrocyte-Neuron Metabolic Crosstalk in Neurodegeneration: A Mitochondrial Perspective. *Front Endocrinol (Lausanne).* 2021;12:668517. doi:10.3389/fendo.2021.668517

246- McMahon EJ, Bailey SL, Castenada CV, Waldner H, Miller SD. Epitope spreading initiates in the CNS in two mouse models of multiple sclerosis. *Nat Med.* 2005;11(3):335-339. doi:10.1038/NM1202

247- Absinta M, Maric D, Gharagozloo M, et al. A lymphocyte-microglia-astrocyte axis in chronic active multiple sclerosis. Nature. 2021;597(7878):709-714. doi:10.1038/s41586-021-03892-7

248- Ahmed SM, Fransen NL, Touil H, et al. Accumulation of meningeal lymphocytes correlates with white matter lesion activity in progressive multiple sclerosis. *JCI Insight.* 2022;7(5):e151683. doi:10.1172/jci.insight.151683

249- Prineas JW, Parratt JDE. Multiple Sclerosis: Microglia, Monocytes, and Macrophage-Mediated Demyelination. *J Neuropathol Exp Neurol*. 2021;80(10):975-996. doi:10.1093/jnen/nlab083

250- Chen C, Shu Y, Yan C, et al. Astrocyte-derived clusterin disrupts glial physiology to obstruct remyelination in mouse models of demyelinating diseases. *Nat Commun.* 2024;15(1):7791. doi:10.1038/s41467-024-52142-7

251- Pettinelli CB, McFarlin DE. Adoptive transfer of experimental allergic encephalomyelitis in SJL/J mice after in vitro activation of lymph node cells by myelin basic protein: requirement for Lyt 1+ 2- T lymphocytes. *J Immunol.* 1981;127(4):1420-1423.

252- Zamvil S, Nelson P, Trotter J, et al. T-cell clones specific for myelin basic protein induce chronic relapsing paralysis and demyelination. *Nature.* 1985;317(6035):355-358. doi:10.1038/317355a0

253- Hauser SL, Bhan AK, Gilles F, Kemp M, Kerr C, Weiner HL. Immunohistochemical analysis of the cellular infiltrate in multiple sclerosis lesions. *Ann Neurol.* 1986;19(6):578-587. doi:10.1002/ana.410190610

254- Alvermann S, Hennig C, Stüve O, Wiendl H, Stangel M. Immunophenotyping of cerebrospinal fluid cells in multiple sclerosis: in search of biomarkers. *JAMA Neurol.* 2014;71(7):905-912. doi:10.1001/jamaneurol.2014.395

255- Jilek S, Schluep M, Rossetti AO, et al. CSF enrichment of highly differentiated $CD8^+$ T cells in early multiple sclerosis. *Clin Immunol.* 2007;123(1):105-113. doi:10.1016/j.clim.2006.11.004

256- de Graaf MT, Smitt PA, Luitwieler RL, et al. Central memory CD4+ T cells dominate the normal cerebrospinal fluid. *Cytometry B Clin Cytom*. 2011;80(1):43-50. doi:10.1002/cyto.b.20542

257- Mazziotti V, Crescenzo F, Turano E, et al. The contribution of tumor necrosis factor to multiple sclerosis: a possible role in progression independent of relapse?. *J Neuroinflammation*. 2024;21(1):209. doi:10.1186/s12974-024-03193-6

258- Milovanovic J, Arsenijevic A, Stojanovic B, et al. Interleukin-17 in Chronic Inflammatory Neurological Diseases. *Front Immunol.* 2020;11:947. doi:10.3389/fimmu.2020.00947

259- Volpe E, Battistini L, Borsellino G. Advances in T Helper 17 Cell Biology: Pathogenic Role and Potential Therapy in Multiple Sclerosis. *Mediators Inflamm.* 2015;2015:475158. doi:10.1155/2015/475158

260- Stojić-Vukanić Z, Pilipović I, Vujnović I, et al. GM-CSF-Producing Th Cells in Rats Sensitive and Resistant to Experimental Autoimmune Encephalomyelitis. *PLoS One.* 2016;11(11):e0166498. doi:10.1371/journal.pone.0166498

261- Danikowski KM, Jayaraman S, Prabhakar BS. Regulatory T cells in multiple sclerosis and myasthenia gravis. *J Neuroinflammation.* 2017;14(1):117. doi:10.1186/s12974-017-0892-8

262- Goverman JM. Regulatory T Cells in Multiple Sclerosis. *N Engl J Med.* 2021;384(6):578-580. doi:10.1056/NEJMcibr2033544

263- Astier AL, Hafler DA. Abnormal Tr1 differentiation in multiple sclerosis. *J Neuroimmunol.* 2007;191(1-2):70-78. doi:10.1016/j.jneuroim.2007.09.018

264- Schneider A, Long SA, Cerosaletti K, et al. In active relapsing-remitting multiple sclerosis, effector T cell resistance to adaptive T(regs) involves IL-6-mediated signaling. *Sci Transl Med.* 2013;5(170):170ra15. doi:10.1126/scitranslmed.3004970

265- Viglietta V, Baecher-Allan C, Weiner HL, Hafler DA. Loss of functional suppression by CD4+ CD25+ regulatory T cells in patients with multiple sclerosis. *J Exp Med.* 2004;199(7):971-979. doi:10.1084/jem.20031579

266- Venken K, Hellings N, Thewissen M, et al. Compromised CD4+ CD25(high) regulatory T-cell function in patients with relapsing-remitting multiple sclerosis is correlated with a reduced frequency of FOXP3-positive cells and reduced FOXP3 expression at the single-cell level. *Immunology.* 2008;123(1):79-89. doi:10.1111/j.1365-2567.2007.02690.x

267- International Multiple Sclerosis Genetics Consortium (IMSGC), Beecham AH, Patsopoulos NA, et al. Analysis of immune-related loci identifies 48 new susceptibility variants for multiple sclerosis. *Nat Genet.* 2013;45(11):1353-1360. doi:10.1038/ng.2770

268- Salou M, Nicol B, Garcia A, Laplaud DA. Involvement of CD8(+) T Cells in Multiple Sclerosis. *Front Immunol.* 2015;6:604. doi:10.3389/fimmu.2015.00604

269- Shi FD, Yong VW. Neuroinflammation across neurological diseases. *Science*. 2025;388(6753):eadx0043. doi:10.1126/science.adx0043

270- Höftberger R, Aboul-Enein F, Brueck W, et al. Expression of major histocompatibility complex class I molecules on the different cell types in multiple sclerosis lesions. *Brain Pathol.* 2004;14(1):43-50. doi:10.1111/j.1750-3639.2004.tb00496.x

271- Malmeström C, Lycke J, Haghighi S, et al. Relapses in multiple sclerosis are associated with increased CD8+ T-cell mediated cytotoxicity in CSF. *J Neuroimmunol.* 2008;196(1-2):159-165. doi:10.1016/j.jneuroim.2008.03.001

272- Huseby ES, Huseby PG, Shah S, Smith R, Stadinski BD. Pathogenic CD8 T cells in multiple sclerosis and its experimental models. *Front Immunol*. 2012;3:64. doi:10.3389/fimmu.2012.00064

273- Salehi Z, Doosti R, Beheshti M, Janzamin E, Sahraian MA, Izad M. Differential Frequency of CD8+ T Cell Subsets in Multiple Sclerosis Patients with Various Clinical Patterns. *PLoS One.* 2016;11(7):e0159565. doi:10.1371/journal.pone.0159565

274- Sádaba MC, Tzartos J, Paíno C, et al. Axonal and oligodendrocyte-localized IgM and IgG deposits in MS lesions. *J Neuroimmunol.* 2012;247(1-2):86-94. doi:10.1016/j.jneuroim.2012.03.020

275- DiSano KD, Gilli F, Pachner AR. Memory B Cells in Multiple Sclerosis: Emerging Players in Disease Pathogenesis. *Front Immunol*. 2021;12:676686. doi:10.3389/fimmu.2021.676686

276- RegevMonaco S, Nicholas R, Reynolds R, Magliozzi R. Intrathecal Inflammation in Progressive Multiple Sclerosis. *Int J Mol Sci.* 2020;21(21):8217. doi:10.3390/ijms21218217

277- Gardner C, Magliozzi R, Durrenberger PF, Howell OW, Rundle J, Reynolds R. Cortical grey matter demyelination can be induced by elevated pro-inflammatory cytokines in the subarachnoid space of MOG-immunized rats. *Brain.* 2013;136(Pt 12):3596-3608. doi:10.1093/brain/awt279

278- Li R, Rezk A, Miyazaki Y, et al. Proinflammatory GM-CSF-producing B cells in multiple sclerosis and B cell depletion therapy. *Sci Transl Med*. 2015;7(310):310ra166.

