

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
FACULTAD DE MEDICINA



TESIS DOCTORAL

**Búsqueda de biomarcadores y mecanismos de respuesta a
ocrelizumab en pacientes con esclerosis múltiple
primariamente progresiva**

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR

PRESENTADA POR

José Ignacio Fernández Velasco

Directora

Luisa María Villar Guimeran

Madrid

© José Ignacio Fernández Velasco, 2023

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
FACULTAD DE MEDICINA



TESIS DOCTORAL

**BÚSQUEDA DE BIOMARCADORES Y MECANISMOS DE RESPUESTA A
OCRELIZUMAB EN PACIENTES CON ESCLEROSIS MÚLTIPLE
PRIMARIAMENTE PROGRESIVA**

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR

PRESENTADA POR

José Ignacio Fernández Velasco

DIRECTORA

Luisa María Villar Guimerans

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
FACULTAD DE MEDICINA
PROGRAMA DE INVESTIGACIÓN BIOMÉDICA



TESIS DOCTORAL

**BÚSQUEDA DE BIOMARCADORES Y MECANISMOS DE
RESPUESTA A OCRELIZUMAB EN PACIENTES CON
ESCLEROSIS MÚLTIPLE PRIMARIAMENTE PROGRESIVA**

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR
PRESENTADA POR:

José Ignacio Fernández Velasco

DIRIGIDA POR:

Dra. Luisa María Villar Guimerans

Madrid, 2022



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

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

CERTIFICA: que D. José Ignacio Fernández Velasco ha realizado, bajo su dirección, su Tesis Doctoral titulada: **“BÚSQUEDA DE BIOMARCADORES Y MECANISMOS DE RESPUESTA A OCRELIZUMAB EN PACIENTES CON ESCLEROSIS MÚLTIPLE PRIMARIAMENTE PROGRESIVA.”**

Revisada la misma, reúne las condiciones necesarias para obtener el Grado de Doctor, por lo que doy mi conformidad para su presentación a tal fin.

En Madrid, a ____ de _____ de 20__.

Fdo.: Dña. Luisa María Villar Guimerans

A mis padres y a mi hermano,

En primer lugar, quiero expresar mi agradecimiento a toda aquella persona que haya contribuido, tanto en lo personal como en lo profesional, a la realización de esta tesis doctoral. Aunque el esfuerzo ha sido grande, cualquier granito de arena me ha dado fuerzas para poder lograr este objetivo, y me gustaría que todos os sintieseis parte de ello.

Gracias a mi directora de tesis, la Dra. Luisa María Villar Guimerans, por darme la oportunidad de unirme al grupo de Esclerosis Múltiple durante mis años de residencia y por brindarme la posibilidad de permanecer en él una vez finalizado este periodo. Gracias por confiar en mí desde el principio, por tus conocimientos, por tu tiempo y esfuerzo, y por mostrarme el camino correcto en cada momento.

Gracias al resto de los miembros de la Unidad de EM del H. Ramón y Cajal. A los neurólogos Lucienne, Susana y Enric, por su gran ayuda en el reclutamiento de pacientes y datos clínicos. A Noelia, por su organización, cordura y templanza cuando cualquiera hubiese perdido los nervios. A Paloma, por su visión diferente de la vida y su a veces dolorosa sinceridad. A Sonia, por su sonrisa y disponibilidad para lo que se necesite. A los nuevos miembros, Rafa y Álex, porque habéis demostrado tener lo necesario para embarcaros en este camino. Gracias Paulette, por llegar al servicio de Inmunología cuando entré perdido de R1 y haber podido compartir esta aventura juntos. Haber rotado y completado la especialidad en paralelo me ha demostrado que eres el compañero de trabajo que todos deberíamos tener. Pero, sin duda, me has enseñado que el compañerismo no compite con la amistad. *Mi chiqui venesolana, gracias de corazón por haber que hasta lo peor parezca divertido, por decorar nuestras vidas, por mandarnos al derma, por escucharnos y aconsejarnos, y por saber elegir cual de nuestros consejos seguir, a pesar de nuestra inevitable "maldad".*

Gracias a los pacientes, por la confianza depositada en nuestro grupo, ya que sin su inestimable colaboración ninguno de nuestros estudios sería posible. Lógicamente, gracias a todas las Unidades y Servicios de Neurología de los diferentes hospitales participantes en este trabajo.

Gracias a todos los integrantes del servicio de Inmunología del Ramón y Cajal, por hacerme sentir como en casa desde el minuto uno. Al personal técnico, por su simpatía y buena cara a la hora de enseñar cómo manejarse por los laboratorios, y por amenizar los “tiempos de incubación” durante las guardias de madrugada. A los facultativos, por compartir todos sus conocimientos sin esperar nada a cambio, y por darme diferentes visiones a la hora de afrontar decisiones. A los residentes, los que fueron y los que son, por acompañarme en esta etapa de mi vida, porque con vosotros siempre hay motivos para querer venir a trabajar. El ambiente de nuestro *immunoteam* siempre ha sido envidiable, con esos desayunos, *breaks* y comidas, todos juntos. Pero gracias sobre todo por lo vivido fuera del horario laboral: los partiditos de pádel, las quedadas de tarde/noche, las cenas, los congresos, y los viajes compartidos. No puedo abandonar este párrafo sin dedicarle una mención especial al “Trío Calavera”. Rubiño y Tito, gracias por hacerlo así de fácil. Brindo por la amistad, por la gestión de alguna que otra red social, y porque nunca nos falten esos bailes de *reguetón* con copitas rotas ni esos paseítos en barco por el Mediterráneo. En resumen, *la vida que merecemos*.

Gracias, por supuesto, a mis amigos de toda la vida, porque seguí a mi lado acumulando buenos momentos aunque no siempre haya sabido estar a la altura. Y gracias a mis amigos de la carrera, por demostrarme que *la bota y la bata* son totalmente compatibles.

En último lugar, pero el más importante, gracias a mi familia porque sin vosotros no sería quién soy. En cada paso de mi vida me habéis demostrado un cariño y un apoyo incondicional, a pesar de mis muchas equivocaciones, y me habéis facilitado la formación que he querido, a pesar de las dudosas salidas laborales que esperaban. Gracias por el hogar que me habéis dado, por acompañarme a lo largo de este camino, y por no haber permitido que tirase la toalla cuando creía que no podía más. Siento ser bastante seco, frío y reservado a la hora de expresar mis sentimientos, pero creo que esta es una oportunidad perfecta para dejarlo aquí plasmado: os quiero mucho a los tres. Infinitas gracias.

ÍNDICE

RESUMEN.....	- 5 -
ABREVIATURAS.....	- 15 -
1 INTRODUCCIÓN.....	- 19 -
1.1 ASPECTOS HISTÓRICOS	- 22 -
1.2 EPIDEMIOLOGÍA.....	- 24 -
1.3 ETIOLOGÍA	- 25 -
1.3.1 Factores genéticos	- 26 -
1.3.2 Factores epigenéticos	- 26 -
1.3.3 Factores ambientales y de estilo de vida.....	- 27 -
1.4 FORMAS CLÍNICAS.....	- 30 -
1.4.1 Esclerosis Múltiple Recidivante Remitente	- 31 -
1.4.2 Esclerosis Múltiple Secundaria Progresiva	- 32 -
1.4.3 Esclerosis Múltiple Primariamente Progresiva	- 32 -
1.5 DIAGNÓSTICO	- 34 -
1.5.1 Pruebas de imagen	- 34 -
1.5.2 Estudios de LCR.....	- 35 -
1.5.3 Potenciales evocados.....	- 36 -
1.6 DIAGNÓSTICO DE LA EMPP	- 36 -
1.7 NEUROPATHOLOGÍA	- 37 -
1.8 FISIOPATHOLOGÍA.....	- 37 -
1.8.1 Linfocitos T.....	- 38 -
1.8.2 Linfocitos B	- 40 -
1.8.3 Células del sistema inmune innato.....	- 42 -
1.9 TRATAMIENTO	- 44 -
1.10 BIOMARCADORES DE RESPUESTA A TRATAMIENTO	- 53 -
1.10.1 Biomarcadores de respuesta a tratamiento en EMRR.....	- 53 -
1.10.2 Biomarcadores de respuesta a tratamiento en EMPP	- 58 -
2 JUSTIFICACIÓN DEL TRABAJO DE TESIS.....	- 61 -
3 HIPÓTESIS Y OBJETIVOS.....	- 65 -

4	PUBLICACIONES	- 69 -
4.1	EFFECT OF OCRELIZUMAB IN BLOOD LEUKOCYTES OF PATIENTS WITH PRIMARY PROGRESSIVE MS.....	- 71 -
4.2	BASELINE INFLAMMATORY STATUS REVEALS DICHOTOMIC IMMUNE MECHANISMS INVOLVED IN PRIMARY-PROGRESSIVE MULTIPLE SCLEROSIS PATHOLOGY.....	- 83 -
5	DISCUSIÓN	- 97 -
5.1	CAMBIOS EN POBLACIONES LEUCOCITARIAS DE SANGRE PÉRIFÉRICA Y FACTORES SOLUBLES DE PACIENTES EMPP A LOS 6 MESES DE TRATAMIENTO CON OCRELIZUMAB.....	- 101 -
5.2	DIFERENCIAS EN LA RESPUESTA INMUNOLÓGICA A OCRELIZUMAB EN FUNCIÓN DEL ESTADO INFLAMATORIO BASAL DE LOS PACIENTES EMPP.....	- 107 -
6	CONCLUSIONES.....	- 115 -
7	BIBLIOGRAFÍA.....	- 119 -
8	ANEXO: ARTÍCULOS RELACIONADOS.....	- 157 -

RESUMEN

Introducción

La esclerosis múltiple (EM) es una enfermedad autoinmune crónica del sistema nervioso central que induce desmielinización, inflamación y daño axonal. Es una enfermedad heterogénea con gran variabilidad clínica, cuya etiología se desconoce, aunque se han identificado diferentes factores ambientales que favorecen la aparición de la enfermedad en individuos predispuestos genéticamente. Aproximadamente un 15% de los pacientes debutan con la forma primariamente progresiva (EMPP), caracterizada por la progresión continua de la disfunción neurológica desde el comienzo de la enfermedad.

Aunque en las últimas décadas ha aumentado exponencialmente el número de opciones terapéuticas disponibles en la EM, éstas no han logrado modificar con éxito el curso de la EMPP. En el momento actual, ocrelizumab, un anticuerpo monoclonal anti-CD20, es el único tratamiento aprobado para pacientes con esta forma clínica de la enfermedad, gracias a unos buenos perfiles de seguridad y eficacia demostrados en el ensayo clínico ORATORIO.

Sin embargo, se desconocen los efectos del fármaco sobre el sistema inmunitario, por lo que resulta imprescindible entender el impacto que tiene sobre las diferentes poblaciones inmunológicas y su posible asociación con la respuesta al tratamiento. Además, no se sabe si ocrelizumab actúa diferencialmente en función del estado inflamatorio basal de los pacientes.

La llegada inminente de nuevas opciones terapéuticas hace necesaria la búsqueda de biomarcadores de respuesta clínica y/o inmunológica a ocrelizumab, que permitan la monitorización e identificación de pacientes EMPP con respuesta óptima a este tratamiento.

Objetivos y métodos

Los objetivos de esta tesis fueron:

- La identificación de los cambios inducidos por el fármaco ocrelizumab sobre subpoblaciones leucocitarias de sangre periférica de pacientes con EMPP.

- La búsqueda de biomarcadores que identifiquen de forma precoz a los respondedores óptimos y subóptimos a ocrelizumab en pacientes con EMPP.
- La exploración de los mecanismos inmunológicos asociados a respuestas óptimas/subóptimas a ocrelizumab, en pacientes EMPP con diferentes niveles de inflamación basal.

En un primer estudio se identificaron los cambios generales inducidos por ocrelizumab en una cohorte de 53 pacientes con EMPP. En el segundo estudio se incluyeron 69 pacientes EMPP clasificados según su estado inflamatorio basal y subclasificados en función de su respuesta al tratamiento. Para ello, se monitorizó la respuesta clínica y radiológica de los pacientes con un seguimiento mínimo de un año. En ambos estudios se analizaron muestras basales y de 6 meses tras la administración de la primera dosis de ocrelizumab. Se estudiaron, en sangre periférica, una amplia variedad de subpoblaciones leucocitarias de células B, T, NK y monocitos por citometría de flujo. Los estudios se completaron mediante la medición en suero de cadenas ligeras de neurofilamentos (sNFL) e inmunoglobulinas (Ig).

Resultados

En pacientes EMPP, ocrelizumab ocasiona una depleción casi completa del número total de linfocitos B a los 6 meses de tratamiento. Esta reducción se produce principalmente a expensas de las células B naïve, B de memoria y B productoras de interleuquina (IL)-6, IL-10, factor estimulante de colonias de granulocitos-macrófagos (GM-CSF) y factor de necrosis tumoral-alfa (TNF α). Al estudiar los porcentajes relativos al compartimento B, se observa una bajada relativa de células B naïve y de las productoras de TNF α pero con aumento en las proporciones de células B transicionales, plasmablastos y células B productoras de IL-6, IL-10 y GM-CSF, sugiriendo la necesidad de continuar el tratamiento. A los 6 meses de tratamiento también se observa una clara remodelación del compartimento de células T que favorecen un perfil tolerogénico. En los linfocitos T CD4+ y T CD8+ se produce un aumento relativo de los ratios entre poblaciones naïve

y efectoras, a causa de la disminución de la subpoblación T CD4+ terminalmente diferenciada (TD) y T CD8+ de memoria efectora (ME). Además, los números y porcentajes de linfocitos T CD20+ disminuyen significativamente tras la administración de ocrelizumab. En cuanto a las células del sistema inmune innato, el tratamiento con ocrelizumab induce una reducción en número, pero no en porcentaje, de la subpoblación de células NK CD56 bright, y un aumento del número total de monocitos a expensas de aquellos que expresan PD-L1 en su membrana, pero sin cambios en los productores de citoquinas inflamatorias, confirmando la redistribución tolerogénica que ocasiona la depleción de los linfocitos B.

Todas estas variaciones sobre células del sistema inmunológico se asocian a una reducción de los niveles de sNfL a los 6 meses de tratamiento con ocrelizumab. Esta disminución se observa tanto en pacientes con lesiones captantes gadolinio en la resonancia magnética (RM) cerebral basal, como en los pacientes sin tales lesiones pero con sNfL basales superiores a 10 pg/mL.

A continuación quisimos profundizar en el análisis de los efectos de ocrelizumab sobre el sistema inmunitario en una cohorte más amplia de pacientes EMPP, clasificados en función de la naturaleza inflamatoria de su enfermedad, según la presencia o ausencia de lesiones captantes de gadolinio en la RM basal.

En los pacientes inflamatorios, la respuesta óptima al fármaco se asocia exclusivamente con una bajada drástica de todas las subpoblaciones B y con un descenso de los niveles de sNfL hasta valores normales. Mientras tanto, la respuesta subóptima al fármaco está asociada a una mayor tasa de repoblación de células B, particularmente de linfocitos B transicionales y B productores de TNF α . Este hecho correlaciona con niveles basales elevados de sNfL que no descienden significativamente tras el tratamiento con ocrelizumab.

En los pacientes sin inflamación basal, ni los niveles de neurofilamentos ni la tasa de repoblación de células B se asociaron con la respuesta al fármaco. En este grupo, la respuesta óptima a ocrelizumab se asocia a la redistribución tolerogénica de los compartimentos de linfocitos T y

de monocitos. Esto se refleja tanto por el aumento en las proporciones naïve/TD y naïve/ME de linfocitos T CD4+ y T CD8+ y del número de monocitos totales y PD-L1+, como por la bajada de la proporción relativa de linfocitos T CD8+ productores de IFN γ . A su vez y solo en este grupo, ocrelizumab induce una expansión de los niveles séricos de IgA, así como del ratio IgA/IgG.

Conclusiones

Nuestro trabajo demuestra que la eliminación de células B inducida por ocrelizumab ocasiona una redistribución tolerogénica entre poblaciones efectoras y reguladoras, lo cual queda reflejado por la reducción de los niveles de sNfL. Sin embargo, nuestros datos muestran dos mecanismos distintos que predominan en la fisiopatología de la EMPP. En pacientes EMPP con inflamación basal, la respuesta óptima a ocrelizumab está mediada por la depleción mantenida de los linfocitos B con normalización de los sNfL. En la EMPP sin inflamación basal, la respuesta se asocia a la tolerización inducida en los compartimentos de células T y monocitos.

Independientemente de la vía inmunológica que impulse la respuesta a ocrelizumab en la EMPP, los mecanismos subyacentes pueden ser modificados por la depleción de las células CD20+. Esto hace que el fármaco sea eficaz y contribuya a la mejoría del curso de la enfermedad en la mayoría de los pacientes tratados.

Introduction

Multiple sclerosis (MS) is a chronic autoimmune disease of the central nervous system that induces demyelination, inflammation and axonal damage. MS is a heterogeneous disease with great clinical variability whose etiology is unknown, although different environmental factors have been identified promoting disease onset in genetically predisposed individuals. Approximately 15% of patients debut with primary progressive MS (PPMS), a clinical form characterized by continuous progression of neurological dysfunction since disease's onset.

Although number of therapeutic options in MS has increased exponentially in recent decades, they have failed to successfully modify the course of PPMS. At present, ocrelizumab, an anti-CD20 monoclonal antibody, is the only approved drug for patients with this clinical form of the disease, with good safety and efficacy profiles demonstrated in the ORATORIO clinical trial.

However, the effects of the drug on the immune system are unknown, so it is essential to understand its impact on different immune subsets and its possible association with response to treatment. Furthermore, it is not known whether the effect of ocrelizumab depends on the baseline inflammatory status of the patients.

The imminent arrival of new therapeutic options makes it necessary to search for biomarkers of clinical and/or immunological response to ocrelizumab, which allow the monitoring and identification of optimal response to treatment in PPMS patients.

Objectives and methods

The objectives of this work were:

- The identification of ocrelizumab-induced changes on peripheral blood leukocyte subsets of PPMS patients.
- The search for biomarkers that identify early optimal and suboptimal responders to ocrelizumab in PPMS patients.

- The exploration of the immunological mechanisms associated with optimal/suboptimal responses to ocrelizumab in different levels of baseline inflammation PPMS patients.

In a first study we identified the overall changes induced by ocrelizumab in a cohort of 53 PPMS patients. The second study included 69 PPMS patients classified according to their baseline inflammatory status and subclassified according to their response to ocrelizumab. For this purpose, the clinical and radiological response of patients was monitored with a minimum follow-up of one year. In both studies, baseline and 6-month samples were analyzed after administration of the first ocrelizumab dose. A wide variety of leukocyte subsets of B, T, NK cells and monocytes were studied in peripheral blood by flow cytometry. Studies were completed by serum measurement of neurofilament light chains (sNfL) and immunoglobulins (Ig).

Results

In PPMS patients, ocrelizumab causes an almost complete depletion of the total number of B lymphocytes at 6 months of treatment. This reduction occurs mainly because of naïve B cells, memory B cells and B cells producing interleukin (IL)-6, IL-10, granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF) and tumor necrosis factor-alpha (TNF α). On studying the percentages relative to the B cell compartment, a relative drop in naïve and TNF α -producing B cells was observed, but with an increase in the proportions of transitional B cells, plasmablasts and IL-6, IL-10 and GM-CSF-producing B cells, suggesting the need for continued treatment. At 6 months of treatment, a clear remodeling of the T-cell compartment is also observed, favoring a tolerogenic profile. In CD4+ and CD8+ T cells, there is a relative increase in the ratios between naïve and effector subsets, due to a decrease in the terminally differentiated (TD) CD4+ and effector memory CD8+ (ME) T cells. In addition, numbers and percentages of CD20+ T cells significantly decrease after ocrelizumab administration. As for cells of the innate immune system, ocrelizumab treatment induces a reduction in number but not in percentage of the CD56 bright NK cell subset, and an increase in the total number of monocytes at the expense of those

expressing PD-L1 in their surface, without changes in inflammatory cytokine producers, confirming the tolerogenic rebalance caused by B lymphocyte depletion.

All these variations on immune system cells are associated with a reduction in sNfL levels at 6 months of treatment with ocrelizumab. This decrease is observed both in patients with gadolinium-enhancing lesions on baseline MRI and in patients without such lesions but baseline sNfL levels above 10 pg/mL.

We next analyze the effects of ocrelizumab on the immune system in a larger cohort of PPMS patients, classified according to the inflammatory nature of their disease, which was measured by the presence or absence of gadolinium-enhancing lesions on baseline brain MRI.

In inflammatory patients, optimal drug response was exclusively associated with a dramatic drop in all B cell subsets and with a decrease in sNfL levels to normal values. Meanwhile, suboptimal drug response is associated with an increased rate of B-cell repopulation, particularly of transitional and TNF α -producing B lymphocytes. This correlates with elevated basal sNfL levels that do not significantly drop after ocrelizumab treatment.

In patients without baseline inflammation, neither neurofilament levels nor B-cell repopulation rate were associated with drug response. In this group, optimal response to ocrelizumab is associated with tolerogenic re-distribution of the T-lymphocyte and monocyte compartments. This is reflected both by the increase in the naïve/TD and naïve/EM ratios of CD4+ and CD8+ T cells and in number of total and PD-L1+ monocytes, and by the decrease in the relative proportion of IFN γ -producing CD8+ T lymphocytes. Only in this group ocrelizumab induce an expansion of serum IgA levels, as well as of the IgA/IgG ratio.

Conclusions

Our work has shown that ocrelizumab-induced B-cell depletion causes a tolerogenic rebalance between effector and regulatory leucocytes, which is reflected by reduced sNfL levels. We found

two distinct mechanisms that predominate in the pathophysiology of the disease in ocrelizumab-treated PPMS patients. In baseline inflammatory PPMS patients, optimal response to ocrelizumab is mediated by maintained B-lymphocyte depletion with normalization of sNFL levels. In PPMS without baseline inflammation, drug response is associated with induced tolerization in the T cell and monocyte compartments.

Regardless of the immune pathway driving the response to ocrelizumab in PPMS, the underlying mechanisms can be modified by CD20+ cell depletion. This makes the drug effective and contributes to improvement of the disease course in most treated patients.

ABREVIATURAS

BHE	Barrera hematoencefálica
BOCM-LE	Bandas oligoclonales de IgM específicas de lípidos
BTK	Tirosín-quinasa de Bruton
CPA	Célula presentadora de antígeno
EAE	Encefalomiелitis autoinmune experimental
EBNA1	Antígeno nuclear-1 del Epstein-Barr
EDA	Evidencia de actividad de la enfermedad
EDSS	Escala expandida del estado de discapacidad
EM	Esclerosis múltiple
EMA	Agencia Europea del Medicamento
EMPP	Esclerosis múltiple primariamente progresiva
EMPR	Esclerosis múltiple progresiva-recidivante
EMRR	Esclerosis múltiple recidivante-remitente
EMSP	Esclerosis múltiple secundariamente progresiva
FDA	Administración de alimentos y medicamentos de los Estados Unidos
Gd+/Gd-	Presencia/ausencia de lesiones captantes de gadolinio
GlialCAM	Molécula de adhesión de células gliales
GM-CSF	Factor estimulante de colonias de granulocitos-macrófagos
GWAS	Estudio de asociación de genoma completo
HLA	Complejo mayor de histocompatibilidad humano
IFNβ	Interferón beta
IFNγ	Interferón gamma
Ig	Inmunoglobulina
IL	Interleuquina
LCR	Líquido cefalorraquídeo
LMP	Leucoencefalitis multifocal progresiva
MC	Memoria central
ME	Memoria efectora
mRNA	Ácido ribonucleico mensajero
NEDA	Sin evidencia de actividad de la enfermedad

NEPAD	Sin evidencia de progresión o actividad de la enfermedad
NK	Célula <i>natural killer</i>
OMS	Organización mundial de la salud
PCD	Progresión confirmada de la discapacidad
PD-L1	Ligando-1 de muerte programada
PIRA	Progresión independiente de recidivas
RM	Resonancia magnética
S1P	Esfingosina-1-fosfato
SCA	Síndrome clínicamente aislado
SIMOA	<i>Single molecule array technology</i>
SNC	Sistema nervioso central
sNfL	Cadenas ligeras de neurofilamentos en suero
SRA	Síndrome radiológico aislado
TD	Terminalmente diferenciado
TGF-β	Factor de crecimiento transformante beta
Th	Célula T <i>helper/cooperadora</i>
TME	Tratamiento modificador de enfermedad
TNFα	Factor de necrosis tumoral alfa
Treg	Célula T reguladora
VCAM1	Molécula de cito-adhesión vascular-1
VEB	Virus de Epstein-Barr
VJC	Virus John Cunningham
VLA4	Antígeno de activación muy tardía-4

1 INTRODUCCIÓN

La Esclerosis Múltiple (EM) es una enfermedad autoinmune crónica del sistema nervioso central (SNC), que cursa con inflamación, desmielinización y daño axonal. En países desarrollados, supone la causa principal de discapacidad no traumática en adultos jóvenes [1], afectando a 2,8 millones de personas en todo el mundo [2].

Aunque no se conoce la causa exacta que desencadena la EM, se han identificado algunos factores que predisponen a padecerla. La susceptibilidad a la enfermedad se ha relacionado con un gran número de genes además de con varios factores ambientales bien definidos, en particular, los niveles de vitamina D, la exposición a la luz ultravioleta, la infección por el virus de Epstein-Barr (VEB), la obesidad o el tabaquismo [3].

Como sucede en un gran número de enfermedades autoinmunes, afecta de 2 a 3 veces más a las mujeres que a los hombres [4]. Los pacientes de EM suelen debutar a una edad cercana a los 30 años [4] aunque hay casos descritos tanto en edad infantil [5] como en adultos mayores de 60 años [6]. La forma más común de presentación (85% de los casos) es la EM recidivante-remitente (EMRR), caracterizada por la presencia de episodios agudos de empeoramiento (brotes o recaídas) seguidos de periodos de recuperación parcial o completa [7]. Un elevado porcentaje de pacientes con EMRR desarrolla la forma secundariamente progresiva (EMSP) durante las dos primeras décadas de su enfermedad. Lo que caracteriza a la EMSP es una progresión continua de la discapacidad, independiente de la presencia o ausencia de brotes [7]. Esta progresión continua de la discapacidad neurológica desde el comienzo de la enfermedad ocurre en hasta el 15% de los pacientes con EM, en la forma clínica conocida como primariamente-progresiva (EMPP) [7].

La EM es una enfermedad heterogénea en lo referido a su clínica y a su evolución. Los pacientes muestran distinta evolución en cuanto a la progresión de la discapacidad y a la gravedad y frecuencia de los brotes clínicos [8]. La aparición de lesiones focales desmielinizantes y su diferente localización determina las manifestaciones clínicas de la enfermedad, siendo de las

más frecuentes: la alteración visual, la ataxia, el déficit sensorial o la debilidad de miembros [8]. Dichas lesiones desmielinizantes, en las que se observan infiltrados leucocitarios, son las que provocan el daño axonal a largo plazo. Además, el curso de la enfermedad se modifica con el aumento de la edad de los pacientes, lo que se conoce como inmunosenescencia precoz [9].

Sin embargo, el manejo de la enfermedad presenta gran complejidad, a pesar de la gran batería de tratamientos modificadores de enfermedad (TME) que han salido al mercado en estas tres últimas décadas [10]. Esta dificultad de manejo queda especialmente patente en las formas progresivas de la enfermedad puesto que, en el momento actual, cuentan con una única opción terapéutica: ocrelizumab.

1.1 ASPECTOS HISTÓRICOS

Hace casi 2 siglos que se realizaron las primeras descripciones de lesiones desmielinizantes como zonas descoloridas en médula espinal [11, 12] pero no fue hasta 1868 cuando el doctor Jean-Martin Charcot hizo la primera descripción clínica y anatómica de un paciente vivo con EM [13], enfermedad a la que se denominó como “esclerosis en placas” hasta 1954.

En 1884, el doctor Pierre Marie, discípulo del doctor Charcot, observó un empeoramiento de los pacientes tras episodios infecciosos y febriles [14], asociándose por primera vez el posible origen de la enfermedad con el padecimiento de una infección viral.

El modelo experimental de la enfermedad, conocido como encefalomiелitis autoinmune experimental (EAE), fue desarrollado en 1935 por Thomas M. Rivers, evidenciando por primera vez que las células del sistema inmunológico tienen la capacidad de dañar al propio cerebro, y por tanto, sugiriéndose el origen autoinmune de la EM [15].

En 1891, Heinrich I. Quincke realizó la primera extracción de líquido cefalorraquídeo (LCR) con fines diagnósticos y terapéuticos [16], pero no fue hasta pasado medio siglo, en 1942, cuando

se describió un aumento de inmunoglobulina (Ig) G en el LCR de los pacientes con EM [17], evidenciando el papel del sistema inmunológico en la fisiopatogenia de la enfermedad.

Respecto a la clínica, la primera escala que permitió medir el grado de discapacidad de los pacientes fue desarrollada por John F. Kurtzke en 1955 y denominada *Disability Status Scale* [18]. El mismo autor, 28 años más tarde, perfeccionó su escala, pasándose a denominar *Expanded Disability Status Scale* (EDSS) [19], y es la que sigue utilizándose hasta el día de hoy.



Figura 1. Representación gráfica de la escala EDSS. Modificada de: <https://www.emonetoone.es/>

Los primeros criterios diagnósticos de la EM fueron publicados por Sydney Allison y Harold Millard en 1954 [20] aunque, debido a su gran subjetividad, fueron rápidamente reemplazados por los de George A. Schumacher de 1965 [21]. La aparición de la Resonancia Magnética (RM) supuso un gran avance en el entendimiento de la enfermedad, permitiendo la detección de las lesiones desmielinizantes en el propio SNC del paciente [22]. Desde 1991 se incluyó esta prueba de imagen como criterio diagnóstico de la enfermedad [23].

En julio de 2001 un grupo de neurólogos con gran experiencia en la EM encabezados por Ian McDonald, elaboran una guía actualizada de los criterios diagnósticos, definiendo e incorporando por primera vez a la forma primariamente progresiva de la EM (EMPP) [24]. Desde entonces se realizan revisiones periódicas de los criterios de McDonald, utilizándose en el momento actual la publicada en el año 2017 [25].

1.2 EPIDEMIOLOGÍA

En diciembre de 2020, la Organización Mundial de la Salud (OMS) publicó los datos de su tercer atlas de EM [26] actualizando los datos epidemiológicos respecto a las versiones de 2008 y 2013. La prevalencia mundial de la EM se estima en 36 personas por cada 100.000 habitantes, o lo que es lo mismo, 1 por cada 2800 habitantes. Esto implica que hay en torno a 2,8 millones de personas que padecen EM en todo el mundo [26]. Este dato se ha incrementado mucho a lo largo de los años (2,1 millones de pacientes en 2008 y 2,3 millones en 2013), probablemente debido a las mejoras en los métodos de conteo a nivel nacional y mundial, al perfeccionamiento del diagnóstico [27], y al aumento de la esperanza de vida de los pacientes con EM [28]. Sin embargo, la prevalencia de la EM no es geográficamente uniforme y varios estudios han demostrado que se relaciona con la latitud [29, 30], ya que aumenta inversamente en proporción a la cercanía al Ecuador [31], posiblemente debido a diversos factores ambientales como la exposición a la luz solar y, en consecuencia, a los niveles de vitamina D. Estos factores parece que desempeñan un papel importante durante la infancia puesto que diversos estudios han concluido que solo los individuos menores de 15 años que migran a zonas con distinta prevalencia, adoptan la prevalencia de la zona de destino, mientras que en adultos se mantiene la prevalencia de la zona de origen [1, 8].

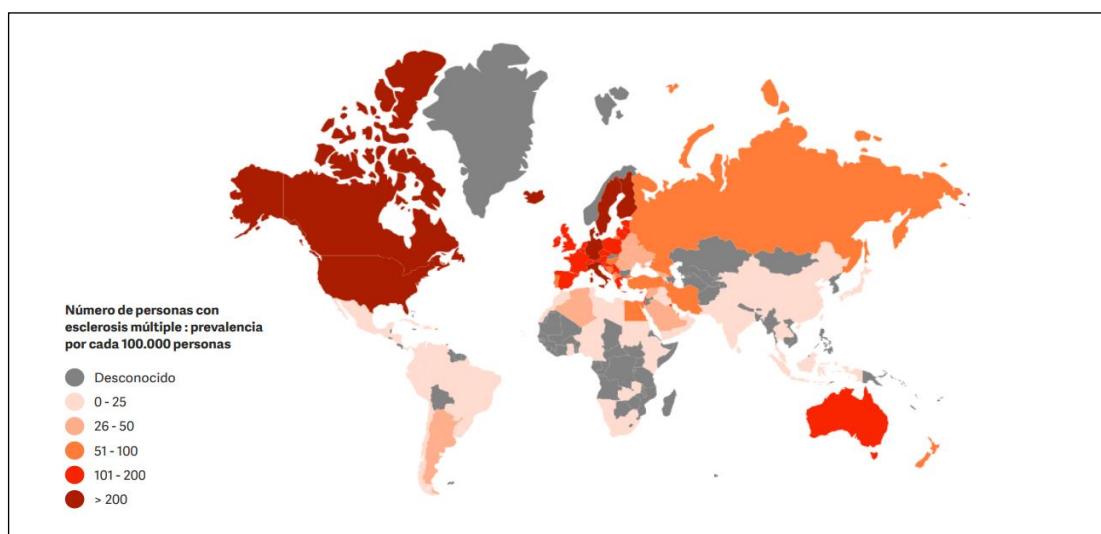


Figura 2. Prevalencia mundial de la Esclerosis Múltiple. Tomada de: The Multiple Sclerosis International Federation, Atlas of MS, 3rd Edition, September 2020. <https://www.atlasofms.org/>

La incidencia de la EM también está aumentando y de manera notable en el caso de las mujeres, 3 veces superior a la de los hombres en la mayoría de los países desarrollados [1], indicando también la posible variabilidad de la enfermedad en referencia a diferentes factores hormonales y/o genéticos [32]. En España, el 75% de los pacientes con EM son mujeres, y la mayoría de ellos debutan a una edad adulta temprana, siendo los 32 años la edad promedio en que se recibe el diagnóstico definitivo [26].

En España, los primeros estudios de prevalencia se realizaron en 1968 [33] con unas cifras muy inferiores a las actuales. Durante la década de los 80's se realizaron algunos estudios que estimaron una prevalencia de entre 5 y 20 pacientes con EM por cada 100.000 habitantes [34]. No fue hasta entrados los años 90's cuando se empezaron a publicar estudios con mayor fiabilidad, en los que la prevalencia rondaba los 60 casos por cada 100.000 habitantes [35-37]. A partir del año 2000 se establecieron prevalencias cercanas a las actuales, con datos comprendidos desde los 80 hasta los 180 casos de EM por cada 100.000 individuos [38-40].

El último estudio de la OMS recoge una prevalencia de 120 enfermos por cada 100.000 habitantes, lo que equivale a 1 por cada 800. Estos datos conllevan la cifra de unos 55.000 pacientes afectados de EM en nuestro país [26].

1.3 ETIOLOGÍA

Hasta la fecha de hoy se desconoce el agente causal de la EM, si bien todos los estudios apuntan a un modelo multifactorial en el cual se propone que, la combinación de diversos factores, sea lo que aumente el riesgo de padecer la enfermedad [41, 42]. Dicha predisposición a la EM puede explicarse en base tanto a componentes genéticos y epigenéticos como ambientales, y puede estar condicionada por el estilo de vida de los pacientes.

1.3.1 Factores genéticos

Los estudios familiares han puesto de manifiesto la existencia del componente genético puesto que la incidencia de la EM es de hasta el 2,5% en familiares de primer grado mientras que es inferior al 0,1% en la población general [43]. Además, los gemelos monocigóticos presentan una concordancia del 30%, claramente superior a la reportada para gemelos dicigóticos [44].

Varios genes que codifican moléculas del complejo principal de histocompatibilidad humano (HLA, del inglés *Human Leukocyte Antigen*) se han asociado con el desarrollo de la EM. Los individuos que portan en su genoma el alelo DRB1*15:01 tienen un riesgo 3 veces superior de padecer la enfermedad que aquellos que no lo portan [45]. Sin embargo, se han encontrado muchos más alelos HLA que alteran el riesgo de padecer la enfermedad, algunos aumentándolo (DRB1*03:01, DRB1*08:01, DRB1*13:03 y DQB1*03:02) y otros disminuyéndolo (A*02:01, B*38:01, B*44:02 y B*55:01) [46].

Además de estos genes, los estudios de GWAS (*Genome Wide Association Studies*) han evidenciado que existen otros muchos polimorfismos que pueden modificar el riesgo de padecer la EM. Estos polimorfismos se dan en algunos genes relacionados con la respuesta inmunológica que codifican para receptores de interleuquina (IL)-2 o de IL7 [47], factor de necrosis tumoral (TNF) [48], factores de transcripción como Nf-κB [49], o para el factor activador de las células B (BAFF) [50]. Sin embargo, la presencia de estos polimorfismos solo suponen un aumento de riesgo de entre 1,1 y 1,5 veces respecto a la población general, sugiriéndose que exista lo que se conoce como un modelo de herencia poligénica. Es decir, que sea la contribución modesta de distintos alelos de riesgo de múltiples genes polimórficos lo que realmente aumente el riesgo de desarrollar la EM.

1.3.2 Factores epigenéticos

Además de en los genes propiamente dichos, se ha encontrado asociación entre la EM y otros factores capaces de modificar la expresión de dichos genes, conocidos habitualmente como

factores epigenéticos. De todos ellos, en la EM cobran especial relevancia los microRNAs, la metilación del ADN y la modificación post-traducciona de las histonas.

Los microRNAs regulan la expresión de hasta un tercio de los genes mediante la degradación o inhibición del ácido ribonucleico (RNA, del inglés *ribonucleic acid*) mensajero (mRNA) [51]. En pacientes con EM se ha encontrado un patrón específico de los mismos, distinto del encontrado en individuos sanos [52]. Además, algunos tratamientos para la EM, como fingolimod [53] o natalizumab [54], son capaces de restaurar los niveles desregulados de algunos de estos patrones de microRNAs.

Por otro lado, se ha encontrado asociación entre el grado de metilación del ADN y el padecimiento de la EM [55], existiendo diferentes patrones de hipo- o hiper-metilación en regiones relacionadas con la expresión del alelo HLA DRB1*15:01 en los pacientes portadores del mismo [56].

Por último, las modificaciones post-traduccionales de las histonas también parecen jugar un papel importante en el desarrollo de la EM. Por ejemplo, en la sustancia blanca de pacientes con EM, se ha observado que un aumento en la acetilación de las histonas en genes implicados en la diferenciación de los oligodendrocitos provoca una disminución de la expresión de los mismos [57].

1.3.3 Factores ambientales y de estilo de vida

Como se ha comentado, los factores genéticos y epigenéticos tienen un papel importante en la enfermedad, si bien no pueden explicar intrínsecamente la etiología de la EM. El aumento de incidencia en las mujeres [1], la desigual distribución latitudinal de la enfermedad [29, 30], y la discordancia entre gemelos monocigóticos [44], entre otros, ponen de manifiesto la existencia de factores no genéticos que predispongan al desarrollo de la enfermedad. Aunque no se conocen todos ellos, hasta el momento se han encontrado diversos factores ambientales asociados a un aumento del riesgo de padecer EM. De entre estos factores cabe destacar la

presencia de algunas infecciones víricas, la falta de vitamina D, la obesidad, los cambios asociados a la microbiota, el tabaquismo o la excesiva ingesta de sal [42].

De todos los agentes infecciosos asociados a la EM, destaca por encima de todos el virus de Epstein-Barr (VEB). Aunque se trate de un virus presente en hasta el 95% de la población sana estudiada, se detecta en prácticamente la totalidad de los pacientes con EM y aumenta en hasta 32 veces el riesgo de desarrollar la enfermedad [58], postulándose como un factor desencadenante de la enfermedad. También se ha descrito que padecer mononucleosis infecciosa por VEB dobla el riesgo de desarrollar EM [59]. Recientemente, se ha demostrado que existe mimetismo molecular de alta afinidad entre un factor de transcripción del VEB, conocido como antígeno nuclear-1 (EBNA1), y la molécula de adhesión de células gliales (GlialCAM), presente en dichas células del SNC [60]. Se ha comprobado que la inmunización con EBNA1 exacerba la enfermedad en la EAE, y que la presencia de anticuerpos anti-EBNA1 y anti-GlialCAM es frecuente en los pacientes con EM [60]. De hecho, otros estudios apuntan a que el 100% de los pacientes tienen anticuerpos frente a EBNA1, con títulos superiores a los de la población general [61, 62] y correlacionando positivamente con el riesgo de desarrollar la enfermedad [63]. Además, se ha descrito mayor reactivación del VEB en pacientes con EM [64], y la presencia de linfocitos B con VEB reactivado en lesiones desmielinizantes activas de los pacientes [65]. Por último, se ha reportado que los niveles séricos de cadenas ligeras de neurofilamentos (sNfL), excelentes biomarcadores de daño axonal en la EM, aumentan tras la infección por VEB [58].

Puesto que la EM tiene una distribución heterogénea marcada por un gradiente latitudinal es inevitable considerar la exposición a la luz solar como uno de los factores ambientales a tener en cuenta. Dicha exposición solar se correlaciona con los niveles de vitamina D, puesto que la forma activa de la misma requiere el contacto de la luz ultravioleta con la piel. En este sentido, unos correctos niveles séricos de vitamina D disminuyen el riesgo de padecer EM, encontrando niveles por debajo del rango de normalidad en un alto número de pacientes [66]. Así mismo, los

niveles de melatonina, afectados por las diferencias estacionales de exposición solar, se correlacionan de manera inversa con la presencia de brotes de la enfermedad [67], de tal manera que, aunque la exposición solar y los niveles de vitamina D se reduzcan durante el invierno, la actividad de la EM disminuye por el aumento compensatorio de la síntesis de melatonina.

La obesidad es otro de los factores ambientales asociados al riesgo de padecer EM, si bien, solo parece afectar a aquellos individuos que hayan sufrido esta condición durante su adolescencia [68]. Aunque no está claro el motivo de esta relación causal, se ha postulado que los principales causantes sean la disminución de la biodisponibilidad de la vitamina D y/o el aumento de los niveles de leptina [42].

