

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
FACULTAD DE MEDICINA



TESIS DOCTORAL

**Mecanismos responsables del empeoramiento asociado a la edad en
esclerosis múltiple**

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR

PRESENTADA POR

Carmen Picón Muñoz

Directores

Luisa María Villar Guimerans

José Carlos Álvarez Cermeño

Madrid, 2018



UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

Facultad de Medicina

**“MECANISMOS RESPONSABLES DEL EMPEORAMIENTO
ASOCIADO A LA EDAD EN ESCLEROSIS MÚLTIPLE”**

Carmen Picón Muñoz

Licenciada en Biotecnología

Directores:

Dra. Luisa María Villar Guimerans

Jefa del Servicio de Inmunología

Hospital Universitario Ramón y Cajal

Dr. José Carlos Álvarez-Cermeño

Jefe de sección en el Servicio de Neurología

Hospital Universitario Ramón y Cajal

Profesor asociado en Ciencias de la Salud en la Facultad de Medicina de la
Universidad de Alcalá de Henares

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

CERTIFICA: Que Doña Carmen Picón Muñoz ha realizado su Tesis doctoral titulada:
**“MECANISMOS RESPONSABLES DEL EMPEORAMIENTO ASOCIADO A LA EDAD EN
ESCLEROSIS MÚLTIPLE”**

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 veinte dos de diciembre de 2016

Fdo: Dña. LUISA MARIA VILLAR GUIMERANS

D. José Carlos Álvarez Cermeño, Doctor en Medicina y Cirugía y Jefe del Sección en el Servicio de Neurología del Hospital Ramón y Cajal, Madrid y Profesor Asociado en Ciencias de la salud de la facultada de Medicina de la Universidad de Alcalá de Henares.

CERTIFICA: Que Doña Carmen Picón Muñoz ha realizado su Tesis doctoral titulada:
**“MECANISMOS RESPONSABLES DEL EMPEORAMIENTO ASOCIADO A LA EDAD EN
ESCLEROSIS MÚLTIPLE”**

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 veinte dos de diciembre de 2016

Fdo: D. JOSÉ CARLOS ÁLVAREZ CERMEÑO

*“The person who never made a mistake
never tried anything new.”*

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar, a mis directores de tesis la Dra. Luisa Maria Villar y el Dr. José Carlos Álvarez Cermeño por haberme brindado la oportunidad de realizar la tesis en esclerosis múltiple, por el entusiasmo que me han transmitido hacia la investigación y por todo el apoyo me dan dado durante estos años.

En segundo lugar, a todos mis compañeros del Servicio de Inmunología, y especialmente a la sección de Inmunoquímica. Al grupo de “inmunocañas” por haber compartido conmigo estos cuatro años y ayudado en tantos momentos. A mi “confesora” particular de Inmunoquímica por escucharme siempre. A la sección de celular por toda la ayuda en citometría, y Lali por ser la madre del Servicio. A todos los residentes con los que he coincidido durante estos años con los que he compartido muy buenos momentos.

Al servicio de neurología del Hospital Ramón y Cajal, especialmente al personal de la Unidad de Esclerosis Múltiple por su amabilidad y disponibilidad.

A Dr. Roberto Álvarez la Fuente y Dr. Manuel Comabella por la cuantificación de los anticuerpos frente a CMV y la chitinase 3 like 1.

Al Dr. Richard Reynolds por haberme aceptado en su laboratorio para hacer la estancia y a todos mis compañeros de laboratorio durante esos meses.

A todos mis amigos, especialmente a Irene por aguantarme durante estos años de convivencia.

Sobre todo agradecer a mi familia todo el apoyo que me han dado. Me gustaría hacer una mención especial a mi madre, ella es la que verdaderamente me ha transmitido desde pequeña la vocación por la ciencia y el trabajo.

ÍNDICE

ABREVIATURAS	23
RESUMEN	29
1. INTRODUCCIÓN	41
1.1. ASPECTOS HISTÓRICOS	41
1.2. EPIDEMIOLOGÍA	42
1.3. ETIOLOGÍA	42
1.3.1 Factores genéticos	42
1.3.2 Factores ambientales	43
1.4. FORMAS CLÍNICAS	45
1.4.1. Esclerosis múltiple remitente recurrente	46
1.4.2. Esclerosis múltiple progresiva	47
1.5. DIAGNÓSTICO	48
1.5.1. Resonancia magnética	48
1.5.2. Potenciales evocados	48
1.5.3 Estudio de LCR	49
1.5.4 Criterios diagnósticos	50
1.6. NEUROLOGÍA	50
1.6.1. Lesiones en la sustancia blanca	50
1.6.2. Lesiones en la sustancia gris	51
1.6.3. Sustancia blanca y gris aparentemente normal	52
1.7. FISIOPATOLOGÍA	52
1.7.1. Linfocitos T CD4+	53

1.7.2. Linfocitos T CD8+	54
1.7.3. Linfocitos B	55
1.7.4. Microglía/macrófagos	57
1.7.5. Astrocitos	56
1.7.6 Cambios asociados a la edad	57
1.8. TRATAMIENTO	59
1.9. ESTUDIO DEL LCR EN LA EM.....	61
1.9.1. Bandas oligoclonales IgM	61
1.9.2. Neurofilamentos	62
1.9.3. Chitinase-3 like 1	63
1.9.4. Proteína fibrilar glial.....	64
1.9.5. Poblaciones celulares	65
2.OBJETIVOS	69
3. MATERIALES Y MÉTODOS.....	73
3.1 MATERIALES Y MUESTRAS BIOLÓGICAS	73
3.1.1. Detección de bandas oligoclonales totales y específicas frente a lípidos de mielina.....	73
3.1.2. Cuantificación de los índices de IgG e IgM y el cociente de albúmina en las muestras de LCR y suero	74
3.1.3. Estudio de leucocitos en el LCR.....	74
3.1.4. Detección intracelular de citoquinas en linfocitos T en el LCR	76
3.1.5. Determinación del daño axonal en LCR.....	76

3.1.6. Determinación de estrés oxidativo en LCR.....	76
3.1.7. Cuantificación de activina A en suero y en LCR	76
3.1.8 Cuantificación de chitinase-3 like 1 en LCR	76
3.1.9 Cuantificación de IgG frente a CMV	77
3.1.10 Tinción de IgM, IgG y CD138 en tejido	77
3.1.11 Muestras biológicas	78
3.1.12 Pacientes	78
3.1.12.1. Grupo de pacientes 1	78
3.1.12.2. Grupo de pacientes 2	79
3.1.12.3 Grupo de pacientes 3	81
3.1.13. Muestras de tejido post-mortem.....	81
3.2 MÉTODOS	83
3.2.1. Cuantificación de IgM, IgG y albúmina en LCR y suero	83
3.2.2. Detección de bandas oligoclonales IgG.....	83
3.2.3. Detección de bandas oligoclonales IgM.....	84
3.2.4. Detección de bandas oligoclonales IgM lípido-específicas....	85
3.2.5. Estudio de poblaciones celulares en LCR	86
3.2.6. Detección intracelular de citoquinas en linfocitos T en LCR	89
3.2.7. Detección de la cadena ligera de los neurofilamentos	92
3.2.8. Detección activina A	93
3.2.9 Detección de SOD	93

3.2.10 Detección de 8- isoprostano	93
3.2.11 Detección de anticuerpos frente a CMV	93
3.2.12 Indentificación de IgG e IgM en lesiones corticales en la esclerosis múltiple.....	93
3.2.12.1 Cortes de tejido	93
3.2.12.2. Determinación de las placas de desmielinización ..	94
3.2.12.3. Determinación de la actividad inflamatori	94
3.2.12.4. Identificación de plasmablastos IgG.....	94
3.2.12.5. Identificación de plasmablastos IgM.....	95
3.2.12.6. Identificación de células plasmáticas	95
3.2.13 Análisis estadístico	96
4. RESULTADOS	99
4.1 ESTUDIO DE LA RESPUESTA INMUNITARIA EN PACIENTES CON EM, OENI Y OENN EN LCR.....	99
4.1.1 Análisis de linfocitos T y linfocitos B.....	99
4.1.2 Análisis de monocitos.....	102
4.1.3 Análisis de la producción intracelular de citoquinaa	103
4.2 FACTORES ASOCIADOS AL DAÑO AXONAL EN LA EM	108
4.2.1 Correlación entre NF-L y variables demográficas, clínicas y radiológicas.....	108
4.2.2 Asociación de los niveles de Nf-L con variables demográficas, clínicas y radiológica	109

4.2.3 Asociación de los niveles altos de Nf-L en el LCR con síntesis intratecal de inmunoglobulinas	111
4.2.4 Estudio de Nf-L como posible biomarcador de conversión a EM	114
4.3 CARACTERIZACIÓN DE LOS MECANISMOS INMUNOLÓGICOS PRESENTES EN LOS PACIENTES CON EM CLASIFICADOS SEGÚN LA PRESENCIA DE BOC DE IgM FRENTE A LÍPIDOS	115
4.3.1 Estudio de marcadores de daño axonal	118
4.3.2 Estudio de marcadores de inflamación	118
4.3.3 Relación con el estrés oxidativo	120
4.3.4 Relación con la respuesta inmune adaptativa	120
4.3.4.1 Estudio de las poblaciones de linfocitos T CD4	120
4.3.4.2 Estudio de las poblaciones de linfocitos T CD8	124
4.3.4.3 Estudio de las poblaciones de linfocitos B	125
4.3.5 Caracterización de la respuesta según si los pacientes con EM se encuentran en brote	127
4.4 EVOLUCIÓN DE LA RESPUESTA INMUNITARIA CON LA EDAD	129
4.4.1- Efecto de la edad en variables clínicas y radiológicas	131
4.4.2- Efecto de la edad en los factores solubles en LCR	132
4.4.3- Efecto de la edad en las poblaciones de leucocitos... ..	135
4.4.4- Efecto de la edad en pacientes clasificados en menores y mayores de 40 años	140
4.4.4.1- Factores solubles	141
4.4.4.2- Respuesta inmune innata y adaptativa	142

4.4.5- Estudio de marcadores de inmunosenescencia	145
4.5. DETECCIÓN DE LINFOCITOS B EN TEJIDO POST-MORTEN EN PACIENTES CON EM.....	146
4.5.1-Detección de lesiones desmielinizadas	147
4.5.2- Identificación de células plasmáticas	148
4.5.3 Identificación de plasmablastos IgM e IgG.....	149
5. DISCUSIÓN	155
5.1. ESTUDIO DE LA RESPUESTA INMUNITARIA EN PACIENTES CON EM, OENI Y ONNI EN LCR.....	155
5.2. FACTORES ASOCIADOS AL DAÑO AXONAL EN LA EM	159
5.3. CARACTERIZACIÓN DE LOS MECANISMOS INMUNOLÓGICOS PRESENTES EN LOS PACIENTES CON EM CLASIFICADOS SEGÚN LA PRESENCIA DE BOC DE IgM FRENTE A LÍPIDOS	162
5.4. EVOLUCIÓN DE LA RESPUESTA INMUNITARIA CON LA EDAD	168
5.5. DETECCIÓN DE LINFOCITOS B EN TEJIDO POST-MORTEM EN PACIENTES CON EM	175
6. CONCLUSIONES	181
7. BIBLIOGRAFÍA	185
8. ADDENDUM.....	207

Publicaciones relacionadas con la tesis

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;87:1076-84.

Villar LM, Costa-Frossard L, Masterman T, Fernandez O, Montalban X, Casanova B, Izquierdo G, Coret F, Tumani H, Saiz A, Arroyo R, Fink K, Leyva L, Espejo C, Simó-Castelló M, García-Sánchez MI, Lauda F, Llufríu S, Álvarez-Lafuente R, Olascoaga J, Prada A, Oterino A, de Andrés C, Tintoré M, Ramió-Torrentà L, Rodríguez-Martín E, Picón C et al. Lipid-specific immunoglobulin M bands in cerebrospinal fluid are associated with a reduced risk of developing progressive multifocal leukoencephalopathy during treatment with natalizumab. *Ann Neurol*. 2015;77:447-57

Villar LM, Picón C, Costa-Frossard L, Alenda R, García-Caldentey J, Espiño M, Muriel A, Álvarez-Cermeño JC. Cerebrospinal fluid immunological biomarkers associated with axonal damage in multiple sclerosis. *Eur J Neurol*. 2015 Aug;22(8):1169-75

Publicaciones no relacionadas con la tesis

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 Jan 15;308-16.

Rodríguez-Martín E, Picón C, Costa-Frossard L, Alenda R, Sainz de la Maza S, Roldán E, Espiño M, Villar LM, Álvarez-Cermeño JC. Natural killer cell subsets in cerebrospinal fluid of patients with multiple sclerosis. *Clin Exp Immunol*. 2015; 180(2):243-9.

Delgado-García M, Matesanz F, Alcina A, Fedetz M, García-Sánchez MI, Ruiz-Peña JL, Fernández Ó, Pinto Medel MJ, Leyva L, Arnal C, Delgado C, López Guerrero JA, González-Pérez A, Sáez ME, Villar LM, Álvarez-Cermeño JC, Picón C et al. A new risk variant for multiple sclerosis at the immunoglobulin heavy chain locus associates with intrathecal IgG, IgM index and oligoclonal bands. *Mult Scler*. 2015 Aug;21(9):1104-11

ABREVIATURAS

ABREVIATURAS:

APC: alofocianina

CMV: Citomegalovirus

Cy: Cianina

CHI3L1: Chitinase-3 like 1 protein

BHE: Barrera hematoencefálica

BOCM: Bandas oligoclonales IgM lípido-específicas

BOC: Bandas oligoclonales

EAE: Encefalitis autoinmune experimental

EDSS: Escala expandida del estado de discapacidad

EM: Esclerosis múltiple

EMRR: Esclerosis múltiple remitente-recurrente

EMSP: Esclerosis múltiple secundaria-progresiva

EMPP: Esclerosis múltiple primaria-progresiva

EMCD: Esclerosis múltiple clínicamente definida

FITC: Isocianato de fluoresceína

HLA: Antígeno leucocitario humano

IgG: Inmunoglobulina G

IgM: Inmunoglobulina M

IL: Interleucina

IFN: Interferón

LCR: Líquido cefalorraquídeo

MHC: Complejo mayor de histocompatibilidad

MOG: Proteína de la mielina del oligodendrocito

MSSS: Multiple Sclerosis Severity Score

OENI: Otras enfermedades neurológicas inflamatorias

OENN: Otras enfermedades neurológicas no inflamatorias

PE: Ficoeritrina

SNA: Síndrome neurológico aislado

SNC: Sistema nervioso central

SOD: Superóxido dismutasa

RM: resonancia magnética

TGF- β : Factor de crecimiento transformante β

Th: Linfocitos T colaboradores

TNF: Factor de necrosis tumoral

VIH: Virus de la inmunodeficiencia adquirida

RESUMEN

Introducción:

La esclerosis múltiple (EM) es una enfermedad inflamatoria crónica del SNC de naturaleza autoinmune que produce desmielinización y daño axonal. Su etiología no es del todo conocida aunque se sabe que distintos factores genéticos y ambientales contribuyen a la susceptibilidad a esta enfermedad. Tampoco se conocen los mecanismos inmunológicos que juegan un papel importante en la EM. Aunque distintos trabajos han estudiado las diferencias entre la EM y otras patologías no inflamatorias, las diferencias con otras patologías inflamatorias no se han estudiado en profundidad. Tampoco se conocen los factores inmunológicos que se asocian con el daño axonal, la variable responsable de la discapacidad en la EM. Además, durante la evolución de la enfermedad, parecen existir dos fases. En la fase inicial predomina la inflamación, asociada a desmielinización y daño axonal. En la segunda fase, que en un principio se solapa con la primera, habría una respuesta inflamatoria compartimentalizada, y una activación crónica de la respuesta inmune innata. Sin embargo, quedan por explorar los cambios en distintas subpoblaciones celulares asociados a la edad en esta patología.

Aproximadamente un tercio de los pacientes con EM muestra bandas oligoclonales IgM (BOC-M+) en LCR frente a lípidos. Múltiples trabajos han demostrado que estos anticuerpos son un biomarcador que se asocia con un mal pronóstico de la enfermedad. Sin embargo se desconoce su asociación con marcadores de inflamación y neurodegeneración en la enfermedad y si la presencia de estos anticuerpos condiciona la inmunosenescencia en la EM.

Objetivos:

El primer objetivo del estudio fue identificar en LCR, las poblaciones celulares que diferencian a los pacientes con EM frente a otras enfermedades neurológicas del SNC. En segundo lugar, investigamos la asociación entre el daño axonal y marcadores clínicos, radiológicos y su relación con mecanismos inmunológicos. En tercer lugar, estudiamos los mecanismos inmunológicos en pacientes clasificados de acuerdo a la presencia o ausencia de BOC-M. En cuarto lugar, exploramos los cambios en la respuesta inmunológica en la EM asociados a la edad. Por último,

estudiamos la presencia de linfocitos B productores de IgM en tejido post mortem y su asociación con la progresión de la enfermedad.

Material y métodos:

Se obtuvieron muestras de LCR y suero en 121 pacientes con EM, 37 pacientes con otras enfermedades neurológicas inflamatorias (OENI), 29 pacientes con otras enfermedades neurológicas no inflamatorias, 66 pacientes con síndrome neurológico aislado (SNA) y 30 pacientes sin patología neurológica. De los pacientes con EM se recogieron los datos clínicos y radiológicos en el momento de la PL. Se obtuvo tejido cerebral (necropsia) de 10 casos con EMSP y 5 casos sin patología neurológica. La detección de bandas oligoclonales IgG e IgM se realizó por isoelectroenfoque e inmunodetección. El estudio de poblaciones leucocitarias se realizó mediante la tinción de antígenos de superficie por citometría de flujo. Para la evaluación de producción intracelular por linfocitos T de citoquinas se realizaron cultivos celulares y se analizaron las subpoblaciones productoras de citoquinas mediante citometría de flujo. Se cuantificaron mediante ELISA los niveles de la cadena ligera de neurofilamentos, chitinase-3 like 1, activina A, SOD, 8-isoprostano y los títulos de anticuerpos frente a CMV. Se estudiaron mediante inmunohistoquímica las lesiones desmielinizadas, la actividad inflamatoria, las células plasmáticas y los plasmablastos IgG e IgM en el tejido.

Resultados:

Encontramos que los pacientes con EM muestran un número mayor de linfocitos T CD8 productores de IFN- γ y TNF- α y linfocitos B que otras enfermedades neurológicas inflamatorias y no inflamatorias.

A continuación, cuantificamos los niveles de la cadena ligera de los neurofilamentos, un marcador de daño axonal en 127 pacientes con EM y 30 sin patología neurológica. Los valores de este grupo nos permitieron establecer un punto de corte para establecer niveles normales y elevados. Encontramos que niveles elevados de esta proteína en LCR identificaban a aquellos pacientes que tenían mayor carga lesional y discapacidad. También los niveles elevados de Nf-L

predicen de forma precoz la aparición de un nuevo brote en pacientes con síndrome neurológico aislado.

Cuando estudiamos parámetros inmunológicos asociado a los valores de neurofilamentos, encontramos que la presencia de BOCM+ se asocia con niveles más elevados de Nf-L, lo que muestra que estos anticuerpos podrían tener un efecto deletéreo en el tejido.

En el estudio de mecanismos asociados a la presencia BOCM+ encontramos que estos pacientes muestran niveles elevados de chitinase 3-like 1, una proteína asociada con la activación de astrogliá y astrocitos. Además, muestran mayor número de linfocitos T CD4 y CD8 en LCR, y un aumento en la respuesta Th1 y Th22. Las respuestas B T dependiente e independiente también están aumentada en este grupo de pacientes, que en particular mostraron un aumento de linfocitos B de memoria y de plasmablastos CD5+.

Cuando estudiamos el efecto de la edad en la respuesta inmune dentro del sistema nervioso central, observamos un aumento de activina A, una citoquina asociada con la respuesta M1 en macrófagos y microglía en todos los pacientes. Además, los pacientes sin BOC-M mostraron una disminución en la respuesta adaptativa en LCR. Disminuyó el número de linfocitos T CD+, CD8+ y linfocitos B y el número de linfocitos T CD4+ produciendo THF alfa e IL-22 y CD8+ produciendo perforina y las células dendríticas mieloides y plasmacitoides. Además, en estos pacientes se incrementan con la edad los niveles de chitinase-3 like 1, otra proteína asociada a la activación de la respuesta inmune innata en el SNC.

Por el contrario, en los pacientes BOCM+ sólo se observó un aumento de superóxido dismutasa con la edad, es decir, un aumento del estrés oxidativo mientras que la respuesta inmune adaptativa en LCR no cambió con la edad.

Observamos que los 40 años, es la edad en la que se comienza a detectar los cambios anteriores en ambos grupos. En los pacientes BOCM- a partir de los 40 años aumentan los títulos de anticuerpos frente a CMV, lo que sugiere que los cambios observados podrían deberse a una inmunosenescencia prematura.

Por último, detectamos plasmablastos IgM y células plasmáticas en las meninges en casos con EMSP. Solamente los plasmablastos IgM se asociaron con la presencia de folículos linfoides ectópicos y mayor progresión de la enfermedad.

Conclusiones:

Los resultados de nuestro trabajo, han mostrado que los linfocitos T CD8 productores de citoquinas pro-inflamatorias y linfocitos B, están aumentados en la EM en comparación con otras enfermedades inflamatorias. Estos resultados sugieren que podrían tener un papel relevante en la fisiopatología de la enfermedad.

Así mismo, hemos mostrado que los niveles de Nf-L en LCR son un buen marcador de daño axonal. Hemos establecido un punto de corte que permitirá usarlos en la práctica clínica diaria como biomarcador para identificar aquellos pacientes con mayor discapacidad, actividad en resonancia magnética y mayor probabilidad de padecer en segundo brote tras un primer episodio de carácter desmielinizante.

Hemos encontrado una estrecha relación entre la presencia de BOC-M+ y los niveles Nf-L, implicando a estos anticuerpos en el daño axonal.

La presencia de BOC-M además, se asocia con una producción mayor de citoquinas pro-inflamatorias en LCR por linfocitos T CD4 y CD8, y una mayor respuesta humoral. Estos pacientes a su vez tienen aumentados los niveles de CH3L1, lo que sugiere que también hay una mayor activación de las células del sistema inmune innato del SNC.

La edad influye en la respuesta adaptativa en los pacientes BOC M- en LCR, disminuyendo los linfocitos T, B y células dendríticas. Por contra, aumentan las moléculas asociadas a la activación del sistema inmune innato en el SNC, y los títulos de anticuerpo frente a CMV. Estos datos podrían indicar que estos pacientes sufren una inmunosenescencia prematura. En cambio, en pacientes BOC M+, la edad no afecta a la respuesta inmunológica de LCR, pero aumentan los niveles de superóxido dismutasa, lo que implica mayor estrés oxidativo.

A partir de los 40 años se empiezan a observar los cambios en los mecanismos efectores en los pacientes BOC M-. Este estudio ha contribuido a entender como cambia la respuesta inflamatoria con la edad en la EM. Esto puede ser importante en el futuro a la hora de considerar la elección o cambios del tratamiento en esta enfermedad.

Por ultimo, la presencia de plasmablastos IgM en las meninges en casos de EMSP se asocia con mayor desmielinización cortical y progresión de la enfermedad. Este hallazgo apoya el papel de la IgM en la patología de la enfermedad, y su asociación con un curso más agresivo de la misma.

ABSTRACT

Background

Multiple Sclerosis is a chronic inflammatory autoimmune disease of the central nervous system that causes demyelination and axonal damage. MS etiology remains unknown but genetic and environmental factors contribute to MS susceptibility. In addition, little is known about the immunological mechanisms playing an important role in the disease. Several reports have compared MS with non-inflammatory diseases but differences with other inflammatory diseases have not been fully elucidated. The immunological mechanisms associated to axonal damage, the cause of the disability in MS, also remain unknown. On the other hand, it was suggested that MS is a two-phase disease. In the first one, the adaptive and innate immune responses mediate acute inflammation linked to demyelination and axonal damage. It is proposed that the second phase mainly show chronic activation of the innate immune response and a compartmentalized inflammation. However, aging effects in cell subsets remain unexplored.

Around 30% of MS patients have oligoclonal IgM bands (OCB-M+) in the cerebrospinal fluid (CSF) that recognize lipids. Several reports have proven that these antibodies are a biomarker of poor disease outcome. However, little is known about its association with inflammatory and neurodegenerative markers in the disease and with immunosenescence.

Objective:

We first aimed to investigate whether there is a different leukocyte profile in CSF of MS patients compared to other neurological pathologies. Second, we studied the relationship of axonal damage with clinical and radiological biomarkers and its association with different immunological mechanisms. Third, we explored the immunological mechanisms present in MS patients classified according to their OCB-M status. Next, we evaluated aging effects on the immune response taking place in MS. Finally, we studied the presence of B-lymphocytes secreting IgM in brain tissue (necropsies) of MS cases and their association with disease progression.

Material and Methods:

We collected serum and CSF samples from 127 consecutive MS patients, 37 with other inflammatory neurological disease (IND), 29 with non-inflammatory neurological diseases (NIND), 30 patients without neurological disease and 66 patients with clinically isolated syndromes (CIS). Clinical and radiological data of MS patients were obtained. IgM and IgG OCB were studied by isoelectrofocusing and immunoblotting. Immunophenotyping of CSF leukocyte subsets was analyzed by flow cytometry. Intracellular cytokine production by T cells was assessed by cell culture and flow cytometry. Levels of light chain neurofilament (NFL), superoxide dismutase, 8-isoprostane, activin A, chitinase-3 like 1 and antibodies against cytomegalovirus were studied by ELISA. Detection of demyelinating lesions, inflammatory activity, plasmablast and plasmatic cells in brain tissue was performed by immunohistochemistry.

Results:

MS patients showed increased number of CD8 T cells secreting TNF- α and INF- γ and B cells compared to other inflammatory and non-inflammatory neurological diseases.

Next, we determined the levels of light chain neurofilament in 127 MS patients and 30 patients without neurological pathology. The control group values allowed setting a cut-off to establish high and normal levels of this protein in the CSF. High levels of this protein identify MS patients with increased MRI lesion load and disability. In addition, they predict the earlier onset of a new relapse in patients with a clinical isolated syndrome.

The presence of OCMB associated with increased levels of CSF NFL, suggesting that these antibodies could exert a deleterious effect in the brain tissue.

Next, we studied the mechanisms associated to the presence of OCBM+. OCBM+ patients showed elevated levels of chitinase 3-like1, a protein associated to microglia and astrocyte activation. Moreover, these patients showed higher numbers of CD4 and CD8 T cells in the CSF and increased Th1 and Th22 responses.

They also showed increased numbers of T independent and dependent B cells, particularly those with memory phenotype and plasmablasts expressing CD5+.

Further, we explored the effect of aging on the immune response in the central nervous system. MS patients showed an age-related increase of Activin A, a protein associated to M1 response produced by macrophages and microglia. When analyzed adaptive immune response we found differences related to the OCBM band status. Patients who lacked OCBM showed a decline of the adaptive immune response in the CSF. The number of CD4+, CD8+ T cells, B cells and dendritic cells, and the number of CD4+ T cells producing TNF- α and IL-22 and CD8+ producing perforin, significantly diminished with aging. In this group of patients, we also found increased levels of chitinase-3 like 1.

In contrast, OCBM+ patients did not show any changes in the CSF adaptive immune response with aging. We only observed an increase of superoxide dismutase with aging, meaning that oxidative stress is up-regulated with age in these patients.

We also found that 40 years is the time point where the the aging effects could be observed. At this age, we also found increased titers of antibodies against cytomegalovirus in BOCM- patient sera, suggesting that the aging effects could be cause by a premature immunosenescence.

Finally, we have detected IgM plasmablasts and plasmatic cells in the meninges of SPMS cases. IgM plasmablasts were associated with the presence of ectopic lymphoid follicles and disease progression.

Conclusions:

MS patients showed higher CSF numbers of B-lymphocytes and of CD8+ T cells producing inflammatory cytokines compared to other neurological diseases, which suggests that these cells could have an important role in the underlying pathology.

On the other hand, we showed that Nf-L levels in the CSF are a good biomarker of axonal damage. We established a cut-off that allow the use of this biomarker in daily clinical practice to identify patients who will have more lesional load and

higher disability suffer early a second relapse after an isolated demyelinating episode.

The presence of OCBM associates with higher Nf-L levels. This reinforces the relationship found between intrathecal IgM synthesis and axonal damage. OCBM also associate with higher production of pro-inflammatory cytokines by T lymphocytes in the CSF, higher numbers of B cells and increased activation of the innate immune response in the CNS. This response is maintained with age. By contrast, OCBM- patients suffer a premature immunosenescence, with a drastic drop of the adaptive immune response. Changes can be observed since the age of 40.

This work contributed to understand the shift on the inflammatory response associated with aging in MS. This could be an important factor in the future for accurate therapeutic decisions.

Finally, the presence of IgM in the meninges on SPMS patients linked to disease progression supports the role of the IgM on the pathology of the disease and the association with a poor outcome.

1. INTRODUCCIÓN

La esclerosis múltiple es una enfermedad crónica del sistema nervioso central (SNC) que afecta aproximadamente a 2.5 millones de individuos en el mundo. Se caracteriza por presentar inflamación, desmielinización, y neurodegeneración, causa del déficit permanente de los pacientes. Principalmente, la enfermedad afecta a adultos jóvenes (20-40 años), y su prevalencia es mayor en mujeres, con un cociente aproximadamente de 2-3:1.

El impacto social y económico de la enfermedad es muy alto al ser 30 años, la media de comienzo de la enfermedad, una edad decisiva para la vida laboral y planificación familiar.

La mayoría de los pacientes debutan con la forma recidivante-remitente (RR), en el que las recidivas son seguidas por periodos de remisión completa o parcial. De los pacientes con EMRR, el 65% evolucionan a una fase secundaria-progresiva, caracterizada por un aumento gradual de la discapacidad con o sin recidiva ocasional. Aproximadamente el 10% de los pacientes con EM, presenta un curso progresivo desde el comienzo, acompañando en ocasiones para actividad clínica o radiológica. Lo que realmente caracteriza esta fase es el empeoramiento de la discapacidad independiente de la actividad.

La presentación de la enfermedad es heterogénea, pudiendo iniciarse síntomas sensoriales visuales, disfunciones motoras, fatiga y déficits cognitivos.[1] Las manifestaciones clínicas se correlacionan con la localización de las lesiones en el SNC. También hay gran disparidad entre pacientes en el curso de la enfermedad (gravedad y frecuencia de los brotes y evolución de la discapacidad). La heterogeneidad también se observa en la histología de la enfermedad, los patrones de desmielinización son diferentes en los distintos pacientes.[2] Las razones por las que esto ocurre se desconocen aún en parte.

1.1 HISTORIA DE LA ESCLEROSIS MÚLTIPLE:

Las primeras descripciones de la EM se deben a Robert Carswell en el año 1838 y a Jean Cruveilhier en el año 1841.[3, 4] Sin embargo, fue Jean-Martin Charcot (1825-

1893) quien realizó la primera descripción clínica completa de la enfermedad y la primera correlación anatomoclínica.[5]

Las primeras hipótesis acerca de la etiología de la EM las realizó Pierre Marie en el año 1884, sugiriendo un origen infeccioso tras observar que la sintomatología de la enfermedad se agudizaba después de infecciones o estados febriles.[6] El concepto de EM como enfermedad autoinmune lo introdujo Thomas River el año 1935, tras conseguir un modelo experimental de la esclerosis múltiple, encefalitis autoinmune experimental (EAE), mediante la inoculación de tejido neural en animales de experimentación.[7] Dichas investigaciones se respaldaron tras el estudio del líquido cefalorraquídeo (LCR). La técnica de la punción lumbar fue introducida por Quinke y Winter a finales del siglo XIX. [8, 9] Kabat *et al.* en 1942, fueron los primeros que encontraron un aumento de IgG en LCR mediante técnicas de electroforesis.[10]

Desde el punto de vista clínico, un hecho importante, fue la introducción de Kurtzke en el año 1955 de una escala que permitía medir el grado de afectación del paciente. [11] Además, la introducción de la resonancia magnética (RM), ha constituido uno de los grandes avances, permitió identificar las lesiones desmielinizantes en el sistema nervioso central.[12]

1.2. EPIDEMIOLOGÍA

La prevalencia de la enfermedad varía considerablemente en todo el mundo, siendo las zonas más afectadas Europa, Estados Unidos, Japón, Australia y Nueva Zelanda. La mayor frecuencia de la enfermedad se da entre los 40 y 60º de latitud norte y ocurre algo similar en el hemisferio sur. Kurtzke fue el primero en describir las distintas zonas de prevalencia en los años 1970-1980, zonas de riesgo alto (>30 casos por cada 100 000 habitantes), de riesgo medio (de 5 a 25 casos) y de riesgo bajo (<5 años).[13] La tasa de prevalencia ha aumentando desde esta primera clasificación y actualmente se clasifica de la siguiente forma: alto >100, medio de 50 a 100 y bajo <50.

En el sur de Europa y en España la prevalencia ha aumentando en las dos últimas décadas a expensas casi exclusivamente de las mujeres. En España la prevalencia se sitúa alrededor de los 100-125 casos por cada 100.000 habitantes, por lo que se incluye dentro de los países con prevalencia alta.[14, 15]

1.3 ETIOLOGÍA

A pesar de que se desconoce la causa exacta que desencadena la enfermedad, la información de la que se dispone permite agrupar a la EM dentro de las llamadas enfermedades con fisiopatología autoinmune. Se sabe que el origen de la enfermedad es multifactorial, intervienen tanto factores ambientales como genéticos. El reto actual es saber que factores contribuyen en cada categoría.

1.3.1 Factores genéticos:

La idea de que los factores genéticos podrían estar involucrados en la enfermedad se planteó con los estudios de agregación familiar.[16] El riesgo de padecer EM ajustado por edad varían dependiendo del parentesco con el enfermo estudiado. [17] Mientras que para la población general es de alrededor del 0,1%, los familiares en primer grado de los pacientes con EM tienen un riesgo del 3 al 5%. [18] que aumenta hasta el 30% en gemelos monozigóticos.[19] Sin embargo, los hijos adoptivos y los esposos de los sujetos afectados no tienen mayor riesgo de padecer EM que la población general. [20] Todo lo anterior demuestra que el riesgo de padecer EM es multifactorial y que los factores genéticos per se no justifican la aparición de la enfermedad.

Hace más de treinta años se describió la primera asociación genética de la EM con el complejo mayor de histocompatibilidad localizado en el cromosoma 6.[21] La región de clase II de este sistema se asocia fuertemente con la EM, en particular el alelo HLA-DR2 y su correspondiente haplotipo DR15.[22, 23] En el último GWAS, encontraron que el alelo HLA-DRB15*01 tenía la mayor asociación con la enfermedad.[24]

Además de los genes localizados en la región HLA, hay múltiples genes que se asocian de forma modesta con la susceptibilidad de padecer la enfermedad. La

mayoría de los genes identificados están relacionados con el sistema inmune, sobre todo con moléculas involucradas en la proliferación y activación de linfocitos T. Entre ellos destacan el receptor de TNF 1 (TNFR1)[25], el gen que codifica la cadena α de la IL-2 [26-28] e IL-7 [29] o la señalización por Nf- κ B.[30]

1.3.2 Factores ambientales:

Los factores genéticos solo podrían explicar una pequeña proporción de las variaciones que hay en la prevalencia de la enfermedad. Esta también se puede asociar con la exposición a diversos factores ambientales como la exposición solar, la infección por el virus Epstein Bar o HHV-6, tabaco, vitamina D entre otros.[31]

La vitamina D es de uno de los factores ambientales que más se ha asociado con la esclerosis múltiple en los últimos años.[32] Son muchas las evidencias que apoyan el papel de la vitamina D como factor protector a padecer la enfermedad. Se ha observado que existe una correlación inversa entre la prevalencia de EM y la exposición solar y los niveles de vitamina D.[32] Esta correlación parece deberse a su metabolito activo la 25-hydroxivitamina.[33] Además, niveles bajos de esta vitamina también se han asociado con mayor actividad y progresión de la enfermedad.[34, 35]

La posible asociación de la enfermedad con agentes infecciosos, principalmente virus, también se baraja en los estudios epidemiológicos de la enfermedad. Distintos datos demuestran una asociación con el virus de Epstein-Barr(EBV). Aunque el 90% de la población general muestra anticuerpos frente EBV, títulos altos de estos anticuerpos se han correlacionado con un riesgo mayor a padecer EM, al igual que la co-infección por dos cepas distintas del virus [36]o el haber padecido mononucleosis infecciosa.[31, 37] Una hipótesis del posible efecto del EBV en la EM es que la migración al SNC de los linfocitos B infectados por este virus active a linfocitos T efectores en las meninges y espacios perivasculares expresando proteínas virales que podrían activar a linfocitos T efectores.[38, 39] Sin embargo, todavía hay controversia sobre la presencia de RNA EBV en el tejido y LCR.[38] La segunda hipótesis postula que la infección por EBV provocaría una desregulación

del sistema inmune, ya que la infección por EBV también se ha asociado con el riesgo a padecer otras enfermedades autoinmunes. [40]

La EM también se ha asociado con otro virus, entre ellos el Herpes virus 6 (HHV-6). El DNA de este de virus se ha detectado tanto en el cerebro de pacientes con EM, como en el LCR y suero de los pacientes.[41-44] La EM también se ha asociado con otro virus, entre ellos el Herpes virus 6 (HHV-6). Además, nuestro grupo detectó la presencia de IgG frente a proteína MCP del HHV-6 en LCR de pacientes con EM. Así mismo, los títulos de anticuerpos de este virus en suero se correlacionan con la aparición de un nuevo brote [45, 46]

Otro factor ambiental relacionado con la EM es el tabaco. El consumo de cigarrillos aumenta la susceptibilidad de padecer la enfermedad.[47] Además, los fumadores pueden experimentar una enfermedad más grave con mayor frecuencia de brotes y mayor discapacidad.[48, 49] El riesgo de conversión a EMSP es mayor en los pacientes fumadores. [50]

La obesidad también es un factor de riesgo de conversión a EM. Estudios observacionales han mostrado como un índice de masa corporal (IMC) elevado en la adolescencia y niñez se asocia con mayor riesgo a desarrollar la enfermedad.[51, 52]

Hábitos alimenticios como el alto consumo de sal se han asociado con la enfermedad. El consumo de sal se ha correlacionado con un aumento en la actividad clínica y en resonancia en adultos con EMRR. [53] Sin embargo, en EM pediátrica no han encontrado asociación entre consumo alto de sal y la tasa de brotes.[54]

1.4 FORMAS CLÍNICAS DE LA ENFERMEDAD:

Aunque el curso de la enfermedad y la sintomatología son heterogéneos, se han identificado distintos perfiles de presentación y curso de la enfermedad que han permitido clasificarla en distintas formas.[55]

Se ha añadido el Síndrome clínico aislado (SNA), y se ha eliminado la EM progresiva primaria. Todas las formas son subcategorizadas como activas y no activas.[56]

La EM activa se define como la aparición de una recaída clínica, o la presencia de nuevas lesiones T2 o captantes de Gadolinio en T1, durante un período de tiempo especificado, preferiblemente al menos un año.

Una subcategoría adicional para los pacientes con EM progresiva diferencia entre aquellos que han mostrado signos de progresión de la discapacidad durante un periodo de tiempo determinado, y aquellos que se han mantenido estables.

El término “empeoramiento” se recomienda para describir a los pacientes cuya enfermedad está avanzando por cualquier razón, mientras que “progresión de la enfermedad” debe reservarse para aquellos con enfermedad progresiva que están progresando verdaderamente (frente al empeoramiento de una recaída).

1.4.1 Esclerosis múltiple recidivante-remitente (EMRR)

La forma más común de presentación de la enfermedad es la esclerosis múltiple remitente recidivante (EMRR). Afecta aproximadamente el 85% de los pacientes, se caracteriza por episodios de disfunción neurológica seguidos de un periodo de recuperación completa o parcial. Los primeros síntomas suelen aparecer entre los 20 y 40 años. Estos pacientes, como dijimos antes, se subdividen en aquellos que tienen actividad clínica y/o radiológica, y los que no siguen activos

Un grupo cada vez más reducido de pacientes, cuando empieza la enfermedad no cumple criterios de EM, es el llamado síndrome neurológico aislado (SNA). Se reconoce como tal la primera manifestación clínica de la enfermedad que muestra características de desmielinización inflamatoria que podría ser EM, pero todavía no cumple criterios de dispersión en tiempo. Cuando estos pacientes tienen nueva actividad, pasan al grupo de EMRR

Fenotipo recidivante: subclasificación

Síndrome desmielinizante aislado

-No activo

-Activo

EMRR

-No activa

-Activa

1.4.2 Esclerosis múltiple progresiva

En este grupo se incluyen las formas que antes se conocían como secundariamente progresivas (aquellas que comienzan como formas con brotes) y primariamente progresivas (caracterizadas por un comienzo progresivo de la enfermedad), constituyen entre un 10-15% de los pacientes con EM). La EM progresiva suele comenzar en la cuarta o quinta década de vida.[57] Se caracteriza por presentar un empeoramiento gradual de los síntomas con o sin periodos de remisión. Se subdivide en activa o no activa a su vez dependiendo de si los pacientes presentan actividad clínica (brotes) o en resonancia (nuevas lesiones en T2 o lesiones captantes de gadolinio).[58]

Enfermedad progresiva. Sub-clasificación:

-Activa y con progresión

-Activa pero sin progresión

-No activa pero con progresión

-No activa y sin progresión (enfermedad estable)

1.5 DIAGNÓSTICO

El diagnóstico de la EM es fundamentalmente clínico, basado en síntomas y signos de afectación del SNC, que afectan diversos territorios, y espaciados en el tiempo (lo que se denomina diseminación espacial y temporal), siempre que hayan sido excluidas causas alternativas.

No existe, en el momento actual, ninguna prueba patognomónica de la enfermedad. Hay numerosas enfermedades, localizadas o sistémicas, que afectan al SNC, tanto clínica como radiológicamente similares a la EM: infecciosas, autoinmunes, metabólicas, degenerativas que plantean un diagnóstico diferencial, a veces complejo, y para lo cual necesitamos ayuda de pruebas complementarias inmunológicas, microbiológicas y bioquímicas, para descartar metabolopatías, infecciones y otras enfermedades autoinmunes.

Existen pruebas paraclínicas esenciales para hacer el diagnóstico más certero, precoz y preciso. Estas herramientas son el estudio del LCR, la RM cerebral y medular, y los potenciales evocados.

1.5.1 Resonancia magnética:

La sensibilidad de la RM en la detección de las placas de desmielinización es de alrededor del 95%. Sin embargo su eficacia está limitada por su inespecificidad, debido a que a veces no distingue entre lesiones por isquemia, edema, inflamación o desmielinización. A pesar de ello, las imágenes de RM permiten evaluar la actividad de la enfermedad, su evolución clínica, la respuesta a tratamiento y el grado de discapacidad del paciente.

1.5.2 Potenciales evocados:

Los potenciales evocados se utilizan para evaluar la conductividad de los impulsos eléctricos en el SNC tras la estimulación de un órgano sensitivo o sensorial periférico. Estas señales se bloquean o se retardan cuando circulan a través de fibras desmielinizadas, de manera que los potenciales evocados recogidos en esta zona pueden encontrarse atenuados, ausentes o retrasados. Los potenciales

evocados tampoco son específicos pero su utilidad se debe a que permite la detección y determinación de las lesiones en el SNC que no se manifiestan clínicamente.

1.5.3- Estudio de LCR

El hallazgo fundamental en el LCR de los pacientes con EM es la detección de síntesis intratecal de IgG que se presenta en el 96% de los pacientes. La síntesis de IgG dentro del SNC se puede estudiar por métodos cualitativos o cuantitativos. Los métodos cuantitativos se basan en la determinación de una serie de índices. Los más utilizados en la práctica clínica son el índice cuantitativo de Tourtellote [59] y los índices semicuantitativos de Reiber[60] y de Tibbling[61]. Todos ellos tienen en cuenta la función de la barrera hematoencefálica al introducir en su fórmula el cociente de albúmina LCR/suero que debe ser menor de 0.7 en individuos sanos. El más sencillo es el índice de IgG cuya fórmula es:

$$(IgG_{LCR}/IgG_{suero})/(Albúmina_{LCR}/Albúmina_{suero})$$

Los valores normales se sitúan entre 0.3-0.7. Por encima de 0.7 indican síntesis intratecal de IgG. La albúmina es una proteína que se sintetiza exclusivamente en el hígado y que sirve como indicador de la integridad de la barrera hematoencefálica (BHE). Si aumenta la IgG del LCR por difusión desde la sangre, también lo haría la albúmina permaneciendo el cociente dentro de unos límites normales, entre 0.3-0.7. Si en cambio, se produce una síntesis de IgG dentro del SNC tendremos niveles aumentados de IgG en LCR pero no de albúmina de manera que se produce un aumento del cociente por encima de 0.7.

Los métodos cualitativos son los más sensibles y se basan en la detección de bandas oligoclonales de IgG en el LCR de los pacientes. Sin embargo, al igual que el resto de pruebas complementarias no es patognomónico de la enfermedad. Además de en la EM, también podemos encontrarnos con un patrón de bandas positivo en algunas infecciones del SNC.

1.5.4 Criterios diagnósticos:

A lo largo de los años, ha habido diferentes propuestas de criterios diagnósticos para la EM. Los más utilizados fueron los establecidos por Poser et al (1983). Ante las evidencias crecientes de la importancia de iniciar un tratamiento temprano, un comité presidido por McDonald propuso nuevos criterios diagnósticos en el año 2000. Actualmente se utiliza la revisión de los criterios diagnósticos de McDonald 2010.[62] Se basan en la diseminación en espacio y en el tiempo de las lesiones, valoradas mediante la aparición de brotes o por RM. Esto último ha acelerado el diagnóstico de la enfermedad. La diseminación en el espacio se puede demostrar con la presencia de al menos dos lesiones en T2 en los territorios considerados característicos de la EM (yuxtacortical, periventricular, infratentorial y medular). La diseminación en el tiempo se demuestra por la aparición de una nueva lesión en T2 y/o una lesión captantes de gadolinio en comparación con una resonancia previa o por la presencia simultánea en RM de lesiones captantes y no captantes.

Los últimos criterios de McDonald dan una menor importancia al análisis de LCR, sin embargo, esta prueba sigue siendo de gran utilidad para el diagnóstico de la EM y la única herramienta para evidenciar el origen inflamatorio de la enfermedad. Es muy útil para diferenciarla EM de neuromielitis óptica y como factor de pronóstico de síndrome neurológico aislado, en muchos casos tiene un valor predictivo mayor que la RM.

1.6 NEUROLOGÍA:

La esclerosis múltiple se caracteriza por la aparición de lesiones focales que se denominan placas, en la sustancia blanca y en las zonas corticales y subcorticales de la sustancia gris, en las que hay una pérdida de mielina (desmielinización) con preservación relativa de los axones, con un grado variable de daño axonal. [63-65]

1.6.1 Desmielinización en la sustancia blanca:

Las lesiones en la sustancia blanca suelen ser múltiples y se localizan en diferentes zonas del SNC, son perivenulares y se localizan más frecuentemente en zona periventricular, nervio óptico y médula espinal. Su tamaño es variable, en general

suele ser inferior a 1,5 cm de diámetro, y a veces suelen coalescer formando placas de mayor tamaño. [66]

Las lesiones desmielinizantes se pueden clasificar en activas, crónicas activas/inactivas y lesiones en remielinización o placas en “sombra”, que se hallan en diferentes estadios evolutivos. [67]

Las lesiones activas se caracterizan por un importante infiltrado inflamatorio, en el que están presentes linfocitos T, linfocitos B, anticuerpos y macrófagos/microglía activada. En ellas aparecen restos de mielina, producto de la digestión por parte de macrófagos. [68] La lesión aguda presenta bordes mal definidos.