279- Ireland SJ, Monson NL, Davis LS. Seeking balance: Potentiation and inhibition of multiple sclerosis autoimmune responses by IL-6 and IL-10. *Cytokine.* 2015;73(2):236-244. doi:10.1016/j.cyto.2015.01.009

280- Hemmer B, Kerschensteiner M, Korn T. Role of the innate and adaptive immune responses in the course of multiple sclerosis. *Lancet Neurol.* 2015;14(4):406-419. doi:10.1016/S1474-4422(14)70305-9

281- Shapouri-Moghaddam A, Mohammadian S, Vazini H, et al. Macrophage plasticity, polarization, and function in health and disease. *J Cell Physiol*. 2018;233(9):6425-6440. doi:10.1002/jcp.26429

282- Mado H, Adamczyk-Sowa M, Sowa P. Role of Microglial Cells in the Pathophysiology of MS: Synergistic or Antagonistic?. *Int J Mol Sci.* 2023;24(3):1861. doi:10.3390/

283- Castellazzi M, Ligi D, Contaldi E, et al. Multiplex Matrix Metalloproteinases Analysis in the Cerebrospinal Fluid Reveals Potential Specific Patterns in Multiple Sclerosis Patients. *Front Neurol.* 2018;9:1080. doi:10.3389/fneur.2018.01080

284- Vermersch P, Airas L, Berger T, et al. The role of microglia in multiple sclerosis: implications for treatment with Bruton's tyrosine kinase inhibitors. *Front Immunol*. 2025;16:1495529. doi:10.3389/fimmu.2025.1495529

285- Bar-Or A, Li R. Cellular immunology of relapsing multiple sclerosis: interactions, checks, and balances. *Lancet Neurol.* 2021;20(6):470-483. doi:10.1016/S1474-4422(21)00063-6

286- Chen Z, Jalabi W, Hu W, et al. Microglial displacement of inhibitory synapses provides neuroprotection in the adult brain. *Nat Commun.* 2014;5:4486. doi:10.1038/ncomms5486

287- Ponath G, Park C, Pitt D. The Role of Astrocytes in Multiple Sclerosis. *Front Immunol.* 2018;9:217. doi:10.3389/fimmu.2018.00217

288- Ghafouri-Fard S, Honarmand K, Taheri M. A comprehensive review on the role of chemokines in the pathogenesis of multiple sclerosis. *Metab Brain Dis*. 2021;36(3):375-406. doi:10.1007/s11011-020-00648-6

289- Correale J, Farez MF. The Role of Astrocytes in Multiple Sclerosis Progression. *Front Neurol.* 2015;6:180. doi:10.3389/fneur.2015.00180

290- Mandal A, Viswanathan C. Natural killer cells: In health and disease. *Hematol Oncol Stem Cell Ther.* 2015;8(2):47-55. doi:10.1016/j.hemonc.2014.11.006

291- Kaur G, Trowsdale J, Fugger L. Natural killer cells and their receptors in multiple sclerosis. *Brain.* 2013;136(Pt 9):2657-2676. doi:10.1093/brain/aws159

292- Gross CC, Ahmetspahic D, Ruck T, et al. Alemtuzumab treatment alters circulating innate immune cells in multiple sclerosis. *Neurol Neuroimmunol Neuroinflamm.* 2016;3(6):e289. doi:10.1212/NXI.0000000000000289

293- Ranganath T, Simpson LJ, Ferreira AM, et al. Characterization of the Impact of Daclizumab Beta on Circulating Natural Killer Cells by Mass Cytometry. *Front Immunol.* 2020;11:714. doi:10.3389/fimmu.2020.00714

294- Caruana P, Lemmert K, Ribbons K, Lea R, Lechner-Scott J. Natural killer cell subpopulations are associated with MRI activity in a relapsing-remitting multiple sclerosis patient cohort from Australia. *Mult Scler.* 2017;23(11):1479-1487. doi:10.1177/1352458516679267

295- Laroni A, Uccelli A. CD56bright Natural Killer Cells: A Possible Biomarker of Different Treatments in Multiple Sclerosis. *J Clin Med*. 2020;9(5):1450. doi:10.3390/jcm9051450

296- Lagumersindez-Denis N, Wrzos C, Mack M, et al. Differential contribution of immune effector mechanisms to cortical demyelination in multiple sclerosis. *Acta Neuropathol.* 2017;134(1):15-34. doi:10.1007/s00401-017-1706-x

297- Rodríguez-Lorenzo S, van Olst L, Rodriguez-Mogeda C, et al. Single-cell profiling reveals periventricular CD56bright NK cell accumulation in multiple sclerosis. *Elife*. 2022;11:e73849. doi:10.7554/eLife.73849

298- Van Kaer L, Wu L, Parekh VV. Natural killer T cells in multiple sclerosis and its animal model, experimental autoimmune encephalomyelitis. *Immunology*. 2015;146(1):1-10. doi:10.1111/imm.12485

299- Kister I, Chamot E, Salter AR, Cutter GR, Bacon TE, Herbert J. Disability in multiple sclerosis: a reference for patients and clinicians. *Neurology*. 2013;80(11):1018-1024. doi:10.1212/WNL.0b013e3182872855

300- Maarouf A, Stellmann JP, Rico A, et al. Active and non-active progression independent of relapse activity within the first 20 years of relapsing multiple sclerosis. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. 2024;95(10):974-978. Published 2024 Sep 17. doi:10.1136/jnnp-2024-333597

301- Kappos L, Wolinsky JS, Giovannoni G, et al. Contribution of Relapse-Independent Progression vs Relapse-Associated Worsening to Overall Confirmed Disability Accumulation in Typical Relapsing Multiple Sclerosis in a Pooled Analysis of 2 Randomized Clinical Trials. *JAMA Neurol.* 2020;77(9):1132-1140. doi:10.1001/jamaneurol.2020.1568

302- Scalfari A, Traboulsee A, Oh J, et al. Smouldering-Associated Worsening in Multiple Sclerosis: An International Consensus Statement on Definition, Biology, Clinical Implications, and Future Directions. Ann Neurol. 2024;96(5):826-845. doi:10.1002/ana.27034

303- Ciccarelli O, Barkhof F, Calabrese M, et al. Using the Progression Independent of Relapse Activity Framework to Unveil the Pathobiological Foundations of Multiple Sclerosis. *Neurology.* 2024;103(1):e209444. doi:10.1212/WNL.0000000000209444

304- Rotstein D, Montalban X. Reaching an evidence-based prognosis for personalized treatment of multiple sclerosis. *Nat Rev Neurol.* 2019;15(5):287-300. doi:10.1038/s41582-019-0170-8

305- Iaffaldano P, Portaccio E, Lucisano G, et al. Multiple Sclerosis Progression and Relapse Activity in Children. *JAMA Neurol*. 2024;81(1):50-58. doi:10.1001/jamaneurol.2023.4455