La microbiota es otro de los factores que parece jugar un papel en diversas enfermedades autoinmunes y, por supuesto, en la EM. En un estudio en gemelos monocigóticos (un gemelo sano y el otro con EM) se observó una diferente composición de la flora intestinal, destacando un incremento de *Akkermansia spp* en el gemelo enfermo [69]. Además, el trasplante de heces del individuo afecto de EM en ratones, aumentó en éstos la incidencia de EAE; mientras que el trasplante de heces del hermano sin EM no supuso lo mismo [69]. En las mismas fechas, se observó en otros grupos de pacientes con EM un aumento diferencial de *Akkermansia muciniphila* respecto a individuos sanos, especie capaz de modular linfocitos T humanos hacia un fenotipo pro-inflamatorio [70]. Además, en los últimos años, se está despertando el interés en el estudio de distintos metabolitos sintetizados por la microbiota intestinal. En este sentido, se demostró que la microbiota sintetiza metabolitos derivados del triptófano capaces de modular la actividad de la microglía [71] y de los astrocitos y, en consecuencia, la inflamación del SNC [72]. Adicionalmente, la microbiota es capaz de sintetizar otros metabolitos conocidos como ácidos grasos de cadena corta, entre los que destacan el acetato, el propionato y el butirato, y que parecen tener un papel relevante en la fisiopatogenia de la EM. Se han

encontrado niveles plasmáticos elevados de acetato en pacientes con EM, los cuales correlacionan directamente con el grado de discapacidad de los pacientes y con el número de linfocitos T pro-inflamatorios productores de IL-17 [73, 74]. Por último, se ha descrito que un predominio de los niveles de acetato sobre los de propionato, durante el primer trimestre de gestación de una paciente con EM, aumenta el riesgo de recidivas durante el periodo de puerperio [75].

El tabaco es otro de los factores asociados a un mayor riesgo de EM. En primer lugar, se atribuyó el aumento de la incidencia de la EM en las mujeres al propio aumento del número de mujeres fumadoras [76]. Varios trabajos sustentan el mayor riesgo de fumadores de desarrollar EM [59, 77] y de aumentar la progresión de la discapacidad de los pacientes [78]. Sin embargo, el mecanismo por el cual el tabaco produce tales efectos no está del todo claro. Algunos autores apuntan a que el factor determinante sea la irritación pulmonar producida como consecuencia del tabaco ya que tal asociación no se ha encontrado en consumidores de tabaco oral, pero sí en fumadores pasivos [79]. En cambio, otros autores apuntan a la hipótesis de que el tabaco pueda influir a través de modificaciones del microbioma gástrico e intestinal [80].

Por último, se ha encontrado una elevación del número de brotes y lesiones desmielinizantes en pacientes con EM que tienen una dieta rica en sal respecto de aquellos que llevan una dieta controlada de la misma [81]. Estos datos sugieren que la ingesta de sodio sea otro de los factores desencadenantes de la enfermedad.

1.4 FORMAS CLÍNICAS

La EM es una enfermedad heterogénea con gran variabilidad clínica, por lo que podemos hablar de distintas formas clínicas o fenotipos que se engloban dentro de una misma patología. La primera clasificación data de 1996 [82], donde el Comité Asesor sobre Ensayos Clínicos en Esclerosis Múltiple de la Sociedad Nacional de Esclerosis Múltiple de EE.UU. propuso 4 formas

clínicas: la EM recurrente-recidivante (EMRR), la EM primariamente-progresiva (EMPP), la EM secundariamente-progresiva (EMSP) y la EM progresiva-recidivante (EMPR).

Sin embargo, con el aumento de la base de conocimientos sobre la patología de la EM, se hicieron evidentes las limitaciones de estos fenotipos y, en 2013, decidieron incluir nuevos descriptores de actividad y progresión, teniendo en consideración las pruebas de imagen por RM y otros biomarcadores [82]. Desde ese momento, cada uno de los fenotipos mencionados podría subdividirse en sus formas activa o no activa. Esto supuso que la EMRR, una forma progresiva con brotes esporádicos, pasase a englobarse dentro de la EMPP activa.

Además, se incorporaron a la clasificación dos nuevos cursos de la enfermedad: el síndrome radiológicamente aislado (SRA) y el síndrome clínicamente aislado (SCA). El término SRA identifica a los pacientes con anomalías en las imágenes de RM, encontradas incidentalmente, pero altamente sugestivas de desmielinización en ausencia de otros signos o síntomas clínicos [83]. El término SCA describe un primer evento clínico altamente sugestivo de enfermedad desmielinizante del SNC, pero que no cumple los criterios para el diagnóstico de EM [84]. Es importante identificar correctamente cuales de estos pacientes alcanzarán finalmente un diagnóstico de EM, para tomar de forma precoz las decisiones clínicas más adecuadas.

1.4.1 Esclerosis Múltiple Recidivante Remitente

Se trata del fenotipo más común puesto que se da en alrededor del 85% de los pacientes con EM y se caracteriza por la alternancia de períodos de disfunción neurológica (recidivas o brotes) y períodos de relativa estabilidad clínica sin nuevos síntomas neurológicos (remisiones). La frecuencia de las recidivas puede variar de un paciente a otro, pero generalmente oscilan de entre 1 y 2 al año [85].

Durante el brote pueden presentarse diversos síntomas neurológicos, siendo los principales el deterioro de la agudeza visual y la visión doble, la debilidad de miembros y la alteración del equilibrio. Para ser considerados como tal, los brotes deben tener una duración de al menos 24

horas en ausencia de infección o alteración metabólica. Estas recaídas dan lugar a déficits residuales en casi la mitad de los episodios, lo que lleva a una acumulación escalonada de la discapacidad [86]. La magnitud de la patología inflamatoria y la frecuencia de las recidivas disminuyen a medida que avanzan la edad del paciente y la duración de la enfermedad [87].

1.4.2 Esclerosis Múltiple Secundaria Progresiva

La mayoría de los pacientes diagnosticados de EMRR y no tratados acaban evolucionando hacia la EMSP, con una mediana de tiempo hasta la fase progresiva de unos 19 años desde el debut de la enfermedad [88]. Es difícil determinar en qué momento exacto del curso de la enfermedad comienza la transición, por lo que el diagnóstico de la EMSP suele establecerse de forma retrospectiva, con desfases de hasta 3 años de duración [89].

Fenotípicamente, el curso de la EMSP no es uniforme y consiste en períodos de progresión con posible actividad de recaída superpuesta, pero también períodos de discapacidad relativamente estable. La patología implicada en la EMSP es poco conocida y probablemente compleja, e implica cierto grado de inflamación persistente, aunque en menor medida que en la EMRR, combinada con la neurodegeneración causada por la disfunción mitocondrial y el daño axonal resultante [85].

1.4.3 Esclerosis Múltiple Primariamente Progresiva

Alrededor del 15% de los pacientes desarrollan este fenotipo de la enfermedad, caracterizado por la ausencia de la fase inicial con recidivas y remisiones y la progresión continua de la disfunción neurológica desde el inicio de la enfermedad [90]. Algunos estudios han confirmado que la enfermedad progresa de forma paralela a como lo hace la EMSP [91] y dicha progresión puede no ser uniforme, existiendo la posibilidad tanto de brotes superpuestos como de períodos de relativa estabilidad. Según esto, se pueden considerar hasta 4 formas distintas de las formas progresivas: activa con progresión, activa sin progresión, no activa con progresión y no activa sin progresión [92].

El efecto que tiene la presencia de brotes clínicos podría sesgar la determinación de la progresión de la enfermedad por lo que, para evaluar la respuesta a determinados tratamientos, se utiliza el parámetro de análisis combinado PIRA (del inglés, *progression independent of relapse activity*) que tiene en cuenta las puntuaciones de progresión respecto al *score* basal, respetando la distancia al brote previo y solo si no se producen nuevos brotes en el siguiente mes desde el incremento de la discapacidad [93].

Para aumentar la sensibilidad en la detección de la acumulación de discapacidad en las formas progresivas, algunos ensayos clínicos utilizan la medida combinada NEPAD (del inglés, *no evidence of progression or active disease*) definida como la evidencia de no progresión en EDSS mantenida 3 meses, la ausencia de nuevas lesiones en RM y la ausencia de brotes clínicos [94].

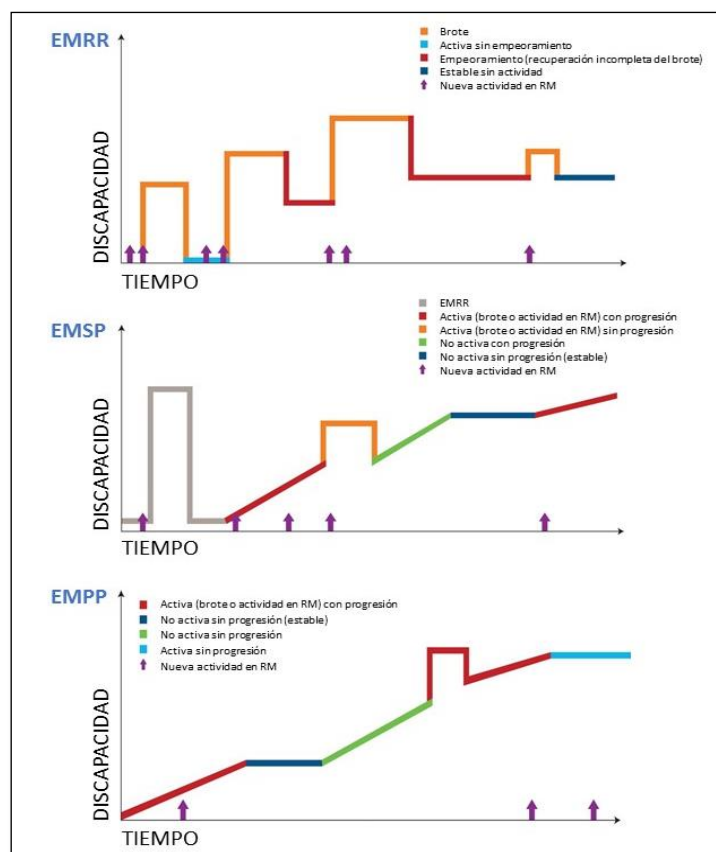


Figura 3. Formas clínicas de la Esclerosis Múltiple. Modificado de: Klineova S, Lublin FD. *Clinical Course of Multiple Sclerosis. Cold Spring Harb Perspect Med.* 2018;8(9):a028928. Abreviaturas: EM, esclerosis múltiple; RR, recurrente-remitente; SP, secundaria progresiva; PP, primariamente progresiva; RM, resonancia magnética.

1.5 DIAGNÓSTICO

Puesto que no se ha encontrado una característica patognomónica de la enfermedad ni una prueba exclusiva para su diagnóstico, éste puede resultar complejo. Al existir además multitud de patologías autoinmunes, infecciosas, metabólicas y/o degenerativas que afectan al SNC, se ha de tener especial cuidado en realizar un correcto diagnóstico diferencial de la EM.

Desde el año 2000 el diagnóstico de la enfermedad se establece en base a los criterios de McDonald [95], los cuales han sido revisados y actualizados hasta en 2 ocasiones. En la revisión de 2010 [96] se establecieron los criterios diferenciales entre la EM y el resto de trastornos del espectro de la neuromielitis óptica. En la revisión de 2017 [25] se establecieron los criterios diagnósticos que se usan en la actualidad y se reintrodujo el estudio de LCR en el diagnóstico de EM, devolviéndose el valor que habían perdido las bandas oligoclonales de IgG en las revisiones previas. De este modo, la presencia de diseminación en espacio y de bandas oligoclonales de IgG, tras un síndrome neurológico aislado, permiten el diagnóstico precoz de la EM.

Aunque la demostración de síntomas y signos clínicos pueda ser de gran utilidad, en la mayoría de ocasiones no tendrá la suficiente fuerza para establecer un diagnóstico. Por tanto, se ha de recurrir a pruebas paraclínicas entre las que destacan las pruebas de imagen, el estudio de los potenciales evocados y el análisis de muestras de LCR de los pacientes.

1.5.1 Pruebas de imagen

La demostración de la diseminación en espacio y en tiempo es fundamental en el diagnóstico de la EM y, por tanto, las imágenes de RM resultan casi indispensables para un diagnóstico precoz. La diseminación en el espacio puede demostrarse 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 diseminación en tiempo puede demostrarse por la presencia simultánea de lesiones que captan o no gadolinio en la primera RM o por la aparición de nuevas lesiones hiperintensas en T2 o captantes de gadolinio en RM

sucesivas [25, 96]. Aunque la RM tiene una sensibilidad del 95% en la detección de estas lesiones en sustancia blanca, ha de tenerse en cuenta que estas lesiones pueden darse de manera similar en otras patologías, por lo que no es un criterio suficiente para el diagnóstico diferencial de la EM. Además de para el diagnóstico, la RM es válida para el seguimiento de la actividad de la enfermedad y de la respuesta a tratamientos.

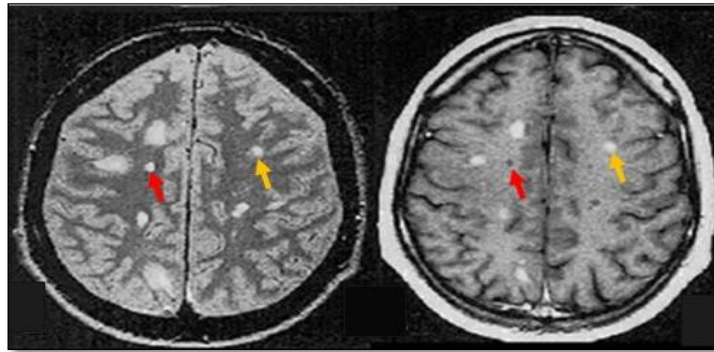


Figura 4. Lesiones desmielinizantes en RM de un paciente con EMRR. A la izquierda se muestran lesiones hipertensas en T2 y a la derecha lesiones en T1, sin (flecha roja) o con (flecha amarilla) captación de gadolinio como contraste. Modificado de Prieto González JM, Lema Bouzas M, Dapena Bolaño MD. Diagnóstico y tratamiento de la esclerosis múltiple. *Med Clin (Barc)*. 2004;123(19):743-748.

1.5.2 Estudios de LCR

Cuando no se consigue demostrar diseminación en tiempo y en espacio, el estudio de LCR cobra especial relevancia, aportando especificidad a los hallazgos encontrados en la RM. A nivel macroscópico, el LCR de un paciente con EM suele tener un aspecto y celularidad conservada, sin embargo, en más del 95% de los pacientes con EM se puede detectar síntesis intratecal de IgG. La síntesis intratecal de IgG puede demostrarse mediante métodos cuantitativos, semicuantitativos y/o cualitativos, teniendo estos últimos mayor sensibilidad. Los métodos cuantitativos como los índices de Tourtellote [97] o de Reiber [98] y semicuantitativos como el índice de Tibbling [99] se basan en determinar la integridad de la barrera hematoencefálica (BHE) usando como factor de corrección la presencia de albúmina, sintetizada de manera exclusiva en el hígado. Si aumentan los niveles de albúmina en LCR por daño de BHE, se asume

que el aumento de los niveles de IgG habrá sido producido por difusión junto a la primera. Sin embargo, en caso de que se produzca el aumento de IgG en LCR sin aumento de albúmina, los índices saldrán alterados y se asumirá síntesis intratecal.

Los métodos cualitativos están basados en la determinación de bandas oligoclonales (BOC) de IgG en LCR [100]. Las BOC de IgG aparecen en más del 96% de los pacientes diagnosticados de EM, si bien no son patognomónicas ya que pueden encontrarse en otras patologías como, por ejemplo, en ciertas infecciones del SNC.

1.5.3 *Potenciales evocados*

Esta prueba neurofisiológica mide la velocidad de conducción de los impulsos eléctricos en el SNC tras una estimulación sensorial. En el caso de existir desmielinización axonal, las señales eléctricas pueden retrasarse de modo que el potencial evocado puede atenuarse, retrasarse o incluso desaparecer [101]. Al igual que ocurre con la RM, los potenciales alterados no son específicos de la EM por lo que siempre requerirán pruebas complementarias para un diagnóstico completo.

1.6 **DIAGNÓSTICO DE LA EMPP**

El diagnóstico diferencial de la EMPP puede ser algo más complicado ya que la progresión de la enfermedad se produce, por lo general, sin la presencia de signos clínicos tan característicos como lo son los brotes y las remisiones. Por tanto, se requiere determinar de forma retrospectiva o prospectiva que haya habido 1 año de progresión de la discapacidad del paciente, sumado a dos de los tres criterios siguientes [25]: presencia de al menos 1 lesión hipertensa en T2 en cerebro (periventricular, cortical, yuxtacortical o infratentorial); presencia de al menos dos lesiones hipertensas en T2 en médula espinal; y/o presencia de bandas oligoclonales de IgG en LCR.

1.7 NEUROPTOLOGÍA

La principal característica de cualquier forma de EM es la presencia de lesiones focales o placas desmielinizantes predominantemente en la sustancia blanca, aunque la presencia de lesiones corticales en sustancia gris también haya sido demostrada en algunos pacientes [102]. Dichas lesiones desmielinizantes comienzan situándose alrededor de capilares y vénulas, lo que acaba alterando la permeabilidad de la BHE. Aunque se desconoce el mecanismo exacto de cómo se produce ese daño de BHE, todos los estudios apuntan a que sea consecuencia de la liberación de mediadores inflamatorios, fruto de la interacción entre células inmunes de sangre periférica y células del SNC [103], jugando un papel importante la activación astrocítica y la formación de cicatrices astrocitarias [104]. Una vez alterada la permeabilidad de la BHE, los linfocitos autorreactivos de sangre periférica serían capaces de migrar a través del endotelio, produciendo pérdida de oligodendrocitos y daño axonal. Como mecanismo compensatorio, en algunas lesiones pueden darse fenómenos de remielinización, ya que se han descrito el reclutamiento y la diferenciación de progenitores de oligodendrocitos, sobre todo en las etapas iniciales de la enfermedad [105].

El número y patrón de las lesiones desmielinizantes de sustancia blanca varía mucho a lo largo de la enfermedad, siendo mucho más abundantes y activas en las fases iniciales que en las fases progresivas de la EM [106]. Justo lo contrario ocurre en las lesiones corticales, que aumentan en número y tamaño a medida que progresa la enfermedad [107], y su presencia está muy asociada a la inflamación meníngea [108] y a la formación de acúmulos linfoides meníngeos [109, 110], correlacionando directamente con mayor neurodegeneración y agresividad de la enfermedad.

1.8 FISIOPATOLOGÍA

La fisiopatología de la EM involucra a multitud de tipos celulares que provocan el fenómeno de autoinmunidad crónica. Aunque se desconocen los mecanismos con exactitud, la hipótesis más

aceptada hasta la fecha sostiene que la respuesta inmune patológica esté desencadenada por linfocitos autorreactivos activados por células presentadoras de antígenos (CPA) en órganos linfoides periféricos. Estas CPA, entre las que se encuentran células dendríticas, macrófagos y linfocitos B, podrían estar presentando epítomos compartidos por la mielina y otros agentes patógenos (fenómeno conocido como mimetismo molecular), de tal manera que el linfocito T reconozca su propia mielina como un agente extraño. Esto podría explicar la clara asociación entre la EM y la infección por algunos virus como el de Epstein-Barr [111]. Las células T CD4+ autorreactivas activarían a linfocitos T CD8, linfocitos B y monocitos que podrían, mediante la secreción de citoquinas proinflamatorias, contribuir a la permeabilización de la BHE y a su migración al SNC a través de la misma. Una vez en el SNC, las células del sistema inmunológico volverían a ser expuestas al antígeno, reactivándose y secretando citoquinas y otros mediadores pro-inflamatorios que conllevarían a comenzar una respuesta inflamatoria local. Esos mediadores podrían activar a células de la microglía, las cuales promoverían retroalimentación del circuito con reclutamiento de más células desde la periferia hasta el SNC. Todo esto conllevaría a daño neuronal mediante distintos procesos como liberación de mediadores neurotóxicos o citotoxicidad dependiente de anticuerpos y/o del sistema del complemento. Además, la destrucción tisular provocaría que nuevos antígenos “extraños” fuesen presentados por CPA, aumentándose el número de dianas antigénicas para nuevos linfocitos T autorreactivos, fenómeno que se conoce como diseminación de epítomos [112].

1.8.1 Linfocitos T

Desde sus inicios, se ha considerado a la EM una enfermedad mediada casi exclusivamente por el linfocito T. Sin embargo, cada vez más evidencias apuntan a que su papel en la fisiopatología implica a muchos más componentes del sistema inmunológico. La rápida consideración del linfocito T como principal mediador de la EM se debió a la detección inmunohistoquímica de infiltrados de este tipo celular en las lesiones desmielinizantes de los pacientes [113] y a la

demostración de que la transferencia de linfocitos T específicos frente a la proteína básica de la mielina era suficiente para inducir la enfermedad en el modelo de EAE en ratón [114].

Los linfocitos T pueden subdividirse en 2 grandes poblaciones: los linfocitos T CD4+ o cooperadores (Th, T helper), que reconocen antígenos presentados por moléculas HLA de clase II; y los linfocitos T CD8+ o citotóxicos, que reconocen antígenos presentados por moléculas HLA de clase I. A su vez, ambos subtipos pueden subdividirse en otras 4 subpoblaciones: linfocitos T vírgenes (naïve), de memoria central (MC), de memoria efectora (ME) y terminalmente diferenciados (TD), en función de la expresión de las moléculas CCR7 y CD45RO. Mientras que en el LCR de individuos sanos predominan las subpoblaciones naïve y de MC [115], en pacientes con EM se han descrito poblaciones efectoras (ME y TD) aumentadas tanto en linfocitos T CD4+ [116] como en CD8+ [117], siendo capaces de llevar a cabo sus funciones efectoras tras su migración a tejidos periféricos [118, 119].

○ *Linfocitos T CD4+*

Las poblaciones de linfocitos T CD4+ que más se han asociado a la EM, incluso desde sus fases más tempranas, son la Th1 y la Th17 [120]. Las Th1, diferenciadas principalmente por la acción de la IL-12, se caracterizan por liberar citoquinas pro-inflamatorias como el interferón gamma (IFN γ) y el factor de necrosis tumoral alfa (TNF α), que contribuyen al daño neuronal; y otras como el factor estimulante de colonias de granulocitos y macrófagos (GM-CSF), necesaria y suficiente para inducir EAE [121]. Las Th17, diferenciadas a partir de IL-6, IL-1 β , IL-23 y el factor de crecimiento transformante beta (TGF- β), promueven la liberación de IL-17 e IL-22, habiéndose encontrado niveles elevados de estas citoquinas en lesiones, suero y LCR de pacientes con EM [122].

Otra de las poblaciones T CD4+ de interés es la de T reguladores (Treg), capaces de liberar IL-10, suprimir la respuesta inmune y promover tolerancia periférica. En otras enfermedades autoinmunes se ha identificado un bajo número de esta población [123, 124], mientras que en

la EM el número parece encontrarse dentro de la normalidad [125], siendo su funcionalidad la que se encontraría disminuida [126] debido a alteraciones en la expresión de su factor de transcripción FoxP3 [127], en la expresión del receptor de IL-2 (CD25), o en la producción y liberación de IL-10 [128].

○ *Linfocitos T CD8+*

A pesar de que en sangre periférica el cociente CD4/CD8 está conservado, en el LCR [129] y en las lesiones desmielinizantes [113] de los pacientes con EM la población de linfocitos T CD8+ está mucho más representada que la de linfocitos T CD4+, correlacionando directamente su número con un aumento del daño axonal [130]. Aunque en condiciones basales solo las células del endotelio y las de la microglía expresan HLA de clase I, se ha descrito un aumento de expresión de estas moléculas HLA en astrocitos, oligodendrocitos y neuronas [131] de pacientes con EM.

Estos linfocitos T CD8+ causan muerte directa de las células diana mediante la liberación de perforinas y granzimas [132], lo que contribuye en gran medida al daño axonal, habiéndose descrito niveles elevados de granzima A en el LCR de pacientes durante un brote, en comparación con los niveles observados en pacientes con baja actividad de la enfermedad o en remisión [133]. Al igual que ocurría con los T CD4+, los linfocitos T CD8+ activados pueden liberar citoquinas proinflamatorias como IFN γ , TNF α , IL-17 y GM-CSF, contribuyendo a la patogénesis de la enfermedad. Se han encontrado niveles aumentados de estas citoquinas en los pacientes con EM [134, 135].

1.8.2 *Linfocitos B*

Con el paso de los años y a medida que se ha adquirido conocimiento de la enfermedad, el linfocito B ha pasado de ser ignorado a convertirse en uno de los jugadores clave en la fisiopatología de la EM. Como ya se comentó, la síntesis intratecal de IgG detectada en forma de

BOC IgG constituye uno de los criterios diagnósticos actuales de la EM [25], revelando una respuesta humoral a consecuencia de una expansión oligoclonal de linfocitos B dentro del SNC.

Se han encontrado depósitos de moléculas de complemento y de anticuerpos IgG e IgM en los estudios histológicos de lesiones focales de pacientes con EM [136]. Además, en fases avanzadas y formas progresivas de la enfermedad, se forman acúmulos linfoides terciarios en las meninges, estructuras donde hay potentes quimioatrayentes que promueven el reclutamiento, la supervivencia y el desarrollo de las células T y B, creándose un sitio idóneo en el que se produzca una inflamación crónica con autorreactividad. Los pacientes con una mayor extensión de la inflamación meníngea albergaban en su sustancia blanca una mayor proporción de lesiones activas y una menor proporción de lesiones inactivas y remielinizadas, por lo que parece establecerse una correlación entre la inflamación cortical y subcortical [110]. Estos agregados ectópicos de linfocitos se correlacionan con un peor curso de la EM [137], y podrían constituir la principal fuente de inflamación intratecal del SNC [110,138].

El fracaso de algunas terapias que potenciaban la actividad del linfocito B [139], unido al éxito demostrado por los fármacos anti CD20, ha eliminado cualquier duda de la participación de esta población en la patología de la EM. Sin embargo, la molécula CD20 no está presente en células plasmáticas productoras de anticuerpos, por lo que esta población no es eliminada, hecho que se refleja en la presencia de BOC IgG a corto plazo [140].

El linfocito B actúa eficientemente como célula presentadora de antígenos a monocitos o linfocitos T [141], además de producir y liberar citoquinas como GM-CSF, TNF α , IL-6 e IL-10, contribuyendo de esta forma a regular la respuesta inmune [142]. De las subpoblaciones de células B, la de linfocitos B de memoria se ha visto aumentada tanto en LCR [116] y sangre periférica [143] de pacientes con EM, por lo que muchos fármacos en desarrollo tienen esta subpoblación como principal diana terapéutica. Por último, resaltar que hay una proporción de linfocitos B que expresan la molécula CD5 en su membrana, y que producen bandas

oligoclonales de IgM específicas de lípidos (BOCM-LE), principalmente fosfatidilcolina, las cuales se asocian con un peor pronóstico en la enfermedad [144,145].

1.8.3 Células del sistema inmune innato.

○ *Microglía y macrófagos*

Al igual que ocurría con los linfocitos, también se han encontrado infiltrados de células fagocíticas en los estudios histológicos de las lesiones de los pacientes con EM, con mayor representación de las mismas en pacientes con actividad [146], y constituyendo aproximadamente el 10% de las células residentes del SNC. Aunque se tiende a hablar indistintamente de ambas, las células de la microglía migran a SNC durante el desarrollo embrionario mientras que los macrófagos se diferencian a partir de monocitos de sangre periférica que atraviesan la BHE. Algunos estudios en el modelo de EAE han tratado de establecer las diferencias funcionales entre ambos tipos celulares, sugiriéndose que los macrófagos iniciarían el proceso de desmielinización y la microglía fagocitaría los restos celulares resultantes [147]. Sin embargo, otros estudios han determinado que comparten la función del mantenimiento de la homeostasis y, dependiendo del ambiente en el que se encuentren, ambos tipos celulares pueden polarizarse hacia fenotipos pro- (M1) o anti- (M2) inflamatorios [148]. Las células M1 liberarán citoquinas como IL-1 β , IL-6, IL-12, IL-23 y TNF α y otras sustancias neurotóxicas como especies reactivas de oxígeno [149]. Por su parte, las M2 liberarán mediadores inmunoreguladores como IL-10 y TGF β [148], llegando incluso a tener un papel neuroprotector, contribuyendo a la reparación de algunas sinapsis neuronales y, en consecuencia, del daño axonal [150].

○ *Células Natural Killer*

Al igual que ocurría con la microglía y los macrófagos, las células *Natural Killer* (NK) también pueden presentar un perfil pro- o anti-inflamatorio en función del patrón de citoquinas liberado [151] aunque su función principal, compartida con los linfocitos T CD8+, sea la inducción de

muerte celular de las células infectadas o tumorales y la producción de IFN γ para la activación de los macrófagos. Todas las células NK expresan en su membrana la molécula CD56, pudiendo subdividirlas en células NK CD56*dim* o NK CD56*bright* en función de la intensidad de expresión de dicho antígeno. Las CD56*dim*, subpoblación mayoritaria, liberan perforinas y granzimas para desempeñar su función citotóxica, y citoquinas proinflamatorias como mediadores de inflamación.

Las CD56*bright* logran sus funciones, predominantemente reguladoras, a través de la liberación de otras citoquinas. De hecho, se ha descrito un aumento de la población NK CD56*bright* en pacientes con EM tratados con interferón-beta [152], daclizumab [153], alemtuzumab [154] y dimetilfumarato [135], en este último caso, con números particularmente elevados en aquellos pacientes que respondieron de forma óptima al fármaco. Por el contrario, se ha descrito una disminución del número [155] y porcentaje [156] de NK CD56*bright* en pacientes tratados con fingolimod. Sin embargo, la respuesta óptima a fingolimod si se relaciona con niveles basales elevados en dicha subpoblación [156]. Por todo esto, la población CD56*bright* de las NK se postula como un posible biomarcador para el seguimiento de diversos fármacos modificadores de enfermedad de la EM.

Por último, existe una tercera población de células NKT, que co-expresan los marcadores de superficie CD3 y CD56*dim*. El porcentaje de NKT es inferior en el LCR de los pacientes con EMRR en comparación con el observado en controles de enfermedad neurológica no inflamatoria, pero no difiere del porcentaje encontrado en otras enfermedades neurológicas inflamatorias [157]. Además, el número de NKT en el LCR de pacientes con formas activas es superior al observado en pacientes en remisión, aunque estas diferencias en números y porcentajes no se reflejan en las muestras analizadas de sangre periférica [157].

1.9 TRATAMIENTO

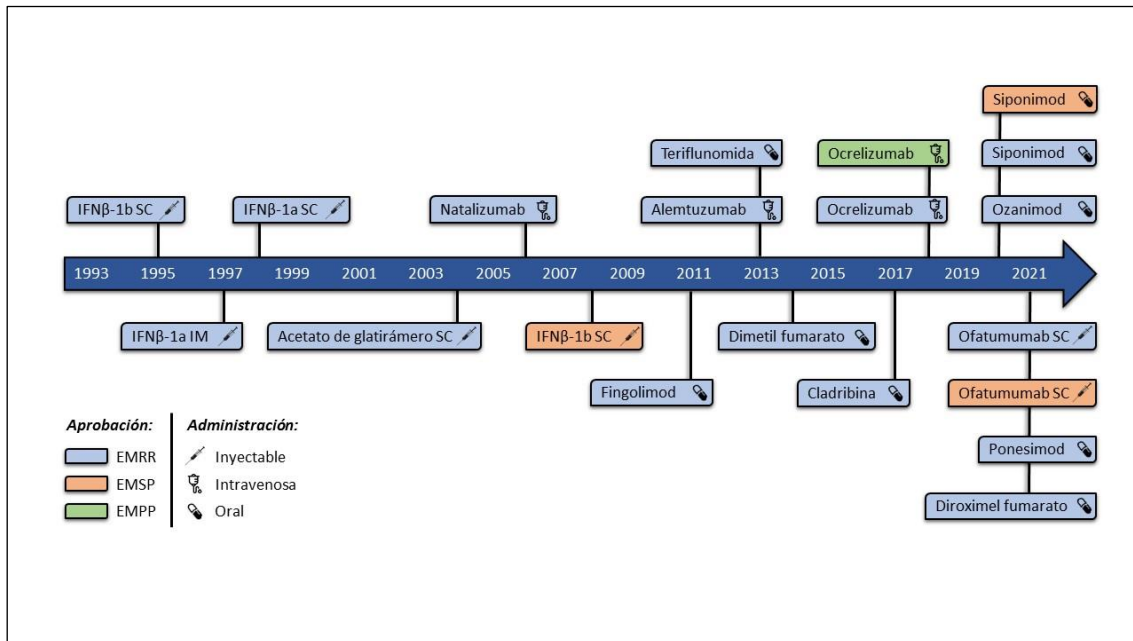


Figura 5. Evolución de los tratamientos modificadores de enfermedad en la esclerosis múltiple. Abreviaturas: EM, esclerosis múltiple; RR, recurrente-remitente; SP, secundaria progresiva; PP, primariamente progresiva; IFN, interferón; SC, subcutáneo; IM, intramuscular.

Hasta el momento, la EM es una enfermedad incurable. Las estrategias actuales de manejo terapéutico están centradas en la reducción de la actividad biológica mediante terapias modificadoras de la enfermedad (TME), suplementadas por fármacos para el control de los brotes agudos y para la mejoría de la sintomatología clínica [10].

Los TME modifican el curso de la EM mediante la supresión o modulación de la función inmunitaria. Ejercen una actividad inmunomoduladora encaminada a la reducción de la tasa de brotes, a la disminución de la acumulación de lesiones en RM, y a la estabilización, el retraso y, en algunos casos, la mejoría modesta de la discapacidad. Las primeras terapias aprobadas, (interferones y acetato de glatirámero) supusieron una revolución para el manejo de pacientes con EM ya que hasta los años 90 solo se dependía de la inmunosupresión. Estos fármacos presentan buena tolerancia y reducen modestamente la frecuencia de brotes [158].

○ *TME de administración subcutánea.*

El interferón beta (IFN β) es un interferón de clase I cuyo mecanismo de acción implica la regulación a la baja de la expresión de moléculas HLA en las CPA, la disminución de citoquinas pro-inflamatorias en favor de las anti-inflamatorias, la inhibición de la proliferación de células T y el bloqueo del tráfico de células inflamatorias hacia el SNC [159]. El IFN β presenta un buen perfil de seguridad, reduciendo modestamente la tasa de brotes hasta en un 30% a los 2 años de tratamiento [160, 161].

El acetato de glatirámero resulta de una mezcla de polipéptidos sintéticos y presenta un mecanismo de acción capaz de polarizar la respuesta inmunológica hacia un fenotipo Th2 mediante su unión a moléculas de HLA de clase II [162]. Al igual que el anterior, es un fármaco seguro que reduce ligeramente la tasa de brotes [163], considerándose una alternativa igualmente eficaz al IFN β en la EMRR [164].

○ *TME de administración oral.*

Fingolimod fue el primer tratamiento oral aprobado para el EMRR. Es un análogo de la esfingosina-1-fosfato (S1P), cuya función es el bloqueo del receptor de S1P, de tal forma que se impide la salida de linfocitos de los órganos linfoides secundarios, evitándose así la infiltración de linfocitos autorreactivos al SNC [165]. El fingolimod reduce la tasa de brotes en hasta un 50% y tiene un beneficio superior respecto al IFN β en la reducción de actividad observada en RM [166]. Por el contrario, no ha demostrado eficacia en la forma EMPP [167]. Se han encontrado algunos efectos secundarios adversos para este fármaco como: diseminación del virus varicela-zoster, infecciones criptocócicas, edema macular e incluso bloqueos cardiacos y bradicardia al inicio del tratamiento, por lo que se requiere monitorización del electrocardiograma para todos los pacientes que reciban su primera dosis [168].

Para tratar de mantener la funcionalidad pero reduciendo estos efectos adversos, se han ensayado y aprobado otros 3 fármacos que modulan selectivamente el receptor de S1P.

Ozanimod [169] y ponesimod [170], han demostrado resultados superiores en cuanto a la reducción en la tasa de brotes en sus ensayos clínicos fase III respecto a IFN β y teriflunomida, respectivamente. Siponimod, aunque ha demostrado resultados de eficacia similares a los anteriores en la EMRR, se ha convertido en una de las escasas opciones terapéuticas aprobadas para las formas secundariamente progresivas activas [171].

La teriflunomida es el metabolito activo de la leflunomida, inmunosupresor utilizado para el tratamiento de la artritis reumatoide. Este fármaco, de administración oral, 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 linfocitos T y B activados, presuntamente autorreactivos. Aunque los efectos adversos más comunes son náuseas, alopecia y elevación de enzimas pancreáticas, se ha descrito riesgo de hepatotoxicidad y teratogénesis. En caso de ser necesario, la teriflunomida puede eliminarse rápidamente mediante la ingestión de colestiramina. Su eficacia ha sido probada en ensayos clínicos fase III donde ha demostrado una disminución de la tasa de brotes de en torno al 31%, con buenos resultados en control de la progresión de la discapacidad y reducción del volumen lesional respecto al grupo de placebo [172, 173]. Sin embargo, no ha demostrado superioridad en eficacia respecto a otros fármacos como IFN β [174].

Dimetilfumarato es otro de los fármacos orales aprobado para la forma EMRR. Se trata de un éster del ácido fumárico (uno de los intermediarios del ciclo de Krebs) con propiedades antioxidantes, neuroprotectoras, anti-inflamatorias e inmunomoduladoras que actúa tanto en células de la respuesta innata como en las de la adaptativa [175]. Su eficacia es alta, ya que permite una reducción de la tasa de brotes cercana al 50% y una reducción superior al 80% en la aparición de nuevas lesiones en RM [176, 177]. Aunque es un fármaco seguro y los efectos adversos son leves, el uso de dimetilfumarato puede inducir linfopenia mantenida en hasta un 6% de los pacientes. Esta linfopenia debe ser monitorizada durante el primer año de

tratamiento, pues podría aumentar el riesgo de padecer una leucoencefalitis multifocal progresiva (LMP). La LMP es una enfermedad oportunista mediada por el virus John Cunningham (VJC) que puede inducir la muerte del paciente o un aumento considerable de su discapacidad [178]. En pacientes tratados con dimetilfumarato la aparición de LMP es rara, estimándose una incidencia de 2 por cada 100.000 pacientes tratados [178].

Diroximelfumarato es un fumarato oral de nueva generación aprobado para el tratamiento de pacientes EMRR con unos perfiles de eficacia y seguridad similares a los de dimetilfumarato [179]. De hecho, la administración oral de diroximelfumarato conduce a una rápida conversión en monometilfumarato, el mismo metabolito farmacológicamente activo que se forma tras la administración dimetilfumarato. Una de las principales ventajas de este fármaco en comparación con dimetilfumarato es su mejor tolerabilidad gastrointestinal, de tal manera que se reducen efectos gastrointestinales adversos en un gran número de pacientes, evitándose así la suspensión del fármaco por dicha causa. Este fármaco, aprobado por la EMA a finales de 2021, se ha empezado a comercializar en España desde junio de 2022.

Cladribina es otro de los fármacos de administración oral aprobados para la EMRR. Se trata de un análogo de la desoxiadenosina, el cual se activa en el interior celular mediante fosforilación por la enzima desoxicitidina-quinasa, produciendo muerte celular por apoptosis [180], para, posteriormente, ser inactivada por una fosfatasa. De esta manera, el efecto sobre cada tipo celular depende de la proporción quinasa/fosfatasa de cada una, teniendo así mayor efecto en linfocitos T y B y células NK de sangre periférica [181].

- *TME de administración intravenosa.*

Puesto que muchos de los fármacos de primera línea no demostraban una eficacia suficiente en la detención de la progresión de la EM, se desarrollaron fármacos de muy alta eficacia para una segunda línea de tratamiento, siendo la mayoría de ellos anticuerpos monoclonales humanizados. Este es el caso de natalizumab, alemtuzumab y ocrelizumab.

En 2006, natalizumab fue el primero de estos fármacos aprobados para la EMRR. Se trata de un anticuerpo monoclonal cuya diana es la integrina- $\alpha 4$ de la molécula VLA4 (del inglés, *very late antigen-4*), ligando de VCAM1 (del inglés, *vascular cell adhesion molecule 1*). Natalizumab bloquea la unión entre VLA4 y VCAM1, evitando la migración a SNC de linfocitos y monocitos a través de la BHE [182]. Reduce en casi el 70% la tasa de brotes respecto a placebo, así como la progresión de la discapacidad y la aparición de nuevas lesiones en RM [183], considerándose posiblemente el fármaco más eficaz para parar la actividad inflamatoria en la EM, de los descritos hasta el momento. Lamentablemente, su uso tiene como contrapartida un riesgo de LMP en 2.5 de cada 1000 pacientes tratados [184]. Por este motivo, la utilización de este TME requiere una estricta monitorización del paciente y la implementación de algoritmos que reduzcan al máximo el riesgo de padecer LMP [185-186].

En 2013 se aprobó alemtuzumab. Se trata de un monoclonal anti-CD52, molécula que se expresa en la superficie de varias células del sistema inmunológico como células NK y monocitos, pero sobre todo en linfocitos T y B. Su unión a CD52 provoca una rápida y marcada linfopenia con el objetivo de promover la reprogramación de la respuesta inmunitaria de los pacientes hacia un perfil tolerogénico [188]. Aunque presenta una eficacia comparable a la mostrada por natalizumab [189], su uso también es cuestionado por la frecuente asociación a diversas enfermedades autoinmunes secundarias, destacando especialmente las que afectan a la glándula tiroidea. Aunque requiere validación, recientemente se ha identificado un biomarcador basado en la monitorización de linfocitos B que identifica aquellos pacientes con EM con un menor riesgo de desarrollar fenómenos autoinmunes secundarios al uso de alemtuzumab [190].

- *TME dirigidos frente a células B*

Aunque en su mayoría podrían englobarse dentro del grupo de anticuerpos monoclonales de alta eficacia de administración intravenosa, merece la pena dedicar un apartado entero a las terapias dirigidas frente a linfocitos B.