La lesión crónica se caracteriza por tener poca actividad inflamatoria y márgenes definidos. En estas lesiones hay una gran pérdida de vainas de mielina y de oligodendrocitos, mostrándose axones desmielinizados, en ocasiones degenerados. Además las crónicas activas se caracterizan por la presencia de microglía activada en el borde de la lesión.[69]

En algunos casos se detecta remielinización parcial, observándose la existencia de oligodendrocitos o de sus prolongaciones y de axones finamente mielinizados. Esto sucede en las placas en sombra.[70]

1.6.2. Lesiones en la sustancia gris:

La patología de la sustancia gris comenzó a tenerse en cuenta desde la última década, debido a que las técnicas inmunohistoquímicas utilizadas anteriormente subestimaban la extensión de las lesiones en la sustancia gris. Ahora se sabe que el volumen de desmielinización puede superar incluso al de la sustancia blanca.[67]

Las lesiones neocorticales se pueden clasificar en tres tipos dependiendo de su localización y extensión: lesiones tipo I o leucocorticales que abarcan tanto la sustancia blanca como la sustancia gris; lesiones tipo II o intracorticales, que son lesiones que se encuentran dentro de la sustancia gris, y las lesiones tipo III o subpiales que se extiende desde la pía hasta distintas zonas de las de las láminas corticales.[71] La mayoría de las lesiones corticales en pacientes con EM son subpiales.[72] En comparación con las lesiones activas de la sustancia blanca, las

lesiones en la corteza contienen relativamente un número menor de células inflamatorias.[73] Esto puede reflejar el estado crónico de las lesiones, porque en biopsias de pacientes en estadios tempranos de la enfermedad, el número de células del sistema inmune es más abundante. Las lesiones corticales se asocian con inflamación en la leptomeninges, que pueden ser difusa u organizada formando folículos linfoides ectópicos.[74] Las lesiones corticales se asocian con mayor gravedad y mortalidad.[75]

1.6.3 Sustancia blanca y gris aparentemente normal

El estudio de la sustancia blanca y gris aparentemente normal ha mostrado que también hay cambios tanto celulares como moleculares sugiriendo que hay déficits en el transporte axonal. A menudo, se encuentran cambios en los nódulos de Ranvier, y disfunción axonal. El daño neuronal en estas zonas es independiente de la desmielinización local.[76, 77] Los análisis realizados hasta ahora sugieren que la disfunción axonal se debe a un mayor estrés oxidativo y activación de la microglía. [78]

1.7 FISIOPATOLOGÍA

La esclerosis múltiple se considera una enfermedad de naturaleza autoinmune. La hipótesis más aceptada postula que linfocitos T autorreactivos desencadenarían la respuesta inflamatoria. La activación de estas células se podría generar a través de mimetismo molecular (epítomos compartidos por la mielina y posibles agentes infecciosos) o través de superantígenos virales o bacterianos.

En los órganos linfoides periféricos, las células T autorreactivas interactúan con las células presentadores de antígenos (CPA), con células B que también podrían actuar como CPA y linfocitos T CD8+. Una vez activadas, activan a los linfocitos T CD8+ y a los linfocitos B y todas ellas expresan moléculas de adhesión que les permiten traspasar la BHE.

En el sistema nervioso central, al ser expuestas de nuevo al antígeno por las CPA, son reactivadas iniciando una reacción inflamatoria mediante la secreción de citoquinas pro-inflamatorias como IFN- γ , TNF- α , IL-17. Estas citoquinas a su vez

desencadenan la activación de macrófagos y microglía que secretan quimiocinas que inducen el reclutamiento de otros linfocitos T CD4+ y linfocitos B, linfocitos T CD8 y monocitos hacia el SNC. Estas células promueven la desmielinización y el daño de oligodendrocitos y neuronas. Estos procesos son mediados mediante contacto celular (linfocitos T CD8+ citotóxicos), por el depósito de inmunoglobulina-complemento o través de mediadores neurotóxicos solubles.

Como consecuencia del daño tisular se liberarían nuevos antígenos que producen la diseminación de epitopos y se amplían las dianas de los linfocitos T.[79]

A continuación se detallan las principales poblaciones leucocitarias que participan en la enfermedad.

1.7.1 Linfocitos T CD4

La presencia de linfocitos T en las lesiones del SNC [80] y la asociación entre el riesgo de padecer EM y la región de HLA,[81] hizo pensar que estas células jugaban un papel predominante en la fisiopatología de la enfermedad. Además, la demostración de que transfiriendo linfocitos T CD4+ que reconocen antígenos de la mielina es suficiente para inducir encefalitis experimental autoinmune (EAE) en ratones,[82] hizo que linfocitos T CD4+ fueran la principal población investigada en relación con la EM durante años. En pacientes con EM se ha detectado en sangre linfocitos T CD4 que reconocen la proteína básica de la mielina (MBP) y la glicoproteína de la mielina de los oligodendrocitos (MOG), sin embargo, también se han detectado en individuos sanos. [83, 84]

Entre las células CD4 efectoras más importantes involucradas en la patología se encuentra las involucradas en las respuestas Th1 y Th17.[85, 86] Las células Th1, se diferencian tras la activación por la citoquina IL-12, se caracterizan por la expresión del factor de transcripción Tbet, el cual controla la expresión génica de IFN- γ y otras moléculas implicadas en la respuesta inflamatoria.[87, 88] Las células Th17, se activan a través de la liberación de IL-23, IL-6, TGF- β , se caracterizan por expresar el factor de transcripción Ror γ t que favorece la expresión de la IL-17. [89] Se ha observado que ambas poblaciones participan en la fisiopatología de la

enfermedad.[90-92] Promueven la activación de microglía, macrófagos, astrocitos, linfocitos B y linfocitos T CD8+ a través de la producción de citoquinas y factores de crecimiento promoviendo la neurodegeneración.[93, 94]

También se considera que en la esclerosis múltiple existe un desequilibrio en los linfocitos T reguladores. Su función es impedir la proliferación de linfocitos T autorreactivos y controlar la inflamación a través de la secreción de citoquinas anti-inflamatorias.[95] La transferencia adoptiva de linfocitos T reguladores previene el desarrollo de EAE. Así mismo se ha visto que la aparición de respuestas reguladoras adecuadas se asocia con la resistencia a la EAE. [96]

En la EM, la frecuencia de linfocitos T reguladores es igual que en controles sanos, sin embargo, tienen menor expresión de FoxP3 y su capacidad de inhibición de la proliferación de linfocitos T CD4+ es menor.[97]

1.7.2. Linfocitos T CD8

La mayoría de los estudios llevados a cabo para determinar la inmunopatogenia de la enfermedad se han centrado en el papel de los linfocitos T CD4. Sin embargo, ya en los años 80 se describió que los linfocitos T CD8+ son los más abundantes en las lesiones.[98, 99] Los linfocitos T CD8 necesitan para ejercer su función citotóxica que la célula diana exprese el MHC-I. En condiciones normales el MHC-I sólo lo expresan la microglía/macrófagos y células endoteliales en el SNC. Sin embargo, en la EM aumenta la expresión de MHC-I por astrocitos, oligodendrocitos y neuronas dependiendo de la actividad de la enfermedad.[100] Un estudio *in vitro* mostró como la liberación de IFN- γ y TNF- α induce la expresión de MHC-I en neuronas.[101]

El número de linfocitos CD8+ en las lesiones se asocia con el daño axonal.[102] Los mecanismos efectoros de estas células podrían darse a través de la liberación de enzimas citolíticas (perforina y granzima B) y liberación de moléculas pro-inflamatorias como IFN- γ . [103-105]

Otro hecho que apoya la implicación de los linfocitos T CD8+ en la EM, es la expansión clonal de estas células, en el SNC y en LCR y sangre de los pacientes. A veces estos clones perduran más de cinco años.[106, 107]

1.7.3 Linfocitos B

Cada vez son más las evidencias que avalan la implicación de los linfocitos B en la fisiopatología de la enfermedad. Más del 95% de los pacientes con EM presentan bandas oligoclonales IgG en el LCR. [108] En las lesiones también se ha identificado anticuerpos y complemento.[2] Además, la eficacia del tratamiento con anticuerpos que reconocen CD20 y eliminan a los linfocitos B, muestra que estas células juegan un papel importante en la enfermedad. [109, 110] Sin embargo, este tratamiento no elimina las células plasmáticas, ni inhibe la síntesis intratecal de IgG al menos a corto plazo.[111] Estos resultados indican que los linfocitos B pueden ejercer otras funciones relevantes en la EM como la de células presentadora de antígeno a linfocitos T. En este sentido, Harp *et al.* describieron que los linfocitos B son buenos presentadores de neuro-antígenos a linfocitos T.[112] Además, los linfocitos B pueden secretar citoquinas pro-inflamatorias como TNF- α , GM-CSF, IL-6 o citoquinas anti-inflamatorias como la IL-35 e IL-10.[113, 114] En la EM, parece que los linfocitos B estarían polarizados a un fenotipo más pro-inflamatorio, mientras que su función reguladora podría ser defectuosa.[115, 116] Por tanto, los linfocitos B contribuyen a través de diferentes mecanismos a la fisiopatología de la enfermedad.

La presencia de linfocitos B se puede detectar en grado variable LCR, meninges, y en el parénquima cerebral. En LCR la mayoría de los linfocitos B tienen un fenotipo de memoria y de plasmablastos de vida corta. Además, un aumento en el porcentaje de estas células se ha asociado con una mayor progresión de la enfermedad.[117] El papel de estos anticuerpos en la fisiopatología de la enfermedad ha sido demostrado en diversos sistemas experimentales. Nuestro grupo ha demostrado que los anticuerpos IgG e IgM se co-localizan en axones y oligodendrocitos y fijan complemento lo que facilita la fagocitosis por los macrófagos presentes en las lesiones. [118]

Además, también se ha identificado la presencia de zonas ricas de linfocitos B en las meninges de los pacientes con EM, principalmente en formas secundariamente progresivas.[119] Dichos linfocitos B forman estructuras que se parecen a folículos

linfoides y a las que se ha denominado como “folículos linfoides ectópicos”. Su detección se ha asociado con mayor progresión de la enfermedad y mayor daño tisular.[78] Aunque estas estructuras en principio se describieron en formas tardías de la enfermedad, más tarde en biopsias de pacientes con formas atípicas también se ha identificado folículos linfoides ectópicos en las meninges.[120] Además estudios de imágenes por RM demuestra que hay un aumento en el contraste en las leptomeninges en una parte de los pacientes con EMRR. [121, 122]

Distintos trabajos, han identificado los mismos clones de linfocitos B en el LCR, meninges y parénquima cerebral de los pacientes con EM.[123, 124] En un estudio posterior compararon los clones de los linfocitos B presentes en los nódulos linfáticos cervicales, en el parénquima cerebral y en el LCR. Los clones que mostraban mayor maduración se encontraron en las lesiones y en los nódulos linfáticos cervicales. Estos hallazgos demuestran que hay un movimiento bidireccional de linfocitos B a través de la barrera hematoencefálica. [125]

1.7.4 Monocitos/macrófagos y microglía

La microglía y los macrófagos residentes constituyen aproximadamente el 10% de las células del SNC.[126] La microglía se genera a partir de precursores que migran al SNC durante el desarrollo fetal y se encuentra distribuida en el parénquima cerebral. [127] Una de sus principales funciones es mantener la homeostasis en el SNC, eliminando desechos celulares y protegiendo frente a infecciones o inflamación.[128] Tras la exposición hacia una señal de daño, la microglía se activa, perdiendo su conformación ramificada hacia una morfología ameboidea y aumenta la expresión de moléculas asociadas a la presentación antigénica.[129] Dependiendo del microambiente que se genere, la microglía puede polarizarse hacia una fenotipo predominantemente pro-inflamatorio, con la secreción de citocinas pro-inflamatorias, o mas anti-inflamatorio con la secreción de mediadores que ayudarían a la regeneración del daño tisular.

La presencia de microglía y macrófagos activados en la EM se puede detectar desde estadios tempranos de la enfermedad y normalmente se localizan cerca de la lesión.[130, 131] Mediante inmunohistoquímica se ha observado como la microglía

y macrófagos aumentan la expresión de marcadores de activación. [131] En la sustancia blanca aparentemente normal se ha asociado la activación de la microglía con el daño en axones y oligodendrocitos independientemente la proximidad a una lesión o del grado de infiltración linfocitaria. [132]

La microglía y macrófagos activados liberan citoquinas pro-inflamatorias y especies reactivas de oxígeno. La liberación de estas moléculas alteraría el metabolismo de las neuronas.[133] En lesiones corticales activas se han observado neuronas con fosfolípidos oxidados y degradación en el DNA, demostrando que el estrés oxidativo juega un papel en la enfermedad. [134]

1.7.5. Astrocitos

Los astrocitos son las células de la glía más abundantes y con un fenotipo más diverso. Los astrocitos tienen funciones estructurales y metabólicas. También pueden mediar la respuesta inmune innata a través de diversos mecanismos.[135] Entre ellos, regulan la expresión de moléculas de adhesión por las células endoteliales de la BHE que permiten la extravasación de linfocitos al SNC.[136] Pueden producir citoquinas y quimiocinas que atraen a células del sistema inmune,[137] activan la microglía[138] o activan a los linfocitos T.[139]

Los astrocitos perivasculares presentan un daño significativo en las lesiones de EM y podrían no estar ejerciendo su función de mantener la permeabilidad de la BHE.[140] Además, se ha observado la expresión de óxido nítrico (NO) por astrocitos en las lesiones de EM, su liberación induciría la neurotoxicidad.[141] El NO a su vez estimula la liberación de glutamato por astrocitos, [142] provocando disfunción en la actividad mitocondrial de las neuronas y degeneración axonal.

1.7.6 Cambios asociados a la edad en la respuesta inmunológica.

El proceso de envejecimiento provoca cambios en el sistema inmune que afectan su funcionamiento y desarrollo. Ambas ramas de la inmunidad, innata y adaptativa, se ven afectadas por este proceso. La inmunosenescencia ocurre normalmente en individuos mayores de 75 años pero también se ha descrito que puede ocurrir de forma precoz en enfermedades infecciosas crónicas como el VIH.

Los cambios más significativos y estudiados en el sistema inmune se observan en los linfocitos T. Durante esta etapa disminuye el número de células vírgenes, se incrementa el número de células T de memoria y se invierte la relación entre linfocitos T CD4+ y CD8+.[143] Se produce una acumulación de células efectoras disfuncionales activadas con un repertorio limitado, que normalmente reconocen antígenos de infecciones crónicas como CMV. [144]

Además se produce una diferenciación celular con cambios en la expresión en antígenos de superficie. El más característico es el aumento de las poblaciones de linfocitos T CD4 y CD8 que han perdido CD28, una molécula necesaria para la co-estimulación y proliferación celular.[145] Los linfocitos T CD4+CD28^{null} adquieren capacidad citolítica, aumentando la expresión de gránulos de perforina y de citoquinas pro-inflamatorias.[146]

La respuesta humoral disminuye durante el envejecimiento. Los linfocitos B de memoria se caracterizan normalmente por expresar el antígeno CD27. Se ha descrito que durante el envejecimiento aumentan las poblaciones de linfocitos B doble negativos (DN) para CD27 e IgD[147]. Esta población doble negativa de linfocitos B, se cree que está constituida por células B de memorias exhaustas por la continua estimulación en los centros germinales. Se caracterizan por producir más citoquinas pro-inflamatorias de forma basal.[148]

Al principio se creía que no se producían alteraciones en el sistema inmune innato. Sin embargo, también la inmunosenescencia toca esta rama de la inmunidad. Los macrófagos pierden capacidad fagocítica y de producción de citoquinas. Las células dendríticas disminuyen la expresión de moléculas necesarias para la presentación antigénica. [149]

Estudios longitudinales realizados en Suecia en individuos mayores de 80 años han establecido diversos parámetros para monitorizar la inmunosenescencia.[150] Entre ellos una disminución del cociente CD4:CD8, infección por CMV, aumento de linfocitos T CD8CD28^{null}.

En enfermedades infecciosas y autoinmunes crónicas se cree que estos procesos se podrían acelerar debido a la continua estimulación del sistema inmune que se deterioraría de forma precoz.

En la EM se ha visto que el curso de la enfermedad cambia con la edad, lo que parece indicar que también podrían cambiar los mecanismos asociados con la fisiopatología de la misma. Una posible hipótesis para este cambio sería la aparición de una inmunosenescencia prematura y una activación crónica del sistema inmune innato en el SNC. Los cambios observados que apoyan esta hipótesis se detallan a continuación.

En los pacientes con EM se ha observado una expansión de linfocitos T CD4+ CD28^{null}. [151] Estas células mostraron ser autorreactivas porque aumentaron la proliferación celular estimulándolas con la proteína básica de la mielina y también producen mayor cantidad de INF- γ . [152, 153]

En un estudio reciente han estudiado la presencia de poblaciones de linfocitos B senescentes en pacientes con EM menores de 60 años. Se observó un incremento en los linfocitos B CD27-IgD- en sangre y LCR. Estos linfocitos B también mostraban características pro inflamatorias. [154]

Además, la respuesta pro-inflamatoria de la microglía se exagera con la edad, aumentando la producción de TNF- α e IL-6. [155] También muestra cambios morfológicos, con una estructura menos ramificada y mayor hipertrofia citoplasmática. [156]

La función astrocitaria también está afectada por el envejecimiento. El aumento de GFAP y de vimentina son los cambios más comúnmente observados. [157, 158] Además también producen más citoquinas pro-inflamatorias como IL-6. [159]

1.8 TRATAMIENTO

Aunque aun no se ha encontrado la cura para EM, en los últimos 20 años se han desarrollado numerosas terapias que tienen como fin disminuir la aparición de

nuevos brotes, el aumento de discapacidad y atrofia cerebral y la aparición de nuevas lesiones en RM. La mayoría de las terapias actuales están indicadas para el tratamiento de la EMRR mientras que para formas progresivas de la enfermedad las opciones terapéuticas son muy limitadas.

Para el tratamiento de los brotes se utilizan los corticoides, como la prednisona o la metilprednisolona a dosis alta, porque disminuyen la intensidad y la duración de los mismos.

Los primeros fármacos inmunomoduladores que se utilizaron fueron el interferón beta y el acetato de glatiramer. El mecanismo de acción exacto del interferón beta sigue siendo desconocido. Se sabe que polariza la respuesta pro-inflamatoria hacia anti-inflamatoria, promoviendo mecanismos reguladores.[160] El acetato de glatiramer, es un péptido sintético, compuesto por cuatro aminoácidos, que se comprobó que suprimía la inducción de EAE. Su efecto se produce a nivel periférico con la polarización a una respuesta anti-inflamatoria.[161]

Además, en los últimos años se han desarrollado diversas terapias altamente efectivas para el tratamiento de la EM, como natalizumab, que es un anticuerpo monoclonal que reconoce $\alpha 4$ -integrina e impide la migración de los linfocitos al SNC,[162] o alemtuzumab, que reconoce el antígeno CD52. Alemtuzumab induce una reprogramación de la inmunidad adaptativa mediante la depleción linfocitaria.[163]

Otro acontecimiento importante en el tratamiento de la EM, es la introducción de tratamientos orales, entre ellos se encuentra fingolimod, que es un modulador del receptor de la esfingosina-1-fosfato y retiene a los linfocitos activados en los ganglios linfáticos.[164] Teriflunomida disminuye la proliferación de linfocitos activados inhibiendo la enzima mitocondrial dihidro-orotato deshidrogenasa, que cataliza un paso clave en la síntesis *de novo* de bases pirimidínicas, necesaria para la proliferación de linfocitos T y B.[165] Otro fármaco oral aprobado es dimetil fumarato, un agente inmunomodulador cuyo mecanismo de acción no se conoce en su totalidad. Se cree que actúa a través de la activación del factor nuclear-2 (Nrf2). [166]

Además, han culminado la fase de ensayos clínicos dos fármacos de los que se esperan resultados prometedores. Ocrelizumab, un anticuerpo monoclonal que reconoce el antígeno CD20 presente en los linfocitos B y elimina estas células. y Cladribina, un análogo de los nucleósidos purínicos, interfiere en la proliferación de los linfocitos.[167]

Debido al aumento en el arsenal terapéutico y los efectos secundarios de algunas terapias de segunda línea, es muy importante la búsqueda de biomarcadores que permitan identificar de forma precoz aquellos fármacos que presenten el mejor perfil de eficacia y seguridad para cada paciente, posibilitando así la terapia especializada en la enfermedad.

1.9 ESTUDIO DEL LCR

El estudio del LCR ha permitido la identificación de diversas moléculas y células que están alteradas en la enfermedad y a comprender que mecanismos celulares podrían jugar un papel importante en la enfermedad. A continuación expondremos algunas de las proteínas y poblaciones celulares que se han visto alteradas en la EM.

1.9.1 Bandas oligoclonales de IgM

Las bandas oligoclonales IgM (IgM) se detectan en aproximadamente el 40% de los pacientes con EM, y constituyen un marcador de pronóstico desfavorable.[168] La presencia de BOC IgM se ha asociado con una evolución más rápida a EMSP y una mayor probabilidad de alcanzar EDSS 6.[169, 170] Más tarde nuestro grupo describió que el 80% de las BOC IgM reconocían lípidos de la mielina (BOCM).[171] Estos anticuerpos se asocian más claramente con un peor pronóstico de la enfermedad que las BOC de IgM totales. [171, 172]. Además la presencia de BOCM se relaciona con mayor volumen lesional en T2 y con una mayor atrofia cerebral.[173]

Las BOCM también pueden ser utilizadas como biomarcador de respuesta a tratamiento. Se han asociado con una respuesta subóptima al tratamiento con interferón beta.[174, 175] Además, la presencia de BOCM reduce el riesgo a padecer LMP en pacientes tratados con natalizumab.[176]

1.9.2. Neurofilamentos.

Los neurofilamentos forman parte del citoesqueleto del axón, su función está relacionada con mantener la estructura y el transporte de moléculas. Los neurofilamentos están formados por tres subunidades, los neurofilamentos de cadena ligera, los neurofilamentos de cadena intermedia y los neurofilamentos de cadena pesada. Cuando hay un daño en el axón se liberan estas proteínas al medio y su cuantificación en LCR refleja el mismo. Como biomarcadores de daño axonal se han estudiado los de cadena ligera y los de cadena pesada. Sin embargo, la reproducibilidad de los resultados es mayor con la cuantificación de los de cadena ligera.[177] La concentración de estas proteínas se ha relacionado con mayor discapacidad, atrofia cerebral y con la progresión de la discapacidad.[178-180] Podrían ser marcadores de respuesta a tratamiento, ya que en pacientes tratados con natalizumab o fingolimod hay un descenso de los niveles de Nf-L en el LCR.[181, 182] Sin embargo el tener que determinarlos en LCR disminuye su valor para el seguimiento del tratamiento en la clínica. También se ha intentado establecer a los Nf-L como marcador de la aparición de un segundo brote tras un primer episodio desmielinizante, sin embargo se han obtenido resultados contradictorios.[183]

1.9.3 Chitinase 3 like-1 protein

La *chitinase 3 like 1* (CHI3L1) es un miembro de la familia de las glicosil-hidrolasas, es capaz de unirse a la quitina pero no tiene capacidad de hidrolizarla. La CHI3L1 la expresan diferentes tipos celulares como condrocitos, macrófagos y neutrófilos.[184] Se desconoce su función pero se ha implicado en diversas enfermedades inflamatorias y en neoplasias.[185-187] Se cree que puede tener un papel en la remodelación tisular y en la inflamación.[188] En la EM mediante tinción inmunohistoquímica e hibridación *in situ* se ha localizado en los astrocitos y microglía activada presentes en las lesiones.[189]

Los niveles de CHI3L1 en LCR son un marcador pronóstico de conversión de SNA a EMCD.[189, 190] Además, podría ser un marcador de progresión de la discapacidad.[191, 192]

1.9.4. La proteína ácida fibrilar glial

La proteína ácida fibrilar glial (GFAP) es un componente del citoesqueleto de los astrocitos. La cuantificación de esta proteína en LCR es un marcador de astrogliosis y daño de los astrocitos.[193] Los niveles de GFAP se han asociado con la acumulación de la discapacidad de forma mas temprana a corto y a largo plazo.[191, 194] Los pacientes con formas progresivas de la enfermedad también muestran niveles mas altos de esta proteína.[195]

1.9.5 Poblaciones celulares:

Linfocitos T CD4+

Los linfocitos T son la población celular mayoritaria en LCR, principalmente los CD4+. La mayoría de los linfocitos T CD4+ de LCR tienen un fenotipo de memoria central [196] o efectora.[197] Gracias a la terapia con natalizumab, un anticuerpo que se une a la integrina VLA-4, se sabe que esta es una de las principales moléculas implicadas en la migración de estos linfocitos al SNC. Además, la expresión del receptor de la fractalquina también podría contribuir a ello ya que se ha observado un aumento de esta proteína en linfocitos T CD4 de LCR.[198]

Se ha descrito que los pacientes con EM muestran más linfocitos T reguladores en LCR en comparación con otras enfermedades neurológicas no inflamatorias. Este incremento aumenta durante los brotes.[199-201]

Se ha analizado el TCR para estudiar la expansión clonal de linfocitos T CD4+ en LCR y sangre en pacientes con EM y controles. Se ha observado que hay mayor expansión clonal en pacientes con EM en los dos compartimientos en comparación con controles. Pero en los pacientes con EM la expansión clonal es mayor en LCR. Además, no compartían los mismos clones en sangre y LCR. [202]

Linfocitos T CD8+

La mayoría de los linfocitos T CD8+ en pacientes con EM son efectores.[203] Además, al igual que sucedía con los CD4+, se observa una expansión clonal de

estas células en el LCR.[204] Un estudio reciente, observó que los mismos clones también se pueden detectar en sangre y en el SNC.[103]

Linfocitos B

Los linfocitos B no suelen detectarse en LCR en patologías no inflamatorias, mientras que en la EM están presentes en número variable. La mayoría de los linfocitos B muestran un fenotipo de memoria o son plasmablastos.[205] Un porcentaje alto de linfocitos B se ha asociado con un mayor índice de progresión y con la actividad de la enfermedad.[117, 205, 206] Además en LCR hay un aumento de la quimioquina CXCL13 que está involucrada en el reclutamiento de linfocitos B.[207] También, se ha encontrado en LCR linfocitos B que pertenecen a la respuesta T independiente y se han correlacionado con mayor actividad de la enfermedad.[208, 209] Esta población se ha asociado con la presencia de bandas oligoclonales IgM.[210]

Se ha secuenciado la región variable de la cadena pesada de las inmunoglobulinas en linfocitos B de sangre y LCR en cinco pacientes. Encontraron las mismas secuencias en linfocitos B de memoria y plasmablastos.[211]

Monocitos

La proporción de monocitos en LCR es mucho más baja en comparación con la de sangre en la EM, [212] e inversamente proporcional a la proporción de linfocitos B.[117] El cociente entre linfocitos T CD4 y monocitos en LCR podría ser un biomarcador de conversión temprana de SNA a EM.[213] Además, un estudio reciente analizó las poblaciones de monocitos presentes en LCR. Los pacientes con EM tenían invertido el cociente entre monocitos CD16+:CD16- en comparación con la sangre. Además, mostraban la presencia de los monocitos CD16+ en los espacios perivasculares en las lesiones del SNC. [214]

Células dendríticas

Otra población estudiada en LCR, ha sido la de células dendríticas. Los pacientes con EM en brote muestran una proporción mayor de células dendríticas plasmacitoides que otras enfermedades no inflamatorias y pacientes con EM en remisión.[215]

Células linfoides innatas

Se ha descrito la presencia de células linfoides innatas en LCR en pacientes con EM. Una población casi no estudiada en esta enfermedad. La proporción de estas células es mayor en EM que en individuos sanos y se correlaciona con una mayor pleiocitosis. [216]

2. OBJETIVOS

Los principales objetivos de este estudio fueron:

1. Caracterización de la respuesta inmunitaria en el LCR en pacientes con EM frente a otras enfermedades inflamatorias y no inflamatorias del SNC.
2. Estudio el daño axonal en pacientes con esclerosis múltiple y su asociación con la inflamación.
3. Caracterización de la respuesta inmune adaptativa e innata en pacientes con EM clasificándoles según la presencia de bandas oligoclonales lípido específicas
4. Estudio de los cambios asociados a la edad en mecanismos inmunológicos en pacientes con EM.
5. Detección de células productoras de IgM en tejido cerebral y su correlación con la progresión de la enfermedad.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. MATERIALES Y MUESTRAS BIOLÓGICAS:

3.1.1. Detección de bandas oligoclonales totales y específicas frente a lípidos de mielina.

- Acido clorídrico 36% (Merck)
- Acido sulfúrico 98% (Merck)
- Cloroformo (Merk)
- Dimetilformamida (Merk)
- Ditiotreitól (DTT) (Sigma Aldrich Química SA)
- Sorbitol (Sigma Aldrich Química SA)
- Glicerol (Merck)
- Fosfato dipotásico K_2HPO_4 (Panreac)
- Fosfato monopotásico KH_2HPO_4 (Panreac)
- Hidróxido sódico (Merck)
- Leche desnatada en polvo (Central Lechera Asturiana)
- Suero salino isotónico (FreseniusKabi)
- Tris Base (Sigma Aldrich Química SA)
- Agarosa IEF (GE Healthcare)
- GelBond (GE Healthcare)
- Nitrocelulosa (GE Healthcare)
- PVDF (GE Healthcare)
- Papel Whatman
- Pharmalyte 5-8 (GE Healthcare)

- Pharmalyte 4,2-4,9 (GE Healthcare)
- Pharmalyte 3-10 (GE Healthcare)
- Pharmalyte 8-10.5 (GE Healthcare)
- Anti- IgM humana marcada con biotina(Sigma Aldrich Química SA)
- Anti-IgG humana marcada con fosfatasa alcalina (Jackson Immunoresearch Laboratories)
- Estreptavidina conjugada con fosfatasa alcalina. (Sigma Aldrich Química SA)
- Nitroazul de tetrazolio (NBT) (Sigma Aldrich Química SA)
- Bromo, cloroindoleil fosfato, p-toluidil sal (BCIP) (Sigma Aldrich Química SA)
- Fosfatidilcolina Tipo III-L (Sigma AldrichQuimica SA)
- Fuente para electroforesis EPS 3500 (GE Healthcare)
- Cubetapara IEF Multiphor II (GE Healthcare)
- Baño refrigerador Multitemp II (GE Healthcare)
- Cristales, moldes metacrilato, pinzas

3.1.2. Cuantificación de los índices de IgG e IgM y el cociente de albumina en las muestras de LCR y suero.

- IMMAGE Immunochemistry Immunoglobulin G (Beckman Coulter)
- IMMAGE Immunochemistry Immunoglobulin M (Beckman Coulter)
- IMMAGE Immunochemistry Albúmina (Beckman Coulter)
- Nefelómetro IMMAGE 800 (Beckman Coulter)

3.1.3. Estudio de las poblaciones de leucocitos en el LCR.

Los anticuerpos monoclonales utilizados para el inmunofenotipo de las distintas poblaciones leucocitarias estudiadas están detallados en la tabla 1.

Tabla 3.1: Anticuerpos monoclonales utilizados en citometría de flujo.

Antígeno	Fluorocromo conjugado	Clon	Procedencia
CD3	PerCP	SK7	BD Biosciences
CD3	BV421	UCHT1	BD Biosciences
CD3	APC-H7	SK7	BD Biosciences
CD4	APC-H7	RPA-T4	BD Biosciences
CD4	FITC	SFC112T4D11	Beckman Coulter
CD5	APC	L17F12	BD Biosciences
CD8	APC-H7	SK1	BD Biosciences
CD11c	APC	S-HCL-3	BD Biosciences
CD14	FITC	MφP9	BD Biosciences
CD16	Pe-Cy5	3G8	BD Biosciences
CD19	Pe-Cy7	SJ25C1	BD Biosciences
CD25	PE	UCHT1	BD Biosciences
CD27	FITC	M-T271	BD Biosciences
CD38	Pe-Cy5	HI72	BD Biosciences
CD45	V500	HI30	BD Biosciences
CD45	APC-H7	2D1	BD Biosciences
CD62L	BV510	DREG-56	BD Biosciences
CD69	PE	FN50	BD Biosciences
CD123	Pe-Cy7	7G3	BD Biosciences
CD127	BV421	G20-127	BD Biosciences
CD154	PE	TRAP1	BD Biosciences
CD192	Alexafluor 647	48607	BD Biosciences
HLA-DR	PE	L243	BD Biosciences
CX3CR1	Pe-Cy7	2A9-1	Biolegend
TNF- α	PerCP-Cy5.5	Mab11	BD Biosciences
IFN- γ	FITC	4S.B3	BD Biosciences
IL-17	APC	41802	R&D Systems
IL-22	PE	142928	R&D Systems
IgM	PE	G20-127	BD Biosciences
Perforina	FITC	δ G9	BD Biosciences

3.1.4. Detección intracelular de citoquinas en linfocitos T en el LCR.

- Phorbolmyristicacetate (PMA) (Sigma Aldrich Quimica SA)
- Ionomicina (Sigma Aldrich Quimica SA)
- Brefeldina (BD Biosciences)
- Medio RPMI (GIBCO)
- Glutamina (Biowhittaker)
- Gentamicina (Braun)
- Suero de ternera fetal Hyclone (GE Healthcare Life Sciences)
- Solucion fijadora, BD Cytotfix (BD Biosciences)
- Solucion permeabilizadora, BD Cytoperm (BD Biosciences)
- Suero Salino (Baxter)
- Incubador (Thermor Scientific)
- Tubos polipropileno estériles

3.1.5. Determinación del daño axonal en LCR.

- NF-Light (Neurofilament light) ELISA kit (Uman Diagnostics)

3.1.6. Determinación de estrés oxidativo en LCR.

- Superoxide Dismutase Assay kit (Cayman Chemical)
- 8-Isoprostane ELISA kit (Cayman Chemical)

3.1.7. Cuantificación de activina A en LCR.

- Human/Mouse/Rat Activin A Quantikine ELISA Kit

3.1.8 Cuantificación de chitinase-3 like 1 en LCR.

- METRA[®]EIA Kit (Quidel)

3.1.9 Cuantificación de IgG frente a CMV en suero.

- Anti-HHV-6 IgG ELISA (Vircell)

3.1.10 Tinción de IgM, IgG y CD138 en tejido.

- PBS (Sigma Aldrich Química SA)
- Peróxido de hidrógeno (Sigma Aldrich Química SA)
- Polyclonal Rabbit Anti-Human IgM (Dako)
- Monoclonal Mouse Anti-Human CD138 (Dako)
- Polyclonal Rabbit Anti-Human IgG (Dako)
- Monoclonal Mouse Anti-Human HLA-DP,DQ,DR Antigen (Dako)
- Biotinylated Goat Anti-Rabbit IgG Antibody (Vector Laboratories)
- Biotinylated Goat Anti-Mouse IgG Antibody (Vector Laboratories)
- Polyclonal Mouse Anti-MOG (In house)
- 2.5% Normal Horse Serum Blocking Solution (Vector laboratories)
- Advanced avidin/biotin complex (ABC) (Vector laboratories)
- 3, 3'-Diaminobenzidina (Impact DAB Peroxidase Substrate) (Vector Laboratories)
- Metanol (Merk)
- Etanol (Merk)
- Paraformaldehído (Sigma Aldrich Química SA)
- Hematoxilina de Mayer (Sigma Aldrich Química SA)
- DPX, medio de inclusión para la histología (Sigma Aldrich Química SA)
- Xileno (Sigma Aldrich Química SA)

- Crioestato Leica
- Microscopio Olympus BX63

3.1.11 Muestras biológicas.

Las muestras se obtuvieron con fines diagnósticos. Para su utilización se obtuvo el consentimiento informado de los pacientes previamente aprobado por el Comité Ético del Hospital Universitario Ramón y Cajal.

El LCR se centrifugó durante 10 minutos a 1800 rpm. El pellet se separó para el análisis posterior de las poblaciones celulares. El sobrenadante se alicuotó y almacenó a -80°C hasta su posterior utilización. Las muestras de suero fueron alicuotadas y almacenadas a -80 °C hasta su uso.

Las muestras de tejido cerebral post mortem se obtuvieron del UK Multiple Sclerosis Society Tissue Bank del Imperial College. Las muestras se criopreservaron en isopentano frío.

3.1.12 Pacientes.

En este trabajo se incluyeron tres grupos de pacientes para analizar distintas variables. A continuación, describimos los distintos grupos.

3.1.12.1. Grupo de pacientes 1:

Para la comparación entre pacientes con EM y otras enfermedades neurológicas se estudiaron 115 pacientes con EM atendidos en los Servicios de Neurología del Hospital Universitario Ramón y Cajal y el Hospital Universitario de Getafe. Ninguno de los pacientes había recibido previamente ningún tratamiento inmunomodulador o inmunosupresor previo a la punción lumbar. De los 115 pacientes incluidos en este estudio, 105 presentaban EMRR y 10 EMPP. Todos los pacientes fueron diagnosticados siguiendo los criterios de McDonald 2010.[62]

En el estudio se incluyó a otros dos grupos de enfermos formados por 37 pacientes con otras enfermedades neurológicas inflamatorias (OENI) y por 29 pacientes con otras enfermedades neurológicas no inflamatorias (OENN).

Los pacientes del grupo OENI presentaban las siguientes patologías: neuritis óptica bilateral (n=10), mielitis transversa (n=9), encefalitis autoinmune (n=6), encefalitis vírica (n=5), síndrome de cefalea y déficits neurológicos transitorios con linfocitosis en el LCR (HANDL) (n=2), vasculitis (n=1), encefalomielitis aguda diseminada (n=1), enfermedad de Behçet (n=1), neuromielitis óptica (n=1), síndrome de persona rígida (n=1).

Los pacientes con OENN presentaron las siguientes enfermedades: pseudotumor cerebri (n=7), cefalea tensional (n=6), ictus (n=4), epilepsia (n=3), esclerosis lateral amiotrófica (n=2), demencia (n=1), tumor cerebral (n=1), hernia espinal discal (n=1), síndrome de dolor regional complejo (n=1), enfermedad de Wilson (n=1), enfermedad de Huntington (n=1) y paraplejia espástica hereditaria (n=1).

3.1.12.2. Grupo de pacientes 2

El análisis de factores asociados al daño axonal consto de dos partes:

Estudio transversal:

Se realizó un estudio transversal en el que se incluyeron de forma consecutiva 127 pacientes con EMRR, estudiados en el Servicio de Neurología del Hospital Universitario Ramón y Cajal. Todos los pacientes fueron diagnosticados según los criterios de McDonald 2010. [62] Ninguno de ellos había sido tratado previamente.

Se incluyó además en este estudio un grupo control formado por 37 sujetos sin patología neurológica inflamatoria o neurodegenerativa. Doce presentaban cefalea inespecífica, 12 no mostraban patología neurológica, 6 tenían hipertensión intracraneal benigna, uno epilepsia, uno hidrocefalia normotensiva y otro déficit de vitamina B1.

Se recogieron los siguientes datos de los pacientes con EM: Tiempo de evolución de la enfermedad, la discapacidad medida a través de la escala EDSS y a través del Multiple Sclerosis Severity Score (MSSS) y la actividad clínica de la enfermedad (brote o remisión).

Se definió un brote como la aparición de nuevos síntomas neurológicos atribuibles a esclerosis múltiple con una duración de al menos 24 horas, precedido por un periodo de estabilidad mínimo de mes.

Se consideró que los pacientes estaban en remisión cuando se encontraban libres de brotes y de progresión durante al menos tres meses antes de ser incluidos en este estudio.

El estudio de resonancia se realizó en un periodo no superior a un mes antes de la obtención de las muestras biológicas. Las imágenes se adquirieron en un equipo de 1,5T (Phillips Gyroscan NT, Eindhoven, the Netherlands). Se estudiaron las secuencias potenciadas en T1 con y sin la aplicación de gadolinio-DTPA y también se estudiaron las secuencias potenciadas en T2. Se consideraron como lesiones aquellas mayores de 3 mm². Las lesiones en T1 (“agujeros negros”) se definieron como regiones con una intensidad de señal más baja que la materia blanca (hipointensa) que correspondían a una región hiperintensa en T2. Además, se determinó la presencia de lesiones captantes de gadolinio.

Estudio longitudinal:

Para el análisis de los neurofilamentos de cadena ligera como posible biomarcador pronóstico de conversión a EM, realizamos un estudio longitudinal en el que se incluyó a 66 pacientes con síndrome neurológico aislado (SNA), de los cuales 45 también se incluyeron en el estudio transversal. Se siguieron prospectivamente en la unidad de EM del Hospital Universitario Ramón y Cajal.

Se anotaron las características clínicas en el momento del SNA y se realizó un seguimiento de los pacientes, valorando la aparición de nuevos síntomas clínicos y realizando resonancias magnéticas anuales. La aparición de un segundo brote y/o nuevas lesiones por RM durante el tiempo de seguimiento fueron los criterios que se utilizaron para establecer la conversión a esclerosis múltiple clínicamente definida. De los 66 pacientes incluidos, 45 convirtieron a EMCD. El tiempo medio de seguimiento de los pacientes fue 26 (12-57) meses. La topografía del brote está detallada en la tabla 3.2.

Tabla 3.2: Topología de los SNA

Topografía SNA	SNA-EMCD N=45	SNA-SNA N=21
Tronco	9	5
Sensitivo	8	8
NO	11	4
Mielitis	17	4

3.1.12.3 Grupo de pacientes 3:

Para la caracterización de los mecanismos inmunológicos presentes en los pacientes con EM y los cambios asociados a la edad se estudiaron 120 pacientes diagnosticados con EM atendidos de forma consecutiva en la Unidad de Esclerosis múltiple del Hospital Universitario Ramón y Cajal y el Hospital Universitario de Getafe, de los cuales 115 ya se habían estudiado en el grupo de pacientes 1. Ninguno de los pacientes había sido tratado previamente con terapias inmunomoduladoras o inmunosupresoras previo a la punción lumbar.

De estos pacientes se recogieron las siguientes variables clínicas y demográficas que presentaron en el momento de la PL: edad, sexo, tiempo de evolución de la enfermedad, número de lesiones en RM en T2, T1 y captantes de gadolinio, discapacidad medida a través de las escalas EDSS y MSSS, estado de la actividad clínica de la enfermedad (brote/remisión).

Para la detección de imágenes por resonancia magnética y definición de brote y remisión, se utilizó el mismo protocolo que en el apartado anterior.

3.1.13. Muestras de tejido post-mortem

El tejido de cerebro humano utilizado en este estudio se obtuvo del UK Multiple Sclerosis Society Tissue Bank en el Imperial College de Londres. Las muestras se obtuvieron durante la autopsia, para su utilización se obtuvo previamente el

consentimiento informado aprobado por el comité bioético. Se incluyeron 10 casos con EMSP y 5 casos sin patología neurológica inflamatoria. (Tabla 2.2)

Tabla 2.2: Datos demográficos de los casos incluidos en este estudio

Caso	Enfermedad	Edad	Causa de defunción
MS326	SP MS	62	Esclerosis múltiple, cáncer de próstata
MS317	SP MS	48	Neumonía debido a esclerosis múltiple
MS347	SP MS	49	Carcinoma de próstata
MS356	SP MS	45	Esclerosis múltiple
MS371	SP MS	40	Bronconeumonía
MS402	SP MS	46	Esclerosis múltiple, bronconeumonía
MS407	SP MS	44	Septicemia, bronconeumonía
MS408	SP MS	39	Neumonía, sepsis
MS426	SP MS	48	Esclerosis múltiple
MS448	SP MS	37	Embolia pulmonar
C14	Patología no neurológica	64	Fallo cardiaco
C25	Patología no neurológica	35	Carcinoma de lengua
C28	Patología no neurológica	60	Cáncer de ovario
C45	Alzheimer	77	Cáncer de próstata
C48	Patología no neurológica	68	Cáncer de colon

3.2 MÉTODOS:

3.2.1. Cuantificación de IgM, IgG y albúmina en LCR y suero.

Las concentraciones de IgG, IgM y albúmina se determinaron en un nefelómetro IMAGE (Beckman Coulter)

Los índices de IgG e IgM se calcularon con la siguiente fórmula:

$$\text{Índice de IgG} = (\text{IgG}_{\text{LCR}}/\text{IgG}_{\text{sueros}})/(\text{Albúmina}_{\text{LCR}}/\text{Albúmina}_{\text{sueros}})$$

$$\text{Índice de IgM} = (\text{IgM}_{\text{LCR}}/\text{IgM}_{\text{sueros}})/(\text{Albúmina}_{\text{LCR}}/\text{Albúmina}_{\text{sueros}})$$

3.2.2. Detección de bandas oligoclonales IgG:

La detección de bandas oligoclonales de IgG se realizó mediante un método puesto a punto en nuestro laboratorio mediante isoelectroenfoque (IEF) e inmunodetección. [25] Para la preparación del gel de IEF se utilizaron anfolinas con un rango de pH entre 3-10 y entre 8-10.5. Se estudiaron muestras pareadas de LCR y suero diluido hasta alcanzar la misma concentración de IgG que el LCR. Una vez realizado el isoelectroenfoque las proteínas se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa y bloqueamos la membrana al 2% de leche desnatada durante 30 minutos. La inmunodetección se realizó con anti-IgG humana unida a fosfatasa alcalina en una dilución 1/5000 al 0.2% de leche desnatada durante 1 hora a temperatura ambiente en agitación. Después, la membrana se tiñó con NBT y BCIP. En la figura 3.1 se muestra los cuatro patrones que se pueden encontrar en los pacientes con patología neurológica.

Estos patrones se definen como:

- 1: El patrón policlonal en el LCR, el que se encuentra en individuos sanos.
- 2: Patrón oligoclonal presente en suero y en el LCR (patrón en espejo). Indica una respuesta humoral sistémica con paso de inmunoglobulinas del suero al LCR.
- 3: Patrón oligoclonal en suero y en LCR, con bandas adicionales presentes en el LCR. Este patrón puede verse en la EM, aunque aparece más frecuentemente en infecciones del SNC.

4: Presencia de bandas oligoclonales en el LCR y patrón policlonal en el suero. Típico de la EM, aunque no patogénico.

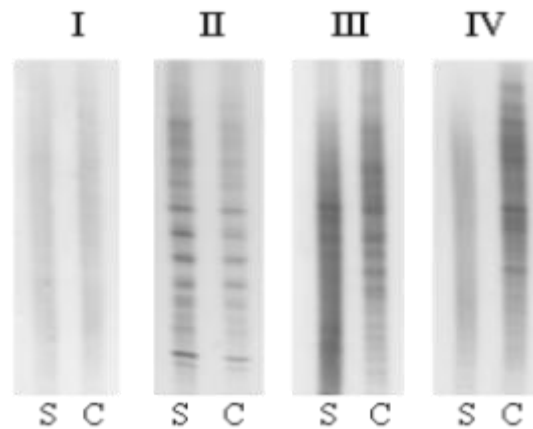


Figura 3.1: Ejemplo representativo de los cuatro patrones de bandas IgG detectados en patologías neurológicas. S: suero. C: Líquido cefalorraquídeo. Los patrones III y IV indican la presencia de síntesis intratecal de IgG.

3.2.3. Detección de bandas oligoclonales IgM.

Las BOC IgM también se realizaron mediante un método puesto a punto en nuestro laboratorio. [217] Se analizaron por IEF e inmunodetección. Los geles de agarosa se prepararon con anfolinas en un rango de pH de 5-8 y 4,2-4.9. Se estudiaron muestras pareadas de LCR y suero diluido hasta alcanzar la misma concentración de IgM que el LCR. Una vez realizado el isoelectroenfoque, se transfirieron las proteínas a una membrana de PDVF previamente activada con metanol durante 15 minutos. Después se bloqueó la membrana con 2% de leche desnatada durante 30 minutos. Para la inmunodetección, se incubó durante toda la noche con anti-IgM unida a biotina a 4°C en agitación con una dilución 1/5000 en 0.2% de leche desnatada. Al día siguiente, se incubó con estreptavidina unida a fosfatasa alcalina durante una hora a temperatura ambiente y se visualizó con NBT y BCIP. En la figura 3.2 se muestra una imagen de los patrones de bandas de IgM que indican síntesis intratecal de IgM.

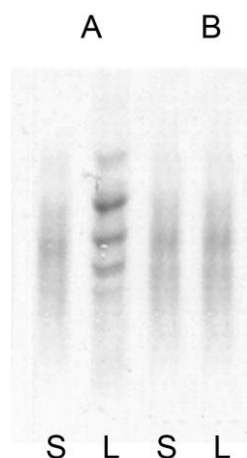


Figura 3.2: Ejemplo representativo de patrones de bandas IgM positivas (A) y negativas (B). S: suero. L: Líquido cefalorraquídeo.