306- Weideman AM, Tapia-Maltos MA, Johnson K, Greenwood M, Bielekova B. Meta-analysis of the Age-Dependent Efficacy of Multiple Sclerosis Treatments. Front Neurol. 2017;8:577. doi:10.3389/fneur.2017.00577

307- Lassmann H. Pathogenic Mechanisms Associated With Different Clinical Courses of Multiple Sclerosis. *Front Immunol.* 2019;9(JAN). doi:10.3389/FIMMU.2018.03116

308- Rist JM, Franklin RJM. Taking ageing into account in remyelination-based therapies for multiple sclerosis. *J Neurol Sci.* 2008;274(1-2):64-67. doi:10.1016/J.JNS.2008.04.027

309- Musella A, Gentile A, Rizzo FR, et al. Interplay Between Age and Neuroinflammation in Multiple Sclerosis: Effects on Motor and Cognitive Functions. *Front Aging Neurosci.* 2018;10:238. doi:10.3389/fnagi.2018.00238

310- Alvarez-Sanchez N, Dunn SE. Potential biological contributers to the sex difference in multiple sclerosis progression. *Front Immunol.* 2023;14:1175874. doi:10.3389/fimmu.2023.1175874

311- Confavreux C, Vukusic S. Age at disability milestones in multiple sclerosis. *Brain*. 2006;129(3):595-605. doi:10.1093/brain/awh714

312- Ventura RE, Antezana AO, Bacon T, Kister I. Hispanic Americans and African Americans with multiple sclerosis have more severe disease course than Caucasian Americans. *Mult Scler.* 2017;23(11):1554-1557. doi:10.1177/1352458516679894

313- Sidhom Y, Maillart E, Du Montcel ST, et al. Fast multiple sclerosis progression in North Africans: Both genetics and environment matter. *Neurology.* 2017;88(13):1218-1225. doi:10.1212/WNL.0000000000003762

314- Kowalec K, McKay KA, Patten SB, et al. Comorbidity increases the risk of relapse in multiple sclerosis: A prospective study. *Neurology.* 2017;89(24):2455-2461. doi:10.1212/WNL.0000000000004716

315- Salter A, Lancia S, Kowalec K, Fitzgerald KC, Marrie RA. Comorbidity and Disease Activity in Multiple Sclerosis. *JAMA Neurol*. doi:10.1001/jamaneurol.2024.2920

316- Goodin DS, Reder AT, Bermel RA, et al. Relapses in multiple sclerosis: Relationship to disability. *Mult Scler Relat Disord*. 2016;6:10-20. doi:10.1016/j.msard.2015.09.002

317- Scalfari A, Neuhaus A, Degenhardt A, et al. The natural history of multiple sclerosis, a geographically based study 10: Relapses and long-term disability. *Brain.* 2010;133(7):1914-1929. doi:10.1093/brain/awq118

318- Kalincik T, Manouchehrinia A, Sobisek L, et al. Towards personalized therapy for multiple sclerosis: Prediction of individual treatment response. *Brain.* 2017;140(9):2426-2443. doi:10.1093/brain/awx185

319- Fahrbach K, Huelin R, Martin AL, et al. Relating relapse and T2 lesion changes to disability progression in multiple sclerosis: a systematic literature review and regression analysis. *BMC Neurol.* 2013;13. doi:10.1186/1471-2377-13-180

320- Novotna M, Paz Soldán MM, Zeid NA, et al. Poor early relapse recovery affects onset of progressive disease course in multiple sclerosis. *Neurology.* 2015;85(8):722-729. doi:10.1212/WNL.0000000000001856

321- Sotiropoulos MG, Lokhande H, Healy BC, et al. Relapse recovery in multiple sclerosis: Effect of treatment and contribution to long-term disability. *Mult Scler J Exp Transl Clin.* 2021;7(2):20552173211015503. doi:10.1177/20552173211015503

322- Vercellino M, Romagnolo A, Mattioda A, et al. Multiple sclerosis relapses: A multivariable analysis of residual disability determinants. *Acta Neurol Scand.* 2009;119(2):126-130. doi:10.1111/j.1600-0404.2008.01076.x

323- Barkhof F. The clinico-radiological paradox in multiple sclerosis revisited. *Curr Opin Neurol.* 2002;15(3):239-245. doi:10.1097/00019052-200206000-00003

324- Tintore M, Rovira À, Río J, et al. Defining high, medium and low impact prognostic factors for developing multiple sclerosis. *Brain.* 2015;138(7):1863-1874. doi:10.1093/brain/awv105

325- Mostert JP, Koch MW, Steen C, Heersema DJ, De Groot JC, De Keyser J. T2 lesions and rate of progression of disability in multiple sclerosis. *Eur J Neurol.* 2010;17(12):1471-1475. doi:10.1111/j.1468-1331.2010.03093.x

326- Lie IA, Weeda MM, Mattiesing RM, et al. Relationship between White Matter Lesions and Gray Matter Atrophy in Multiple Sclerosis. *Neurology.* 2022;98(15):E1562-E1573. doi:10.1212/WNL.0000000000200006

327- Amato MP, Portaccio E, Goretti B, et al. Association of neocortical volume changes with cognitive deterioration in relapsing-remitting multiple sclerosis. *Arch Neurol.* 2007;64(8):1157-1161. doi:10.1001/archneur.64.8.1157

328- Lavorgna L, Bonavita S, Ippolito D, et al. Clinical and magnetic resonance imaging predictors of disease progression in multiple sclerosis: a nine-year follow-up study. *Mult Scler.* 2014;20(2):220-226. doi:10.1177/1352458513494958

329- Pérez-Miralles F, Sastre-Garriga J, Tintoré M, et al. Clinical impact of early brain atrophy in clinically isolated syndromes. *Mult Scler.* 2013;19(14):1878-1886. doi:10.1177/13524585134

330- Rovira À, Swanton J, Tintoré M, et al. A single, early magnetic resonance imaging study in the diagnosis of multiple sclerosis. *Arch Neurol.* 2009;66(5):587-592. doi:10.1001/ARCHNEUROL.2009.49 88231

331- Brownlee WJ, Altmann DR, Prados F, et al. Early imaging predictors of long-term outcomes in relapse-onset multiple sclerosis. *Brain.* 2019;142(8):2276-2287. doi:10.1093/brain/awz156

332- Zarco LA, Cárdenas-Cruz AF, Muñoz Ó, Cañellas AR. Paramagnetic iron rim lesions as a prognostic factor for disability progression in multiple sclerosis: A systematic review of the literature. *Mult Scler Relat Disord*. doi:10.1016/j.msard.2025.106804

333- Calvi A, Tur C, Chard D, et al. Slowly expanding lesions relate to persisting black-holes and clinical outcomes in relapse-onset multiple sclerosis. *Neuroimage Clin*. 2022;35:103048. doi:10.1016/j.nicl.2022.103048

334- Di Filippo M, Gaetani L, Centonze D, et al. Fluid biomarkers in multiple sclerosis: from current to future applications. *Lancet Reg Health Eur.* 2024;44:101009. doi:10.1016/j.lanepe.2024.101009

335- Tolentino M, Pace F, Perantie DC, et al. Cerebrospinal fluid biomarkers as predictors of multiple sclerosis severity. *Mult Scler Relat Disord*. 2025;94:106268. doi:10.1016/j.msard.2025.106268

336- Villar LM, Masjuan J, González-Porqué P, et al. Intrathecal IgM synthesis is a prognostic factor in multiple sclerosis. *Ann Neurol.* 2003;53(2):222-226. doi:10.1002/ana.10441