Hasta cuatro anticuerpos monoclonales cuya diana es la molécula CD20 han sido sometidos a ensayos clínicos en la EMRR, resultando exitosos en mayor o menor medida pero dejando patente el papel del linfocito B en la fisiopatología de la EM. Sin duda, ha quedado claro que la eliminación de este tipo celular es un enfoque correcto a la hora de buscar dianas terapéuticas en esta patología. Estos cuatro anti-CD20 son, según el orden en que se realizaron sus ensayos clínicos en EM: rituximab, ocrelizumab, ofatumumab y ublituximab.

- *Rituximab*

Rituximab es un anticuerpo monoclonal quimérico dirigido frente a la molécula CD20 [191]. Su eficacia como deplecionante de linfocitos B se demostró en dos ensayos clínicos fase II. En el primero de ellos, el ensayo HERMES [192], se comparó el efecto de rituximab frente a placebo en 104 pacientes con EMRR, observándose su superioridad en la reducción de la tasa anualizada de brotes, del volumen lesional en T2 y de las lesiones captantes de contraste. El segundo ensayo se realizó en 30 pacientes con EMRR en los que se administró rituximab en dosis oncológicas como complemento de otros TME inyectables [193], demostrando una reducción de casi el 90% en la aparición de lesiones captantes de contraste en RM. Además, se realizó el ensayo clínico OLYMPUS de fase II/III en 439 pacientes con EMPP [194], que no alcanzó su objetivo primario de demostrar la superioridad de rituximab frente a placebo en el tiempo hasta alcanzar progresión confirmada de la discapacidad (PCD) ni en la tasa de atrofia cerebral, aunque si demostró una reducción en el volumen lesional en T2. Posteriormente, en un análisis de subgrupos, rituximab si mostró un retraso en el tiempo hasta PCD en pacientes menores de 51 años y/o en aquellos con lesiones captantes de gadolinio antes de la administración del fármaco, sugiriéndose que la depleción de linfocitos B sea más eficaz en pacientes más jóvenes y con mayor actividad inflamatoria [195].

Finalmente, rituximab no fue aprobado ni por la FDA (Administración de Alimentos y Medicamentos de los Estados Unidos) ni por la EMA (Agencia Europea del Medicamento) para

su uso en ninguna de las formas de la EM. Sin embargo, ha sido ampliamente usado “fuera de ficha técnica” en pacientes con EM con alta actividad y ha abierto la puerta al desarrollo y estudio de otros anti-CD20.

- *Ocrelizumab*

Ocrelizumab es un anticuerpo monoclonal anti-CD20 humanizado, lo cual aventaja a rituximab (anticuerpo monoclonal quimérico) en la potencial formación de anticuerpos neutralizantes del fármaco. Estos anticuerpos neutralizantes se han detectado en hasta el 50% de los pacientes que reciben rituximab de forma crónica [196].

Un primer ensayo clínico fase II exploró la eficacia de ocrelizumab a distintas dosis, frente a placebo o IFN β intramuscular, en pacientes con EMRR. Los pacientes que recibieron ocrelizumab, independientemente de la dosis, mostraron una reducción en la tasa anualizada de brotes y en el número de lesiones captantes de gadolinio respecto a los otros 2 grupos [197], pero no hubo reducción del volumen lesional en T2. Posteriormente se realizó un ensayo de extensión en el que, a los 6 meses, los pacientes de los 3 grupos recibían una siguiente dosis de ocrelizumab, demostrando que la tasa anualizada de brotes se mantenía más baja en los pacientes que iniciaron directamente con ocrelizumab que en aquellos que iniciaron con dosis de placebo o de IFN β [198].

Tras ello, se realizaron 2 ensayos clínicos fase III: OPERA I y OPERA II [199], para estudiar la eficacia de ocrelizumab frente a IFN β subcutáneo, en aproximadamente 800 pacientes EMRR por cada ensayo. Ocrelizumab mostró una mayor reducción de la tasa anualizada de brotes, menor incidencia de PCD y menor número de nuevas lesiones en T2 y captantes de gadolinio, mientras que la reducción en el volumen cerebral fue menor solo en el ensayo OPERA I. La proporción de pacientes con EMRR sin evidencia de actividad de la enfermedad (NEDA, del inglés *non-evidence of disease activity*) también fue mayor en los grupos de ocrelizumab de ambos ensayos clínicos [200]. En el análisis de subgrupos [201] se llegó a la misma conclusión que el

realizado en rituximab, con una mayor eficacia del fármaco en pacientes jóvenes (en este caso menores de 41 años) y con alta actividad inflamatoria (al menos una lesión captante de gadolinio en RM). En el posterior ensayo de extensión [202], los pacientes que provenían de ocrelizumab tuvieron mejores resultados en cuanto a proporción de pacientes con PCD y pacientes que alcanzaron NEDA, respecto a los pacientes que provenían de IFN β .

Algunos ensayos posteriores como ENSEMBLE [203] y CASTING [204] han demostrado proporciones del 75% al 85% de NEDA en pacientes EMRR con una duración de la enfermedad inferior a 3 años y, en pacientes que habían fracasado a otros TME previos, respectivamente.

Se evaluó también la eficacia de ocrelizumab respecto a placebo en 732 pacientes con EMPP en el ensayo ORATORIO de fase III [205] y, al contrario de lo que ocurrió en el ensayo OLYMPUS con rituximab, alcanzó su objetivo primario de reducción de la PCD a los 3 y a los 6 meses, y varios de sus objetivos secundarios como la mejoría clínica en el test de los 25 pasos, la disminución en el volumen lesional y la menor reducción del volumen cerebral. El ensayo de extensión [206] ha determinado un buen perfil de eficacia y seguridad mantenido durante más de 6 años, con mejores resultados en pacientes que iniciaron ocrelizumab de forma temprana respecto de aquellos que empezaron con placebo. Aunque los efectos adversos más comunes son leves, encabezados por las infecciones de tracto superior, ya han sido reportados 8 casos de LMP en pacientes tratados con ocrelizumab, si bien 7 de ellos se asociaron al tratamiento previo con natalizumab o fingolimod [207]. El caso restante sí se ha asociado directamente al uso de ocrelizumab en la EMPP, ya que el paciente no contaba con líneas de tratamiento previas [208]. Sin embargo, ha de tenerse en cuenta la edad del paciente (78 años) ya que la inmunosenescencia basal a esta avanzada edad conlleva un mayor riesgo a la hora de padecer infecciones.

Con todo ello, la FDA (2017) y la EMA (enero de 2018) aprobaron el uso del fármaco para las formas activas de la EMRR y para la EMPP, convirtiéndose en el primer y único fármaco

disponible a fecha de hoy para esta forma progresiva de la enfermedad. Esta limitación terapéutica tan evidente para una forma de la enfermedad que afecta al 15% de los pacientes con EM es importante revertirla, por lo que parece de importancia prioritaria el conocer todos los mecanismos fisiopatológicos que esconde la EMPP para aumentar el repertorio disponible de dianas de tratamiento.

- *Ofatumumab*

Ofatumumab es el primer anticuerpo monoclonal anti-CD20 totalmente humano, aprobado recientemente por la FDA (2020) y la EMA (2021) para el tratamiento de las formas activas de la EMRR. Además, cuenta con la particularidad de ser un TME de administración subcutánea, a diferencia de los otros 3 anti-CD20 que son de administración intravenosa.

En un primer ensayo clínico fase II [209] se demostró, en una cohorte de 38 pacientes EMRR, que a los 6 meses de tratamiento con ofatumumab se consigue reducir, en prácticamente la totalidad de pacientes, la aparición de nuevas lesiones en T2 y captantes de gadolinio. En un segundo ensayo fase II, llamado MIRROR [210], se estudiaron en 232 pacientes EMRR distintas dosis del fármaco, en comparación con un grupo placebo. A los 6 meses, la tasa de brotes fue superior en el grupo placebo que en cualquiera de las dosis de ofatumumab, con una reducción del 65% al 90% en el número acumulado de lesiones captantes de gadolinio. Posteriormente se realizaron dos ensayos fase III: ASCLEPIOS I y II [211] en alrededor de 900 pacientes EMRR tratados con ofatumumab subcutáneo, en comparación con un grupo que recibía teriflunomida oral. La tasa anualizada de brotes fue menor en los grupos de ofatumumab, donde también se observó una mayor reducción del riesgo de PCD. Ofatumumab promovió también una supresión más eficaz de la actividad observada en RM, con una reducción significativa en la aparición de lesiones en T2 y captantes de gadolinio. Sin embargo, no hubo diferencias con teriflunomida en el análisis de mejora de la discapacidad ni en las tasas de atrofia cerebral a los 6 meses de tratamiento.

- *Ublituximab*

Aunque aún no ha sido aprobado, se están realizando ensayos clínicos en un cuarto TME anti-CD20. En este caso, se trata de un anticuerpo quimérico modificado mediante glucoingeniería para potenciar su afinidad por el receptor de inmunoglobulinas FcγRIII [212], de tal manera que aumente su capacidad de lisis celular mediante citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos. Al ser un anticuerpo quimérico, al igual que rituximab, debe monitorizarse la potencial producción anticuerpos neutralizantes del fármaco.

En un ensayo fase II [213] en 48 pacientes EMRR, frente a placebo, se observó una reducción del 10% del volumen lesional en T2 con un 100% de reducción en la aparición de nuevas lesiones captantes de gadolinio. Posteriormente, se realizaron dos ensayos clínicos fase III: ULTIMATE I y II [214] en los que se utilizó teriflunomida como comparador activo, con mejoras significativas en la reducción de la tasa anualizada de brotes y en el número total de lesiones captantes de gadolinio y lesiones en T2. Sin embargo, no se encontraron diferencias entre los fármacos al estudiar la PCD ni los cambios en el volumen cerebral. Además, un 45% de los pacientes tratados con ublituximab alcanzaron NEDA, un 30% más que los que lo lograron con teriflunomida. Se prevé tener resultados de los estudios de extensión, con la posible aprobación del fármaco para la EM, en el año 2023.

1.10 BIOMARCADORES DE RESPUESTA A TRATAMIENTO

1.10.1 Biomarcadores de respuesta a tratamiento en EMRR

El manejo clínico de la EM es realmente complicado debido a la alta heterogeneidad de la enfermedad, por lo que es necesario encontrar biomarcadores que faciliten estos procesos. Un biomarcador se define como cualquier sustancia, estructura o proceso que puede medirse objetivamente en el organismo o en sus productos y que influye o predice la incidencia de un

resultado o de una enfermedad [215], o la respuesta farmacológica a una terapia [216]. Los biomarcadores pueden ser moleculares, histológicos, radiológicos o fisiológicos [217], y pueden clasificarse, según su función, en marcadores diagnósticos, pronósticos, de progresión y de respuesta al tratamiento [218].

En la actualidad, la tasa de brotes, la progresión de la discapacidad y la carga lesional son parámetros útiles para evaluar la actividad de la EM y la respuesta al tratamiento. Sin embargo, aunque es posible estandarizar estas características en cohortes grandes de pacientes, no es extrapolable a pacientes individuales [219]. Por tanto, existe una necesidad aun no cubierta de encontrar biomarcadores que sean lo suficientemente específicos, sensibles y rentables para evaluar la eficacia terapéutica y, en consecuencia, lograr una medicina personalizada en la EM [220], posibilitando la selección de los pacientes con alta probabilidad de responder a un tratamiento específico.

Como ya se ha comentado, en las últimas 3 décadas ha crecido exponencialmente el número de opciones terapéuticas para la EMRR. Sin embargo, el hallazgo de buenos biomarcadores que predigan la respuesta a los mismos no está corriendo la misma suerte, por lo que el fracaso y cambio de línea terapéutica es algo común. En la EMPP, donde ocrelizumab es la única opción disponible, tampoco hay biomarcadores validados de respuesta a este tratamiento. Dado el mal pronóstico de estos pacientes y los nuevos ensayos clínicos que ofrecen otras opciones a estos pacientes (por ejemplo, el ensayo clínico fase III FENtrepid evalúa la eficacia de fenebrutinib en pacientes EMPP utilizando ocrelizumab como comparador activo), la búsqueda de biomarcadores de respuesta a ocrelizumab en la EMPP es una línea de investigación prioritaria.

- *Anticuerpos neutralizantes*

Fueron las primeras moléculas utilizadas como biomarcadores de respuesta al tratamiento ya que son producidos tras la administración de algunos TME de naturaleza proteica, con la consiguiente disminución de su biodisponibilidad. La presencia mantenida en el tiempo y a

títulos elevados de anticuerpos anti-IFN β afecta negativamente a la progresión de la EM [221], pudiendo ser útiles para la identificación de pacientes que respondan de forma subóptima [222]. Sin embargo, los anticuerpos neutralizantes frente a acetato de glatirámero no se asocian a una disminución de la eficacia farmacológica [223], y en los formados frente a natalizumab solo hay disminución del beneficio si éstos se mantienen en el tiempo [224]. La formación de estos anticuerpos neutralizantes se ha asociado a la aparición de reacciones de hipersensibilidad en pacientes tratados con natalizumab [225].

○ *Factores solubles*

El estudio de ciertas moléculas solubles implicadas en inflamación también puede ser útil en la búsqueda de biomarcadores de respuesta. Se ha descrito que, previo a iniciar un TME, los pacientes con niveles bajos de IL-10 en suero son candidatos a una mejor respuesta a IFN β [226], justo lo contrario a lo que sucede en pacientes con niveles elevados de IL-17 sérica [227].

CXCL13, una quimiocina atrayente de linfocitos B, también puede considerarse un biomarcador de respuesta óptima a ciertos fármacos ya que se ha encontrado una disminución de la molécula en pacientes tratados con natalizumab [228] y con rituximab [140].

○ *Cadenas ligeras de los neurofilamentos*

Los neurofilamentos son proteínas del citoesqueleto axonal compuestas por cadenas ligeras (NfL), medianas y pesadas, según su peso molecular [229], y que tienen un papel primordial en el mantenimiento de la estructura y en el transporte axonal [230]. Al producirse daño axonal, el citoesqueleto se desestructura, liberándose neurofilamentos al LCR. Esto los convierte en un buen biomarcador de daño axonal de diferentes trastornos neurológicos, entre los que se incluye la EM [231]. En comparación con controles sanos, los niveles de NfL en LCR están elevados en pacientes con EM, y presentan niveles aún más altos durante los brotes, lo que refleja el daño axonal agudo mediado por la inflamación [232]. Además, el aumento de los niveles de NfL en LCR es un factor de riesgo para la conversión de un SCA [233] o de un SRA [234]

en una EM clínicamente definida. En la EM, los niveles de NfL en LCR se asocian con un mayor número de lesiones en T1 y en T2, con más lesiones captantes de gadolinio, y con una mayor discapacidad. Además, se ha visto que concentraciones elevadas de NfL en LCR se asocian con la presencia de BOCM-LE y con un mayor número de linfocitos B en LCR [235].

Los niveles de estas moléculas en LCR se asocian también con la respuesta al tratamiento. Se ha visto que el IFN β es capaz de reducir niveles de NfL [236] aunque la disminución es considerablemente mayor en pacientes tratados con fingolimod [237] o natalizumab [238]. Este último, tras un año de tratamiento reduce la concentración de NfL en LCR hasta niveles encontrados en controles sanos [238]. Rituximab también reduce los niveles de NfL en pacientes con EMRR [239] y EMPP [240], especialmente en aquellos con enfermedad activa. Sin embargo su cuantificación intratecal no es útil para la monitorización del tratamiento en la práctica clínica habitual, donde generalmente no está indicada la punción lumbar más allá del diagnóstico de la enfermedad.

Con la llegada de la tecnología SIMOA (del inglés, *Single Molecule Array Technology*) se ha posibilitado la cuantificación de los niveles de NfL en muestras de suero, con una alta sensibilidad. Además, se ha encontrado una fuerte asociación entre los niveles de NfL en LCR y suero [241], lo que convirtió el estudio de estas moléculas en suero como un potencial biomarcador en la EM. Así, se ha visto que los niveles de NfL en suero (sNfL) están aumentados en pacientes con EM y se correlacionan positivamente con la actividad observada en RM, con el número de brotes y con el deterioro de la discapacidad física [241, 242].

Del mismo modo, se ha publicado que la concentración de sNfL disminuye tras el tratamiento con IFN β [243] o tras el cambio de terapia a fingolimod [244], que los niveles de sNfL son menores en pacientes que han recibido algún TME respecto de aquellos que no han sido tratados, y que la disminución de esos niveles está inversamente correlacionada con la duración de la terapia [241]. La respuesta óptima al tratamiento con dimetilfumarato se asocia con niveles

bajos de sNfL [245]. Recientemente, se incluyó por primera vez el estudio de los sNfL como criterio de valoración en el ensayo ASCLEPIOS con ofatumumab, encontrado una disminución mayor en pacientes tratados con este fármaco respecto a los tratados con teriflunomida [211].

○ *Poblaciones leucocitarias*

La citometría de flujo ha posibilitado el estudio inmunofenotípico de los pacientes con EM. El estudio de LCR, aunque es algo complicado por la escasa celularidad y la invasividad en la obtención de muestras seriadas, refleja de manera fiel lo que ocurre en el parénquima del SNC en el momento de la extracción de la muestra. En cambio, el estudio de poblaciones leucocitarias en sangre periférica es mucho menos invasivo y permite investigar los cambios inmunológicos producidos en respuesta a diferentes tratamientos, con el objetivo de identificar a los respondedores óptimos.

En este sentido, se ha descrito que la respuesta óptima al IFN β puede establecerse con un porcentaje de linfocitos B CD5+ o de linfocitos T CD8+ productores de perforina inferiores al 3,0% y 2,6%, respectivamente [246]. Del mismo modo, los respondedores a IFN β presentan una expansión de linfocitos T CD4+ de fenotipo regulador [247] y de células NK CD56 bright [248]. Esta última población NK se ha estudiado en otros fármacos, observándose un aumento en respuesta a daclizumab [153], alemtuzumab [154] y dimetilfumarato [135]. La respuesta a acetato de glatirámero se ha relacionado con una disminución de la expresión de CD40 en células dendríticas [249]. La mala respuesta a fingolimod se asocia a niveles elevados de linfocitos B transicionales, linfocitos T CD4-CD8- y emigrantes tímicos recientes, previo al tratamiento [250]; mientras que una respuesta óptima se da en pacientes con niveles basales disminuidos de plasmablastos y aumentados de células NK CD56 bright [156]. La respuesta óptima a natalizumab se asocia a la disminución de expresión de CD49d en células mononucleares de sangre periférica, lo que rebaja su capacidad de migración [251]. La buena respuesta a dimetilfumarato está marcada por el aumento de NK CD56 bright y la disminución de los

linfocitos B de memoria y de los linfocitos T CD4+ y T CD8+ con fenotipo de memoria central, de linfocitos T CD4+ productores de IFN γ , de linfocitos T CD8+ productores de IFN γ y TNF α , y de linfocitos B productores de TNF α [135]. La respuesta óptima a teriflunomida se asocia a una reducción de linfocitos T CD8+ con fenotipo terminalmente diferenciado [252]. Además, este fármaco aumenta en los monocitos de sangre periférica la expresión de la molécula PD-L1 (ligando-1 de muerte programada), la cual promueve un ambiente tolerogénico, revirtiendo el estado de inflamación que se da en la EM [252]. Aunque todos estos biomarcadores son prometedores, carecen de utilidad clínica mientras no sean validados en grandes estudios multicéntricos con nuevas cohortes de pacientes.

1.10.2 Biomarcadores de respuesta a tratamiento en EMPP

Hasta la fecha, pocos estudios se han centrado en la búsqueda de biomarcadores de respuesta a TME en la EMPP, debido en parte al poco arsenal terapéutico disponible para esta forma de la enfermedad.

OBOE (del inglés, *Ocrelizumab Biomarker Outcome Evaluation*) [253] ha sido el principal ensayo clínico realizado para encontrar biomarcadores a ocrelizumab en 28 pacientes con EMPP. En LCR, los linfocitos B y T se redujeron tras el tratamiento, aunque no se realizaron estudios diferenciales de subpoblaciones. La molécula CXCL13 también tendió a disminuir tras ocrelizumab, pero no alcanzó significación estadística. En un primer análisis de esta cohorte se observó una disminución de los niveles de NfL tanto en suero como en LCR a las 12 semanas de tratamiento [254], la cual no se mantuvo a las 52 semanas, aunque los niveles fueron más bajos en los pacientes con lesiones basales captantes de gadolinio que en los que no [253].

Recientemente se han publicado los resultados de un estudio en 378 pacientes con EMPP tratados, fuera de ficha técnica, con fingolimod. Previo al tratamiento, se observó una correlación entre los niveles de sNfL y edades más avanzadas de los pacientes, mayor discapacidad, dependencia más temprana del uso de silla de ruedas, mayor carga lesional,

mayor riesgo de PCD, mayor deterioro cognitivo y mayores tasas de atrofia cerebral. Sin embargo, la progresión de la discapacidad en pacientes con niveles altos de sNfL fue independiente de la presencia de lesiones en la RM basal, poniendo de manifiesto la relevancia del NfL como potencial biomarcador. Tras fingolimod, los niveles de NfL disminuyeron frente a los de los pacientes tratados con placebo, permaneciendo elevados en respondedores subóptimos al fármaco, en los que se determinó progresión de su discapacidad [255].

2 JUSTIFICACIÓN DEL TRABAJO DE TESIS

En las últimas décadas ha aumentado exponencialmente el número de opciones terapéuticas disponibles en la EM. Sin embargo, no es así para la forma primariamente progresiva, que afecta a aproximadamente al 15% de los pacientes. La práctica totalidad de las terapias que han demostrado eficacia en la forma EMRR no han logrado alterar el curso de la EMPP. De hecho, en el momento actual, ocrelizumab es el único TME aprobado (por la FDA en 2017 y por la EMA en 2018) para pacientes diagnosticados de la forma primariamente progresiva.

El ensayo clínico ORATORIO demostró la eficacia y seguridad del anti-CD20 ocrelizumab en la EMPP, logrando reducciones en la progresión de la discapacidad, la tasa de brotes, el número de lesiones en resonancia magnética, la disminución en el volumen lesional, la menor reducción del volumen cerebral y la mejoría clínica en el test de los 25 pasos. Estos datos son los que permitieron su aprobación y, estudios de extensión posteriores han comprobado que la eficacia y seguridad se mantienen con éxito durante al menos 6 años de seguimiento.

Sin embargo, el potencial éxito de las terapias dirigidas frente a linfocitos B en la forma EMPP ya se había puesto de manifiesto algunos años antes con el ensayo clínico OLYMPUS, en el que se evaluó a rituximab, otro anticuerpo monoclonal anti-CD20. Aunque rituximab cumplió varios de sus objetivos secundarios, no obtuvo significación estadística en su objetivo primario de reducir la progresión de la discapacidad, por lo que se desestimó su aprobación. Un posterior análisis de subgrupos mostró que dicha progresión sí se redujo significativamente en el grupo de pacientes más jóvenes (<51 años de edad) y/o con evidencia de una mayor actividad inflamatoria de su enfermedad. Precisamente estos resultados proporcionaron la justificación y el diseño del ensayo con ocrelizumab.

Hay diferencias notables en el reclutamiento y en las características basales de los pacientes con EMPP participantes en el ensayo OLYMPUS de rituximab frente a los del ensayo ORATORIO con ocrelizumab. En el primero se reclutaron pacientes con una media (rango) de edad de 50,1 (18,0-65,0) años frente a 44,7 (20,0-56,0) años para los pacientes de ocrelizumab. Los pacientes del

OLYMPUS presentaban una duración más larga de su enfermedad respecto a los de ORATORIO (9,2 años de media frente a 6,7) aunque con una media (rango) de EDSS similar: 4,8 (2,0-6,5) frente a 4,7 (2,0-7,0). El 65,0% de los pacientes del ensayo de rituximab no había recibido TME previos frente al 88,7% de los pacientes del ensayo de ocrelizumab. Además, el porcentaje de pacientes con lesiones captantes de gadolinio fue ligeramente superior en el ensayo ORATORIO, un 27,5% frente al 24,1% del ensayo OLYMPUS.

Por todo lo anterior, no queda claro si ocrelizumab es igual de eficaz en todos los pacientes con EMPP, o si, por el contrario, y al igual que ocurrió en el análisis de subgrupos del ensayo con rituximab, tiene un potencial superior en pacientes más jóvenes y con un mayor estado inflamatorio basal. Además, tampoco se conocen los efectos del fármaco sobre el sistema inmunitario, por lo que es necesario entender el impacto que tiene sobre las diferentes poblaciones inmunológicas y su posible asociación con la respuesta al tratamiento.

Pese a ser el único fármaco aprobado para la EMPP en el momento actual, se están realizando nuevos ensayos clínicos, principalmente en moléculas inhibitoras de la BTK (tirosín-quinasa de Bruton). Ante la llegada inminente de nuevas opciones terapéuticas, resulta imprescindible la identificación de respondedores óptimos a ocrelizumab y, por tanto, la búsqueda de biomarcadores clínicos y/o inmunológicos de respuesta al mismo.

3 HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

Ocrelizumab tiene un efecto claro aunque modesto en pacientes diagnosticados de EMPP, con unos buenos perfiles de seguridad y eficacia mantenidos en el tiempo. Rituximab, otro anti-CD20, también demostró su eficacia pero solo en un subgrupo de pacientes más jóvenes y con altos niveles de inflamación basal, reflejado por la presencia de lesiones captantes de gadolinio en la RM, previo inicio del tratamiento. Las características basales de los pacientes que participaron en el ensayo clínico ORATORIO de ocrelizumab eran similares al subgrupo en el que rituximab demostró su eficacia, de tal manera que no queda claro si el efecto superior de ocrelizumab sobre rituximab depende solo de su mecanismo de acción, o si bien es que actúa, tanto clínica como inmunológicamente, de diferente manera en función del estado inflamatorio de los pacientes. La citometría de flujo es una de las mejores herramientas para realizar un seguimiento exhaustivo de los cambios que producen estas terapias sobre poblaciones celulares. Estudiando una gran cantidad de poblaciones leucocitarias, así como sus perfiles inmunofenotípicos de producción de citoquinas, podrían caracterizarse los efectos que produce ocrelizumab en pacientes con formas primariamente progresivas. Una vez explorados esos cambios, podrían encontrarse biomarcadores que, además de contribuir a la monitorización, identifiquen qué pacientes son los que obtendrán un mayor beneficio de esta terapia.

Así, los objetivos de esta tesis fueron:

- ✓ La identificación de los cambios inducidos por el fármaco ocrelizumab sobre subpoblaciones leucocitarias de sangre periférica de pacientes con EMPP.
- ✓ La búsqueda de biomarcadores que identifiquen de forma precoz a los respondedores óptimos y subóptimos a ocrelizumab en pacientes con EMPP.
- ✓ La exploración de los mecanismos inmunológicos asociados a respuestas óptimas/subóptimas a ocrelizumab, en pacientes EMPP con diferentes niveles de inflamación basal, con la finalidad de desentrañar nuevas y potenciales dianas terapéuticas.

4 PUBLICACIONES

4.1 EFFECT OF OCRELIZUMAB IN BLOOD LEUKOCYTES OF PATIENTS WITH PRIMARY PROGRESSIVE MS

*Fernández-Velasco JI, Kuhle J, Monreal E, Meca-Lallana V, Meca-Lallana J, Izquierdo G, Gascón-Giménez F, Sainz de la Maza S, Walo-Delgado PE, Maceski A, Rodríguez-Martín E, Roldán E, Villarrubia N, Saiz A, Blanco Y, Sánchez P, Carreón-Guarnizo E, Aladro Y, Brieva L, Íñiguez C, González-Suárez I, Rodríguez de Antonio LA, Masjuan J, Costa-Frossard L, Villar LM. Effect of Ocrelizumab in Blood Leukocytes of Patients With Primary Progressive MS. *Neuroimmunol Neuroinflamm.* 2021 Jan 6; 8(2): e940*

Antecedentes: En aproximadamente el 15% de los casos, la EM comienza con un empeoramiento progresivo de la discapacidad sin periodos de remisión. Esta forma de la enfermedad se conoce como EM primariamente progresiva (EMPP) y se asocia a un peor pronóstico. Ocrelizumab es el único tratamiento modificador de enfermedad aprobado para la EMPP, desde que su eficacia y seguridad quedaron demostradas en el ensayo clínico ORATORIO. Nuestro objetivo fue analizar los cambios inducidos por ocrelizumab en las células inmunitarias de la sangre periférica de pacientes EMPP.

Diseño del estudio: Longitudinal, prospectivo, multicéntrico.

Pacientes: Se incluyeron 53 pacientes con EMPP que iniciaron el tratamiento con ocrelizumab.

Métodos: Se aislaron células mononucleares de sangre periférica heparinizada antes de iniciar tratamiento con ocrelizumab y 6 meses después, y se criopreservaron hasta su utilización. Los ensayos se hicieron en paralelo en las muestras basales y de 6 meses de tratamiento. Se estudiaron subpoblaciones leucocitarias efectoras, de memoria y reguladoras por citometría de flujo. Los niveles séricos de las cadenas ligeras de neurofilamentos se obtuvieron mediante tecnología SIMOA. Las comparaciones entre muestras basales y de 6 meses de tratamiento

fueron analizadas mediante el test de Wilcoxon. Los valores de significación estadística fueron corregidos por el test de Bonferroni.

Resultados: Ocrelizumab consiguió una depleción casi completa del número total de linfocitos B a los 6 meses de tratamiento en pacientes EMPP. Esto lo logró a expensas de la reducción en los números de células B naïve, B de memoria y células B productoras de interleuquina (IL)-6, IL-10, factor estimulante de colonias de granulocitos-macrófagos (GM-CSF) y factor de necrosis tumoral-alfa (TNF α). Por el contrario, las proporciones de plasmablastos y células B productoras de GM-CSF e IL-6 aumentaron significativamente, sugiriendo la necesidad de continuar el tratamiento. También se observó una disminución del número y porcentaje de células T CD20+, así como una clara remodelación del compartimento de células T, con aumento relativo de las proporciones naïve/efectoras en las células T CD4+ y T CD8+, y disminución relativa de las células T CD4+ y T CD8+ que producen interferón-gamma. El número total de monocitos aumentó a expensas de aquellos que expresan PD-L1 en su membrana, pero no se observaron cambios en los productores de citoquinas inflamatorias. Las variaciones inmunológicas se asociaron a una reducción de los niveles séricos de las cadenas ligeras de neurofilamentos (sNfL). La disminución en los niveles de sNfL se observó tanto en pacientes con lesiones captantes gadolinio como en los pacientes sin tales lesiones pero con sNfL basales superiores a 10 pg/mL.

Conclusiones: En la EMPP, la drástica depleción de las células B efectoras cambia la respuesta de células T hacia un perfil tolerogénico, reflejado por la disminución de los niveles de sNfL.

Effect of Ocrelizumab in Blood Leukocytes of Patients With Primary Progressive MS

José I. Fernández-Velasco, BSc, Jens Kuhle, MD, PhD, Enric Monreal, MD, Virginia Meca-Lallana, MD, José Meca-Lallana, MD, PhD, Guillermo Izquierdo, MD, PhD, Francisco Gascón-Giménez, MD, Susana Sainz de la Maza, MD, Paulette E. Walo-Delgado, MD, Aleksandra Maceski, PhD, Eulalia Rodríguez-Martín, PhD, Ernesto Roldán, PhD, Noelia Villarrubia, PhD, Albert Saiz, MD, PhD, Yolanda Blanco, MD, Pedro Sánchez, MD, Ester Carreón-Guarnizo, MD, PhD, Yolanda Aladro, MD, Luis Brieva, MD, Cristina Íñiguez, MD, Inés González-Suárez, MD, Luis A. Rodríguez de Antonio, MD, Jaime Masjuan, MD, Lucienne Costa-Frossard, MD, and Luisa M. Villar, PhD

Correspondence
Dr. Villar
villarluisa88@gmail.com

Neurol Neuroimmunol Neuroinflamm 2021;8:e940. doi:10.1212/NXI.0000000000000940

Abstract

Objective

To analyze the changes induced by ocrelizumab in blood immune cells of patients with primary progressive MS (PPMS).

Methods

In this multicenter prospective study including 53 patients with PPMS who initiated ocrelizumab treatment, we determined effector, memory, and regulatory cells by flow cytometry at baseline and after 6 months of therapy. Wilcoxon matched paired tests were used to assess differences between baseline and 6 months' results. *p* Values were corrected using the Bonferroni test.

Results

Ocrelizumab reduced the numbers of naive and memory B cells ($p < 0.0001$) and those of B cells producing interleukin (IL)-6, IL-10, granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF), and tumor necrosis factor- α (TNF α) ($p < 0.0001$ in all cases). By contrast, the proportions of plasmablasts and B cells producing GM-CSF and TNF α increased significantly, suggesting the need for treatment continuation. We also observed a decrease in CD20⁺ T-cell numbers ($p < 0.0001$) and percentages ($p < 0.0001$), and a clear remodeling of the T-cell compartment characterized by relative increases of the naive/effector ratios in CD4⁺ ($p = 0.002$) and CD8⁺ ($p = 0.002$) T cells and relative decreases of CD4⁺ ($p = 0.03$) and CD8⁺ ($p = 0.004$) T cells producing interferon- γ . Total monocyte numbers increased ($p = 0.002$), but no changes were observed in those producing inflammatory cytokines. The immunologic variations were associated with a reduction of serum neurofilament light chain (sNfL) levels ($p = 0.008$). The reduction was observed in patients with Gd-enhanced lesions at baseline and in Gd- patients with baseline sNfL >10 pg/mL.

Conclusions

In PPMS, effector B-cell depletion changed T-cell response toward a low inflammatory profile, resulting in decreased sNfL levels.

From the Immunology Department (J.I.F.-V., P.E.W.-D., E.R.-M., E.R., N.V., L.M.V.), Ramon y Cajal University Hospital, Madrid, Spain; Neurologic Clinic and Policlinic (J.K., A.M.), Departments of Medicine, Biomedicine, and Clinical Research, University Hospital Basel, University of Basel, Switzerland; Neurology Department (E.M., S.S.d.I.M., J.M., L.C.-F.), Ramon y Cajal University Hospital, Madrid; Neurology Department (V.M.-L., P.S.), La Princesa University Hospital, Madrid; Multiple Sclerosis and Clinical Neuroimmunology Unit (J.M.-L., E.C.-G.), Virgen de la Arrixaca University Hospital, Murcia; Multiple Sclerosis Unit (G.I.), Vithas Nisa Sevilla Hospital; Neurology Department (F.G.-G.), Valencia Clinic University Hospital; Center of Neuroimmunology (A.S., Y.B.), Neurology Department, Clínic of Barcelona Hospital, Institut d'Investigacions Biomèdiques August Pi i Sunyer (IDIBAPS), and Institut de Neurociències, Universitat de Barcelona; Neurology Department (Y.A.), Getafe University Hospital, Madrid; Neurology Department (L.B.), Arnau de Vilanova Hospital, Lleida; Neurology Department (C.I.), Lozano Blesa Clinic University Hospital, Zaragoza; Neurology Department (I.G.-S.), Alvaro Cunqueiro Hospital, Vigo; Neurology Department (L.A.R.d.A.), Fuenlabrada University Hospital, Madrid, Spain.

Go to [Neurology.org/NN](https://www.neurology.org/NN) for full disclosures. Funding information is provided at the end of the article.

The Article Processing Charge was funded by P118/00572 integrated in the Plan Estatal I+D+I and cofunded by ISCIII-Subdirección General de Evaluación and Fondo Europeo de Desarrollo Regional (FEDER, "Otra manera de hacer Europa").

This is an open access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution-NonCommercial-NoDerivatives License 4.0 (CC BY-NC-ND), which permits downloading and sharing the work provided it is properly cited. The work cannot be changed in any way or used commercially without permission from the journal.

Glossary

EM = effector memory; **GM-CSF** = granulocyte-macrophage colony-stimulating factor; **IFN- γ** = interferon-gamma; **Ig** = immunoglobulin; **IL** = interleukin; **NK** = natural killer; **PBMC** = peripheral blood mononuclear cell; **PD-L1** = programmed death-ligand 1; **PPMS** = primary progressive MS; **RRMS** = relapsing-remitting MS; **sNfL** = serum neurofilament light chain; **TD** = terminally differentiated; **TNF α** = tumor necrosis factor-alpha.

MS is the most prevalent demyelinating disease of the CNS. Most patients initially show with a relapsing-remitting (RR) course. However, in about 10% of the cases, the disease starts with a progressive disability worsening without remission periods.¹ This form of the disease is known as primary progressive MS (PPMS) and is associated with a poorer prognosis.² Classically, patients with PPMS do not benefit of disease-modifying treatments approved for the relapsing form of the disease.³ This changed recently with the approval of ocrelizumab (Ocrevus; Roche, Grenzach-Wyhlen, Germany) as a disease-modifying treatment for PPMS. Its efficacy and safety were demonstrated in the ORATORIO phase III clinical trial.^{4,5}

At the molecular level, these humanized antibodies selectively target cells that express CD20 on their surface. The CD20 molecule is expressed in most B-cell subsets as pre-B, naive, and memory B cells, whereas it is absent in stem cells, pro-B cells, and plasma cells. Accordingly, ocrelizumab treatment results in B depletion mediated by complement, cellular cytotoxicity, or apoptosis.⁶ However, its effect on other immune cell subsets has not been fully addressed. The effects of B-cell depletion by rituximab, another CD20 monoclonal antibody, were studied in patients with RRMS. Flow cytometry demonstrated reduced CSF B cells and T cells in most patients 6 months after treatment.⁷ CD4⁺ and CD8⁺ T-cell reduction remained stable with subsequent rituximab cycles. This was also observed in other immune cell types.⁸ Future studies will address whether additional changes are observed in patients with RRMS treated with ocrelizumab. In this line, a nearly complete depletion of B cells was observed in patients with PPMS 2 weeks after the administration of a single dose of this drug.^{9,10} However, CD20 is also expressed on a small subset of CD3⁺ T cells, a highly activated subset of T cells displaying increased expression of activation markers and production of proinflammatory cytokines.^{11,12} These cells are found in blood, CSF, and chronic brain lesions of patients with MS^{12,13} and have shown to be effectively depleted by rituximab in patients with RRMS¹⁴ and ocrelizumab in a small cohort of 21 patients with MS (only 4 of them classified as patients with PPMS).^{9,10} Despite these data, less is known about the effect of ocrelizumab in different T- and B-cell subsets as well as on natural killer (NK) cells and monocytes.

We describe the changes induced by ocrelizumab in blood immune cells of patients with PPMS to further understand the effect of the drug in the abnormal inflammatory response taking place in these patients.

Methods

This multicenter prospective longitudinal study included 53 patients diagnosed with PPMS according to the McDonald criteria¹⁵ who consecutively initiated ocrelizumab treatment in 10 university hospitals. Basal patient data are depicted in table 1.

MRI examination was performed within 1 month before treatment initiation following clinical protocols established in each of the centers.

Sample Collection

Patient heparinized blood specimens were obtained just before initiating ocrelizumab treatment and 6 months thereafter, before the second dosing. Samples were sent to the Immunology Department of Hospital Ramón y Cajal (Madrid) where peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) were separated 24 hours after blood collection, including those collected at the same hospital, and cryopreserved until studied. Basal and 6-month samples were studied simultaneously to avoid interassay variability. Serum samples were stored at -80°C until processed. A second aliquot of fresh blood collected in an EDTA tube was used to explore total lymphocyte and monocyte counts in a Coulter counter.

Monoclonal Antibodies

CD8-FITC, CD20-FITC, CD24-FITC, interferon-gamma (IFN γ)-FITC, interleukin (IL)-1 β -FITC, CD27-PE, IL-10-PE, CD197 (CCR7)-PE, GM-CSF-PE, CD3-PerCP, tumor necrosis factor-alpha (TNF α)-PerCP-Cy5.5, CD19-PE-Cy7, CD25-PE-Cy7, programmed death-ligand 1 (PD-L1)-PE-Cy7, CD45RO-APC, CD56-APC, IL-12-APC, IL-6-APC, CD4-APC-H7, CD8-APC-H7, CD14-APC-H7, CD38-APC-H7, CD3-BV421, CD127-BV421, IL-6-BV421, CD45-V500 (BD Biosciences, San Jose, CA), and IL-17-APC (R&D Systems, Minneapolis, MN).

Labeling of Surface Molecules

We prepared aliquots of 10^6 PBMCs in RPMI 1640 medium (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA), labeled them with adequate amounts of fluorescence-labeled monoclonal antibodies during 30 minutes at 4°C in the dark. Cells were washed twice with PBS and analyzed by flow cytometry as detailed below.

In Vitro Stimulation and Intracellular Cytokine Staining

We studied intracellular production of pro- and anti-inflammatory cytokines by B and T lymphocytes as previously described.¹⁶ In

Table 1 Baseline Data and Patient Characteristics (n = 53)

Age, y, median (range)	52.0 (33.0–67.0)
Sex, F/M	23/30
Disease duration, y, median (range)	8.8 (1.4–15.4)
EDSS score, median (range)	6.0 (2.0–8.0)
Patients showing contrast-enhancing lesions (n = 48), n (%)	12 (25.0)
T2 lesions on MRI (n = 48), n (%)	
<10 lesions	11 (22.9)
10–50 lesions	29 (60.5)
50–100 lesions	4 (8.3)
>100 lesions	4 (8.3)

Abbreviation: EDSS = Expanded Disability Status Scale.

In addition, we explored intracellular cytokine production by monocytes by stimulating aliquots of 10^6 PBMCs with 1 mg/mL lipopolysaccharide (from *Escherichia coli* O111: B4; Merck, Kenilworth, NJ) during 4 hours at 37°C in 5% CO₂.

Flow Cytometry

PBMCs were analyzed within 1 hour after antigen labeling. Isotype controls were used for setting mean auto-fluorescence values. Results obtained were analyzed using FACSDiva software V.8.0 (BD Biosciences) as previously described.¹⁶ A minimum amount of 5×10^4 events were analyzed. The gating strategy is shown in figure e-1 (links.lww.com/NXI/A368). For intracellular cytokine staining, nonstimulated PBMCs were used as control of basal production (figure e-2, links.lww.com/NXI/A369). We explored intracellular production of IL-1 β , IL-6, IL-10, IL-12, and TNF α by monocytes; IFN γ , granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF), TNF α , IL-17, and IL-10 by CD4 and CD8 T cells; and IL-6, IL-10, TNF α , and GM-CSF by B cells.