3.2.4. Detección de bandas oligoclonales IgM lípido específicas.

El método para la detección de BOC IgM lípido específicas también se puso a punto en nuestro laboratorio.[171] La inmunodetección se realizó mediante membranas de nitrocelulosa recubiertas de fosfatidilcolina, a una concentración final de 20µg/ml en suero fisiológico. Las membranas de nitrocelulosa se incuban con las micelas toda la noche en agitación a 4°C. Al día siguiente, se lava la membrana con Polypep al 1% y se bloquean toda la noche con Polypep al 3% a 4°C en agitación. El resto del protocolo es igual que para las BOC IgM.

3.2.5. Estudio de poblaciones celulares en LCR

Para el estudio del LCR se partió de un volumen variable de entre 4-10 ml de cada uno de los pacientes. Las muestras de LCR se centrifugaron a 1800 r.p.m. durante 10 minutos. El precipitado celular se resuspendió y se repartió en un máximo de 2 tubos para su marcaje y un tercer tubo para la posterior estimulación. En 36 muestras el volumen fue superior a 8 ml y realizamos la tinción de un tercer tubo. El mínimo volumen de cada tubo fueron 2ml (Tubo 3). Las distintas combinaciones que se utilizaron fueron las siguientes:

- Tubo 1: Perforina-FITC, CD25-PE, CD3-PercP, CD19-PeCy7, CD5-APC, CD8-APC-H7, CD127-BV421, CD45-V500

- Tubo 2: CD14-FITC, HLA-DR-PE, CD16-PeCy5.5, CD123-PeCy7, CD11c-APC, CD4-APC-H7, CD45-V450, CD62L-V510
- Tubo 3: CD27-FITC, IgM-PE, CD38-PeCy5.5, CD19-PeCy7, CD5-APC, CD3-APC-H7, CD45-V500

Los anticuerpos monoclonales se utilizaron a las concentraciones óptimas indicadas por el fabricante y solamente en algunos casos se titularon los anticuerpos (CD16-PeCy5.5, CD38-PeCy5.5). Las incubaciones de las células fueron de 20-30 minutos a 4°C y en oscuridad. Transcurrido ese tiempo se realizó un lavado con suero fisiológico. Las células se resuspendieron en aproximadamente 200 µl de suero salino fisiológico y se analizaron en un citómetro de flujo (FACSCanto II, Becton Dickinson). El análisis multiparamétrico se llevó a cabo con el programa FACSDiva.

Para seleccionar los leucocitos primero discriminamos los dupletes con un gráfico biparamétrico entre el área y la altura. A continuación, en un gráfico que representa la granularidad (SSC) frente al tamaño celular (FCS), los leucocitos totales se englobaron dentro de la población de granularidad y un tamaño células intermedio-bajo (P1). Dentro de esa población se seleccionaron aquellos que expresasen el antígeno pan leucocitario CD45 (P2). (Figura 3.4)

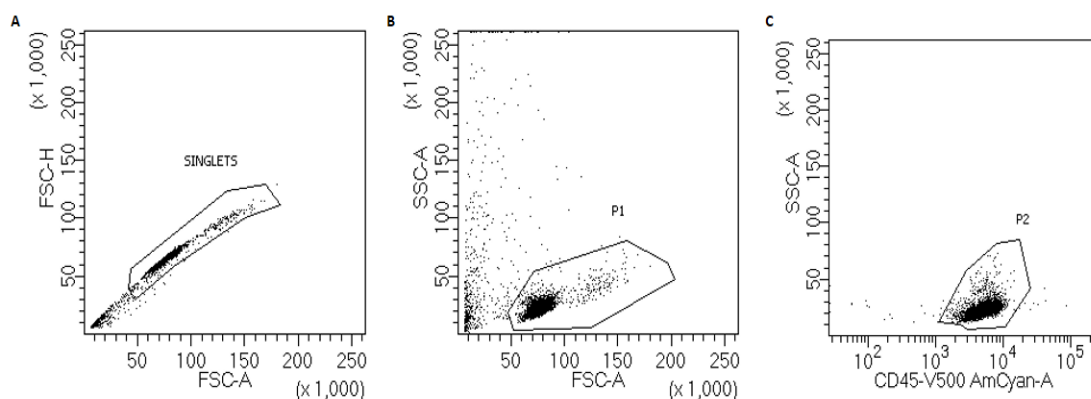


Figura 3.4: Ejemplo representativo de la selección de los leucocitos para el posterior análisis de las poblaciones. Primero eliminamos los posibles dupletes (A). A continuación, por tamaño y granularidad seleccionamos los leucocitos (B) y como último criterio seleccionamos las células que expresen el antígeno pan-leucocitario CD45 (C).

A continuación, se detallan en las figuras las estrategias utilizadas para la identificación de las poblaciones leucocitarias estudiadas.

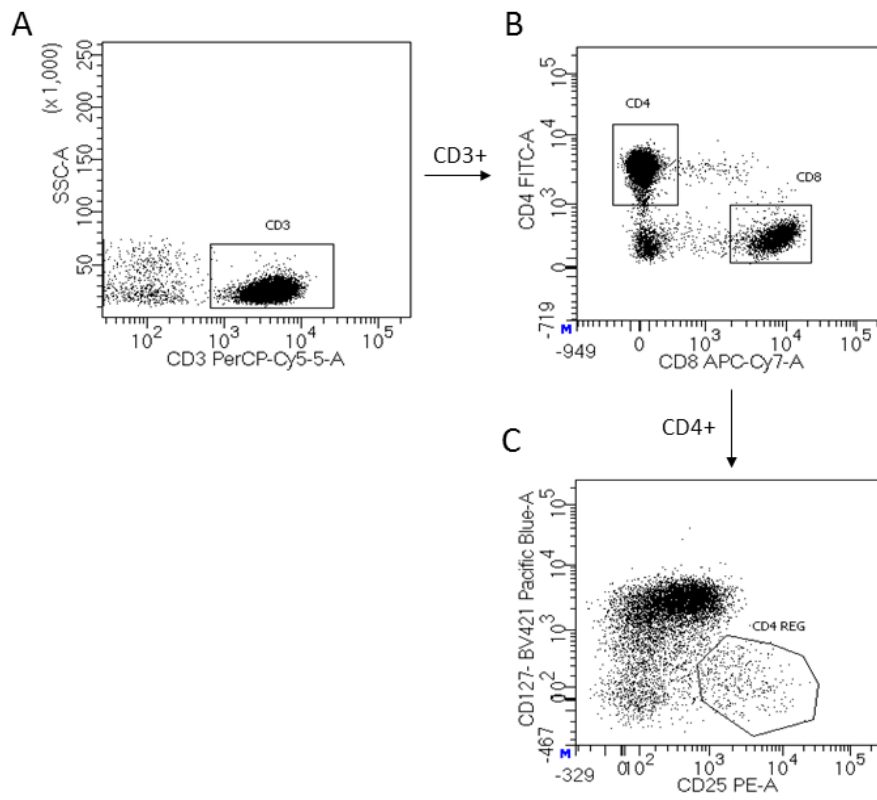


Figura 3.5: A partir de los leucocitos CD45+ determinamos los linfocitos CD3 (A), linfocitos CD4 y CD8 (B), linfocitos T CD4 reguladores (C).

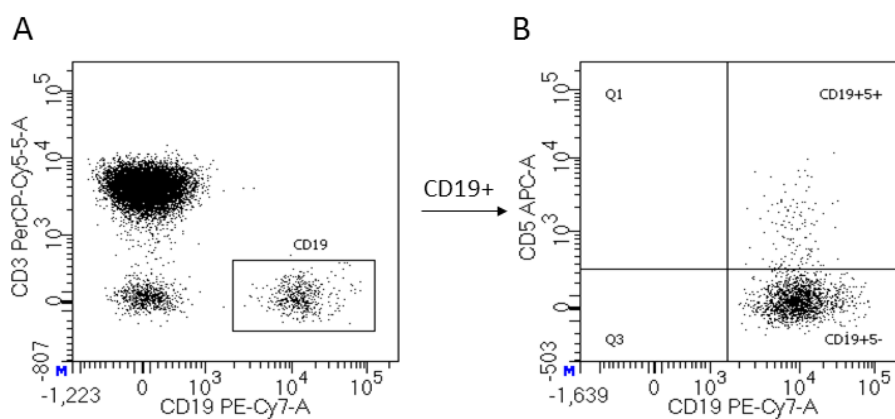


Figura 3.6: A partir de los leucocitos CD45+ estudiamos los linfocitos B. Seleccionamos los linfocitos B con el antígeno CD19+, poniendo como marcador negativo el CD3 (A), linfocitos CD19 estudiamos los que expresan el antígeno CD5+ (B).

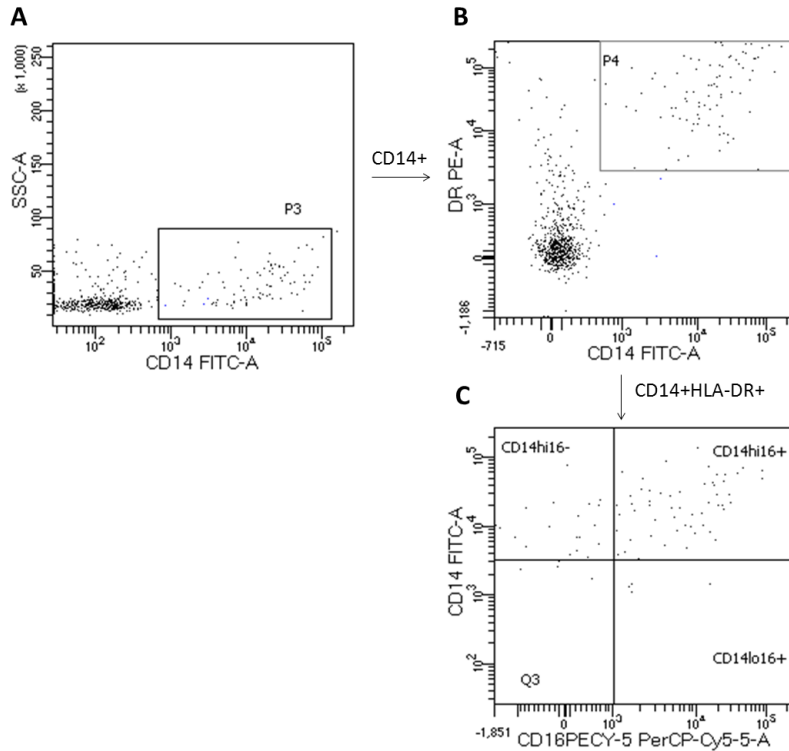


Figura 3.7: A partir de los leucocitos CD45+ estudiamos las poblaciones de monocitos. Los monocitos totales tenían que cumplir la condición de expresar CD14 (A) y HLA-DR (B). A continuación, estudiamos las tres poblaciones de monocitos según la expresión de CD14 y CD16 (D).

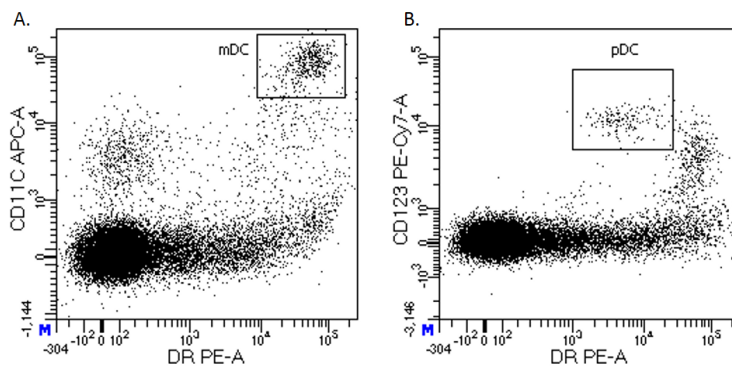


Figura 3.8: A partir de los leucocitos CD45+ estudiamos las células dendríticas. En primer lugar, pusimos como condición que no expresaran el antígeno CD14. Las células dendríticas mieloides las seleccionamos según la expresión de CD11c y HLA-DR. Las células dendríticas plasmacitoides las seleccionamos con el antígeno CD123 y HLA-DR (B).

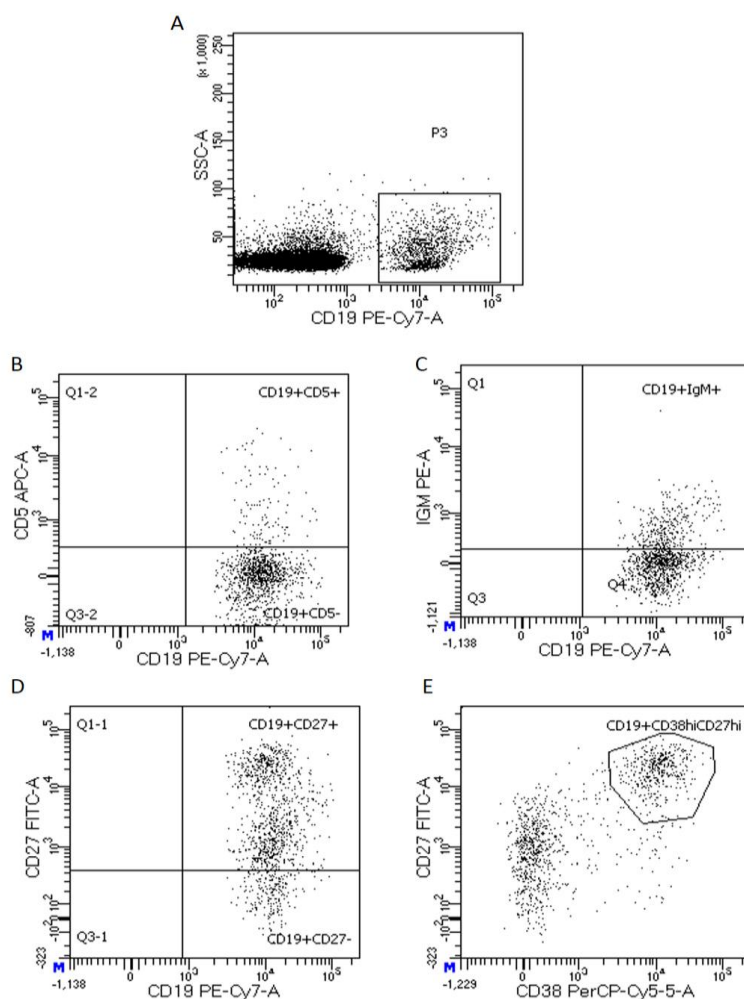


Figura 3.9: A partir de los leucocitos CD45+ estudiamos el inmunofenotipo de linfocitos B. Primero seleccionamos linfocitos B totales (A), sobre la P3 estudiamos la expresión del antígeno CD5 (B), IgM (C), CD27 (B) y la co-expresión de CD38 y CD27 de alta intensidad para la identificación de plasmablastos (E).

3.2.6. Detección intracelular de citoquinas en linfocitos T en LCR

Para la determinación de citoquinas intracelulares en LCR, se resuspendió el pellet en 1 ml de medio completo al 10% de suero de ternera fetal. Para la activación linfocitaria se añadió PMA (50ng/ml) e ionomicina (750ng/ml), además se bloqueó el transporte de proteínas con 2µl de brefeldina A (BD GolgiPlug™). Como control de estimulación se analizó en paralelo un tubo sin estimular, en el que también se bloqueó el transporte de proteínas. Las muestras se incubaron durante 4 horas en estufa a 37°C.

Transcurridas las 4 horas, incubamos las células con los siguientes anticuerpos: CD8-APC-H7, CD3-BV421, CD45-V500. La incubación de las células fue de 20-30 minutos a 4°C y en oscuridad. Posteriormente se realizaron 2 lavados con suero salino fisiológico durante 5 minutos a 1600 r.p.m. Después de los lavados, se decantaron los tubos y se añadieron 200 µl de solución fijadora incubando durante 20 minutos a 4°C. Lavamos con 2 ml de solución permeabilizadora durante 5 minutos a 1600 r.p.m. Realizamos el marcaje con los anticuerpos anti-antígenos intracitoplasmáticos (IFN-γ-FITC, IL-22-PE, TNF-α-PerCP-Cy5.5, IL-17-APC) y se incubaron durante 30 minutos a 4°C en oscuridad. A continuación, se lavaron dos veces las muestras con la solución permeabilizadora y se resuspendieron en 200 µl de suero salino antes de ser analizadas en el citómetro de flujo. Todas las muestras se analizaron en un citómetro de flujo FACSCanto II. El análisis multiparamétrico se llevó a cabo con el programa FACSDiva 7.

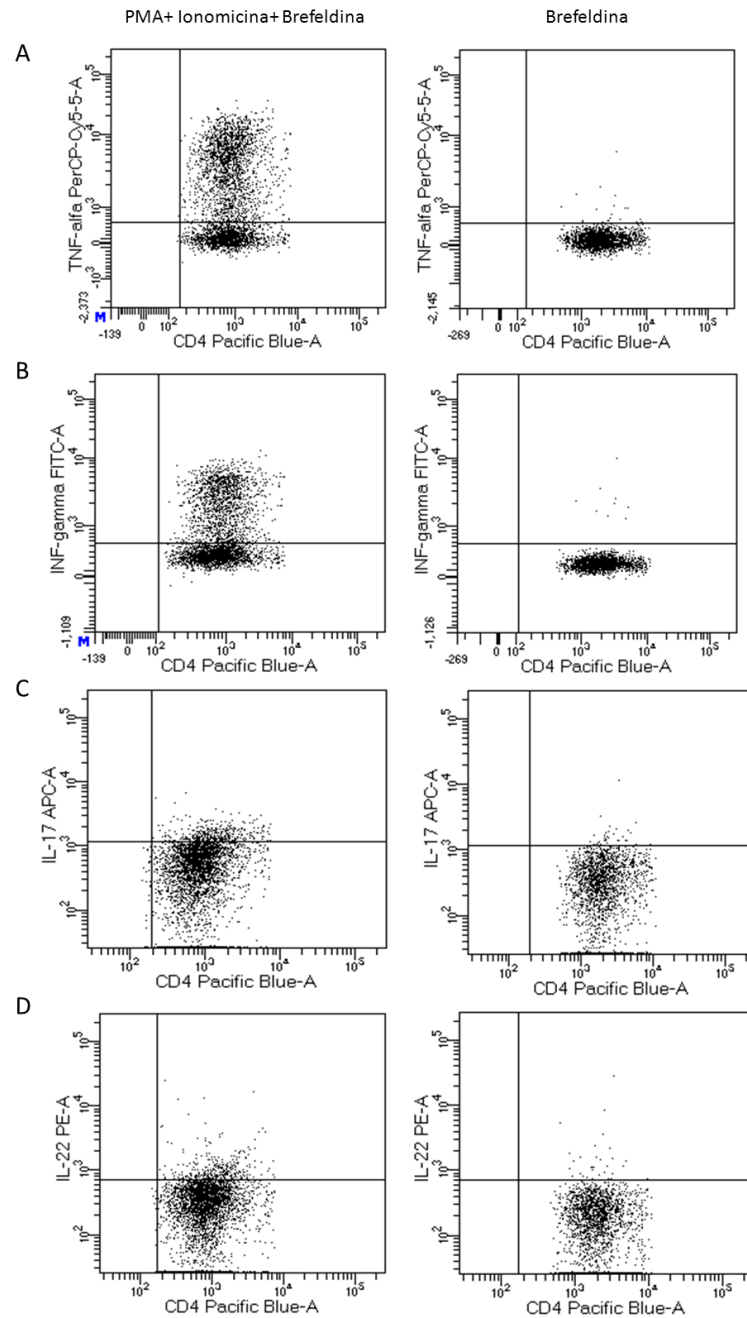


Figura 3.10. Ejemplo representativo de la producción de citoquinas por linfocitos T CD4. En la izquierda están representados los linfocitos estimulados con PMA e ionomicina y en la izquierda el control de estimulación. Analizamos la producción de TNF-alpha (A) e IFN-gamma (B) , IL-17 (C) e IL-22 (D).

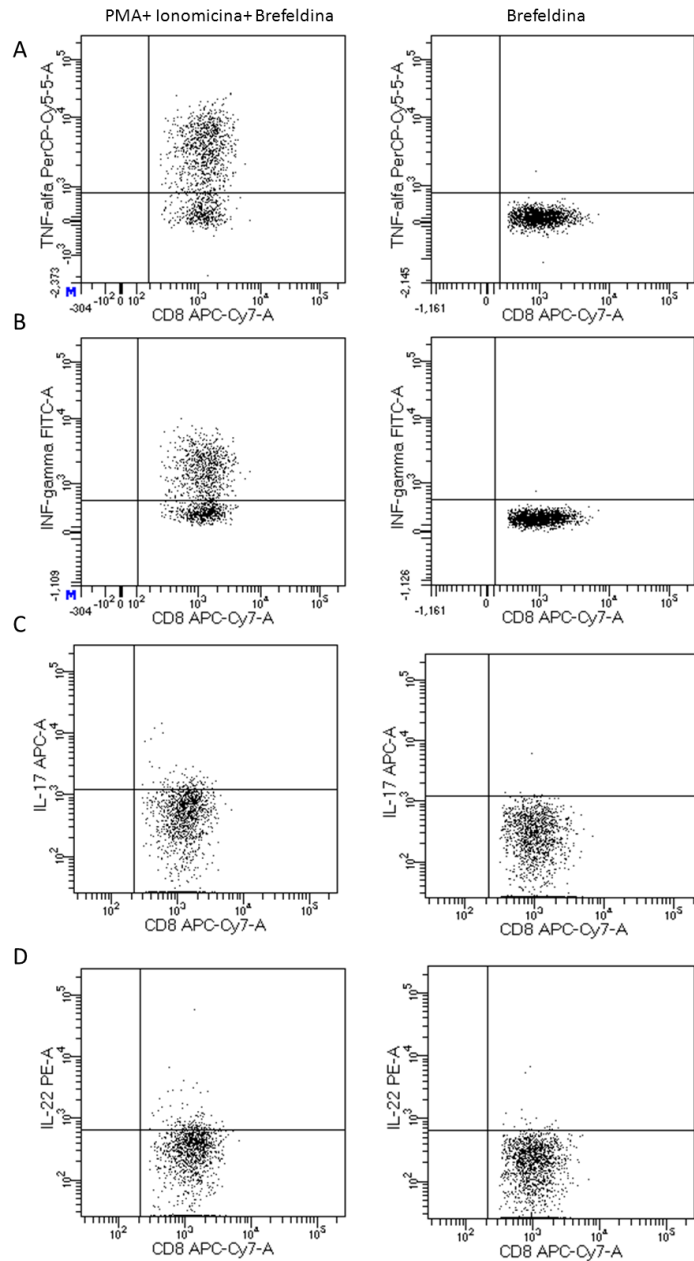


Figura 3.11: Ejemplo representativo de la producción de citoquinas por linfocitos T CD8. En la izquierda están representados los linfocitos estimulados con PMA e ionomicina y en la izquierda el control de estimulación. Analizamos la producción de TNF-alfa (A) e IFN-gamma (B), IL-17 (C) e IL-22 (D).

3.2.7. Detección de la cadena ligera de los neurofilamentos en LCR:

Los niveles de la cadena ligera de los neurofilamentos se determinaron mediante ELISA (UmanDiagnostics, Umea, Sweden) según las condiciones del fabricante. Los límites de rango de detección oscilan entre 100 to 10 000 ng/l. Las muestras de LCR

las diluimos en algunos casos 1:5 porque superaban el límite del rango de detección.

3.2.8. Detección de la activina A en LCR:

Los niveles de activina A se determinaron mediante ELISA (R&D) según las condiciones del fabricante. Los límites de rango de detección oscilan entre 15,6 a 1000 pg/ml.

3.2.7 Detección de chitinase-3 like 1 en LCR:

Los niveles de chitinase-3 like protein 1 se determinaron mediante el ELISA METRA EIA kit (Quidel) según las condiciones del fabricante. Las muestras se analizaron por duplicado en muestras de LCR sin diluir.

3.2.9 Detección de la superóxido dismutasa en LCR:

Para determinar la actividad de la superóxido dismutasa (SOD) utilizamos el kit superoxide assay kit (Cayman) según las condiciones de fabricantes. Para la detección de la actividad de SOD diluimos previamente las muestras de LCR 1:5. Los límites de rango de detección oscilan entre 0-0,05 U/ml.

3.2.10 Detección de 8- isoprostano:

Para la determinación de 8-isoprostano utilizamos el ELISA de Cayman según las condiciones de fabricante. El ensayo tiene un rango de detección de 0,8-500 pg/ml y una sensibilidad aproximadamente de 3 pg/ml.

3.2.11 Detección de anticuerpos frente a CMV:

Para la cuantificación de IgG frente a CMV utilizamos el ELISA CMV IGG TEST SYSTEM según las condiciones del fabricante.

3.2.12 Detección de IgG e IgM en lesiones corticales en la esclerosis múltiple.

3.2.12.1 Cortes de tejido

Se obtuvieron dos bloques de cada caso, los 30 bloques fueron criocortados a -20°C con un grosor de 10 µm.

3.2.12.2. Determinación de las placas de desmielinización:

Para la determinación de las placas desmielinizadas, las secciones se tiñeron con el anticuerpo de ratón anti-MOG (1/50). Primero, secamos las secciones y las fijamos con metanol a -20°C durante 10 minutos. Después, se lavaron con PBS y se bloquearon con suero de caballo fetal al 1% una hora a temperatura ambiente. Las secciones se incubaron con anti-MOG durante toda la noche a 4°C . Al día siguiente, se lavaron con PBS y se incubaron durante 20 minutos con PBS al 1% de H_2O_2 . Después se volvieron a lavar con PBS y se incubaron con anti-IgG biotinilado de ratón (1/500) a temperatura ambiente durante una hora. Se lavaron las secciones con PBS y se incubaron durante 45 minutos con el complejo avidina-biotina peroxidasa (ABC). Visualizamos las secciones con diaminobenzidina (DAB). Después se tiñeron los núcleos con hematoxilina, y se deshidrataron con etanol y se montaron con depex (DPX).

3.2.12.3. Determinación de la actividad inflamatoria:

Para la determinación de la actividad inflamatoria secamos las secciones y las fijamos con acetona a -20°C durante 10 minutos. Después, se lavaron con PBS y se bloquearon con suero de caballo fetal al 1% una hora a temperatura ambiente. Las secciones se incubaron con anti-HLA-DR (1/200) humano de ratón durante toda la noche a 4°C . Al día siguiente, se lavaron con PBS y se incubaron durante 20 minutos con PBS al 1% de H_2O_2 . Después se volvieron a lavar con PBS y se incubaron con anti-IgG biotinilado de ratón (1/500) a temperatura ambiente durante una hora. Se lavaron las secciones con PBS y se incubaron durante 45 minutos con el complejo ABC. Visualizamos las secciones con DAB. Después se tiñeron los núcleos con hematoxilina, y se deshidrataron con etanol y se montaron con DPX.

3.2.12.4. Identificación de plasmablastos IgG

Para la identificación de plasmablastos IgG secamos las secciones y las fijamos con metanol a -20°C durante 10 minutos. Después, se lavaron con PBS y se bloquearon con suero de caballo fetal al 1% una hora a temperatura ambiente. Las secciones se incubaron con anti-IgG (1/500) humano de rata durante toda la noche a 4°C . Al día siguiente, se lavaron con PBS y se incubaron durante 20 minutos con PBS al 1% de

H₂O₂. Después se volvieron a lavar con PBS y se incubaron con anti-IgG biotinilado de rata (1/500) a temperatura ambiente durante una hora. Se lavaron las secciones con PBS y se incubaron durante 45 minutos con el complejo ABC. Visualizamos las secciones con DAB. Después se tiñeron los núcleos con hematoxilina, y se deshidrataron con etanol y se montaron con DPX.

3.2.12.5. Identificación de plasmablastos IgM

Para la identificación de plasmablastos IgM secamos las secciones y las fijamos con metanol a -20°C durante 10 minutos. Después, se lavaron con PBS y se bloquearon con suero de caballo fetal al 1% una hora a temperatura ambiente. Las secciones se incubaron con anti-IgM (1/1000) humano de rata durante toda la noche a 4°C. Al día siguiente, se lavaron con PBS y se incubaron durante 20 minutos con PBS al 1% de H₂O₂. Después se volvieron a lavar con PBS y se incubaron con anti-IgG biotinilado de rata (1/500) a temperatura ambiente durante una hora. Se lavaron las secciones con PBS y se incubaron durante 45 minutos con el complejo ABC. Visualizamos las secciones con DAB. Después se tiñeron los núcleos con hematoxilina, y se deshidrataron con etanol y se montaron con DPX.

3.2.12.6. Identificación de células plasmáticas

Para la identificación de células plasmáticas secamos las secciones y las fijamos con metanol a -20°C durante 10 minutos. Después, se lavaron con PBS y se bloquearon con suero de caballo fetal al 1% una hora a temperatura ambiente. Las secciones se incubaron con anti-CD138 (1/1000) humano de ratón durante toda la noche a 4°C. Al día siguiente, se lavaron con PBS y se incubaron durante 20 minutos con PBS al 1% de H₂O₂. Después se volvieron a lavar con PBS y se incubaron con anti-IgG biotinilado de ratón (1/500) a temperatura ambiente durante una hora. Se lavaron las secciones con PBS y se incubaron durante 45 minutos con el complejo ABC. Visualizamos las secciones con DAB. Después se tiñeron los núcleos con hematoxilina, y se deshidrataron con etanol y se montaron con DPX.

3.2.13 Análisis estadístico:

Para el análisis estadístico se utilizó el programa Graphpad Prism 5 (GraphPad software, La Jolla, USA). Se consideraron estadísticamente significativos los valores de p menores a 0.05.

Los test estadísticos empleados para la comparación entre dos grupos fueron el test de U de Mann Whitney mientras que para la comparación de 3 o más grupos utilizamos la prueba de Kruskal-Wallis. Para el análisis de tablas de contingencia utilizamos el test exacto de Fisher. Para el análisis de curvas de supervivencia utilizamos el test de Kaplan Meier.

4. RESULTADOS

4.1 ESTUDIO DE LA RESPUESTA INMUNITARIA EN PACIENTES CON EM, OENI Y OENN EN LCR.

En primer lugar, nos propusimos caracterizar la respuesta inmunitaria en pacientes con EM, con otras enfermedades neurológicas inflamatorias (OENI) y otras enfermedades neurológicas no inflamatorias (OENN), con el objetivo de estudiar las posibles diferencias entre los tres grupos de pacientes. Para ello analizamos subpoblaciones de linfocitos T, linfocitos B, monocitos y la producción intracelular de citoquinas por linfocitos T por citometría de flujo en el LCR.

Este estudio lo realizamos en 115 pacientes con EM, 37 pacientes con OENI y con 29 pacientes con OENN. Todos ellos sin tratamiento desde, al menos, seis meses antes de la obtención de las muestras. Las variables demográficas de edad y sexo están detalladas en la tabla 4.1. No hubo diferencias significativas entre los tres grupos de pacientes.

Tabla 4.1: Datos demográficos de los pacientes con EM y otras enfermedades neurológicas.

	EM n=115	OENI n=37	OENN n=29	P
EdadM±DS	40±12	44±13	43±11	NS
Sexo (F/M)	73/42	27/10	23/6	NS

M±DS: Media ± desviación estándar; EM: Esclerosis múltiple; OENI: otras enfermedades neurológicas inflamatorias; OENNI: otras enfermedades neurológicas no inflamatorias.

4.1.1 Análisis de linfocitos T y linfocitos B:

Primero estudiamos mediante marcaje de antígenos de superficie los linfocitos T CD4, CD8 y las células B. Los resultados obtenidos se detallan en la tabla 4.2.

Tabla 4.2: Número total de linfocitos T y B presentes en pacientes con EM, OENI y OENN.

Nº de células/ml LCR Mediana (RIQ)	EM n=115	OENI n=37	OENN n=29	P
LT CD4+	1236 (613-2847)	708 (152-3494)	143 (70-340)	p<0.0001; a:ns,b***,c**
LT CD4+DR+	182 (108-415)	136 (77-1206)	36 (16-50)	p<0.0001; a:ns,b***,c***
LT CD4+CD62L+	601 (279-1829)	404 (70-1295)	97 (41-231)	p<0.0001; a:ns,b***,c**
LT CD4+CD25hiCD127lo/-	41 (21-116)	14 (2-137)	2 (1-11)	p<0.0001; a*,b***,c**
LT CD8+	360 (223-825)	221 (825-1574)	61 (18-125)	p<0.0001 a:ns,b***,c***
LT CD8+ Perforina+	9 (2-24)	42 (19-54)	4 (3-4)	p=0.01 a:ns;b:ns;c*
LB	45 (17-135)	10 (2-102)	2 (1-6)	p<0.0001; a**,b***,c**
LB CD5+	6 (2-19)	3 (0-15)	0 (0-1)	p<0.0001; a:ns,b***,c**
LB CD5-	36 (15-102)	6 (1-81)	2 (0-4)	p<0.0001; a**,b***,c:ns

RIQ= rango intercuartil (25%-75%). LT: Linfocitos T; LB: Linfocitos B; EM: Esclerosis múltiple; OENI: otras enfermedades neurológicas inflamatorias; OENNI: otras enfermedades neurológicas no inflamatorias. El valor de P es el resultado del análisis global de las diferencias (Kruskal-Wallis test); Además se realizó un estudio post hoc mediante el test de Dunn's para evaluar las diferencias entre: a: EM versus OENI; b: EM versus OENN; c: OENI versus OENN. *p< 0.05; **p< 0.01; ***p < 0.001.

Tanto los pacientes con EM como aquellos con OENI mostraron un aumento significativo de todas las subpoblaciones celulares estudiadas cuando se compararon con los pacientes con OENN. Además, los pacientes con EM mostraron diferencias en distintas subpoblaciones con respecto a OENI. Mostraron un número más elevado de linfocitos T reguladores (CD4+CD25hiCD137lo/-, p<0.05). (Figura

4.1) Por otro lado, solamente los pacientes OENI mostraron un incremento de linfocitos T CD8+ productores de perforina en comparación con OENN.

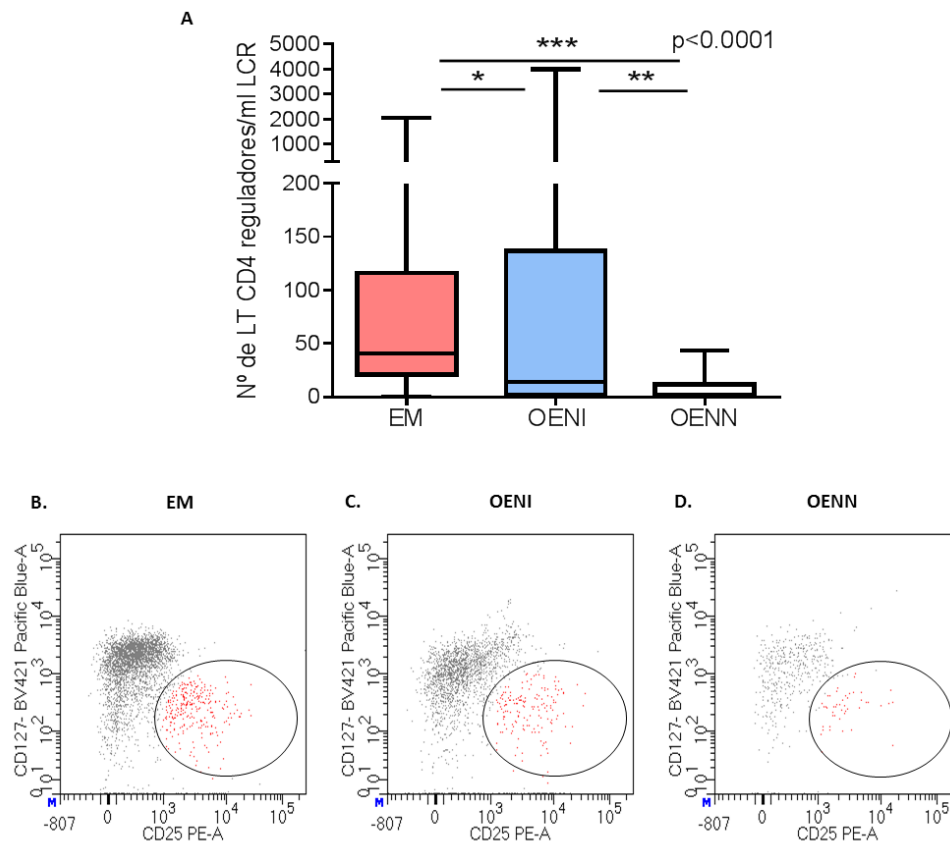


Figura 4.1: A. Comparación en el número de linfocitos CD4 reguladores presentes en el LCR en pacientes con EM, OENI y OENNI. Ejemplo representativo de poblaciones de linfocitos CD4 reguladores en un paciente con EM (B), un paciente con OENI (C) y un paciente con OENN (D).

También observamos en los pacientes con EM un claro aumento de los linfocitos B con respecto a OENI ($p < 0.01$). Este aumento se debía principalmente a la población CD19+5- ($p < 0.01$). (Figura 4.2)

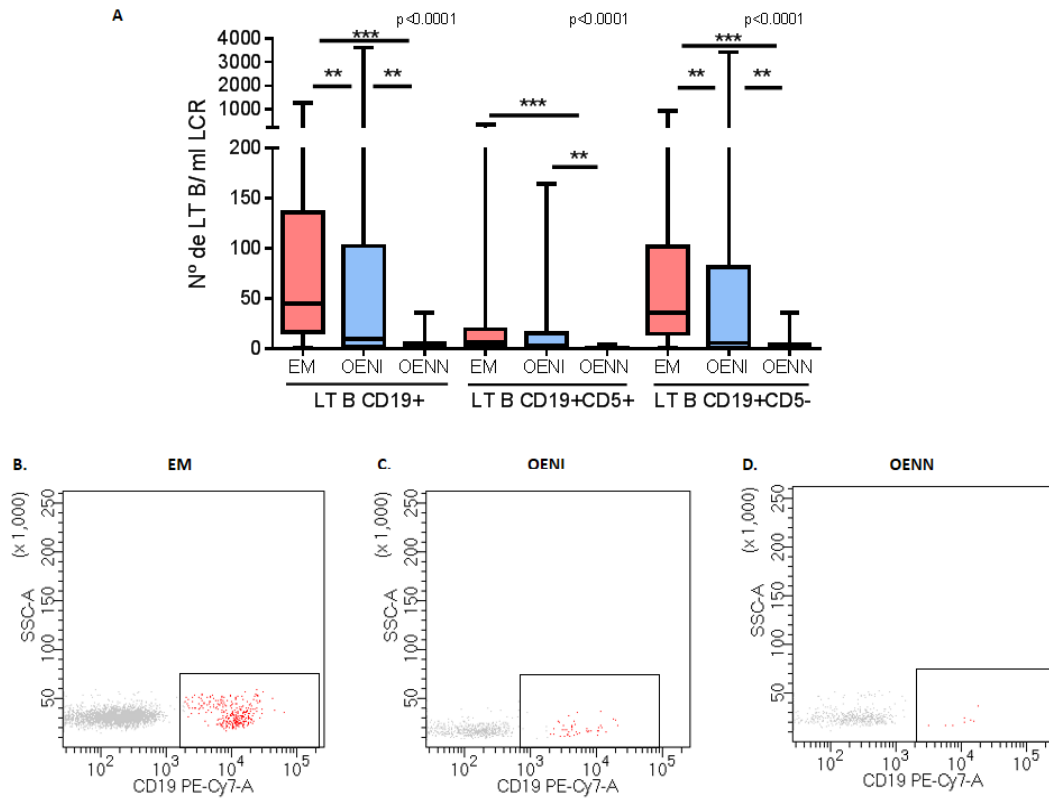


Figura 4.2: A. Número de linfocitos B presentes en el LCR en pacientes con EM, OENI y OENN. B Ejemplo representativo de poblaciones de linfocitos B en un paciente con EM (B), un paciente con OENI (C) y un paciente con OENN (D).

4.1.2. Análisis de monocitos:

A continuación, estudiamos las distintas poblaciones de monocitos en los tres grupos de pacientes. Los resultados se muestran en la tabla 4.3.

Tabla 4.3: Comparación en el número de monocitos en el LCR entre pacientes con esclerosis múltiple y otras enfermedades neurológicas.

Nº de células /ml LCR Mediana (RIQ)	EM n=115	OENI n=37	OENN n=29	p
Mo Totales	50 (27-75)	29 (14-121)	24 (8-45)	p=0.0015;a:ns,b ^{**} ,c:ns
Mo CD14hiCD16-	21 (13-44)	18 (7-63)	10 (5-21)	p=0.007;a:ns,b ^{**} ,c [*]
Mo CD14hiCD16+	14 (6-25)	9 (4-41)	11 (5-15)	p=0.19;a:ns,b:ns,c:ns
MoCD14loCD16+	5 (2-11)	3 (0-7)	1 (0-1)	p=0.0003;a:ns,b ^{***} ,c [*]

RIQ= rango intercuartil (25%-75%). Mo: monocitos; EM: Esclerosis múltiple; OENI: otras enfermedades neurológicas inflamatorias; OENNI: otras enfermedades neurológicas no inflamatorias. El valor de P es el resultado del análisis global de las diferencias (Kruskal-Wallis test); Además se realizó un estudio post hoc mediante el test de Dunn's para evaluar las diferencias entre: a: EM versus OENI; b: EM versus OENN; c: OENI versus OENN. *p< 0.05; **p<0.01;***p < 0.001.

Los pacientes con EM mostraron un número superior de monocitos que aquellos con OENN (p=0.0015). Estas diferencias se debían principalmente a un aumento en los monocitos clásicos (CD14hiCD16-,p=0.0007) y no clásicos (CD14lo16+, p=0.0003). Estas dos subpoblaciones también se encontraban aumentadas, aunque en menor grado en los pacientes con OENI respecto a aquellos con OENN.

No hubo diferencias en el número de monocitos intermedios (CD14hiCD16+) en el LCR de los tres grupos de pacientes.

4.1.3 Análisis de la producción intracelular de citoquinas.

Por último, se analizó la producción intracelular de citoquinas por los linfocitos T CD4+ y CD8+ presentes en LCR. Se estudiaron IFN-γ, TNF-α, IL-22 e IL-17 Este estudio se realizó en 81 pacientes con EM, 18 con OENI y 12 con OENN.

Tabla 4.4: Producción intracelular de citoquinas por linfocitos T CD4 en pacientes con EM, OENI y OENN.

Nº células /ml LCR Mediana (RIQ)	EM n=81	OENI n=18	OENN n=12	P
LT CD4+TNF- α +	766 (377-1819)	409 (244-845)	157 (76-271)	p<0,0001; a:ns;b***;c:ns
LT CD4+IFN- γ +	350 (172-754)	206 (70-338)	52 (39-109)	p<0,0001; a:ns;b***;c:ns
LT CD4+IL-17+	30 (9-131)	29 (16-92)	3 (1-8)	p=0,002; a:ns;b**;c**
LT CD4+IL-22+	9 (4-31)	15 (7-23)	1 (1-5)	p=0,005; a:ns;b**;c**
LT CD4+ IFN- γ +IL-22+	5 (1-13)	12 (8-30)	1 (0-2)	p=0,0001; a*;b*;c***

RIQ= rango intercuartil (25%-75%). LT: linfocitos T; EM: Esclerosis múltiple; OENI: otras enfermedades neurológicas inflamatorias; OENNI: otras enfermedades neurológicas no inflamatorias. El valor de P es el resultado del análisis global de las diferencias (Kruskal-Wallis test); Además se realizó un estudio post hoc mediante el test de Dunn's para evaluar las diferencias entre: a: EM versus OENI; b: EM versus OENN; c: OENI versus OENN. *p< 0.05; **p<0.01;***p < 0.001.

Los pacientes con EM y con OENI mostraron un aumento significativo de linfocitos T CD4 productores de IL-17, IL-22, e IL-17+IL-22 en comparación con OENN. Sin embargo, sólo los pacientes de EM mostraron un aumento significativo de linfocitos T CD4+ productores de TNF- α e IFN- γ comparado con grupo OENN que no se observó en OENI.

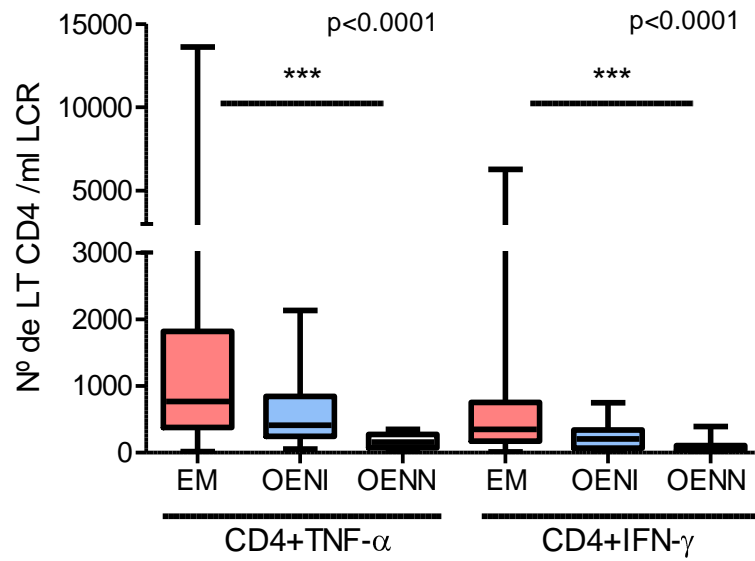


Figura 4.3: Comparación en el número de linfocitos CD4 produciendo TNF- α e IFN- γ en el LCR en pacientes con EM, OENI y OENNI.

La única diferencia que mostró el grupo OENI con respecto a EM fue un aumento en los linfocitos CD4+IL-17+IL-22+.

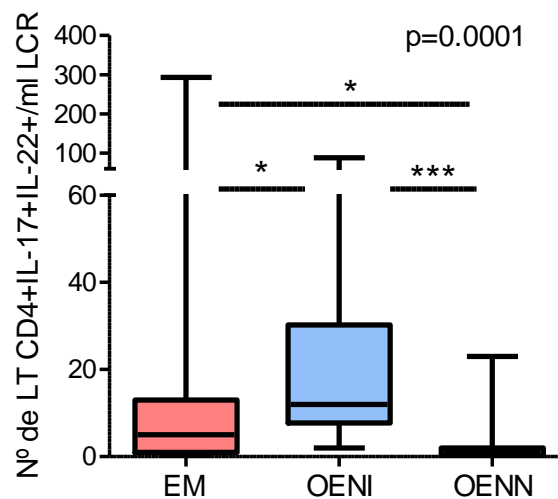


Figura 4.4: Comparación en la producción intracelular de IL-17+IL-22 por linfocitos T CD4+ en pacientes con EM, OENI y OENNI.

A continuación, se muestra la producción intracelular de las citoquinas mencionadas anteriormente por los linfocitos T CD8+ presentes en LCR (Tabla 4.5). Los pacientes con EM y OENI mostraron un mayor número de linfocitos CD8, IL-17+ y CD8+, IL-17+IL-22+ que aquellos con OENN. Los pacientes con OENI mostraron niveles aumentados de IL-22 en comparación con el grupo de EM. Por último, los pacientes con EM mostraron un número mayor de linfocitos CD8 produciendo INF- γ o TNF- α que aquellos con OENI u OENN (Figura 4.5).

Tabla 4.5: Producción intracelular de citoquinas por linfocitos T CD8 en pacientes con EM, OENI y OENN.

Nº de células/ml LCR Mediana (RIQ)	EM n=81	OENI n=18	OENN n=12	P
LT CD8+TNF- α +	269 (150-553)	113 (60-242)	47 (13-95)	p<0,0001 a*, b***;c:ns
LT CD8+IFN- γ +	199 (97-393)	81 (33-218)	12 (8-38)	p<0,0001 a*, b***;c:ns
LT CD8+IL-17+	11 (3-35)	15 (5-82)	2 (0-3)	p=0,002 a:ns;b**,c**
LT CD8+IL-22+	2 (0-6)	22 (2-56)	1 (0-6)	p=0,009 a*;b:ns;c:ns
LT CD8+IL22+IL-17+	2 (0-6)	4 (1-19)	0 (0-1)	p=0,008 a:ns;b*,c**

RIQ= rango intercuartil (25%-75%). Mo: monocitos; EM: Esclerosis múltiple; OENI: otras enfermedades neurológicas inflamatorias; OENNI: otras enfermedades neurológicas no inflamatorias. El valor de P es el resultado del análisis global de las diferencias (Kruskal-Wallis test); Además se realizó un estudio post hoc mediante el test de Dunn's para evaluar las diferencias entre: a: EM versus OENI; b: EM versus OENN; c: OENI versus OENN. *p<0.05; **p<0.01;***p < 0.001.