337- Capuano R, Zubizarreta I, Alba-Arbalat S, et al. Oligoclonal IgM bands in the cerebrospinal fluid of patients with relapsing MS to inform long-term MS disability. *Mult Scler.* 2021;27(11):1706-1716. doi:10.1177/1352458520981910

338- Villar LM, García-Barragán N, Espiño M, et al. Influence of oligoclonal IgM specificity in multiple sclerosis disease course. *Multiple Sclerosis.* 2008;14(2):183-187. doi:10.1177/1352458507082046

339- Monreal E, Sainz de la Maza S, Costa-Frossard L, et al. Predicting Aggressive Multiple Sclerosis With Intrathecal IgM Synthesis Among Patients With a Clinically Isolated Syndrome. *Neurol Neuroimmunol Neuroinflamm.* 2021;8(5):e1047. doi:10.1212/NXI.0000000000001047

340- Coll-Martinez C, Quintana E, Buxó M, et al. Oligoclonal IgM bands are a promising biomarker for long-term cognitive outcomes in multiple sclerosis. *Mult Scler Relat Disord.* 2022;68:104397. doi:10.1016/j.msard.2022.104397

341- Talaat F, Abdelatty S, Ragaie C, Dahshan A. Chitinase-3-like 1-protein in CSF: a novel biomarker for progression in patients with multiple sclerosis. *Neurol Sci.* 2023;44(9):3243-3252. doi:10.1007/s10072-023-06764-2

342- Comabella M, Clarke MA, Schaedelin S, et al. CSF chitinase 3-like 1 is associated with iron rims in patients with a first demyelinating event. *Mult Scler.* 2022;28(1):71-81. doi:10.1177/13524585211010082

343- Schneider R, Bellenberg B, Gisevius B, et al. Chitinase 3-like 1 and neurofilament light chain in CSF and CNS atrophy in MS. *Neurology(R) neuroimmunology & neuroinflammation.* 2020;8(1). doi:10.1212/NXI.0000000000000906

344- Cantó E, Tintoré M, Villar LM, et al. Chitinase 3-like 1: prognostic biomarker in clinically isolated syndromes. *Brain.* 2015;138(Pt 4):918-931. doi:10.1093/brain/awv017

345- Brenner M. Role of GFAP in CNS injuries. *Neurosci Lett.* 2014;565:7-13. doi:10.1016/J.NEULET.2014.01.055

346- Martínez MA, Olsson B, Bau L, et al. Glial and neuronal markers in cerebrospinal fluid predict progression in multiple sclerosis. *Mult Scler.* 2015;21(5):550-561. doi:10.1177/1352458514549397

347- Azzolini F, Gilio L, Pavone L, et al. Neuroinflammation Is Associated with GFAP and sTREM2 Levels in Multiple Sclerosis. *Biomolecules.* 2022;12(2):222. doi:10.3390/biom12020222

348- Abdelhak A, Hottenrott T, Morenas-Rodríguez E, et al. Glial Activation Markers in CSF and Serum From Patients With Primary Progressive Multiple Sclerosis: Potential of Serum GFAP as Disease Severity Marker?. *Front Neurol.* 2019;10:280. doi:10.3389/fneur.2019.00280

349- Varhaug KN, Torkildsen Ø, Myhr KM, Vedeler CA. Neurofilament Light Chain as a Biomarker in Multiple Sclerosis. *Front Neurol.* 2019;10:338. doi:10.3389/fneur.2019.00338

350- Engel S, Protopapa M, Steffen F, et al. Implications of extreme serum neurofilament light chain levels for the management of patients with relapsing multiple sclerosis. *Ther Adv Neurol Disord*. 2021;14:17562864211001977. doi:10.1177/17562864211001977

351- Freedman MS, Gnanapavan S, Booth RA, et al. Guidance for use of neurofilament light chain as a cerebrospinal fluid and blood biomarker in multiple sclerosis management. *EBioMedicine.* 2024;101:104970. doi:10.1016/j.ebiom.2024.104970

352- Villar LM, Picón C, Costa-Frossard L, et al. Cerebrospinal fluid immunological biomarkers associated with axonal damage in multiple sclerosis. *Eur J Neurol.* 2015;22(8):1169-1175. doi:10.1111/ene.12579

353- Novakova L, Zetterberg H, Sundström P, et al. Monitoring disease activity in multiple sclerosis using serum neurofilament light protein. *Neurology.* 2017;89(22):2230-2237. doi:10.1212/WNL.0000000000004683

354- Arrambide G, Espejo C, Eixarch H, et al. Neurofilament light chain level is a weak risk factor for the development of MS. *Neurology.* 2016;87(11):1076-1084. doi:10.1212/WNL.0000000000003085

355- Kuhle J, Barro C, Andreasson U, et al. Comparison of three analytical platforms for quantification of the neurofilament light chain in blood samples: ELISA, electrochemiluminescence immunoassay and Simoa. *Clin Chem Lab Med.* 2016;54(10):1655-1661. doi:10.1515/cclm-2015-1195

356- Nötzel M, Werder LI, Ziemssen T, Akgün K. Ella versus Simoa Serum Neurofilament Assessment to Monitor Treatment Response in Highly Active Multiple Sclerosis Patients. *Int J Mol Sci.* 2022;23(20):12361. doi:10.3390/ijms232012361

357- Bergman J, Dring A, Zetterberg H, et al. Neurofilament light in CSF and serum is a sensitive marker for axonal white matter injury in MS. *Neurol Neuroimmunol Neuroinflamm.* 2016;3(5). doi:10.1212/NXI.0000000000000271

358- Khalil M, Teunissen CE, Lehmann S, et al. Neurofilaments as biomarkers in neurological disorders - towards clinical application. *Nat Rev Neurol.* 2024;20(5):269-287. doi:10.1038/s41582-024-00955-x

359- Bose G, Healy BC, Saxena S, et al. Early neurofilament light and glial fibrillary acidic protein levels improve predictive models of multiple sclerosis outcomes. *Mult Scler Relat Disord*. 2023;74:104695. doi:10.1016/j.msard.2023.104695

360- Thebault S, Bose G, Booth R, Freedman MS. Serum neurofilament light in MS: The first true blood-based biomarker?. *Mult Scler.* 2022;28(10):1491-1497. doi:10.1177/1352458521993066

361- Bittner S, Oh J, Havrdová EK, Tintoré M, Zipp F. The potential of serum neurofilament as biomarker for multiple sclerosis. *Brain.* 2021;144(10):2954-2963. doi:10.1093/brain/awab241

362- Kuhle J, Kropshofer H, Haering DA, et al. Blood neurofilament light chain as a biomarker of MS disease activity and treatment response. *Neurology.* 2019;92(10):E1007-E1015. doi:10.1212/WNL.0000000000007032

363- Steffen F, Uphaus T, Ripfel N, et al. Serum Neurofilament Identifies Patients With Multiple Sclerosis With Severe Focal Axonal Damage in a 6-Year Longitudinal Cohort. *Neurol Neuroimmunol Neuroinflamm.* 2022;10(1):e200055. doi:10.1212/NXI.0000000000200055

364- Ning L, Wang B. Neurofilament light chain in blood as a diagnostic and predictive biomarker for multiple sclerosis: A systematic review and meta-analysis. *PLoS One.* 2022;17(9):e0274565. doi:10.1371/journal.pone.0274565

365- Bjornevik K, Munger KL, Cortese M, et al. Serum Neurofilament Light Chain Levels in Patients With Presymptomatic Multiple Sclerosis. *JAMA Neurol*. 2020;77(1):58-64. doi:10.1001/jamaneurol.2019.3238

366- Benkert P, Meier S, Schaedelin S, et al. Serum neurofilament light chain for individual prognostication of disease activity in people with multiple sclerosis: a retrospective modelling and validation study. *Lancet Neurol.* 2022;21(3):246-257. doi:10.1016/S1474-4422(22)00009-6