Flow Cytometry Analyses

To avoid bias due to B-cell depletion, we analyzed total cell counts per microliter for every leukocyte subset. This was calculated by exploring percentages over total mononuclear cells (CD45⁺) and total lymphocyte and monocyte numbers as described above. In addition, we recorded the values of every T, B, NK, and monocyte subset relative to total T, B, NK, and monocyte cells, respectively.

Immunoglobulin and sNfL Quantification

Immunoglobulin (Ig) G, IgA, and IgM levels were measured by nephelometry on a BN ProSpec analyzer (Siemens Healthcare Diagnostics). Serum neurofilament light chain (sNfL) levels were quantified in a SR-X instrument (Quanterix, Lexington, MA) using the single molecule array NF-light Advantage Kit technique (Quanterix, Billerica, MA).¹⁷

Statistical Analysis

Statistical analyses were performed with GraphPad Prism 6.0 software (GraphPad Prism Inc., San Diego, CA). Differences between basal and 6 months samples were assessed by Wilcoxon matched paired tests. *p* Values were adjusted using the Bonferroni method. *p* Values below 0.05 were considered significant.

Standard Protocol Approvals, Registrations, and Patient Consents

This study was approved by the Ramón y Cajal University Hospital Clinical Research Ethics Committee. Written informed consent was obtained from every patient before entry.

Data Availability

Anonymized data supporting the findings of this study will be shared by any qualified investigator during 3 years after the publication of the study on reasonable request.

Results

Fifty-three patients with PPMS (43% females) treated with ocrelizumab for at least 6 months were included in this study. Median (range) age and disease duration were respectively 52.0 (33.0–67.0) and 8.8 (1.4–15.4) years, respectively, and the median Expanded Disability Status Scale score was 6 (2–8) at baseline. MRI data from 48 patients were available. A low baseline activity (defined as less than 10 lesions) was observed in 22.9% of patients, with a moderate activity (10–50 lesions) in 60.5% and a high (50–100 lesions) or very high activity (>100 lesions) in 16.6%. Twelve patients (25%) of our cohort showed at least 1 contrast-enhancing lesion (table 1).

We studied the changes induced by ocrelizumab in the peripheral blood mononuclear cell counts after 6 months of treatment. Patients experienced a discrete decrease in the absolute lymphocyte counts, not reaching statistical significance (ns) after Bonferroni correction and a clear increase in absolute CD14⁺ monocyte counts (*p* = 0.002, table e-1, links.lww.com/NXI/A372). We further addressed the impact of this drug on the absolute numbers and population percentages of different leukocyte subsets.

B Cells

As expected, total CD19⁺ B-cell counts were strongly reduced after ocrelizumab treatment (*p* < 0.0001, figure 1A and table e-1, links.lww.com/NXI/A372). We first explored effector and memory B-cell subsets. Ocrelizumab induced a decrease in naive and memory B-cell numbers (both *p* < 0.0001, figure 1A and table e-1) and of plasmablasts although the last one did not reach statistical significance (*p* = 0.06, figure 1A and table e-1). On the other hand, it caused a clear increase in percentages of plasmablasts and transitional B cells (both *p* < 0.0001, figure 1B and table e-1) relative to total CD19⁺ B cells.

When we evaluated intracellular cytokine production by B cells, we observed a drastic reduction in IL-6, IL-10, GM-

CSF, and TNF α B-cell numbers (all $p < 0.0001$, figure 1C and table e-2, links.lww.com/NXI/A373). Ocrelizumab also induced a decrease in the percentage of B cells producing TNF α ($p < 0.0001$) relative to total CD19 $^+$ B cells and a clear increase in the proportion of regulatory B cells producing IL-10 ($p < 0.0001$). By contrast, we also observed relative increases in the percentages of B cells producing IL-6 ($p = 0.004$) and GM-CSF ($p < 0.0001$) (figure 1D and table e-2).

T Cells

We next studied the effects of ocrelizumab in CD4 $^+$ T-cell subsets. No significant differences were observed in the total cell numbers except for a trend toward an increase in Treg CD4 $^+$ cells ($p = 0.03$, ns after Bonferroni correction, table e-1, links.lww.com/NXI/A372). However, we found a clear decrease in the percentage of terminally differentiated (TD) ($p < 0.0001$) CD4 $^+$ T subset relative to total CD4 $^+$ T cells and a trend toward relative increases in the percentages of naive CD4 $^+$ T cells ($p = 0.005$, ns after Bonferroni correction) as shown in figure 2A and table e-1. When we explored CD8 $^+$ T cells, we found a decrease in effector memory (EM) CD8 $^+$ T-cell percentages relative to total T CD8 $^+$ cells ($p = 0.001$, figure 2B and table e-1). We also observed an increase in the percentage of naive CD8 $^+$ T cells ($p = 0.01$, figure 2B and table e-1). In addition, we found clear increases in the ratios between naive/TD CD4 $^+$ T cells ($p = 0.002$, figure 2A and table e-1) and naive/EM CD8 $^+$ T cells ($p = 0.002$, figure 2B and table e-1). These increases were maintained for the ratios between naive and effector subsets (naive/EM + TD ratio) in both CD4 $^+$ ($p = 0.009$, figure 2A and table e-1) and CD8 $^+$ ($p = 0.002$, figure 2B and table e-1) T cells.

CD20 $^+$ T cells were analyzed in 39 patients with PPMS of our cohort. We observed a marked decrease in this subset both in absolute numbers ($p < 0.0001$) and in the percentage of CD20 $^+$ T cells relative to CD3 $^+$ T cells ($p < 0.0001$) (table e-1, links.lww.com/NXI/A372). In addition, we explored changes after 6 months of ocrelizumab treatment in CD4 $^+$ and CD8 $^+$ T-cell subsets expressing or not CD20 (figures e-3, links.lww.com/NXI/A370 and e-4, links.lww.com/NXI/A371). We found significant decreases in the percentages of all CD4 $^+$ CD20 $^+$ and CD8 $^+$ CD20 $^+$ subsets related to total CD4 $^+$ and CD8 $^+$ T cells, respectively. However, when we explored CD20 $^-$ T-cell subsets, we observed only a decrease of TD CD4 $^+$ ($p = 0.002$) and EM CD8 $^+$ ($p = 0.0008$) T-cell subsets and an increase of naive CD8 $^+$ T cells ($p = 0.007$), similar to that detected in total CD4 $^+$ and CD8 $^+$ T-cell subsets.

On studying intracellular cytokine production by CD4 $^+$ and CD8 $^+$ T cells, no changes were found in absolute cell counts except for a tendency to increase in IL-10-producing CD4 $^+$ cells ($p = 0.04$, ns after Bonferroni correction, table e-2, links.lww.com/NXI/A373). However, we observed a clear decrease in the percentages of CD4 $^+$ ($p = 0.03$) and CD8 $^+$ ($p = 0.004$) T cells producing IFN γ , respectively, to total CD4 $^+$ and CD8 $^+$ T cells (table e-2).

Innate Immune Cells

When we explored innate immune cells, we observed only a discrete decrease in the total numbers of CD56 bright NK cells ($p = 0.005$, table e-1, links.lww.com/NXI/A372), an increase in total monocyte numbers ($p = 0.002$, table e-1), and a trend toward an increase in the numbers of PD-L1-expressing monocytes ($p = 0.007$, ns after Bonferroni correction, table e-1). No changes were found in numbers or proportions of monocytes producing pro- or anti-inflammatory cytokines (table e-2, links.lww.com/NXI/A373).

Serum Igs and NfL Levels

IgG and IgA levels remained stable after ocrelizumab treatment. Only serum IgM levels decreased ($p < 0.0001$), but no patient reached levels below the normal range (data not shown). sNfL levels decreased after ocrelizumab treatment ($p = 0.008$, figure 3A).

Influence of Inflammatory Status in Ocrelizumab-Induced Changes

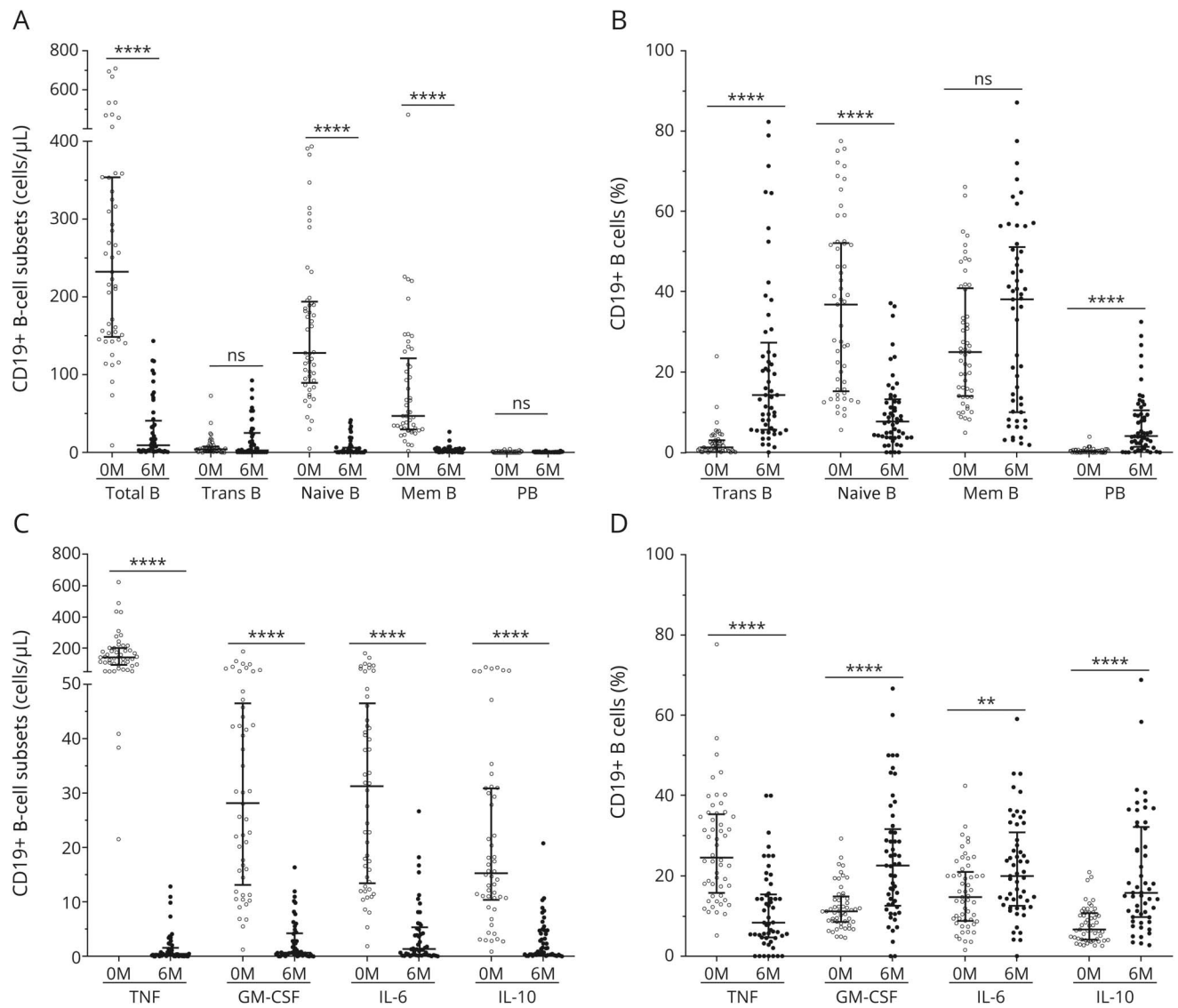
We finally evaluated changes in blood leukocyte subsets and in serum Igs and NfL values in patients showing ($n = 12$, Gd+) or lacking ($n = 41$, Gd-) gadolinium-enhanced lesion at baseline to elucidate whether the inflammatory status could condition ocrelizumab effects described above. No significant differences were observed in the leukocyte subsets or serum Igs between both groups. However, when studying sNfL, we found a significant decrease in patients showing gadolinium-enhancing lesions ($p = 0.03$, figure 3B) at baseline and only a trend ($p = 0.06$) in those lacking them. Of note, when we divided Gd- patients according to their baseline sNfL values, we found that those with values higher than 10 pg/mL ($n = 22$) experienced a clear decrease on ocrelizumab treatment ($p = 0.006$, figure 3C), whereas those with baseline sNfL below 10 pg/mL ($n = 19$) did not experience significant changes (figure 3D).

Discussion

Ocrelizumab is a humanized monoclonal antibody that selectively depletes CD20-expressing B cells, preserving the capacity for B-cell reconstitution and preexisting humoral immunity.¹⁸ The changes in the different peripheral blood immune cell subsets induced by this treatment have not been totally identified yet. We explored changes of a wide variety of leukocytes including different T, B, NK, and monocyte subsets in a multicenter prospective cohort of 53 patients with PPMS treated with this drug, by exploring these cells in baseline and 6 months' samples before treatment with the second dose of ocrelizumab.

Ocrelizumab induced a drastic depletion of CD19 $^+$ B-cell counts mainly because of a reduction in naive and memory subsets. In addition, we observed a trend toward a decrease in the number of plasmablasts. If confirmed in larger series, this

Figure 1 Changes in Blood B-Cell Subsets on Ocrelizumab Treatment



B-cell subsets were obtained before (0M) and at 6 months (6M) of ocrelizumab treatment (n = 53). (A) Absolute numbers (cells/ μL) of the different CD19⁺ B-cell subsets. (B) Percentages of the CD19⁺ B-cell subsets related to total CD19⁺ cells. (C) Absolute numbers (cells/ μL) of CD19⁺ cytokine-producing cells. (D) Percentages of CD19⁺ cytokine-producing cells related to total CD19⁺ cells. Median and 25%–75% interquartile range values are shown. ***p* < 0.01, *****p* < 0.0001. GM-CSF = granulocyte-macrophage colony-stimulating factor; IL = interleukin; MemB = memory B cell; PB = plasmablasts; TNF = tumor necrosis factor; TransB = transitional B cell.

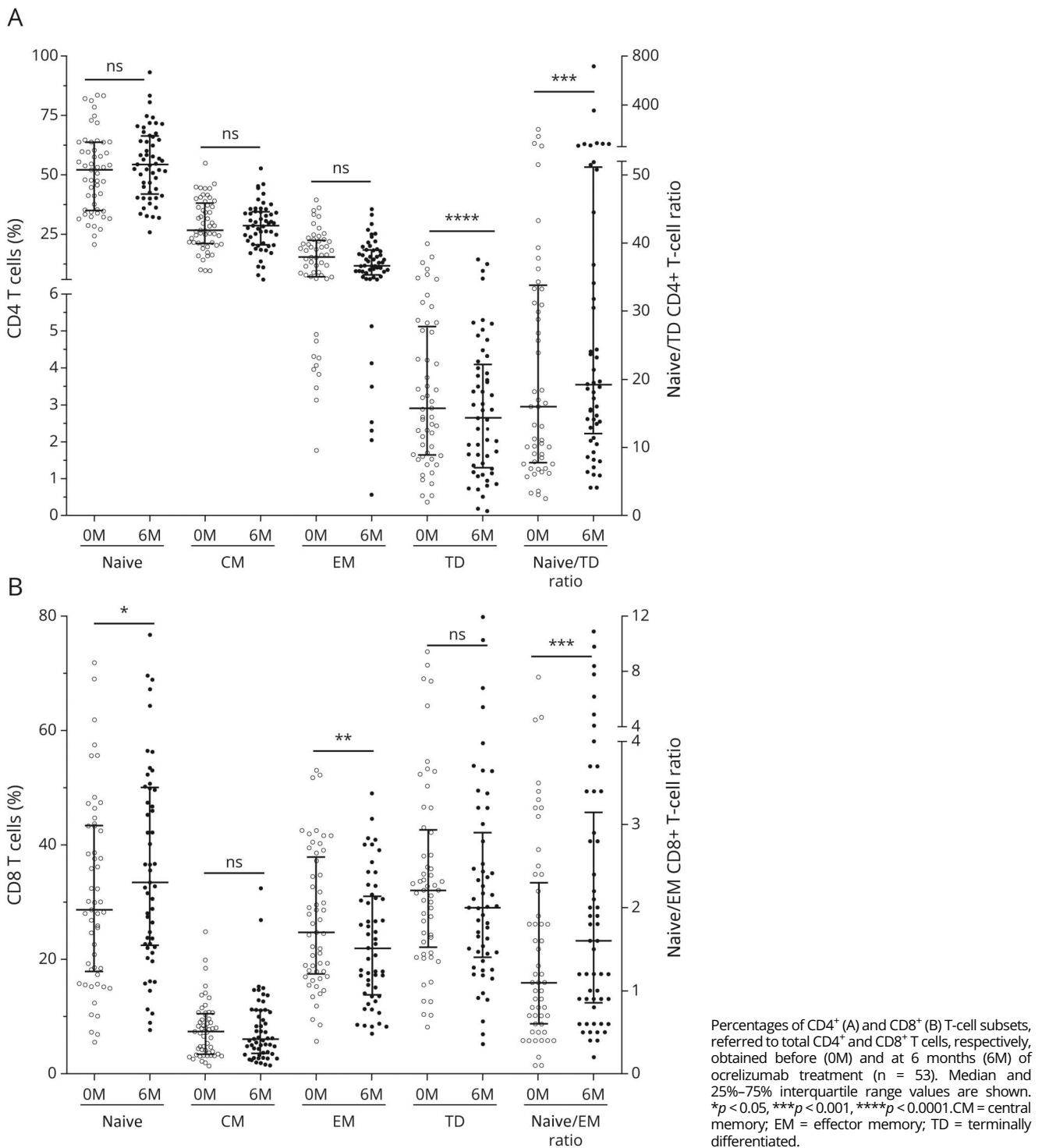
will be relevant because they are an important effector subset in MS¹⁹ being the effect of anti-CD20 antibodies on this B-cell subset questioned because of their low CD20 expression.²⁰ The only B-cell subset not experiencing a decrease at 6 months was transitional B cells. In fact, the proportion of these cells increased within the B-cell compartment, confirming that the B-cell repopulation is not affected by ocrelizumab¹⁸ because it was also observed on rituximab²¹ and fingolimod treatments.²² The proportion of plasmablasts also increased 6 months after ocrelizumab administration, suggesting a rapid B-cell differentiation to effector subsets.

We also observed a dramatic decrease in the numbers of B cells secreting TNF α , IL-6, IL-10, and GM-CSF. Moreover, there

was a relative decrease in the proportion of TNF α -producing cells and a relative increase of IL-10–producing cells in the B-cell compartment as reported for patients with RRMS.²³ However, there were also relative increases in GM-CSF- and IL-6-producing B cells, showing that some effector B cells can promptly arise after ocrelizumab treatment and strongly suggesting that anti-CD20 treatment does not reconstitute a fully healthy immune system or re-establish immune tolerance in all patients,²⁴ supporting the need for retreatment.

Anti-CD20 treatment also alters T-cell activation and cytokine production.⁸ We observed no significant changes in T-cell numbers after ocrelizumab treatment, with the exception of CD20⁺ T cells, which clearly decreased both in number

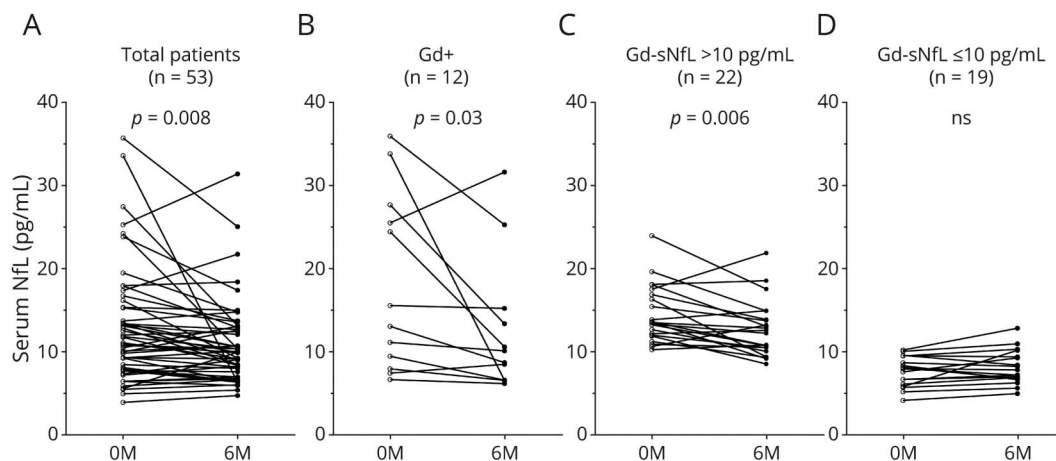
Figure 2 Changes in Blood T Cells Induced by Ocrelizumab Treatment



and percentages. This represents a unique cell population with a highly activated phenotype, proinflammatory and migratory properties, which has been proposed to play an important role in MS pathology.¹² Its downregulation may also be part of the beneficial effect of ocrelizumab in PPMS. Decreases in total CD20⁺ T-cell counts were also described for alemtuzumab, fingolimod, and dimethyl fumarate, but no reductions of the

proportions within the T-cell compartment were observed for these drugs.¹² Apart from this, ocrelizumab caused in the CD20⁻ T cells a decline of the proportion of effector T cells, an increase of CD8⁺ naive T cells, and of the ratio of naive/effector T cells. These data confirm that B-cell depletion induces a redistribution of the T-cell compartment, which favors naive vs effector cells.

Figure 3 Ocrelizumab Treatment Induces Changes in sNfL Levels



sNfL levels (pg/mL) obtained before (0M) and at 6 months (6M) of ocrelizumab treatment (n = 53). (A) All patients. (B) Patients showing gadolinium-enhanced lesions (Gd+) at baseline. (C) Patients not showing gadolinium-enhanced lesions (Gd-) with sNfL levels >10 pg/mL at baseline. (D) Patients not showing gadolinium-enhanced lesions (Gd-) with sNfL levels ≤10 pg/mL at baseline. sNfL = serum neurofilament light chain.

Ocrelizumab also shows an effect in cytokine-producing T cells. It induced decreases of CD4⁺ and CD8⁺ T cells producing IFN γ in our cohort. This decrease could be observed 6 months after ocrelizumab administration. The durable effect on IFN- γ -producing T cells can contribute to the clinical benefit of ocrelizumab in PPMS.

Moreover, we observed an increase in total numbers of monocytes expressing PD-L1, the ligand of the cell surface receptor PD-1, which promotes self-tolerance by suppressing T-cell inflammatory activity.²⁵ This could be important to modulate the abnormal response in MS.

By contrast, our data showed a decrease in the numbers, but not in percentages, of CD56 bright NK cells, thus suggesting that, opposite to that observed in response to other treatments in patients with RRMS,^{16,26,27} these cells do not play a role in the response to ocrelizumab treatment in PPMS.

Regarding serum Igs, ocrelizumab induced a decrease in serum IgM levels after treatment as previously described with rituximab with no changes in IgG and IgA values.

We finally explored changes in sNfL levels. Increasing data support that sNfL levels associate with disease activity and treatment response in patients with RRMS.²⁹ In this line, we observed a clear decrease of sNfL in patients showing Gd-enhanced lesions at baseline, but remarkably, it also significantly reduced the sNfL values in more than 50% of Gd- patients, who showed basal sNfL higher than 10 pg/mL, which suggests that these patients with PPMS still could have some inflammatory activity that can be modulated on ocrelizumab treatment.

Our data contribute to show the changes induced by ocrelizumab in blood leukocytes of patients with PPMS, indicating

that in addition to its impact on B cells, it can reshape the T-cell response toward a low inflammatory profile and induce a clear decrease in sNfL levels. These data should be confirmed in larger cohorts.

Study Funding

Red Española de Esclerosis Múltiple (REEM) (RD16/0015/0001; RD16/0015/0002; RD16/0015/0003) and PI18/00572 integrated in the Plan Estatal I+D+I and cofunded by ISCIII-Subdirección General de Evaluación and Fondo Europeo de Desarrollo Regional (FEDER, “Otra manera de hacer Europa”).

Disclosure

J.I. Fernández-Velasco reports no disclosures relevant to the manuscript. J. Kuhle received speaker fees, research support, travel support, and/or served on advisory boards byECTRIMS, Swiss MS Society, Swiss National Research Foundation (320030_189140/1), University of Basel, Bayer, Biogen, Celgene, Merck, Novartis, Roche, and Sanofi. E. Monreal received research grants, travel support or honoraria for speaking engagements from Biogen, Merck, Novartis, Roche, and Sanofi-Genzyme. V. Meca-Lallana received grants and consulting or speaking fees from Almirall, Biogen, Celgene, Genzyme, Merck, Novartis, Roche, and Teva. J. Meca-Lallana received grants and consulting or speaking fees from Almirall, Biogen, Celgene, Genzyme, Merck, Novartis, Roche, and Teva. G. Izquierdo received speaking and/or advisory board honoraria from Bayer, Biogen Idec, Novartis, Sanofi, Merck Serono, Almirall, Roche, Actelion, Celgene, and Teva. F. Gascón-Giménez received funding for research grants, travel support, and honoraria for speaking engagements from Bayer, Biogen, Roche, Merck, Novartis, Almirall, and Genzyme-Sanofi. S. Sainz de la Maza received payment for lecturing or travel expenses from Merck Serono, Biogen,

Sanofi-Genzyme, Roche, and Novartis. P.E. Walo-Delgado, A. Maceski, E. Rodríguez-Martín, E. Roldán, and N. Villarrubia report no disclosures relevant to the manuscript. A. Saiz received compensation for consulting services and speaking honoraria from Bayer-Schering, Merck Serono, Biogen Idec, Sanofi-Aventis, Teva Roche, Novartis, and Alexion. Y. Blanco received compensation for consulting services and speaker honoraria from Bayer-Schering, Merck Serono, Biogen, Genzyme-Sanofi, Teva, Novartis, and Roche. P. Sánchez received travel support from Merck, Roche, and Sanofi-Genzyme. E. Carreón-Guarnizo reports no disclosures relevant to the manuscript. Y. Aladro received funding for research projects or in the form of conference fees, mentoring, and assistance for conference attendance from Bayer, Biogen, Roche, Merck, Novartis, Almirall, and Sanofi. L. Brieva received funding for research projects or in the form of conference fees, mentoring, and assistance for conference attendance from Bayer, Biogen, Roche, Merck, Novartis, Almirall, Celgen, and Sanofi. C. Íñiguez received research grants, travel support, and honoraria for speaking engagements from Bayer, Biogen, Merck, Novartis, Roche, Sanofi-Genzyme, and Teva. I. González-Suárez received research grants, travel support, and honoraria for speaking engagements from Biogen, Merck, Novartis, Roche, Sanofi-Genzyme, Teva, and Alexion. L.A. Rodríguez de Antonio and J. Masjuan report no disclosures relevant to the manuscript. L. Costa-Frossard received speaker fees, travel support, and/or served on advisory boards by Biogen, Sanofi, Merck, Bayer, Novartis, Roche, Teva, Celgene, Ipsen, Biopas, and Almirall. L.M. Villar received research grants, travel support or honoraria for speaking engagements from Biogen, Merck, Novartis, Roche, Sanofi-Genzyme, and Bristol-Myers. Go to Neurology.org/NN for full disclosures.

Publication History

Received by *Neurology: Neuroimmunology & Neuroinflammation* July 14, 2020. Accepted in final form November 3, 2020.

Appendix Authors

Name	Location	Contribution
José I. Fernández-Velasco, BSci	Ramón y Cajal University Hospital, Madrid, Spain	Wrote the manuscript draft, stored blood samples, and performed the experiments
Jens Kuhle, MD, PhD	Basel University Hospital, Switzerland	Contributed to sNfL measurement and made a critical review of the manuscript
Enric Monreal, MD	Ramón y Cajal University Hospital, Madrid, Spain	Visited patients with MS, collected samples and clinical data, and made a critical review of the manuscript
Virginia Meca-Lallana, MD	La Princesa University Hospital, Madrid, Spain	Visited patients with MS, collected samples and clinical data, and made a critical review of the manuscript

Appendix (continued)

Name	Location	Contribution
José Meca-Lallana, MD, PhD	Virgen de la Arrixaca University Hospital, Murcia, Spain	Visited patients with MS, collected samples and clinical data, and made a critical review of the manuscript
Guillermo Izquierdo, MD, PhD	Vithas Nisa Hospital, Sevilla, Spain	Visited patients with MS, collected samples and clinical data, and made a critical review of the manuscript
Francisco Gascón-Giménez, MD	Valencia Clinic, University Hospital, Valencia, Spain	Visited patients with MS, collected samples and clinical data, and made a critical review of the manuscript
Susana Sainz de la Maza, MD	Ramón y Cajal University Hospital, Madrid, Spain	Visited patients with MS, collected samples and clinical data, and made a critical review of the manuscript
Paulette E. Walo-Delgado, MD	Ramón y Cajal University Hospital, Madrid, Spain	Stored blood samples, performed the experiments, and made a critical review of the manuscript
Aleksandra Maceski, PhD	Basel University Hospital, Switzerland	Contributed to sNfL measurement and made a critical review of the manuscript
Eulalia Rodríguez-Martín, PhD	Ramón y Cajal University Hospital, Madrid, Spain	Supervised flow cytometry studies and made a critical review of the manuscript
Ernesto Roldán, PhD	Ramón y Cajal University Hospital, Madrid, Spain	Supervised flow cytometry studies and made a critical review of the manuscript
Noelia Villarrubia, PhD	Ramón y Cajal University Hospital, Madrid, Spain	Stored blood samples, performed the experiments, and made a critical review of the manuscript
Albert Saiz, MD, PhD	Clinic de Barcelona Hospital, Spain	Visited patients with MS, collected samples and clinical data, and made a critical review of the manuscript
Yolanda Blanco, MD	Clinic de Barcelona Hospital, Spain	Visited patients with MS, collected samples and clinical data, and made a critical review of the manuscript
Pedro Sánchez, MD	La Princesa University Hospital, Madrid, Spain	Visited patients with MS, collected samples and clinical data, and made a critical review of the manuscript
Ester Carreón-Guarnizo, MD, PhD	Virgen de la Arrixaca Clinic University Hospital, Murcia, Spain	Visited patients with MS, collected samples and clinical data, and made a critical review of the manuscript
Yolanda Aladro, MD	Getafe University Hospital, Madrid, Spain	Visited patients with MS, collected samples and clinical data, and made a critical review of the manuscript

Appendix (continued)

Name	Location	Contribution
Luis Brieva, MD	Arnau de Vilanova Hospital, Lleida, Spain	Visited patients with MS, collected samples and clinical data, and made a critical review of the manuscript
Cristina Iñiguez, MD	Lozano Blesa Clinic University Hospital, Zaragoza, Spain	Visited patients with MS, collected samples and clinical data, and made a critical review of the manuscript
Inés González-Suárez, MD	Alvaro Cunqueiro Hospital, Vigo, Spain	Visited patients with MS, collected samples and clinical data, and made a critical review of the manuscript
Luis A. Rodríguez de Antonio, MD	Fuenlabrada University Hospital, Madrid, Spain	Visited patients with MS, collected samples and clinical data, and made a critical review of the manuscript
Jaime Masjuan, MD	Ramón y Cajal University Hospital, Madrid, Spain	Visited patients with MS, collected samples and clinical data, and made a critical review of the manuscript
Lucienne Costa-Frossard, MD	Ramón y Cajal University Hospital, Madrid, Spain	Visited patients with MS, collected samples and clinical data, and made a critical review of the manuscript
Luisa M. Villar, PhD	Ramón y Cajal University Hospital, Madrid, Spain	Designed and supervised the study and corrected the manuscript

References

- Faissner S, Plemel J, Gold R, Yong W. Progressive multiple sclerosis: from pathophysiology to therapeutic strategies. *Nat Rev Drug Discov* 2019;18:905–922.
- Macaron G, Ontaneda D. Diagnosis and management of progressive multiple sclerosis. *Biomedicines* 2019;7:56.
- Bittner S, Ruck T, Wiendl H, et al. Targeting B cells in relapsing–remitting multiple sclerosis: from pathophysiology to optimal clinical management. *Ther Adv Neurol Disord* 2017;10:51–66.
- Montalban X, Hauser SL, Kappos L, et al. Ocrelizumab versus placebo in primary progressive multiple sclerosis. *N Engl J Med* 2017;376:209–220.
- Sorensen PS, Blinkenberg M. The potential role of ocrelizumab in the treatment of multiple sclerosis: current evidence and future prospects. *Ther Adv Neurol Disord* 2016;9:44–52.
- Lehmann-Horn K, Kinzel S, Weber MS. Deciphering the role of B cells in multiple sclerosis—towards specific targeting of pathogenic function. *Int J Mol Sci* 2017;18:2048.
- Graves J, Vinayagasundaram U, Mowry EM, et al. Effects of rituximab on lymphocytes in multiple sclerosis and neuromyelitis optica. *Mult Scler Relat Disord* 2014;3:244–252.
- Bar-Or A, Fawaz L, Fan B, et al. Abnormal B-cell cytokine responses a trigger of T-cell-mediated disease in MS? *Ann Neurol* 2010;67:452–461.
- Gingele S, Jacobus TL, Konen FF, et al. Ocrelizumab depletes CD20⁺ T cells in multiple sclerosis patients. *Cells* 2019;8:12.
- Gingele S, Skripuletz T, Jacobs R. Role of CD20⁺ T cells in multiple sclerosis: implications for treatment with ocrelizumab. *Neural Regen Res* 2020;15:663–664.
- Wilk E, Witte T, Marquardt N, et al. Depletion of functionally active CD20⁺ T cells by rituximab treatment. *Arthritis Rheumatol* 2009;60:3563–3571.
- Schuh E, Berer K, Mulazzani M, et al. Features of human CD3+CD20⁺ T cells. *J Immunol* 2016;197:1111–1117.
- Holley JE, Bremer E, Kendall AC, et al. CD20⁺ inflammatory T-cells are present in blood and brain of multiple sclerosis patients and can be selectively targeted for apoptotic elimination. *Mult Scler Relat Disord* 2014;3:650–658.
- Palanichamy A, Jahn S, Nickles D, et al. Rituximab efficiently depletes increased CD20-expressing T cells in multiple sclerosis patients. *J Immunol* 2014;193:580–586.
- Thompson AJ, Banwell BL, Barkhof F, et al. Diagnosis of multiple sclerosis: 2017 revisions of the McDonald criteria. *Lancet Neurol* 2018;17:162–173.
- 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 J* 2018;24:1317–1327.
- Manouchehrinia A, Stridh P, Khademi M, et al. Plasma neurofilament light levels are associated with risk of disability in multiple sclerosis. *Neurology* 2020;94:e2457–e2467.
- Greenfield AL, Hauser SL. B cell therapy for multiple sclerosis: entering an era. *Ann Neurol* 2018;83:13–26.
- Rivas JR, Ireland SJ, Chkheidze R, et al. Peripheral VH4⁺ plasmablasts demonstrate autoreactive B cell expansion toward brain antigens in early multiple sclerosis patients. *Acta Neuropathol* 2017;133:43–60.
- Forsthuber TG, Cimbora DM, Ratchford JN, et al. B cell-based therapies in CNS autoimmunity: differentiating CD19 and CD20 as therapeutic targets. *Ther Adv Neurol Disord* 2018;11:1756286418761697.
- Ikemiyagi M, Hirai T, Ishii R, et al. Transitional B cells predominantly reconstituted after a desensitization therapy using rituximab before kidney transplantation. *Ther Apher Dial* 2017;21:139–149.
- Miyazaki Y, Niino M, Takahashi E, et al. Fingolimod induces BAFF and expands circulating transitional b cells without activating memory B cells and plasma cells in multiple sclerosis. *Clin Immunol* 2018;187:95–101.
- Sabatino JJ, Zamvil SS, Hauser SL. B-Cell therapies in multiple sclerosis. *Cold Spring Harb Perspect Med* 2019;9:a032037.
- Lünemann JD, Ruck T, Muraro P, Bar-Or A, Wiendl H. Immune reconstitution therapies: concepts for durable remission in multiple sclerosis. *Nat Rev Neurol* 2020;16:56–62.
- Goodman A, Patel SP, Kurzrock R. PD1-PDL1 immune-checkpoint blockade in B-cell lymphomas. *Nat Rev Clin Oncol* 2017;14:203–220.
- 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;141:348–356.
- Elkins J, Sheridan J, Amaravadi L, et al. CD56(bright) natural killer cells and response to daclizumab hyp in relapsing-remitting MS. *Neurol Neuroimmunol Neuroinflamm* 2015;2:e65.
- Hauser S, Waubant E, Arnold DL, et al. B-cell depletion with rituximab in relapsing-remitting multiple sclerosis. *N Engl J Med* 2008;358:676–688.
- Disanto G, Barro C, Benkert P, et al. Serum neurofilament light: a biomarker of neuronal damage in multiple sclerosis. *Ann Neurol* 2017;81:857–870.

Neurology[®] Neuroimmunology & Neuroinflammation

Effect of Ocrelizumab in Blood Leukocytes of Patients With Primary Progressive MS

José I. Fernández-Velasco, Jens Kuhle, Enric Monreal, et al.

Neurol Neuroimmunol Neuroinflamm 2021;8;

DOI 10.1212/NXI.0000000000000940

This information is current as of January 6, 2021

Updated Information & Services	including high resolution figures, can be found at: http://nn.neurology.org/content/8/2/e940.full.html
References	This article cites 29 articles, 4 of which you can access for free at: http://nn.neurology.org/content/8/2/e940.full.html##ref-list-1
Subspecialty Collections	This article, along with others on similar topics, appears in the following collection(s): All Demyelinating disease (CNS) http://nn.neurology.org/cgi/collection/all_demyelinating_disease_cns Multiple sclerosis http://nn.neurology.org/cgi/collection/multiple_sclerosis
Permissions & Licensing	Information about reproducing this article in parts (figures, tables) or in its entirety can be found online at: http://nn.neurology.org/misc/about.xhtml#permissions
Reprints	Information about ordering reprints can be found online: http://nn.neurology.org/misc/addir.xhtml#reprintsus

Neurol Neuroimmunol Neuroinflamm is an official journal of the American Academy of Neurology. Published since April 2014, it is an open-access, online-only, continuous publication journal. Copyright Copyright © 2021 The Author(s). Published by Wolters Kluwer Health, Inc. on behalf of the American Academy of Neurology.. All rights reserved. Online ISSN: 2332-7812.



4.2 BASELINE INFLAMMATORY STATUS REVEALS DICHOTOMIC IMMUNE MECHANISMS INVOLVED IN PRIMARY-PROGRESSIVE MULTIPLE SCLEROSIS PATHOLOGY

Fernández-Velasco JI, Monreal E, Kuhle J, Meca-Lallana V, Meca-Lallana J, Izquierdo G, Oreja-Guevara C, Gascón-Giménez F, Sainz de la Maza S, Walo-Delgado PE, Lapuente-Suanzes P, Maceski A, Rodríguez-Martín E, Roldán E, Villarrubia N, Saiz A, Blanco Y, Diaz-Pérez C, Valero-López G, Diaz-Diaz J, Aladro Y, Brieva L, Íñiguez C, González-Suárez I, Rodríguez de Antonio LA, García-Domínguez JM, Sabin J, Llufríu S, Masjuan J, Costa-Frossard L, Villar LM. Baseline Inflammatory Status Reveals Dichotomic Immune Mechanisms Involved In Primary-Progressive Multiple Sclerosis Pathology. Front Immunol. 2022 Mar 21; 13: 842354

Antecedentes: Ocrelizumab es el único tratamiento modificador de enfermedad aprobado para la EM primariamente progresiva (EMPP), forma con la que debutan en torno al 15% de los pacientes con EM. Rituximab, otro anti-CD20, demostró su eficacia solo en un grupo de pacientes EMPP con alta carga inflamatoria basal, determinada según las lesiones desmielinizantes en RM. Ocrelizumab demostró eficacia y seguridad en el ensayo clínico ORATORIO, independientemente de la edad y del estado inflamatorio de los pacientes. Nuestro objetivo fue determinar el papel de la inflamación en la respuesta a ocrelizumab en la EMPP.

Diseño del estudio: Longitudinal, prospectivo, multicéntrico.

Pacientes: Se incluyeron 69 pacientes con EMPP que iniciaron tratamiento con ocrelizumab. Éstos fueron clasificados según la presencia basal (Gd+) o ausencia (Gd-) de lesiones que realzan con gadolinio en la RM cerebral. Se subclasificaron como NEDA aquellos pacientes con buena respuesta al fármaco, definida como ausencia de progresión de la discapacidad o de nuevas lesiones en RM tras un año de tratamiento. Los pacientes que no cumplieron alguna de estas dos condiciones se subclasificaron con el término EDA.

Métodos: Se aislaron células mononucleares de sangre periférica heparinizada antes de iniciar tratamiento con ocrelizumab y 6 meses después, y se criopreservaron hasta su utilización. Los ensayos se hicieron en paralelo en muestras basales y de 6 meses de tratamiento. Se estudiaron subpoblaciones leucocitarias efectoras, de memoria y reguladoras por citometría de flujo. Los niveles séricos de las cadenas ligeras de neurofilamentos se obtuvieron mediante tecnología SIMOA. Los niveles séricos de inmunoglobulinas G, A y M se cuantificaron mediante nefelometría. Las comparaciones entre muestras basales y de 6 meses de tratamiento fueron analizadas mediante el test de Wilcoxon. Las comparaciones entre los diferentes grupos de pacientes se realizaron mediante el test U de Mann-Whitney. Los valores de significación estadística fueron corregidos por el test de Bonferroni.

Resultados: Más del 60% de los pacientes alcanzaron NEDA tras un año de tratamiento, independientemente de sus características basales. En los pacientes Gd+, la baja tasa de repoblación de células B inflamatorias se asoció a la reducción de los valores de sNfL 6 meses después de la primera dosis de ocrelizumab. Los pacientes del grupo Gd- también presentaron un bajo número de células B y de sNfL 6 meses después de iniciar el tratamiento, independientemente de su respuesta a ocrelizumab. En estos pacientes, el estado de NEDA se asoció con una remodelación tolerogénica de los compartimentos de células T y monocitos, y con un claro aumento de los niveles de IgA en suero.