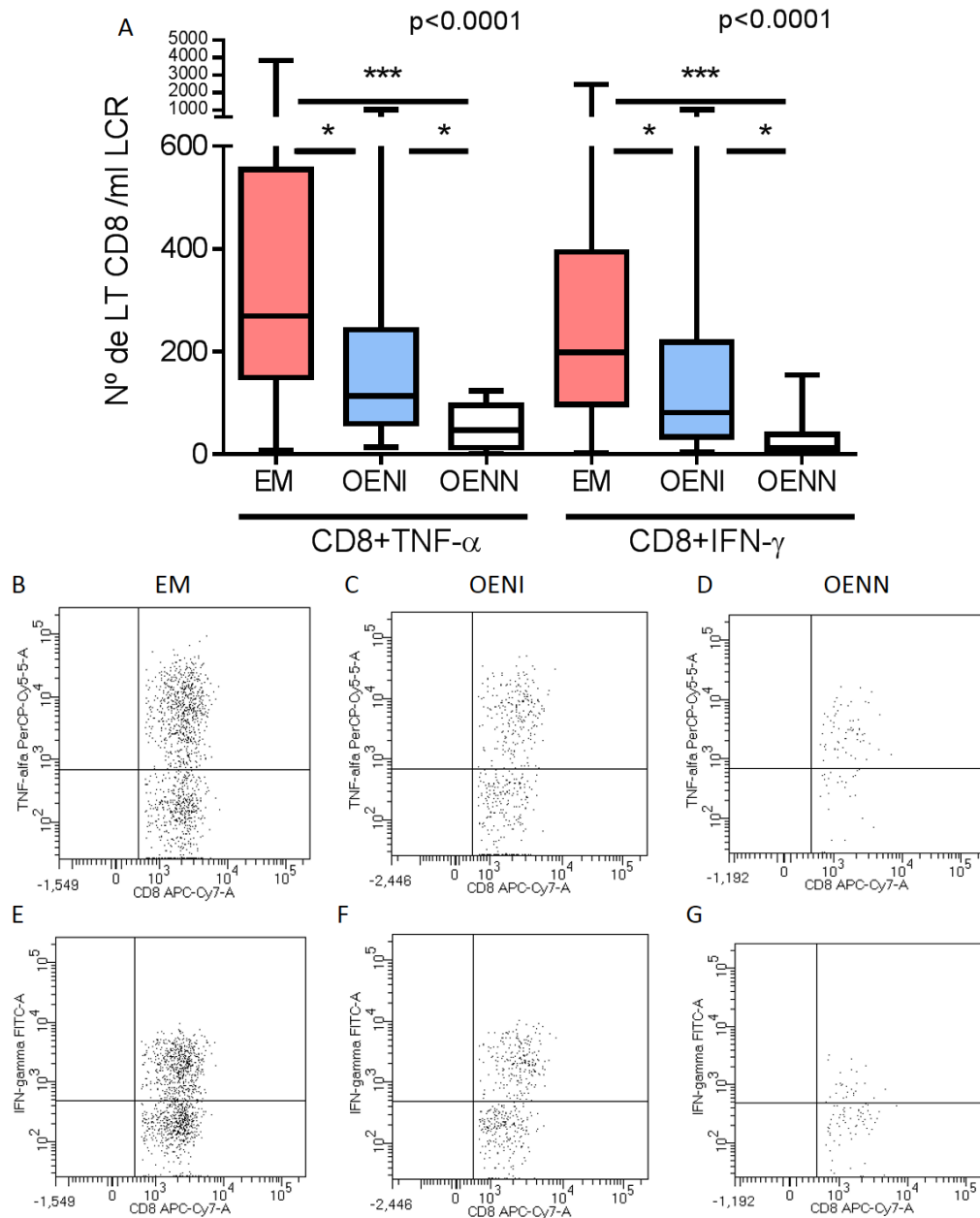


Figura 4.5: A. Comparación en el número de linfocitos CD8 produciendo TNF- α e IFN- γ en el LCR en pacientes con EM, OENI y OENNI. B Ejemplo representativo de linfocitos CD8+TNF- α + en un paciente con EM (B), un paciente con OENI (C) y un paciente con OENN (D).Ejemplo representativo de poblaciones de linfocitos T CD8+IFN- γ + en un paciente con EM (E), un paciente con OENI (F) y un paciente con OENN (G).

En resumen, hemos mostrado que las patologías no inflamatorias presentan un número de linfocitos reducido en LCR en comparación con las inflamatorias y hemos encontrado un perfil que nos permite diferenciar la EM de OENI. Los pacientes con EM mostraron un aumento de las poblaciones de linfocitos T reguladores y linfocitos BCD5-. Además, presentaron un aumento en los linfocitos T CD8+ productores de TNF- α e IFN- γ . Por otro lado, establecimos otro perfil que caracteriza a los pacientes OENI. Este perfil incluye un aumento de linfocitos T CD4+IL-22+IL-17+ y linfocitos T CD8+IL-22.

4.2 FACTORES ASOCIADOS AL DAÑO AXONAL EN LA EM.

Nuestro siguiente objetivo fue investigar si los niveles de la cadena ligera de los neurofilamentos (Nf-L) en LCR se correlacionan con distintos marcadores de actividad y discapacidad en la EM, para tratar de confirmar estudios preliminares que sugerían que podía ser un marcador de neurodegeneración en esta enfermedad.[218, 219] Posteriormente estudiamos las distintas variables inmunológicas que se asocian con los niveles de esta proteína.

Incluimos en el estudio 127 pacientes con EMRR, calculamos los niveles de Nf-L y su correlación con la edad, el tiempo de evolución y distintas variables clínicas y radiológicas que se asocian con neurodegeneración (EDSS, MSSS, número de lesiones en T1) e inflamación (Nº de lesiones en T2 y de lesiones captantes de gadolinio).

4.2.1 Correlación entre NF-L y variables demográficas, clínicas y radiológicas.

Los niveles de Nf-L en LCR no se correlacionaron con la edad ni con el tiempo de evolución de la enfermedad. Sin embargo, se correlacionaron positivamente con variables clínicas y radiológicas relacionadas con la neurodegeneración, como el EDSS ($r=0.31$; $p=0.0004$), el número de lesiones en T1 ($r=0.46$; $p<0.0001$) y sobre todo el MSSS ($r=0.54$; $p<0.0001$).

Además, los niveles de Nf-L se correlacionaron con variables asociadas a la inflamación, como el número de lesiones en T2 ($r=0.42$; $p<0.0001$) y el número de lesiones captantes de gadolinio ($r=0.52$; $p<0.0001$). Estos resultados confirman que los valores de Nf-L en LCR se asocian con la actividad en RM y la progresión de la discapacidad. (Figura 4.6).

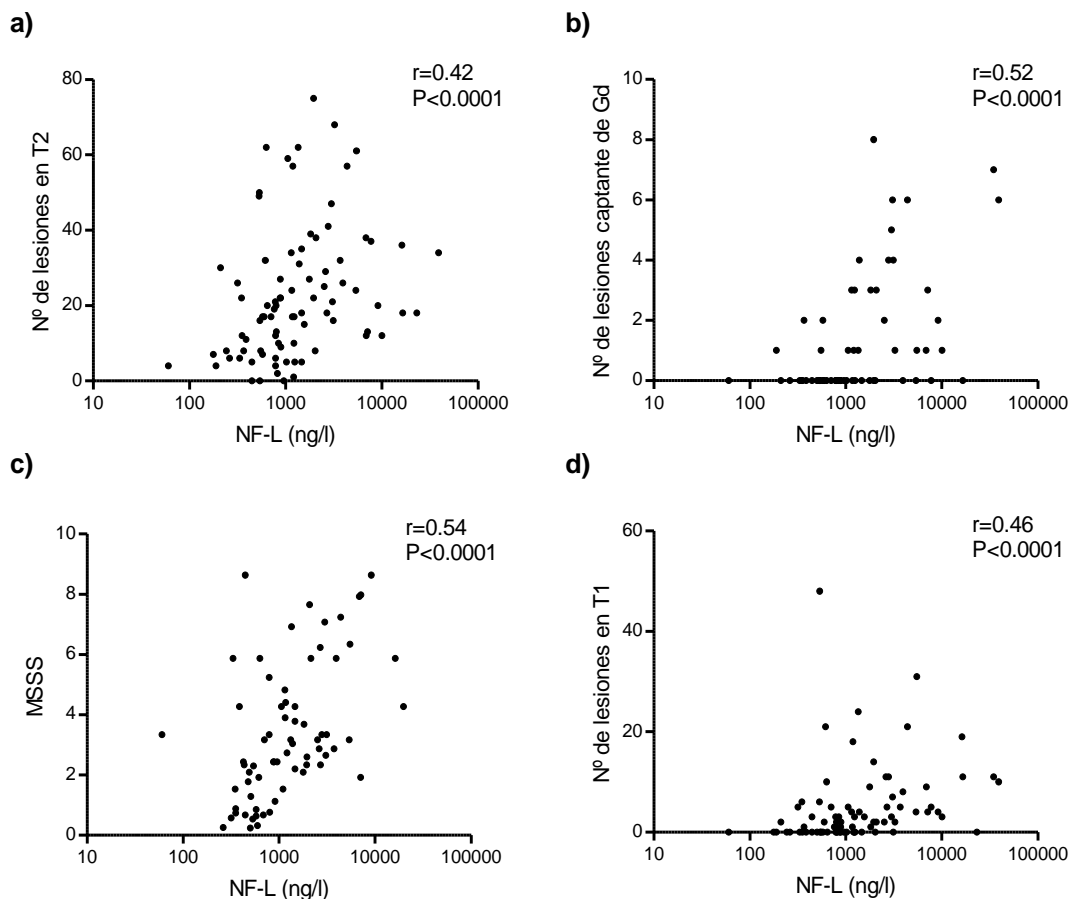


Figure 4.6: Correlaciones entre los valores de Nf-L (ng/l) en pacientes con EM con (a) el número de lesiones en T2 en RM, (b) el número de lesiones captantes de gadolinio, (c) MSSS, y (d) el número de lesiones en T1 por RM.

4.2.2 Asociación de los niveles de Nf-L con variables demográficas, clínicas y radiológicas

A continuación, quisimos establecer los valores normales de Nf-L en LCR con el fin de caracterizar a los pacientes con EM que presentan niveles normales o niveles altos de esta proteína. Para ello cuantificamos los Nf-L presentes en LCR en un

grupo control formado por 30 pacientes sin patología neurológica inflamatoria o neurodegenerativa.

No existían diferencias significativas entre la edad y el sexo entre pacientes con EM y el grupo control. (Tabla 4.6)

Tabla 4.6: Factores demográficos entre pacientes con EM y grupo control

	EM n=115	Grupo control n=37	P
Edad (M±DS)	33.56±9.03	35±9.6	Ns
Sexo (F/M)	81/46	26/11	Ns

M±DS: Media ± desviación estándar; EM: Esclerosis múltiple

Los pacientes con EM presentaban claramente niveles más altos de Nf-L en LCR que en controles (Media±ES: 2970±504 vs. 335±32, p<0.0001). (Figura 4.7). Para establecer los valores normales de Nf-L en LCR sumamos a la media de los controles más 3 desviaciones estándar (Media± 3.0 DS). Obtuvimos un valor de 900ng/ml que nos sirvió para establecer un punto de corte en el grupo de pacientes con EM. Así, dividimos a los pacientes con EM en dos grupos:

- Grupo NfL-normal: formado por 55 pacientes con niveles inferiores a 900 ng/l
- Grupo NfL-alto: formado por 72 pacientes con niveles superiores a 900 ng/l.

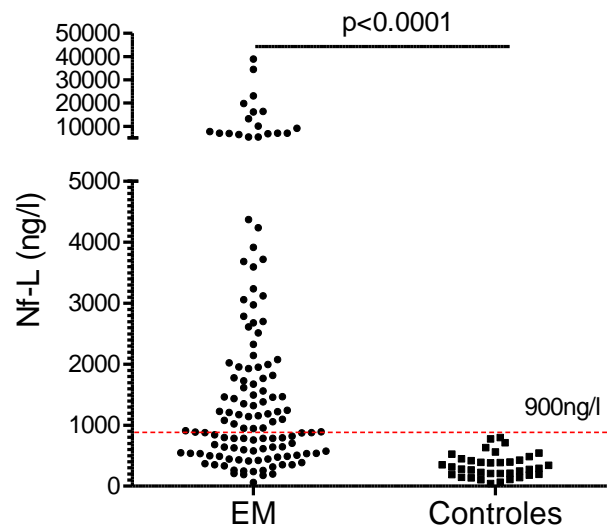


Figura 4.7: Niveles de Nf-L en pacientes con EM y controles. Para establecer los valores normales establecimos un punto de corte que consistió en la media \pm 3DS de los controles (900 ng/l).

Tal y como observamos al estudiar las correlaciones los niveles altos de Nf-L se asociaron con mayor discapacidad medida a través de las escalas EDSS ($p=0.003$) y MSSS ($p<0.0001$) y con mayor número de lesiones en T1 ($p=0.0004$), T2 ($p=0.0007$) y captantes de gadolinio ($p=0.004$, Tabla 4.7).

Tabla 4.7: Datos demográficos, clínicos y radiológicos en pacientes con EM divididos según los niveles de Nf-L en LCR.

	NfL-Altos n=72	NfL-Normal n=55	p
Edad (M±DS)	33,33±9,23	33,85±8,84	ns
Sexo (F/M)	48/24	33/22	ns
Tiempo de evolución, años (M±DS)	3,68±5,45	4,6±6,52	ns
EDSS, mediana (RIQ)	2 (1,5-2)	1,5 (1-2)	0.003
MSSS, mediana (RIQ)	3,69 (2,65-5,87)	1,84 (0,67-3,21)	<0.0001
Nº de lesiones en T2 en RM, mediana (RIQ)	25 (17-38)	12 (6-22)	0.0007
Nº de lesiones en T1 en RM, mediana (RIQ)	4 (1,5-10,5)	0 (0-2,5)	0.0004
Nº de lesiones captantes de Gd, mediana (RIQ)	1 (0-4)	0 (0-0)	<0.0001

NfL-Altos: niveles de neurofilamentos superiores a 900ng/l; NfL-normal: Niveles de neurofilamentos inferior a 900 ng/l; F/M: femenino/masculino; RIQ: rango intercuartil (25%-75%); M±DS: Media ± desviación estándar; Los valores de p son el resultado del test de Man Whitney.

Los niveles altos de Nf-L se asocian con la actividad inflamatoria, pero sobre todo con los marcadores de neurodegeneración como el MSSS que mide la discapacidad acumulada a lo largo de la evolución de la enfermedad y el número de agujeros negros en la resonancia craneal.

4.2.3 Asociación de los niveles altos de Nf-L en el LCR con síntesis intratecal de inmunoglobulinas

Nuestro siguiente objetivo fue estudiar si la síntesis intratecal de inmunoglobulinas se asocia con los niveles de Nf-L. (Tabla 4.6)

Tabla 4.6: Datos de laboratorio entre pacientes con EM con niveles altos y normales de Nf-L.

	NfL-Alto n=72	NfL-Normal n=55	p
Índice de IgG (M±DS)	0,99±0,44	1,03±0,63	ns
BOC IgG (P/N)	52/3	70/2	ns
Índice de IgM (M±DS)	0,21±0,19	0,12±0,13	0,012
BOC IgM lípido-específicas (P/N)	46/26	7/48	<0,0001

NfL-Alto: niveles de neurofilamentos superiores a 900ng/l; NfL-normal: Niveles de neurofilamentos inferior a 900 ng/l; P/N: positivo/negativo; M±DS: Media ± desviación estándar; Los valores de p son el resultado del test de Man Whitney.

Los niveles de Nf-L no se asociaron con el índice de IgG ni con la presencia de BOC IgG. Sin embargo, el grupo de NfL-alto se asoció con mayor índice de IgM en LCR. Sobre todo, estas diferencias fueron más claras cuando estudiamos la presencia de BOC IgM lípido específicas (BOCM+), el grupo NfL-alto mostró claramente mayor proporción de pacientes con BOCM+ (OR: 12.1 CI: 4.8-30.7; p<0.0001). (Figura 4.8)

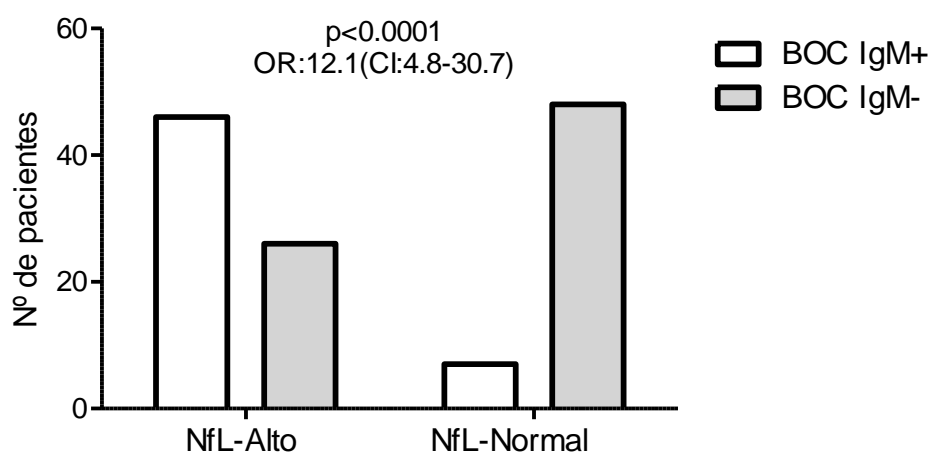


Figura 4.8: Número de pacientes que muestran BOC IgM lípido específicas en el grupo de pacientes con NfL-Altos (>900ng/l) y con NfL-normales (<900ng/ml). Test exacto de Fisher.

4.2.4 Estudio de Nf-L como posible biomarcador de conversión a EM.

A continuación, estudiamos si los niveles de Nf-L pueden ser marcadores pronósticos de conversión a esclerosis múltiple clínicamente definida (EMCD) en pacientes con síndromes neurológicos aislados (SNA).

Incluimos en el estudio a 66 pacientes consecutivos que tuvieron un SNA entre 2009 y 2011. Cuarenta y cinco tuvieron un segundo brote y convirtieron a EMCD (SNA-EMCD). Los 21 restantes no tuvieron un segundo brote (SNA-SNA). El tiempo medio de seguimiento fueron 26 (12-57) meses.

También se analizó la aparición de lesiones nuevas en las resonancias magnéticas anuales. Ninguno de los SNA que no tuvieron un segundo brote cumplió los criterios de diseminación en el espacio durante el tiempo de seguimiento.

Primero comparamos los niveles de Nf-L entre los dos grupos. Los pacientes que convirtieron a EM, mostraron en el primer brote niveles más elevados que los que no convirtieron ($p < 0.0001$). (Figura 4.9)

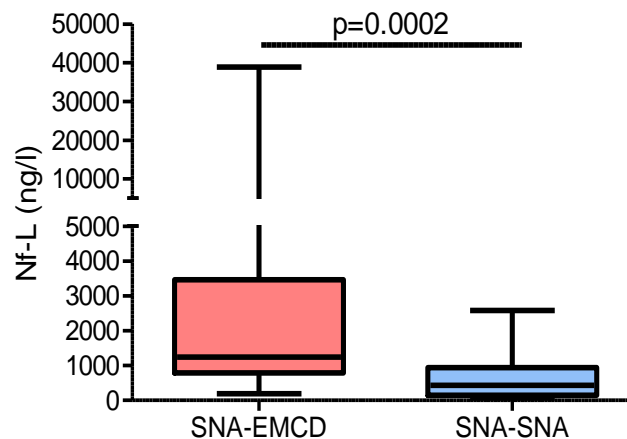


Figura 4.9: Niveles de Nf-L en pacientes con SNA que convirtieron a esclerosis clínicamente definida (SNA-EMCD) y pacientes con SNA que no convirtieron.

A continuación, analizamos si los niveles altos de Nf-L en LCR pueden predecir la conversión a EMCD. Para ello dividimos a los SNA en dos grupos, atendiendo a si tenían valores de Nf-L mayores o menores de 900ng/l. Calculamos mediante el test de Kaplan Meier la probabilidad de permanecer libre de un segundo brote. (Figura

4.10). Los valores elevados predijeron la aparición precoz de un segundo brote (Hazard ratio HR: 3.2, 95% 1.7-5.9; $p=0.0003$).

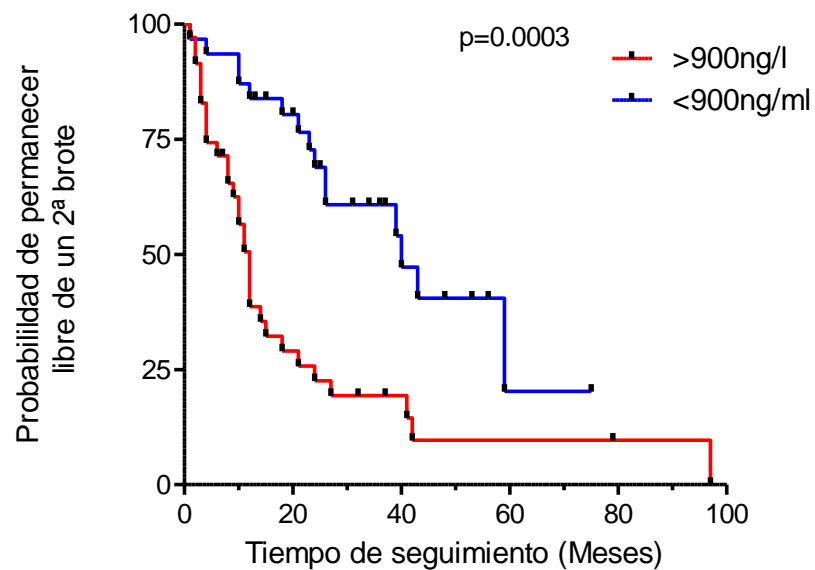


Figura 4.10: Probabilidad de permanecer libre de un segundo brote en pacientes con SNA con niveles de Nf-L por encima de la normalidad (>900ng/l) y en la normalidad (<900ng/l).

4.3 CARACTERIZACIÓN DE LOS MECANISMOS INMUNOLÓGICOS PRESENTES EN LOS PACIENTES CON EM CLASIFICADOS SEGÚN LA PRESENCIA DE BOC DE IgM FRENTE A LÍPIDOS.

La síntesis intratecal de IgM en la EM se asocia con mayores niveles de Nf-L en LCR y con un peor pronóstico de la enfermedad.[171] Ante este hallazgo, quisimos investigar en profundidad los mecanismos inmunológicos que diferencian los pacientes con estos anticuerpos de los que carecen de ellos.

En este estudio incluimos a 121 pacientes con EM estudiados de forma consecutiva en la unidad de EM del Hospital Ramón y Cajal de Madrid, y los clasificamos en dos grupos según la presencia BOC IgM lípido específicas.

- El grupo ML+: formado por 43 pacientes (34%) con bandas oligoclonales IgM lípido-específicas.
- El grupo ML-: formado por los 78 restantes (66%) sin bandas oligoclonales IgM lípido-específicas.

Analizamos distintas variables demográficas, clínicas y radiológicas en ambos grupos. (Tabla 4.9).

La proporción de pacientes en brote era ligeramente mayor en el grupo ML+ ($p=0.043$). Estos pacientes también mostraron mayor MSSS en comparación con los ML- ($p=0.002$). (Figura 4.11).

Tabla 4.10: Parámetros clínicos y radiológicos en pacientes ML+ y ML-.

	ML+ n=43	ML- n=78	p
Edad (M±DS)	36,3±9,26	40,8±11,9	Ns
Sexo (F/M)	28/15	47/31	Ns
Tiempo de evolución, años (M±DS)	1,8±3,3	3,7±5,6	Ns
Nº de lesiones en T2 en RM, (IQR)	20,5(9-35)	20(8-26,5)	Ns
Nº de lesiones en T1 en RM, mediana (IQR)	0(0-11)	1(0-11)	Ns
Nº de lesiones captantes de gd, mediana (IQR)	0(0-2)	0(0-1)	Ns
Brote (SI/NO)	12/31	9/69	0.043
EDSS, mediana (IQR)	2(1,5-2,5)	1,5(1-2)	Ns
MSSS, mediana (IQR)	5,8(3,7-7,9)	3,5(1,8-4,9)	0.002

M±DS: Media ± desviación estándar; RIQ: rango intercuartil (25%-75%); ML+= Pacientes con BOC IgM lípido específica; ML-= pacientes sin BOC IgM lípido específicas.

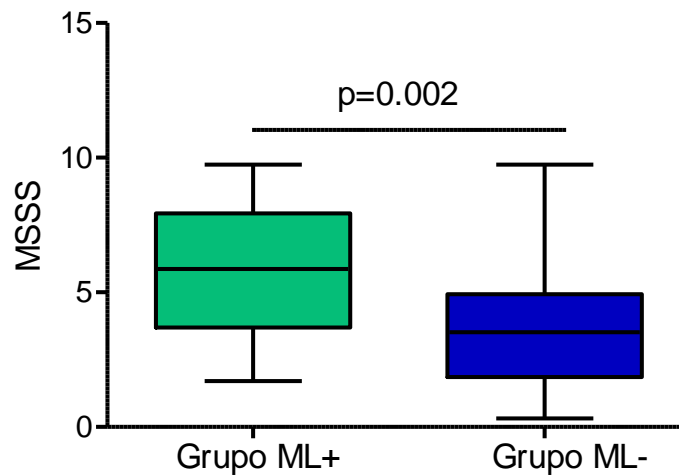


Figura 4.11: MSSS en pacientes ML+ y ML-. ML+: pacientes con EM que presentan BOC de IgM frente a lípidos; ML-: pacientes con EM que no presentan BOC de IgM frente a lípidos.

Estudiamos la relación con las variables asociadas a la síntesis intratecal de inmunoglobulinas, como se muestra en la tabla 4.10. La presencia de estos anticuerpos está asociada a un aumento en el índice de IgG en LCR ($p=0.02$) y sobre todo con un aumento en el índice de IgM ($p<0.0001$), no se asocia con diferencias en el cociente de albumina o con la presencia de BOC IgG.

Tabla 4.10 Datos de laboratorio en pacientes con ML+ y ML-.

	ML+ n=43	ML- n=78	p
BOC IgG (P/N)	72/6	43/0	ns
Índice IgG (M±DS)	1,2±0,8	0,9±0,5	0.02
Índice IgM (M±DS)	0,4±0,3	0,2±0,1	<0.0001
Cociente albumina(M±DS)	4,9±2,0	5,2±2,2	ns

M±DS: Media ± desviación estándar; ML+= Pacientes con BOC IgM lípido específica; ML-= pacientes sin BOC IgM lípido específicas.

4.3.1 Estudio de marcadores de daño axonal.

En el apartado anterior observamos que los pacientes ML+ tienen valores aumentados de Nf-L en LCR. Quisimos corroborar esos resultados en esta cohorte independiente. Observamos que los niveles de Nf-L de nuevo se encontraban significativamente más elevados en los pacientes con BOC IgM lípido específicas. (Figura 4.12), confirmando nuestros datos previos.

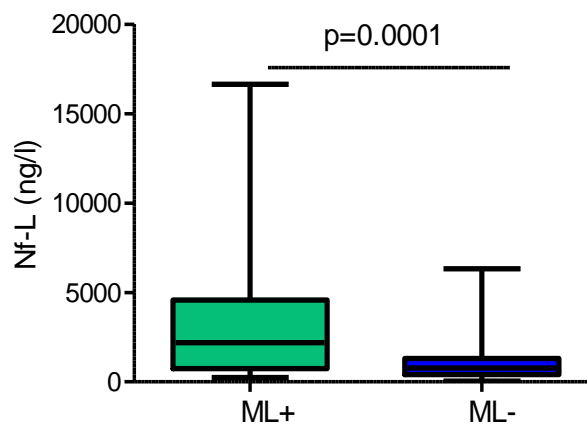


Figura 4.12: Comparación de los niveles de Nf-L entre pacientes con BOC IgM lípido-específicas (ML+) y sin estos anticuerpos (ML-).

4.3.2 Estudio de marcadores de inflamación:

Estudiamos también factores solubles relacionados con la activación de la respuesta inmune innata. Analizamos los niveles de activina A en LCR, un mediador soluble que está involucrado en la polarización de macrófagos hacia un fenotipo M1.[220] No encontramos diferencias significativas entre los dos grupos de pacientes. (Figura 4.13)

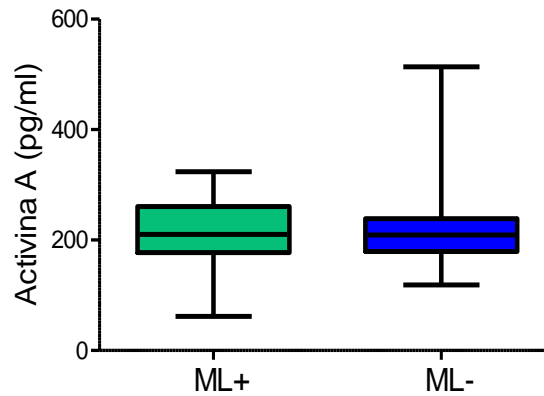


Figura 4.13. Comparación de los niveles de activina A en pacientes con BOC IgM lípido-específicas (ML+) y sin ellas (ML-).

Además, cuantificamos los niveles de *chitinase-3-like 1* (CHI3L1) una proteína también asociada con un peor pronóstico en la EM que se encuentra en el citoplasma de la microglía y astrocitos activados.[189] Los pacientes con BOC IgM lípido específicas mostraron niveles más elevados de esta proteína en LCR ($p=0.005$) (Figura4.14)

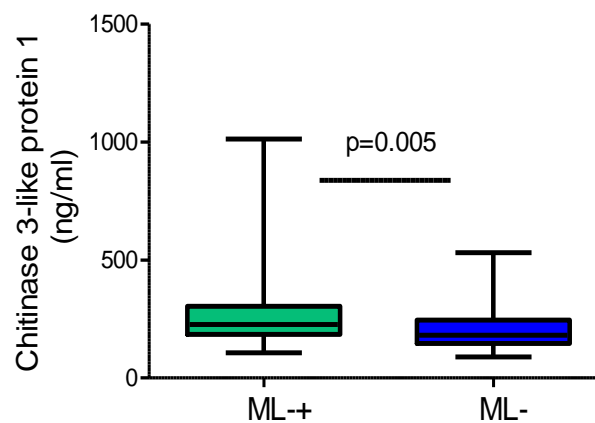


Figura 4.14. Comparación de los niveles de *chitinase 3-like protein 1* en pacientes de EM con BOC IgM lípido-específicas (ML+) y sin ellas (ML-).

4.3.3. Relación con el estrés oxidativo:

El estrés oxidativo se considera un mecanismo que participa en la progresión de la enfermedad.[221] Nosotros estudiamos dos moléculas relacionadas con el estrés oxidativo. Primero cuantificamos la superóxido dismutasa (SOD), una enzima antioxidante y los niveles de 8-Iso-prostaglandina_{2α} (8-iso-PGF_{2α}), producto generado en la peroxidación lipídica. [222]

No observamos diferencias estadísticamente significativas en ninguna de las moléculas estudiadas entre los dos grupos de pacientes. (Figura 4.15)

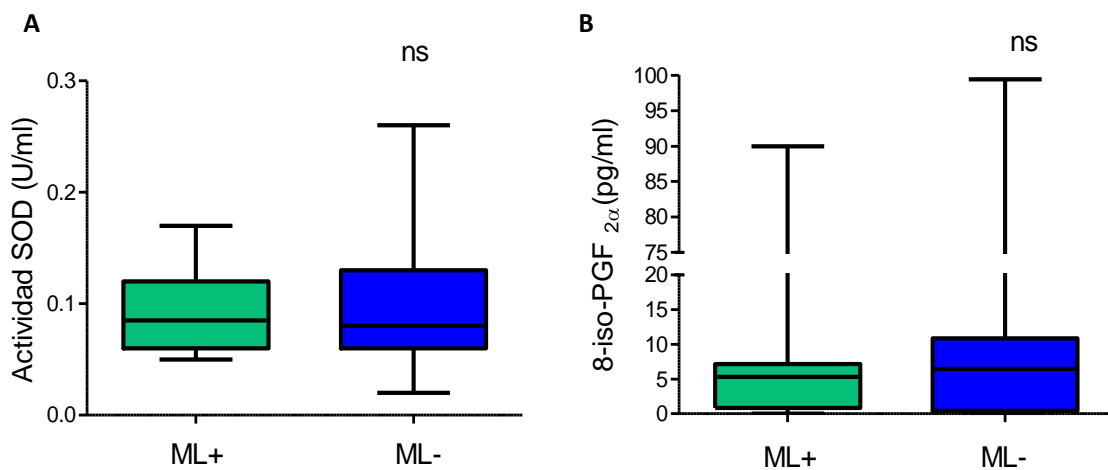


Figura 4.15: Comparación de la actividad de la superóxido dismutasa (SOD) (A) y de los niveles de 8-Iso-prostaglandina_{2α} (8-Iso-PGF_{2α}) (B) en pacientes de EM con BOC IgM lipido-especificas (ML+) y sin ellas (ML).

4.3.4. Relación con la respuesta inmune adaptativa:

Para investigar las diferencias en la respuesta inmune adaptativa entre ambos grupos, analizamos en LCR poblaciones de linfocitos T y poblaciones de linfocitos B mediante citometría de flujo analizando el número total de células en LCR.

4.4.4.1.- Estudio de las poblaciones de linfocitos T CD4:

Evaluamos las distintas subpoblaciones de linfocitos T CD4 cooperadores entre ambos grupos. Los resultados obtenidos se muestran en la tabla 4.11.

Tabla 4.11: Subpoblaciones celulares de linfocitos T CD4 en pacientes ML+ y en pacientes ML-.

Nº células/ml Mediana (RIQ)	ML+ n=43	ML- n=78	p
LT CD4+	2262(880-4251)	1043(552-2327)	0.0011
LT CD4+CD25hiCD127lo/-	79(38-221)	35(15-77)	<0.0001
LT CD4+DR+	331(212-703)	159(106-316)	0.0011
LT CD4+CD62L+	1340(640-2190)	439(199-1149)	0.0008
LT CD4+TNF-α+	682(390-1264)	278(144-514)	0.0002
LT CD4+IFN-γ+	1582(883-3095)	535(334-1055)	0.0003
LT CD4+IL-17+	30(12-155)	30(7-138)	ns
LT CD4+IL-22+	28(15-57)	11(6-46)	0.007
LT CD4+IL-17+IL-22+	9(5-28)	4(1-11)	0.02

RIQ: rango intercuartil (25%-75%); LT: Linfocitos; ML+= Pacientes con BOC IgM lípido específica; ML-= pacientes sin BOC IgM lípido específicas.

Cuando se analizaron las subpoblaciones mediante marcajes de superficie, observamos que los pacientes ML+ mostraban un número mayor de linfocitos T CD4+ totales (p=0.0011). Este aumento se debía un incremento en los linfocitos T CD4+ DR+ (p=0.0011). y los CD62L+ (p=0.008). Pero las diferencias más significativas se observaron en los linfocitos T reguladores (CD4+CD25hiCD127lo/-) (p<0.0001). (Figura 4.16)

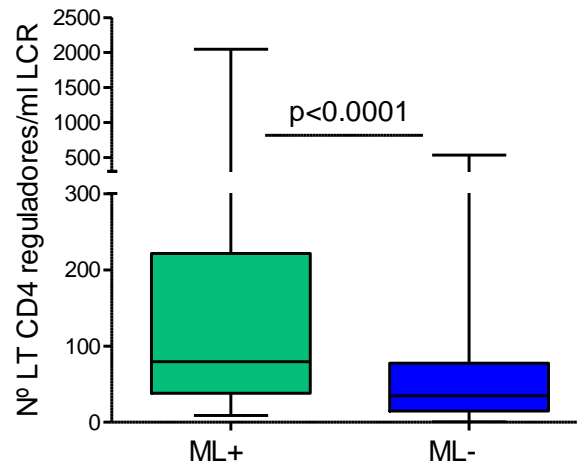


Figura 4.16: Comparación de las células T CD4 reguladores entre pacientes ML+ (BOC IgM lípido específica positivas) y ML- (BOC IgM lípido específica negativas).

Además, cuando estudiamos la producción intracelular de citoquinas, los pacientes ML+ mostraban un aumento en la producción intracelular de TNF- α e IFN- γ ($p=0.0002$; $p=0.0003$). (Figura 4.17) Así mismo, este grupo de pacientes mostró en menor grado un aumento de los linfocitos T CD4+IL-22+ ($p=0.007$). No se encontraron diferencias significativas en las células productoras de IL-17, pero si en la subpoblación que produce IL-17+ e IL-22+ ($p=0.02$).

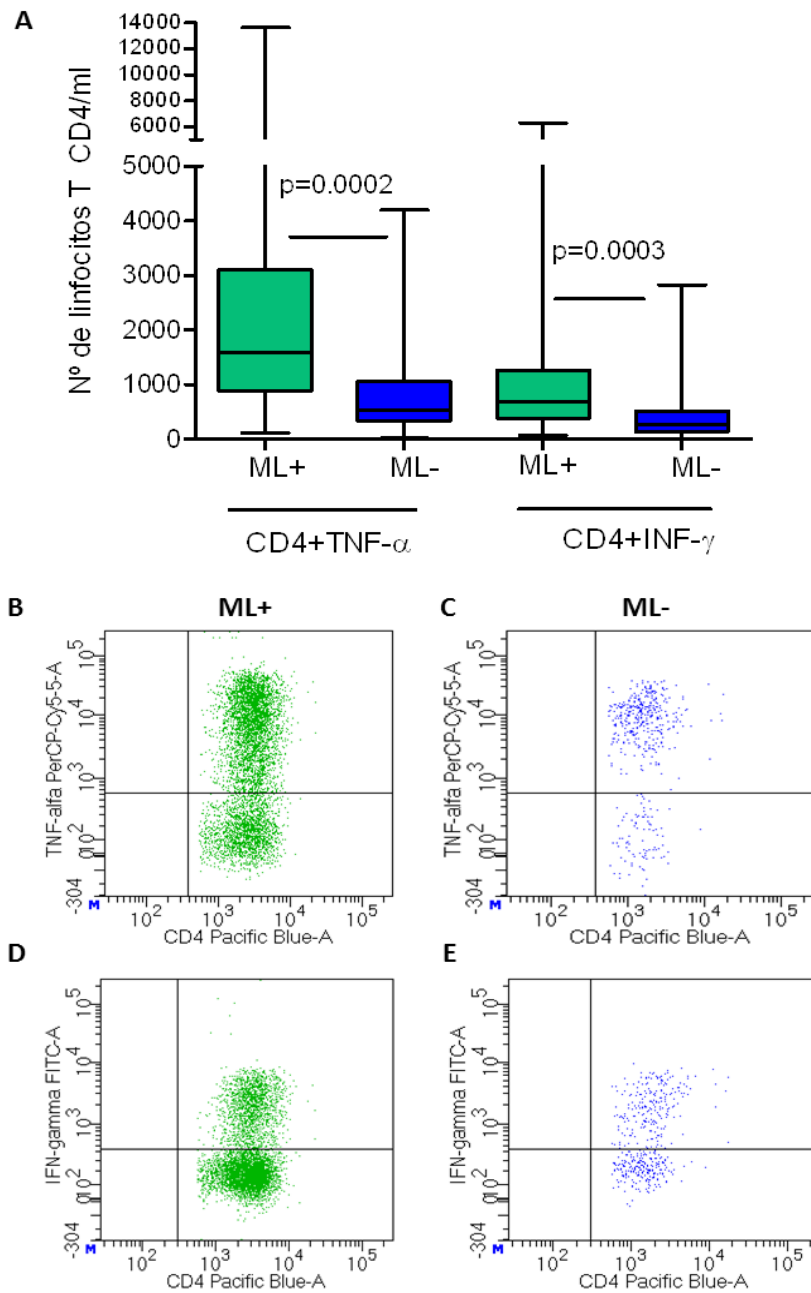


Figura 4.17: A. Comparación de las células T CD4 productoras de TNF- α y productoras de IFN- γ entre pacientes ML+ (BOC IgM lípido-específicas positivas) y ML- (BOC IgM lípido-específicas negativas). Ejemplo representativo de linfocitos T CD4 productoras de TNF- α en pacientes ML+ (B) y en pacientes ML- (C) y productoras de IFN- γ en pacientes ML+ (D) y en pacientes ML- (E).

4.3.4.2.- Estudio de las poblaciones de linfocitos T CD8:

A continuación, estudiamos el número de linfocitos T CD8 totales presentes en el LCR y también la producción de citoquinas intracelulares. (Tabla 4.12)

Tabla 4.12: Subpoblaciones celulares de linfocitos T CD8 en pacientes ML+ y en pacientes ML-.

Nº células/ml Mediana(RIQ)	ML+ n=43	ML- n=78	p
LT CD8+	636(296-1276)	328(131-540)	0.0011
LT CD8+ Perforina+	29(13-55)	14(4-26)	0.02
LT CD8+TNF- α +	751(270-868)	211(127-319)	0.0001
LT CD8+IFN- γ +	422(166-797)	124(86-294)	0.0001
LT CD8+IL-17+	20(8-72)	8(3-28)	ns
LT CD8+IL-22+	13(4-68)	4(2-8)	0.0004
LT CD8+IL-17+IL-22+	7(2-12)	1(0-4)	0.004

RIQ: rango intercuartil (25%-75%); LT: Linfocitos; ML+= Pacientes con BOC IgM líquido específica; ML-= pacientes sin BOC IgM líquido específicas.

El número total de linfocitos T CD8 estaba aumentado en los pacientes ML+. Las pacientes ML+ además mostraron un número mayor de linfocitos T CD8+ productores de perforina.

Al igual que sucedía con la población CD4+, los pacientes ML+ mostraron un aumento de linfocitos T CD8+ productores de TNF- α e INF- γ ($p=0.0001$ en ambos casos). (Figura 4.18) Además, se observó un claro incremento en los linfocitos T CD8+IL-22 ($p=0.0004$), y en menor medida en los CD8+IL-17+IL-22+ ($p=0.004$) en comparación con el grupo ML-.

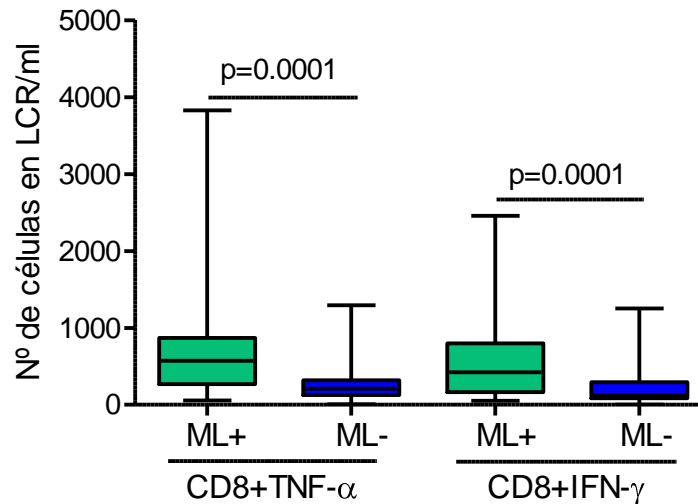


Figura 4.18: Comparación de las células T CD8+TNF- α y CD8+INF- γ entre pacientes ML+ (BOC IgM lípido-específicas positivas) y ML- (BOC IgM lípido-específicas negativas)

4.3.4.3.- Estudio de las poblaciones de linfocitos B:

El siguiente paso fue analizar la respuesta inmune humoral a través del estudio de los linfocitos B, en concreto de las poblaciones de CD5+ y CD5-. Los resultados se muestran en la tabla 4.13. El grupo ML+ mostró un claro aumento de linfocitos B en LCR, tanto de la población CD5+ como la CD5-.

Tabla 4.13: Subpoblaciones celulares de linfocitos B en pacientes ML+ y en pacientes ML-.

Nº células/ml Mediana(RIQ)	ML+ n=43	ML- n=78	p
LB	102(43-394)	29(12-76)	p<0.0001
LB CD5+	25(7-83)	4(1-13)	P<0.0001
LB CD5-	74(32-386)	26(11-64)	p<0.0001

RIQ: rango intercuartil (25%-75%); LB: Linfocitos B; ML+= Pacientes con BOC IgM lípido-específicas; ML-= pacientes sin BOC IgM lípido-específicas

A continuación, en 36 pacientes analizamos la correlación entre el índice de IgM y distintas poblaciones de linfocitos B con el fin de identificar qué población se asocia con la liberación de IgM. (Tabla 4.14)

El índice de IgM se asoció con un mayor número de linfocitos B de memoria, pero sobre todo con un aumento de plasmablastos que expresan el antígeno CD5+en LCR.

Tabla 4.14. Correlación entre el índice de IgM y poblaciones de linfocitos B en LCR en pacientes con EM.

Poblaciones linfocitos B		
n=36	r	P
CD19+IgM+	0.14	ns
CD19+CD27hiCD38hi	0.29	ns
CD19+CD27+	0.34	0.03
CD19+CD27hiCD38hiCD5+	0.38	0.02
CD19+CD27hiCD38hi IgM	0.18	ns
CD19+IgM+CD27+	0.18	ns
CD19+IgM+CD5+	0.24	ns

r= coeficiente de correlación de Spearman.

4.3.5. Relación con la respuesta inmune innata.

Caracterizamos la respuesta inmune innata en LCR a través del análisis de los monocitos y de poblaciones de células dendríticas. Los resultados están representados en la tabla 4.15.

Tabla 4.15: Poblaciones de monocitos y células dendríticas estudiadas en pacientes ML+ y ML-.

Nº células/ml Mediana (RIQ)	ML+ n=43	ML- n=78	p
Monocitos totales	38 (24-66)	54 (29-84)	ns
Mo CD14hiCD16-	18 (9-41)	26 (15-46)	ns
Mo CD14hiCD16+	12 (6-21)	16 (7-30)	ns
Mo CD14loCD16-	5 (2-12)	4 (1-9)	ns
Cdsplasmacitoides	14 (5-57)	9 (3-20)	ns
Cds mieloides	56 (30-147)	31 (16-90)	ns

RIQ: rango intercuartil (25%-75%); ML+= Pacientes con BOC IgM lípido específica; ML-= pacientes sin BOC IgM lípido específicas; Mo= monocitos; Cds= células dendríticas.

No observamos diferencias en las poblaciones estudiadas entre ambos grupos de pacientes.

4.3.5. Caracterización de la respuesta según si los pacientes con EM se encuentran en brote.

Hemos mostrado que hay mayor proporción de pacientes en brote en el grupo ML+ que en el grupo ML-. Lo siguiente que quisimos determinar es si las diferencias en los factores solubles y en las poblaciones leucocitarias estudiadas anteriormente entre los dos grupos de pacientes se deben al brote.

Por tanto, subdividimos a los pacientes con ML+ y ML- en función de que en el momento de la punción lumbar se encontraban en brote o en remisión y analizar si se encontraban diferencias en las moléculas y poblaciones leucocitarias anteriormente.

No encontramos ninguna diferencia significativa entre los grupos de pacientes en los factores solubles estudiadas (Tabla 4.17), ni en las poblaciones leucocitarias estudiadas (Tabla 4.18). Esto indica que los resultados obtenidos no se deben a que haya mayor proporción de pacientes en brote que en el grupo ML+. (Tabla 4.17)

Tabla 4.16: Factores solubles en pacientes ML+ y ML- divididos según actividad de la enfermedad.