367- Kuhle J, Plavina T, Barro C, et al. Neurofilament light levels are associated with long-term outcomes in multiple sclerosis. *Multiple Sclerosis Journal.* 2020;26(13):1691-1699. doi:10.1177/1352458519885613

368- Meier S, Willemse EAJ, Schaedelin S, et al. Serum Glial Fibrillary Acidic Protein Compared With Neurofilament Light Chain as a Biomarker for Disease Progression in Multiple Sclerosis. *JAMA Neurol*. 2023;80(3):287-297. doi:10.1001/jamaneurol.2022.5250

369- Monreal E, Fernández-Velasco JI, García-Sánchez MI, et al. Association of Serum Neurofilament Light Chain Levels at Disease Onset With Disability Worsening in Patients With a First Demyelinating Multiple Sclerosis Event Not Treated With High-Efficacy Drugs. JAMA Neurol. 2023;80(4):397-403. doi:10.1001/jamaneurol.2023.0010

370- Monreal, E., Fernández-Velasco, J.I., Sainz de la Maza, S, et al. Combining CSF and Serum Biomarkers to Differentiate Mechanisms of Disability Worsening in Multiple Sclerosis. *Int J Mol Sci*. 2025; 26(14):6898. doi:10.3390/ijms26146898

371- Maceski AM, Benkert P, Einsiedler M, et al. GFAP and NfL as predictors of disease progression and relapse activity in fingolimod-treated multiple sclerosis. *Brain*. Published online November 14, 2025. doi:10.1093/brain/awaf433

372- Monreal E, Fernández-Velasco JI, Álvarez-Lafuente R, et al. Serum biomarkers at disease onset for personalized therapy in multiple sclerosis. *Brain*. 2024;147(12):4084-4093. doi:10.1093/brain/awae260

373- Rodríguez-Jorge F, Fernández-Velasco JI, Villarrubia N, et al. Biomarkers of response to ocrelizumab in relapsing–remitting multiple sclerosis. *Front. Immunol.* 2024; 15:1480676. doi: 10.3389/fimmu.2024.1480676

374- Sainz-Amo R, Rodero Romero A, Monreal E, et al. Effect of alemtuzumab over sNfL and sGFAP levels in multiple sclerosis. *Front Immunol.* 2024;15:1454474. doi:10.3389/fimmu.2024.1454474

375- Seiberl M, Feige J, Hilpold P, et al. Serum Neurofilament Light Chain as Biomarker for Cladribine-Treated Multiple Sclerosis Patients in a Real-World Setting. *Int J Mol Sci*. 2023;24(4):4067. doi:10.3390/ijms24044067

376- Sainz-Amo R, Rodero-Romero A, Monreal E, et al. Effect of Natalizumab on sNfL and sGFAP Levels in Multiple Sclerosis Patients. *Int J Mol Sci*. 2024;25(23):13153. doi:10.3390/ijms252313153

377- Pafiti A, Krashias G, Tzartos J, et al. A Comparison of Two Analytical Approaches for the Quantification of Neurofilament Light Chain, a Biomarker of Axonal Damage in Multiple Sclerosis. *Int J Mol Sci*. 2023;24(13):10787. doi:10.3390/ijms241310787

378- Johnsson M, Stenberg YT, Farman HH, et al. Serum neurofilament light for detecting disease activity in individual patients in multiple sclerosis: A 48-week prospective single-center study. *Mult Scler*. 2024;30(6):664-673. doi:10.1177/13524585241237388

379- Jiang X, Shen C, Teunissen CE, et al. Glial fibrillary acidic protein and multiple sclerosis progression independent of acute inflammation. *Mult Scler*. 2023;29(9):1070-1079. doi:10.1177/13524585231176732

380- Ayrignac X, Le Bars E, Duflos C, et al. Serum GFAP in multiple sclerosis: correlation with disease type and MRI markers of disease severity. *Sci Rep*. 2020;10(1). doi:10.1038/s41598-020-67934-2

381- Högel H, Rissanen E, Barro C, et al. Serum glial fibrillary acidic protein correlates with multiple sclerosis disease severity. *Multiple Sclerosis Journal.* 2020;26(2):210-219. doi:10.1177/1352458518819380

382- Madill E, Healy BC, Molazadeh N, et al. Serum glial fibrillary acidic protein predicts disease progression in multiple sclerosis. *Ann Clin Transl Neurol.* 2024;11(10):2719-2730. doi:10.1002/acn3.52187

383- Barro C, Healy BC, Liu Y, et al. Serum GFAP and NfL Levels Differentiate Subsequent Progression and Disease Activity in Patients With Progressive Multiple Sclerosis. *Neurol Neuroimmunol Neuroinflamm.* 2023;10(1). doi:10.1212/NXI.0000000000200052

384- Yuan A, Nixon RA. Neurofilament Proteins as Biomarkers to Monitor Neurological Diseases and the Efficacy of Therapies. *Front Neurosci*. 2021;15:689938. doi:10.3389/fnins.2021.689938

385- Abdelhak A, Foschi M, Abu-Rumeileh S, et al. Blood GFAP as an emerging biomarker in brain and spinal cord disorders. *Nat Rev Neurol*. 2022;18(3):158-172. doi:10.1038/s41582-021-00616-3

386- Ehrenberg AJ, Khatun A, Coomans E, et al. Relevance of biomarkers across different neurodegenerative diseases. *Alzheimers Res Ther*. 2020;12(1):56. doi:10.1186/s13195-020-00601-w

387- Fang T, Dai Y, Hu X, Xu Y, Qiao J. Evaluation of serum neurofilament light chain and glial fibrillary acidic protein in the diagnosis of Alzheimer's disease. *Front Neurol*. 2024;15:1320653. doi:10.3389/fneur.2024.1320653

388- Preische O, Schultz SA, Apel A, et al. Serum neurofilament dynamics predicts neurodegeneration and clinical progression in presymptomatic Alzheimer's disease. *Nat Med*. 2019;25(2):277-283. doi:10.1038/s41591-018-0304-3

389- Mazzeo S, Ingannato A, Giacomucci G, et al. Plasma neurofilament light chain predicts Alzheimer's disease in patients with subjective cognitive decline and mild cognitive impairment: A cross-sectional and longitudinal study. *Eur J Neurol.* 2024;31(1):e16089. doi:10.1111/ene.16089

390- Frank A, Bendig J, Schnalke N, et al. Serum neurofilament indicates accelerated neurodegeneration and predicts mortality in late-stage Parkinson's disease. *NPJ Parkinsons Dis.* 2024;10(1):14. doi:10.1038/s41531-023-00605-x

391- Buhmann C, Magnus T, Choe CU. Blood neurofilament light chain in Parkinson's disease. *J Neural Transm (Vienna).* 2023;130(6):755-762. doi:10.1007/s00702-023-02632-7

392- Hansson O, Janelidze S, Hall S, et al. Blood-based NfL: A biomarker for differential diagnosis of parkinsonian disorder. *Neurology.* 2017;88(10):930-937. doi:10.1212/WNL.0000000000003680

393- Watanabe M, Nakamura Y, Michalak Z, et al. Serum GFAP and neurofilament light as biomarkers of disease activity and disability in NMOSD. *Neurology.* 2019;93(13):e1299-e1311. doi:10.1212/WNL.0000000000008160

394- Koini M, Pirpamer L, Hofer E, et al. Factors influencing serum neurofilament light chain levels in normal aging. *Aging (Albany NY)*. 2021;13(24):25729-25738. doi:10.18632/aging.203790

395- Salvadores N, Sanhueza M, Manque P, Court FA. Axonal Degeneration during Aging and Its Functional Role in Neurodegenerative Disorders. *Front Neurosci*. 2017;11:451. doi:10.3389/fnins.2017.00451