Conclusiones: La inflamación basal influye en qué vías inmunológicas predominan en los pacientes con EMPP. Mientras que en pacientes Gd+ la respuesta a ocrelizumab viene determinada por la repoblación de células B proinflamatorias, en el grupo Gd- depende principalmente del cambio de células T y monocitos hacia perfiles tolerogénicos. La depleción de células B causada por ocrelizumab es capaz de modular ambos mecanismos, de tal manera que hay altas tasas de respuesta óptima al fármaco, independientemente del estado inflamatorio basal de los pacientes EMPP.



OPEN ACCESS

Edited by:

Bert A 'T Hart,
University Medical Center Groningen,
Netherlands

Reviewed by:

Ayman Rezk,
University of Pennsylvania,
United States
Nancy Monson,
University of Texas Southwestern
Medical Center, United States

***Correspondence:**

Luisa M. Villar
luisamaria.villar@salud.madrid.org
orcid.org/0000-0002-9067-3668

Specialty section:

This article was submitted to
Multiple Sclerosis
and Neuroimmunology,
a section of the journal
Frontiers in Immunology

Received: 23 December 2021

Accepted: 28 February 2022

Published: 21 March 2022

Citation:

Fernández-Velasco JI,
Monreal E, Kuhle J,
Meca-Lallana V, Meca-Lallana J,
Izquierdo G, Oreja-Guevara C,
Gascón-Giménez F, Sainz de la
Maza S, Walo-Delgado PE,
Lapuente-Suanzes P, Maceski A,
Rodríguez-Martín E, Roldán E,
Villarrubia N, Saiz A, Blanco Y,
Díaz-Pérez C, Valero-López G,
Díaz-Díaz J, Aladro Y, Brieua L,
Íñiguez C, González-Suárez I,
Rodríguez de Antonio LA,
García-Domínguez JM, Sabin J,
Llufriu S, Masjuan J, Costa-Frossard L
and Villar LM (2022) Baseline
Inflammatory Status Reveals
Dichotomic Immune Mechanisms
Involved In Primary-Progressive
Multiple Sclerosis Pathology.
Front. Immunol. 13:842354.
doi: 10.3389/fimmu.2022.842354

Baseline Inflammatory Status Reveals Dichotomic Immune Mechanisms Involved In Primary-Progressive Multiple Sclerosis Pathology

José I. Fernández-Velasco¹, Enric Monreal², Jens Kuhle³, Virginia Meca-Lallana⁴, José Meca-Lallana⁵, Guillermo Izquierdo⁶, Celia Oreja-Guevara⁷, Francisco Gascón-Giménez⁸, Susana Sainz de la Maza², Paulette E. Walo-Delgado¹, Paloma Lapuente-Suanzes¹, Aleksandra Maceski³, Eulalia Rodríguez-Martín¹, Ernesto Roldán¹, Noelia Villarrubia¹, Albert Saiz⁹, Yolanda Blanco⁹, Carolina Díaz-Pérez⁴, Gabriel Valero-López⁵, Judit Díaz-Díaz⁷, Yolanda Aladro¹⁰, Luis Brieua¹¹, Cristina Íñiguez¹², Inés González-Suárez¹³, Luis A Rodríguez de Antonio¹⁴, José M. García-Domínguez¹⁵, Julia Sabin¹⁶, Sara Llufriu⁹, Jaime Masjuan², Lucienne Costa-Frossard² and Luisa M. Villar^{1*}

¹ Immunology Department, Ramon y Cajal University Hospital, Madrid, Spain, ² Neurology Department, Ramon y Cajal University Hospital, Madrid, Spain, ³ Neurologic Clinic and Policlinic, Departments of Medicine, Biomedicine, and Clinical Research, University Hospital Basel, University of Basel, Basel, Switzerland, ⁴ Neurology Department, La Princesa University Hospital, Madrid, Spain, ⁵ Multiple Sclerosis and Clinical Neuroimmunology Unit, Virgen de la Arrixaca University Hospital, Murcia, Spain, ⁶ Multiple Sclerosis Unit, Vithas Nisa Sevilla Hospital, Sevilla, Spain, ⁷ Neurology Department, Clínico San Carlos Hospital, Instituto de Investigación Sanitaria San Carlos (IdISSC), Madrid, Spain, ⁸ Neurology Department, Valencia Clinic University Hospital, Valencia, Spain, ⁹ Center of Neuroimmunology, Neurology Department, Clinic of Barcelona Hospital, Institut d'Investigacions Biomèdiques August Pi i Sunyer (IDIBAPS), and Institut de Neurociències, Universitat de Barcelona, Barcelona, Spain, ¹⁰ Neurology Department, Getafe University Hospital, Madrid, Spain, ¹¹ Neurology Department, Arnau de Vilanova Hospital, Lleida, Spain, ¹² Neurology Department, Lozano Blesa Clinic University Hospital, Zaragoza, Spain, ¹³ Neurology Department, Alvaro Cunqueiro Hospital, Vigo, Spain, ¹⁴ Neurology Department, Fuenlabrada University Hospital, Madrid, Spain, ¹⁵ Neurology Department, Gregorio Marañón University Hospital, Madrid, Spain, ¹⁶ Neurology Department, Puerta de Hierro University Hospital, Madrid, Spain

Objective: To ascertain the role of inflammation in the response to ocrelizumab in primary-progressive multiple sclerosis (PPMS).

Methods: Multicenter prospective study including 69 patients with PPMS who initiated ocrelizumab treatment, classified according to baseline presence [Gd+, n=16] or absence [Gd-, n=53] of gadolinium-enhancing lesions in brain MRI. Ten Gd+ (62.5%) and 41 Gd- patients (77.4%) showed non-evidence of disease activity (NEDA) defined as no disability progression or new MRI lesions after 1 year of treatment. Blood immune cell subsets were characterized by flow cytometry, serum immunoglobulins by nephelometry, and serum neurofilament light-chains (sNfL) by SIMOA. Statistical analyses were corrected with the Bonferroni formula.

Results: More than 60% of patients reached NEDA after a year of treatment, regardless of their baseline characteristics. In Gd+ patients, it associated with a low repopulation rate of inflammatory B cells accompanied by a reduction of sNfL values 6 months after their first ocrelizumab dose. Patients in Gd- group also had low B cell numbers and sNfL values 6 months after initiating treatment, independent of their treatment response. In these

patients, NEDA status was associated with a tolerogenic remodeling of the T and innate immune cell compartments, and with a clear increase of serum IgA levels.

Conclusion: Baseline inflammation influences which immunological pathways predominate in patients with PPMS. Inflammatory B cells played a pivotal role in the Gd+ group and inflammatory T and innate immune cells in Gd- patients. B cell depletion can modulate both mechanisms.

Keywords: multiple sclerosis, demyelinating diseases, ocrelizumab, B cells, biomarkers

1 INTRODUCTION

Multiple sclerosis (MS) is the most common demyelinating disease of the central nervous system (1). It induces demyelination, inflammation, and axonal damage, responsible for the permanent neurological deficits suffered by patients with MS (2). Primary progressive MS (PPMS) represents about 10–15% (3) of all MS cases and is characterized by a disease progression that remains continuous since disease onset (4), with or without concomitant visible inflammation by conventional MRI. Although many therapeutic options are available for relapsing remitting MS (RRMS), this is not the case for PPMS. Most of the anti-inflammatory drugs found useful for patients with RRMS are not effective among those with PPMS (5). However, the anti CD20 antibody rituximab showed efficacy in depleting cerebrospinal fluid and peripheral blood B cells in PPMS (6) and results of the OLYMPUS clinical trial suggested that B cell depletion could be effective in those PPMS patients exhibiting signs of inflammation as demonstrated by the occurrence of contrast-enhancing lesions at baseline on MRI (7). Recently, results of the ORATORIO clinical trial with ocrelizumab, a humanized anti CD20 antibody, showed that patients with PPMS responded to this drug, independent of the presence of clinically demonstrable inflammation (8), and it was approved for the treatment of PPMS patients. Ocrelizumab not only induces B cell depletion but modulates T cell compartment toward adopting a more tolerogenic status (9).

Therefore, we aimed to explore the mechanisms associated with favorable response to ocrelizumab in inflammatory and non-inflammatory PPMS cases, toward facilitating the early identification of ocrelizumab responders and revealing new putative therapeutic targets in PPMS.

2 MATERIALS AND METHODS

2.1 Patients

This multicenter, prospective longitudinal study included 69 patients with PPMS diagnosed according to the McDonald criteria (10) who consecutively initiated ocrelizumab treatment in 13 Spanish University Hospitals. Patients were subdivided into four groups based on their inflammatory status (presence [Gd+, n=16] or absence [Gd-, n=53] of gadolinium-enhancing lesions at baseline) and their response to 1 year of ocrelizumab treatment. Non evidence of disease activity (NEDA) was defined as the

absence of further Expanded Disability-Status Scale (EDSS) progression with no new MRI lesions at 1 year; in contrast, evidence of disease activity (EDA) patients as having at least one of the above-mentioned conditions. We considered patients as having an increase in the EDSS score when this was confirmed three months after the first assessment. The maximum gap between baseline MRI and treatment initiation was a month.

2.2 Sample Collection

Blood samples were collected in heparinized tubes immediately before (baseline) and 6 months after (before the second dose) ocrelizumab treatment. In both cases they were obtained the day ocrelizumab was administered, just before initiating the infusion. Samples were then sent to the Immunology Department at Ramón y Cajal University Hospital (Madrid). Peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) were isolated from 20 mL of heparinized whole blood as previously described (9) and cryopreserved in fetal bovine serum (HyClone Laboratories) supplemented with 10% DMSO (dimethyl sulfoxide) until further analysis. The samples collected at baseline and 6 months were analyzed simultaneously to avoid inter-assay variability. Serum samples were also collected and stored at -80°C while awaiting analysis. Total lymphocyte and monocyte counts were determined using a Coulter Counter from 10 mL of fresh EDTA-treated blood.

2.3 Monoclonal Antibodies

The monoclonal antibodies used in this study are listed in **Supplementary Table 1**. No differences were observed in plasmablast counts in any of the groups studied (**Figure 1E**; **Supplementary Table 2**).

2.4 Labelling Surface Antigens

Aliquots of 10^6 PBMCs were thawed by a 37°C thermostatic bath and washed twice in RPMI 1640 medium (Thermo Fisher Scientific). Samples were processed and stained as described (9) prior to being analyzed by flow cytometry.

2.5 *In Vitro* Stimulation and Intracellular Cytokine Staining

Thawed aliquots to analyze intracellular cytokine production were subdivided in three polypropylene tubes. To study cytokine production by monocytes, an aliquot of 3×10^5 PBMCs was resuspended in 1 mL of RPMI 1640 medium and incubated with 1 mg/mL lipopolysaccharide (from *Escherichia coli* O111: B4; Merck) in presence of 2 µg/ml Brefeldin A (GolgiPlug, BD

Biosciences) and 2.1 μM Monensin (Golgi Stop, BD Biosciences) during 4 hours at 37°C in 5% CO₂ atmosphere.

To study cytokine production by T and B cells (Except IL-10 producing B cells) an aliquot of 3×10^5 PBMCs was resuspended and incubated in 1 mL RPMI 1640 medium and stimulated with 50 ng/mL of Phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA, Merck) and 750 ng/mL Ionomycin (Merck) in presence of 2 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Brefeldin A and 2.1 μM Monensin during 4 hours at 37°C in 5% CO₂ atmosphere.

To identify IL-10 producing B cells, an aliquot of 3×10^5 PBMCs was preincubated in 1 mL RPMI 1640 medium with 3 $\mu\text{g}/\text{mL}$ of CpG oligonucleotide (*In vivo*Gen) during 20h at 37°C in 5% CO₂ atmosphere. After this, it was stimulated with 50 ng/mL of Phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA, Merck) and 750 ng/mL Ionomycin (Merck) in presence of 2 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Brefeldin A and 2.1 μM Monensin during 4 hours at 37°C in 5% CO₂ atmosphere.

After incubation, the three aliquots were stained with the two-step protocol described previously (9). PBMCs were analyzed in a FACSCanto II flow cytometer (BD Biosciences).

2.6 Flow Cytometry

Cells were always analyzed within a maximum period of 1h after staining. Mean autofluorescence values were set using appropriate negative isotype controls. Data analysis was performed using FACSDiva Software V.8.0 (BD Biosciences). A minimum amount of 5×10^4 events were analyzed. We followed the strategy showed in **Supplementary Figure 1** to identify the different subpopulations. We set a gate including cells with high to intermediate CD45 and low to intermediate side scatter and excluding debris and apoptotic cells. CD4 and CD8 T cells were classified as: naïve (CCR7+ CD45RO⁻), central memory (CM) (CCR7+ CD45RO⁺), effector memory (EM) (CCR7⁻ CD45RO⁺), and terminally differentiated (TD) (CCR7⁻ CD45RO⁻). Regulatory CD4 T cells (Treg) were defined as CD3+ CD4+ CD25^{hi} CD127^{low}. CD56 NK cells were classified as: NKT cells (CD3+ CD56^{dim}), CD56dim NK cells (CD3⁻ CD56^{dim}) and CD56bright NK cells (CD3⁻ CD56^{br}). B cells were classified as: naïve (CD19+ CD38^{dim} CD27⁻), memory (CD19+ CD27^{dim} CD38^{dim}), plasmablasts (CD19+ CD27^{hi} CD38^{hi}), transitional B cells (CD19+ CD27⁻ CD24^{hi} CD38^{hi}) cells or regulatory B cells (Breg) (CD19+ IL-10⁺) cells. PD-L1 was explored in monocytes by studying its co-expression with CD14 in PBMCs. We also explored intracellular production of IL-1 β , IL-6, IL-10, IL-12 and TNF α by monocytes. IL-1 β and TNF α represent innate cell activation, IL-12 induces Th1 responses, IL-6 represent innate cell activation and induces Th17 responses and finally, IL-10 is an anti-inflammatory cytokine. We also explored in CD4 and CD8 T cells the production of IFN γ and TNF α , products of Th1 response; IL-17, a product of the Th17 response; GM-CSF, which induces innate cell activation; and IL-10 that has a regulatory function. Finally, we explored B cells producing IL-6, a pro-inflammatory cytokine that induces Th17 cells; TNF α , an inflammatory cytokine; GM-CSF, inducing innate cell activation; and IL-10 a regulatory cytokine. Representative dot plots showing cytokine production by monocytes, B and T cells are shown in **Supplementary Figure 2**.

2.7 Flow Cytometry Analyses

We recorded for every leukocyte subset total cell counts per mL of blood, calculated by measuring total lymphocyte and monocyte numbers by a coulter counter, and the percentages of every subset over total mononuclear cells. To avoid bias due to B cell depletion, we also recorded the values of every T, B, NK and monocyte subset relative to total T, B, NK and monocyte cells, respectively.

2.8 Immunoglobulin and sNfL Quantification

Serum levels of immunoglobulins (IgG, IgA, and IgM) were measured by nephelometry using a DimensionVista analyzer (Siemens Healthcare Diagnostics) and serum neurofilament light chain (sNfL) levels were measured using the single molecule array (Simoa) NF-light[®] Assay (Quanterix).

2.9 Statistical Analyses

Statistical analyses were performed using GraphPad Prism 8.0 software (GraphPad Prism Inc.). Wilcoxon matched pairs test was used to assess differences between the samples collected at baseline and after 6 months from the same patient. Mann-Whitney-U test was used to compare the subgroups of patients. *P*-values were adjusted using the Bonferroni correction and *p*-values less than 0.05 were considered statistically significant.

The association between NfL and age has been modelled using a Generalized Additive Model for Location, Scale and Shape (GAMLSS) model and age-normalized measures were obtained for each data point. Z score was used as a continuous measure for the number of standard deviations a given datapoint is above/below the mean in samples of healthy controls of the same age.

2.10 Ethical Considerations

Written informed consent was obtained from every patient prior to their inclusion in the present study, which was approved by the Ethics Committee of each center participating in this study.

2.11 Data Availability Statement

Any anonymized data collected for the purpose of this study will be shared with qualified investigators for 3 years from the initial publication of the study upon reasonable request to the corresponding author.

3 RESULTS

Sixty-nine patients with PPMS (53% female) treated with ocrelizumab were included in this study. Age and disease duration [median (range)] were, respectively, 52.0 (33.0-71.0) and 9.2 (1.3-24.1) years and basal EDSS score was 5.5 (1.0-8.0). All patients were followed for 1 year. Fifty-one (73.9%) remained NEDA 1 year after ocrelizumab initiation. Using MRI data collected at baseline, we further classified the patients according to their inflammatory status into Gd+ (at least one

Gd-enhancing lesion) and Gd- (no Gd-enhancing lesions) groups. Ten Gd+ (62.5%) and 41 Gd- (77.4%) patients were NEDA at the one-year follow-up. We found no significant differences between the four patient subgroups in terms of baseline clinical characteristics except for the MRI data (Table 1).

At baseline, few differences were found between Gd+ and Gd- patients (Supplementary Figure 3). sNfL levels were higher in Gd+ group, ($p=0.019$). Likewise, plasmablast numbers trended to be higher in this group of patients ($p=0.029$) but significance was lost after Bonferroni correction. By contrast, percentages of B naïve cells with respect to total CD19+ cells were higher ($p=0.015$) in Gd- patients. No differences were found between those Gd+ and Gd- patients in monocytes, T or NK cell subsets analyzed nor in intracellular cytokine production (data not shown).

We next explored differences in the PBMCs induced by ocrelizumab according to patient group after 6 months of ocrelizumab treatment by addressing its impact on the absolute numbers (Supplementary Table 2) and relative percentages (Supplementary Table 3) of each cellular subtype.

3.1 B Cells

As expected, after 6 months of treatment, ocrelizumab reduced the total numbers of B cells in all groups (Supplementary Table 2). After applying the Bonferroni correction, these differences remained statistically significant in the Gd+ NEDA group and the Gd- EDA and NEDA groups (Figure 1A and Supplementary Table 2). These differences were mainly due to decreased naïve and memory B cell numbers (Figures 1B, C, Supplementary Table 2). However, there was no statistically significant reduction in any B cell subpopulation in EDA patients in the Gd+ group (Supplementary Table 2). This may be partly due to the low number of patients included in this group. However, it should be noted that this patient subgroup had significantly more total ($p=0.030$) and transitional ($p=0.030$) B cells than the NEDA patients in the same Gd+ group at the 6-month follow-up (Figures 1A, D, respectively; Supplementary Table 2). This could also imply a more rapid B cell repopulation

in this group. These differences were not observed in the Gd- patients (Supplementary Table 2).

We next evaluated intracellular cytokine production in B cells. Again, after applying the Bonferroni correction, a drastic reduction in IL-10, IL-6, GM-CSF, and TNF α B cell numbers (Figures 2A–D, respectively, Supplementary Table 2) was observed in the Gd+ NEDA group and in both Gd- EDA and NEDA patients. However, this was not observed in Gd+ EDA patients, who at 6 months of follow-up showed increased numbers of B cells producing TNF α than NEDA patients of the same group ($p=0.04$, Figure 2D and Supplementary Table 2). At 6 months, B cell numbers were very low and thus establishing percentages respective to total B cells with such a small quantity of cells could result highly imprecise. Consequently, we decided not to analyze differences relative to total B cells percentages, contrary to what we did with the rest of the leukocyte populations.

3.2 T Cells

3.2.1 Total Cell Counts

We next studied the effect of ocrelizumab in the different T cell subpopulations after 6 months of ocrelizumab treatment. We only found significant differences in the CD20+ T cell subset. It decreased in all groups but after Bonferroni correction differences only remained significant in the Gd+ NEDA group and in both Gd- EDA and NEDA groups (Figure 1F and Supplementary Table 2). Results were similar when studied separately CD4+ and CD8+ subsets (Supplementary Figure 4).

3.2.2 Percentages Relative to CD4+ and CD8+ Subsets

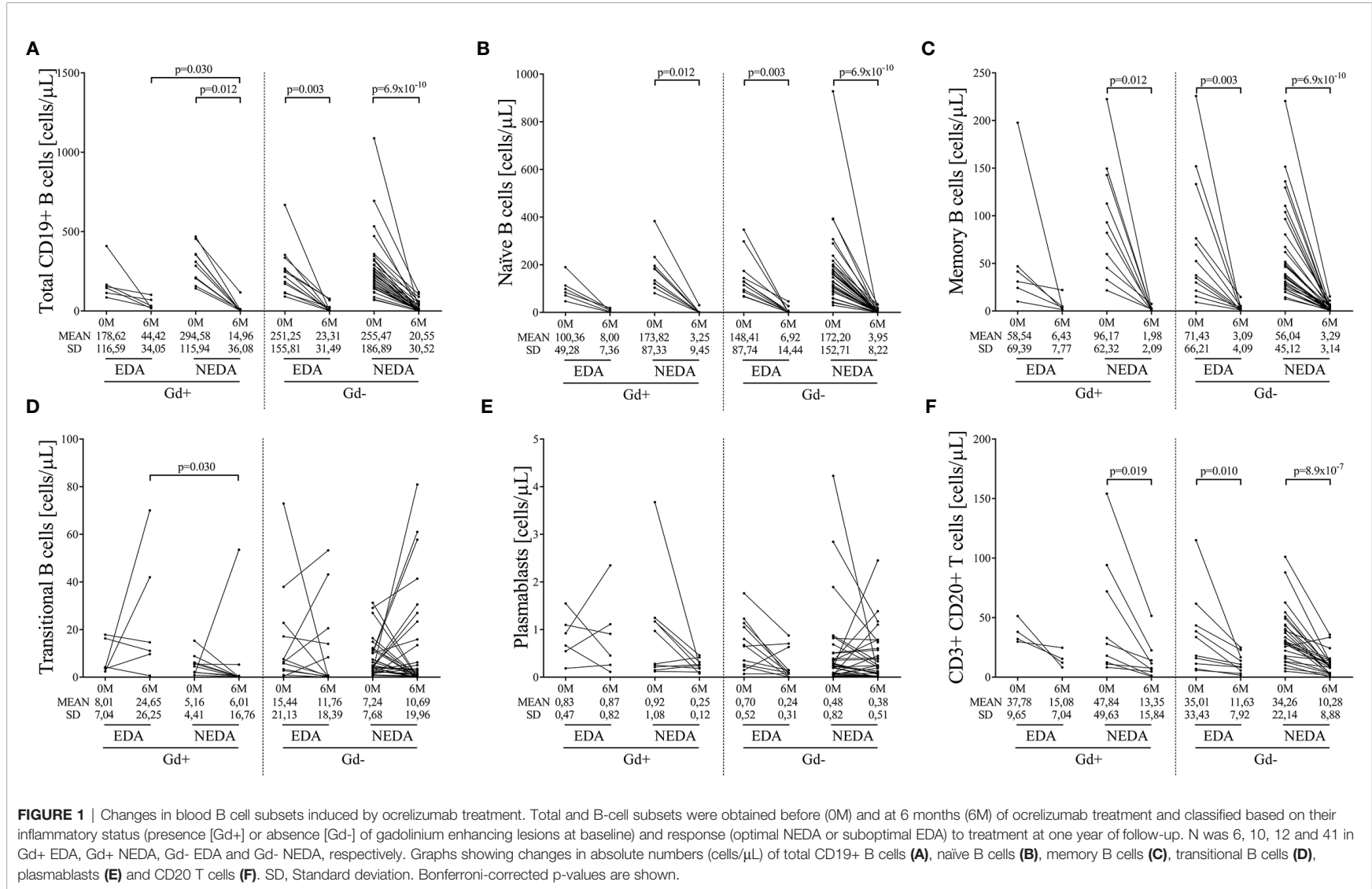
No differences were observed in the Gd+ group (Supplementary Table 3). However, ocrelizumab treatment modified the T cell compartment in NEDA patients of the Gd- group. We found an increase in the proportion of naïve CD4+ T cells ($p=0.004$, Supplementary Table 3) accompanied by decreases in the percentages of TD ($p=0.002$, Supplementary Table 3) and EM ($p=0.041$, Supplementary Table 3) CD4+ T subsets related to the total CD4+ T cell population. Accordingly, we found

TABLE 1 | Baseline data and patient characteristics.

	All patients (n=69)	Gd+ (n=16)		Gd- (n=53)		p value
		EDA (n=6)	NEDA (n=10)	EDA (n=12)	NEDA (n=41)	
Age [years] – median (range).	52.0 (33.0 – 71.0)	51.0 (40.0 – 54.0)	49.0 (33.0 – 58.0)	50.0 (38.0 – 63.0)	54.0 (36.0 – 71.0)	0.204
Sex (F/M).	37/32	3/3	5/5	6/6	23/18	0.970
Disease duration [years] – median (range).	9.2 (1.3 – 24.1)	10.7 (2.1 – 15.4)	7.0 (1.3 – 13.3)	6.6 (1.6 – 19.0)	10.2 (1.7 – 24.2)	0.490
EDSS score – median (range).	5.5 (1.0 – 8.0)	5.5 (3.0 – 8.0)	6.0 (3.5 – 6.0)	4.0 (1.0 – 6.0)	6.0 (2.0 – 7.0)	0.160
Gd lesions – median (range).	0.0 (0.0 – 4.0)	1.0 (1.0 – 3.0)	1.0 (1.0 – 4.0)	0.0 (0.0 – 0.0)	0.0 (0.0 – 0.0)	1.6x10⁻¹⁴

F, Female; M, male; EDSS, Expanded Disability Status Scale; n, number of patients; Gd+/-, presence/absence of gadolinium enhancing lesions at baseline; EDA, evidence of disease activity patients at 1 year of follow-up; NEDA, non-evidence of disease activity patients at 1 year of follow-up.

Bold values are significant values ($p < 0.05$).



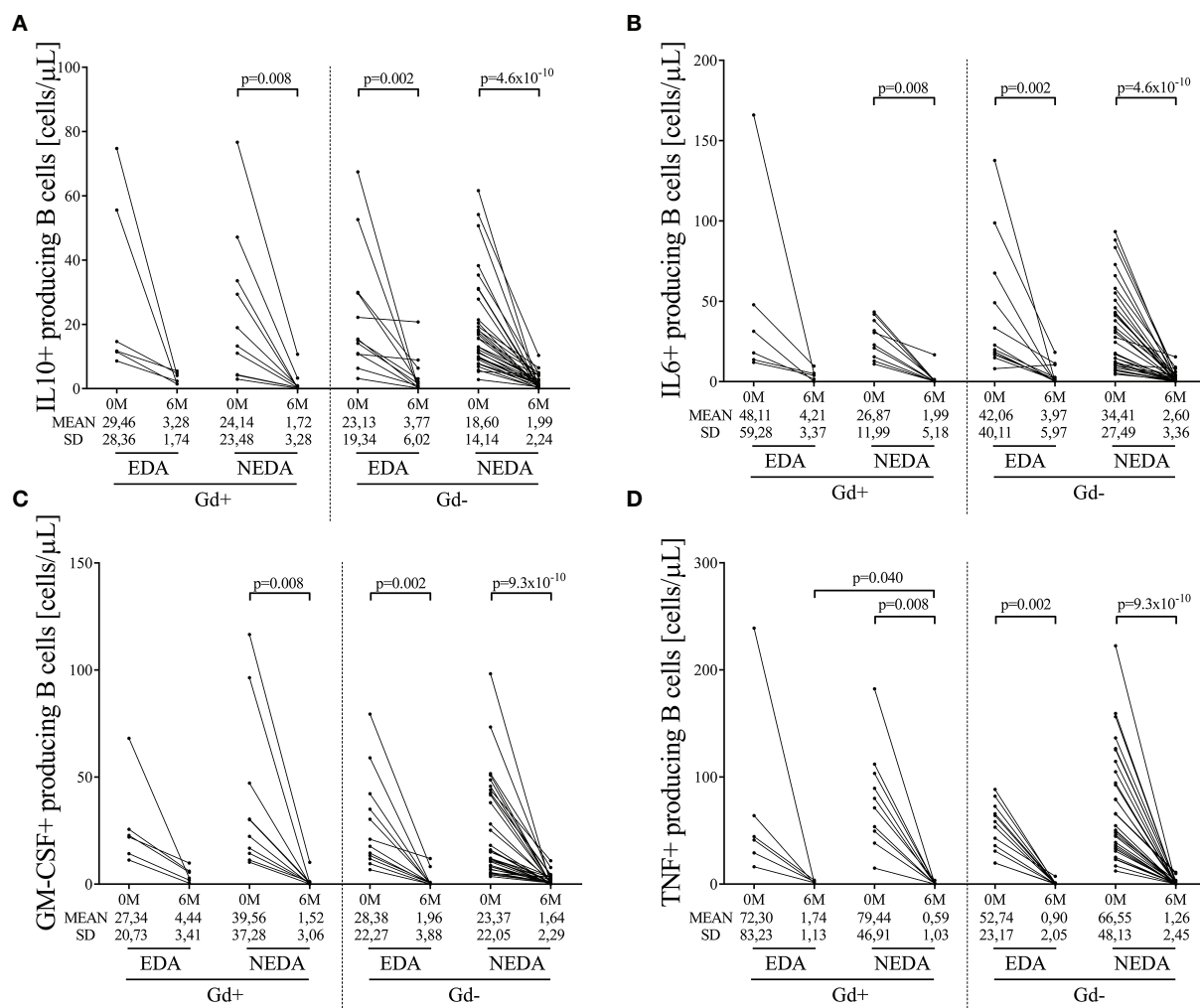


FIGURE 2 | Changes in blood cytokine-producing B cells on ocrelizumab treatment. Cytokine-producing B cells were obtained before (0M) and at 6 months (6M) of ocrelizumab treatment and classified based on their inflammatory status (presence [Gd+] or absence [Gd-] of gadolinium enhancing lesions at baseline) and response (NEDA or EDA) to treatment at one year of follow-up. N was 6, 10, 12 and 41 in Gd+ EDA, Gd+ NEDA, Gd- EDA and Gd- NEDA, respectively. Graphs showing changes in absolute numbers (cells/ μ L) of IL-10 (A), IL-6 (B), GM-CSF (C), and TNF α (D)-producing B cells. IL, interleukin; GM-CSF, granulocyte-macrophage colony-stimulating factor; TNF, tumor necrosis factor alpha; SD, Standard deviation. Bonferroni-corrected p-values are shown.

increases in the naïve/EM ($p=0.004$, **Figure 3A**) and naïve/TD ($p<0.0001$, **Figure 3A**) ratios.

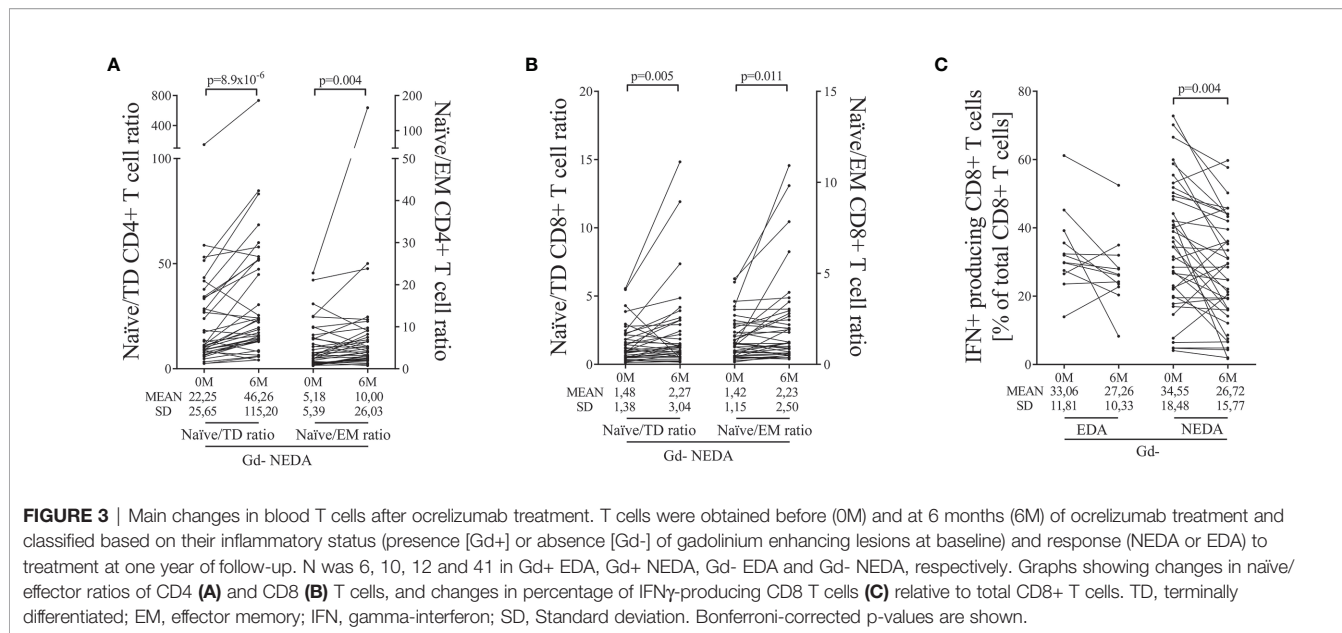
We also found an increase in naïve CD8+ T cell percentages relative to total T CD8+ cells ($p=0.031$, **Supplementary Table 3**). Although, in this case, it was not associated with significant decreases in effector and TD subpopulations, again, NEDA patients showed an increase in the naïve/EM ($p=0.011$, **Figure 3B**) and naïve/TD ($p=0.005$, **Figure 3B**) ratios.

Finally, we studied the relative changes in intracellular cytokine production by CD4+ and CD8+ T cells. No differences were found in cytokine production from CD4+ T cells. However, in the Gd- group, the NEDA patients experienced a decrease in the proportion of CD8+ T cells producing IFN γ ($p=0.004$, **Figure 3C** and **Supplementary Table 3**) relative to the total CD8+ T cell population.

By contrast, no changes were observed in EDA Gd- group in any T cell subset after six months of ocrelizumab treatment. This suggests that the remodeling of the T cell compartment is important for the response to ocrelizumab in these patients.

3.3 Innate Immune Cells

An increase in the total monocyte counts was found in Gd-NEDA patients 6 months after ocrelizumab treatment with the differences being higher in the NEDA group ($p=0.034$, **Supplementary Table 2**). We next explored if this increase was associated with the total numbers of monocytes producing IL-1, IL-6, IL-10, IL-12, and TNF-alpha or expressing PD-L1. The only significant differences were found in PD-L1+ monocytes. Gd- NEDA patients experienced an increase of the numbers of this subset after ocrelizumab treatment ($p=0.013$,



Supplementary Table 2). No significant changes were observed in the proportions of any subset relative to total monocytes. We observed a decrease in the number of CD56bright NK cells ($p=0.023$, Supplementary Table 2) in the Gd- NEDA group after treatment with no variations in the relative proportions of the NK subsets analyzed (Supplementary Table 3).

3.4 Serum NfL Levels

Baseline sNfL levels were higher in the Gd+ EDA group compared with the Gd- EDA ($p=0.014$) and Gd- NEDA ($p=0.007$) groups (Figure 4). They also trended toward higher values than those observed in the Gd+ NEDA patients ($p=0.07$). Six months after ocrelizumab treatment, sNfL levels were only significantly lower than basal values in the Gd+ NEDA group (Figure 4). They did not decrease significantly in the Gd+ EDA patients. The Gd- NEDA and EDA groups, whose baseline sNfL values were not elevated, did not vary significantly from each other upon treatment. When explored the z score normalized by patient age, we observed that in most Gd+ EDA patients, baseline sNfL values were higher than 2 z score levels (median values=2.411) whilst they were mostly between 0 and 2 z score values in most patients from the other three groups (Table 2).

3.5 Serum Immunoglobulin Values

We explored changes in serum immunoglobulin concentrations 6 months after the first dose of ocrelizumab. The levels of IgG remained stable, while significant decreases in serum IgM levels were observed in all of them (Table 3). Additionally, increased serum IgA levels were observed in the Gd- NEDA group ($p=0.006$, Table 3). However, the most interesting results were observed when the changes in the ratios of the different serum immunoglobulins were explored. The IgA to IgM ratio was augmented in all groups (Figure 5B) with these changes highly relevant in Gd- NEDA group ($p=4 \times 10^{-12}$). The IgG to IgM ratio

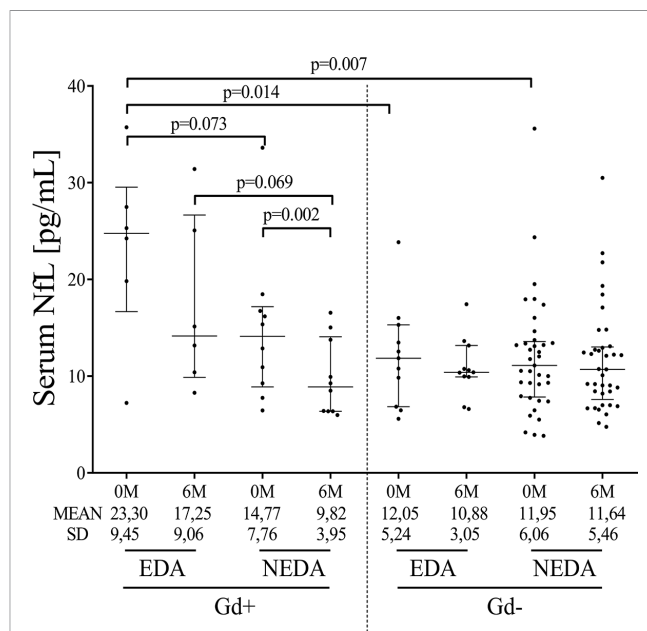


FIGURE 4 | Ocrelizumab treatment induces changes in sNfL levels. sNfL levels (pg/mL) measured before (0M) and at 6 months (6M) of ocrelizumab treatment and classified based on their inflammatory status (presence [Gd+] or absence [Gd-] of gadolinium enhancing lesions at baseline) and response (NEDA or EDA) to treatment at one year of follow-up. N was 6, 10, 12 and 41 in Gd+ EDA, Gd+ NEDA, Gd- EDA and Gd- NEDA, respectively. sNfL, serum neurofilament light-chains; SD, Standard deviation.

also increased (Figure 5A), being again the most prominent changes observed in the Gd- NEDA group ($p=2.5 \times 10^{-11}$). Remarkably, this group of patients experienced an increase in the IgA to IgG ratio ($p=0.0011$; Figure 5C) not observed in any other group.

TABLE 2 | Cohort summary of age-normalized sNfL values.

Group	n	OM		6M		
		NfL.zscore		NfL.zscore		
		Median	IQR	n	Median	IQR
Gd- NEDA	41	0.305	[-0.361, 1.495]	41	0.176	[-0.496, 1.175]
Gd- EDA	12	0.440	[-0.101, 1.243]	12	0.210	[-0.319, 0.948]
Gd+ NEDA	10	1.422	[0.515, 1.642]	10	0.151	[-0.422, 0.812]
Gd+ EDA	6	2.411	[2.074, 2.750]	6	1.646	[0.775, 2.395]
All	69	0.569	[-0.094, 1.801]	69	0.228	[-0.358, 1.282]

Results of NfL z score are shown as median [25-75% IQR]. Gd+/-, presence/absence of gadolinium enhancing lesions at baseline; EDA, evidence of disease activity patients at 1 year of follow-up; NEDA, non-evidence of disease activity patients at 1 year of follow-up; OM, 0 Months (pre-ocrelizumab treatment); 6M, 6 Months of ocrelizumab treatment.

TABLE 3 | Ocrelizumab induced changes in serum immunoglobulin levels.

		EDA (n=18)			NEDA (n=51)		
		OM	6M	*p	OM	6M	*p
		IgG [mg/dL]					
	Gd+	1113 (795-1573)	1125 (748-1478)	>0.99	1095 (744-1120)	995 (737-1133)	>0.99
	Gd-	880 (750-1023)	927 (791-1010)	>0.99	955 (825-1090)	984 (870-1195)	>0.99
IgA [mg/dL]							
	Gd+	233 (206-324)	237 (210-361)	>0.99	179 (138-225)	170 (155-215)	>0.99
	Gd-	172 (133-196)	177 (144-188)	>0.99	199 (139-228)	208 (155-251)	0.006
IgM [mg/dL]							
	Gd+	72 (63-186)	60 (37-168)	>0.99	95 (51-244)	77 (40-157)	0.018
	Gd-	124 (60-160)	99 (36-134)	0.009	102 (80-159)	84 (67-131)	4.8*10⁻⁴

Results are shown as Median [25-75% IQR]. P values were corrected by using Bonferroni test. Gd+/-, presence/absence of gadolinium enhancing lesions at baseline; EDA, evidence of disease activity patients at 1 year of follow-up; NEDA, non-evidence of disease activity patients at 1 year of follow-up; OM, 0 Months (pre-ocrelizumab treatment); 6M, 6 Months of ocrelizumab treatment; *p, corrected p value.

Bold values are significant values ($p < 0.05$).

4 DISCUSSION

Ocrelizumab selectively depletes CD20+ cells while maintaining B cell reconstitution and pre-existing humoral immunity (11). In patients with PPMS, ocrelizumab not only induces B cell depletion, but reshapes the T cell response toward a low inflammatory profile, resulting in decreased sNfL levels (9).

However, the influence of baseline inflammatory status on these changes has not been fully ascertained. Inflammation is used in the classification of patients with progressive MS. In fact, current guidelines for diagnosing PPMS include two qualifiers: disease activity, defined by MRI or clinical evidence of inflammatory lesions or relapses; and disability progression, defined as a gradually worsening disability independent of relapses (12).