Factores solubles Mediana (RIQ)	ML+ Remisión n=31	ML+ Brote n=12	p	ML- Remisión n=69	ML- Brote n=9	p
Índice de IgG	0.21 (0.11-0.34)	0.19 (0.16-0.38)	ns	0.12 (0.08-0.18)	0.14 (0.10-0.2)	ns
Índice de IgM	1.01 (0.85-1.52)	0.72 (0.65-1.17)	ns	0.76 (0.59-1.09)	0.84 (0.64-2.02)	ns
Cociente de albumina	3.98 (3.33-6.42)	4.91 (3.35-6.21)	ns	4.95 (3.63-6.01)	4.51 (3.70-7.78)	ns
Nf-L (ng/l)	2169 (759-4079)	3442 (622-10948)	ns	815 (407-1309)	696.1 (212.1-1490)	ns
SOD (U/ml)	0.09 (0.06-0.12)	0.09 (0.07-0.11)	ns	0.08 (0.06-0.13)	0.1 (0.08-0.12)	ns
8-Isoprostano (pg/ml)	5.01 (0.44-7.12)	6.59 (4.91-13.53)	ns	6.59 (0.45-11.55)	0.67 (0.04-2.24)	ns
<i>Chitinase3 like 1</i> (pg/l)	201.4 (176.6-295.3)	268.8 (222.5-331.8)	ns	180.7 (151.6-235.4)	192. (125.3-258.9)	ns
Activina A (pg/ml)	201.2 (177.2-265.2)	229.3 (166.4-298.9)	ns	207.9 (179.1-235.1)	217.5 (165.8-280.7)	ns

RIQ: rango intercuartil (25%-75%); LT: Linfocitos; ML+= Pacientes con BOC IgM lípido específica; ML-= pacientes sin BOC IgM lípido específicas.

Tabla 4.17: Subpoblaciones de linfocitos T en pacientes ML+ y ML- divididos según actividad de la enfermedad

Nº células CD45+/ml Mediana (IQR)	ML+ Remisión n=31	ML+ Brote n=12	p	ML- Remisión n=9	ML- Brote n=69	p
LT CD4+	2430 (1079-4629)	1631 (679-3819)	ns	945 (548-1742)	2827 (858-4873)	ns
LT CD4+CD25hi CD127lo	91 (41-221)	71 (28-216)	ns	33 (15-58)	161 (23-30)	ns
LT CD4+DR+	322 (211-645)	532 (139-750)	ns	152 (108-311)	175 (77-1035)	ns
LT CD4+CD62L+	1251 (525-2190)	1377 (975-2959)	ns	428 (210-1222)	675 (161-2983)	ns
LT CD4+TNF-α+	1413 (740-2837)	2019 (1276-10781)	ns	535 (334-984)	808 (139-1442)	ns
LT CD4+IFN-γ+	666 (317-1145)	884 (515-5017)	ns	282 (144-534)	261 (75-356)	ns
LT CD4+IL-17+	30 (10-102)	105 (12-282)	ns	31 (8-154)	13 (2-27)	ns
LT CD4+IL-22+	8 (4-20)	29 (9-227)	ns	4 (1-13)	4 (2-6)	ns
LT CD4+IL-17+IL-22+	19 (14-48)	69 (26-430)	ns	11 (6-52)	13 (6-16)	ns
LT CD8+	636 (276-1269)	637 (309-1207)	ns	312 (191-449)	872 (306-1143)	ns
LT CD8+TNF-α+	481 (253-663)	698 (442-955)	ns	211 (129-313)	257 (25-540)	ns
LT CD8+IFN-γ+	382 (160-555)	542 (302-750)	ns	124 (87-294)	134 (24-338)	ns
LT CD8+IL-17	21 (7-53)	68 (12-120)	ns	8 (3-30)	4 (1-10)	ns
LT CD8+IL-22+	5 (2-11)	15 (7-73)	ns	1 (0-4)	2 (0-2)	ns
LT CD8+IL-17+IL-22+	12 (3-27)	47 (21-75)	ns	4 (1-9)	2 (2-4)	ns

RIQ: rango intercuartil (25%-75%); LT: Linfocitos T;; ML+= Pacientes con BOC IgM lípido específica; ML-= pacientes sin BOC IgM lípido específicas.

Tabla 4.18: Subpoblaciones de linfocitos B, monocitos y células dendríticas en pacientes ML+ y ML- divididos según actividad de la enfermedad

Nº células CD45+/ml Mediana (IQR)	ML+ Remisión n=31	ML+ Brote n=12	p	ML- Remisión n=9	ML- Brote n=69	p
LB	89 (44-412)	122 (26-400)	ns	28 (12-66)	45 (14-295)	ns
LB CD5+	17 (6-84)	31 (7-77)	ns	3 (1-12)	5 (2-41)	ns
LB CD5-	74 (37-297)	96 (19-324)	ns	25 (10-56)	35 (12-250)	ns
Monocitos totales	36 (23-67)	56 (27-66)	ns	51 (29-83)	61 (42-96)	ns
Mo CD14hiCD16-	17 (8-39)	29 (11-64)	ns	26 (15-51)	23 (9-34)	ns
Mo CD14hiCD16+	13 (6-21)	12 (6-28)	ns	15 (7-29)	23 (19-39)	ns
Mo CD14loCD16-	6 (2-12)	6 (1-26)	ns	4 (1-9)	5 (1-9)	ns
Cds plasmacitoides	8 (4-38)	60 (20-88)	ns	9 (3-20)	38 (8-68)	ns
Cds mieloides	51 (21-98)	92 (58-281)	ns	32 (16-103)	28 (25-31)	ns

RIQ: rango intercuartil (25%-75%); LB: Linfocitos B; Mo: Monocitos; Cds: células dendríticas; ML+= Pacientes con BOC IgM lípido específica; ML-= pacientes sin BOC IgM lípido específicas.

4.4. EVOLUCIÓN DE LA RESPUESTA INMUNITARIA CON LA EDAD:

Estudios recientes llevados a cabo en necropsias de pacientes con EM sugieren que la fisiopatología de la enfermedad cambia con la edad. Se produce una disminución de la respuesta adaptativa y un aumento de la respuesta innata confinada al SNC. Quisimos investigar el efecto de la edad en las poblaciones de leucocitos y en los factores solubles estudiados anteriormente. Este estudio se llevó a cabo en la misma cohorte de pacientes que en el apartado anterior.

Dado que la presencia de BOC de IgM lípido específicas implica diferencias en el perfil inmunológico de los pacientes, estudiamos el grupo total de pacientes y también por separado los grupos IgM+ e IgM-. Las características demográficas de los tres grupos están representadas en la tabla 4.19. No había diferencias significativas entre los grupos ML+ y ML- en ninguna de las variables estudiadas.

Tabla 4.19: Variables demográficas de pacientes con EM, pacientes ML+ y pacientes ML-.

	EM n=121	ML+ n=43	ML- n=78
EdadM±DS	38.8±11	35.9±9.4	40.5±12
Sexo (F/M)	76/44	29/15	47/29
Tiempo de evolución, años (M±DS)	2.6±4.3	1.8±3.2	3.1±4.7
Brote (SI/NO)	19/98	13/31	9/67

M±DS: Media ± desviación estándar; EM= esclerosis múltiple; ML+= Pacientes con BOC IgM lípido específica; ML-= pacientes sin BOC IgM lípido específicas.

4.4.1. Efecto de la edad en variables clínicas y radiológicas

En primer lugar, estudiamos la correlación de la edad con variables clínicas y radiológicas en los tres grupos. (Tabla 4.20)

Tabla 4.20: Correlación de la edad con variables clínicas y radiológicas.

Variables clínicas y demográficas	EM n=121		ML+ n=43		ML- n=78	
	r	p	r	p	r	p
Nº lesiones en RM en T2	0,22	0,02	0,11	ns	0,32	0,006
Nº de lesiones en RM en T1	0,31	0,0011	0,10	ns	0,41	0,0004
Nº de lesiones captantes de gd	-0,17	ns	-0,29	ns	-0,14	ns
EDSS	0,28	0,002	0,02	ns	0,47	< 0,0001
MSSS	-0,01	ns	-0,09	ns	0,18	ns

EM= esclerosis múltiple; ML+= Pacientes con BOC IgM lípido específica; ML-= pacientes sin BOC IgM lípido específicas. r= coeficiente de correlación de Spearman. Gd: Gadolinio.

En los pacientes con EM, la edad se correlacionó positivamente con el número de lesiones en T2 y sobre todo con el número de lesiones en T1 y con el EDSS. Cuando analizamos por separado los pacientes ML+ y ML-, observamos que dichas correlaciones se debían al grupo ML-(Figura 4.20). En los pacientes ML+ ni el aumento del número de lesiones ni el de la discapacidad se asociaron con la edad. Estos datos indican que la edad es un factor importante en el aumento de la discapacidad en los pacientes ML- pero no acelera el curso de la enfermedad en los mismos, ya que el MSSS no se relaciona con esta variable.

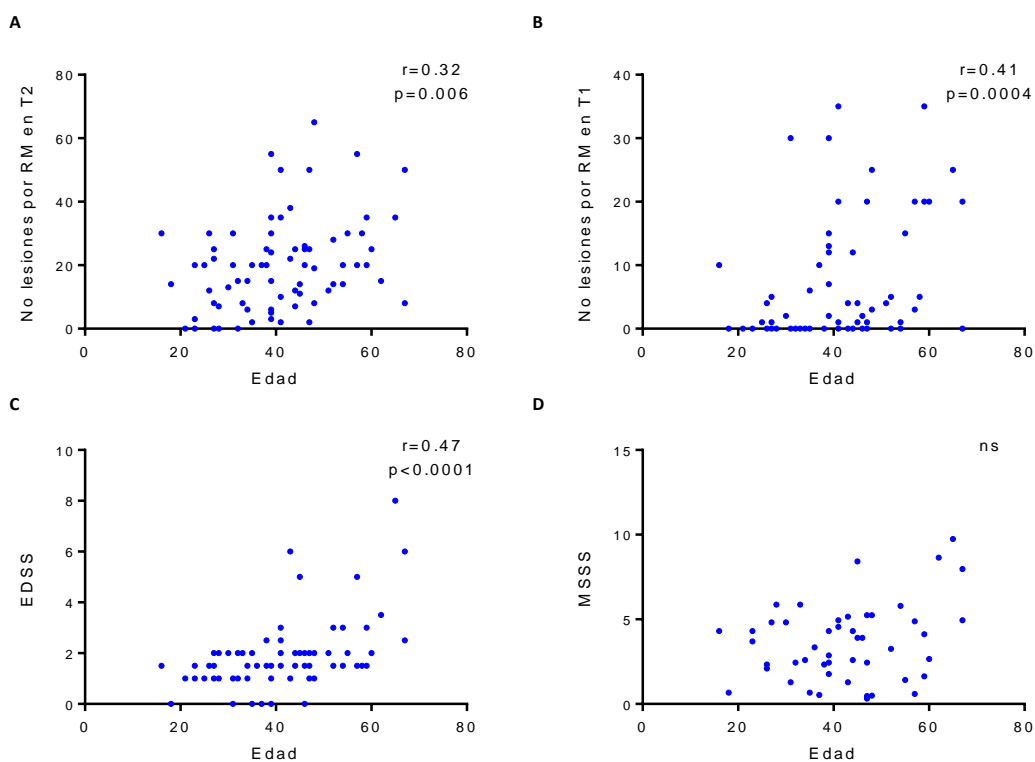


Figura 4.20: Correlaciones entre la edad de los pacientes ML- y el número de lesiones en RM en T2 (A), número de lesiones en RM en T1 (B), la discapacidad (EDSS) (C) y el MSSS.

4.4.2 Efecto de la edad en los factores solubles estudiados en LCR

A continuación, analizamos la correlación de la edad con factores solubles de LCR en los tres grupos. (Tabla 4.21)

Tabla 4.21: Correlación de la edad con factores solubles en LCR.

Factores solubles	EM		ML+		ML-	
	n=121		n=43		n=78	
	r	p	r	p	r	p
Índice de IgG	-0,08	ns	0,05	ns	-0,07	ns
Índice de IgM	-0,13	ns	-0,05	ns	-0,11	ns
Cociente de albumina	0,29	0,0011	0,17	ns	0,33	0,0033
Nf-L (ng/l)	-0,05	ns	-0,31	ns	0,13	ns
SOD (U/ml)	0,16	ns	0,46	0,004	0,04	ns
8-Iso-prostaglandina2α (pg/ml)	0,13	ns	0,15	ns	0,13	ns
<i>Chitinase-3 like 1</i> (pg/l)	0,32	0,0008	0,06	ns	0,49	< 0,0001
Activina A (pg/ml)	0,46	< 0,0001	0,40	0,02	0,52	< 0,0001

EM= esclerosis múltiple; ML+= Pacientes con BOC IgM lípido específica; ML-= pacientes sin BOC IgM lípido específicas. r= coeficiente de correlación de Spearman

En los pacientes con EM, la edad se correlaciona positivamente con el cociente de albumina y sobre todo con los niveles de activina A y chitinase 3-like 1. (Figura 4.21; Figura 4.22). Estas correlaciones se deben principalmente al grupo ML-.

Por otro lado, en los pacientes ML+, observamos una la correlación débil con la activina A. Además, en este grupo de pacientes observamos una correlación positiva entre la edad y la SOD(r=0.42; p=0.004). Esto podría estar indicando un posible aumento de estrés oxidativo en estos pacientes.

No encontramos en ninguno de los tres grupos correlación entre la edad y los niveles de Nf-L o los índices de inmunoglobulina.

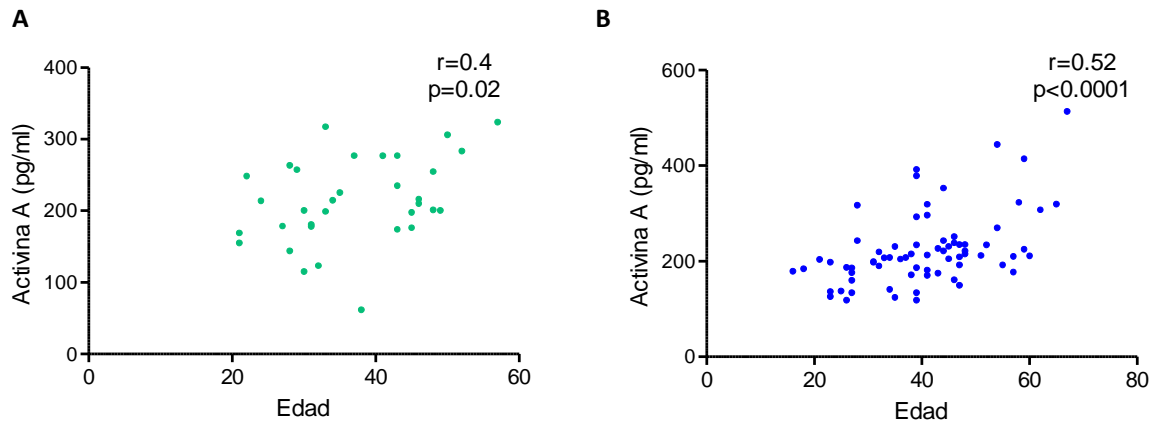


Figura 4.21: Correlaciones entre la edad de los pacientes ML+ (A) y ML- (B) y la concentración de activina A.

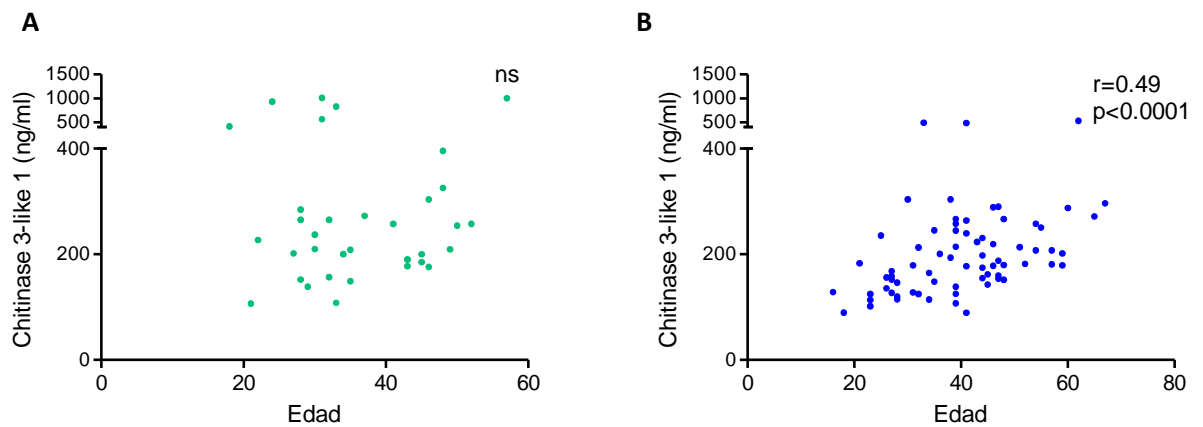


Figura 4.22: Correlaciones entre la edad de los pacientes ML+ (A) y ML- (B) y los niveles de chitinase 3-like 1.

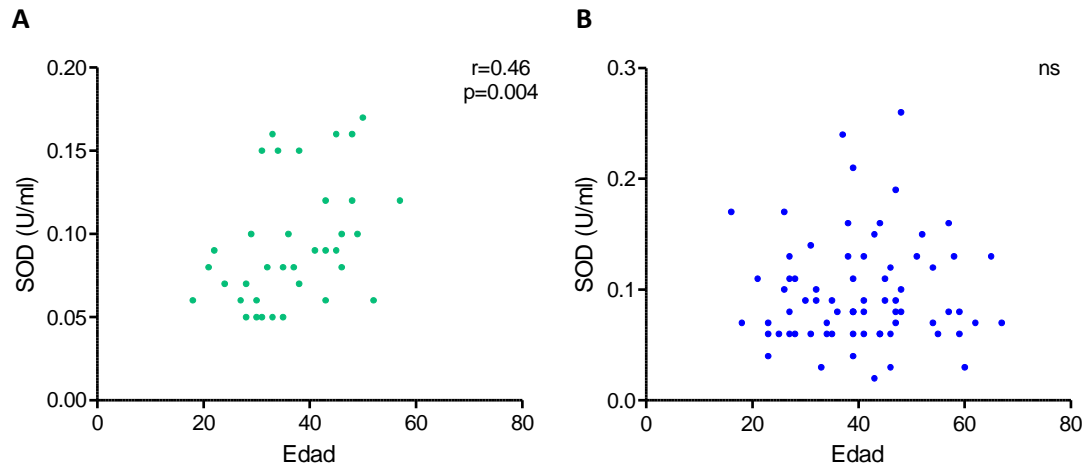


Figura 4.23: Correlaciones entre la edad de los pacientes ML+ (A) y ML- (B) con la superóxido dismutasa (SOD).

4.3 Efecto de la edad en las poblaciones de leucocitos en LCR

A continuación, estudiamos como afecta la edad en las subpoblaciones linfocitarias en LCR. En primer lugar, estudiamos el efecto en los linfocitos T CD4. (Tabla 4.20)

Tabla 4.22: Correlación de la edad en con subpoblaciones de linfocitos T CD4+.

Nº de células/ml	EM n=121		ML+ n=43		ML- n=78	
	r	p	r	p	r	p
LT CD4+	-0,35	< 0,0001	-0,13	ns	-0,42	0,0001
LT CD4+CD25hiCD127lo/-	-0,24	0,01	0,07	ns	-0,32	0,005
LT CD4+DR+	-0,22	0,03	0,18	ns	-0,33	0,007
LT CD4+CD62L+	-0,31	0,001	0,10	ns	-0,42	0,0004
LT CD4+TNF-α+	-0,30	0,005	-0,05	ns	-0,35	0,008
LT CD4+IFN-γ+	-0,28	0,009	-0,11	ns	-0,27	0,044
LT CD4+IL-17+	-0,28	0,011	-0,39	ns	-0,22	ns
LT CD4+IL-22+	-0,29	0,007	0,01	ns	-0,38	0,0033
LT CD4+IL-17+IL-22+	-0,19	ns	-0,16	ns	-0,16	ns

EM= esclerosis múltiple; ML+= Pacientes con BOC IgM líquido específica; ML-= pacientes sin BOC IgM líquido específicas; LT: Linfocitos; r= coeficiente de correlación de Spearman; Los valores de p son el resultado de la correlación de Spearman

El número de linfocitos T CD4+ en LCR disminuye con la edad en los pacientes con EM. Esta disminución sólo se observa en los pacientes ML-, mientras que en el grupo ML+ el número de linfocitos T CD4 el número de linfocitos CD4+ se mantiene estable independientemente de la edad.

La disminución de los linfocitos T CD4+ en los pacientes ML- se ve reflejada en un descenso de determinadas subpoblaciones entre las que se cuentan: los linfocitos T CD4 reguladores, CD4+CD62L+, CD4DR+ y los productores de TNF-α, de IL-22 y en menor grado los productores de IFN-γ.

En los pacientes ML+ no se observó ningún descenso significativo de las subpoblaciones de linfocitos CD4+ con la edad.

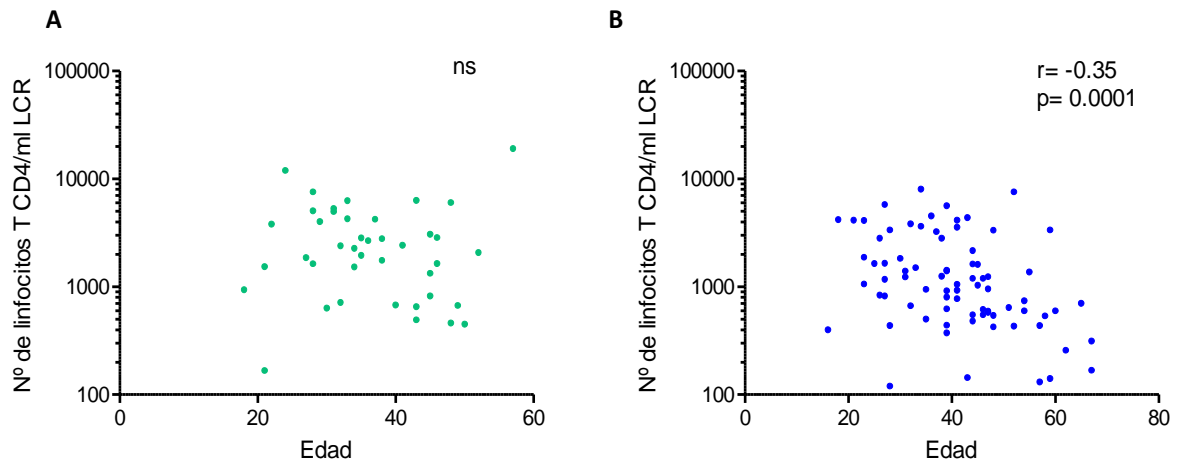


Figura 4.23: Correlaciones entre la edad de pacientes ML+ (A) y los pacientes ML- (B) con la el número de linfocitos T CD4 en LCR.

A continuación, estudiamos como afecta la edad a las poblaciones de linfocitos T CD8+. (Tabla 4.23) Al igual que sucedía con los CD4+, esta subpoblación en LCR disminuye con la edad en los pacientes con EM. Esto se debe a los pacientes ML-. (Figura 4.24).

No encontramos ninguna correlación entre la edad y las poblaciones de linfocitos T CD8 productores de citoquinas en ninguno de los tres grupos. Sin embargo, solamente los pacientes ML- muestran una clara disminución de los linfocitos T CD8 productores de perforina.

Tabla 4.23: Correlación de la edad con subpoblaciones de linfocitos T CD8+.

Nº de células/ml	EM n=121		ML+ n=43		ML- n=78	
	r	p	r	p	r	p
LT CD8+	-0,28	0,002	-0,04	ns	-0,36	0,0011
LT CD8+Perforina+	-0,55	0,0003	-0,44	ns	-0,51	0,009
LT CD8+TNF- α +	-0,24	0,026	-0,01	ns	-0,24	ns
LT CD8+IFN- γ +	-0,20	ns	0,05	ns	-0,22	ns
LT CD8+IL-17+	-0,14	ns	-0,02	ns	-0,11	ns
LT CD8+IL-22+	-0,04	ns	0,10	ns	-0,01	ns
LT CD8+IL-17+IL-22+	-0,07	ns	0,07	ns	-0,04	ns

EM= esclerosis múltiple; ML+= Pacientes con BOC IgM lípido específica; ML-= pacientes sin BOC IgM lípido específicas; LT: Linfocitos; r= coeficiente de correlación de Spearman; Los valores de p son el resultado de la correlación de Spearman

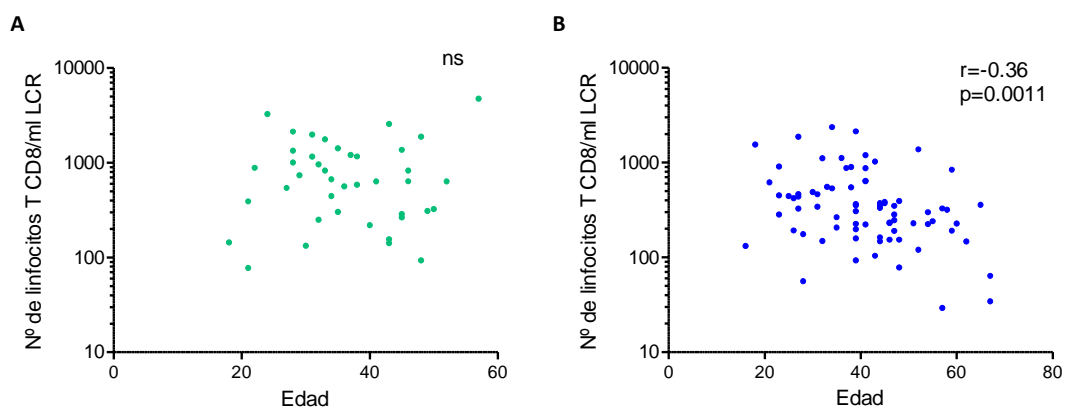


Figura 4.24: Correlación entre la edad de los pacientes ML+ (A) y los pacientes ML- (B) y el número de linfocitos T CD8 en LCR.

A continuación, estudiamos el efecto de la edad en la respuesta humoral (Tabla 4.24). Hay una clara correlación negativa con los linfocitos B. Esta correlación se da en los linfocitos B CD5+ y CD5- aunque las diferencias son más significativas en la subpoblación de linfocitos B CD5-. Esta disminución se debe al grupo ML-. En el grupo ML+ no disminuye el número de linfocitos B en LCR en relación con la edad (Figura 4.25).

Por último, estudiamos la correlación de las poblaciones de monocitos y células dendríticas en relación con la edad. No encontramos ninguna asociación de los monocitos con la misma. Sin embargo, los pacientes ML- experimentaron una disminución de las poblaciones de células dendríticas mieloides y plasmacitoides al aumentar la edad.

Tabla 4.24: Correlación de la edad con subpoblaciones de linfocitos B, monocitos y con células detríticas.

Nº de células/ml	EM n=121		ML+ n=43		ML- n=78	
	r	p	r	p	r	p
LT CD19+	-0,36	< 0,0001	-0,05	ns	-0,44	< 0,0001
LT CD19+CD5+	-0,33	0,0002	-0,11	ns	-0,35	0,0017
LT CD19+CD5-	-0,37	< 0,0001	-0,04	ns	-0,45	< 0,0001
Monocitos totales	-0,09	ns	-0,04	ns	-0,14	ns
Mo CD14hiCD16-	-0,12	ns	-0,14	ns	-0,12	ns
Mo CD14hiCD16+	-0,05	ns	0,17	ns	-0,18	ns
Mo CD14loCD16-	-0,07	ns	0,24	ns	-0,22	ns
Cds plasmacitoides	-0,26	ns	0,06	ns	-0,39	0,02
Cds mieloides	-0,31	0,028	0,02	ns	-0,41	0,017

EM= esclerosis múltiple; ML+= Pacientes con BOC IgM lípido específica; ML-= pacientes sin BOC IgM lípido específicas; LT: Linfocitos; r= coeficiente de correlación de Spearman

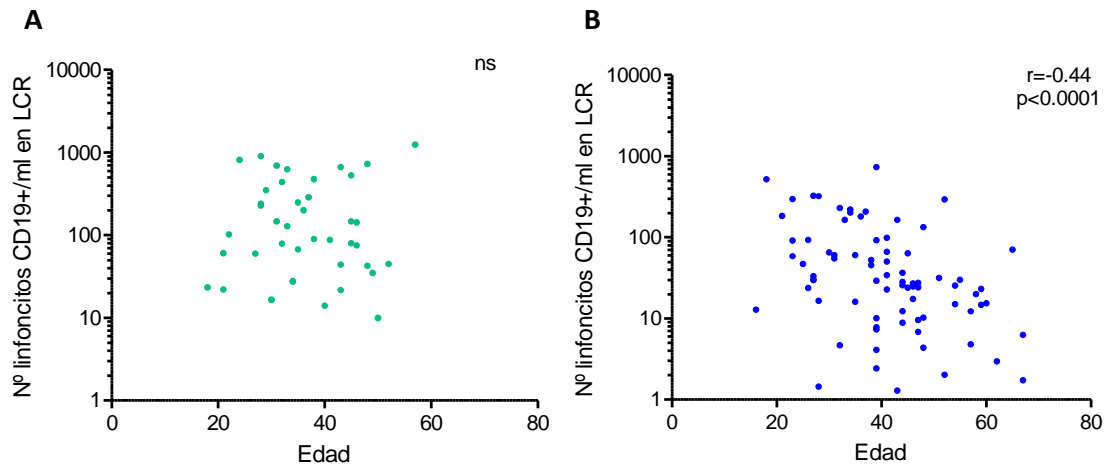


Figura 4.25:Correlaciones entre la edad en la que se encuentra los pacientes ML+ (A) y los pacientes ML- (B) con el número de linfocitos B en LCR.

4.4.4 Efecto de la edad en pacientes clasificados en menores y mayores de 40 años.

Hemos demostrado que la edad influye de distinta manera en los pacientes ML+ y ML-. Lo siguiente que quisimos determinar es un punto de corte en la edad que nos permita establecer un punto en el tiempo en el que los pacientes ML- presentan un fenotipo menos inflamatorio. Elegimos la edad de 40 años porque entre los 40-45 años se ha observado que los pacientes con EM comienzan a progresar en ausencia de brotes [223] Los grupos que establecimos fueron los siguientes:

Pacientes ML+ mayores de 40 años (ML+>40): Se incluyeron a 28 pacientes

Pacientes ML+ menores de 40 años (ML+<40): Se incluyeron a 15 pacientes

Pacientes ML- menores de 40 años (ML-<40): Se incluyeron a 40 pacientes

Pacientes ML- mayores de 40 años (ML->40): Se incluyeron a 38 pacientes

A continuación, comparamos estudiamos las diferencias entre los pacientes ML+ mayores y menores de 40 años y lo mismo con los pacientes ML-. Analizamos

variables clínicas, radiológicas, factores solubles y poblaciones leucocitarias en LCR que interviene en la respuesta inmune innata y adaptativa.

4.5.3.1. Factores solubles

No encontramos ninguna diferencia estadísticamente significativa con los factores solubles asociados al daño axonal y a la síntesis intratecal de inmunoglobulinas, sin embargo el cociente de albúmina aumenta de forma moderada en los pacientes ML- mayores de 40 años [Mediana (RIQ); ML-<40: 4.3 (2.9-5.8); ML->40: 5.2(4.4-7.9); $p=0.02$).

Los pacientes ML+>40 mostraron niveles mayores de la actividad de la SOD ($p=0.02$)(Figura 4.26).

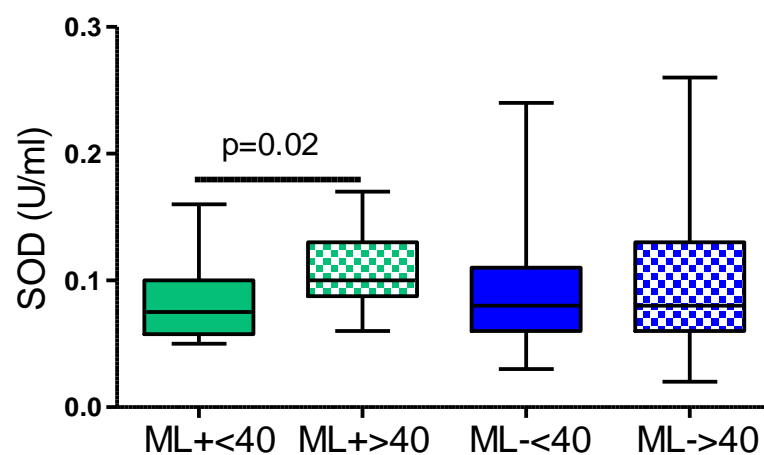


Figura 4.26: Comparación de la actividad SOD (A) entre pacientes ML+ mayores de 40 años (ML+>40) con menores de 40 (ML+<40) y entre pacientes ML- mayores de 40 años (ML->40) con menores de 40 (ML-<40).

Sin embargo, las mayores diferencias se observaron en otras moléculas implicadas en la activación de la respuesta innata. En el grupo ML-, los pacientes mayores de 40 años mostraron un aumento en los niveles de *chitinase 3-like 1* ($p=0.0023$) y de activina A ($p=0.0005$) (Figura 4.27).

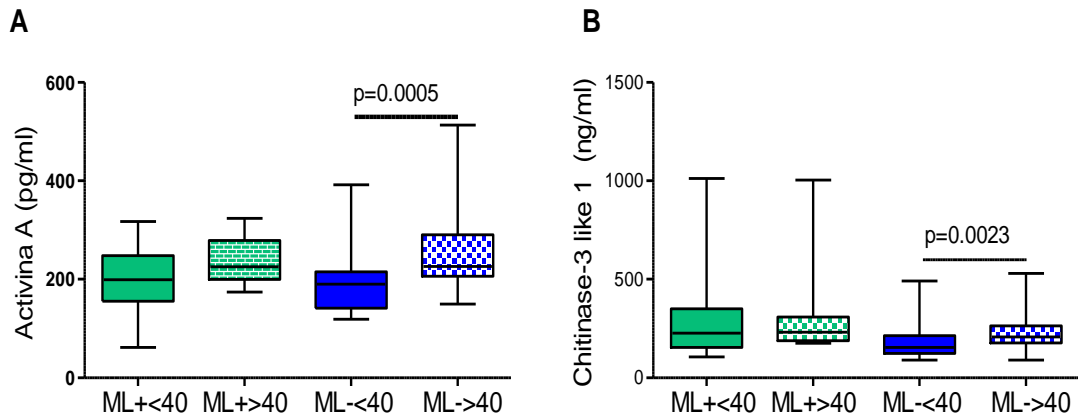


Figura 4.27: Comparación de los niveles de activina A (A) y de los niveles de *chitinase* 3-like 1 (B) entre pacientes ML+ mayores de 40 años (ML+>40) con menores de 40 (ML+<40) y entre pacientes ML- mayores de 40 años (ML->40) con menores de 40 (ML-<40).

4.5.3.3. Respuesta inmune innata y adaptativa

En los pacientes ML->40 hay una bajada en el número de linfocitos T CD4+ ($p=0.0045$). Esta disminución se detectó en las siguientes las subpoblaciones de linfocitos T CD4+, en los linfocitos T efectores (CD4+HLA-DR+) ($p=0.028$), linfocitos T CD4+CD62L+ ($p=0.007$) y en los linfocitos T CD4+ reguladores ($p=0.049$). Los pacientes ML+ no mostraron diferencias significativas en estas subpoblaciones con respecto a la edad. (Figura 4.28)

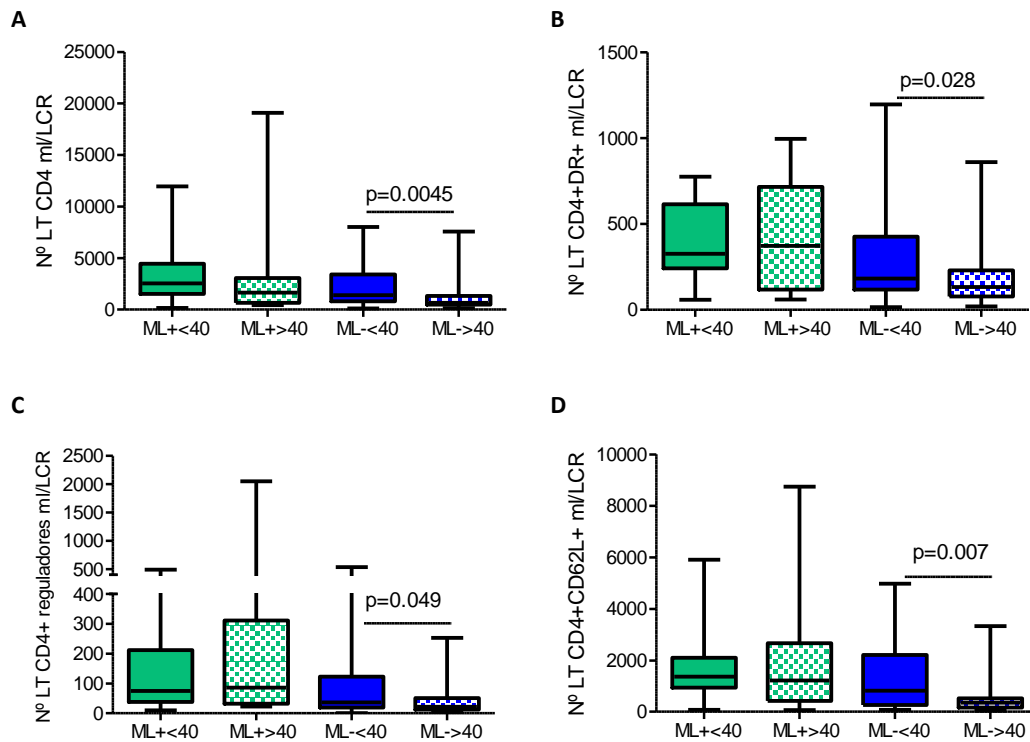


Figura 4.28: Comparación del número de linfocitos T CD4+ (A), CD4+DR+ (B) y CD4+ reguladores (C) y CD4+CD62L+ (D) entre pacientes ML+ mayores (ML+>40) y menores (ML+<40) de 40 años y entre pacientes ML- mayores (ML->40) y menores (ML-<40) de 40 años.

Para el análisis de citocinas aumentamos el punto de corte a 45 años, porque observamos que la producción de las mismas tarda más en bajar con la edad. Los pacientes ML->40 mostraron una disminución en el número de linfocitos T CD4+ productores de IL-22 ($p=0.006$) y de TNF- α (Figura 4.29). Además, la producción de IFN- γ en este grupo de pacientes mostró una tendencia a la disminución, aunque no fue estadísticamente significativa ($p=0.056$).

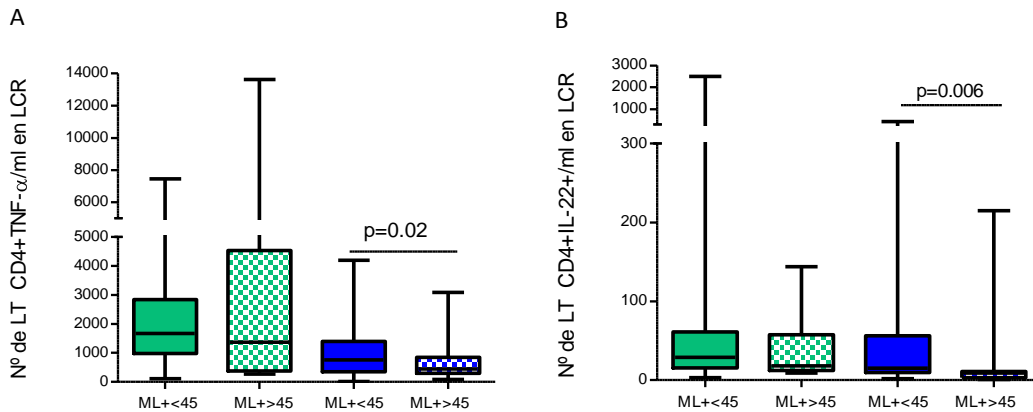


Figura 4.29: Comparación del número de linfocitos CD4+TNF- α (A) y CD4+IL-22+ (B) entre pacientes ML+ mayores (ML+>45) y menores (ML+<45) de 45 años y entre pacientes ML- mayores (ML->45) y menores (ML-<45) de 45 años.

El número de linfocitos T CD8+ también era inferior en los pacientes ML->40 comparado con ML-<40; ML->40: 243(156-374); $p=0.02$) mientras que en los pacientes ML+ no se encontraron diferencias estadísticamente significativas. (Figura 4.30)

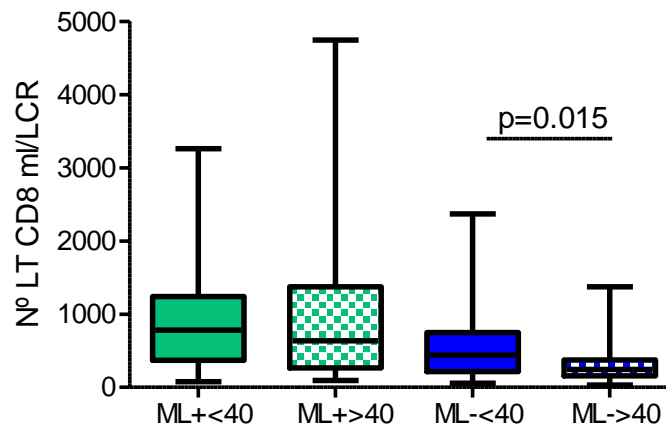


Figura 4.30: Comparación del número de linfocitos T CD8+ entre pacientes ML+ mayores (ML+>40) (ML+<40) de 40 años.

A continuación, estudiamos los linfocitos B. Los pacientes ML->40 mostraron un número menor de linfocitos B en comparación con los ML-<40 ($p=0.0026$).

Mostraron diferencias en la subpoblación CD5+ ($p=0.016$), pero sobre todo en la subpoblación CD19+CD5- ($p=0.002$); mientras que en los pacientes ML+ no se encontraron diferencias significativas. (Figura 4.31)

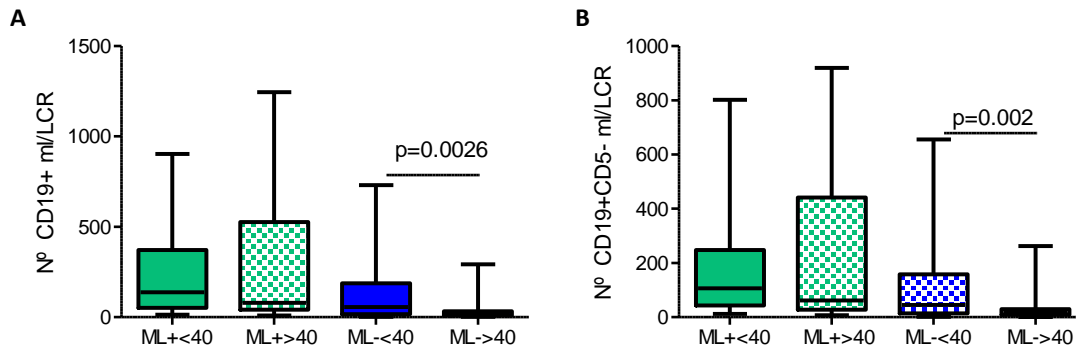


Figura 4.31: Comparación del número de linfocitos B (A), y linfocitos B CD5- (B) entre pacientes ML+ mayores de 40 años (ML+>40) con menores de 40 (ML+<40) y entre pacientes ML- mayores de 40 años (ML->40) con menores de 40 (ML-<40).

No encontramos diferencias significativas en el número de monocitos en los pacientes ML+ y los pacientes ML-. Sin embargo, los pacientes ML- mayores de 40 años mostraron una disminución en el número de células dendríticas plasmacitoides (ML-<40: 16(7-50); ML->40: 5 (3-11); $p=0.045$) y mieloides (ML-<40: 59(24-144); ML->40: 20(12-32), $p=0.01$). Estas diferencias no se observan en los pacientes ML+.

4.5.4 Estudio de marcadores de inmunosenescencia

A continuación, quisimos investigar si los pacientes con EM podrían sufrir una inmunosenescencia prematura. El aumento en los títulos de anticuerpos frente a citomegalovirus (CMV) se ha establecido como un marcador de inmunosenescencia, [224] En la misma cohorte del apartado anterior estudiamos la correlación entre la edad de los pacientes y los títulos de IgG frente a CMV. Se observó una clara correlación positiva con la edad en los pacientes IgM- ($r=0.42$; $p=0.0002$) que no se detectó en los pacientes ML+.

El siguiente paso fue analizar si partir de los 40 años aumenta los títulos de estos anticuerpos. No se observaron diferencias significativas en los pacientes ML+ mayores y menores de 40 años. Sin embargo, los pacientes ML- mayores de 40 mostraron un claro aumento en los títulos de anticuerpos frente CMV ($p=0,0009$). (Figura 4.32)

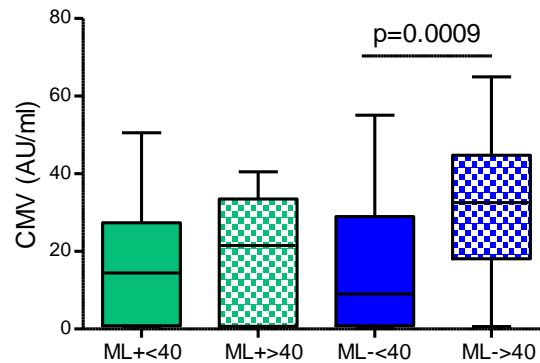


Figura 4.32: Comparación de los títulos de IgG frente a CMV entre pacientes ML+ mayores de 40 años (ML+>40) con menores de 40 (ML+<40).

En resumen, observamos que en los pacientes ML- hay un aumento de los títulos de anticuerpos IgG frente a CMV que podría indicar que estos pacientes están sufriendo una inmunosenescencia prematura que no se daría en los pacientes ML+.

4.5 DETECCIÓN DE LINFOCITOS B EN TEJIDO POST-MORTEM EN PACIENTES CON EM.

Hemos demostrado que la presencia de BOC IgM-LE+ en LCR se asocia con una mayor inflamación en la EM y que la respuesta inmune se mantiene con la edad en este grupo de pacientes. Por ello, quisimos investigar las células productoras de IgM en tejidos post-mortem de pacientes. En este estudio se incluyeron 10 pacientes con EMSP y 5 controles. Elegimos secciones del cerebro que abarcasen tanto la

sustancia gris como la sustancia blanca subcortical, debido a que las lesiones en la sustancia gris son las que se han asociado con la progresión de la discapacidad.

4.5.1. Detección de las lesiones desmielinizadas:

En primer lugar, estudiamos la presencia de lesiones desmielinizantes a través de la tinción inmunohistoquímica de MOG. Las lesiones en la sustancia gris (LSG), se caracterizaron basándose en su localización. Se definieron de la siguiente forma:

- Las lesiones tipo I o leucocortical que involucran también a la sustancia blanca subcortical sin llegar a la región subpial.
- Lesiones tipo II o intracorticales, generalmente alrededor de un vaso sanguíneo exclusivamente dentro de la corteza.
- Lesiones tipo III o subpiales

Todos los casos menos uno, presentaron lesiones corticales. La mayoría de las lesiones presentes eran subpiales, que son las más comunes en las lesiones corticales de pacientes con EM. También se detectaron lesiones leucocorticales que convergían con las subpiales en el 40% de los pacientes. (Figura4.33). Finalmente, 4 casos mostraron lesiones en la sustancia blanca subcortical.

Las lesiones fueron posteriormente clasificadas según la actividad en: activas (lesiones con un núcleo confluyente centro infiltrado de células HLA-DR+ microglía/macrófagos con morfología ameboide); crónicas activas (lesiones en donde en el borde y no en el centro de la placa confluyen células HLA-DR+ macrófagos/microglía con morfología ameboide) o lesiones crónicas inactivas (Se aprecia un número reducido de microglía/macrófagos). El 60% de las lesiones en la sustancia gris eran crónicas activas mientras que las restantes eran crónicas. Las lesiones en la sustancia blanca subcortical eran todas activas.

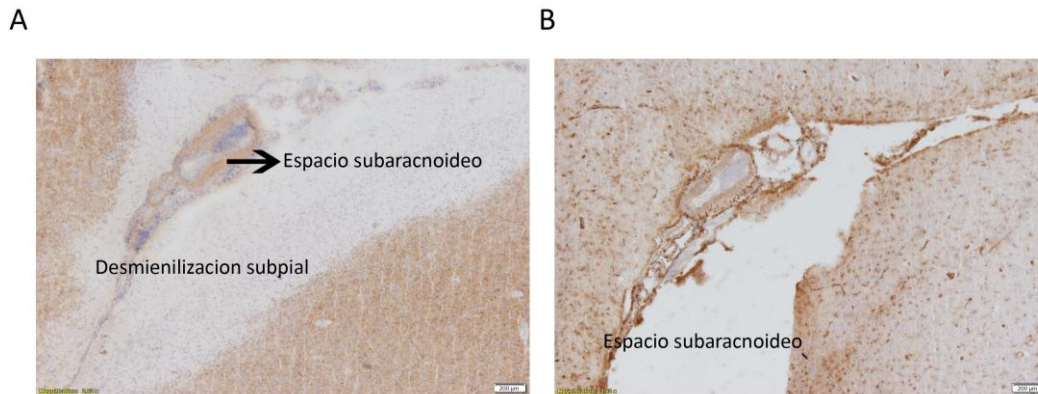


Figura 4.33: Identificación de lesión subpial crónica inactiva. Bloques teñidos con anti-MOG para la detección de la desmielinización de la lesión (A) y con anti-HLA-DR para identificar la actividad inflamatoria (B). La figura A representa la región de un surco en donde se observa la desmielinización subpial mientras que la figura B corresponde a la misma región con escasos microglía/macrófagos activados.