396- Khalil M, Pirpamer L, Hofer E, et al. Serum neurofilament light levels in normal aging and their association with morphologic brain changes. *Nat Commun*. 2020;11(1):812.. doi:10.1038/s41467-020-14612-6

397- Simrén J, Andreasson U, Gobom J, et al. Establishment of reference values for plasma neurofilament light based on healthy individuals aged 5-90 years. *Brain Commun*. 2022;4(4):fcac174. doi:10.1093/braincomms/fcac174

398- Capo X, Galmes-Panades AM, Navas-Enamorado C, et al. Circulating Neurofilament Light Chain Levels Increase with Age and Are Associated with Worse Physical Function and Body Composition in Men but Not in Women. *Int J Mol Sci*. 2023;24(16):12751. doi:10.3390/ijms241612751

399- Hviid CVB, Knudsen CS, Parkner T. Reference interval and preanalytical properties of serum neurofilament light chain in Scandinavian adults. *Scand J Clin Lab Invest*. 2020;80(4):291-295. doi:10.1080/00365513.2020.1730434

400- Abdelhak A, Petermeier F, Benkert P, et al. Serum neurofilament light chain reference database for individual application in paediatric care: a retrospective modelling and validation study. *Lancet Neurol*. 2023;22(9):826-833. doi:10.1016/S1474-4422(23)00210-7

401- Nitz E, Smitka M, Schallner J, et al. Serum neurofilament light chain in pediatric spinal muscular atrophy patients and healthy children. *Ann Clin Transl Neurol*. 2021;8(10):2013-2024. doi:10.1002/acn3.51449

402- Varhaug KN, Barro C, Bjørnevik K, et al. Neurofilament light chain predicts disease activity in relapsing-remitting MS. *Neurol Neuroimmunol Neuroinflamm.* 2017;5(1):e422. doi:10.1212/NXI.0000000000000422

403- Hermesdorf M, Leppert D, Maceski A, et al. Longitudinal analyses of serum neurofilament light and associations with obesity indices and bioelectrical impedance parameters. *Sci Rep*. 2022;12(1):15863. doi:10.1038/s41598-022-20398-y

404- Manouchehrinia A, Piehl F, Hillert J, et al. Confounding effect of blood volume and body mass index on blood neurofilament light chain levels. *Ann Clin Transl Neurol*. 2020;7(1):139-143. doi:10.1002/acn3.50972

405- Solís-Tarazona L, Raket LL, Cabello-Murgui J, Reddam S, Navarro-Quevedo S, Gil-Perotin S. Predictive value of individual serum neurofilament light chain levels in short-term disease activity in relapsing multiple sclerosis. Front Neurol. 2024;15:1354431. doi:10.3389/fneur.2024.1354431

406- Lin TY, Motamedi S, Asseyer S, et al. Individual Prognostication of Disease Activity and Disability Worsening in Multiple Sclerosis With Retinal Layer Thickness *z* Scores. *Neurol Neuroimmunol Neuroinflamm*. 2024;11(5):e200269. doi:10.1212/NXI.0000000000200269

407- Comabella M, Sastre-Garriga J, Carbonell-Mirabent P, et al. Serum neurofilament light chain levels predict long-term disability progression in patients with progressive multiple sclerosis. J Neurol Neurosurg Psychiatry. Published online April 29, 2022. doi:10.1136/jnnp-2022-329020

408- Barro C, Chitnis T, Weiner HL. Blood neurofilament light: a critical review of its application to neurologic disease. *Ann Clin Transl Neurol*. 2020;7(12):2508-2523. doi:10.1002/acn3.51234

409- Mielke MM. Consideration of Sex Differences in the Measurement and Interpretation of Alzheimer Disease-Related Biofluid-Based Biomarkers. *J Appl Lab Med*. 2020;5(1):158-169. doi:10.1373/jalm.2019.030023

410- Revendova KZ, Zeman D, Bunganic R, et al. Serum neurofilament levels in patients with multiple sclerosis: A comparison of SIMOA and high sensitivity ELISA assays and contributing factors to ELISA levels. *Mult Scler Relat Disord*. 2022;67:104177. doi:10.1016/j.msard.2022.104177

411- Saraste M, Bezukladova S, Matilainen M, et al. Increased serum glial fibrillary acidic protein associates with microstructural white matter damage in multiple sclerosis: GFAP and DTI. *Mult Scler Relat Disord.* 2021;50:102810. doi:10.1016/j.msard.2021.102810

412- Sánchez-Juan P, Valeriano-Lorenzo E, Ruiz-González A, et al. Serum GFAP levels correlate with astrocyte reactivity, post-mortem brain atrophy and neurofibrillary tangles. *Brain*. 2024;147(5):1667-1679. doi:10.1093/brain/awae035

413- Gattringer T, Enzinger C, Pinter D, et al. Serum glial fibrillary acidic protein is sensitive to acute but not chronic tissue damage in cerebral small vessel disease. *J Neurol*. 2023;270(1):320-327. doi:10.1007/s00415-022-11358-7

414- Paul JF, Ducroux C, Correia P, et al. Serum glial fibrillary acidic protein in acute stroke: feasibility to determine stroke-type, timeline and tissue-impact. *Front Neurol*. 2024;15:1470718. Published 2024 Dec 6. doi:10.3389/fneur.2024.1470718

415- Bhatt M, Sharma M, Das B. The Role of Inflammatory Cascade and Reactive Astrogliosis in Glial Scar Formation Post-spinal Cord Injury. *Cell Mol Neurobiol*. 2024;44(1):78. doi:10.1007/s10571-024-01519-9

416- Loonstra FC, de Ruiter LRJ, Koel-Simmelink MJA, et al. Neuroaxonal and Glial Markers in Patients of the Same Age With Multiple Sclerosis. *Neurol Neuroimmunol Neuroinflamm*. 2022;10(2):e200078. doi:10.1212/NXI.0000000000200078

417- Chatterjee P, Pedrini S, Ashton NJ, et al. Diagnostic and prognostic plasma biomarkers for preclinical Alzheimer's disease. *Alzheimers Dement*. 2022;18(6):1141-1154. doi:10.1002/alz.12447

418- Chatterjee P, Pedrini S, Stoops E, et al. Plasma glial fibrillary acidic protein is elevated in cognitively normal older adults at risk of Alzheimer's disease. *Transl Psychiatry*. 2021;11(1):27. doi:10.1038/s41398-020-01137-1

419- Lin J, Ou R, Li C, et al. Plasma glial fibrillary acidic protein as a biomarker of disease progression in Parkinson's disease: a prospective cohort study. *BMC Med*. 2023;21(1):420. doi:10.1186/s12916-023-03120-1

420- Yin P, Niu X, Guan C, et al. Relationship between increased serum neurofilament light chain and glial fibrillary acidic protein levels with non-motor symptoms in patients with Parkinson's disease. *Psychogeriatrics*. 2024;24(2):415-425. doi:10.1111/psyg.13088

421- Yalachkov Y, Schäfer JH, Jakob J, et al. Effect of Estimated Blood Volume and Body Mass Index on GFAP and NfL Levels in the Serum and CSF of Patients With Multiple Sclerosis. *Neurol Neuroimmunol Neuroinflamm*. 2022;10(1):e200045. doi:10.1212/NXI.0000000000200045

422- Jurga AM, Paleczna M, Kadluczka J, Kuter KZ. Beyond the GFAP-Astrocyte Protein Markers in the Brain. *Biomolecules*. 2021;11(9):1361. doi:10.3390/biom11091361

423- Ysrraelit MC, Correale J. Impact of sex hormones on immune function and multiple sclerosis development. *Immunology*. 2019;156(1):9-22. doi:10.1111/imm.13004