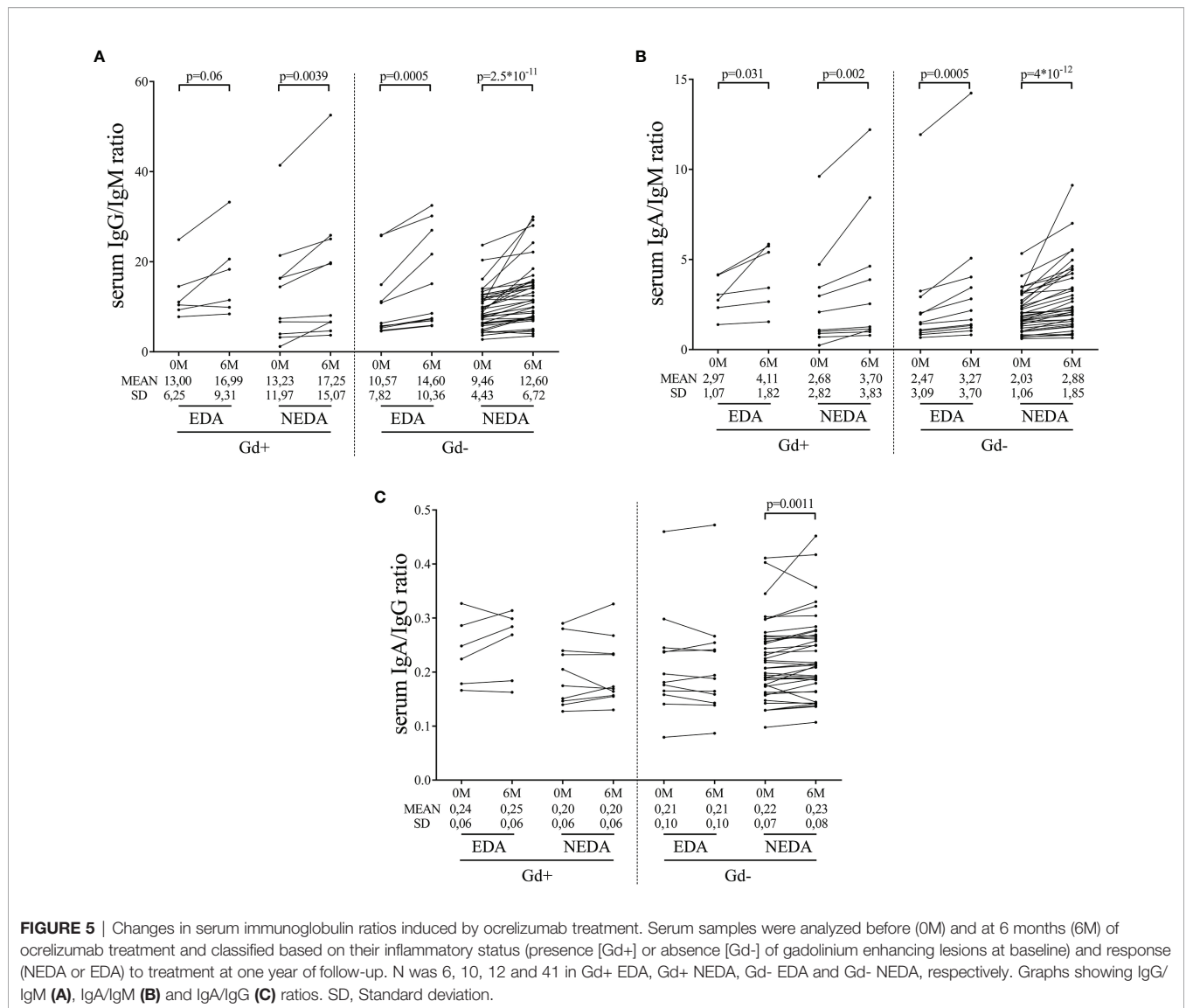
Inflammatory status can also play a role in DMT effectiveness. Overall subgroup analyses evaluating Rituximab in patients with PPMS (OLYMPUS trial) suggested that this drug may affect disease progression in younger patients, particularly those with inflammatory lesions (7). However, results from the ORATORIO trial with ocrelizumab showed that anti-CD20 antibodies are effective in non-inflammatory patients with PPMS (8). This agrees with our results. We explored response to ocrelizumab in a multicenter prospective cohort of 69 patients with PPMS treated with this drug. NEDA patients at 1 year of treatment represented 62% of the inflammatory group (10 out of 16) and 75% of the non-inflammatory one (41 of 53) in our study.

We first explored baseline differences in patients classified according to their inflammatory status (presence [Gd+]/absence [Gd-] of gadolinium-enhancing lesions at baseline). We studied

different leukocyte subsets (B cells, T cells, NK cells and monocytes) and sNfL values. As expected, Gd+ patients showed high sNfL values. They also showed a trend to higher plasmablast numbers. The association of plasmablasts with inflammation in MS has been widely documented in the CSF (13). Probably peripheral blood is not the best compartment to study these cells in MS, but our data seem to confirm the role of plasmablasts in inflammation in MS. On the other hand, we found increased values of naïve B cells in Gd- patients. This suggests other function for B cells in non-inflammatory PPMS patients, as antigen presentation. No other differences were found between Gd+ and Gd- patients.

We next studied changes associated with NEDA status in both groups of patients by analyzing T, B, NK, and monocyte cell subsets at baseline and 6 months after receiving the first dose of treatment, before receiving the second one. Patients were classified according to their inflammatory condition (Gd+ or Gd-) and to their response to treatment (NEDA or EDA).

Although B cells clearly diminished in all groups of patients 6 months after the first ocrelizumab dose, in the EDA inflammatory group, total B cell counts were higher at this point. This increase was mainly due to transitional B cells, thus indicating a higher rate of B cell repopulation for these patients, and to TNF-alpha-producing B cells, thus indicating a rapid differentiation into pro-inflammatory B cells. Another characteristic of EDA Gd+ patients was the increased levels of sNfL levels at baseline compared with the non-inflammatory groups, with a trend also observed for higher values than NEDA Gd+ patients. These data show that baseline Gd enhancing lesions and especially high serum neurofilament levels associate in PPMS with a high rate of B cell repopulation and



strongly suggest that these patients should benefit from early re-treatment or dose adjustment. By contrast, in NEDA Gd+ patients, the low B cell counts at 6 months were associated with a significant reduction of the sNfL levels 6 months after the first ocrelizumab dose. Finally, in NEDA and EDA Gd- patients, sNfL levels did not change significantly after ocrelizumab treatment, despite the reduction in B cell counts or response to treatment. This is important, since NfL is being proposed as a biomarker for response to different drugs in MS (14) and this could be not the case in patients with low inflammatory activity.

T cell activation and cytokine production are also affected by anti-CD20 DMTs (9, 15). We first studied absolute T cell counts. Only CD20+ T cells decreased in number. This occurred in the four patient groups, with Gd+ EDA being the only one in which the reduction did not reach statistical significance, probably due to the low sample size. The CD20+ T cell subset has been proposed to play an important role in MS pathology because of its highly activated phenotype and proinflammatory and migratory

properties (16) and a reduction in these cells, described also for alemtuzumab, fingolimod, and dimethyl fumarate (16), can be beneficial for patients with PPMS treated with ocrelizumab, independent of their baseline inflammatory status.

We next explored the changes in the proportions of the different T cell subsets after 6 months of treatment relative to the total CD4+ and CD8+ T cells. Variations were restricted to the Gd- NEDA group. These patients exhibited a reduction in TD and EM CD4+ T effector cells and increases in naïve CD4+ and CD8+ T cells and in the ratios of naïve/EM and naïve/TD in CD4+ and CD8+ T cells. Likewise, they experienced a decrease in the proportion of CD8+ T cells producing IFN γ . These data show that response to ocrelizumab in Gd- patients is conditioned by reshaping the T cell compartment to a more tolerogenic profile. The activation of the T cell compartment by B cells may play an important role in the pathology of Gd- PPMS. Furthermore, the beneficial effects of different drugs in patients with MS with low inflammatory contribution to their disease may be reflected by

changes in other biomarkers aside from sNfL, especially in those with low baseline levels of this protein.

Regarding to Gd- EDA patients, we did not find any clear explanation for the lack of changes in the T cell compartment they showed upon Ocrelizumab treatment. They had no differences on epidemiological, clinical or immune cell subsets at baseline with NEDA group. Exploring antigen presenting B cells and activated dendritic cells in both groups could help to elucidate this conundrum. Future research will demonstrate if antigen presenting B cells could be a biomarker of response to Ocrelizumab in Gd- PPMS patients, as suggested by the remodeling in the T cell compartment showed by NEDA patients.

We also explored changes in innate immune cells at baseline and after 6 months of treatment. Again, we only found significant changes in NEDA Gd- patients. They showed a significant increase in total monocyte counts. This increase was mainly due to PD-L1-expressing monocytes. This molecule is a ligand of the PD-1 receptor, which promotes self-tolerance by suppressing T cell inflammatory activity (17). Its increase has been described in response to other drugs in MS (18). Its up-regulation upon B cell depletion further demonstrates the role of inflammatory B cells in inducing inflammation in cells of the innate immune response and how this can be changed by B cell depletion (19). The up-regulation of PD-L1 expression by monocytes may contribute to the remodeling of the T cell compartment observed in these patients.

Regarding serum immunoglobulins in the four groups of patients, ocrelizumab induced a decrease in serum IgM levels, with no changes in IgG values, as previously reported for patients treated with anti-CD20 antibodies (9, 20). Likewise, all groups of patients showed a decrease in the IgG/IgM and IgA/IgM ratios. Most IgM molecules present in serum are natural antibodies that react against non-protein antigens, anti-lipid specificity being the most frequent (21, 22). Intrathecal synthesis of anti-lipid IgM antibodies associates with an aggressive MS course (22, 23). Thus, the down regulation of the B cells producing these antibodies may have a beneficial effect in MS. Additionally, our data contain interesting results with IgA antibodies. Gd- NEDA patients showed an increase of the levels of this immunoglobulin upon ocrelizumab treatment, and raised values of the ratio IgA/IgG. IgA, produced mostly at mucosal surfaces, functions as a critical mediator of intestinal homeostasis (24) and gut-microbiota reactive IgA plasma cells can migrate to peripheral organs with potential roles in extraintestinal autoimmune diseases (25). In MS, gut microbiota-specific IgA cells are considered a systemic mediator of the disease behaving as an informative biomarker during active neuroinflammation (26). In the experimental model of the disease, migration of IgA-producing plasma cells from the intestinal mucosa to the CNS has proven to down-modulate disease activity. This was attributed to IL-10 production in these cells (27), but often, natural IgA antibodies produced by plasma cells of the gut mucosa recognize similar antigens that natural IgM antibodies present in serum (28, 29). These IgA antibodies could block antigens recognized by IgM, thus avoiding complement fixation and diminishing axonal damage.

In summary this study shows that baseline inflammation could determine the immunological pathways that drive the

response to Ocrelizumab in PPMS and that, regardless of baseline MRI activity, B cell depletion with ocrelizumab can modify both underlying mechanisms, and be effective in more than 60% of patients.

DATA AVAILABILITY STATEMENT

The original contributions presented in the study are included in the article/**Supplementary Material**. Further inquiries can be directed to the corresponding author.

ETHICS STATEMENT

The studies involving human participants were reviewed and approved by Ethics Committee of each participating hospital. The patients/participants provided their written informed consent to participate in this study.

AUTHOR CONTRIBUTIONS

JF-V drafted the manuscript, major role in performing experiments, acquisition and analysis of data. PW-D, PL-S, and NV collected samples and performed flow cytometry experiments. JK and AM contributed to sNfL measurement. ER-M and ER supervised flow cytometry studies. EM, VM-L, JM-L, GI, CO-G, FG-G, SS, AS, YB, CD-P, GV-L, JD-D, YA, LB, CÍ, IG-S, LR, JG-D, JS, SL, JM, and LC-F visited MS patients, contributed by sending samples or collected clinical data. LV designed and supervised the study. All authors revised the manuscript and approved the final version.

FUNDING

This work was supported by Red Española de Esclerosis Múltiple (REEM) (RD16/0015/0001; RD16/0015/0002; RD16/0015/0003; RD16/0015/0008; RD16/0015/0013) and PI18/00572 integrated in the Plan Estatal I+D+I and co-funded by ISCIII-Subdirección General de Evaluación and Fondo Europeo de Desarrollo Regional (FEDER, “Una manera de hacer Europa”).

ACKNOWLEDGMENTS

Authors acknowledge AI Pérez Macías and S Ortega for their excellent technical support.

SUPPLEMENTARY MATERIAL

The Supplementary Material for this article can be found online at: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fimmu.2022.842354/full#supplementary-material>

REFERENCES

- Filippi M, Bar-Or A, Piehl F, Preziosa P, Solari A, Vukusic S, et al. Multiple Sclerosis. *Nat Rev Dis Primers* (2018) 4(1):43. doi: 10.1038/s41572-018-0041-4
- Faissner S, Plemler JR, Gold R, Yong VW. Progressive Multiple Sclerosis: From Pathophysiology to Therapeutic Strategies. *Nat Rev Drug Discovery* (2019) 18(12):905–22. doi: 10.1038/s41573-019-0035-2
- Miller DH, Leary SM. Primary-Progressive Multiple Sclerosis. *Lancet Neurol* (2007) 6(10):903–12. doi: 10.1016/S1474-4422(07)70243-0
- Baldassari LE, Fox RJ. Therapeutic Advances and Challenges in the Treatment of Progressive Multiple Sclerosis. *Drugs* (2018) 78(15):1549–66. doi: 10.1007/s40265-018-0984-5
- Goldschmidt C, McGinley MP. Advances in the Treatment of Multiple Sclerosis. *Neurol Clin* (2021) 39(1):21–33. doi: 10.1016/j.ncl.2020.09.002
- Monson NL, Cravens PD, Frohman EM, Hawker K, Racke MK. Effect of Rituximab on the Peripheral Blood and Cerebrospinal Fluid B Cells in Patients With Primary Progressive Multiple Sclerosis. *Arch Neurol* (2005) 62(2):258–64. doi: 10.1001/archneur.62.2.258
- Hawker K, O'Connor P, Freedman MS, Calabresi PA, Antel J, Simon J, et al. Rituximab in Patients With Primary Progressive Multiple Sclerosis: Results of a Randomized Double-Blind Placebo-Controlled Multicenter Trial. *Ann Neurol* (2009) 66(4):460–71. doi: 10.1002/ana.21867
- Montalban X, Hauser SL, Kappos L, Arnold DL, Bar-Or A, Comi G, et al. Ocrelizumab Versus Placebo in Primary Progressive Multiple Sclerosis. *N Engl J Med* (2017) 376(3):209–20. doi: 10.1056/NEJMoa1606468
- Fernández-Velasco JI, Kuhle J, Monreal E, Meca-Lallana V, Meca-Lallana J, Izquierdo G, et al. Effect of Ocrelizumab in Blood Leukocytes of Patients With Primary Progressive Ms. *Neuroimmunol Neuroinflamm* (2021) 8(2):e940. doi: 10.1212/NXI.0000000000000940
- 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(2):162–73. doi: 10.1016/S1474-4422(17)30470-2
- Greenfield AL, Hauser SL. B-Cell Therapy for Multiple Sclerosis: Entering an Era. *Ann Neurol* (2018) 83(1):13–26. doi: 10.1002/ana.25119
- Lublin FD, Reingold SC, Cohen JA, Cutter GR, Sorensen PS, Thompson AJ, et al. Defining the Clinical Course of Multiple Sclerosis: The 2013 Revisions. *Neurology* (2014) 83(3):278–86. doi: 10.1212/WNL.0000000000000560
- Cepok S, Rosche B, Grummel V, Vogel F, Zhou D, Sayn J, et al. Short-Lived Plasma Blasts are the Main B Cell Effector Subset During the Course of Multiple Sclerosis. *Brain* (2005) 128(7):1667–76. doi: 10.1093/brain/awh486
- Disanto G, Barro C, Benkert P, Naegelien Y, Schädelin S, Giardiello A, et al. Serum Neurofilament Light: A Biomarker of Neuronal Damage in Multiple Sclerosis. *Ann Neurol* (2017) 81(6):857–70. doi: 10.1002/ana.24954
- Bar-Or A, Fawaz L, Fan B, Darlington PJ, Rieger A, Ghorayeb C, et al. Abnormal B-Cell Cytokine Responses a Trigger of T-Cell-Mediated Disease in MS? *Ann Neurol* (2010) 67(4):452–61. doi: 10.1002/ana.21939
- Schuh E, Berer K, Mulazzani M, Feil K, Meinel I, Lahm H, et al. Features of Human CD3+CD20+ T Cells. *J Immunol* (2016) 197(4):1111–7. doi: 10.4049/jimmunol.1600089
- Goodman A, Patel SP, Kurzrock R. PD-1-PD-L1 Immune-Checkpoint Blockade in B-Cell Lymphomas. *Nat Rev Clin Oncol* (2017) 14(4):203–20. doi: 10.1038/nrclinonc.2016.168
- 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(2):355–63. doi: 10.1002/acn3.711
- Li R, Bar-Or A. The Multiple Roles of B Cells in Multiple Sclerosis and Their Implications in Multiple Sclerosis Therapies. *Cold Spring Harb Perspect Med* (2019) 9(4):a029108. doi: 10.1101/cshperspect.a029108
- Oksbjerg NR, Nielsen SD, Blinkenberg M, Magyar M, Sellebjerg F. Anti-CD20 Antibody Therapy and Risk of Infection in Patients With Demyelinating Diseases. *Mult Scler Relat Disord* (2021) 52:102988. doi: 10.1016/j.msard.2021.102988
- Boes M. Role of Natural and Immune IgM Antibodies in Immune Responses. *Mol Immunol* (2000) 37(18):1141–9. doi: 10.1016/S0161-5890(01)00025-6
- Villar LM, Sádaba MC, Roldán E, Masjuan J, González-Porqué P, Villarrubia N, et al. Intrathecal Synthesis of Oligoclonal IgM Against Myelin Lipids Predicts an Aggressive Disease Course in MS. *J Clin Invest* (2005) 115(1):187–94. doi: 10.1172/JCI22833
- 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(5):e1047. doi: 10.1212/NXI.0000000000001047
- Pabst O, Slack E. IgA and the Intestinal Microbiota: The Importance of Being Specific. *Mucosal Immunol* (2020) 13(1):12–21. doi: 10.1038/s41385-019-0227-4
- Shalpour S, Lin XJ, Bastian IN, Brain J, Burt AD, Aksenov AA, et al. Inflammation-Induced IgA+ Cells Dismantle Anti-Liver Cancer Immunity. *Nature* (2017) 551(7680):340–5. doi: 10.1038/nature24302
- Pröbstel AK, Zhou X, Baumann R, Wischniewski S, Kutza M, Rojas OL, et al. Gut Microbiota-Specific IgA+ B Cells Traffic to the CNS in Active Multiple Sclerosis. *Sci Immunol* (2020) 5(53):eabc7191. doi: 10.1126/sciimmunol.abc7191
- Rojas OL, Pröbstel AK, Porfilio EA, Wang AA, Charabati M, Sun T, et al. Recirculating Intestinal IgA-Producing Cells Regulate Neuroinflammation via IL-10. *Cell* (2019) 177(2):492–3. doi: 10.1016/j.cell.2019.03.037
- Grönwall C, Silverman GJ. Natural IgM: Beneficial Autoantibodies for the Control of Inflammatory and Autoimmune Disease. *J Clin Immunol* (2014) 34Suppl1:S12–21. doi: 10.1007/s10875-014-0025-4
- Palma J, Tokarz-Deptuła B, Deptuła J, Deptuła W. Natural Antibodies-Facts Known and Unknown. *Cent Eur J Immunol* (2018) 43(4):466–75. doi: 10.5114/cej.2018.81354

Conflict of Interest: EM received research grants, travel support or honoraria for speaking engagements from Biogen, Merck, Novartis, Roche, and Sanofi-Genzyme; JK received speaker fees, research support, travel support, and/or served on advisory boards by ECTRIMS, Swiss MS Society, Swiss National Research Foundation (320030_189140/1), University of Basel, Bayer, Biogen, Celgene, Merck, Novartis, Roche, Sanofi; VM-L received grants and consulting or speaking fees from Almirall, Biogen, Celgene, Genzyme, Merck, Novartis, Roche and Teva; JM-L has received grants and consulting or speaking fees from Almirall, Biogen, Bristol-Myers-Squibb, Genzyme, Merck, Novartis, Roche and Teva; GI has received consultancy/advice and Conference- travel support from Bayer, Novartis, Sanofi, Merck Serono, Roche, Actelion Celgene and Teva; CO-G has received speaker and consulting fees from Biogen, Celgene, Merck KGaA (Darmstadt, Germany), Novartis, Roche, Sanofi Genzyme and Teva; FG-G has received funding for research grants, travel support and honoraria for speaking engagements from: Bayer, Biogen, Roche, Merck, Novartis, Almirall, Teva and Genzyme-Sanofi; SS received research grants, travel support, or honoraria for speaking engagements from Almirall, Bayer, Biogen, Merck, Mylan, Novartis, Roche, Sanofi-Genzyme and Teva; AS reports compensation for consulting services and speaker honoraria from Merck-Serono, Biogen-Idec, Sanofi-Aventis, Teva Pharmaceutical Industries Ltd, Novartis, Roche, and Alexion; YB received speaking honoraria from Biogen, Novartis and Genzyme; LB received funding for research projects or in the form of conference fees, mentoring, and assistance for conference attendance from: Bayer, Biogen, Roche, Merck, Novartis, Almirall, Celgen and Sanofi; IG-S received research grants, travel support and honoraria for speaking engagements from Biogen, Merck, Novartis, Roche, Sanofi-Genzyme, TEVA and Alexion; LR received travel support, and honoraria for speaking engagements from Biogen, Merck, Roche and Sanofi-Genzyme; JS received funding for research projects and conference fees, mentoring, and assistance for conference attendance from: Teva, Merck, Biogen, Roche, Novartis, and Sanofi; SL received compensation for consulting services and speaking honoraria from Merck-Serono, Biogen-Idec, Sanofi-Aventis, Teva Pharmaceutical Industries Ltd, Novartis and Roche; 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; LV received research grants, travel support or honoraria for speaking engagements from Biogen, Merck, Novartis, Roche, Sanofi-Genzyme and Bristol-Myers.

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.

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.

Copyright © 2022 Fernández-Velasco, Monreal, Kuhle, Meca-Lallana, Meca-Lallana, Izquierdo, Oreja-Guevara, Gascón-Giménez, Sainz de la Maza, Walo-Delgado, Lapuente-Suanzes, Maceski, Rodríguez-Martín, Roldán, Villarrubia,

Saiz, Blanco, Diaz-Pérez, Valero-López, Diaz-Diaz, Aladro, Brieva, Íñiguez, González-Suárez, Rodríguez de Antonio, García-Domínguez, Sabin, Llufríu, Masjuan, 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.

5 DISCUSIÓN

La Esclerosis Múltiple (EM) es una enfermedad desmielinizante crónica del sistema nervioso central (SNC). Se trata de una patología autoinmune, inflamatoria y neurodegenerativa, que constituye la primera causa de discapacidad en adultos jóvenes. Es heterogénea y multifactorial, jugando papeles importantes tanto la carga génica como la ambiental, pero mediada por el sistema inmunológico. De las múltiples formas en que se puede manifestar la enfermedad, un 15% de los pacientes presentan el fenotipo primariamente progresivo (EMPP), caracterizado por la progresión continua de la disfunción neurológica desde el inicio de la enfermedad [82].

Aunque la enfermedad es aún incurable, en parte por el desconocimiento de su agente causal, existe un elevado arsenal de tratamientos modificadores de la enfermedad (TME) disponibles, permitiendo en la mayoría de casos una terapia individualizada en la que se tenga en cuenta el curso de la enfermedad, la eficacia del fármaco y su seguridad, así como las propias preferencias del paciente [256]. A la fecha de la publicación de este trabajo, sin embargo, ocrelizumab es el único TME aprobado para pacientes diagnosticados con EMPP. Por este motivo, hay alto interés científico y clínico en encontrar alternativas a ocrelizumab, postulándose como primera opción los TME orales inhibidores de la enzima BTK, entre los que se incluyen evobrutinib [257], tolebrutinib [258], orelabrutinib [259] y fenebrutinib [260]. La llegada inminente de una nueva generación de alternativas terapéuticas para esta forma progresiva de la enfermedad refleja la necesidad de identificar biomarcadores que seleccionen a los mejores candidatos a cada una de las terapias y que predigan la respuesta a los mismos, de tal manera que los potenciales cambios entre líneas terapéuticas se optimicen al máximo.

Ocrelizumab es un anticuerpo monoclonal humanizado que elimina selectivamente los linfocitos que expresan la molécula CD20 en su superficie. Esto lo logra principalmente mediante citotoxicidad celular mediada por anticuerpos o por el sistema del complemento, y por apoptosis directa [261]. La molécula CD20 se expresa en gran parte del repertorio B pero no en

progenitores, células pro-B ni en células plasmáticas, de tal manera que se preserva la capacidad de reconstitución de las células B y la inmunidad humoral pre-existente [261].

La citometría de flujo ha demostrado una depleción casi completa de células B de LCR, mantenida hasta 6 meses tras la administración de rituximab, otro anticuerpo monoclonal anti-CD20 [262]. Del mismo modo, dos semanas después de la administración de una sola dosis de ocrelizumab, se observó una depleción completa de células B en pacientes con EMPP [263]. Sin embargo, los estudios de LCR en general no están indicados para el seguimiento de pacientes con EM por lo que nos propusimos estudiar los cambios inducidos por esta molécula sobre células mononucleares de sangre periférica. Está descrito que las células de sangre periférica juegan un papel importante en la fisiopatología de la EM [264], y que los tratamientos inmunomoduladores pueden modificar tanto su número, su porcentaje, su expresión antigénica diferencial y/o su funcionalidad, y el patrón de citoquinas expresado por las mismas. En cambio, se desconoce casi por completo cómo afecta la eliminación de poblaciones celulares que expresan el antígeno CD20 al resto de células del sistema inmunológico en pacientes EMPP tratados con ocrelizumab.

Precisamente este es el motivo de que gran parte de nuestro trabajo se haya centrado en estudiar los cambios que produce el fármaco sobre una amplia variedad de células mononucleares de sangre periférica, entre las que se incluyen diferentes subpoblaciones de células B, T, NK y monocitos, tanto a nivel de expresión antigénica como a nivel de producción de citoquinas anti- y pro-inflamatorias. Se analizaron tanto valores absolutos como porcentajes de células relativos a la población de estudio y, en los casos necesarios, se completó el estudio mediante la realización de ratios entre diferentes subpoblaciones. La EMPP solo se da en un 10-15% de los pacientes con EM [7], por lo que es difícil reunir una cohorte amplia de pacientes. Para ello organizamos un estudio multicéntrico en el que participaron 14 hospitales españoles, lo que nos permitió analizar 53 pacientes en nuestro primer trabajo y 69 en el segundo.

Además, el estudio de múltiples variables a menudo implica la aparición de diferencias significativas pero con niveles de significación ajustados, que a menudo no se validan en nuevas cohortes. Para evitar los problemas derivados de las comparaciones múltiples, todas las variables analizadas se corrigieron por el test de Bonferroni. Aunque se ha perdido la significación en algunos de los cambios observados, los que se mantuvieron significativos tienen un valor más robusto lo que facilita el análisis de los efectos de este fármaco sobre el sistema inmunitario de los pacientes.

5.1 CAMBIOS EN POBLACIONES LEUCOCITARIAS DE SANGRE PÉRIFÉRICA Y FACTORES SOLUBLES DE PACIENTES EMPP A LOS 6 MESES DE TRATAMIENTO CON OCRELIZUMAB

En nuestros pacientes, ocrelizumab indujo una drástica depleción del número absoluto de linfocitos B, debido principalmente a una reducción de las subpoblaciones naïve y de memoria. Existen numerosos datos que apoyan la implicación de los linfocitos B de memoria en la patología, tanto en formas pediátricas como adultas [265]. Entre ellos, cabe destacar su asociación con procesos neurodegenerativos [266], su detección en las lesiones observadas en estudios *post-mortem* [267], y su disminución en periferia y consecuente acumulación en el SNC tras la presencia de un brote [265]. Además, se ha descrito una asociación entre la disminución de linfocitos B de memoria y buena respuesta al tratamiento con otros TME como IFN β [268], fingolimod [269], alemtuzumab [270], dimetilfumarato [135] o teriflunomida [252]. El número de plasmablastos hemáticos también disminuyó significativamente tras el tratamiento con ocrelizumab en nuestra serie. Esto también reviste interés clínico ya que dicho número se asocia en la EM con la gravedad de la enfermedad desde las primeras fases de la misma [271]. El efecto beneficioso de su disminución ya ha sido atribuido a otros TME como la teriflunomida en pacientes con EMRR [252], pero esto no había sido descrito en la EMPP. Aunque tras aplicar

Bonferroni esta reducción perdió su significación, de confirmarse la bajada en series más grandes, podría tener relevancia ya que se trata de una población efectora importante en la EM [271]. El bajo nivel de expresión de CD20 que muestran los plasmablastos en su membrana ha hecho que la efectividad de los anti-CD20 sobre esta población haya sido muy debatida [272], por lo que estos datos podrían confirmar la efectividad de ocrelizumab sobre la misma.

A continuación estudiamos los posibles cambios inducidos por ocrelizumab en el compartimento de células B. Se detectó un claro aumento de la proporción de células B transicionales respecto a la población total de linfocitos B, confirmando que la repoblación de células B no solo no se ve afectada por ocrelizumab [261], sino que aumenta en respuesta a la depleción de linfocitos B. Por tanto, demostramos que la reconstitución B tras ocrelizumab en la EMPP ocurre de forma similar a lo que ya había descrito para el uso de rituximab como tratamiento para la artritis reumatoide [273], para el síndrome nefrótico idiopático [274], para inducción previa a trasplante renal [275] y, recientemente, para la EMRR [276].

Además, observamos otros cambios muy relevantes. Mientras que la proporción de células naïve disminuía drásticamente, la proporción relativa de plasmablastos, respecto al total de células B, aumentó tras la administración de ocrelizumab, sugiriendo una rápida diferenciación de células B hacia fenotipos efectores. Esto indica que ocrelizumab, al menos en las primeras dosis, no debería considerarse un tratamiento de inducción en la EM. A su vez, el alargamiento del intervalo de dosis, que se ha considerado sobre todo en el contexto de la pandemia por COVID-19 [277], podría tener efectos deletéreos al menos en algunos pacientes.

Al estudiar la producción de citoquinas por los linfocitos B se evidenció la disminución drástica del número de células B secretoras de TNF α , IL-6, IL-10 y GM-CSF. Además, se produjo una disminución relativa en la proporción de células B productoras de TNF α y un aumento relativo de las productoras de IL-10 respecto a la población B total, tal y como se había reportado en pacientes con EMRR [278]. Sin embargo, los aumentos relativos en células B productoras de GM-

CSF e IL-6 demuestran que pueden surgir rápidamente algunas células B efectoras después del tratamiento con ocrelizumab, dejando en evidencia que el tratamiento anti-CD20 no reconstituye un sistema inmunitario completamente sano ni restablece la tolerancia inmunitaria por igual en todos los pacientes, como se ha propuesto por otros grupos [279], respaldando la necesidad del retratamiento. El estudio de la velocidad de repoblación de linfocitos B activados podría contribuir a la identificación de buenos respondedores a ocrelizumab.

Aunque con niveles de expresión mucho menores, la molécula CD20 también se expresa de manera fisiológica en una pequeña parte de linfocitos T. Los linfocitos T CD20+ constituyen una población celular única con un fenotipo altamente activado, propiedades migratorias y pro-inflamatorias gracias a la producción de citoquinas inflamatorias [280, 281]. Estas células se han encontrado en sangre, LCR y lesiones crónicas en cerebro de pacientes con EM [281, 282] y se ha propuesto que podrían desempeñar un papel importante en la patología de la EM [281]. La disminución de esta población ha sido descrita en pacientes EMRR tratados tanto con rituximab [283] como con ocrelizumab [263, 284]. Del mismo modo, se han descrito disminuciones en los recuentos totales de células T CD20+ para alemtuzumab, fingolimod y dimetilfumarato, pero no se observaron reducciones de las proporciones dentro del compartimento de células T para estos fármacos [281]. Por lo general, la EMPP es una forma clínica de la enfermedad con un menor componente inflamatorio que la EMRR, por lo que decidimos explorar la población de linfocitos T CD20+ en nuestra cohorte de pacientes. En este trabajo evidenciamos tanto su presencia en sangre periférica como la reducción de la misma, no solo en números absolutos sino también en porcentajes relativos, transcurridos 6 meses de la primera administración de ocrelizumab. Además, dicha disminución se produjo en todas las subpoblaciones T CD20+ analizadas (naïve, memoria central, memoria efectora y terminalmente diferenciadas), respecto tanto a linfocitos T CD4+ como a T CD8+. Esta regulación a la baja podría ser parte del efecto beneficioso de ocrelizumab en la EMPP.

Con la excepción de las células T CD20+, no encontramos otros cambios significativos en los números absolutos de linfocitos T tras el tratamiento con ocrelizumab en nuestra cohorte. Sin embargo, está descrito que la eliminación, tanto *ex vivo* como *in vivo*, de la población B es capaz de disminuir las respuestas proinflamatorias de linfocitos T CD4+ como T CD8+ en pacientes EMRR tratados con rituximab, mediante la disminución de linfocitos T CD4+ y T CD8+ productores de IFN gamma y linfocitos T CD4+ productores de IL-17 [285]. Los efectos de la eliminación de células B sobre el compartimento T no se conocían en la EMPP por lo que decidimos explorar los posibles cambios inducidos por ocrelizumab en nuestra cohorte de pacientes. Ocrelizumab ocasionó una disminución de la proporción de células T CD8+ de memoria efectora con un aumento de las células T CD8+ naïve. Este fenómeno también se observó en la subpoblación T CD4+, aunque en este caso la disminución de células efectoras se produjo en las células terminalmente diferenciadas. Estos datos confirman que la depleción de células B induce una redistribución del compartimento de células T, favoreciendo la presencia de células naïve frente a efectoras.

Ocrelizumab también mostró un efecto sobre las células T productoras de citocinas. Concretamente en nuestra cohorte de pacientes EMPP se produjo una disminución de los linfocitos T CD4+ y T CD8+ productores de IFN γ a los 6 meses de la administración de ocrelizumab. La eliminación de estas células proinflamatorias es importante ya que juegan un papel fundamental en el mantenimiento de la inflamación en la EM [286], y consideramos que el efecto duradero del fármaco sobre las células T productoras de IFN γ puede contribuir de manera directa al beneficio clínico en la EMPP.

Al estudiar la respuesta innata, nos pareció importante monitorizar la expresión de PD-L1 por los monocitos ya que la interacción de esta molécula con su receptor PD-1, expresado en la superficie de las células T, representa un punto de control de la respuesta inmune, induciendo inhibición de proliferación, producción de citocinas y actividad citolítica que promueve la

autotolerancia [287, 288]. Parece que la capacidad supresora de esta molécula está disminuida en otras enfermedades autoinmunes como la artritis reumatoide, y que su aumento provoca una mejoría clínica [289]. Dicho aumento ha sido reportado en respuesta al tratamiento con teriflunomida en pacientes EMRR [252]. En nuestra cohorte, observamos un aumento del número total de monocitos que expresan PD-L1, que podría tener una contribución importante en la modulación de la respuesta anómala que se produce en la EMPP. Esto podría ser causante en parte al efecto anti-inflamatorio que hemos observado en los linfocitos T.

Siguiendo con el análisis de la respuesta inmune innata y, a diferencia de lo observado en respuesta a otros tratamientos en pacientes con EMRR [135, 248, 290], nuestros datos mostraron una ligera disminución en número, aunque no en el porcentaje, de células NK CD56 *bright*, sugiriendo así que estas células no juegan un papel en la respuesta al tratamiento con ocrelizumab en la EMPP.

Aunque la teoría apunta a que la respuesta humoral queda conservada tras el tratamiento con fármacos anti-CD20, la realidad es que esto no se refleja en la práctica clínica. En estudios previos con rituximab en EMRR, se demostró la reducción de la IgM sérica y, en menor medida, de la IgG [291-293], mientras que los niveles de IgA no se vieron afectados [291]. Los datos de seguimiento de los ensayos pivotaes a lo largo de 5,5 años de tratamiento con ocrelizumab evidenciaron la disminución de las concentraciones no solo de IgM, sino también de IgG e IgA. Estas inmunoglobulinas disminuyen a razón de entre un 3% y un 4% al año, permaneciendo sobre el límite bajo de la normalidad en la gran mayoría de los pacientes [294]. En nuestros pacientes ocrelizumab indujo a los 6 meses una disminución de los niveles séricos de IgM, pero sin cambios en los valores de IgG e IgA. La disminución sustancial de IgM, pero no de IgG e IgA, es coherente con la vida media de las células plasmáticas CD20-. Las células plasmáticas de vida corta surgen en zonas extrafoliculares en respuesta a la inmunización primaria, persisten sólo unos días y producen anticuerpos de afinidad relativamente baja, principalmente de isotipo IgM

[295]. Por el contrario, la mayor parte de la IgG e IgA sérica es producida, predominantemente en la médula ósea, principalmente por células plasmáticas de vida larga [296]. Esto ocasiona que los niveles de IgM tienden a permanecer bajos durante períodos más largos que los de IgG y a menudo permanecen bajos después de que el nivel de células B haya vuelto a la normalidad [291]. Los pacientes con EM tratados con anticuerpos anti-CD20 tienen un mayor riesgo de infecciones en comparación con los pacientes tratados con otros tipos de TME [297], y existe una asociación entre la duración del tratamiento, la concentración sérica de IgG e IgM y el riesgo de infección [293]. La incidencia de infecciones graves se mantiene baja y no difiere mucho de la incidencia reportada en otras cohortes de pacientes EM que requieren hospitalización relacionada con infecciones [294]. Ninguno de los pacientes de nuestra serie experimentó infecciones graves durante el primer año de seguimiento, posiblemente debido a que la disminución de los niveles de IgM no parece tener consecuencias graves en pacientes tratados con anti-CD20. Estas complicaciones aparecen más frecuentemente asociadas a bajadas de IgG [293], siendo las más frecuentes las infecciones de tracto urinario y de vías respiratorias. La mayoría se resuelven sin mayor complicación y en muy pocos casos se discontinúa el tratamiento con ocrelizumab [294]. En nuestros pacientes EMPP no se observó bajada de IgG durante el primer año de tratamiento con ocrelizumab, lo cual sustenta el hecho de que ninguno de ellos haya sufrido infecciones graves durante este periodo de seguimiento.

Por último, exploramos los cambios en los niveles de los sNfL. Cada vez hay más datos que apoyan que los niveles de sNfL se asocian con la actividad de la enfermedad y la respuesta al tratamiento en los pacientes con EMRR [241]. En esta línea, observamos una clara disminución de sNfL en los pacientes que mostraban lesiones captantes de gadolinio en RM al inicio del tratamiento. Sin embargo, también se redujeron significativamente los valores de sNfL en más del 50% de los pacientes sin lesiones captantes de gadolinio, pero que mostraban unos niveles basales de sNfL superiores a 10 pg/mL. Esto sugiere que los pacientes EMPP que no reflejan un alto estado inflamatorio en la RM podrían tener cierta actividad inflamatoria que puede ser

modulada tras el tratamiento con ocrelizumab. Precisamente, un estudio recientemente publicado ha confirmado nuestros datos previos del valor de los sNfL para detectar la inflamación en la EMPP, y ha establecido que un valor de corte basal de sNfL de 10,2 pg/mL identifica a los pacientes en mayor riesgo de progresión [298]. Esto es importante puesto que hasta hace poco la RM era considerada la única herramienta para evaluar la actividad de la enfermedad [299] y, aunque es una técnica excelente para identificar la aparición de nuevas lesiones desmielinizantes, su realización en la práctica clínica suele ser anual, lo que puede retrasar la identificación de respondedores subóptimos. El estudio de sNfL podría implementarse de forma seriada en la práctica clínica habitual y facilitar la monitorización temprana de los tratamientos, posibilitando un ajuste precoz de las estrategias terapéuticas.

Estos últimos resultados son los que abrieron la puerta a nuestro segundo trabajo, en el que vimos necesario estudiar los cambios producidos por ocrelizumab en pacientes EMPP en función del estado inflamatorio basal de cada paciente, con la intención de encontrar biomarcadores que identificasen respondedores o predijesen una buena respuesta al mismo.

5.2 DIFERENCIAS EN LA RESPUESTA INMUNOLÓGICA A OCRELIZUMAB EN FUNCIÓN DEL ESTADO INFLAMATORIO BASAL DE LOS PACIENTES EMPP

No todos los pacientes con EMPP pueden ser considerados por igual, ya que esta forma clínica de la enfermedad engloba casos con o sin actividad y con o sin progresión [92]. Además, los ensayos clínicos de rituximab y ocrelizumab en la EMPP no evidencian si ambos fármacos benefician por igual a pacientes con diferente estado inflamatorio. Los análisis de subgrupos del ensayo OLYMPUS, que evaluaron el rituximab en pacientes con EMPP, sugirieron que este fármaco puede tener un mayor beneficio en el control de la progresión de la enfermedad en los pacientes más jóvenes, especialmente en aquellos con lesiones inflamatorias [194]. Sin embargo, los resultados del ensayo ORATORIO con ocrelizumab mostraron que este anticuerpo

anti-CD20 también es eficaz en los pacientes EMPP con un menor estado inflamatorio basal [205], aunque las características basales de los pacientes que participaron en este ensayo clínico fueron similares a las del subgrupo en el que rituximab demostró su eficacia. Por tanto, no queda claro si la diferencia en eficacia depende solo de sus mecanismos de acción, o si ocrelizumab actúa de diferente forma clínica e inmunológica en función del estado inflamatorio del paciente. El estado inflamatorio se utiliza en la clasificación actual de los pacientes con EM progresiva [82], por lo que, para realizar este trabajo, una cohorte de 69 pacientes con EMPP fue clasificada según su nivel de inflamación en función de la presencia (Gd+/inflamatorio) o ausencia (Gd-/no inflamatorio) de lesiones con realce de gadolinio en la RM basal, antes de iniciar tratamiento con ocrelizumab.

Por otro lado, la monitorización de la actividad de la enfermedad durante el tratamiento se lleva a cabo mediante combinación de datos clínicos y paraclínicos [300] que permiten definir el estado del paciente en respuesta al tratamiento. NEDA-3 (del inglés, *no evidence of disease activity-3*) define al respondedor óptimo a una determinada terapia: 1) que no evidencie nuevas lesiones en T2 ni captantes de contraste en imágenes de RM; 2) con datos clínicos que apoyen la ausencia de brotes; y 3) sin aumento de su discapacidad, medida según la escala EDSS [301]. Este estado ha sido utilizado como forma de evaluación en diversos ensayos clínicos y estudios observacionales. Aunque el estado NEDA-3 es difícil de mantener a lo largo de los años [302], se sabe que alcanzar NEDA-3 en el primer año es un factor de buen pronóstico para la respuesta en los años siguientes. En nuestro estudio, al trabajar con pacientes EMPP en los que la aparición de brotes no es frecuente, no hemos hecho uso ni del término ODA (del inglés, *ongoing disease activity*) para definir a los pacientes que progresan, ni del término NEDA-3. De hecho, ninguno de los 69 pacientes EMPP analizados en este trabajo experimentaron 1 brote durante el primer año de seguimiento desde el inicio de ocrelizumab. Al eliminar la aparición de brotes de nuestra definición de estado clínico, estos términos han sido sustituidos por EDA (del inglés, *evidence of disease activity*) y NEDA (menos restrictivo que NEDA-3), respectivamente.