4.7.4. Identificación de células plasmáticas en las lesiones:

A continuación, analizamos la presencia de células plasmáticas en las meninges en todos los bloques mediante la expresión del el antígeno CD138. Para el análisis contamos las células CD138+ presentes en las meninges en cada sección y realizamos la media. Estudiamos la existencia de activación celular cortical en las regiones próximas a las plasmáticas.

Se observaron células plasmáticas en seis de los diez casos de EM y en ninguno de los cinco controles. (Figura 4.34) El número de células plasmáticas de cada caso se detalla en tabla 4.26

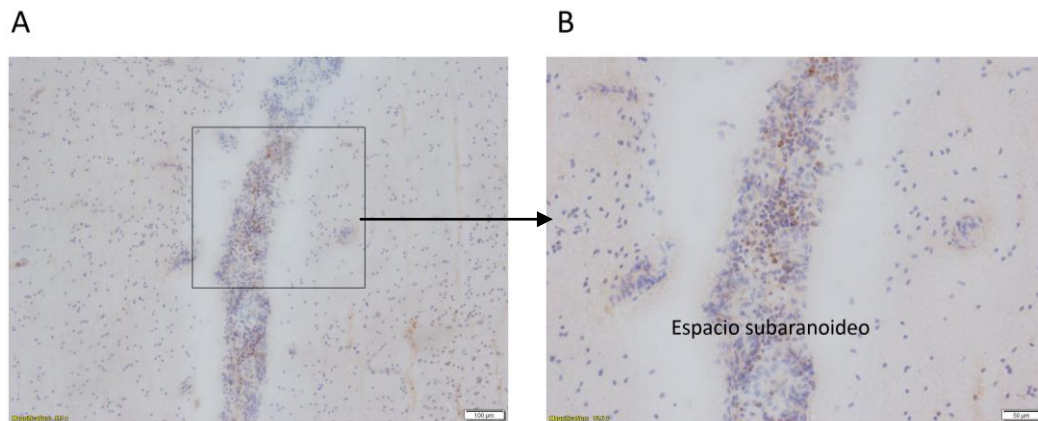


Figura 4.34: Preparación para la identificación de células plasmáticas mediante la tinción con anti-CD138 en un paciente con EMSP con infiltración leucocitaria en el espacio subaracnoideo. Se observan células plasmáticas dispersas entre los infiltrados celulares. La figura B es una ampliación (50µm) de la figura A (10µm).

4.7.2 Identificación de plasmablastos IgM e IgG en los cortes de cerebro:

Para la identificación de plasmablastos se tiñeron las secciones con anti-IgM o con anti-IgG. Para el análisis contamos el número de células IgG+ e IgM+ en las meninges en cada sección y realizamos la media entre cada caso.

No encontramos plasmablastos IgG+ en ninguna de las secciones analizadas, ni en los pacientes con EM, ni en los controles. Sin embargo, cuando realizamos la tinción de IgM observamos estos linfocitos en 5 pacientes con EM y en ningún control. (Tabla 4.35)

Los plasmablastos se localizaban principalmente en las meninges, cerca de las lesiones subpiales. (Figura 4.24)

Previamente se había estudiado en las necropsias incluidas en este estudio la presencia de folículos linfoides terciarios. Existía una clara correlación entre los plasmablastos IgM y los folículos linfoides ectópicos. En cinco de los seis pacientes con estas estructuras se detectaba la presencia de plasmablastos IgM. Sin embargo, ni los folículos linfoides ectópicos ni los plasmablastos IgM+ se asociaron con la presencia de células plasmáticas en las meninges.

Tabla 4.25: Número de células CD138+ e IgM+ presentes en el tejido.

Casos	Folículo linfoide ectópicos (+/-)	Células CD138+ meninges	Células IgM+ meninges
MS326	-	3	0
MS317	+	0	19
MS347	-	6	0
MS356	+	1	0
MS371	+	0	0
MS402	+	10	5
MS407	+	0	6
MS408	+	11	18
MS426	+	0	16
MS448	-	4	0
C14		0	0
C25		0	0
C28		0	0
C45		0	0
C48		0	0

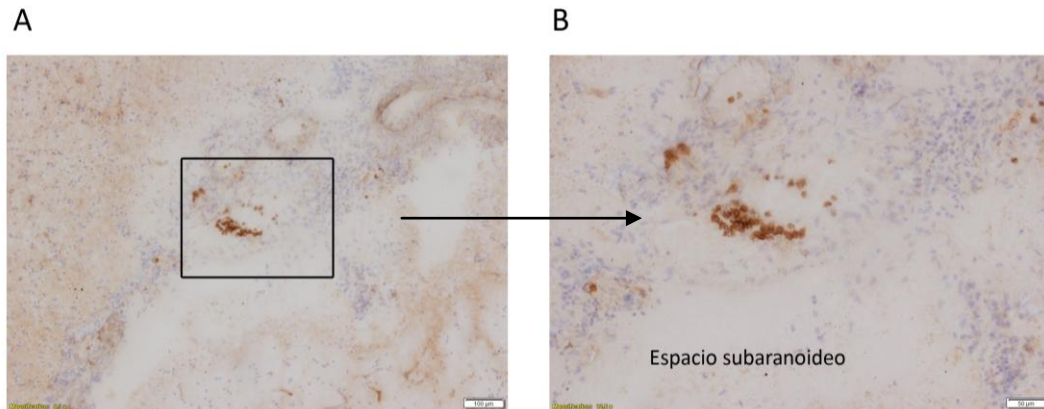


Figura 4.35: Preparación para la identificación de plasmablastos IgM mediante la tinción con anti-IgM en un paciente con EMSP que mostraba lesión subpial extensa. Se observan agrupaciones de plasmablastos en el espacio subaranoideo. La figura B es una ampliación (50 μ m) de la figura A (10 μ m).

Hemos identificado que en los pacientes con EM secundaria progresiva se pueden detectar plasmablastos de IgM en las meninges y que estas células están presentes en aquellos pacientes que presentan folículos linfoides terciarios que se han asociado con tener mayor patología cortical y mayor progresión de la enfermedad. Además, la presencia de plasmablastos no se asocia a las células plasmáticas indicando que son de vida corta y necesitan continua reactivación que podría ocurrir en los folículos linfoides ectópicos.

5. DISCUSIÓN

La esclerosis múltiple es la principal causa de discapacidad en adultos jóvenes. Su incidencia se acerca al 0.1% en la población española y en otros países de Europa Occidental y Norteamérica. En los últimos años se han realizado múltiples esfuerzos para dilucidar los mecanismos que juegan un papel importante en la fisiopatología de la enfermedad. Sin embargo, todavía hay muchas incógnitas por desvelar en la EM. Por ejemplo, los mecanismos inmunológicos que diferencian a los pacientes con EM de aquellos con otras patologías inflamatorias del SNC. También quedan por conocer las poblaciones celulares o moléculas solubles implicadas en el daño axonal en la EM. La asociación entre distintos biomarcadores que diferencian pacientes con formas agresivas o más benignas de la enfermedad también está por explorar. Finalmente, los cambios de la respuesta inmunitaria asociados con la edad son aún una incógnita y su estudio reviste el mayor interés clínico y científico. En este trabajo hemos intentado estudiar varios de estos aspectos como se detalla a continuación.

5.1 ESTUDIO DE LA RESPUESTA INMUNITARIA EN PACIENTES CON EM, OENI Y ONNI EN LCR.

La inflamación en el SNC se caracteriza por la infiltración de células del sistema inmune en el parénquima cerebral, independientemente del origen infeccioso o autoinmune de la enfermedad. El líquido cefalorraquídeo refleja lo que está ocurriendo en el SNC y su estudio puede ayudarnos a dilucidar los mecanismos inmunológicos que juegan un papel en estas patologías. Por ello, el estudio de las poblaciones celulares presentes en el LCR en los pacientes con EM y otras enfermedades neurológicas podría contribuir a desvelar las diferencias entre EM y otras patologías inflamatorias del SNC, que aún no se conocen en su totalidad.

Hasta ahora la mayoría de los estudios realizados en LCR, han comparado pacientes con EM con individuos sanos o pacientes con enfermedades neurológicas no inflamatorias. Los principales hallazgos de estos estudios muestran que en la EM hay un aumento del cociente CD4:CD8,[197] y un aumento de la proporción de linfocitos B y plasmablastos en LCR en comparación con patologías no inflamatorias. [117, 206] Sin embargo, todavía no se han obtenido resultados concluyentes

cuando se comparan los linfocitos presentes en LCR en pacientes con EM y en otras enfermedades neurológicas inflamatorias.[197, 212, 225]

En este trabajo nos propusimos caracterizar las distintas subpoblaciones leucocitarias que se encuentran presentes en LCR en pacientes con EM, OENI y OENN, con el fin de establecer distintos perfiles celulares. Analizamos el número total de células presentes LCR en 115 pacientes con EM, 36 pacientes con OENI y 29 pacientes con OENN.

Los pacientes con OENN mostraron un número significativamente menor de prácticamente todas las poblaciones leucocitarias en comparación con los pacientes con EM y OENI. Algunas poblaciones leucocitarias estaban aumentadas tanto en la EM como en OENI como los linfocitos T CD4 y CD8 totales, los linfocitos CD4+ activados, los que han emigrado recientemente de la periferia y los productores de IL-17. Estas células parecen ser mediadoras de inflamación en el SNC independientemente de la etiología que la produzca. Bielekova *et al.* obtuvo hallazgos similares, observaron que los pacientes con EM y otras enfermedades neurológicas tienen menor número de linfocitos T que otras enfermedades no inflamatorias del SNC. Pero no hallaron diferencias con otras enfermedades neuroinflamatorias en ninguna población estudiada. [212] Sin embargo, en este trabajo hemos observado que hay diferencias en algunas subpoblaciones entre la EM y otras enfermedades inflamatorias incluidas en este estudio, lo que muestra que hay mecanismos que se asocian de forma más específica con la EM. Así, estos pacientes mostraron un número más elevado de linfocitos CD4 reguladores que aquellos con OENI. El aumento de esta población podría ser un mecanismo compensatorio para frenar la actividad inflamatoria. Sin embargo, esto podría no conseguirse debido a que en la EM hay una pérdida de la capacidad inmunosupresora de los linfocitos CD4 reguladores.[97, 226, 227] El déficit funcional de estas células, les dota de una menor capacidad inhibidora de la actividad Th1 y Th17, asociada a una menor expresión del factor de transcripción FoxP3. [97, 226, 228] Además, se ha encontrado que en biopsias de pacientes con EM el número absoluto de Treg es bajo. [199] Esta diferencia con nuestros datos que muestran un aumento de las células CD4 reguladoras en el LCR de estos

pacientes podría deberse a que las células Treg presentes en LCR de los pacientes con EM expresan altos niveles de la molécula proapoptótica Fas. Se ha postulado que su interacción con el ligando de Fas presente en el endotelio podría inducir la apoptosis de estas células y daría cuenta del bajo número de estas células en el parénquima cerebral.[199]

Por otro lado, encontramos un número elevado de linfocitos B en la EM en comparación con otras enfermedades inflamatorias y no inflamatorias. Las diferencias con otras enfermedades no inflamatorias ya se conocen desde antiguo. Distintos grupos han descrito que los pacientes con EM tienen un mayor porcentaje de linfocitos B que los pacientes con EONN y que este aumento se debe principalmente a linfocitos B activados. Además, se ha descrito que valores elevados de linfocitos B en LCR se asocian con formas más agresivas de la enfermedad.[117, 205] Las diferencias con otras enfermedades inflamatorias que observamos en este trabajo, confirman el papel diferencial de estas células en la fisiopatología de la enfermedad.

Estudiamos dos poblaciones de linfocitos B, los linfocitos CD5- involucrados en la respuesta T-dependiente y los linfocitos B CD5+ involucrados en la respuesta T-independiente.[229] La respuesta T independiente se ha asociado en la EM con la síntesis intratecal de IgM, que aparece en un tercio de los pacientes y se asocia con formas más agresivas de la enfermedad. Porcentajes altos de estas células se asocian con la actividad de la enfermedad [208] y con un periodo más corto entre los dos primeros brotes.[230] Sin embargo, probablemente por estar restringidas a un subgrupo de pacientes, estas células no contribuyeron a establecer las diferencias en los linfocitos B entre EM y OEIN que se debían principalmente a la respuesta B T-dependiente. Estos datos concuerdan con la respuesta intratecal de IgG, que se da en más del 90% de los pacientes con EM y muy raramente en otras patologías del SNC.[231-233] La síntesis intratecal de IgG fue el primer hallazgo que demostró la naturaleza autoinmune de la esclerosis múltiple [10] y continua siendo un biomarcador importante para el diagnóstico diferencial de la enfermedad.[108, 234] Nuestros datos confirman la producción intratecal de estos anticuerpos y

muestran que la respuesta B T-dependiente en el sistema nervioso central es característica de la EM.

Por el contrario, otro mecanismo inmunológico que se ha implicado en la fisiopatología de la EM es la producción de perforina por los linfocitos CD8+, no se vió aumentada en la enfermedad. Sólo los pacientes con OENI mostraron un aumento significativo del número de estas células en comparación con OENN. Este es un dato reseñable ya que los linfocitos CD8 son los principales linfocitos T que se observan en las lesiones y se ha postulado que podrían tener un papel importante en la fisiopatología de la enfermedad.[106, 235] Se cree que los linfocitos T CD8 podrían actuar como células efectoras a través de la liberación de granzima B, perforina y de citoquinas que inducen daño axonal activando cascadas apoptóticas en las neuronas. [103, 104, 236, 237]

A continuación, estudiamos la producción citoplasmática de citoquinas pro-inflamatorias por linfocitos T CD4+ y CD8+. Los pacientes con EM mostraron un mayor número de linfocitos T CD4 productores de TNF- α e IFN- γ que los OENN. Dicho incremento no se observó en OENI, indicando que la producción de estas citoquinas podría tener un papel más relevante en la EM que en otras patologías inflamatorias del SNC. Las diferencias fueron aún más claras cuando se estudiaron los linfocitos CD8+. Observamos que el número de linfocitos T CD8 productores de TNF- α e IFN- γ era mayor en los pacientes con EM en comparación con OENI y OENN. Este estudio sugiere que la activación de CD8 en la EM va más dirigida a la producción de estas citoquinas pro-inflamatorias y a la inducción de daño axonal indirecto a través de la activación de la microglía y de mecanismos proapoptóticos.

Por otro lado, los pacientes con EM se caracterizan por presentar un número menor de linfocitos T CD4+ productores de IL-22+ y IL-17+ y linfocitos T CD8+ productores IL-22+ respecto a OENI. Estos resultados sugieren que la IL-22 podría no estar jugando un papel primordial en la EM, ya que no podemos afirmar que esta citoquina esté involucrada en todas las enfermedades neuroinflamatorias porque abarcan un grupo heterogéneo de patologías. El papel de la IL-22 en enfermedades inflamatorias y autoinflamatorias se desconoce. Se ha descrito que podría tener

efectos anti-inflamatorios y pro-inflamatorios dependiendo de la patología.[238-240] En la EM, los primeros estudios realizados sobre el papel de esta citoquina fueron realizados en el modelo experimental. Estos estudios muestran que la IL-22 podría tener un carácter anti-inflamatorio porque disminuía la severidad de la EAE. Estudios posteriores han mostrado un aumento en la producción de IL-22 en pacientes con EM en comparación con controles.[241] Además, se ha descrito que la población de CD4+IL-17+IL-22+ podría estar involucrada en la rotura de la barrera hematoencefálica.[242] El aumento más claro de estas células en otras enfermedades neurológicas inflamatorias podría deberse a que el daño de barrera sea más sutil en la EM.

En resumen, este trabajo nos ha permitido elucidar que poblaciones celulares y citoquinas podrían estar jugando un papel importante en la enfermedad. Entre ellas parecen jugar un papel más relevante los linfocitos B y los linfocitos T CD8 productores de INF- γ y TNF- α .

5.2- ESTUDIO DE LOS FACTORES ASOCIADOS AL DAÑO AXONAL EN LA EM.

El daño axonal es una de las principales características de la fisiopatología de EM, y es la principal causa de discapacidad irreversible de los pacientes. Los mecanismos que conllevan al daño axonal no se conocen bien. Se sabe que la lesión axonal puede aparecer en estadios tempranos de la enfermedad y se ha observado que hay una relación directa entre la inflamación y el daño neuronal.

Los primeros estudios que asocian el daño axonal con la inflamación fueron realizados por Ferguson y Trapp.[63, 65] Estos estudios, demostraron que en las lesiones agudas de EM existe un depósito de la proteína precursora de amiloide (APP) y que el daño neuronal se asocia con una mayor infiltración linfocitaria en las lesiones. Sin embargo, otros datos apuntan que el daño axonal podría ser independiente de la inflamación, y en el mismo podrían estar involucrados otros mecanismos patogénicos diferentes. Esta hipótesis se basa en varias observaciones,

entre ellas, la incapacidad de detener la progresión de la discapacidad mediante el tratamiento con fármacos que frenan la inflamación.[243] Además, el daño axonal y neuronal se puede observar también en la sustancia blanca aparentemente normal y en la corteza, donde no se observa infiltración linfocitaria. [244, 245]

Dado que es muy importante determinar el grado de afectación neuronal en la EM, se ha tratado de identificar diversos biomarcadores en LCR que se asocien con el mismo. El marcador que ha demostrado una mejor asociación con la degeneración axonal es la cadena ligera de los neurofilamentos en LCR que se asocia con la misma tanto en la esclerosis múltiple como en otras enfermedades neurodegenerativas con escaso o nulo componente inflamatorio.[246-248] Además, en la EM se ha descrito que los niveles de Nf-L en LCR se correlacionan con la progresión de la enfermedad medida con las escalas EDSS y MSSS y con la inflamación medida como el número de células totales de LCR.[179, 180, 249] Nuestro objetivo fue validar estos resultados, estudiar la correlación de los niveles de Nf-L con variables radiológicas asociadas con la neurodegeneración y la inflamación y, sobre todo con variables inmunológicas. Para ello, cuantificamos los niveles de Nf-L en 127 pacientes diagnosticados con EMRR y en 30 controles sin patología neurológica. Confirmamos la correlación de los niveles de Nf-L con la discapacidad y observamos que los niveles de Nf-L se correlacionaban con la carga lesional en T2 y con el número de lesiones captantes de gadolinio, dos marcadores de inflamación en la EM. Pero, sobre todo, se correlacionaron con el número de lesiones en T1, un marcador de neurodegeneración en la enfermedad.

Estos resultados junto con estudios previos muestran que la cadena ligera de los neurofilamentos es un buen marcador de la actividad y progresión de la enfermedad. Sin embargo, para su uso en la clínica era importante determinar los valores normales de Nf-L en LCR para establecer los pacientes que muestran niveles elevados de esta proteína. Previamente, se había intentado establecer un punto de corte. Sin embargo, estos estudios carecían de un grupo control y un método de ensayo reproducible. [180] En nuestro trabajo usamos un ELISA comercial para la detección de Nf-L que presenta una alta reproducibilidad intra- e inter-ensayo. Además, incluimos un grupo control formado por 30 paciente sin patología

nerológica, para establecer valores normales de Nf-L en LCR. Fijamos el punto de corte utilizando la media del grupo control más 3 desviaciones estándar. Establecimos como normales los valores de Nf-L inferiores a 900 ng/ml. Este valor de referencia podría ser una ayuda en la práctica clínica diaria para determinar los pacientes con EM que presentan un mayor daño axonal. Para confirmar esto, clasificamos a los pacientes según sus niveles de Nf-L y observamos que aquellos con valores elevados, mostraban mayor discapacidad y mayor número de lesiones en T1, T2 y captantes de gadolinio. Es decir, los niveles de Nf-L superiores a 900 ng/ml identifican a los pacientes de EM con mayor inflamación y neurodegeneración.

A continuación, estudiamos si los niveles elevados de Nf-L se asocian con marcadores inmunológicos. Se investigó su asociación con la síntesis intratecal de anticuerpos medida mediante métodos semicuantitativos y con la detección de bandas oligoclonales. En primer lugar, estudiamos su asociación con la síntesis intratecal de IgG. El porcentaje de pacientes con BOC de IgG fue similar en el grupo con valores altos de Nf-L que en aquellos con valores normales de esta proteína. Esto no es de extrañar dado que la mayoría de los pacientes de EM presentan BOC de IgG. Tampoco se encontró relación entre los valores del índice de IgG y la concentración de Nf-L en LCR. Estos datos indican que la síntesis de IgG no está directamente relacionada con la neurodegeneración en la EM.[108, 250] Sin embargo, los pacientes con niveles elevados de Nf-L mostraron un índice de IgM elevado y las diferencias se hicieron más evidentes cuando estudiamos la presencia de BOC IgM lípido-específicas (BOCM). La mayoría de los pacientes con BOCM presentaban valores elevados de Nf-L. Estos datos confirman estudios previos que mostraron que la presencia de estos anticuerpos se asocia con un curso más agresivo de la enfermedad en términos de tasa de brotes, discapacidad a largo plazo y atrofia cerebral.[168, 171-173] Los anticuerpos IgM podrían tener un efecto deletéreo en el tejido, ya que en las lesiones se han encontrado en los oligodendrocitos y los axones en unión con el complemento.[118] Estos hallazgos por lo tanto apoyan la hipótesis de que las BOCM podrían estar relacionadas con el daño axonal.

Se ha planteado si los Nf-L en LCR podrían utilizarse como biomarcador para predecir la conversión a EM en pacientes con síndrome neurológico aislado (SNA). Los resultados obtenidos hasta ahora han sido contradictorios. El primer estudio realizado sobre este tema describió un aumento en los niveles de Nf-L en los pacientes con síndromes neurológicos aislados que convertían a EM en comparación con aquellos que permanecían como episodios aislados. Sin embargo, en estudios posteriores no se confirmaron estos hallazgos.[183, 249, 251] Para estudiar el valor de los niveles de Nf-L en LCR como biomarcador pronóstico en síndromes neurológicos aislados (SNA) estudiamos 66 pacientes con SNA seguidos prospectivamente en la unidad de EM del Hospital Ramón y Cajal de Madrid. Cuarenta y cinco de ellos convirtieron a EM. Observamos que unos niveles de Nf-L superiores a 900 ng/l predecían de forma precoz la aparición de un segundo brote. El establecimiento de un punto de corte objetivo basado en los valores de Nf-L en controles sanos nos ha ayudado a demostrar el papel de los Nf-L como marcador pronóstico de conversión a EM en los SNA, confirmando la utilidad clínica de la medición de esta proteína.

5.3 CARACTERIZACIÓN DE LOS MECANISMOS INMUNOLÓGICOS PRESENTES EN LOS PACIENTES CON EM CLASIFICADOS SEGÚN LA PRESENCIA DE BOC DE IgM FRENTE A LÍPIDOS.

En el apartado anterior hemos mostrado como la presencia de bandas oligoclonales IgM lípido-específicas (BOCM+) se asocia con niveles elevados de Nf-L en LCR. Estos anticuerpos son un marcador pronóstico en la EM, que se relaciona con un curso más agresivo de la enfermedad.[171-173, 210] Son producto de una respuesta B persistente y de alta afinidad en la EM, como se demuestra por su alta tasa de hipermutación somática.[171, 252, 253] Su presencia se ha asociado con un aumento de linfocitos B en LCR, en especial de la subpoblación CD19+CD5+, que forma parte de la respuesta B T independiente. Además, se ha relacionado con un aumento de plasmablastos en LCR y en cuanto a su producción, se ha visto que se asocia con un aumento de TNF- α en LCR y con un polimorfismo en la posición -376

del promotor de esta citoquina y con el haplotipo HLADRB1*03:01 que se correlaciona con una conversión más rápida a EM después de un SNA.[210, 254] También se ha encontrado una correlación entre la presencia de estas bandas y niveles altos de CXCL13 en LCR. Esta quimiocina induce la migración de linfocitos B a distintos órganos y la producción de anticuerpos naturales.[210, 255] Sin embargo, se desconoce si existen otros mecanismos inmunológicos que diferencian a los pacientes que producen estos anticuerpos de aquellos que no los presentan. En este trabajo nos propusimos estudiar en profundidad las diferencias en el perfil inmunológico en LCR de estos dos grupos de pacientes. En este estudio se incluyeron 121 pacientes diagnosticados con EM. Los pacientes se clasificaron en dos grupos: el primero incluía a aquellos que tenían BOC IgM lípido-específicas (ML+) y el segundo los que carecían de estos anticuerpos (ML-).

Los pacientes ML+ mostraron una mayor puntuación en la escala MSSS, lo que corrobora el papel pronóstico de estos anticuerpos. Además, confirmamos en esta cohorte independiente que muestran valores más elevados de Nf-L en LCR.

Para caracterizar los distintos mecanismos inmunológicos en pacientes ML+ y ML-, en primer lugar, estudiamos la respuesta inmune innata en LCR.

Previamente se ha descrito que los pacientes con EM tienen una fracción mayor de células dendríticas plasmacitoides (pDC) y mieloides (mDC) que otras patologías neurológicas no-inflamatorias.[215, 256] Además, las pDC se encuentra alrededor de los vasos sanguíneos presentes en las lesiones desmielinizantes. [257] Nosotros estudiamos las células dendríticas mieloides y plasmacitoides en los dos grupos. No encontramos diferencias significativas para ninguna de las dos subpoblaciones entre pacientes con o sin BOCM. Esto datos sugieren que no hay diferencias en la presentación antigénica.

A continuación, analizamos el número y el fenotipo de monocitos. Se han definido tres poblaciones de monocitos según la expresión de los antígenos CD14 y CD16.[258, 259] Los monocitos clásicos expresan CD14 con alta intensidad y no expresan el antígeno CD16. Esta población constituye el 90% de los monocitos presentes en sangre, y su principal función es migración al tejido inflamado a través

del receptor CCR2.[260, 261] La siguiente población estudiada fueron los monocitos alternativos (CD14^{hi}CD16⁺). El aumento de estas células en sangre se ha relacionado con el riesgo a padecer enfermedades cardiovasculares y con enfermedades autoinmunes.[262-264] Se cree que su principal función es la secreción de sustancias reactivas de oxígeno y moléculas pro-inflamatorias. Además, podrían tener un papel en la presentación antigénica, ya que expresan con alta intensidad HLA-DR.[265-267] La tercera población estudiada fueron los monocitos no-clásicos (CD14^{lo}CD16⁺). Estas células se han asociado a la inmunovigilancia del endotelio en búsqueda de daño tisular.[268] En el LCR de los pacientes con EM la mayoría de los monocitos se asocian con un fenotipo pro-inflamatorio, siendo mayoritarios los monocitos clásicos y alternativos. Los monocitos no clásicos son apenas detectables en LCR. No encontramos diferencias entre el número de monocitos o su fenotipo en pacientes con y sin BOCLM. Estos datos parecen indicar que tampoco hay diferencias entre estas poblaciones de la respuesta innata en el LCR en relación con estos anticuerpos. Sin embargo, cuando analizamos moléculas asociadas a la activación del sistema inmune innato, observamos que los pacientes ML⁺ mostraban un aumento en los niveles de *chitinase 3 like-1* (CHI3L1). Los niveles de esta proteína también se han asociado con un peor pronóstico de la enfermedad. Es una proteasa perteneciente a la familia de las quitinasas,[184] que puede ser secretada por distintas poblaciones celulares como los condrocitos, células vasculares del músculo liso, neutrófilos y macrófagos.[269] En las placas de desmielinización presentes en el tejido cerebral de los pacientes con EM, la CHI3L1 se localiza en los macrófagos/microglía y en los astrocitos activados.[189-191] Además los niveles de esta proteína se han asociado con peor pronóstico de la enfermedad. Se ha descrito que la presencia de anticuerpos IgM en los axones y los oligodendrocitos en el SNC induce la activación del complemento. [118] Esto podría activar a las células de la respuesta innata, que presentan receptores para el complemento[270, 271] La estrecha correlación que hemos encontrado entre los niveles de esta proteasa y la presencia de BOCM parecen corroborar esta hipótesis.

Sin embargo, no encontramos relación entre los niveles de activina A, una proteína involucrada en la polarización de macrófagos a un fenotipo M1 pro-inflamatorio, [220] o los niveles de estrés oxidativo y la síntesis intratecal de IgM. Esto parece indicar que existe una activación selectiva de mecanismos efectores en la respuesta innata en el SNC cuando hay una activación mediada por anticuerpos y complemento, como se ha visto en otras patologías neurológicas como la enfermedad de Alzheimer [272] y que la liberación de proteasas podría jugar un papel importante en este proceso en la EM.

A continuación, estudiamos la respuesta inmune adaptativa. Los pacientes ML+ mostraron un número mayor de linfocitos T CD4+ y CD8+. En el análisis de las subpoblaciones observamos un aumento de los linfocitos T CD4+CD62L, CD4+DR+ y CD4 reguladores. Estos resultados indican que en los pacientes ML+, podría haber una mayor migración de los linfocitos T de la periferia, ya que este receptor se expresa en las células T que migran a los ganglios linfáticos (principalmente naïve o de memoria central).[273, 274] Estos datos se correlacionarían con la observación de que la mayoría de los linfocitos T de LCR son de memoria central.[196] Estas células tienen la capacidad de expandirse de forma más rápida una vez encontrado el antígeno, lo que perpetuaría el proceso inflamatorio.[275] Además, los pacientes con BOCM mostraron un aumento de los linfocitos CD4 activados (CD4+DR+), lo que demuestra la correlación entre la presencia de las BOC de IgM y la respuesta adaptativa inflamatoria en la EM. Por último, como un posible método de compensación por la mayor inflamación, también se observa un aumento en el número de linfocitos T reguladores, aunque como apuntamos en el primer apartado en la EM parece que hay un déficit en la funcionalidad de estas poblaciones y no logran restaurar el balance pro-/anti-inflamatorio.[97, 227]

También, el número de linfocitos CD8+ que expresan perforina es mayor en los pacientes ML+. La liberación de esta molécula podría estar implicada en el daño axonal en este grupo de pacientes, ya que se ha observado una polarización de linfocitos CD8+ con perforina en las lesiones hacia las neuronas en las lesiones de EM. [276, 277]

Por último, estudiamos la producción de citoquinas proinflamatorias por linfocitos T. En general, observamos que las citoquinas producidas mayoritariamente en los pacientes con EM fueron IFN- γ y TNF- α mientras que el número de células productoras de IL-17 e IL-22 era menor. Cuando se analizaron separadamente los pacientes IgM+ e IgM-, se observó que los primeros mostraron un número aún mayor de linfocitos T CD4+ y CD8+ productores de TNF- α e INF- γ . Estas células de la respuesta Th1 son capaces de estimular la respuesta citotóxica, lo que concuerda con los datos descritos en el apartado anterior. La liberación de estas citoquinas se ha asociado a un mayor daño en las lesiones y con mayor gravedad de la enfermedad.[278] Además, se cree que estas citoquinas podrían tener un efecto deletéreo dual en las neuronas, activando por una parte la cascada de apoptosis en las mismas y por otra induciendo la activación de microglía/macrófagos.[279] Estos datos muestran una correlación entre la síntesis intratecal de IgM y la respuesta Th1 en la EM, que podría contribuir a la progresión más rápida de la discapacidad que muestran estos pacientes.

Los pacientes ML+ también mostraron un número mayor de linfocitos T CD4+ y CD8+ productores de IL-22 y los que producen a la vez IL-22+ e IL-17+. Además de dañar la integridad de la barrera hematoencefálica, la población CD4+IL-22+IL-17+ se ha asociado con la formación de folículos linfoides ectópicos en patologías inflamatorias. Estas estructuras se ha visto que están presentes en las meninges de algunos pacientes con EMSP y se han asociado con una progresión más rápida de la enfermedad.[280, 281] Nuestros datos muestran que la inflamación mediada por la respuesta TH17 también juega un papel en los mecanismos patogénicos que tienen lugar en los pacientes IgM+, aunque como se ha reseñado más arriba, la respuesta adaptativa proinflamatoria que predomina en estos pacientes es la respuesta TH1.

A continuación, estudiamos la respuesta humoral a través del estudio de los linfocitos B. Evaluamos la respuesta T dependiente y T independiente con el antígeno CD5+.[229] Los pacientes IgM+ mostraron un aumento de los linfocitos B totales y de las dos subpoblaciones estudiadas como ya había descrito nuestro grupo anteriormente, siendo el aumento más significativo en la población CD5+.[171, 210] Estudios previos mostraron que la mayoría de los linfocitos B de

LCR presentan un fenotipo de memoria y además un fracción de los linfocitos B son plasmablastos de vida corta.[205, 206] La frecuencia de plasmablastos se correlaciona con el índice de IgG.[205] Nosotros quisimos estudiar en 36 pacientes con BOC de IgM que estadio de maduración de linfocitos B se asocia con la síntesis intratecal de IgM. Observamos que se asocia con un fenotipo de memoria, pero sobre todo con plasmablastos que expresan CD5+, es decir forman parte del repertorio T independiente. Los linfocitos B de memoria podrían reactivarse para producir esta inmunoglobulina o estar involucrados en la secreción de citoquinas. En pacientes con EM se ha observado que los linfocitos B de memoria producen niveles elevados de citoquinas pro-inflamatorias como TNF- α y sobre todo GM-CSF en comparación con individuos sanos.[115] Esta población además actúa sobre células mieloides promoviendo un estado pro-inflamatorio. Estos datos se podrían correlacionar con el aumento de la CHIL31 observado previamente en pacientes ML+.

Los brotes se definen como la aparición de nuevos síntomas o empeoramiento de la enfermedad que duran al menos 24 horas. Se desconoce en su totalidad los mecanismos responsables de los brotes. Se cree que la formación de lesiones agudas desmielinizantes y el daño axonal son los responsables de las manifestaciones clínicas de la enfermedad.[282] Estas lesiones se caracterizan por la infiltración de linfocitos T y B y activación de la microglía/macrófagos.[283] La migración de los linfocitos de la periferia se produce por un aumento en la permeabilidad de la barrera hematoencefálica con el aumento de moléculas de adhesión que permite la migración al SNC.[284] Los periodos de remisión corresponderían a la fase en la que se controla la inflamación aguda. Por ultimo, quisimos determinar si hay diferencia en la distribución de los leucocitos de LCR entre los pacientes en brote o remisión. No observamos diferencias significativas entre las subpoblaciones leucocitarias en pacientes en brote y no brote. Estos resultados podrían deberse al bajo número de pacientes en brote incluidos en el estudio o a la alta inflamación que presentan los pacientes IgM+ independientemente de que estén o no en brote.[173] Futuros estudios dilucidarán si alguna subpoblación celular se asocia con la actividad clínica en los pacientes IgM-

5.4 EVOLUCIÓN DE LA RESPUESTA INMUNITARIA CON LA EDAD.

El término inmunosenescencia se refiere a déficit funcional del sistema inmune y adaptativo. Afecta principalmente a individuos mayores de 75 años e interviene en diversos mecanismos necesarios para la defensa contra infecciones. Con la edad disminuye el tamaño del timo, lo que se conoce como involución tímica. Como consecuencia se generan menos linfocitos T naïve. [285] y por el contrario, se incrementa el número de linfocitos circulantes de memoria CD4 y sobre todo CD8.[286] Estas poblaciones también sufren cambios con la edad. Se caracterizan por perder la molécula co-estimuladora CD28, que está involucrada en la activación linfocitaria y en la proliferación de linfocitos T y adquieren mayor capacidad secretora de IFN- γ y TNF- α . [143, 287] Además, los linfocitos T CD4 pueden producir moléculas citolíticas como granzima B y perforina.[146] Se postula que estas células están especializadas en detener la replicación viral porque hay una expansión clonal de linfocitos T frente a citomegalovirus (CMV) y otros antígenos crónicos.[144, 288, 289] Además, en los linfocitos T disminuye el tamaño de los telómeros y los ciclos de escisión del TCR.[290-292] El envejecimiento también afecta la función y fenotipo de los linfocitos B.[148] Disminuye el número de precursores y linfocitos B inmaduros en la médula ósea y el repertorio del BCR. [293, 294] Además, se ha observado que hay reducción de los centros germinales. Se desconoce si este hallazgo se debe a un déficit funcional en los linfocitos B o de los linfocitos T foliculares.[295, 296]

En principio se creía que el envejecimiento no afectaba la función del sistema inmune innato. Sin embargo, las células dendríticas tienen menor capacidad de presentación antigénica, debido a la pérdida de moléculas involucradas en la co-estimulación y en la captura de antígenos.[297] En los macrófagos hay una pérdida de producción de citoquinas pro-inflamatorias.[298, 299] Por el contrario, en el SNC se ha observado que con la edad hay un aumento en la actividad de la microglía asociado a un incremento en la producción de ROS y de moléculas pro-inflamatorias[300]

En algunas enfermedades se ha observado una aceleración de la inmunosenescencia, principalmente en la infección por el virus VIH. La hipótesis de que en los pacientes con SIDA podría padecer un envejecimiento acelerado surgió de la observación de que la esperanza de vida es dependiente de la edad en la que comienzan terapias antirretrovirales.[301] Además, en pacientes infectados por VIH aumentan de modo precoz co-morbididades típicas del envejecimiento.[302, 303] Estos pacientes, independientemente de la linfopenia de linfocitos T CD4, muestran una senescencia acelerada de linfocitos T CD8. Aumenta el porcentaje de linfocitos T CD8CD28^{null} y se observa una expansión clonal de los mismos. [304, 305] Se ha descrito que tienen menor capacidad proliferativa y mayores niveles de perforina junto con una disminución en el tamaño de los telómeros. En la EM se ha postulado que también podría ocurrir una inmunosenescencia prematura. Un estudio mostró que un aumento precoz de dos marcadores de inmunosenescencia. El número de ciclos de escisión del TCR disminuye mientras que los linfocitos T CD4+CD28^{null} aumentan en comparación con individuos sanos.[306]

Un envejecimiento acelerado del sistema inmune en la EM podría explicar los cambios en el curso de la enfermedad que se han asociado con la edad del paciente. Los estudios de historia natural de la EM, realizados principalmente por Confavreux, muestran que los pacientes con EM comienzan a empeorar alrededor de los 45 años independientemente del tiempo de evolución de la enfermedad y de la actividad clínica previa de la misma. Se ha postulado que los principales mecanismos efectores en esa fase de la enfermedad están mediados por una activación crónica de la microglía y los astrocitos en el SNC.[307] Esto provocaría daño axonal y neurodegeneración a través de la producción de moléculas pro-inflamatorias y estrés oxidativo. [308] Además, disminuirá la producción de factores tróficos y la fagocitosis de restos celulares clásica de la respuesta innata M2.[309] Nosotros quisimos investigar cómo influye la edad en la respuesta inmune innata y adaptativo en el LCR. Estudiamos los pacientes ML- y ML+ por separado porque como hemos mostrado anteriormente, muestran diferentes mecanismos patogénicos.

En primer lugar, expondremos los cambios observados en pacientes ML- y a continuación, los cambios en los pacientes ML+.

5.4.1 Pacientes sin BOC IgM lípido específica

Comenzamos estudiando cómo afecta la edad a células y moléculas involucradas en la respuesta inmune innata. En primer lugar, estudiamos, la activina A. Esta proteína es producida por muchas células del sistema inmune, incluyendo monocitos, macrófagos, células dendríticas, células Th2 y linfocitos B a través de la activación de los receptores tipo Toll.[310] Se ha visto que la activina interviene en la polarización de los macrófagos hacia un fenotipo pro-inflamatorio e inhibe la conversión hacia un estado anti-inflamatorio.[220] Observamos que los niveles de activina A y CHI3L1 aumentan con la edad en este grupo de pacientes. El aumento de ambas moléculas sugiere una polarización hacia un estado pro-inflamatorio de los macrófagos/microglía y astrocitos en el SNC. El aumento de la CHI3L1 parece indicar que la microglía y la astrogliosa activadas secretan esta proteasa como parte de sus mecanismos efectores. Sin embargo, no se observó un aumento de las moléculas asociadas con el estrés oxidativo, lo que muestra que la activación incluye sólo determinadas vías efectoras.

En este grupo de pacientes también observamos una disminución de células dendríticas, tanto mieloides como plasmacitoides, indicando que hay una disminución en la capacidad presentadora de antígeno. Estos resultados se correlacionarían con la pérdida de la capacidad de migración y fagocitosis de las células dendríticas que se produce durante el envejecimiento.[311, 312] Por el contrario, el número de monocitos no cambia con la edad. Esto podría deberse a que los astrocitos activados secretan la quimiocina (CCL2) que favorece la migración de monocitos. [313-315]

Debido a que la senescencia sobre todo afecta al sistema inmune adaptativo, lo siguiente que hicimos fue estudiar el efecto de la edad en las poblaciones de linfocitos presentes en LCR. En los pacientes ML- con la edad hay una clara disminución del número de linfocitos T CD4+ y CD8+. Cuando estudiamos las subpoblaciones CD4+, sobre todo observamos una disminución de los linfocitos T

CD4+CD62L+, es decir, aquellos que acaban de migrar al SNC.[316] Estos datos sugieren que con la edad disminuye el reclutamiento de linfocitos T CD4+. También observamos una clara disminución del número de linfocitos T CD4+ reguladores y activados y de las células productoras de las citoquinas pro-inflamatorias TNF- α e IL-22 y un descenso moderado de las células productoras de IFN- γ . Sin embargo, no detectamos cambios en la producción de IL-17. Estos datos coinciden con la polarización de la respuesta Th1/Th22 hacia TH17 que se ha observado como efecto del envejecimiento en ratones. [317, 318]

Por el contrario, la producción de citoquinas por linfocitos T CD8+ no varía a lo largo del tiempo, aunque si lo hace el número de células que producen perforina lo que sugiere que este mecanismo efector ya de por si más bajo en los pacientes IgM- no juega un papel importante en el empeoramiento asociado a la edad en estos pacientes. Sin embargo, las células productoras de citoquinas proinflamatorias podrían jugar un papel en la activación de las células del sistema inmune innato en el SNC.

La influencia de la edad en los linfocitos B no ha sido del todo dilucidada. En individuos sanos parece haber una alta variabilidad interpersonal. Se ha postulado que hay un aumento de las células naïve y que la proporción de células de memoria IgM+ no parece alterarse. Sin embargo, se ha encontrado una notoria disminución en las células de memoria que han sufrido cambio de clase que son responsables de montar respuestas secundarias rápidas de anticuerpos.[294] En nuestro estudio observamos que la disminución más drástica en el LCR de los pacientes ML- es la de los linfocitos B. Hay una caída de las respuestas T dependiente e independiente. Se ha visto que los linfocitos B de LCR en su mayoría tienen un fenotipo de células de memoria. [319] Nuestros datos podrían explicarse por una senescencia acelerada que altere este compartimento en la EM y por ello altere la migración de estas células al SNC. Sin embargo, no observamos cambio en la síntesis intratecal de inmunoglobulinas. Puede que las células plasmáticas de larga vida se mantengan en el SNC y continúen produciendo inmunoglobulinas. Estos datos concuerdan con estudios anteriores que mostraron que la síntesis intratecal de IgG no depende de

la renovación de las mismas desde la sangre [174] ni de la eliminación de los linfocitos B de la periferia.[320]

Se ha descrito que durante el envejecimiento hay una pérdida de las uniones estrechas de las células endoteliales que forman la barrera hematoencefálica (BHE), lo que provoca un aumento en la permeabilidad de la misma. Sin embargo, no se observa mayor reclutamiento de linfocitos, solamente un aumento de la producción de TNF- α por las células endoteliales[321-323] Para estudiar el estado de la BHE, nosotros utilizamos el cociente de albumina. Observamos que dicho cociente aumenta con la edad en el grupo ML-. Además, tal como se muestra más arriba, no hay mayor reclutamiento de linfocitos. Todos estos datos sugieren que en los pacientes ML- hay una inmunosenescencia prematura ya que encontramos una activación de la respuesta innata y una supresión de la adaptativa asociada a la edad en pacientes que no rebasan en ningún caso los 65 años.

Pacientes ML+

Los pacientes ML+ mostraron un perfil de cambios diferente con la edad.

Cuando estudiamos la respuesta innata observamos que los niveles de chitinase 3-like 1 no cambiaron en relación a la edad, debido a que, desde edades tempranas, la liberación de esta proteína estaba aumentada en los pacientes ML+. Sin embargo, observamos un aumento de la activina A en relación a la edad similar al que encontramos en los pacientes ML-. Estos resultados indican que la activación del sistema inmune innato en el SNC asociada a la edad se da de forma precoz en la EM y no es un mecanismo efector diferencial entre los pacientes ML+ y ML-. Tampoco encontramos en estos pacientes una disminución de los monocitos en LCR, lo que como se comentó podría deberse a la secreción de CCL2 por los astrocitos activados.[261, 313]

Otro cambio asociado a la edad que encontramos en la respuesta innata en los pacientes ML+ fue un aumento de la superóxido dismutasa en LCR. Esta enzima controla la disociación de las especies reactivas de oxígeno y se ha visto que aumenta en condiciones de hipoxia en el SNC. [207-209] Las especies reactivas de

oxígeno oxidan macromoléculas promoviendo la neurodegeneración. [324]. Además, los niveles de SOD en LCR se correlacionan con el número de lesiones en el SNC. [325, 326] Los aumentos de activina A y SOD en LCR de los pacientes ML+ en relación con la edad sugiere que aunque la activación de la microglía se observe desde estadios tempranos en este grupo de pacientes, los mecanismos efectores difieren con la edad.[327]

Cuando estudiamos las células presentadoras de antígeno, a diferencia de lo que ocurre en los pacientes ML-, en los pacientes ML+ no encontramos ningún cambio en el número de células dendríticas mieloides o plasmacitoides en LCR, lo que muestra que no presentan una disminución precoz de la presentación antigénica.

Del mismo modo, tampoco encontramos en este grupo cambios asociados a la edad en la respuesta adaptativa. Se mantiene el número de linfocitos T y B en LCR, así como la capacidad de producir citoquinas proinflamatorias y perforina.

Estos datos muestran que los pacientes ML+ muestran una activación de la respuesta innata en el SNC asociada con la edad pero no una senescencia prematura del sistema inmune adaptativo.

Infección por CMV e inmunosenescencia

La infección crónica por el citomegalovirus humano (CMV) se relaciona con un deterioro del sistema inmune que afecta a la inmunidad innata y adaptativa, y se ha postulado que contribuye de forma importante a la inmunosenescencia.[328, 329] Aunque la seropositividad para CMV está influenciada por factores geográficos, étnicos y socio-económicos, se ha demostrado que aumenta con la edad en todas las poblaciones estudiadas.[330] La cuantificación de la IgG específica frente a CMV es un marcador de la infección por este virus y un aumento en la concentración de forma precoz indicaría una inmunosenescencia prematura. Nosotros observamos que con la edad aumentan de forma muy clara los títulos de anticuerpos frente a CMV en los pacientes ML-. En cambio, en los pacientes M+ no encontramos dicha asociación. Estos datos sugieren que los pacientes ML- sufren una inmunosenescencia acelerada, lo que podría explicar los cambios en la

fisiopatología de la enfermedad que sufren estos pacientes con la edad. Este proceso se ha observado en pacientes con infecciones crónicas como el HIV [331] y en otras enfermedades autoinmunes como la artritis reumatoide [332] y a menudo contribuyen a procesos degenerativos precoces como los que se observan en individuos ancianos. Este podría ser, al menos en parte, el origen del empeoramiento que sufren los pacientes ML- con la edad. La no presencia de este fenómeno en los pacientes ML+ parece indicar que este mecanismo no es uniforme en todos los pacientes con EM. Esto podría a cambiar una teoría extendida sobre el carácter “amnésico” de la enfermedad con un empeoramiento a partir de los 40-50 años independientemente del curso previo y una respuesta pobre a las terapias actuales. En los pacientes ML+ hasta hace muy poco el empeoramiento era precoz, teniendo estos pacientes una mala evolución de la enfermedad desde etapas tempranas de la misma [168, 172] La aparición de las nuevas terapias de alta eficacia ha empezado a cambiar esto. Se ha visto que estos pacientes pueden responder bien a dichos fármacos.[174, 176] Nuestros resultados apuntan a que la respuesta a estas terapias podría darse durante un intervalo más largo de edad en los pacientes ML+.