424- Juutinen L, Ahinko K, Hagman S, et al. The association of menopausal hormone levels with progression-related biomarkers in multiple sclerosis. *Mult Scler Relat Disord*. 2024;85:105517. doi:10.1016/j.msard.2024.105517

425- Itoh N, Itoh Y, Meyer CE, et al. Estrogen receptor beta in astrocytes modulates cognitive function in mid-age female mice. *Nat Commun*. 2023;14(1):6044. doi:10.1038/s41467-023-41723-7

426- Bavato F, Kexel AK, Kluwe-Schiavon B, et al. A Longitudinal Investigation of Blood Neurofilament Light Chain Levels in Chronic Cocaine Users. *Mol Neurobiol*. 2023;60(7):3935-3944. doi:10.1007/s12035-023-03327-6

427- Haegele KF, Stueckle CA, Malin JP, Sindern E. Increase of CD8+ T-effector memory cells in peripheral blood of patients with relapsing-remitting multiple sclerosis compared to healthy controls. *J Neuroimmunol*. 2007;183(1-2):168-174. doi:10.1016/j.jneuroim.2006.09.008

428- Morille J, Mandon M, Rodriguez S, et al. Multiple Sclerosis CSF Is Enriched With Follicular T Cells Displaying a Th1/Eomes Signature. *Neurol Neuroimmunol Neuroinflamm*. 2022;9(6):e200033. Published 2022 Oct 20. doi:10.1212/NXI.0000000000200033

429- Thebault S, Reaume M, Marrie RA, et al. High or increasing serum NfL is predictive of impending multiple sclerosis relapses. *Mult Scler Relat Disord*. 2022;59:103535. doi:10.1016/j.msard.2022.103535

430- Wang L, Liang Y, Zhao C, et al. Regulatory T cells in homeostasis and disease: molecular mechanisms and therapeutic potential. *Signal Transduct Target Ther*. 2025;10(1):345. Published 2025 Oct 14. doi:10.1038/s41392-025-02326-4

431- Noori-Zadeh A, Mesbah-Namin SA, Bistoon-Beigloo S, et al. Regulatory T cell number in multiple sclerosis patients: A meta-analysis. *Mult Scler Relat Disord*. 2016;5:73-76. doi:10.1016/j.msard.2015.11.004

432- Tapia-Maltos MA, Treviño-Frenk I, García-González HB, et al. Identification of regulatory T cell molecules associated with severity of multiple sclerosis. *Mult Scler*. 2021;27(11):1695-1705. doi:10.1177/1352458520977045

433- Liu Y, Carlsson R, Comabella M, et al. FoxA1 directs the lineage and immunosuppressive properties of a novel regulatory T cell population in EAE and MS. *Nat Med*. 2014;20(3):272-282. doi:10.1038/nm.3485

434- Li YF, Zhang SX, Ma XW, et al. The proportion of peripheral regulatory T cells in patients with Multiple Sclerosis: A meta-analysis. *Mult Scler Relat Disord*. 2019;28:75-80. doi:10.1016/j.msard.2018.12.019

435- Ciccocioppo F, Lanuti P, Pierdomenico L, et al. The Characterization of Regulatory T-Cell Profiles in Alzheimer's Disease and Multiple Sclerosis. *Sci Rep.* 2019;9(1):8788. doi:10.1038/s41598-019-45433-3

436- Salerno F, Howden AJM, Matheson LS, et al. An integrated proteome and transcriptome of B cell maturation defines poised activation states of transitional and mature B cells. *Nat Commun*. 2023;14(1):5116. doi:10.1038/s41467-023-40621-2

437- Knippenberg S, Peelen E, Smolders J, et al. Reduction in IL-10 producing B cells (Breg) in multiple sclerosis is accompanied by a reduced naïve/memory Breg ratio during a relapse but not in remission. *J Neuroimmunol*. 2011;239(1-2):80-86. doi:10.1016/j.jneuroim.2011.08.019

438- Vasileiadis GK, Dardiotis E, Mavropoulos A, et al. Regulatory B and T lymphocytes in multiple sclerosis: friends or foes?. *Auto Immun Highlights*. 2018;9(1):9. doi:10.1007/s13317-018-0109-x

439- Lomakin YA, Zvyagin IV, Ovchinnikova LA, et al. Deconvolution of B cell receptor repertoire in multiple sclerosis patients revealed a delay in tBreg maturation. *Front Immunol*. 2022;13:803229. doi:10.3389/fimmu.2022.8032

440- Sharpe AH, Pauken KE. The diverse functions of the PD1 inhibitory pathway. *Nat Rev Immunol*. 2018;18(3):153-167. doi:10.1038/nri.2017.108

441- Chen RY, Zhu Y, Shen YY, et al. The role of PD-1 signaling in health and immune-related diseases. *Front Immunol*. 2023;14:1163633. doi:10.3389/fimmu.2023.1163633

442- Rasouli J, Ciric B, Imitola J, et al. Expression of GM-CSF in T Cells Is Increased in Multiple Sclerosis and Suppressed by IFN-β Therapy. *J Immunol*. 2015;194(11):5085-5093. doi:10.4049/jimmunol.1403243

443- Ghezzi L, Cantoni C, Cignarella F, et al. T cells producing GM-CSF and IL-13 are enriched in the cerebrospinal fluid of relapsing MS patients. *Mult Scler*. 2020;26(10):1172-1186. doi:10.1177/1352458519852092

444- Rebuffet L, Melsen JE, Escalière B, et al. High-dimensional single-cell analysis of human natural killer cell heterogeneity. *Nat Immunol*. 2024;25(8):1474-1488. doi:10.1038/s41590-024-01883-0

445- Smith SL, Kennedy PR, Stacey KB, et al. Diversity of peripheral blood human NK cells identified by single-cell RNA sequencing. *Blood Adv*. 2020;4(7):1388-1406. doi:10.1182/bloodadvances.2019000699

446- Martin JF, Perry JS, Jakhete NR, Wang X, Bielekova B. An IL-2 paradox: blocking CD25 on T cells in duces IL-2-driven activation of CD56(bright) NK cells. *J Immunol*. 2010;185(2):1311-1320. doi:10.4049/jimmunol.0902238

447- Martínez-Rodríguez JE, López-Botet M, Munteis E, et al. Natural killer cell phenotype and clinical response to interferon-beta therapy in multiple sclerosis. *Clin Immunol*. 2011;141(3):348-356. doi:10.1016/j.clim.2011.09.006

448- Woo MS, Engler JB, Friese MA. The neuropathobiology of multiple sclerosis. Nat Rev Neurosci. 2024;25(7):493-513. doi:10.1038/s41583-024-00823-z

449- Cui LY, Chu SF, Chen NH. The role of chemokines and chemokine receptors in multiple sclerosis. *Int Immunopharmacol*. 2020;83:106314. doi:10.1016/j.intimp.2020.106314

450- Berek K, Bauer A, Rudzki D, et al. Immune profiling in multiple sclerosis: a single-center study of 65 cytokines, chemokines, and related molecules in cerebrospinal fluid and serum. *Front Immunol*. 2023;14:1200146. doi:10.3389/fimmu.2023.1200146

451- Rabin A, Bello E, Kumar S, et al. Targeted proteomics of cerebrospinal fluid in treatment naïve multiple sclerosis patients identifies immune biomarkers of clinical phenotypes. *Sci Rep*. 2024;14(1):21793. doi:10.1038/s41598-024-67769-1

452- Bai Z, Chen D, Wang L, et al. Cerebrospinal Fluid and Blood Cytokines as Biomarkers for Multiple Sclerosis: A Systematic Review and Meta-Analysis of 226 Studies With 13,526 Multiple Sclerosis Patients. *Front Neurosci*. 2019;13:1026. doi:10.3389/fnins.2019.01026