La edad podría ser otro de los factores que influyesen en la eficacia de ocrelizumab puesto que, en el ensayo OLYMPUS con rituximab, los pacientes más beneficiados fueron aquellos con edades inferiores a 51 años [194] y, en el ensayo ORATORIO con ocrelizumab, el rango superior de edad en el reclutamiento fue de 54 años [205]. Sin embargo, no hemos encontrado diferencias al analizar variables inmunológicas en función de la edad en nuestra cohorte, por lo que no hemos incluido este parámetro en nuestra clasificación. Del mismo modo, no encontramos diferencias en cuanto al sexo de los pacientes ni en cuanto a su EDSS basal.

Por tanto, del total de nuestra cohorte, se han analizado y realizado comparaciones entre 4 diferentes grupos de pacientes EMPP: 6 EDA Gd+, 10 NEDA Gd+, 12 EDA Gd- y 41 NEDA Gd-.

En primer lugar, observamos que el número absoluto de linfocitos B de sangre periférica disminuyó drásticamente a los 6 meses de tratamiento con ocrelizumab, independientemente del estado inflamatorio basal del paciente y de la eficacia de respuesta al mismo. Sin embargo tras el tratamiento, en pacientes EDA inflamatorios, el número total de células B fue mayor que en el resto de grupos. Este hecho se produjo principalmente a expensas del número de células B transicionales y de células B productoras de TNF α , indicando una mayor tasa de repoblación de linfocitos B y una rápida diferenciación de células B con características proinflamatorias en este grupo de pacientes. La diferenciación temprana de linfocitos B inmaduros pero activados ya se había descrito en pacientes EMRR tratados con rituximab [276], aunque según lo publicado recientemente dicha repoblación no se asocia con un mayor riesgo de progresión clínica [303]. Nuestros datos en cambio apuntan a que, en la EMPP, la repoblación temprana del repertorio B ocurre principalmente en individuos con progresión de su enfermedad tras la administración de ocrelizumab. La monitorización de esta repoblación B podría valorarse como biomarcador para posibles reajustes de dosis o intervalos del tratamiento.

Al estudiar las poblaciones de linfocitos B, la única diferencia basal observada en pacientes Gd+ respecto a Gd- fue el mayor número de plasmablastos, aunque la significación desapareció al

aplicar el test de Bonferroni. La asociación de los plasmablastos con la inflamación en la EM ha sido documentada en el LCR de pacientes EMRR [304]. Sin embargo nuestros datos, de ser validados en futuros trabajos, pondrían de manifiesto por primera vez el papel de los plasmablastos en la inflamación en la EMPP, así como su posible estudio en sangre periférica. Encontramos además valores aumentados en la proporción relativa de linfocitos B naïve de los pacientes Gd-. Esto podría sugerir alguna función alternativa de los linfocitos B en pacientes EMPP no inflamatorios, como podría ser una mayor presentación antigénica, lo cual tendrá que ser estudiado en futuros trabajos.

De todas las poblaciones de linfocitos T analizadas, sólo las células T CD20+ disminuyeron en número, hecho que ocurrió en los cuatro grupos de pacientes analizados. El grupo EDA Gd+ fue el único que perdió significación tras la aplicación de Bonferroni, probablemente debido al bajo tamaño muestral. Estos datos apuntan a que la reducción de las células T CD20+ puede ser beneficiosa para los pacientes EMPP tratados con ocrelizumab, pero de forma independiente de su estado inflamatorio inicial. La activación de las células T y la producción de citoquinas también se modifican en base al estado inflamatorio del paciente y al tratamiento con TME, incluidos los anti-CD20 [285] pero no hay estudios realizados en EMPP. Por este motivo, aunque no encontramos variaciones en números absolutos, nos pareció importante explorar los cambios en las proporciones de subpoblaciones de linfocitos T. Las variaciones encontradas fueron similares a las reportadas en nuestro primer trabajo pero se limitaron exclusivamente al grupo NEDA Gd-. Estos pacientes mostraron una reducción de las células T CD4+ efectoras (terminalmente diferenciadas y de memoria efectora) y un aumento de las células naïve T CD4+ y T CD8+, así como de los ratios naïve/EM y naïve/TD. Así mismo, se produjo un descenso en la proporción de células T CD8+ que producen IFN γ , demostrando que la respuesta óptima a ocrelizumab en pacientes Gd- está condicionada por la remodelación del compartimento de células T hacia un perfil más tolerogénico. La activación del compartimento de células T por parte de las células B puede desempeñar un papel importante en la patología de la EMPP de

pacientes no inflamatorios y puede ser útil como biomarcador a la hora de reflejar una buena respuesta al tratamiento. En cuanto a los pacientes EDA Gd-, no encontramos una explicación clara para la ausencia de cambios en el repertorio de células T.

Para dilucidar esto, exploramos los cambios producidos por ocrelizumab en células del sistema inmune innato y, de nuevo, sólo se encontraron variaciones significativas en los pacientes NEDA Gd-. Estos mostraron un aumento significativo en el recuento total de monocitos, debido principalmente a los que expresaban la molécula PD-L1 en su superficie. La interacción de PD-L1 con su receptor PD-1 induce autotolerancia y suprime la actividad inflamatoria T [287]. Nuestros datos confirman que tras la administración de ocrelizumab, la regulación al alza de la expresión de PD-L1 por los monocitos contribuye a la remodelación del compartimento de células T observado exclusivamente en este grupo pacientes. Además demostramos, por primera vez en la EMPP, que la depleción de las células B es capaz de revertir la inflamación inducida por las mismas sobre células de la respuesta inmune innata [305].

Como era de esperar según los resultados reportados en nuestro primer trabajo, otra de las diferencias basales encontrada fue la de que los pacientes Gd+ presentaban valores de sNfL más elevados que los pacientes Gd-. De los 4 grupos, el grupo EDA Gd+ tuvo mayores niveles basales de sNfL en comparación con los dos grupos no inflamatorios, y con valores más altos también respecto a NEDA Gd+, pero en este último caso sin significación estadística. Estos datos demuestran que la presencia basal de lesiones que realzan gadolinio en la RM y los sNfL especialmente elevados se asocian en la EMPP con una alta tasa de repoblación de células B, y sugieren de forma contundente que estos pacientes deberían beneficiarse de un retratamiento temprano o de un reajuste de dosis de ocrelizumab. Por el contrario, en los pacientes NEDA Gd+, los bajos recuentos de células B a los 6 meses de tratamiento se asociaron con una reducción significativa de los niveles de sNfL en ese mismo intervalo de tiempo. Por último, en los pacientes no inflamatorios (tanto NEDA como EDA), los niveles de sNfL no cambiaron significativamente

tras el tratamiento con ocrelizumab, a pesar de la reducción de los recuentos de células B o de la respuesta al tratamiento. Esto es importante ya que el sNfL se está proponiendo como un biomarcador de respuesta a un gran número de fármacos en la EM [241] y podría existir una excepción en pacientes con baja actividad inflamatoria, donde su monitorización no estaría revelando una óptima o subóptima respuesta a ocrelizumab.

En lo que respecta a las inmunoglobulinas, en los cuatro grupos de pacientes ocrelizumab indujo una disminución de los niveles séricos de IgM, sin cambios en los valores de IgG, tal y como reportamos en nuestro primer estudio. Así mismo, todos los grupos de pacientes mostraron un aumento de los ratios IgG/IgM e IgA/IgM. La mayoría de las moléculas IgM presentes en el suero son anticuerpos naturales que reaccionan contra antígenos no proteicos, siendo la especificidad antilipídica la más frecuente [144, 306], y la síntesis intratecal de anticuerpos IgM antilipídicos se asocia con un curso agresivo de la EM [145, 306]. Por tanto, la depleción ocasionada por ocrelizumab de las células B que producen estos anticuerpos puede tener un efecto beneficioso directo en la EMPP, lo cual es independiente del estado inflamatorio basal.

Además, nuestros datos contienen resultados interesantes en cuanto a anticuerpos IgA. Los pacientes NEDA Gd- mostraron un aumento de los niveles séricos de esta inmunoglobulina tras el tratamiento con ocrelizumab, y valores elevados del ratio IgA/IgG. La IgA, producida principalmente en la superficie de las mucosas, funciona como un mediador crítico de la homeostasis intestinal [307] y, las células plasmáticas productoras de IgA reactiva frente a la microbiota intestinal pueden migrar a los órganos periféricos, con un papel potencial en las enfermedades autoinmunes extraintestinales [308]. En la EM, las células IgA específicas de la microbiota intestinal se consideran un mediador sistémico de la enfermedad que se comporta como un biomarcador informativo durante la neuroinflamación activa [309]. En el modelo experimental de la enfermedad, la migración de las células plasmáticas productoras de IgA desde la mucosa intestinal al SNC ha demostrado reducir la actividad de la enfermedad gracias

a la producción de IL-10 por estas células [310]. Aunque nuestros datos son muy preliminares, futuros trabajos demostrarán la implicación de la IgA y de la microbiota en la respuesta al tratamiento con ocrelizumab en la EMPP.

Aunando los datos obtenidos en ambos estudios, se ha demostrado que la eliminación de células CD20+ por parte de ocrelizumab ocasiona una redistribución tolerogénica de poblaciones efectoras y reguladoras. La inflamación basal de los pacientes podría determinar las vías inmunológicas que impulsan la respuesta a ocrelizumab en la EMPP pero, independientemente de ello, la eliminación de las células B puede modificar los mecanismos subyacentes, contribuyendo a la mejoría del curso de la enfermedad y siendo eficaz en la mayoría de los pacientes.

6 CONCLUSIONES

- 1) En pacientes EMPP, ocrelizumab induce una drástica depleción del número absoluto de linfocitos B, debido principalmente a la reducción de las células B naïve y B de memoria y a las células B secretoras de TNF α , IL-6, IL-10 y GM-CSF.
- 2) Respecto a los porcentajes sobre linfocitos B, se observa un aumento de células transicionales y plasmablastos y una bajada relativa de células naïve. También se produce una disminución de células B secretoras de TNF α , y un aumento de las productoras de IL-6, IL-10 y GM-CSF, a los 6 meses de tratamiento.
- 3) En el compartimento T se aprecia una bajada del número de células T CD20+ y un aumento del ratio entre poblaciones naïve y efectoras, tanto T CD4+ como T CD8+, favoreciendo un perfil tolerogénico.
- 4) El tratamiento con ocrelizumab también induce un aumento del número de monocitos que expresan PD-L1, confirmando el efecto tolerogénico de la depleción de linfocitos B.
- 5) Esta depleción de linfocitos B se asocia con una bajada de sNfL tanto en pacientes que presentan lesiones captantes de gadolinio en la RM basal, como en aquellos sin tales lesiones pero con valores basales de sNfL superiores a 10 pg/mL.
- 6) La eliminación de los linfocitos B tiene distintos efectos sobre el sistema inmunitario dependiendo de la naturaleza inflamatoria de la enfermedad, medida según la presencia o ausencia de lesiones captantes de gadolinio en la RM basal.
- 7) En los pacientes inflamatorios la respuesta subóptima al fármaco se asocia con una repoblación más rápida de los linfocitos B, sobre todo de células B transicionales y productoras de TNF α . Esto correlaciona con la presencia de niveles basales elevados de sNfL, que además no descienden con el tratamiento.
- 8) La respuesta óptima se asocia en los pacientes inflamatorios con una bajada drástica de todas las subpoblaciones B y con un descenso de los niveles de sNfL hasta niveles normales. No se ha encontrado ninguna otra asociación entre subpoblaciones celulares o factores solubles con la respuesta a tratamiento de este grupo de pacientes.

- 9) En los pacientes no inflamatorios, los niveles de sNfL y la tasa de repoblación B no se asocian con la respuesta al tratamiento con ocrelizumab.
- 10) En estos pacientes, la respuesta óptima a ocrelizumab se asocia a la redistribución de los compartimentos de células T y de monocitos, dirigidos hacia un perfil más tolerogénico, y a una expansión de la IgA en suero.
- 11) La respuesta a ocrelizumab en pacientes con EMPP inflamatoria está mediada principalmente por una depleción mantenida de los linfocitos B, asociada a una normalización de los sNfL. En los no inflamatorios, la respuesta al fármaco viene marcada principalmente por la tolerización inducida en otros compartimentos celulares.
- 12) Estos datos muestran dos mecanismos inmunológicos distintos que predominan en la fisiopatología de la EMPP en estos pacientes. En un futuro, la monitorización de dichos mecanismos podría utilizarse como biomarcador de respuesta al tratamiento con ocrelizumab.

7 BIBLIOGRAFÍA

1. Dobson R, Giovannoni G. Multiple sclerosis - a review. *Eur J Neurol.* 2019;26(1):27-40.
2. Walton C, King R, Rechtman L, Kaye W, Leray E, Marrie RA, et al. Rising prevalence of multiple sclerosis worldwide: Insights from the Atlas of MS, third edition. *Mult Scler.* 2020;26(14):1816-1821.
3. Alfredsson L, Olsson T. Lifestyle and Environmental Factors in Multiple Sclerosis. *Cold Spring Harb Perspect Med.* 2019;9(4):a028944.
4. Dendrou CA, Fugger L, Friese MA. Immunopathology of multiple sclerosis. *Nat Rev Immunol.* 2015;15(9):545-558.
5. Krupp LB, Tardieu M, Amato MP, Banwell B, Chitnis T, Dale RC, et al. International Pediatric Multiple Sclerosis Study Group criteria for pediatric multiple sclerosis and immune-mediated central nervous system demyelinating disorders: revisions to the 2007 definitions. *Mult Scler.* 2013;19(10):1261-1267.
6. Bermel RA, Rae-Grant AD, Fox RJ. Diagnosing multiple sclerosis at a later age: more than just progressive myelopathy. *Mult Scler.* 2010;16(11):1335-1340.
7. Lassmann H, van Horssen J, Mahad D. Progressive multiple sclerosis: pathology and pathogenesis. *Nat Rev Neurol.* 2012;8(11):647-656.
8. Thompson AJ, Baranzini SE, Geurts J, Hemmer B, Ciccarelli O. Multiple sclerosis. *Lancet.* 2018;391(10130):1622-1636.
9. Picón C, Tejada-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.
10. Hauser SL, Cree BAC. Treatment of Multiple Sclerosis: A Review. *Am J Med.* 2020;133(12):1380-1390.
11. Carswell R, Polman CH. Pathological anatomy: Illustrations of the elementary forms of disease. London: Longman, Orme, Brown, Green and Longman. 1838.

12. Cruveilhier J. Anatomie pathologique du corps humain; descriptions avec figures lithographiées et coloriées; des diverses alterations morbides dont le corps humain est susceptible. Paris: JB Bailliere. 1841.
13. Charcot JM. Histologie de la sclerose en plaques. Gazette des hopitaux (Paris). 1868;41:554-566.
14. Pierre M. La sclerose en plaques et maladies infectieuses. La Progres Medicale. 1884;12:287-289.
15. Rivers TM, Schwentker FF. Encephalomyelitis accompanied by myelin destruction experimentally produced in monkeys. J Exp Med. 1935;61(5):689-702.
16. Quincke HI. Die Lumbar punktion des Hydrocephalus. Klin Wochenschr. 1891;20:929-933.
17. Kabat EA, Moore DH, Landow H. An Electrophoretic Study of the Protein Components in Cerebrospinal Fluid and Their Relationship to the Serum Proteins. The Journal of Clinical Investigation. 1942;21:571-577.
18. Kurtzke JF. A New Scale for Evaluating Disability in Multiple Sclerosis. Neurology. 1955;5:580-583.
19. Kurtzke JF. Rating neurologic impairment in multiple sclerosis: an expanded disability status scale (EDSS). Neurology. 1983;33:1444-1452.
20. Millar JH, Allison RS. Familial incidence of disseminated sclerosis in Northern Ireland. Ulster Med J. 1954;23(Suppl. 2):29-92.
21. Schumacher GA, Beebe G, Kibler RF, Kurland LT, Kurtzke JF, Mcdowell F, et al. Problems of experimental trials of therapy in multiple sclerosis: report by the panel on the evaluation of experimental trials of therapy in multiple sclerosis. Ann N Y Acad Sci. 1965;122:552-568.
22. 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.

23. Goodkin DE, Doolittle TH, Hauser SS, Ransohoff RM, Roses AD, Rudick RA. Diagnostic criteria for multiple sclerosis research involving multiply affected families. *Arch Neurol.* 1991;48(8):805-807.
24. Mc Donald WI, Edan G, Goodking D, Hartung HP, Lublin FD, Mc Farland HF, et al. Recommended diagnostic criteria for Multiple Sclerosis: guidelines from The International Panel on the diagnosis of MS. *Annals of Neurology* 2001;50:121-127.
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(2):162-173.
26. The Multiple Sclerosis International Federation, Atlas of MS, 3rd Edition, September 2020. Available online at: <https://www.msif.org/wp-content/uploads/2020/12/Atlas-3rd-Edition-Epidemiology-report-EN-updated-30-9-20.pdf>
27. Schwenkenbecher P, Wurster U, Konen FF, Gingele S, Sühs KW, Wattjes MP, et al. Impact of the McDonald Criteria 2017 on Early Diagnosis of Relapsing-Remitting Multiple Sclerosis. *Front Neurol.* 2019;10:188.
28. Kingwell E, Leray E, Zhu F, Petkau J, Edan G, Oger J, et al. Multiple sclerosis: effect of beta interferon treatment on survival. *Brain.* 2019;142(5):1324-1333.
29. Simpson S Jr, Wang W, Otahal P, Blizzard L, van der Mei IAF, Taylor BV. 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.
30. Tao C, Simpson S Jr, van der Mei I, Blizzard L, Havrdova E, Horakova D, et al. Higher latitude is significantly associated with an earlier age of disease onset in multiple sclerosis. *Journal of Neurology, Neurosurgery & Psychiatry.* 2016;87:1343-1349.
31. Browne P, Chandraratna D, Angood C, Tremlett H, Baker C, Taylor BV, et al. Atlas of Multiple Sclerosis 2013: A growing global problem with widespread inequity. *Neurology.* 2014;83(11):1022-1024.

32. Voskuhl RR, Sawalha AH, Itoh Y. Sex chromosome contributions to sex differences in multiple sclerosis susceptibility and progression. *Multiple Sclerosis*. 2018;24(1):22-31.
33. Oliveras RC, Aragonés J, Mercadé J. Estudio de la incidencia relativa y absoluta de la esclerosis múltiple en nuestra región. *An Med Clin (Barc)*. 1968;54:13-15.
34. Fernandez O, Izquierdo G, Campos VM, Pastor M. Epidemiología de la esclerosis múltiple en la provincia de Málaga. Estudio de prevalencia. *Neurologia*. 1986;1:3-5.
35. Fernández O, Luque G, San Román C, Bravo M, Dean G. The prevalence of multiple sclerosis in the Sanitary District of Velez-Malaga, southern Spain. *Neurology*. 1994;44:425-429.
36. Uría DF, Abad P, Calatayud MT, Virgala P, Díaz A, Chamizo C, et al. Multiple sclerosis in Gijon health district, Asturias, northern Spain. *Acta Neurol Scand* 1997;96:375-379.
37. Bufill E, Blesa R, Galán I, Dean G. Prevalence of multiple sclerosis in the region of Osona, Catalonia, northern Spain. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. 1995;58:577-581.
38. Fernández O, Fernández V, Guerrero M, León A, López-Madrona JC, Alonso A, et al. Multiple sclerosis prevalence in Malaga, Southern Spain estimated by the capture-recapture method. *Mult Scler*. 2012;18:372-376.
39. Otero-Romero S, Roura P, Sola J, Altimiras J, Sastre-Garriga J, Nos C, et al. Increase in the prevalence of multiple sclerosis over a 17-year period in Osona, Catalonia, Spain. *Mult Scler*. 2013;19:245-248.
40. Fraga-González C. Epidemiología de la esclerosis múltiple en la ciudad de Ourense [tesis doctoral]. Vigo: Universidad de Vigo; 2018.
41. 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.
42. Olsson T, Barcellos LF, Alfredsson L. Interactions between genetic, lifestyle and environmental risk factors for multiple sclerosis. *Nat Rev Neurol*. 2017;13(1):25-36.

43. Lindsey JW. Familial recurrence rates and genetic models of multiple sclerosis. *Am J Med Genet A*. 2005;135(1):53-58.
44. Hansen T, Skytthe A, Stenager E, Petersen HC, Brønnum-Hansen H, Kyvik KO. Concordance for multiple sclerosis in Danish twins: an update of a nationwide study. *Mult Scler*. 2005;11(5):504-510.
45. Patsopoulos NA, Barcellos LF, Hintzen RQ, Schaefer C, van Duijn CM, Noble JA, et al. Fine-mapping the genetic association of the major histocompatibility complex in multiple sclerosis: HLA and non-HLA effects. *PLoS Genet*. 2013;9(11):e1003926.
46. Moutsianas L, Jostins L, Beecham AH, Dilthey AT, Xifara DK, Ban M, et al. Class II HLA interactions modulate genetic risk for multiple sclerosis. *Nat Genet*. 2015;47(10):1107-1113.
47. International Multiple Sclerosis Genetics Consortium, Hafler DA, Compston A, Sawcer S, Lander ES, Daly MJ, et al. Risk alleles for multiple sclerosis identified by a genomewide study. *N Engl J Med*. 2007;357(9):851-862.
48. Gregory AP, Dendrou CA, Attfield KE, Haghikia A, Xifara DK, Butter F, et al. TNF receptor 1 genetic risk mirrors outcome of anti-TNF therapy in multiple sclerosis. *Nature*. 2012;488(7412):508-511.
49. Taşan M, Musso G, Hao T, Vidal M, MacRae CA, Roth FP. Selecting causal genes from genome-wide association studies via functionally coherent subnetworks. *Nat Methods*. 2015;12(2):154-159.
50. Steri M, Orrù V, Idda ML, Pitzalis M, Pala M, Zara I, et al. Overexpression of the Cytokine BAFF and Autoimmunity Risk. *N Engl J Med*. 2017;376(17):1615-1626.
51. Ha M, Kim VN. Regulation of microRNA biogenesis. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2014;15(8):509-524.

52. Regev K, Healy BC, Paul A, Diaz-Cruz C, Mazzola MA, Raheja R, et al. Identification of MS-specific serum miRNAs in an international multicenter study. *Neurol Neuroimmunol Neuroinflamm.* 2018;5(5):e491.
53. Sáenz-Cuesta M, Alberro A, Muñoz-Culla M, Osorio-Querejeta I, Fernandez-Mercado M, Lopetegui I, et al. The First Dose of Fingolimod Affects Circulating Extracellular Vesicles in Multiple Sclerosis Patients. *Int J Mol Sci.* 2018;19(8):2448.
54. Mameli G, Arru G, Caggiu E, Niegowska M, Leoni S, Madeddu G, et al. Natalizumab Therapy Modulates miR-155, miR-26a and Proinflammatory Cytokine Expression in MS Patients. *PLoS One.* 2016;11(6):e0157153.
55. Castro K, Casaccia P. Epigenetic modifications in brain and immune cells of multiple sclerosis patients. *Mult Scler.* 2018;24(1):69-74.
56. Kular L, Liu Y, Ruhrmann S, Zheleznyakova G, Marabita F, Gomez-Cabrero D, 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.
57. Pedre X, Mastronardi F, Bruck W, López-Rodas G, Kuhlmann T, Casaccia P. Changed histone acetylation patterns in normal-appearing white matter and early multiple sclerosis lesions. *J Neurosci.* 2011;31(9):3435-3445.
58. Jornevik K, Cortese M, Healy BC, Kuhle J, Mina MJ, Leng Y, et al. Longitudinal analysis reveals high prevalence of Epstein-Barr virus associated with multiple sclerosis. *Science.* 2022;375(6578):296-301.
59. Handel AE, Williamson AJ, Disanto G, Handunnetthi L, Giovannoni G, Ramagopalan SV. An updated meta-analysis of risk of multiple sclerosis following infectious mononucleosis. *PLoS ONE.* 2010;5(9):e12496.
60. Lanz TV, Brewer RC, Ho PP, Moon JS, Jude KM, Fernandez D, et al. Clonally expanded B cells in multiple sclerosis bind EBV EBNA1 and GlialCAM. *Nature.* 2022;603(7900):321-327.

61. Sundström P, Nyström M, Ruuth K, Lundgren E. Antibodies to specific EBNA-1 domains and HLA DRB1*1501 interact as risk factors for multiple sclerosis. *J Neuroimmunol.* 2009;215(1–2):102-107.
62. Sundqvist E, Sundström P, Lindén M, Hedström AK, Aloisi F, Hillert J, et al. Epstein-Barr virus and multiple sclerosis: interaction with HLA. *Genes Immun.* 2012;13(1):14-20.
63. Zhou Y, Zhu G, Charlesworth JC, Simpson S, Rubicz R, Göring HH, et al. Genetic loci for Epstein-Barr virus nuclear antigen-1 are associated with risk of multiple sclerosis. *Mult Scler.* 2016;22(13):1655-1664.
64. Salvetti M, Giovannoni G, Aloisi F. Epstein-Barr virus and multiple sclerosis. *Curr Opin Neurol.* 2009;22(3):201-206.
65. Serafini B, Rosicarelli B, Franciotta D, Magliozzi R, Reynolds R, Cinque P, et al. Dysregulated Epstein-Barr virus infection in the multiple sclerosis brain. *J Exp Med.* 2007;204(12):2899-2912.
66. Pierrot-Deseilligny C, Souberbielle J-C. Vitamin D and multiple sclerosis: An update. *Mult Scler Relat Disord.* 2017;14:35–45.
67. Farez MF, Mascanfroni ID, Méndez-Huergo SP, Yeste A, Murugaiyan G, Garo LP, et al. Melatonin Contributes to the Seasonality of Multiple Sclerosis Relapses. *Cell.* 2015;162(6):1338-1352.
68. 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.
69. Berer K, Gerdes LA, Cekanaviciute E, Jia X, Xiao L, Xia Z, et al. Gut microbiota from multiple sclerosis patients enables spontaneous autoimmune encephalomyelitis in mice. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2017;114(40):10719-10724.
70. Cekanaviciute E, Yoo BB, Runia TF, Debelius JW, Singh S, Nelson CA, et al. Gut bacteria from multiple sclerosis patients modulate human T cells and exacerbate symptoms in mouse models. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2017;114(40):10713-10718.

71. Erny D, Hrabě de Angelis AL, Jaitin D, Wieghofer P, Staszewski O, David E, et al. Host microbiota constantly control maturation and function of microglia in the CNS. *Nat Neurosci.* 2015;18(7):965-977.
72. Rothhammer V, Mascanfroni ID, Bunse L, Takenaka MC, Kenison JE, Mayo L, et al. Type I interferons and microbial metabolites of tryptophan modulate astrocyte activity and central nervous system inflammation via the aryl hydrocarbon receptor. *Nat Med.* 2016;22(6):586-597.
73. Pérez-Pérez S, Domínguez-Mozo MI, Alonso-Gómez A, Medina S, Villarrubia N, Fernández-Velasco JI, et al. Acetate correlates with disability and immune response in multiple sclerosis. *PeerJ.* 2020;8:e10220.
74. Dominguez-Mozo MI, Perez-Perez S, Villarrubia N, Costa-Frossard L, Fernandez-Velasco JI, Ortega-Madueño I, 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.
75. Cuello JP, Martínez Ginés ML, García Domínguez JM, Tejeda-Velarde A, Lozano Ros A, Higuera Y, et al. Short-chain fatty acids during pregnancy in multiple sclerosis: A prospective cohort study. *Eur J Neurol.* 2022;29(3):895-900.
76. Palacios N, Alonso A, Brønnum-Hansen H, Ascherio A. Smoking and increased risk of multiple sclerosis: parallel trends in the sex ratio reinforce the evidence. *Ann Epidemiol.* 2011;21(7):536-542.
77. Hedström AK. Smoking and disability progression in multiple sclerosis. *Expert Rev Neurother.* 2020;20(8):739-741.
78. Marrie RA, Rudick R, Horwitz R, et al. Vascular comorbidity is associated with more rapid disability progression in multiple sclerosis. *Neurology.* 2010;74:1041-1047.
79. Hedström AK, Bäärnhielm M, Olsson T, Alfredsson L. Tobacco smoking, but not Swedish snuff use, increases the risk of multiple sclerosis. *Neurology.* 2009;73(9):696-701.

80. Dopkins N, Nagarkatti PS, Nagarkatti M. The role of gut microbiome and associated metabolome in the regulation of neuroinflammation in multiple sclerosis and its implications in attenuating chronic inflammation in other inflammatory and autoimmune disorders. *Immunology*. 2018;154:178-185.
81. 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.
82. 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.
83. Okuda DT, Mowry EM, Beheshtian A, Waubant E, Baranzini SE, Goodin DS, et al. Incidental MRI anomalies suggestive of multiple sclerosis: The radiologically isolated syndrome. *Neurology*. 2009;72(9):800-805.
84. Miller DH, Chard DT, Ciccarelli O. Clinically isolated syndromes. *Lancet Neurol*. 2012;11(2):157-169.
85. Klineova S, Lublin FD. Clinical Course of Multiple Sclerosis. *Cold Spring Harb Perspect Med*. 2018;8(9):a028928.
86. Lublin FD, Baier M, Cutter G. Effect of relapses on development of residual deficit in multiple sclerosis. *Neurology*. 2003;61:1528-1532.
87. 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;59:1006-1010.
88. Rovaris M, Confavreux C, Furlan R, Kappos L, Comi G, Filippi M. Secondary progressive multiple sclerosis: Current knowledge and future challenges. *Lancet Neurol*. 2006;5:343-354.

89. Katz Sand I, Krieger S, Farrell C, Miller AE. Diagnostic uncertainty during the transition to secondary progressive multiple sclerosis. *Mult Scler*. 2014;20:1654-1657.
90. Ransohoff RM, Hafler DA, Lucchinetti CF. Multiple sclerosis—A quiet revolution. *Nat Rev Neurol*. 2015;11:134-142.
91. Kremenchutzky M, Rice GP, 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;129:584-594.
92. Lublin FD. New multiple sclerosis phenotypic classification. *Eur Neurol*. 2014;72(Suppl 1):1-5.
93. Kappos L, Wolinsky JS, Giovannoni G, Arnold DL, Wang Q, Bernasconi C, 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.
94. Wolinsky JS, Montalban X, Hauser SL, Giovannoni G, Vermersch P, Bernasconi C, et al. Evaluation of no evidence of progression or active disease (NEPAD) in patients with primary progressive multiple sclerosis in the ORATORIO trial. *Ann Neurol*. 2018;84(4):527-536.
95. McDonald WI, Compston A, Edan G, Goodkin D, Hartung HP, Lublin FD, 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.
96. Polman CH, Reingold SC, Banwell B, Clanet M, Cohen JA, Filippi M, et al. Diagnostic criteria for multiple sclerosis: 2010 revisions to the McDonald criteria. *Ann Neurol*. 2011;69(2):292-302.

97. Tourtellotte WW, Potvin AR, Fleming JO, Murthy KN, Levy J, Syndulko K, et al. Multiple sclerosis: measurement and validation of central nervous system IgG synthesis rate. *Neurology*. 1980;30(3):240-244.
98. 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.
99. Tibbling G, Link H, Ohman 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.
100. Villar LM, Masjuan J, Sádaba MC, González-Porqué P, Plaza J, Bootello A, et al. Early differential diagnosis of multiple sclerosis using a new oligoclonal band test. *Arch Neurol*. 2005;62(4):574-577.
101. Nuwer M. Potenciales evocados en la esclerosis múltiple. In: *Esclerosis múltiple Bases clínicas y patológicas*. Raine C. McFarland H, Tourtellote WW eds. 1997;43-45.
102. Lassmann H, Brück W, Lucchinetti CF. The immunopathology of multiple sclerosis: an overview. *Brain Pathol*. 2007;17(2):210-218.
103. Filippi M, Bar-Or A, Piehl F, Preziosa P, Solari A, Vukusic S, et al. Multiple sclerosis. *Nat Rev Dis Primers*. 2018;4(1):43.
104. Lassmann H. *Multiple Sclerosis Pathology*. Cold Spring Harb Perspect Med. 2018 01;8(3):a028936.
105. Prineas JW, Barnard RO, Kwon EE, Sharer LR, Cho ES. Multiple sclerosis: remyelination of nascent lesions. *Ann Neurol*. 1993;33(2):137-151.
106. Lassmann H. Pathogenic Mechanisms Associated With Different Clinical Courses of Multiple Sclerosis. *Front Immunol*. 2018;9:3116.

107. Kutzelnigg A, Lucchinetti CF, Stadelmann C, Brück W, Rauschka H, Bergmann M, et al. Cortical demyelination and diffuse white matter injury in multiple sclerosis. *Brain*. 2005;128(11):2705-2712.
108. Howell OW, Reeves CA, Nicholas R, Carassiti D, Radotra B, Gentleman SM, et al. Meningeal inflammation is widespread and linked to cortical pathology in multiple sclerosis. *Brain*. 2011;134(9):2755-2771.
109. Magliozzi R, Howell O, Vora A, Serafini B, Nicholas R, Puopolo M, et al. Meningeal B-cell follicles in secondary progressive multiple sclerosis associate with early onset of disease and severe cortical pathology. *Brain*. 2007;130(4):1089-1104.
110. 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(5):e151683.
111. Bjornevik K, Cortese M, Healy BC, Kuhle J, Mina MJ, Leng Y, et al. Longitudinal analysis reveals high prevalence of Epstein-Barr virus associated with multiple sclerosis. *Science*. 2022;375(6578):296-301.
112. 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.
113. 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.
114. Zamvil S, Nelson P, Trotter J, Mitchell D, Knobler R, Fritz R, et al. T-cell clones specific for myelin basic protein induce chronic relapsing paralysis and demyelination. *Nature*. 1985;317(6035):355-358.
115. de Graaf MT, Smitt PAES, Luitwieler RL, van Velzen C, van den Broek PDM, Kraan J, et al. Central memory CD4+ T cells dominate the normal cerebrospinal fluid. *Cytometry B Clin Cytom*. 2011;80(1):43-50.

116. 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.
117. Jilek S, Schluep M, Rossetti AO, Guignard L, Le Goff G, Pantaleo G, et al. CSF enrichment of highly differentiated CD8+ T cells in early multiple sclerosis. *Clin Immunol.* 2007;123(1):105-113.
118. Sallusto F, Lenig D, Förster R, Lipp M, Lanzavecchia A. Two subsets of memory T lymphocytes with distinct homing potentials and effector functions. *Nature.* 1999;401(6754):708-712.
119. Bromley SK, Thomas SY, Luster AD. Chemokine receptor CCR7 guides T cell exit from peripheral tissues and entry into afferent lymphatics. *Nat Immunol.* 2005;6(9):895-901.
120. Kaskow BJ, Baecher-Allan C. Effector T Cells in Multiple Sclerosis. *Cold Spring Harb Perspect Med.* 2018 02;8(4):a029025.
121. Stojić-Vukanić Z, Pilipović I, Vujnović I, Nacka-Aleksić M, Petrović R, Arsenović-Ranin N, et al. GM-CSF-Producing Th Cells in Rats Sensitive and Resistant to Experimental Autoimmune Encephalomyelitis. *PLoS One.* 2016;11(11):e0166498.
122. 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.
123. Miyara M, Gorochov G, Ehrenstein M, Musset L, Sakaguchi S, Amoura Z. Human FoxP3+ regulatory T cells in systemic autoimmune diseases. *Autoimmun Rev.* 2011;10(12):744-755.
124. Zhang X, Zhang X, Zhuang L, Xu C, Li T, Zhang G, et al. Decreased regulatory T-cell frequency and interleukin-35 levels in patients with rheumatoid arthritis. *Exp Ther Med.* 2018;16(6):5366-5372.
125. Danikowski KM, Jayaraman S, Prabhakar BS. Regulatory T cells in multiple sclerosis and myasthenia gravis. *J Neuroinflammation.* 2017;14(1):117.

126. 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.
127. Venken K, Hellings N, Thewissen M, Somers V, Hensen K, Rummens J-L, 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.
128. Astier AL, Hafler DA. Abnormal Tr1 differentiation in multiple sclerosis. *J Neuroimmunol.* 2007;191(1-2):70-78.
129. Friese MA, Fugger L. Autoreactive CD8+ T cells in multiple sclerosis: a new target for therapy? *Brain J Neurol.* 2005;128(8):1747-1763.
130. Frischer JM, Bramow S, Dal-Bianco A, Lucchinetti CF, Rauschka H, Schmidbauer M, et al. The relation between inflammation and neurodegeneration in multiple sclerosis brains. *Brain.* 2009;132(5):1175-1789.
131. Höftberger R, Aboul-Enein F, Brueck W, Lucchinetti C, Rodriguez M, Schmidbauer M, 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.
132. Denic A, Wootla B, Rodriguez M. CD8(+) T cells in multiple sclerosis. *Expert Opin Ther Targets.* 2013;17(9):1053-1066.
133. Malmeström C, Lycke J, Haghighi S, Andersen O, Carlsson L, Wadenvik H, 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.
134. 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.

135. 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(10):1317-1327.
136. Sádaba MC, Tzartos J, Paíno C, García-Villanueva M, Alvarez-Cermeño JC, Villar LM, et al. Axonal and oligodendrocyte-localized IgM and IgG deposits in MS lesions. *J Neuroimmunol.* 2012;247(1–2):86-94.
137. Monaco S, Nicholas R, Reynolds R, Magliozzi R. Intrathecal Inflammation in Progressive Multiple Sclerosis. *Int J Mol Sci.* 2020;21(21):8217.
138. 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;136:3596-3608.
139. Bible E. Multiple sclerosis: Atacicept increases relapse rates in multiple sclerosis. *Nat Rev Neurol.* 2014;10(4):182.
140. Piccio L, Naismith RT, Trinkaus K, Klein RS, Parks BJ, Lyons JA, et al. Changes in B- and T-lymphocyte and chemokine levels with rituximab treatment in multiple sclerosis. *Arch Neurol.* 2010;67(6):707-714.
141. Harp CT, Lovett-Racke AE, Racke MK, Frohman EM, Monson NL. Impact of myelin-specific antigen presenting B cells on T cell activation in multiple sclerosis. *Clin Immunol.* 2008;128(3):382-391.
142. Li R, Patterson KR, Bar-Or A. Reassessing B cell contributions in multiple sclerosis. *Nat Immunol.* 2018;19(7):696-707.
143. Li R, Rezk A, Miyazaki Y, Hilgenberg E, Touil H, Shen P, et al. Proinflammatory GM-CSF-producing B cells in multiple sclerosis and B cell depletion therapy. *Sci Transl Med.* 2015;7(310):310ra166.

144. Villar LM, Sádaba MC, Roldán E, Masjuan J, González-Porqué P, Villarrubia N, et al. Intrathecal synthesis of oligoclonal IgM against myelin lipids predicts an aggressive disease course in MS. *J Clin Invest*. 2005;115(1):187-194.
145. 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(5):e1047.
146. Brück W, Sommermeier N, Bergmann M, Zettl U, Goebel HH, Kretzschmar HA, et al. Macrophages in multiple sclerosis. *Immunobiology*. 1996;195(4-5):588-600.
147. Yamasaki R, Lu H, Butovsky O, Ohno N, Rietsch AM, Cialic R, et al. Differential roles of microglia and monocytes in the inflamed central nervous system. *J Exp Med*. 2014;211(8):1533-1549.
148. Shapouri-Moghaddam A, Mohammadian S, Vazini H, Taghadosi M, Esmaili SA, Mardani F, et al. Macrophage plasticity, polarization, and function in health and disease. *J Cell Physiol*. 2018;233(9):6425-6440.
149. Labzin LI, Heneka MT, Latz E. Innate Immunity and Neurodegeneration. *Annu Rev Med*. 2018;69:437-449.
150. Chen Z, Jalabi W, Hu W, Park H-J, Gale JT, Kidd GJ, et al. Microglial displacement of inhibitory synapses provides neuroprotection in the adult brain. *Nat Commun*. 2014;5:4486.
151. Schleinitz N, Vély F, Harlé J-R, Vivier E. Natural killer cells in human autoimmune diseases. *Immunology*. 2010;131(4):451-458.
152. Saraste M, Irjala H, Airas L. Expansion of CD56Bright natural killer cells in the peripheral blood of multiple sclerosis patients treated with interferon-beta. *Neurol. Sci*. 2007;28:121-126.

153. Bielekova B, Catalfamo M, Reichert-Scrivner S, Packer A, Cerna M, Waldmann TA, et al. Regulatory CD56(bright) natural killer cells mediate immunomodulatory effects of IL-2/Ralpha-targeted therapy (daclizumab) in multiple sclerosis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2006;103:5941-5946.
154. Gross CC, Ahmetshahic D, Ruck T, Schulte-Mecklenbeck A, Schwarte K, Jorgens S, et al. Alemtuzumab treatment alters circulating innate immune cells in multiple sclerosis. *Neurol Neuroimmunol Neuroinflamm.* 2016;3:e289.
155. Johnson TA, Evans BL, Durafourt BA, Blain M, Lapierre Y, Bar-Or A, et al. Reduction of the peripheral blood CD56(bright) NK lymphocyte subset in FTY720-treated multiple sclerosis patients. *J. Immunol.* 2011;187:570-579.
156. Moreno-Torres I, González-García C, Marconi M, García-Grande A, Rodríguez-Esparragoza L, Elvira V, et al. Immunophenotype and Transcriptome Profile of Patients With Multiple Sclerosis Treated With Fingolimod: Setting Up a Model for Prediction of Response in a 2-Year Translational Study. *Front Immunol.* 2018;9:1693.
157. Rodríguez-Martín E, Picón C, Costa-Frossard L, Alenda R, De La Maza SS, Roldán E, et al. Natural killer cell subsets in cerebrospinal fluid of patients with multiple sclerosis. *Clin. Exp. Immunol.* 2015;180:243-249.
158. Galetta SL, Markowitz C, Lee AG. Immunomodulatory agents for the treatment of relapsing multiple sclerosis: a systematic review. *Arch Intern Med.* 2002;162(19):2161-2169.
159. Kieseier BC. The mechanism of action of interferon-beta in relapsing multiple sclerosis. *CNS Drugs.* 2011;25(6):491-502.
160. Paty DW, Li DK. Interferon beta-1b is effective in relapsing-remitting multiple sclerosis. II. MRI analysis results of a multicenter, randomized, double-blind, placebo-controlled trial. UBC MS/MRI Study Group and the IFNB Multiple Sclerosis Study Group. *Neurology.* 1993;43(4):662-667.