Respuesta inmunológica en pacientes mayores de 40 años

Nuestros hallazgos muestran profundos cambios en la respuesta inmunológica con la edad, especialmente en el grupo ML-. Estos resultados podrían tener repercusión a la hora de elegir un tratamiento para estos pacientes ya que las terapias inmunosupresoras podrían tener efectos no deseados en estos pacientes. Por ello quisimos establecer un punto de corte que nos permita en la práctica clínica diaria clasificar a los pacientes en dos estadios con distinto perfil inmunológico en LCR. Elegimos la edad de 40 años, ya que estudios observacionales, consideran que entre 40-50 años hay un cambio en la clínica de los pacientes.

Dividimos a los pacientes con EM en cuatro grupos, aquellos ML+ mayores y menores de 40 años y los pacientes ML- menores y mayores de 40 años. Utilizando este punto de corte pudimos confirmar los resultados obtenidos anteriormente. A partir de los 40 años los pacientes ML- muestran una activación de la respuesta

innata y una clara inhibición de la respuesta adaptativa que no se ve en los pacientes ML+ a esa edad.

Sin embargo, la disminución de la producción de TNF-alfa, IL-22 y ligeramente INF-gama por linfocitos T CD4 es a partir de los 45 años cuando empieza a apreciarse. Parece que son otras poblaciones las que se ven afectadas primero por el envejecimiento.

La edad ya se perfila como un factor que determina una menor eficacia a distintos tratamientos en la EM [333] y posibles efectos secundarios asociados a la seguridad, como la aparición de linfopenia grave tras el tratamiento con dimetil fumarato.[334] El conocimiento del estatus IgM de los pacientes podría ser útil para evaluar el perfil de eficacia y seguridad de los tratamientos asociado a la edad, un factor que se prevé importante para conseguir en un futuro una terapia personalizada en la EM. En este sentido, nuestro grupo ha descrito que la presencia de bandas oligoclonales IgM reduce el riesgo de padecer LMP en pacientes tratados con natalizumab. Puede que una mejor preservación de la respuesta inmune adaptativa en estos pacientes, pueda contribuir a evitar la infección por este virus oportunista.[176]

Futuros estudios dilucidarán los factores que evitan la inmunosenescencia precoz en los pacientes ML+. La naturaleza altamente proinflamatoria de la respuesta mediada por anticuerpos y complemento que parece primar en estos pacientes podría contribuir a este fenómeno.

5.5 DETECCIÓN DE LINFOCITOS B EN TEJIDO POST-MORTEM EN PACIENTES CON EM.

Al principio se creía que la EM era una enfermedad que se restringía a la sustancia blanca, sin embargo, se ha descrito lesiones desmienilizante en la sustancia gris y se pueden detectar en estadios tempranos de la enfermedad, aunque son más

abundantes en etapas progresivas. Además, estas lesiones se correlacionan mejor con la progresión de la enfermedad y la disfunción cognitiva.[121, 335]

La infiltración de linfocitos es escasa en la sustancia gris, sugiriendo que otros son los mecanismos que participan en la patología cortical.[122, 336, 337]

El desarrollo de los folículos linfoides ectópicos se ha descrito en diversas enfermedades infecciosas e inflamatorias.[338, 339] Estas estructuras tienen una arquitectura similar a los folículos linfoides secundarios, con zonas separadas de linfocitos T y B y células dendríticas especializadas.[340, 341] La presencia folículos linfoides ectópicos se asocia con mayor desmielinización subpial y un curso más agresivo de la enfermedad, sugiriendo que tienen un papel importante en la progresión de la enfermedad.[74] Además, estos pacientes presentan mayor pérdida neuronal.[75] La inflamación de las meninges parece que también tiene lugar en estadios tempranos de la enfermedad. Mediante estudios de resonancia magnética se demostró captación de contraste en las leptomeninges de aproximadamente el 20% de los casos con RRMS. [342]

Nosotros estudiamos 10 casos con EMSP y 5 casos con patología neurológicas no inflamatorias. Previamente se había estudiado la presencia de folículos linfoides ectópicos y el grado de afectación de la corteza. De los 10 casos incluidos en este estudio, 8 presentaban estas estructuras que se asociaron con mayor daño cortical y menor tiempo en alcanzar etapas progresivas y dos casos no mostraban folículos linfoides ectópicos y presentaban menor inflamación en las meninges y menor daño cortical.

Determinamos la presencia de células plasmáticas, plasmablastos IgG y IgM en las meninges y estudiamos si se localizaban cerca de lesiones subpiales. De los 10 casos incluidos en este estudio, seis presentaron células plasmáticas en las meninges. Ninguna de las células plasmáticas mostró producción de IgM. Sin embargo, encontramos plasmablastos IgM en el espacio subaracnoideo. DE hecho, no observamos plasmablastos de IgG en ninguno de los casos estudiados. La presencia de plasmablastos IgM sólo se observó en aquellos casos que presentaban folículos linfoides ectópicos. Además, la presencia de estas células se encontró en zonas con

lesiones subpiales extensas. La liberación de IgM al espacio subaracnoideo podría difundir a la sustancia gris y ser un mecanismo efector de desmielinización y daño neuronal.

No se encontró correlación entre los casos con plasmablastos IgM y células plasmáticas lo que sugiere que los plasmablastos encontrados son de corta vida y que podrían necesitar una reactivación que podría estar sucediendo en los folículos linfoides ectópicos.

Estos resultados podrían indicar que los pacientes con BOCM podrían ser los que desarrollaran folículos linfoides ectópicos. Esta hipótesis se basa en que los plasmablastos encontrados en las meninges pertenecen al isotipo IgM. Además, estos pacientes tienen mayor producción de citoquinas IL-17 y 22 necesarias para la formación de folículos y mayor producción de IFN-gamma y TNF-alfa. Se ha observado que la expresión de estas citoquinas aumenta en los pacientes con inflamación en las meninges y podría ser uno de los mecanismos responsables del daño neuronal.[236] Por último, nuestro grupo describió previamente que estos pacientes tienen aumentados en LCR los niveles de CXCL13, una citoquina necesaria para la formación de folículos linfoides ectópicos que se encuentra aumentada en pacientes que presentan dichas estructuras en las meninges. [210]

6. CONCLUSIONES

1. En la EM existe un distinto perfil inmunológico en LCR en comparación con otras enfermedades neurológicas inflamatorias y no inflamatorias del SNC con predominio de linfocitos CD8+ proinflamatorios, linfocitos B y células T reguladoras.
2. Los niveles de Nf-L en LCR se asocian con la inflamación y neurodegeneración en la EM y predicen la conversión precoz de los síndromes neurológicos aislados de posible etiología desmienilizante a EM.
3. Los pacientes con BOCM+ tienen niveles elevados de Nf-L y un mayor número de linfocitos B y T en LCR.
4. La producción de citoquinas pro-inflamatorias, TNF- α , IFN- γ e IL-22 por linfocitos T CD4 y CD8 está aumentada en los pacientes con BOC M.
5. La presencia de BOCM también se asocia con mayor número de linfocitos TCD4+ activados, de células CD4+ que expresan L-selectina, células T reguladoras y linfocitos T CD8+ productores de perforina.
6. Los niveles de CHI3L1, una proteína expresada por microglía y astrocitos activados, están elevados en los pacientes BOCM.
7. La edad se asocia en la EM con un aumento de moléculas asociadas con la activación del sistema inmunitario innato en LCR.
8. En los pacientes sin BOCM la edad desencadena una disminución de la respuesta inmune adaptativa en LCR. En los pacientes con BOCM se asocia con un aumento del estrés oxidativo.
9. Los pacientes sin BOCM mayores de 40 años muestran un aumento de los títulos de anticuerpos frente a CMV en suero, un marcador de inmunosenescencia prematura.
10. La presencia de folículos linfoides ectópicos en pacientes con EMSP se correlaciona con un aumento de plasmablastos productores de IgM en las meninges.

7. BIBLIOGRAFÍA

1. Compston A, Coles A. Multiple sclerosis. *The Lancet* 2008; 372: 1502-1517.
2. Lassmann H, Brück W, Lucchinetti C. Heterogeneity of multiple sclerosis pathogenesis: implications for diagnosis and therapy. *Trends in Molecular Medicine* 2001; 7: 115-121.
3. Cruveilhier J. Anatomie pathologique du corps humain; descriptions avec figures lithographiées et coloriées; des diverses alterations morbides dont le corps humain est susceptible. 1841.
4. Carswell R. Pathological anatomy: illustrations of the elementary forms of disease. 1838.
5. Charcot JM. Histologie de la sclérose en plaques. *Gazette des hôpitaux (Paris)* 1868; 41: 554-566.
6. Pierre M. La sclérose en plaques et maladies infectieuses. *La Progres Medicale* 1884; 12: 287-289.
7. Rivers TM, Schwentker FF. Encephalomyelitis accompanied by myelin destruction experimentally produced in monkeys. *The Journal of Experimental Medicine* 1935; 61: 689-702.
8. Quincke H. Die Lumbar punktion des Hydrocephalus. *Klin Wochenschr* 1891; 20: 929-933.
9. Essex Wynter W. Four cases of tubercular meningitis in which paracentesis of the theca vertebralis was performed for the relief of fluid pressure. *The Lancet* 1891; 137: 981-982.
10. Kabat EA MD, Landow H. An electrophoretic study of the protein components in cerebrospinal fluid and their relationship to the serum proteins. *J Clin Invest* 1943; 21: 571-577.
11. Kurtzke JF. A New Scale for Evaluating Disability in Multiple Sclerosis. *Neurology* 1955; 5: 580-583.
12. Young IR, Hall AS, Pallis CA et al. Nuclear magnetic resonance imaging of the brain in multiple sclerosis. *The Lancet* 1981; 318: 1063-1066.
13. Kurtzke JF. A reassessment of the distribution of multiple sclerosis *Acta Neurologica Scandinavica* 1975; 51: 137-157.
14. Fernández O FV, Guerrero M, León A, López-Madróna JC, Alonso A, Bustamante R, Tamayo JA, Romero F, Bravo M, Luque G, García L, Sanchís G, San Roman C, Romero M, Papais-Alvarenga M, de Ramon E. Multiple sclerosis prevalence in Malaga, Southern Spain estimated by the capture-recapture method. *Mult Scler* 2012; 18: 375-376.
15. Otero-Romero S, Ramió-Torrentà L, Pericot I et al. Onset-adjusted incidence of multiple sclerosis in the Girona province (Spain): Evidence of increasing risk in the south of Europe. *Journal of the Neurological Sciences* 2015; 359: 146-150.
16. Mackay RP. The familial occurrence of multiple sclerosis and its implications. *Annals of Internal Medicine* 1950; 33: 298-320.
17. Sadovnick A, Baird, PA, Ward, RH. Multiple sclerosis: updated risks for relatives. *American Journal Medical Genetics* 1988; 29: 533-541.
18. Dyment DA, Ebers, G. C. & Sadovnick, A. D. Genetics of multiple sclerosis. *Lancet Neurol* 2004; 3: 104-110.

19. Sadovnick AD, Armstrong H, Rice GPA et al. A population-based study of multiple sclerosis in twins: Update. *Annals of Neurology* 1993; 33: 281-285.
20. Nielsen NM, Westergaard T, Rostgaard K et al. Familial Risk of Multiple Sclerosis: A Nationwide Cohort Study. *American Journal of Epidemiology* 2005; 162: 774-778.
21. Hillert J. Human leukocyte antigen studies in multiple sclerosis. *Annals of Neurology* 1994; 36: S15-S17.
22. Fogdell A, Hillert J, Sachs C, Olerup O. The multiple sclerosis- and narcolepsy-associated HLA class II haplotype includes the DRB5*0101 allele. *Tissue Antigens* 1995; 46: 333-336.
23. Gregersen JW, Kranc KR, Ke X et al. Functional epistasis on a common MHC haplotype associated with multiple sclerosis. *Nature* 2006; 443: 574-577.
24. The International Multiple Sclerosis Genetics C, Wellcome Trust Case Control C, Sawcer S et al. Genetic risk and a primary role for cell-mediated immune mechanisms in multiple sclerosis. *Nature* 2011; 476: 214-219.
25. Gregory AP, Dendrou CA, Attfield KE et al. TNF receptor 1 genetic risk mirrors outcome of anti-TNF therapy in multiple sclerosis. *Nature* 2012; 488: 508-511.
26. Hartmann FJ, Khademi M, Aram J et al. Multiple sclerosis-associated IL2RA polymorphism controls GM-CSF production in human TH cells. *Nature Communications* 2014; 5: 5056.
27. Dendrou CA, Plagnol V, Fung E et al. Cell-specific protein phenotypes for the autoimmune locus IL2RA using a genotype-selectable human bioresource. *Nat Genet* 2009; 41: 1011-1015.
28. Consortium TIMSG. Risk Alleles for Multiple Sclerosis Identified by a Genomewide Study. *New England Journal of Medicine* 2007; 357: 851-862.
29. Lundström W, Highfill S, Walsh STR et al. Soluble IL7R α potentiates IL-7 bioactivity and promotes autoimmunity. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2013; 110: E1761-E1770.
30. Taşan M, Musso G, Hao T et al. Selecting causal genes from genome-wide association studies via functionally-coherent subnetworks. *Nature methods* 2015; 12: 154-159.
31. Belbasis L, Bellou V, Evangelou E et al. Environmental risk factors and multiple sclerosis: an umbrella review of systematic reviews and meta-analyses. *The Lancet Neurology* 2015; 14: 263-273.
32. Simpson S, Blizzard L, Otahal P et al. Latitude is significantly associated with the prevalence of multiple sclerosis: a meta-analysis. *Journal of Neurology, Neurosurgery & Psychiatry* 2011; 82: 1132-1141.
33. Munger KL, Levin LI, Hollis BW et al. Serum 25-hydroxyvitamin d levels and risk of multiple sclerosis. *Jama* 2006; 296: 2832-2838.
34. Ascherio A, Munger KL, White R et al. Vitamin D as an early predictor of multiple sclerosis activity and progression. *JAMA Neurology* 2014; 71: 306-314.
35. Thouvenot E, Orsini M, Daures JP, Camu W. Vitamin D is associated with degree of disability in patients with fully ambulatory relapsing–remitting multiple sclerosis. *European Journal of Neurology* 2015; 22: 564-569.

36. Santón A CE, Aparicio M, Royuela A, Villar LM, Alvarez-Cermeño JC. High frequency of co-infection by Epstein-Barr virus types 1 and 2 in patients with multiple sclerosis. *Mult Scler* 2011; 17: 1295-1300.
37. Operskalski EA, Visscher, B. R., Malmgren, R. M. case-control study of multiple sclerosis. *Neurology* 1989; 39: 825-829.
38. Lossius A, Johansen JN, Vartdal F et al. High-throughput sequencing of TCR repertoires in multiple sclerosis reveals intrathecal enrichment of EBV-reactive CD8+ T cells. *European Journal of Immunology* 2014; 44: 3439-3452.
39. Serafini B, Rosicarelli B, Franciotta D et al. Dysregulated Epstein-Barr virus infection in the multiple sclerosis brain. *The Journal of Experimental Medicine* 2007; 204: 2899-2912.
40. Münz C, Lünemann JD, Getts MT, Miller SD. Antiviral immune responses: triggers of or triggered by autoimmunity? *Nature reviews. Immunology* 2009; 9: 246-258.
41. Mancuso R, Hernis A, Cavarretta R et al. Detection of viral DNA sequences in the cerebrospinal fluid of patients with multiple sclerosis. *Journal of Medical Virology* 2010; 82: 1051-1057.
42. Tuke PW, Hawke S, Griffiths PD, Clark DA. Distribution and quantification of human herpesvirus 6 in multiple sclerosis and control brains. *Multiple Sclerosis* 2004; 10: 355-359.
43. Ortega-Madueño I, Garcia-Montojo M, Dominguez-Mozo MI et al. Anti-Human Herpesvirus 6A/B IgG Correlates with Relapses and Progression in Multiple Sclerosis. *PLoS ONE* 2014; 9: e104836.
44. Alvarez-Lafuente R G-MM, De Las Heras V, Domínguez-Mozo MI, Bartolome M, Benito-Martin MS, Arroyo R. Herpesviruses and human endogenous retroviral sequences in the cerebrospinal fluid of multiple sclerosis patients. *Mult Scler* 2008; 14: 595-601.
45. Simpson S, Taylor B, Dwyer DE et al. Anti-HHV-6 IgG titer significantly predicts subsequent relapse risk in multiple sclerosis. *Multiple Sclerosis Journal* 2012; 18: 799-806.
46. Alvarez-Lafuente R DIHV, Bartolomé M, Picazo JJ, Arroyo R. Relapsing-remitting multiple sclerosis and human herpesvirus 6 active infection. *Arch Neurol* 2004; 61: 1523-1527.
47. Hedström AK BM, Olsson T, Alfredsson L, 73(9):696-701. NS. Tobacco smoking, but not Swedish snuff use, increases the risk of multiple sclerosis. *Neurology* 2009; 73: 696-701.
48. Hernán MA, Jick SS, Logroscino G et al. Cigarette smoking and the progression of multiple sclerosis. *Brain* 2005; 128: 1461-1465.
49. Manouchehrinia A, Tench CR, Macted J et al. Tobacco smoking and disability progression in multiple sclerosis: United Kingdom cohort study. *Brain* 2013; 136: 2298-2304.
50. Wingerchuk DM. Smoking: effects on multiple sclerosis susceptibility and disease progression. *Therapeutic Advances in Neurological Disorders* 2012; 5: 13-22.
51. Munger KL, Chitnis T, Ascherio A. Body size and risk of MS in two cohorts of US women. *Neurology* 2009; 73: 1543-1550.
52. Mokry LE, Ross S, Timpson NJ et al. Obesity and Multiple Sclerosis: A Mendelian Randomization Study. *PLOS Medicine* 2016; 13: e1002053.
53. Farez MF, Fiol MP, Gaitán MI et al. Sodium intake is associated with increased disease activity in multiple sclerosis. *Journal of Neurology, Neurosurgery & Psychiatry* 2015; 86: 26-31.

54. Nourbakhsh B, Graves J, Casper TC et al. Dietary salt intake and time to relapse in paediatric multiple sclerosis. *Journal of Neurology, Neurosurgery & Psychiatry* 2016; 87: 1350-1353.
55. Fred D. Lublin SCR. Defining the clinical course of multiple sclerosis. *Neurology* 1996; 46: 907-911.
56. Lublin FD, Reingold SC, Cohen JA et al. Defining the clinical course of multiple sclerosis: The 2013 revisions. *Neurology* 2014; 83: 278-286.
57. Thompson AJ, Polman CH, Miller DH et al. Primary progressive multiple sclerosis. *Brain* 1997; 120: 1085.
58. Lublin FD. New Multiple Sclerosis Phenotypic Classification. *European Neurology* 2014; 72(suppl 1): 1-5.
59. Tourtellotte WW. Multiple sclerosis: measurement and validation of central nervous system IgG synthesis rate. *Neurology* 1980; 30: 240-244.
60. Reiber H. Calculation of the IgG fraction of cerebrospinal fluid locally synthesized in the central nervous system *J Clin Chem Clin Biochem* 1979; 17.
61. Link HT, G. P. III. . Principles of albumin and IgG analyses in neurological disorders. *Scand J Clin Lab Invest* 1977; 37: 397-401.
62. Polman CH, Reingold SC, Banwell B et al. Diagnostic criteria for multiple sclerosis: 2010 Revisions to the McDonald criteria. *Annals of Neurology* 2011; 69: 292-302.
63. Trapp BD, Peterson J, Ransohoff RM et al. Axonal Transection in the Lesions of Multiple Sclerosis. *New England Journal of Medicine* 1998; 338: 278-285.
64. Lassmann H VK. Are current immunological concepts of multiple sclerosis reflected by the immunopathology of its lesions? *Springer Semin Immunopathol* 1995; 17: 77-87.
65. Ferguson B, Matyszak MK, Esiri MM, Perry VH. Axonal damage in acute multiple sclerosis lesions. *Brain* 1997; 120: 393-399.
66. Frohman EM, Racke MK, Raine CS. Multiple Sclerosis — The Plaque and Its Pathogenesis. *New England Journal of Medicine* 2006; 354: 942-955.
67. Kutzelnigg A, Lucchinetti CF, Stadelmann C et al. Cortical demyelination and diffuse white matter injury in multiple sclerosis. *Brain* 2005; 128: 2705-2712.
68. Brück W PP, Poser S, Rieckmann P, Hanefeld F, Kretschmar HA, Lassmann H. Monocyte/macrophage differentiation in early multiple sclerosis lesions. *Ann Neurol* 1995; 38: 788-796.
69. Prineas JW, Kwon EE, Cho E-S et al. Immunopathology of secondary-progressive multiple sclerosis. *Annals of Neurology* 2001; 50: 646-657.
70. Patrikios P, Stadelmann C, Kutzelnigg A et al. Remyelination is extensive in a subset of multiple sclerosis patients. *Brain* 2006; 129: 3165-3172.
71. Matthews PM, Roncaroli F, Waldman A et al. A practical review of the neuropathology and neuroimaging of multiple sclerosis. *Practical Neurology* 2016; 16: 279-287.
72. Bø L, Vedeler CA, Nyland HI et al. Subpial Demyelination in the Cerebral Cortex of Multiple Sclerosis Patients. *Journal of Neuropathology & Experimental Neurology* 2003; 62: 723-732.

73. Peterson JW, Bö L, Mörk S et al. Transected neurites, apoptotic neurons, and reduced inflammation in cortical multiple sclerosis lesions. *Annals of Neurology* 2001; 50: 389-400.
74. Magliozzi R, Howell O, Vora A et al. Meningeal B-cell follicles in secondary progressive multiple sclerosis associate with early onset of disease and severe cortical pathology. *Brain* 2007; 130: 1089-1104.
75. Magliozzi R, Howell OW, Reeves C et al. A Gradient of neuronal loss and meningeal inflammation in multiple sclerosis. *Annals of Neurology* 2010; 68: 477-493.
76. Lassmann H. Mechanisms of white matter damage in multiple sclerosis. *Glia* 2014; 62: 1816-1830.
77. Zeis T, Graumann U, Reynolds R, Schaeren-Wiemers N. Normal-appearing white matter in multiple sclerosis is in a subtle balance between inflammation and neuroprotection. *Brain* 2008; 131: 288-303.
78. Howell OW, Reeves CA, Nicholas R et al. Meningeal inflammation is widespread and linked to cortical pathology in multiple sclerosis. *Brain* 2011; 134: 2755-2771.
79. McMahon EJ, Bailey, S. L., Castenada, C. V., Waldner, H. & Miller, S. D. . Epitope spreading initiates in the CNS in two mouse models of multiple sclerosis. *Nat Med* 2005; 11.
80. Popescu BFG, Lucchinetti CF. Pathology of Demyelinating Diseases. *Annual Review of Pathology: Mechanisms of Disease* 2012; 7: 185-217.
81. International Multiple Sclerosis Genetics C, Beecham AH, Patsopoulos NA et al. Analysis of immune-related loci identifies 48 new susceptibility variants for multiple sclerosis. *Nature genetics* 2013; 45: 1353-1360.
82. Zamvil S NP, Trotter J, Mitchell D, Knobler R, Fritz R, Steinman L. T-cell clones specific for myelin basic protein induce chronic relapsing paralysis and demyelination. *Nature* 1985; 317: 355-358.
83. Bielekova B, Sung M-H, Kadom N et al. Expansion and Functional Relevance of High-Avidity Myelin-Specific CD4+ T Cells in Multiple Sclerosis. *The Journal of Immunology* 2004; 172: 3893-3904.
84. Niels Hellings, Mark Barée, Christof Verhoeven et al. T-cell reactivity to multiple myelin antigens in multiple sclerosis patients and healthy controls. *Journal of Neuroscience Research* 2001; 63: 290-302.
85. Tzartos JS, Friese MA, Craner MJ et al. Interleukin-17 Production in Central Nervous System-Infiltrating T Cells and Glial Cells Is Associated with Active Disease in Multiple Sclerosis. *The American Journal of Pathology* 2008; 172: 146-155.
86. S S Zamvil aLS. The T Lymphocyte in Experimental Allergic Encephalomyelitis. *Annual review of immunology* 1990; 8: 579-621.
87. O'Garra A MK. From IL-10 to IL-12: how pathogens and their products stimulate APCs to induce T(H)1 development. *Nature Immunol* 2009; 10: 929-932.
88. Szabo SJ, Sullivan BM, Peng SL, Glimcher LH. Molecular mechanisms regulating Th1 immune response. *Annual review of immunology* 2003; 21: 713-758.
89. Korn T BE, Oukka M, Kuchroo VK. I IL-17 and Th17 Cells. *Ann Rev Immunol* 2009; 27: 485-517.
90. Panitch HS HR, Haley AS, Johnson KP. Exacerbations of multiple sclerosis in patients treated with gamma interferon. *Lancet* 1987; 1: 893-895.

91. Panitch HS HR, Schindler J, Johnson KP. Treatment of multiple sclerosis with gamma interferon: exacerbations associated with activation of the immune system. *Neurology* 1987; 37: 1097-1102.
92. Deiß A1 BI, Haarmann A, Buttman M. Treating multiple sclerosis with monoclonal antibodies: a 2013 update. *Expert Rev Neurother* 2013; 13: 315-335.
93. El-Behi M, Ciric B, Dai H et al. The encephalitogenicity of T(H)17 cells is dependent on IL-1- and IL-23-induced production of the cytokine GM-CSF. *Nature immunology* 2011; 12: 568-575.
94. Codarri L, Gyulveszi G, Tosevski V et al. ROR[gamma]t drives production of the cytokine GM-CSF in helper T cells, which is essential for the effector phase of autoimmune neuroinflammation. *Nat Immunol* 2011; 12: 560-567.
95. Miyara M, Yoshioka Y, Kitoh A et al. Functional Delineation and Differentiation Dynamics of Human CD4+ T Cells Expressing the FoxP3 Transcription Factor. *Immunity* 2009; 30: 899-911.
96. Marín N, Mecha M, Espejo C et al. Regulatory Lymphocytes Are Key Factors in MHC-Independent Resistance to EAE. *Journal of Immunology Research* 2014; 2014: 156380.
97. Vigiotta V, Baecher-Allan C, Weiner HL, Hafler DA. Loss of Functional Suppression by CD4(+)CD25(+) Regulatory T Cells in Patients with Multiple Sclerosis. *The Journal of Experimental Medicine* 2004; 199: 971-979.
98. Booss J EM, Tourtellotte WW, Mason DY. Immunohistological analysis of T lymphocyte subsets in the central nervous system in chronic progressive multiple sclerosis. *J Neurol Sci* 1983; 62: 219-232.
99. Hauser SL BA, Gilles F, Kemp M, Kerr C, Weiner HL. Immunohistochemical analysis of the cellular infiltrate in multiple sclerosis lesions. *Ann Neurol* 1986; 19: 578-587.
100. Höftberger R A-EF, Brueck W, Lucchinetti C, Rodriguez M, Schmidbauer M, Jellinger K, Lassmann H. Expression of major histocompatibility complex class I molecules on the different cell types in multiple sclerosis lesions. *Brain Pathol* 2004; 14: 43-50.
101. Friese MA, Fugger L. Pathogenic CD8+ T cells in multiple sclerosis. *Annals of Neurology* 2009; 66: 132-141.
102. Bitsch A SJ, Bunkowski S, Kuhlmann T, Brück W. Acute axonal injury in multiple sclerosis. Correlation with demyelination and inflammation. *Brain* 2000; 123: 1174-1183.
103. Salou M, Garcia A, Michel L et al. Expanded CD8 T-cell sharing between periphery and CNS in multiple sclerosis. *Annals of Clinical and Translational Neurology* 2015; 2: 609-622.
104. Ifergan I, Kebir H, Alvarez JI et al. Central nervous system recruitment of effector memory CD8+ T lymphocytes during neuroinflammation is dependent on $\alpha 4$ integrin. *Brain* 2011; 134: 3560-3577.
105. Annibaldi V RG, Angelini DF, Serafini B, Mechelli R, Cannoni S, Romano S, Paolillo A, Abderrahim CD161(high)CD8+T cells bear pathogenetic potential in multiple sclerosis. *Brain* 134: 542-554.
106. Babbe H, Roers A, Waisman A et al. Clonal Expansions of Cd8(+) T Cells Dominate the T Cell Infiltrate in Active Multiple Sclerosis Lesions as Shown by Micromanipulation and Single Cell Polymerase Chain Reaction. *The Journal of Experimental Medicine* 2000; 192: 393-404.

107. Skulina C, Schmidt S, Dornmair K et al. Multiple sclerosis: Brain-infiltrating CD8(+) T cells persist as clonal expansions in the cerebrospinal fluid and blood. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2004; 101: 2428-2433.
108. Alvarez-Cermeno JC, Villar LM. Multiple sclerosis: Oligoclonal bands-a useful tool to avoid MS misdiagnosis. *Nat Rev Neurol* 2013; 9: 303-304.
109. Kappos L, Li D, Calabresi PA et al. Ocrelizumab in relapsing-remitting multiple sclerosis: a phase 2, randomised, placebo-controlled, multicentre trial. *The Lancet* 378: 1779-1787.
110. Hawker K, O'Connor P, Freedman MS et al. Rituximab in patients with primary progressive multiple sclerosis: Results of a randomized double-blind placebo-controlled multicenter trial. *Annals of Neurology* 2009; 66: 460-471.
111. Piccio L, Naismith RT, Trinkaus K et al. Changes in B and T lymphocytes and chemokines with rituximab treatment in multiple sclerosis. *Archives of Neurology* 2010; 67: 707-714.
112. Harp CT, Lovett-Racke AE, Racke MK et al. Impact of myelin-specific antigen presenting B cells on T cell activation in multiple sclerosis. *Clinical Immunology* 2008; 128: 382-391.
113. Shen P, Roch T, Lampropoulou V et al. IL-35-producing B cells are critical regulators of immunity during autoimmune and infectious diseases. *Nature* 2014; 507: 366-370.
114. Iwata Y, Matsushita T, Horikawa M et al. Characterization of a rare IL-10-competent B-cell subset in humans that parallels mouse regulatory B10 cells. *Blood* 2011; 117: 530-541.
115. Li R, Rezk A, Miyazaki Y et al. Proinflammatory GM-CSF-producing B cells in multiple sclerosis and B cell depletion therapy. *Science Translational Medicine* 2015; 7: 310ra166-310ra166.
116. Bar-Or A, Fawaz L, Fan B et al. Abnormal B-cell cytokine responses a trigger of T-cell-mediated disease in MS? *Annals of Neurology* 2010; 67: 452-461.
117. Cepok S, Jacobsen M, Schock S et al. Patterns of cerebrospinal fluid pathology correlate with disease progression in multiple sclerosis. *Brain* 2001; 124: 2169-2176.
118. Sádaba MC, Tzartos J, Paíno C et al. Axonal and oligodendrocyte-localized IgM and IgG deposits in MS lesions. *Journal of Neuroimmunology* 2012; 247: 86-94.
119. Serafini B, Rosicarelli B, Magliozzi R et al. Detection of Ectopic B-cell Follicles with Germinal Centers in the Meninges of Patients with Secondary Progressive Multiple Sclerosis. *Brain Pathology* 2004; 14: 164-174.
120. Lucchinetti CF, Popescu BFG, Bunyan RF et al. Inflammatory Cortical Demyelination in Early Multiple Sclerosis. *New England Journal of Medicine* 2011; 365: 2188-2197.
121. Calabrese M, Poretto V, Favaretto A et al. Cortical lesion load associates with progression of disability in multiple sclerosis. *Brain* 2012; 135: 2952-2961.
122. Calabrese M, Reynolds R, Magliozzi R et al. Regional Distribution and Evolution of Gray Matter Damage in Different Populations of Multiple Sclerosis Patients. *PLoS ONE* 2015; 10: e0135428.
123. Lovato L, Willis SN, Rodig SJ et al. Related B cell clones populate the meninges and parenchyma of patients with multiple sclerosis. *Brain* 2011; 134: 534-541.

124. Obermeier B, Lovato L, Mentele R et al. Related B cell clones that populate the CSF and CNS of patients with multiple sclerosis produce CSF immunoglobulin. *Journal of Neuroimmunology* 2011; 233: 245-248.
125. Stern JNH, Yaari G, Vander Heiden JA et al. B cells populating the multiple sclerosis brain mature in the draining cervical lymph nodes. *Science Translational Medicine* 2014; 6: 248ra107-248ra107.
126. Ransohoff RM, Perry VH. Microglial Physiology: Unique Stimuli, Specialized Responses. *Annual review of immunology* 2009; 27: 119-145.
127. Ginhoux F, Greter M, Leboeuf M et al. Fate Mapping Analysis Reveals That Adult Microglia Derive from Primitive Macrophages. *Science* 2010; 330: 841-845.
128. London A, Cohen M, Schwartz M. Microglia and monocyte-derived macrophages: functionally distinct populations that act in concert in CNS plasticity and repair. *Frontiers in Cellular Neuroscience* 2013; 7.
129. Kettenmann H, Hanisch U-K, Noda M, Verkhratsky A. Physiology of Microglia. *Physiological Reviews* 2011; 91: 461-553.
130. Giannetti P, Politis M, Su P et al. Increased PK11195-PET binding in normal-appearing white matter in clinically isolated syndrome. *Brain* 2015; 138: 110-119.
131. De Groot CJA, Bergers E, Kamphorst W et al. Post-mortem MRI-guided sampling of multiple sclerosis brain lesions. Increased yield of active demyelinating and (p)reactive lesions. *Brain* 2001; 124: 1635-1645.
132. Howell OW, Rundle JL, Garg A et al. Activated Microglia Mediate Axoglial Disruption that Contributes to Axonal Injury in Multiple Sclerosis. *Journal of Neuropathology & Experimental Neurology* 2010; 69: 1017-1033.
133. Heneka MT, Kummer MP, Latz E. Innate immune activation in neurodegenerative disease. *Nat Rev Immunol* 2014; 14: 463-477.
134. Fischer MT, Wimmer I, Höftberger R et al. Disease-specific molecular events in cortical multiple sclerosis lesions. *Brain* 2013; 136: 1799-1815.
135. Farina C, Aloisi F, Meinl E. Astrocytes are active players in cerebral innate immunity. *Trends in Immunology* 2007; 28: 138-145.
136. Sobel RA MM, Fondren G. Intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) in cellular immune reactions in the human central nervous system. *Am J Pathol* 1990; 136: 1309-1316.
137. Correale J, Farez MF. The Role of Astrocytes in Multiple Sclerosis Progression. *Frontiers in Neurology* 2015; 6: 180.
138. Dong Y BE. Immune function of astrocytes. *Glia* 2001; 36: 180-190.
139. Calderon TM EE, Lopez L, Kumar SS, Hesselgesser J, Raine CS, Berman JW. A role for CXCL12 (SDF-1alpha) in the pathogenesis of multiple sclerosis: regulation of CXCL12 expression in astrocytes by soluble myelin basic protein. *J Neuroimmunol* 2006; 177: 29-39.
140. Mayo L, Trauger SA, Blain M et al. B4GALT6 regulates astrocyte activation during CNS inflammation. *Nature medicine* 2014; 20: 1147-1156.
141. Liu JS ZM, Brosnan CF, Lee SC. Expression of inducible nitric oxide synthase and nitrotyrosine in multiple sclerosis lesions. *Am J Pathol* 2001; 158: 2027-2066.
142. Stojanovic IR, Kostic M, Ljubisavljevic S. The role of glutamate and its receptors in multiple sclerosis. *J Neural Transm* 2014; 121.

143. Goronzy JJ, Lee W-W, Weyand CM. Aging and T-cell diversity. *Experimental gerontology* 2007; 42: 400-406.
144. van Leeuwen EMM, Remmerswaal EBM, Vossen MTM et al. Emergence of a CD4+CD28- Granzyme B+, Cytomegalovirus-Specific T Cell Subset after Recovery of Primary Cytomegalovirus Infection. *The Journal of Immunology* 2004; 173: 1834-1841.
145. Maly K, Schirmer M. The Story of CD4+CD28-; T Cells Revisited: Solved or Still Ongoing? *Journal of Immunology Research* 2015; 2015: 11.
146. Appay V, Zaunders JJ, Papagno L et al. Characterization of CD4+ CTLs Ex Vivo. *The Journal of Immunology* 2002; 168: 5954-5958.
147. Bulati M BS, Candore G, Caruso C, Dunn-Walters DK, Colonna Romano G. B cells and immunosenescence: a focus on IgG+IgD-CD27-(DN) B cells in aged humans. *Aging Res Rev.* 2011; 10: 274-284.
148. Cancro MP, Hao Y, Scholz JL et al. B cells and aging: molecules and mechanisms. *Trends in Immunology* 2009; 30: 313-318.
149. Shaw AC, Joshi S, Greenwood H et al. Aging of the Innate Immune System. *Current opinion in immunology* 2010; 22: 507-513.
150. Wikby A MP, Olsson J, Johansson B, Ferguson FG. Changes in CD8 and CD4 lymphocyte subsets, T cell proliferation responses and non-survival in the very old: the Swedish longitudinal OCTO-immune study. *Mechanisms of Ageing and Development* 1998; 102: 187-198.
151. Lovett-Racke AE, Trotter JL, Lauber J et al. Decreased dependence of myelin basic protein-reactive T cells on CD28-mediated costimulation in multiple sclerosis patients. A marker of activated/memory T cells. *Journal of Clinical Investigation* 1998; 101: 725-730.
152. Markovic-Plese S, Cortese I, Wandinger K-P et al. CD4(+)/CD28(-) costimulation-independent T cells in multiple sclerosis. *Journal of Clinical Investigation* 2001; 108: 1185-1194.
153. Miyazaki Y IK, Kikuchi S, Fukazawa T, Niino M, Hirotsu M, Sasaki H, Onoé K. Expansion of CD4+CD28- T cells producing high levels of interferon- γ in peripheral blood of patients with multiple sclerosis. *Mult Scler* 2008; 14: 1044-1055.
154. Claes N FJ, Vanheusden M, Hellings N, Stinissen P, Van Wijmeersch B, Hupperts R, Somers V. Age-Associated B Cells with Proinflammatory Characteristics Are Expanded in a Proportion of Multiple Sclerosis Patients. *J Immunol* 2016; 197: 4576.
155. Njie EG BE, Stassen FR, Steinbusch HW, Borchelt DR, Streit WJ. Ex vivo cultures of microglia from young and aged rodent brain reveal age-related changes in microglial function. *Neurobiol Aging* 2012; 33.
156. Tremblay ME ZM, Ison JR, Allen PD, Majewska AK.. *Glia* 2012; 60: 541-58. Effects of aging and sensory loss on glial cells in mouse visual and auditory cortices. *Glia* 2012; 60.
157. Sloane JA HW, Rosene DL, Moss MB, Kemper T, Abraham CR. Astrocytic hypertrophy and altered GFAP degradation with age in subcortical white matter of the rhesus monkey. *Brain Res* 2000; 862: 1-10.
158. Porchet R PA, Bouras C, Drabevora E, Draber P, Riederer BM. . Analysis of glial fibrillary protein protein in the human enthorinal cortex during aging and Alzheimer's disease. *Proteomics* 2003; 3: 1476-1485.

159. Salminen A OJ, Kaarmiranta K, Haapasalo A, Hiltunen M, Soininen. Astrocytes in the aging brain express characteristics of senescence-associated secretory phenotype. *Eur J Neurosci* 2011; 34: 3-11.
160. CE M. Interferon-beta: mechanism of action and dosing issues. *Neurology* 2007; 12: S8-11.
161. Lovett-Racke MKRaAE. Glatiramer Acetate Treatment of Multiple Sclerosis: An Immunological Perspective. *Journal of Immunology* 2011; 186: 1887-1818.
162. Polman CH, O'Connor PW, Havrdova E et al. A Randomized, Placebo-Controlled Trial of Natalizumab for Relapsing Multiple Sclerosis. *New England Journal of Medicine* 2006; 354: 899-910.
163. Brown JWL, Coles AJ. Alemtuzumab: evidence for its potential in relapsing—remitting multiple sclerosis. *Drug Design, Development and Therapy* 2013; 7: 131-138.
164. Kappos L, Radue E-W, O'Connor P et al. A Placebo-Controlled Trial of Oral Fingolimod in Relapsing Multiple Sclerosis. *New England Journal of Medicine* 2010; 362: 387-401.
165. Papadopoulou A, Kappos L, Sprenger T. Teriflunomide for oral therapy in multiple sclerosis. *Expert Review of Clinical Pharmacology* 2012; 5: 617-628.
166. Linker RA GR. Dimethyl fumarate for treatment of multiple sclerosis: mechanism of action, effectiveness, and side effects. *Curr Neurol Neurosci Rep* 13: 394.
167. Leist TP, Comi G, Cree BAC et al. Effect of oral cladribine on time to conversion to clinically definite multiple sclerosis in patients with a first demyelinating event (ORACLE MS): a phase 3 randomised trial. *The Lancet Neurology* 2014; 13: 257-267.
168. Villar LM, Masjuan J, González-Porqué P et al. Intrathecal IgM synthesis is a prognostic factor in multiple sclerosis. *Annals of Neurology* 2003; 53: 222-226.
169. Villar LM MJ, González-Porqué P, Plaza J, Sádaba MC, Roldán E, Bootello A, Alvarez-Cermeño JC. Intrathecal IgM synthesis predicts the onset of new relapses and a worse disease course in MS. *Neurology* 2002; 59: 555-559.
170. Villar LM MJ, González-Porqué P, Plaza J, Sádaba MC, Roldán E, Bootello A, Alvarez-Cermeño JC. Intrathecal IgM synthesis in neurologic diseases: relationship with disability in MS. *Neurology* 2002; 58: 824-826.
171. Villar LM, Sádaba MC, Roldán E et al. Intrathecal synthesis of oligoclonal IgM against myelin lipids predicts an aggressive disease course in MS. *Journal of Clinical Investigation* 2005; 115: 187-194.
172. Thangarajh M, Gomez-Rial J, Hedström A et al. Lipid-specific immunoglobulin M in CSF predicts adverse long-term outcome in multiple sclerosis. *Multiple Sclerosis* 2008; 14: 1208-1213.
173. Magraner MJ, Bosca I, Simó-Castelló M et al. Brain atrophy and lesion load are related to CSF lipid-specific IgM oligoclonal bands in clinically isolated syndromes. *Neuroradiology* 2012; 54: 5-12.
174. Villar LM, García-Sánchez MI, Costa-Frossard L, et al. Immunological markers of optimal response to natalizumab in multiple sclerosis. *Archives of Neurology* 2012; 69: 191-197.

175. Bosca I VL, Coret F, Magraner MJ, Simó-Castelló M, Alvarez-Cermeño JC, Casanova B. Response to interferon in multiple sclerosis is related to lipid-specific oligoclonal IgM bands. *Mult Scler* 2010; 16: 810-815.
176. Villar LM, Costa-Frossard L, Masterman T et al. Lipid-specific immunoglobulin M bands in cerebrospinal fluid are associated with a reduced risk of developing progressive multifocal leukoencephalopathy during treatment with natalizumab. *Annals of Neurology* 2015; 77: 447-457.
177. Kuhle J, Bestwick JP, Lindberg RL, Ramagopalan SV, Norgren N, Nissim A, Malaspina A, Leppert D, Giovannoni G, Kappos L. A comparative study of CSF neurofilament light and heavy chain protein in MS. *Mult Scler* 2013; 19: 1597-1603.
178. Mellergård J, Tisell A, Blystad I et al. Cerebrospinal fluid levels of neurofilament and tau correlate with brain atrophy in natalizumab-treated multiple sclerosis. *European Journal of Neurology* 2016.
179. Norgren N, Svenningsson A, Rosengren L, Stigbrand T, Gunnarsson M. Neurofilament and glial fibrillary acidic protein in multiple sclerosis. *Neurology* 2004; 63: 1589-1590.
180. Salzer J, Svenningsson A, Sundström P. Neurofilament light as a prognostic marker in multiple sclerosis. *Multiple Sclerosis* 2010; 16: 287-292.
181. Kuhle J, Disanto G, Lorscheider J et al. Fingolimod and CSF neurofilament light chain levels in relapsing-remitting multiple sclerosis. *Neurology* 2015; 84: 1639-1643.
182. Gunnarsson M, Malmeström C, Axelsson M et al. Axonal damage in relapsing multiple sclerosis is markedly reduced by natalizumab. *Annals of Neurology* 2011; 69: 83-89.
183. Teunissen CE, Khademi M, Brundin L, Norgren N, Koel-Simmelink MJ, Schepens M, Bouwman F, Twaalfhoven HA, Blom HJ, Jakobs C, Dijkstra CD. Combination of CSF N-acetylaspartate and neurofilaments in multiple sclerosis. *Neurology* 2009; 72: 1322-1329.
184. Hakala BE, White C, Recklies AD. Human cartilage gp-39, a major secretory product of articular chondrocytes and synovial cells, is a mammalian member of a chitinase protein family. *Journal of Biological Chemistry* 1993; 268: 25803-25810.
185. Peltomaa R, Harvey S, Helve T, Leirisalo-Repo M. Increased level of YKL-40 in sera from patients with early rheumatoid arthritis: a new marker for disease activity. *Rheumatol Int* 2001; 20: 192-196.
186. Vind I, Price PA, Munkholm P. Serum YKL-40, a potential new marker of disease activity in patients with inflammatory bowel disease. *Scand J Gastroenterol* 2003; 38: 599-605.
187. Dupont J, Thaler HT, Fleisher M, Kauff N, Hensley ML. Early detection and prognosis of ovarian cancer using serum YKL-40. *J Clin Oncol* 2004; 22: 3330-3339.
188. Bigg HF, Rowan AD, Cawston TE. The mammalian chitinase-like lectin, YKL-40, binds specifically to type I collagen and modulates the rate of type I collagen fibril formation. *J Biol Chem* 2006; 281: 21082-21095.
189. Cantó E, Tintoré M, Villar LM et al. Chitinase 3-like 1: prognostic biomarker in clinically isolated syndromes. *Brain* 2015; 138: 918-931.
190. Comabella M, Fernández M, Martín R et al. Cerebrospinal fluid chitinase 3-like 1 levels are associated with conversion to multiple sclerosis. *Brain* 2010; 133: 1082-1093.