453- Qureshi F, Hu W, Loh L, et al. Analytical validation of a multi-protein, serum-based assay for disease activity assessments in multiple sclerosis. *Proteomics Clin Appl*. 2023;17(3):e2200018. doi:10.1002/prca.202200018

454- Wagner CA, Roqué PJ, Goverman JM. Pathogenic T cell cytokines in multiple sclerosis. *J Exp Med*. 2020;217(1):e20190460. doi:10.1084/jem.20190460

455- Khaibullin T, Ivanova V, Martynova E, et al. Elevated Levels of Proinflammatory Cytokines in Cerebrospinal Fluid of Multiple Sclerosis Patients. *Front Immunol*. 2017;8:531. doi:10.3389/fimmu.2017.00531

456- Ponomarev ED, Maresz K, Tan Y, Dittel BN. CNS-derived interleukin-4 is essential for the regulation of autoimmune inflammation and induces a state of alternative activation in microglial cells. *J Neurosci*. 2007;27(40):10714-10721. doi:10.1523/JNEUROSCI.1922-07.2007

457- Junttila IS. Tuning the Cytokine Responses: An Update on Interleukin (IL)-4 and IL-13 Receptor Complexes. Front Immunol. 2018;9:888. doi:10.3389/fimmu.2018.00888

458- Puthenparampil M, Stropparo E, Zywicki S, et al. Wide Cytokine Analysis in Cerebrospinal Fluid at Diagnosis Identified CCL-3 as a Possible Prognostic Factor for Multiple Sclerosis. *Front Immunol*. 2020;11:174. doi:10.3389/fimmu.2020.00174

459- Melamud MM, Ermakov EA, Boiko AS, et al. Multiplex Analysis of Serum Cytokine Profiles in Systemic Lupus Erythematosus and Multiple Sclerosis. *Int J Mol Sci*. 2022;23(22):13829. doi:10.3390/ijms232213829

460- Estevao C, Bowers CE, Luo D, et al. CCL4 induces inflammatory signalling and barrier disruption in the neurovascular endothelium. *Brain Behav Immun Health*. 2021;18:100370. doi:10.1016/j.bbih.2021.100370

461- Cheng W, Chen G. Chemokines and chemokine receptors in multiple sclerosis. *Mediators Inflamm*. 2014;2014:659206. doi:10.1155/2014/659206

462- Mahad DJ, Ransohoff RM. The role of MCP-1 (CCL2) and CCR2 in multiple sclerosis and experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE). *Semin Immunol*. 2003;15(1):23-32. doi:10.1016/s1044-5323(02)00125-2

463- Nazeri A, Heydarpour P, Sadaghiani S, Sahraian MA, Burkly LC, Bar-Or A. A further TWEAK to multiple sclerosis pathophysiology. *Mol Neurobiol*. 2014;49(1):78-87. doi:10.1007/s12035-013-8490-y

464- Stephan D, Roger A, Aghzadi J, et al. TWEAK and TNFα, Both TNF Ligand Family Members and Multiple Sclerosis-Related Cytokines, Induce Distinct Gene Response in Human Brain Microvascular Endothelial Cells. *Genes (Basel)*. 2022;13(10):1714. doi:10.3390/genes13101714

465- Magliozzi R, Scalfari A, Pisani AI, et al. The CSF Profile Linked to Cortical Damage Predicts Multiple Sclerosis Activity. *Ann Neurol*. 2020;88(3):562-573. doi:10.1002/ana.25786

466- Momenilandi M, Lévy R, Sobrino S, et al. FLT3L governs the development of partially overlapping hematopoietic lineages in humans and mice. *Cell*. 2024;187(11):2817-2837.e31. doi:10.1016/j.cell.2024.04.009

467- Mayo L, Trauger SA, Blain M, et al. Regulation of astrocyte activation by glycolipids drives chronic CNS inflammation. *Nat Med*. 2014;20(10):1147-1156. doi:10.1038/nm.3681

468- Wheeler MA, Clark IC, Tjon EC, et al. MAFG-driven astrocytes promote CNS inflammation. *Nature*. 2020;578(7796):593-599. doi:10.1038/s41586-020-1999-0

469- Scalabrino G. Epidermal Growth Factor in the CNS: A Beguiling Journey from Integrated Cell Biology to Multiple Sclerosis. An Extensive Translational Overview. Cell Mol Neurobiol. 2022;42(4):891-916. doi:10.1007/s10571-020-00989-x

470- Scalabrino G, Galimberti D, Mutti E, et al. Loss of epidermal growth factor regulation by cobalamin in multiple sclerosis. *Brain Res*. 2010;1333:64-71. doi:10.1016/j.brainres.2010.03.073

471- Linnerbauer M, Lößlein L, Vandrey O, et al. The astrocyte-produced growth factor HB-EGF limits autoimmune CNS pathology. *Nat Immunol*. 2024;25(3):432-447. doi:10.1038/s41590-024-01756-6

472- Chen C, Shu Y, Yan C, et al. Astrocyte-derived clusterin disrupts glial physiology to obstruct remyelination in mouse models of demyelinating diseases. *Nat Commun*. 2024;15(1):7791. doi:10.1038/s41467-024-52142-7

473- Brambilla R, Morton PD, Ashbaugh JJ, Karmally S, Lambertsen KL, Bethea JR. Astrocytes play a key role in EAE pathophysiology by orchestrating in the CNS the inflammatory response of resident and peripheral immune cells and by suppressing remyelination. *Glia*. 2014;62(3):452-467. doi:10.1002/glia.22616

8. ANEXO: ARTÍCULOS RELACIONADOS

- Sainz de la Maza S, Walo-Delgado PE, Rodríguez-Domínguez M, et al. Short- and Long-Term Humoral and Cellular Immune Responses to SARS-CoV-2 Vaccination in Patients with Multiple Sclerosis Treated with Disease-Modifying Therapies. *Vaccines (Basel)*. 2023;11(4):786. doi:10.3390/vaccines11040786
- Rodero-Romero A, Sainz de la Maza S, Fernández-Velasco JI, et al. Blood CD8+ Naïve T-Cells Identify MS Patients with High Probability of Optimal Cellular Response to SARS-CoV-2 Vaccine. *Vaccines (Basel)*. 2023;11(9):1399. doi:10.3390/vaccines11091399
- Sainz-Amo R, Rodero Romero A, Monreal E, et al. Effect of alemtuzumab over sNfL and sGFAP levels in multiple sclerosis. *Front Immunol*. 2024;15:1454474. doi:10.3389/fimmu.2024.1454474
- Sainz de la Maza S, Rodero-Romero A, Monreal E, et al. COVID-19 vaccines are not associated with axonal injury in patients with multiple sclerosis. *Front Immunol*. 2024;15:1439393. doi:10.3389/fimmu.2024.1439393
- Rodríguez-Jorge F, Fernández-Velasco JI, Villarrubia N, et al. Corrigendum: Biomarkers of response to ocrelizumab in relapsing-remitting multiple sclerosis. *Front Immunol*. 2024;15:1535051. doi:10.3389/fimmu.2024.1535051
- Monreal E, Fernández-Velasco JI, Álvarez-Lafuente R, et al. Serum biomarkers at disease onset for personalized therapy in multiple sclerosis. *Brain*. 2024;147(12):4084-4093. doi:10.1093/brain/awae260
- Sainz-Amo R, Rodero-Romero A, Monreal E, et al. Effect of Natalizumab on sNfL and sGFAP Levels in Multiple Sclerosis Patients. *Int J Mol Sci*. 2024;25(23):13153. doi:10.3390/ijms252313153
- Monreal, E.; Fernández-Velasco, J.I.; Sainz de la Maza, S, et al. Combining CSF and Serum Biomarkers to Differentiate Mechanisms of Disability Worsening in Multiple Sclerosis. *Int J Mol Sci*. 2025; 26(14):6898. doi:10.3390/ijms26146898