161. Kappos L, Kuhle J, Multanen J, Kremenchutzky M, Verdun di Cantogno E, Cornelisse P, et al. Factors influencing long-term outcomes in relapsing-remitting multiple sclerosis: PRISMS-15. *Journal of neurology neurosurgery and psychiatry*. 2015;86(11):1202-1207.
162. Neuhaus O, Farina C, Wekerle H, Hohlfeld R. Mechanisms of action of glatiramer acetate in multiple sclerosis. *Neurology*. 2001;56(6):702-708.
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.
164. Cadavid D, Wolansky LJ, Skurnick J, Lincoln J, Cheriyan J, Szczepanowski K, 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.
165. Mandala S, Hajdu R, Bergstrom J, Quackenbush E, Xie J, Milligan J, et al. Alteration of lymphocyte trafficking by sphingosine-1-phosphate receptor agonists. *Science*. 2002;296(5566):346-349.
166. Cohen JA, Barkhof F, Comi G, Hartung HP, Khatri BO, Montalban X, et al. Oral fingolimod or intramuscular interferon for relapsing multiple sclerosis. *N Engl J Med*. 2010;362(5):402-415.
167. Lublin F, Miller DH, Freedman MS, Cree BAC, Wolinsky JS, Weiner H, et al. Oral fingolimod in primary progressive multiple sclerosis (INFORMS): a phase 3, randomised, double-blind, placebo-controlled trial. *Lancet*. 2016;387(10023):1075-1084.
168. Laroni A, Brogi D, Morra VB, Guidi L, Pozzilli C, Comi G, et al. Safety of the first dose of fingolimod for multiple sclerosis: results of an open-label clinical trial. *BMC neurology*. 2014;14:65.
169. Cohen JA, Comi G, Selmaj KW, Bar-Or A, Arnold DL, Steinman L, 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 neurology*. 2019;18(11):1021-1033.
170. Kappos L, Fox RJ, Burcklen M, Freedman MS, Havrdová EK, Hennessy B, 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.
171. Kappos L, Bar-Or A, Cree BAC, Fox RJ, Giovannoni G, Gold R, et al. Siponimod versus placebo in secondary progressive multiple sclerosis (EXPAND): a double-blind, randomised, phase 3 study. *Lancet*. 2018;391(10127):1263-1273.
172. O'Connor P, Wolinsky JS, Confavreux C, Comi G, Kappos L, Olsson TP, et al. Randomized trial of oral teriflunomide for relapsing multiple sclerosis. *N Engl J Med*. 2011;365(14):1293-1303.
173. O'Connor P, Comi G, Freedman MS, Miller AE, Kappos L, Bouchard JP, et al. Long-term safety and efficacy of teriflunomide: Nine-year follow-up of the randomized TEMSO study. *Neurology*. 2016;86(10):920-930.
174. Vermersch P, Czlonkowska A, Grimaldi LM, Confavreux C, Comi G, Kappos L, et al. Teriflunomide versus subcutaneous interferon beta-1a in patients with relapsing multiple sclerosis: a randomised, controlled phase 3 trial. *Mult Scler*. 2014;20(6):705-716.
175. Dubey D, Kieseier BC, Hartung HP, Hemmer B, Warnke C, Menge T, 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.
176. Gold R, Kappos L, Arnold DL, Bar-Or A, Giovannoni G, Selmaj K, et al. Placebo-controlled phase 3 study of oral BG-12 for relapsing multiple sclerosis. *N Engl J Med*. 2012;367(12):1098-1107.

177. Fox RJ, Miller DH, Phillips JT, Hutchinson M, Havrdova E, Kita M, 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.
178. Jordan AL, Yang J, Fisher CJ, Racke MK, Mao-Draayer Y. Progressive multifocal leukoencephalopathy in dimethyl fumarate-treated multiple sclerosis patients. *Mult Scler.* 2022;28(1):7-15.
179. Naismith RT, Wolinsky JS, Wundes A, LaGanke C, Arnold DL, Obradovic D, 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.
180. Leist TP, Weissert R. Cladribine: mode of action and implications for treatment of multiple sclerosis. *Clin Neuropharmacol.* 2011;34(1):28-35.
181. Baker D, Pryce G, Herrod SS, Schmierer K. Potential mechanisms of action related to the efficacy and safety of cladribine. *Mult Scler Relat Disord.* 2019;30:176-186.
182. Sheremata WA, Minagar A, Alexander JS, Vollmer T. The role of alpha-4 integrin in the aetiology of multiple sclerosis: current knowledge and therapeutic implications. *CNS Drugs.* 2005;19(11):909-922.
183. Polman CH, O'Connor PW, Havrdova E, Hutchinson M, Kappos L, Miller DH, et al. A randomized, placebo-controlled trial of natalizumab for relapsing multiple sclerosis. *N Engl J Med.* 2006;354(9):899-910.
184. Yousry TA, Major EO, Ryschkewitsch C, Fahle G, Fischer S, Hou J, et al. Evaluation of patients treated with natalizumab for progressive multifocal leukoencephalopathy. *N Engl J Med.* 2006;354(9):924-933.
185. Plavina T, Subramanyam M, Bloomgren G, Richman S, Pace A, Lee S, et al. Anti-JC virus antibody levels in serum or plasma further define risk of natalizumab-associated progressive multifocal leukoencephalopathy. *Ann Neurol.* 2014;76:802-812.

186. 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;22:880-881.
187. Toboso I, Tejada-Velarde A, Alvarez-Lafuente R, Arroyo R, Hegen H, Deisenhammer F, et al. New Algorithms Improving PML Risk Stratification in MS Patients Treated With Natalizumab. *Front Neurol.* 2020;11:579438.
188. 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.
189. Coles AJ, Twyman CL, Arnold DL, Cohen JA, Confavreux C, Fox EJ, 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.
190. Walo-Delgado PE, Monreal E, Medina S, Quintana E, Sainz de la Maza S, Fernández-Velasco JI, et al. Role of B Cell Profile for Predicting Secondary Autoimmunity in Patients Treated With Alemtuzumab. *Front Immunol.* 2021;12:760546.
191. Weiner GJ. Rituximab: mechanism of action. *Semin Hematol.* 2010;47:115-123.
192. Hauser SL, Waubant E, Arnold DL, Vollmer T, Antel J, Fox RJ, et al. B-cell depletion with rituximab in relapsing-remitting multiple sclerosis. *N Engl J Med.* 2008;358:676-688.
193. Naismith RT, Piccio L, Lyons JA, Lauber J, Tutlam NT, Parks BJ, et al. Rituximab add-on therapy for breakthrough relapsing multiple sclerosis: a 52-week phase II trial. *Neurology.* 2010;74:1860-1867.
194. Hawker K, O'Connor P, Freedman MS, Calabresi PA, Antel J, Simon J, et al. Rituximab in patients with primary progressive multiple sclerosis: results of a randomized double-blind placebo-controlled multicenter trial. *Ann Neurol.* 2009;66(4):460-471.
195. Ingle GT, Sastre-Garriga J, Miller DH, Thompson AJ. Is inflammation important in early PPMS? A longitudinal MRI study. *J Neurol Neurosurg Psychiatry.* 2005;76(9):1255-1258.

196. Rituximab Prescribing Information Reference ID: 4663614. (2020). Available online at: https://www.gene.com/download/pdf/rituxan_prescribing.pdf
197. Kappos L, Li D, Calabresi PA, O'Connor P, Bar-Or A, Barkhof F, et al. Ocrelizumab in relapsing-remitting multiple sclerosis: a phase 2, randomised, placebo-controlled, multicentre trial. *Lancet*. 2011;378(9805):1779-1787.
198. 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.
199. Hauser SL, Bar-Or A, Comi G, Giovannoni G, Hartung HP, Hemmer B, et al. Ocrelizumab versus Interferon Beta-1a in Relapsing Multiple Sclerosis. *N Engl J Med*. 2017;376(3):221-234.
200. Havrdova E, Arnold DL, Bar-Or A, Comi G, Hartung HP, Kappos L, et al. No evidence of disease activity (NEDA) analysis by epochs in patients with relapsing multiple sclerosis treated with ocrelizumab vs interferon beta-1a. *Mult Scler J Exp Transl Clin*. 2018;4(1):2055217318760642.
201. Turner B, Cree BAC, Kappos L, Montalban X, Papeix C, Wolinsky JS, et al. Ocrelizumab efficacy in subgroups of patients with relapsing multiple sclerosis. *J Neurol*. 2019;266(5):1182-1193.
202. Hauser SL, Kappos L, Arnold DL, Bar-Or A, Brochet B, Naismith RT, et al. Five years of ocrelizumab in relapsing multiple sclerosis: OPERA studies open-label extension. *Neurology*. 2020;95(13):e1854–e1867.
203. Hartung HP, Berger T, Bermel R, Brochet B, Holmøy T, Karabudak R, et al. Ocrelizumab phase IIIb efficacy: 1-year NEDA rates (with MRI re-baselining) from the ENSEMBLE study in early-stage relapsing-remitting MS patients. In: *ECTRIMS 2020*, vol S3, pp 225–659, Poster P0220.

204. Wiendl H, Comi G, Oreja-Guevara C, Van Wijmeersch BAS, Buffels RJW, Kadner R, et al. Ocrelizumab phase IIIb efficacy from CASTING: 2-year NEDA (MRI re-baselined) subgroup rates in RRMS patients with a suboptimal response to prior DMTs. In: ECTRIMS 2020, vol S3, pp 224–659, Poster P0219.
205. Montalban X, Hauser SL, Kappos L, Arnold DL, Bar-Or A, Comi G, et al. Ocrelizumab versus placebo in primary progressive multiple sclerosis. *N Engl J Med.* 2017;376(3):209-220.
206. Wolinsky JS, Arnold DL, Brochet B, Hartung HP, Montalban X, Naismith RT, et al. Long-term follow-up from the ORATORIO trial of ocrelizumab for primary progressive multiple sclerosis: a post-hoc analysis from the ongoing open-label extension of the randomised, placebo-controlled, phase 3 trial. *Lancet Neurol.* 2020;19(12):998-1009.
207. Hauser SL, Kappos L, Montalban X, Craveiro L, Chognot C, Hughes R, et al. Safety of ocrelizumab in patients with relapsing and primary progressive multiple sclerosis. *Neurology.* 2021;97(16):e1546-e1559
208. Patel A, Sul J, Gordon ML, Steinklein J, Sanguinetti S, Pramanik B, et al. Progressive Multifocal Leukoencephalopathy in a Patient With Progressive Multiple Sclerosis Treated With Ocrelizumab Monotherapy. *JAMA Neurol.* 2021;78(6):736-740.
209. Sorensen PS, Lisby S, Grove R, Derosier F, Shackelford S, Havrdova E, et al. Safety and efficacy of ofatumumab in relapsing-remitting multiple sclerosis: a phase 2 study. *Neurology.* 2014;82(7):573-581.
210. Bar-Or A, Grove RA, Austin DJ, Tolson JM, VanMeter SA, Lewis EW, et al. Subcutaneous ofatumumab in patients with relapsing-remitting multiple sclerosis: the MIRROR Study. *Neurology.* 2018;90(20):e1805-e1814.
211. Hauser SL, Bar-Or A, Cohen JA, Comi G, Correale J, Coyle PK, et al. Ofatumumab versus teriflunomide in multiple sclerosis. *N Engl J Med.* 2020;383(6):546-557.

212. De Romeuf C, Dutertre CA, Le Garff-Tavernier M, Fournier N, Gaucher C, Glacet A, et al. Chronic lymphocytic leukaemia cells are efficiently killed by an anti-CD20 monoclonal antibody selected for improved engagement of FcγRIIIA/CD16. *Br J Haematol.* 2008;140:635-643.
213. Fox E, Lovett-Racke AE, Gormley M, Liu Y, Petracca M, Cocozza S, et al. A phase 2 multicenter study of ublituximab, a novel glycoengineered anti-CD20 monoclonal antibody, in patients with relapsing forms of multiple sclerosis. *Mult Scler.* 2021;27(3):420-429.
214. Steinman L, Fox E, Hartung HP, Alvarez E, Qian P, Wray S, et al. Phase 3 results of the ULTIMATE I & II global studies: ublituximab versus teriflunomide in relapsing multiple sclerosis, in ECTRIMS. 2021: Vienna.
215. World Health Organization. International Programme on Chemical Safety. Biomarkers in Risk Assessment: Validity and Validation. World Health Organization; Geneva, Switzerland: 2001
216. Atkinson AJ, Colburn WA, DeGruttola WG, DeMets DL, Downing GJ, Hoth DF, et al. Biomarkers and surrogate endpoints: Preferred definitions and conceptual framework. *Clin. Pharmacol. Ther.* 2001;69:89-95.
217. Mishina E, FDA—NIH Biomarker Working Group BEST (Biomarkers, EndpointS, and Other Tools) Resource [Internet]. Monitoring Biomarker. Silver Spring (MD): Food and Drug Administration (US); 2016; Co-Published by National Institutes of Health (US): Bethesda, MD, USA. 2020. Available online: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK326791/>
218. Califf R.M. Biomarker definitions and their applications. *Exp. Biol. Med.* 2018;243:213-221.
219. Ziemssen T, Derfuss T, de Stefano N, Giovannoni G, Palavra F, Tomic D, et al. Optimizing treatment success in multiple sclerosis. *J. Neurol.* 2016;263:1053-1065.

220. Paul A, Comabella M, Gandhi R. Biomarkers in Multiple Sclerosis. Cold Spring Harb. Perspect. Med. 2019;9:a029058.
221. Hesse D, Sørensen PS. Using measurements of neutralizing antibodies: the challenge of IFN-beta therapy. Eur J Neurol. 2007;14(8):850-859.
222. Polman CH, Bertolotto A, Deisenhammer F, Giovannoni G, Hartung HP, Hemmer B, et al. Recommendations for clinical use of data on neutralising antibodies to interferon-beta therapy in multiple sclerosis. Lancet Neurol. 2010;9(7):740-750.
223. Salama HH, Hong J, Zang YC, El-Mongui A, Zhang J. Blocking effects of serum reactive antibodies induced by glatiramer acetate treatment in multiple sclerosis. Brain. 2003;126(12):2638-2647.
224. Vennegoor A, Rispens T, Strijbis EM, Seewann A, Uitdehaag BM, Balk LJ, et al. Clinical relevance of serum natalizumab concentration and anti-natalizumab antibodies in multiple sclerosis. Mult Scler. 2013;19(5):593-600.
225. O'Connor P, Goodman A, Kappos L, Lublin F, Polman C, Rudick RA, et al. Long-term safety and effectiveness of natalizumab redosing and treatment in the STRATA MS Study. Neurology. 2014;83(1):78-86.
226. Bartosik-Psujek H, Stelmasiak Z. The interleukin-10 levels as a potential indicator of positive response to interferon beta treatment of multiple sclerosis patients. Clin Neurol Neurosurg. 2006;108(7):644-647.
227. Axtell RC, de Jong BA, Boniface K, van der Voort LF, Bhat R, De Sarno P, et al. T helper type 1 and 17 cells determine efficacy of interferon-beta in multiple sclerosis and experimental encephalomyelitis. Nat Med. 2010;16(4):406-412.
228. Sellebjerg F, Börnsen L, Khademi M, Krakauer M, Olsson T, Frederiksen JL, et al. Increased cerebrospinal fluid concentrations of the chemokine CXCL13 in active MS. Neurology. 2009;73(23):2003-2010.

229. Yuan A, Rao MV, Veeranna, Nixon RA. Neurofilaments and Neurofilament Proteins in Health and Disease. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* 2017;9:a018309.
230. Petzold A. Neurofilament phosphoforms: Surrogate markers for axonal injury, degeneration and loss. *J. Neurol. Sci.* 2005;233:183-198.
231. Khalil M, Teunissen CE, Otto M, Piehl F, Sormani MP, Gattringer T, et al. Neurofilaments as biomarkers in neurological disorders. *Nat. Rev. Neurol.* 2018;14:577–589.
232. Norgren N, Sundström P, Svenningsson A, Rosengren L, Stigbrand T, Gunnarsson M. Neurofilament and glial fibrillary acidic protein in multiple sclerosis. *Neurology.* 2004;63:1586-1590.
233. Arrambide G, Espejo C, Eixarch H, Villar LM, Alvarez-Cermeño JC, Picón C, et al. Neurofilament light chain level is a weak risk factor for the development of MS. *Neurology.* 2016;87(11):1076-1084.
234. Matute-Blanch C, Villar LM, Álvarez-Cermeño JC, Rejdak K, Evdoshenko E, Makshakov G, et al. Neurofilament light chain and oligoclonal bands are prognostic biomarkers in radiologically isolated syndrome. *Brain.* 2018;141(4):1085-1093.
235. Villar LM, Picón C, Costa-Frossard L, Alenda R, García-Caldentey J, Espiño M, et al. Cerebrospinal fluid immunological biomarkers associated with axonal damage in multiple sclerosis. *Eur J Neurol.* 2015;22(8):1169-1175.
236. Novakova L, Axelsson M, Khademi M, Zetterberg H, Blennow K, Malmeström C, et al. Cerebrospinal fluid biomarkers as a measure of disease activity and treatment efficacy in relapsing-remitting multiple sclerosis. *J Neurochem.* 2017;141(2):296-304.
237. Kuhle J, Disanto G, Lorscheider J, Stites T, Chen Y, Dahlke F, et al. Fingolimod and CSF neurofilament light chain levels in relapsing-remitting multiple sclerosis. *Neurology.* 2015;84:1639-1643.

-
238. Gunnarsson M, Malmeström C, Axelsson M, Sundström P, Dahle C, Vrethem M, et al. Axonal damage in relapsing multiple sclerosis is markedly reduced by natalizumab. *Ann. Neurol.* 2011;69:83-89.
239. de Flon P, Gunnarsson M, Laurell K, Söderström L, Birgander R, Lindqvist T, et al. Reduced inflammation in relapsing-remitting multiple sclerosis after therapy switch to rituximab. *Neurology.* 2016;87:141.
240. Axelsson M, Malmeström C, Gunnarsson M, Zetterberg H, Sundström P, Lycke J, et al. Immunosuppressive therapy reduces axonal damage in progressive multiple sclerosis. *Mult. Scler. J.* 2014;20:43-50.
241. Disanto G, Barro C, Benkert P, Naegelin Y, Schädelin S, Giardiello A, et al. Serum Neurofilament light: A biomarker of neuronal damage in multiple sclerosis. *Ann. Neurol.* 2017;81:857-870.
242. Thebault S, Abdoli M, Fereshtehnejad SM, Tessier D, Tabard-Cossa V, Freedman MS. Serum neurofilament light chain predicts long term clinical outcomes in multiple sclerosis. *Sci. Rep.* 2020;10:10381.
243. Varhaug KN, Barro C, Bjørnevik K, Myhr KM, Torkildsen Ø, Wergeland S, et al. Neurofilament light chain predicts disease activity in relapsing-remitting MS. *Neurol Neuroimmunol Neuroinflamm.* 2017;5(1):e422.
244. Piehl F, Kockum I, Khademi M, Blennow K, Lycke J, Zetterberg H, et al. Plasma neurofilament light chain levels in patients with MS switching from injectable therapies to fingolimod. *Mult Scler.* 2018;24(8):1046-1054.
245. Walo-Delgado PE, Sainz de la Maza S, Villarrubia N, Monreal E, Medina S, Espiño M, et al. Low serum neurofilament light chain values identify optimal responders to dimethyl fumarate in multiple sclerosis treatment. *Sci Rep.* 2021;11(1):9299.

-
246. Alenda R, Costa-Frossard L, Alvarez-Lafuente R, Espejo C, Rodríguez-Martín E, de la Maza SS, et al. Blood lymphocyte subsets identify optimal responders to IFN-beta in MS. *J Neurol*. 2018;265(1):24-31.
247. Namdar A, Nikbin B, Ghabae M, Bayati A, Izad M. Effect of IFN-beta therapy on the frequency and function of CD4(+)CD25(+) regulatory T cells and Foxp3 gene expression in relapsing-remitting multiple sclerosis (RRMS): a preliminary study. *J Neuroimmunol*. 2010;218(1-2):120-124.
248. Martínez-Rodríguez JE, López-Botet M, Munteis E, Rio J, Roquer J, Montalban X, et al. Natural killer cell phenotype and clinical response to interferon-beta therapy in multiple sclerosis. *Clin Immunol*. 2011;141(3):348-356.
249. Sellebjerg F, Hesse D, Limborg S, Lund H, Søndergaard HB, Krakauer M, et al. Dendritic cell, monocyte and T cell activation and response to glatiramer acetate in multiple sclerosis. *Mult Scler*. 2013;19(2):179-187.
250. Quirant-Sánchez B, Hervás-García JV, Teniente-Serra A, Brieva L, Moral-Torres E, Cano A, et al. Predicting therapeutic response to fingolimod treatment in multiple sclerosis patients. *CNS Neurosci Ther*. 2018 Dec;24(12):1175-1184.
251. Defer G, Mariotte D, Derache N, Toutirais O, Legros H, Cauquelin B, et al. CD49d expression as a promising biomarker to monitor natalizumab efficacy. *J Neurol Sci*. 2012;314(1-2):138-142.
252. 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(2):355-363.
253. Bar-Or A, Bennett J, Von Budingen H, Carruthers R, Edwards K, Fallis R, et al. B Cells, T Cells and Inflammatory CSF Biomarkers in Primary Progressive MS and Relapsing MS in the OBOE (Ocrelizumab Biomarker Outcome Evaluation) Trial (1635). *Neurology*. 2020; 94(15 Supplement):1635.

-
254. Bar-Or A, Gelfand J, Fiore D, Harp C, Ma X, Herman A, et al. Interim Analysis of the OBOE (Ocrelizumab Biomarker Outcome Evaluation) Study in Multiple Sclerosis (MS) (S24.002). *Neurology*. 2018;90(15 Supplement):S24.002.
255. Leppert D, Kropshofer H, Häring DAA, Dahlke F, Patil A, Meinert R, et al. Blood Neurofilament Light in Progressive Multiple Sclerosis: Post Hoc Analysis of 2 Randomized Controlled Trials. *Neurology*. 2022;4:10.1212/WNL.00000000002002.
256. Montalban X, Gold R, Thompson AJ, Otero-Romero S, Amato MP, Chandraratna D, et al.ECTRIMS/EAN Guideline on the pharmacological treatment of people with multiple sclerosis. *Mult Scler*. 2018;24(2):96-120.
257. Montalban X, Arnold DL, Weber MS, Staikov I, Piasecka-Stryczynska K, Willmer J, et al. Placebo-Controlled Trial of an Oral BTK Inhibitor in Multiple Sclerosis. *N Engl J Med*. 2019;380(25):2406-2417.
258. Reich DS, Arnold DL, Vermersch P, Bar-Or A, Fox RJ, Matta A, et al. Safety and efficacy of tolebrutinib, an oral brain-penetrant BTK inhibitor, in relapsing multiple sclerosis: a phase 2b, randomised, double-blind, placebo-controlled trial. *Lancet Neurol*. 2021;20(9):729-738.
259. Yang C, Cui Y, Ren X, Li M, Yu K, Shen S, et al. Orelabrutinib Combined With Lenalidomide and Immunochemotherapy for Relapsed/Refractory Primary Central Nervous System Lymphoma: A Retrospective Analysis of Case Series. *Front Oncol*. 2022;12:901797.
260. Correale J. BTK inhibitors as potential therapies for multiple sclerosis. *Lancet Neurol*. 2021;20(9):689-691.
261. Greenfield AL, Hauser SL. B cell therapy for multiple sclerosis: entering an era. *Ann Neurol* 2018;83:13-26.
262. Graves J, Vinayagasundaram U, Mowry EM, Matthews IR, Marino JA, Cheng J, et al. Effects of rituximab on lymphocytes in multiple sclerosis and neuromyelitis optica. *Mult Scler Relat Disord*. 2014;3:244-252.

263. Gingele S, Jacobus TL, Konen FF, Hümmert MW, Sühs KW, Schwenkenbecher P, et al. Ocrelizumab depletes CD20+ T cells in multiple sclerosis patients. *Cells*. 2019;8:12.
264. van Langelaar J, Rijvers L, Smolders J, van Luijn MM. B and T Cells Driving Multiple Sclerosis: Identity, Mechanisms and Potential Triggers. *Front Immunol*. 2020;11:760.
265. Schwarz A, Balint B, Korporal-Kuhnke M, Jarius S, von Engelhardt K, Fürwentsches A, et al. B-cell populations discriminate between pediatric- and adult-onset multiple sclerosis. *Neurol Neuroimmunol Neuroinflamm*. 2017;4(1):e309.
266. Comabella M, Cantó E, Nurtdinov R, Río J, Villar LM, Picón C, et al. MRI phenotypes with high neurodegeneration are associated with peripheral blood B-cell changes. *Hum Mol Genet*. 2016;25(2):308-316.
267. Serafini B, Severa M, Columba-Cabezas S, Rosicarelli B, Veroni C, Chiappetta G, et al. Epstein-Barr virus latent infection and BAFF expression in B cells in the multiple sclerosis brain: implications for viral persistence and intrathecal B-cell activation. *J Neuropathol Exp Neurol*. 2010;69(7):677-693.
268. Rizzo F, Giacomini E, Mechelli R, Buscarinu MC, Salvetti M, Severa M, et al. Interferon- β therapy specifically reduces pathogenic memory B cells in multiple sclerosis patients by inducing a FAS-mediated apoptosis. *Immunol Cell Biol*. 2016;94(9):886-894.
269. Grützke B, Hucke S, Gross CC, Herold MVB, Posevitz-Fejfar A, Wildemann BT, et al. Fingolimod treatment promotes regulatory phenotype and function of B cells. *Ann Clin Transl Neurol*. 2015;2(2):119-130.
270. Thompson SAJ, Jones JL, Cox AL, Compston DAS, Coles AJ. B-cell reconstitution and BAFF after alemtuzumab (Campath-1H) treatment of multiple sclerosis. *J Clin Immunol*. 2010;30(1):99-105.
271. Rivas JR, Ireland SJ, Chkheidze R, Rounds WH, Lim J, Johnson J, Ramirez DM, et al. Peripheral VH4+ plasmablasts demonstrate autoreactive B cell expansion toward brain antigens in early multiple sclerosis patients. *Acta Neuropathol*. 2017;133:43-60.

272. Forsthuber TG, Cimbora DM, Ratchford JN, Katz E, Stüve O. B cell-based therapies in CNS autoimmunity: differentiating CD19 and CD20 as therapeutic targets. *Ther Adv Neurol Disord* 2018;11:1756286418761697.
273. Roll P, Palanichamy A, Kneitz C, Dorner T, Tony HP. Regeneration of B cell subsets after transient B cell depletion using anti-CD20 antibodies in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.* 2006;54:2377-2386.
274. Colucci M, Carsetti R, Cascioli S, Casiraghi F, Perna A, Ravà L, et al. B Cell Reconstitution after rituximab treatment in idiopathic nephrotic syndrome. *J Am Soc Nephrol JASN.* 2016;27:1811-1822.
275. Ikemiyagi M, Hirai T, Ishii R, Miyairi S, Okumi M, Tanabe K. Transitional B cells predominantly reconstituted after a desensitization therapy using rituximab before kidney transplantation. *Ther Apher Dial.* 2017;21:139-149.
276. Nissimov N, Hajiyeva Z, Torke S, Grondey K, Brück W, Häusser-Kinzel S, Weber MS. B cells reappear less mature and more activated after their anti-CD20-mediated depletion in multiple sclerosis. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2020;117(41):25690-25699.
277. van Lierop ZY, Toorop AA, van Ballegoij WJ, Olde Dubbelink TB, Strijbis EM, de Jong BA, et al. Personalized B-cell tailored dosing of ocrelizumab in patients with multiple sclerosis during the COVID-19 pandemic. *Mult Scler.* 2022;28(7):1121-1125.
278. Sabatino JJ, Zamvil SS, Hauser SL. B-Cell therapies in multiple sclerosis. *Cold Spring Harb Perspect Med.* 2019;9:a032037.
279. Lunemann JD, Ruck T, Muraro P, Bar-Or A, Wiendl H. Immune reconstitution therapies: concepts for durable remission in multiple sclerosis. *Nat Rev Neurol.* 2020;16:56-62.
280. Wilk E, Witte T, Marquardt N, Horvath T, Kalippke K, Scholz K, et al. Depletion of functionally active CD20+ T cells by rituximab treatment. *Arthritis Rheumatol* 2009;60:3563-3571.

281. Schuh E, Berer K, Mulazzani M, Feil K, Meinel I, Lahm H, Krane M, et al. Features of human CD3+CD20+ T cells. *J Immunol*. 2016;197:1111-1117.
282. Holley JE, Bremer E, Kendall AC, de Bruyn M, Helfrich W, Tarr JM, et al. CD20+ inflammatory T-cells are present in blood and brain of multiple sclerosis patients and can be selectively targeted for apoptotic elimination. *Mult Scler Relat Disord*. 2014;3:650-658.
283. Palanichamy A, Jahn S, Nickles D, Derstine M, Abounasr A, Hauser SL, et al. Rituximab efficiently depletes increased CD20-expressing T cells in multiple sclerosis patients. *J Immunol*. 2014;193:580-586.
284. Gingele S, Skripuletz T, Jacobs R. Role of CD20+ T cells in multiple sclerosis: implications for treatment with ocrelizumab. *Neural Regen Res*. 2020;15:663-664.
285. Bar-Or A, Fawaz L, Fan B, Darlington PJ, Rieger A, Ghorayeb C, et al. Abnormal B-cell cytokine responses a trigger of T-cell-mediated disease in MS? *Ann Neurol*. 2010;67(4):452-461.
286. Faissner S, Plemel JR, Gold R, Yong VW. Progressive multiple sclerosis: from pathophysiology to therapeutic strategies. *Nat Rev Drug Discov*. 2019;18(12):905-922.
287. Goodman A, Patel SP, Kurzrock R. PD1-PDL1 immune-checkpoint blockade in B-cell lymphomas. *Nat Rev Clin Oncol*. 2017;14:203-220.
288. Carter L, Fouser LA, Jussif J, Fitz L, Deng B, Wood CR, et al. PD-1:PD-L inhibitory pathway affects both CD4(+) and CD8(+) T cells and is overcome by IL-2. *Eur J Immunol*. 2002;32(3):634-643.
289. Zacca ER, Onofrio LI, Acosta CDV, Ferrero PV, Alonso SM, Ramello MC, et al. PD-L1+ Regulatory B Cells Are Significantly Decreased in Rheumatoid Arthritis Patients and Increase After Successful Treatment. *Front Immunol*. 2018;9:2241.

290. Elkins J, Sheridan J, Amaravadi L, Riester K, Selmaj K, Bielekova B, et al. CD56 (bright) natural killer cells and response to daclizumab hyp in relapsing-remitting MS. *Neurool Neuroimmunol Neuroinflamm.* 2015;2:e65.
291. Kridin K, Ahmed AR. Post-rituximab immunoglobulin M (IgM) hypogammaglobulinemia. *Autoimmun. Rev.* 2020;19(3):102466.
292. Roberts DM, Jones RB, Smith RM, Alberici F, Kumaratne D., Burns S, et al. Rituximab-associated hypogammaglobulinemia: incidence, predictors and outcomes in patients with multi-system autoimmune disease. *J. Autoimmun.* 2015;57:60-65.
293. Oksbjerg NR, Nielsen SD, Blinkenberg M, Magyari M, Sellebjerg F. Anti-CD20 antibody therapy and risk of infection in patients with demyelinating diseases. *Mult Scler Relat Disord.* 2021;52:102988.
294. Derfuss T, Weber M, Hughes R, Wang Q, Sauter A, Koendgen H, et al. Serum immunoglobulin levels and risk of serious infections in the pivotal Phase III trials of ocrelizumab in multiple sclerosis and their open-label extensions. *Mult. Scler.* 2019;25:20-21.
295. Yu YH, Lin KI. Factors That Regulate the Generation of Antibody-Secreting Plasma Cells. *Adv Immunol.* 2016;131:61-99.
296. De La Torre I, Leandro MJ, Valor L, Becerra E, Edwards JC, Cambridge G. Total serum immunoglobulin levels in patients with RA after multiple B-cell depletion cycles based on rituximab: relationship with B-cell kinetics. *Rheumatology (Oxford).* 2012;51(5):833-840.
297. Luna G, Alping P, Burman J, Fink K, Fogdell-Hahn A, Gunnarsson M, et al. Infection risks among patients with multiple sclerosis treated with fingolimod, natalizumab, rituximab, and injectable therapies. *JAMA Neurol.* 2020;77:184-191.
298. Comabella M, Sastre-Garriga J, Carbonell-Mirabent P, Fissolo N, Tur C, Malhotra S, et al. Serum neurofilament light chain levels predict long-term disability progression in

- patients with progressive multiple sclerosis. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. 2022;jnnp-2022-329020.
299. Wattjes MP, Rovira À, Miller D, Yousry TA, Sormani MP, de Stefano MP, et al. Evidencebased guidelines: MAGNIMS consensus guidelines on the use of MRI in multiple sclerosis-establishing disease prognosis and monitoring patients. *Nat Rev Neurol*. 2015;11(10):597-606.
300. Trojano M, Tintore M, Montalban X, Hillert J, Kalincik T, Iaffaldano P, et al. Treatment decisions in multiple sclerosis - insights from real-world observational studies. *Nat Rev Neurol*. 2017;13(2):105-118.
301. Giovannoni G, Tomic D, Bright JR, Havrdová E. «No evident disease activity»: The use of combined assessments in the management of patients with multiple sclerosis. *Mult Scler*. 2017;23(9):1179-1187.
302. Rotstein DL, Healy BC, Malik MT, Chitnis T, Weiner HL. Evaluation of no evidence of disease activity in a 7-year longitudinal multiple sclerosis cohort. *JAMA Neurol*. 2015;72(2):152-128.
303. Dorcet G, Migné H, Biotti D, Bost C, Lerebours F, Ciron J, et al. Early B cells repopulation in multiple sclerosis patients treated with rituximab is not predictive of a risk of relapse or clinical progression. *J Neurol*. 2022;1:11.
304. Cepok S, Rosche B, Grummel V, Vogel F, Zhou D, Sayn J, et al. Short-Lived Plasma Blasts are the Main B Cell Effector Subset During the Course of Multiple Sclerosis. *Brain*. 2005;128(7):1667-1676.
305. Li R, Bar-Or A. The Multiple Roles of B Cells in Multiple Sclerosis and Their Implications in Multiple Sclerosis Therapies. *Cold Spring Harb Perspect Med*. 2019;9(4):a029108.
306. Boes M. Role of Natural and Immune IgM Antibodies in Immune Responses. *Mol Immunol*. 2000;37(18):1141-1149.

307. Pabst O, Slack E. IgA and the Intestinal Microbiota: The Importance of Being Specific. *Mucosal Immunol.* 2020;13(1):12-21.
308. Shalapour S, Lin XJ, Bastian IN, Brain J, Burt AD, Aksenov AA, et al. Inflammation-Induced IgA+ Cells Dismantle Anti-Liver Cancer Immunity. *Nature.* 2017;551(7680):340-345.
309. Pröbstel AK, Zhou X, Baumann R, Wischnewski S, Kutza M, Rojas OL, et al. Gut Microbiota-Specific IgA+ B Cells Traffic to the CNS in Active Multiple Sclerosis. *Sci Immunol.* 2020;5(53):eabc7191.
310. Rojas OL, Pröbstel AK, Porfilio EA, Wang AA, Charabati M, Sun T, et al. Recirculating Intestinal IgA-Producing Cells Regulate Neuroinflammation via IL-10. *Cell.* 2019;177(2):492-493.

8 ANEXO: ARTÍCULOS RELACIONADOS

Estos artículos fueron publicados durante la realización de esta tesis doctoral:

- ✓ Cuello JP, Martínez Ginés ML, Kuhle J, García Domínguez JM, Lozano Ros A, Romero Delgado F, Higuera Y, Meldaña Rivera A, Goicochea Briceño H, García-Tizon Larroca S, De León-Luis J, Michalak Z, Barro C, Álvarez Lafuente R, Medina Heras S, Fernández Velasco JI, Tejeda-Velarde A, Domínguez-Mozo MI, Muriel A, de Andrés C, Villar LM. **Neurofilament light chain levels in pregnant multiple sclerosis patients: a prospective cohort study.** Eur J Neurol. 2019;26(9):1200-1204.
- ✓ Cuello JP, Martínez Ginés ML, Tejeda-Velarde A, Medina Heras S, García Domínguez JM, Fernández Velasco JI, Lozano Ros A, Higuera Y, Meldaña Rivera A, Goicochea Briceño H, García-Tizon Larroca S, De León-Luis J, de Andrés C, Álvarez Lafuente R, Villar LM. **Cytokine profile during pregnancy predicts relapses during pregnancy and postpartum in multiple sclerosis.** J Neurol Sci. 2020;414:116811.
- ✓ Pérez-Pérez S, Domínguez-Mozo MI, Alonso-Gómez A, Medina S, Villarrubia N, Fernández-Velasco JI, García-Martínez MÁ, García-Calvo E, Estévez H, Costa-Frossard L, Alvarez-Cermeño JC, Luque-García JL, Arroyo R, Villar LM, Alvarez-Lafuente R. **Acetate correlates with disability and immune response in multiple sclerosis.** PeerJ. 2020;8:e10220.
- ✓ Walo-Delgado PE, Monreal E, Medina S, Quintana E, Sainz de la Maza S, Fernández-Velasco JI, Lapuente P, Comabella M, Ramió-Torrentà L, Montalban X, Midaglia L, Villarrubia N, Carrasco-Sayalero A, Rodríguez-Martín E, Roldán E, Meca-Lallana J, Alvarez-Lafuente R, Masjuan J, Costa-Frossard L, Villar LM. **Role of B Cell Profile for Predicting Secondary Autoimmunity in Patients Treated With Alemtuzumab.** Front Immunol. 2021;12:760546.

- ✓ Monreal E, Sainz de la Maza S, Costa-Frossard L, Walo-Delgado P, Zamora J, Fernández-Velasco JI, Villarrubia N, Espiño M, Lourido D, Lapuente P, Toboso I, Álvarez-Cermeño JC, Masjuan J, Villar LM. **Predicting Aggressive Multiple Sclerosis With Intrathecal IgM Synthesis Among Patients With a Clinically Isolated Syndrome.** *Neurol Neuroimmunol Neuroinflamm.* 2021;8(5):e1047.
- ✓ Walo-Delgado PE, Sainz de la Maza S, Villarrubia N, Monreal E, Medina S, Espiño M, Fernández-Velasco JI, Rodríguez-Martín E, Roldán E, Lourido D, Muriel A, Masjuan-Vallejo J, Costa-Frossard L, Villar LM. **Low serum neurofilament light chain values identify optimal responders to dimethyl fumarate in multiple sclerosis treatment.** *Sci Rep.* 2021;11(1):9299.
- ✓ Capuano R, Zubizarreta I, Alba-Arbalat S, Sepulveda M, Sola-Valls N, Pulido-Valdeolivas I, Andorra M, Martínez-Heras E, Solana E, López-Soley E, Montejo C, Blanco Y, Fernández-Velasco JI, Gallo A, Bisecco A, Villoslada P, Saiz A, Llufríu S, Villar LM, Martínez-Lapiscina EH. **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.
- ✓ Picón C, Tejada-Velarde A, Fernández-Velasco JI, Comabella M, Álvarez-Lafuente R, Quintana E, Sainz de la Maza S, Monreal E, Villarrubia N, Álvarez-Cermeño JC, Domínguez-Mozo MI, Ramió-Torrentà L, Rodríguez-Martín E, Roldán E, Aladro Y, Medina S, Espiño M, Masjuan J, Matute-Blanch C, Muñoz-San Martín M, Espejo C, Guaza C, Muriel A, Costa-Frossard L, Villar LM. **Identification of the Immunological Changes Appearing in the CSF During the Early Immunosenescence Process Occurring in Multiple Sclerosis.** *Front Immunol.* 2021;12:685139.

- ✓ Dominguez-Mozo MI, Perez-Perez S, Villarrubia N, Costa-Frossard L, Fernandez-Velasco JI, Ortega-Madueño I, Garcia-Martinez MA, Garcia-Calvo E, Estevez H, Luque Garcia JL, Torrejon MJ, Arroyo R, Villar LM, Alvarez-Lafuente R. **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.
- ✓ Pérez-Pérez S, Cuello JP, Martínez-Ginés M, Pardo-Rodríguez B, García-Domínguez JM, Domínguez-Mozo MI, Lozano-Ros A, García-Martínez MÁ, Higuera Y, Meldaña-Rivera A, Goicochea-Briceño H, Tejeda-Velarde A, Fernández-Velasco JI, Medina S, Arroyo R, Villar LM, Álvarez-Lafuente R. **Evolution of antibody titres against Epstein-Barr virus and human herpesvirus 6A/B and expression of multiple sclerosis-associated retrovirus in the serum of pregnant multiple sclerosis patients.** Sci Rep. 2021;11(1):8441.
- ✓ Cuello JP, Martínez Ginés ML, García Domínguez JM, Tejeda-Velarde A, Lozano Ros A, Higuera Y, Meldaña Rivera A, Goicochea Briceño H, Garcia-Tizon S, de León-Luis J, Medina Heras S, Fernández Velasco JI, Pérez-Pérez S, García-Martínez MÁ, Pardo-Rodríguez B, Domínguez-Mozo MI, García-Calvo E, Estévez H, Luque-García JL, Villar LM, Alvarez-Lafuente R. **Short-chain fatty acids during pregnancy in multiple sclerosis: A prospective cohort study.** Eur J Neurol. 2022;29(3):895-900.