191. Martínez MAM, Olsson B, Bau L et al. Glial and neuronal markers in cerebrospinal fluid predict progression in multiple sclerosis. *Multiple Sclerosis (Houndmills, Basingstoke, England)* 2015; 21: 550-561.
192. Modvig S DM, Roed H, Sørensen TL, Larsson HB, Langkilde AR, Frederiksen JL, Sellebjerg F. Cerebrospinal fluid levels of chitinase 3-like 1 and neurofilament light chain predict multiple sclerosis development and disability after optic neuritis. *Mult Scler* 2015; 21: 1761-1770.
193. Eng LF GR. GFAP and astrogliosis. *Brain Pathol* 1994; 4: 229-237.
194. Axelsson M1 MC, Nilsson S, Haghighi S, Rosengren L, Lycke J. Glial fibrillary acidic protein: a potential biomarker for progression in multiple sclerosis. *J Neurol* 2011; 258: 882-888.
195. Mañé-Martínez MA, Olsson B, Bau L et al. Glial and neuronal markers in cerebrospinal fluid in different types of multiple sclerosis. *Journal of Neuroimmunology* 2016; 299: 112-117.
196. Giunti D, Borsellino G, Benelli R et al. Phenotypic and functional analysis of T cells homing into the CSF of subjects with inflammatory diseases of the CNS. *Journal of Leukocyte Biology* 2003; 73: 584-590.
197. Mullen KM, Gocke AR, Allie R et al. Expression of CCR7 and CD45RA in CD4(+) and CD8(+) subsets in cerebrospinal fluid of 134 patients with inflammatory and non-inflammatory neurological diseases. *Journal of Neuroimmunology* 2012; 249: 86-92.
198. Blauth K, Zhang X, Chopra M et al. The role of fractalkine (CX3CL1) in regulation of CD4+ cell migration to the central nervous system in patients with relapsing–remitting multiple sclerosis. *Clinical Immunology* 2015; 157: 121-132.
199. Fritzsching B, Haas J, König F et al. Intracerebral Human Regulatory T Cells: Analysis of CD4+CD25+FOXP3+ T Cells in Brain Lesions and Cerebrospinal Fluid of Multiple Sclerosis Patients. *PLoS ONE* 2011; 6: e17988.
200. Feger U, Luther C, Poeschel S et al. Increased frequency of CD4(+) CD25(+) regulatory T cells in the cerebrospinal fluid but not in the blood of multiple sclerosis patients. *Clinical and Experimental Immunology* 2007; 147: 412-418.
201. Tejera-Alhambra M AB, Teijeiro R, Ramos-Medina R, Aristimuño C, Valor L, de Andrés C, Sánchez-Ramón S. Perforin expression by CD4+ regulatory T cells increases at multiple sclerosis relapse: sex differences. *Int J Mol Sci* 2012; 13: 6698-6697.
202. de Paula Alves Sousa A, Johnson KR, Nicholas R et al. Intrathecal T-cell clonal expansions in patients with multiple sclerosis. *Annals of Clinical and Translational Neurology* 2016; 3: 422-433.
203. Jilek S, Schlupe M, Rossetti AO et al. CSF enrichment of highly differentiated CD8+ T cells in early multiple sclerosis. *Clinical Immunology* 2007; 123: 105-113.
204. Jacobsen M, Cepok S, Quak E et al. Oligoclonal expansion of memory CD8+ T cells in cerebrospinal fluid from multiple sclerosis patients. *Brain* 2002; 125: 538-550.
205. Cepok S, Rosche B, Grummel V et al. Short-lived plasma blasts are the main B cell effector subset during the course of multiple sclerosis. *Brain* 2005; 128: 1667-1676.
206. Kuenz B, Lutterotti A, Ehling R et al. Cerebrospinal Fluid B Cells Correlate with Early Brain Inflammation in Multiple Sclerosis. *PLoS ONE* 2008; 3: e2559.

207. Krumbholz M, Theil D, Cepok S et al. Chemokines in multiple sclerosis: CXCL12 and CXCL13 up-regulation is differentially linked to CNS immune cell recruitment. *Brain* 2006; 129: 200-211.
208. Seidi OA, Semra YK, Sharief MK. Expression of CD5 on B lymphocytes correlates with disease activity in patients with multiple sclerosis. *Journal of Neuroimmunology* 2002; 133: 205-210.
209. Mix E, Olsson T, Correale J et al. B cells expressing CD5 are increased in cerebrospinal fluid of patients with multiple sclerosis. *Clinical and Experimental Immunology* 1990; 79: 21-27.
210. Villar LM, Espiño M, Cavanillas ML et al. Immunological mechanisms that associate with oligoclonal IgM band synthesis in multiple sclerosis. *Clinical Immunology* 2010; 137: 51-59.
211. Palanichamy A, Apeltsin L, Kuo TC et al. Immunoglobulin class-switched B cells provide an active immune axis between CNS and periphery in multiple sclerosis. *Science Translational Medicine* 2014; 6: 248-255.
212. Han S, Lin YC, Wu T et al. Comprehensive Immunophenotyping of Cerebrospinal Fluid Cells in Patients with Neuroimmunological Diseases. *The Journal of Immunology* 2014; 192: 2551-2563.
213. Nemecek A ZH, Rübenthaler J, Fleischer V, Paterka M, Luessi F, Müller-Forell W, Zipp F, Siffrin V. Flow cytometric analysis of T cell/monocyte ratio in clinically isolated syndrome identifies patients at risk of rapid disease progression. *Mult Scler* 2016; 22: 183-193.
214. Waschbisch A, Schröder S, Schraudner D et al. Pivotal Role for CD16+ Monocytes in Immune Surveillance of the Central Nervous System. *The Journal of Immunology* 2016; 196: 1558-1567.
215. Longhini ALF, von Glehn F, Brandão CO et al. Plasmacytoid dendritic cells are increased in cerebrospinal fluid of untreated patients during multiple sclerosis relapse. *Journal of Neuroinflammation* 2011; 8: 2-2.
216. Degn M MS, Dyring-Andersen B, Bonfeld CM, Frederiksen JL, Geisler C, von Essen MR. Increased prevalence of lymphoid tissue inducer cells in the cerebrospinal fluid of patients with early multiple sclerosis. *Mult Scler* 2016; 22: 1013-1020.
217. Villar LM, González-Porqué P, Masjuán J et al. A sensitive and reproducible method for the detection of oligoclonal IgM bands. *Journal of Immunological Methods* 2001; 258: 151-155.
218. Petzold A, Eikelenboom M, Keir G et al. Axonal damage accumulates in the progressive phase of multiple sclerosis: three year follow up study. *Journal of Neurology, Neurosurgery, and Psychiatry* 2005; 76: 206-211.
219. Teunissen CE, Khalil M. Neurofilaments as biomarkers in multiple sclerosis. *Multiple Sclerosis Journal* 2012; 18: 552-556.
220. Sierra-Filardi E, Puig-Kröger A, Blanco FJ et al. Activin A skews macrophage polarization by promoting a proinflammatory phenotype and inhibiting the acquisition of anti-inflammatory macrophage markers. *Blood* 2011; 117: 5092-5101.
221. Fischer MT, Sharma R, Lim JL et al. NADPH oxidase expression in active multiple sclerosis lesions in relation to oxidative tissue damage and mitochondrial injury. *Brain* 2012; 135: 886-899.

222. Miller E, Mrowicka M, Saluk-Juszczak J, Ireneusz M. The Level of Isoprostanes as a Non-invasive Marker for in vivo Lipid Peroxidation in Secondary Progressive Multiple Sclerosis. *Neurochemical Research* 2011; 36: 1012-1016.
223. Confavreux C, Vukusic S. Age at disability milestones in multiple sclerosis. *Brain* 2006; 129: 595-605.
224. Alonso Arias R, Moro-García MA, Echeverría A et al. Intensity of the Humoral Response to Cytomegalovirus Is Associated with the Phenotypic and Functional Status of the Immune System. *Journal of Virology* 2013; 87: 4486-4495.
225. Alvermann S, Hennig C, Stüve O et al. Immunophenotyping of cerebrospinal fluid cells in multiple sclerosis: In search of biomarkers. *JAMA Neurology* 2014; 71: 905-912.
226. Kumar M, Putzki N, Limmroth V et al. CD4+CD25+FoxP3+ T lymphocytes fail to suppress myelin basic protein-induced proliferation in patients with multiple sclerosis. *Journal of Neuroimmunology* 2006; 180: 178-184.
227. Kleinewietfeld M, Hafler DA. Regulatory T cells in autoimmune Neuroinflammation. *Immunological reviews* 2014; 259: 231-244.
228. Venken K, Hellings N, Hensen K et al. Secondary progressive in contrast to relapsing-remitting multiple sclerosis patients show a normal CD4+CD25+ regulatory T-cell function and FOXP3 expression. *Journal of Neuroscience Research* 2006; 83: 1432-1446.
229. Robert Berland HHW. Origins and functions of B-1 with notes on the role of CD5 Annual review of immunology 2002; 20: 253-300.
230. Villar LM, Espiño M, Roldán E et al. Increased peripheral blood CD5+ B cells predict earlier conversion to MS in high-risk clinically isolated syndromes. *Multiple Sclerosis Journal* 2011; 17: 690-694.
231. Villar LM, Masjuan J, Sádaba MC, et al. EARly differential diagnosis of multiple sclerosis using a new oligoclonal band test. *Archives of Neurology* 2005; 62: 574-577.
232. Dobson R, Ramagopalan S, Davis A, Giovannoni G. Cerebrospinal fluid oligoclonal bands in multiple sclerosis and clinically isolated syndromes: a meta-analysis of prevalence, prognosis and effect of latitude. *Journal of Neurology, Neurosurgery & Psychiatry* 2013; 84: 909-914.
233. Masjuan J A-CJ, García-Barragán N, Díaz-Sánchez M, Espiño M, Sádaba MC, González-Porqué P, Martínez San Millán J, Villar LM. Clinically isolated syndromes: a new oligoclonal band test accurately predicts conversion to MS. *Neurology* 2006; 66: 576-578.
234. McLean BN, Luxton RW, Thompson EJ. A study of immunoglobulin G in the cerebrospinal fluid of 1007 patients with suspected neurological disease using isoelectric focusing and the log IgG-Index. *Brain* 1990; 113: 1269-1289.
235. Booss J EM, Tourtellotte WW, Mason DY. Immunohistological analysis of T lymphocyte subsets in the central nervous system in chronic progressive multiple sclerosis. *J Neurol Sci* 1893; 61: 219-232.
236. Gardner C, Magliozzi R, Durrenberger PF et al. 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.
237. Sauer BM, Schmalstieg WF, Howe CL. Axons are injured by antigen-specific CD8+ T cells through a MHC class I- and granzyme B-dependent mechanism. *Neurobiology of Disease* 2013; 59: 194-205.

238. Dudakov JA, Hanash AM, van den Brink MRM. Interleukin-22: immunobiology and pathology. *Annual review of immunology* 2015; 33: 747-785.
239. Nikoopour E, Bellemore SM, Singh B. IL-22, cell regeneration and autoimmunity. *Cytokine* 2015; 74: 35-42.
240. Nograles KE, Zaba LC, Shemer A et al. IL-22 producing "T22" T-cells account for up-regulated IL-22 in atopic dermatitis (AD), despite reduced IL-17 producing Th17 T-cells. *The Journal of allergy and clinical immunology* 2009; 123: 1244-1252.e1242.
241. Caspi R, Mattapallil M, Rigden R et al. Neuroprotective effects of IL-22 during CNS inflammation. *The Journal of Immunology* 2015; 194: 118.113.
242. Kebir H, Kreymborg K, Ifergan I et al. Human TH17 lymphocytes promote blood-brain barrier disruption and central nervous system inflammation. *Nat Med* 2007; 13: 1173-1175.
243. Molyneux PD, Kappos L, Polman C et al. The effect of interferon beta-1b treatment on MRI measures of cerebral atrophy in secondary progressive multiple sclerosis. *Brain* 2000; 123: 2256-2263.
244. Lovas G, Szilágyi N, Majtényi K et al. Axonal changes in chronic demyelinated cervical spinal cord plaques. *Brain* 2000; 123: 308-317.
245. DeLuca GC, Williams K, Evangelou N et al. The contribution of demyelination to axonal loss in multiple sclerosis. *Brain* 2006; 129: 1507-1516.
246. Malmeström C HS, Rosengren L, Andersen O, Lycke J. Neurofilament light protein and glial fibrillary acidic protein as biological markers in MS. *Neurology* 2003; 61: 1720-1725.
247. Meeter LH, Dopfer EG, Jiskoot LC et al. Neurofilament light chain: a biomarker for genetic frontotemporal dementia. *Annals of Clinical and Translational Neurology* 2016; 3: 623-636.
248. Zetterberg H, Skillbäck T, Mattsson N, et al. Association of cerebrospinal fluid neurofilament light concentration with alzheimer disease progression. *JAMA Neurology* 2016; 73: 60-67.
249. Khalil M, Enzinger C, Langkammer C et al. CSF neurofilament and N-acetylaspartate related brain changes in clinically isolated syndrome. *Mult Scler* 2013; 19: 436-442.
250. Abreira V, Alvarez-Cermeño JC, Arroyo R et al. Utility of oligoclonal IgG band detection for MS diagnosis in daily clinical practice. *Journal of Immunological Methods* 2011; 371: 170-173.
251. Fialová L, Bartos A, Švarcová J et al. Serum and cerebrospinal fluid light neurofilaments and antibodies against them in clinically isolated syndrome and multiple sclerosis. *Journal of Neuroimmunology* 2013; 262: 113-120.
252. Grönwall C, Vas J, Silverman GJ. Protective Roles of Natural IgM Antibodies. *Frontiers in Immunology* 2012; 3: 66.
253. Beltrán E, Obermeier B, Moser M et al. Intrathecal somatic hypermutation of IgM in multiple sclerosis and neuroinflammation. *Brain* 2014; 137: 2703-2714.
254. de la Concha EG, Cavanillas ML, Cénit MC et al. DRB1*03:01 Haplotypes: Differential Contribution to Multiple Sclerosis Risk and Specific Association with the Presence of Intrathecal IgM Bands. *PLoS ONE* 2012; 7: e31018.

255. Ansel KM, Harris RBS, Cyster JG. CXCL13 Is Required for B1 Cell Homing, Natural Antibody Production, and Body Cavity Immunity. *Immunity* 2002; 16: 67-76.
256. Pashenkov M, Huang Y-M, Kostulas V et al. Two subsets of dendritic cells are present in human cerebrospinal fluid. *Brain* 2001; 124: 480-492.
257. Lande R, Gafa V, Serafini B et al. Plasmacytoid Dendritic Cells in Multiple Sclerosis. Intracerebral Recruitment and Impaired Maturation in Response to Interferon- β 2008; 67: 388-401.
258. Ziegler-Heitbrock L, Hofer TPJ. Toward a Refined Definition of Monocyte Subsets. *Frontiers in Immunology* 2013; 4: 23.
259. Ziegler-Heitbrock L, Ancuta P, Crowe S et al. Nomenclature of monocytes and dendritic cells in blood. *Blood* 2010; 116: e74-e80.
260. Geissmann F, Jung S, Littman DR. Blood Monocytes Consist of Two Principal Subsets with Distinct Migratory Properties. *Immunity* 2003; 19: 71-82.
261. Tsou C-L, Peters W, Si Y et al. Critical roles for CCR2 and MCP-3 in monocyte mobilization from bone marrow and recruitment to inflammatory sites. *The Journal of Clinical Investigation* 2007; 117: 902-909.
262. Heine GH, Ortiz A, Massy ZA et al. Monocyte subpopulations and cardiovascular risk in chronic kidney disease. *Nat Rev Nephrol* 2012; 8: 362-369.
263. Rossol M, Kraus S, Pierer M et al. The CD14^{bright}CD16⁺ monocyte subset is expanded in rheumatoid arthritis and promotes expansion of the Th17 cell population. *Arthritis & Rheumatism* 2012; 64: 671-677.
264. Yoon BR, Yoo S-J, Choi Yh et al. Functional Phenotype of Synovial Monocytes Modulating Inflammatory T-Cell Responses in Rheumatoid Arthritis (RA). *PLoS ONE* 2014; 9: e109775.
265. Abeles D, McPhail MJ, Sowter D et al. CD14, CD16 and HLA-DR reliably identifies human monocytes and their subsets in the context of pathologically reduced HLA-DR expression by CD14^{hi}/CD16^{neg} monocytes: Expansion of CD14^{hi}/CD16^{pos} and contraction of CD14^{lo}/CD16^{pos} monocytes in acute liver failure. *Cytometry Part A* 2012; 81A: 823-834.
266. Wong KL, Tai JJ-Y, Wong W-C et al. Gene expression profiling reveals the defining features of the classical, intermediate, and nonclassical human monocyte subsets. *Blood* 2011; 118: e16-e31.
267. Zawada AM, Rogacev KS, Rotter B et al. SuperSAGE evidence for CD14⁺⁺CD16⁺ monocytes as a third monocyte subset. *Blood* 2011; 118: e50-e61.
268. Cros J, Cagnard N, Woollard K et al. Human CD14(dim) Monocytes Patrol and Sense Nucleic Acids and Viruses via TLR7 and TLR8 Receptors. *Immunity* 2010; 33: 375-386.
269. Bonnef-Barkay D, Wang G, Starkey A et al. In vivo CHI3L1 (YKL-40) expression in astrocytes in acute and chronic neurological diseases. *J Neuroinflammation* 2010; 7.
270. Watkins LM, Neal JW, Loveless S et al. Complement is activated in progressive multiple sclerosis cortical grey matter lesions. *Journal of Neuroinflammation* 2016; 13: 161.
271. Ingram G, Loveless S, Howell OW et al. Complement activation in multiple sclerosis plaques: an immunohistochemical analysis. *Acta Neuropathologica Communications* 2014; 2: 53.
272. Hong S, Beja-Glasser VF, Nfonoyim BM et al. Complement and microglia mediate early synapse loss in Alzheimer mouse models. *Science* 2016.

273. Hengel RL, Thaker V, Pavlick MV et al. Cutting Edge: L-Selectin (CD62L) Expression Distinguishes Small Resting Memory CD4+ T Cells That Preferentially Respond to Recall Antigen. *The Journal of Immunology* 2003; 170: 28-32.
274. Klinger A, Gebert A, Bieber K et al. Cyclical expression of L-selectin (CD62L) by recirculating T cells. *International Immunology* 2009; 21: 443-455.
275. Sallusto F, Lenig D, Forster R et al. Two subsets of memory T lymphocytes with distinct homing potentials and effector functions. *Nature* 1999; 401: 708-712.
276. Rensing-Ehl A, Malipiero U, Irmiler M et al. Neurons induced to express major histocompatibility complex class I antigen are killed via the perforin and not the Fas (APO-1/CD95) pathway. *European Journal of Immunology* 1996; 26: 2271-2274.
277. Neumann H, Medana IM, Bauer J, Lassmann H. Cytotoxic T lymphocytes in autoimmune and degenerative CNS diseases. *Trends in Neurosciences* 2002; 25: 313-319.
278. Caminero A, Comabella M, Montalban X. Tumor necrosis factor alpha (TNF- α), anti-TNF- α and demyelination revisited: An ongoing story. *Journal of Neuroimmunology* 2011; 234: 1-6.
279. Doll DN, Rellick SL, Barr TL et al. Rapid mitochondrial dysfunction mediates TNF-alpha-induced neurotoxicity. *Journal of Neurochemistry* 2015; 132: 443-451.
280. Grogan JL, Ouyang W. A role for Th17 cells in the regulation of tertiary lymphoid follicles. *European Journal of Immunology* 2012; 42: 2255-2262.
281. Kebir H, Kreymborg K, Ifergan I et al. Human T(H)17 lymphocytes promote blood-brain barrier disruption and central nervous system inflammation. *Nature medicine* 2007; 13: 1173-1175.
282. Brück W. The pathology of multiple sclerosis is the result of focal inflammatory demyelination with axonal damage. *Journal of Neurology* 2005; 252: v3-v9.
283. Lassmann H, Brück W, Lucchinetti CF. The Immunopathology of Multiple Sclerosis: An Overview. *Brain Pathology* 2007; 17: 210-218.
284. Prat A, Biernacki K, Lavoie J et al. Migration of multiple sclerosis lymphocytes through brain endothelium. *Archives of Neurology* 2002; 59: 391-397.
285. Dorshkind K, Montecino-Rodriguez E, Signer RAJ. The ageing immune system: is it ever too old to become young again? *Nat Rev Immunol* 2009; 9: 57-62.
286. Nikolich-Zugich J. Ageing and life-long maintenance of T-cell subsets in the face of latent persistent infections. *Nat Rev Immunol* 2008; 8: 512-522.
287. Czesnikiewicz-Guzik M, Lee W-W, Cui D et al. T cell subset-specific susceptibility to aging. *Clinical immunology* 2008; 127: 107-118.
288. Almanzar G, Schwaiger S, Jenewein B et al. Long-Term Cytomegalovirus Infection Leads to Significant Changes in the Composition of the CD8(+) T-Cell Repertoire, Which May Be the Basis for an Imbalance in the Cytokine Production Profile in Elderly Persons. *Journal of Virology* 2005; 79: 3675-3683.
289. Pawelec G, Derhovanessian E. Role of CMV in immune senescence. *Virus Research* 2011; 157: 175-179.
290. Liu Y, Kuick R, Hanash S, Richardson B. DNA methylation inhibition increases T cell KIR expression through effects on both promoter methylation and transcription factors. *Clinical immunology* 2009; 130: 213-224.

291. Lu Q, Wu A, Ray D et al. DNA Methylation and Chromatin Structure Regulate T Cell Perforin Gene Expression. *The Journal of Immunology* 2003; 170: 5124-5132.
292. Moro-García MA, Alonso-Arias R, López-Larrea C. Molecular Mechanisms Involved in the Aging of the T-cell Immune Response. *Current Genomics* 2012; 13: 589-602.
293. Johnson SA, Rozzo SJ, Cambier JC. Aging-Dependent Exclusion of Antigen-Inexperienced Cells from the Peripheral B Cell Repertoire. *The Journal of Immunology* 2002; 168: 5014-5023.
294. Scholz JL, Diaz A, Riley RL et al. A comparative review of aging and B cell function in mice and humans. *Current opinion in immunology* 2013; 25.
295. Zheng B, Han S, Takahashi Y, Kelsoe G. Immunosenescence and germinal center reaction. *Immunological reviews* 1997; 160: 63-77.
296. Linterman MA. How T follicular helper cells and the germinal centre response change with age. *Immunol Cell Biol* 2014; 92: 72-79.
297. Grolleau-Julius A, Garg MR, Mo R et al. Effect of Aging on Bone Marrow-Derived Murine CD11c+CD4-CD8 α - Dendritic Cell Function. *The Journals of Gerontology Series A: Biological Sciences and Medical Sciences* 2006; 61: 1039-1047.
298. Boehmer ED, Goral J, Faunce DE, Kovacs EJ. Age-dependent decrease in Toll-like receptor 4-mediated proinflammatory cytokine production and mitogen-activated protein kinase expression. *Journal of Leukocyte Biology* 2004; 75: 342-349.
299. Chelvarajan RL, Collins SM, Van Willigen JM, Bondada S. The unresponsiveness of aged mice to polysaccharide antigens is a result of a defect in macrophage function. *Journal of Leukocyte Biology* 2005; 77: 503-512.
300. Norden DM, Godbout JP. Microglia of the Aged Brain: Primed to be Activated and Resistant to Regulation. *Neuropathology and applied neurobiology* 2013; 39: 19-34.
301. Lohse N, Hansen A, Pedersen G, et al. SURvival of persons with and without hiv infection in denmark, 1995-2005. *Annals of Internal Medicine* 2007; 146: 87-95.
302. Deeks SG, Phillips AN. HIV infection, antiretroviral treatment, ageing, and non-AIDS related morbidity. *BMJ* 2009; 338.
303. Guaraldi G, Orlando G, Zona S et al. Premature Age-Related Comorbidities Among HIV-Infected Persons Compared With the General Population. *Clinical Infectious Diseases* 2011; 53: 1120-1126.
304. Gamberg J, Pardoe I, Bowmer MI et al. Lack of CD28 expression on HIV-specific cytotoxic T lymphocytes is associated with disease progression. *Immunol Cell Biol* 2004; 82: 38-46.
305. Kalayjian RC, Landay A, Pollard RB et al. Age-Related Immune Dysfunction in Health and in Human Immunodeficiency Virus (HIV) Disease: Association of Age and HIV Infection with Naive CD8+ Cell Depletion, Reduced Expression of CD28 on CD8+ Cells, and Reduced Thymic Volumes. *Journal of Infectious Diseases* 2003; 187: 1924-1933.
306. Thewissen M, Linsen L, Somers V et al. Premature Immunosenescence in Rheumatoid Arthritis and Multiple Sclerosis Patients. *Annals of the New York Academy of Sciences* 2005; 1051: 255-262.
307. Mayo L, Quintana FJ, Weiner HL. The Innate Immune System in Demyelinating Disease. *Immunological reviews* 2012; 248: 170-187.

308. Hamby ME, Hewett JA, Hewett SJ. TGF- β 1 potentiates astrocytic nitric oxide production by expanding the population of astrocytes that express NOS-2. *Glia* 2006; 54: 566-577.
309. Brosnan CF RC. The astrocyte in multiple sclerosis revisited. *Glia* 2013; 61: 453-465.
310. Wang X, Fischer G, Hyvönen M. Structure and activation of pro-activin A. *Nature Communications* 2016; 7: 12052.
311. Agrawal A, Agrawal S, Cao J-N et al. Altered Innate Immune Functioning of Dendritic Cells in Elderly Humans: A Role of Phosphoinositide 3-Kinase-Signaling Pathway. *The Journal of Immunology* 2007; 178: 6912-6922.
312. Bhushan M, Cumberbatch M, Dearman RJ et al. Tumour necrosis factor- α -induced migration of human Langerhans cells: the influence of ageing. *British Journal of Dermatology* 2002; 146: 32-40.
313. Mahad D, Callahan MK, Williams KA et al. Modulating CCR2 and CCL2 at the blood-brain barrier: relevance for multiple sclerosis pathogenesis. *Brain* 2006; 129: 212-223.
314. Kim RY, Hoffman AS, Itoh N et al. Astrocyte CCL2 sustains immune cell infiltration in chronic experimental autoimmune encephalomyelitis. *Journal of Neuroimmunology* 2014; 274: 53-61.
315. Van Der Voorn P, Tekstra J, Beelen RHJ et al. Expression of MCP-1 by Reactive Astrocytes in Demyelinating Multiple Sclerosis Lesions. *The American Journal of Pathology* 1999; 154: 45-51.
316. Rosen SD. Ligands for L-Selectin: Homing, Inflammation, and Beyond. *Annual review of immunology* 2004; 22: 129-156.
317. Schmitt V, Rink L, Uciechowski P. The Th17/Treg balance is disturbed during aging. *Experimental gerontology* 2013; 48: 1379-1386.
318. Lim M-A, Lee J, Park J-S et al. Increased Th17 differentiation in aged mice is significantly associated with high IL-1 β level and low IL-2 expression. *Experimental gerontology* 2014; 49: 55-62.
319. Tabibian-Keissar H, Hazanov L, Schiby G et al. Aging affects B-cell antigen receptor repertoire diversity in primary and secondary lymphoid tissues. *European Journal of Immunology* 2016; 46: 480-492.
320. Piccio L, Naismith RT, Trinkaus K, et al. Changes in b- and t-lymphocyte and chemokine levels with rituximab treatment in multiple sclerosis. *Archives of Neurology* 2010; 67: 707-714.
321. Elahy M, Jackaman C, Mamo JC et al. Blood-brain barrier dysfunction developed during normal aging is associated with inflammation and loss of tight junctions but not with leukocyte recruitment. *Immunity & Ageing* 2015; 12: 2.
322. Hegen H, Auer M, Zeileis A, Deisenhammer F. Upper reference limits for cerebrospinal fluid total protein and albumin quotient based on a large cohort of control patients: implications for increased clinical specificity. In *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine*. 2016; 285.
323. Eickhoff K, Wikström J, Poser S, Bauer H. Protein profile of cerebrospinal fluid in multiple sclerosis with special reference to the function of the blood brain barrier. *J Neurol* 1977; 214.

324. Uttara B, Singh AV, Zamboni P, Mahajan RT. Oxidative Stress and Neurodegenerative Diseases: A Review of Upstream and Downstream Antioxidant Therapeutic Options. *Current Neuropharmacology* 2009; 7: 65-74.
325. Yoshida E MK, Aoki S, Takahashi A, Riku S, Murayama T, Yanagi T, Kato K. Cerebrospinal fluid levels of superoxide dismutases in neurological diseases detected by sensitive enzyme immunoassays. *Journal of the Neurological Sciences* 1994; 124: 25-31.
326. Strand T, Marklund SL. Release of superoxide dismutase into cerebrospinal fluid as a marker of brain lesion in acute cerebral infarction. *Stroke* 1992; 23: 515-518.
327. Olsson J, Wikby A, Johansson B et al. Age-related change in peripheral blood T-lymphocyte subpopulations and cytomegalovirus infection in the very old: the Swedish longitudinal OCTO immune study. *Mechanisms of Ageing and Development* 2001; 121: 187-201.
328. Solana R, Tarazona R, Aiello AE et al. CMV and Immunosenescence: from basics to clinics. *Immunity & Ageing : I & A* 2012; 9: 23-23.
329. Koch S, Larbi A, Özcelik D et al. Cytomegalovirus Infection. *Annals of the New York Academy of Sciences* 2007; 1114: 23-35.
330. Cannon MJ SD, Hyde TB. Review of cytomegalovirus seroprevalence and demographic characteristics associated with infection. *Rev Med Virol* 2010; 20: 202-213.
331. Effros RB. The silent war of CMV in aging and HIV infection. *Mechanisms of Ageing and Development* 2016; 158: 46-52.
332. Rothe K, Quandt D, Schubert K et al. Latent Cytomegalovirus Infection in Rheumatoid Arthritis and Increased Frequencies of Cytolytic LIR-1+CD8+ T Cells. *Arthritis & Rheumatology* 2016; 68: 337-346.
333. Matell H, Lycke J, Svenningsson A et al. Age-dependent effects on the treatment response of natalizumab in MS patients. *Multiple Sclerosis Journal* 2015; 21: 48-56.
334. Longbrake EE, Naismith RT, Parks BJ et al. Dimethyl fumarate-associated lymphopenia: Risk factors and clinical significance. *Multiple sclerosis journal - experimental, translational and clinical* 2015; 1.
335. Fisniku LK, Chard DT, Jackson JS et al. Gray matter atrophy is related to long-term disability in multiple sclerosis. *Annals of Neurology* 2008; 64: 247-254.
336. Lassmann H, van Horssen J, Mahad D. Progressive multiple sclerosis: pathology and pathogenesis. *Nat Rev Neurol* 2012; 8: 647-656.
337. Reynolds R RF, Nicholas R, Radotra B, Gveric D, Howell O. The neuropathological basis of clinical progression in multiple sclerosis. *Acta Neuropathol* 2011; 122: 155-170.
338. Aloisi F, Pujol-Borrell R. Lymphoid neogenesis in chronic inflammatory diseases. *Nat Rev Immunol* 2006; 6: 205-217.
339. Carragher DM, Rangel-Moreno J, Randall TD. Ectopic lymphoid tissues and local immunity. *Seminars in immunology* 2008; 20: 26-42.
340. Buckley CD, Barone F, Nayar S et al. Stromal Cells in Chronic Inflammation and Tertiary Lymphoid Organ Formation. *Annual review of immunology* 2015; 33: 715-745.
341. Chang JE, Turley SJ. Stromal infrastructure of the lymph node and coordination of immunity. *Trends in Immunology* 2015; 36: 30-39.
342. Absinta M, Vuolo L, Rao A et al. Gadolinium-based MRI characterization of leptomeningeal inflammation in multiple sclerosis. *Neurology* 2015; 85: 18-28.

8. ADDENDUM

Neurofilament light chain level is a weak risk factor for the development of MS

OPEN

Georgina Arrambide, MD, PhD*
 Carmen Espejo, PhD*
 Herena Eixarch, PhD
 Luisa M. Villar, PhD
 José C. Alvarez-Cermeño, MD, PhD
 Carmen Picón, MSc
 Jens Kuhle, MD
 Giulio Disanto, MD, PhD
 Ludwig Kappos, MD
 Jaume Sastre-Garriga, MD, PhD
 Deborah Pareto, PhD
 Eva Simon, BSc
 Manuel Comabella, MD, PhD
 Jordi Río, MD, PhD
 Carlos Nos, MD
 Carmen Tur, MD, PhD
 Joaquín Castelló, MD
 Angela Vidal-Jordana, MD
 Ingrid Galán, MD
 Maria J. Arévalo, PhD
 Cristina Auger, MD
 Alex Rovira, MD
 Xavier Montalban, MD, PhD‡
 Mar Tintore, MD, PhD‡

Correspondence to
 Dr. Tintore:
 mtintore@cem-cat.org
 or Dr. Espejo:
 carmen.espejo@vhir.org

Editorial, page 1068

Supplemental data
 at Neurology.org

ABSTRACT

Objective: To determine the prognostic value of selected biomarkers in clinically isolated syndromes (CIS) for conversion to multiple sclerosis (MS) and disability accrual.

Methods: Data were acquired from 2 CIS cohorts. The screening phase evaluated patients developing clinically definite MS (CIS-CDMS) and patients who remained as CIS during a 2-year minimum follow-up (CIS-CIS). We determined levels of neurofascin, semaphorin 3A, fetuin A, glial fibrillary acidic protein, and neurofilament light (NfL) and heavy chains in CSF (estimated mean [95% confidence interval; CI]). We evaluated associations between biomarker levels, conversion, disability, and magnetic resonance parameters. In the replication phase, we determined NfL levels ($n = 155$) using a 900 ng/L cutoff. Primary endpoints in uni- and multivariate analyses were CDMS and 2010 McDonald MS.

Results: The only biomarker showing significant differences in the screening was NfL (CIS-CDMS 1,553.1 [1,208.7–1,897.5] ng/L and CIS-CIS 499.0 [168.8–829.2] ng/L, $p < 0.0001$). The strongest associations were with brain parenchymal fraction change ($r_s = -0.892$) and percentage brain volume change ($r_s = -0.842$) at 5 years. NfL did not correlate with disability. In the replication phase, more NfL-positive patients, according to the cutoff, evolved to MS. Every 100-ng/L increase in NfL predicted CDMS (hazard ratio [HR] = 1.009, 95% CI 1.005–1.014) and McDonald MS (HR = 1.009, 95% CI 1.005–1.013), remaining significant for CDMS in the multivariate analysis (adjusted HR = 1.005, 95% CI 1.000–1.011). This risk was lower than the presence of oligoclonal bands or T2 lesions.

Conclusions: NfL is a weak independent risk factor for MS. Its role as an axonal damage biomarker may be more relevant as suggested by its association with medium-term brain volume changes.

Neurology® 2016;87:1076–1084

GLOSSARY

aHR = adjusted hazard ratio; **BPF** = brain parenchymal fraction; **CDMS** = clinically definite multiple sclerosis; **CI** = confidence interval; **CIS** = clinically isolated syndrome; **CV** = coefficient of variation; **DMT** = disease-modifying treatment; **EDSS** = Expanded Disability Status Scale; **FA** = fetuin A; **Gd** = gadolinium; **GFAP** = glial fibrillary acidic protein; **HR** = hazard ratio; **MS** = multiple sclerosis; **NfH** = neurofilament heavy chain; **NfL** = neurofilament light chain; **OCB** = oligoclonal bands; **PBVC** = percentage brain volume change; **sema3A** = semaphorin 3A; **SIENA** = Structural Image Evaluation, using Normalization, of Atrophy.

Identifying patients with clinically isolated syndromes (CIS) who will present a second attack and determining the degree of disability accrual over the medium- to long-term are crucial goals in multiple sclerosis (MS). Although MRI is the most reliable prognostic marker^{1,2} and oligoclonal bands (OCBs) also have an important role,^{3,4} the disease heterogeneity hinders a more individualized prognosis. Therefore, the search for biomarkers that capture the different aspects

*These authors contributed equally to this work.

‡These authors contributed equally as principal investigators.

From Servei de Neurologia–Neuroimmunologia (G.A., C.E., H.E., J.S.-G., E.S., M.C., J.R., C.N., C.T., J.C., A.V.-J., I.G., M.J.A., X.M., M.T.), Centre d'Esclerosi Múltiple de Catalunya (Cemcat), Vall d'Hebron Institut de Recerca, Hospital Universitari Vall d'Hebron, Barcelona; Universitat Autònoma de Barcelona (G.A., C.E., H.E., J.S.-G., E.S., M.C., J.R., C.N., C.T., J.C., A.V.-J., I.G., X.M., M.T.), Bellaterra; Departments of Neurology and Immunology (L.M.V., J.C.A.-C., C.P.), Multiple Sclerosis Unit, Hospital Ramón y Cajal, Instituto Ramón y Cajal de Investigación Sanitaria (IRYCIS), Madrid, Spain; Department of Neurology (J.K., L.K.), University Hospital Basel; Neurocentre of Southern Switzerland (G.D.), Ospedale Civico, Lugano, Switzerland; and Magnetic Resonance Unit (IDI) (D.P., C.A., A.R.), Hospital Universitari Vall d'Hebron, Barcelona, Spain.

Go to Neurology.org for full disclosures. Funding information and disclosures deemed relevant by the authors, if any, are provided at the end of the article. The Article Processing Charge was paid by the authors.

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.

of MS is still necessary. Although many have been identified, few are currently useful in the clinical setting.⁵ Consequently, we aimed to determine the prognostic value of selected biomarkers for conversion to MS and disability accrual, and to assess their associations with MRI inflammatory activity and neurodegenerative parameters.

METHODS Patients. We acquired longitudinal data from CIS cohorts at the Multiple Sclerosis Center in Vall d'Hebron Hospital, Barcelona,⁶ and the Neurology Department of Ramón y Cajal Hospital, Madrid. Inclusion criteria were age younger than 50 years and baseline clinical evaluation within the first 3 months of disease onset. We recorded baseline demographic and clinical characteristics and conducted follow-up visits every 3 to 6 months, assessing for relapses, clinical worsening, and excluding patients in whom we reached alternative diagnoses. A second attack established the diagnosis of clinically definite MS (CDMS).⁷ Definitions of disability accrual were a sustained increase in the Expanded Disability Status Scale (EDSS) of 1.0 point over 1 year or confirmed EDSS score ≥ 3.0 .

Biological samples. We collected venous blood and CSF within 3 months of disease onset for OCB determination in the 2 hospitals. Remnant samples were aliquoted and stored at -80°C until further use.

MRI acquisition and analysis. At Vall d'Hebron Hospital, brain MRI acquisition on 1.5- or 3.0-tesla superconductive magnets included the following sequences, obtained with a contiguous 3- to 5-mm slice thickness: transverse proton density and T2-weighted conventional or fast spin-echo, transverse and sagittal T2 fluid-attenuated inversion recovery, and unenhanced and contrast-enhanced T1-weighted spin-echo. We included routine baseline spinal cord MRIs in November 2007. Baseline scans were done within 5 months of disease onset and follow-up MRIs at 1 year and every 5 years thereafter.⁶ The Ramón y Cajal cohort followed a similar acquisition protocol, performing baseline and follow-up MRIs within 3 months after the CIS and at 1 year, including spinal cord MRI in case of myelitis.

Neuroradiologists scored T2 lesion number and location, and gadolinium (Gd)-enhancing and new T2 lesion number. T2 lesion volume was calculated using the semiautomated Jim medical image display package (Xinapse Systems, Ltd., Colchester, UK). Brain volume parameters were obtained using the Structural Image Evaluation, using Normalization, of Atrophy (SIENA) software, part of FSL (FMRIB Software Library).⁸ Single-time-point analysis to obtain brain parenchymal fraction (BPF) estimates was performed with SIENAX. Two-time-point analysis was performed with SIENA, estimating the percentage brain volume change (PBVC) between 2 input images of the same subject at different time points.

Biological markers. We selected fetuin A (FA),⁹ semaphorin 3A (sema3A),^{10,11} glial fibrillary acidic protein (GFAP),^{12–15} neurofilament heavy (NfH) and light (NfL) chains,^{13–20} and neurofascin^{21,22} after a PubMed search in 2008, which we updated regularly throughout the study duration, including the terms “biological markers” or “biomarkers” and “multiple sclerosis” or “clinically isolated syndromes.”

Except for NfH, we determined biomarker levels using commercial sandwich ELISA kits according to the manufacturers'

recommendations (FA: BioVendor, Brno, Czech Republic; NfL: UmanDiagnostics AB, Umeå, Sweden; GFAP: Abnova, Taipei City, Taiwan; neurofascin: USCN Life Science Inc., Wuhan, China; and sema3A: USCN Life Science Inc.). We optimized the assays using varying sample dilutions measured in duplicates. NfH levels were determined using an electrochemiluminescence-based solid-phase sandwich immunoassay¹⁷ at the University Hospital Basel, Switzerland, selected among different assays for its higher sensitivity.^{18,23,24} All samples were tested blinded to clinical data and outcome measures. Whenever possible according to availability, we tested samples from the same patients using a different, unfrozen aliquot.

Experimental design. Screening phase. We selected 2 opposite groups with a 2-year minimum follow-up from the Vall d'Hebron cohort: CIS-CDMS (n = from 33 to 38), including patients with 3 to 4 Barkhof-Tintore criteria on baseline MRI and presence of OCBs who converted to CDMS; and CIS-CIS (n = from 33 to 39), comprising patients with 0 Barkhof-Tintore criteria and absence of OCBs who remained as CIS (figure e-1A at Neurology.org).

Replication phase. Only NfL levels showed significant differences in the screening and were thus evaluated in a replication phase. We selected consecutive patients with available CSF samples from the Vall d'Hebron and Ramón y Cajal cohorts (n = 155). Patients from Vall d'Hebron were selected from a different time range (2009–2011) than the NfL screening phase because of sample availability. NfL determination was performed in each hospital separately using the above-mentioned assay (figure e-1B).

Statistical analysis. We performed parametric and nonparametric descriptive statistics depending on the normality of the distributions of the continuous variables.

Screening phase. For each biomarker, we calculated sample size for 80% power at the 0.05 level of significance based on previous data. We used generalized linear models to compare CIS groups in terms of conversion to CDMS and assess biomarker levels and disability accrual, with the Bonferroni correction for multiple comparisons when applicable. Data are reported as the estimated mean (95% confidence interval [CI]). Potential covariates were age, sex, CIS topography, time from CIS to lumbar puncture, sample storage time, and disease-modifying treatment (DMT) before CDMS. We calculated Spearman correlations for MRI inflammatory activity parameters at baseline, 1, and 5 years (number of T2, Gd-enhancing, and new T2 lesions; T2 lesion volume), and partial correlations for neurodegenerative parameters at 1 and 5 years of follow-up (BPF change [BPF Δ] adjusted for age and baseline Gd-enhancing lesions, and PBVC). We calculated BPF Δ by subtracting baseline from 1- and 5-year follow-up SIENAX estimates and dividing by the baseline values, then multiplying by 100. We assessed the PBVC estimated by SIENA for changes from baseline to 1 and 5 years. Finally, we assessed Spearman correlations between NfL and NfH levels in a subgroup of 42 patients with determination of both biomarkers.

Replication phase. Primary endpoints were conversion to CDMS and 2010 McDonald MS according to NfL status (positive/negative) based on a 900 ng/L cutoff value, established as the mean ± 3 SD of NfL levels in a control group of patients with noninflammatory neurologic diseases.²⁵ We performed uni- and multivariate Cox proportional hazard regression analyses for NfL levels as a continuous or dichotomic variable. Covariates were OCBs, baseline T2 lesion number, DMT before MS, and hospital where NfL levels were determined. We used generalized linear models to compare NfL levels in terms of disability accrual (EDSS score ≥ 3.0), and Spearman correlations or generalized linear models to determine associations between NfL and MRI inflammatory parameters at baseline and 1 year. We could not assess brain volume

changes because of the few estimated measures at the time of the analysis.

We performed statistical tests on the 0.05 level of significance, using the IBM SPSS Statistics (version 20.0; IBM Corp., Armonk, NY). We also prepared figures using GraphPad Prism 5.02 for Windows (GraphPad Software, La Jolla, CA).

Standard protocol approvals, registrations, and patient consents. This study received approval from the corresponding local ethical committees in both hospitals and all patients signed a written informed consent.

RESULTS Screening phase. Appendix e-1A describes preliminary analyses. Baseline demographic and clinical characteristics were comparable between CIS groups (table 1) except for the higher frequency of optic neuritis in CIS-CIS regarding FA, NfL, and NfH. The proportion of patients on DMT before CDMS varied between 8.8% and 17.7% for each biomarker. Mean follow-up was longer for CIS-CDMS than CIS-CIS tested for GFAP and NfH. The differences in storage time between CIS-CDMS and CIS-CIS samples for NfH did not correlate with this biomarker's levels ($r_s = -0.131, p = 0.256$). NfH levels correlated with age ($r_s = 0.230, p = 0.044$). We found no differences in time from CIS to lumbar puncture. Therefore, for each protein, we adjusted the analyses for age, topography, and/or DMT.

FA, GFAP, and NfH results were negative (figure e-2, A–C). We could not detect neurofascin and sema3A.

As for NfL levels, we found a significant difference between CIS-CDMS (1,553.1 [1,208.7–1,897.5] ng/L) and CIS-CIS (499.0 [168.8–829.2] ng/L) ($p < 0.0001$) (figure 1). The average intra- and interplate coefficients of variation (CVs) were 9.7% and 0.5%, respectively. We found no significant differences for EDSS progression of 1 point or ≥ 3.0 , even though in the latter case, NfL levels were 1,506.1 (645.2–2,367.1) ng/L in the 15 patients with EDSS score ≥ 3.0 and 906.6 (693.2–1,120.1) ng/L if < 3.0 ($p = 0.185$). We found significant correlations between NfL levels and inflammatory activity parameters on MRI, except for Gd-enhancing lesions at 5 years (table 2). As for neurodegenerative parameters, NfL and both BPFΔ and PBVC at 5 years showed the strongest correlations (table 2, figure 2).

Finally, we found a correlation between NfL and NfH levels ($r_s = 0.466, p = 0.002$).

Replication phase. Appendix e-1B describes preliminary analyses. Baseline demographic and clinical characteristics are shown in table e-1. Median (interquartile range) NfL levels were 1,238.3 (1,782.1) ng/L for patients converting to CDMS and 555.8 (825.5) ng/L for CIS-CIS. Average intra- and interplate CV were 4.9% and 7.0% at Vall d'Hebron ($n = 93$) and 5.1% and 8.8% at Ramón y Cajal ($n = 62$).

According to the cutoff, 63 patients (40.6%) were NfL positive. Significantly more NfL-positive patients

Table 1 Demographic and clinical characteristics

	FA and NfL (2010) ^a		GFAP (2011)		NfH (2012)	
	CIS-CDMS	CIS-CIS	CIS-CDMS	CIS-CIS	CIS-CDMS	CIS-CIS
No.	35	33	33	33	38	39
Mean age (SD), y	29.3 (7.3)	30.1 (9.7)	30.7 (8.0)	30.4 (8.2)	30.7 (7.5)	31.6 (8.2)
Females, n (%)	24 (68.6)	26 (78.8)	21 (63.6)	24 (72.7)	28 (73.7)	32 (82.1)
Mean follow-up (SD), ^b mo	78.8 (33.4)	57.9 (35.2)	79.1 (36.2)	43.7 (50.0)	104.3 (31.1)	74.3 (36.4)
CIS topography, n (%) ^c						
Optic nerve	10 (28.6)	22 (66.7)	11 (33.3)	20 (60.6)	10 (26.3)	24 (61.5)
Brainstem	9 (25.7)	5 (15.2)	7 (21.2)	7 (21.2)	8 (21.1)	4 (10.3)
Spinal cord	11 (31.4)	4 (12.1)	10 (30.3)	4 (12.1)	14 (36.8)	3 (7.7)
Other	5 (14.3)	2 (6.1)	5 (15.2)	2 (6.1)	6 (15.8)	8 (20.5)
Mean time from CIS to lumbar puncture (SD), d	58.9 (53.5)	80.1 (72.3)	184.4 (534.1)	199.7 (303.6)	57.1 (52.5)	81.1 (169.2)
Frozen samples mean storage time (SD), ^d mo	88.5 (34.1)	80.2 (33.5)	91.5 (34.5)	75.0 (44.3)	113.1 (33.7)	97.6 (40.5)

Abbreviations: CDMS = clinically definite multiple sclerosis; CIS = clinically isolated syndrome; FA = fetuin A; GFAP = glial fibrillary acidic protein; NfH = neurofilament heavy chain; NfL = neurofilament light chain.

The screening phase was performed between 2010 and 2012. Categorical variables: χ^2 test. Continuous variables: Student t test for 2 groups, analysis of variance for multiple comparisons.

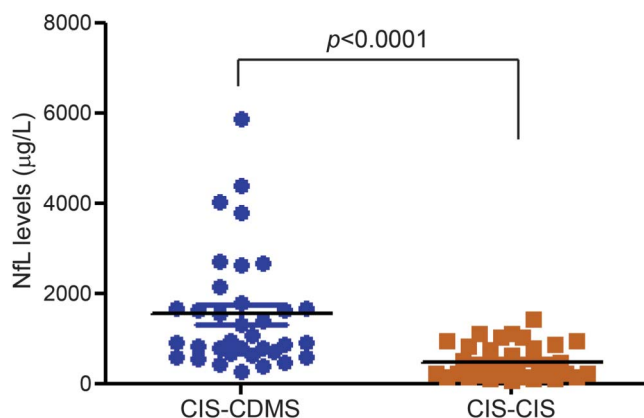
^a Years in parentheses show the time when each biomarker was tested. Samples were obtained between 1995 and 2008 for FA, NfL, and GFAP, and between 1995 and 2009 for NfH. CSF samples were aliquoted and stored at -80°C until their use.

^b FA and NfL: $p = 0.050$; GFAP: $p = 0.002$; NfH: $p < 0.0001$.

^c FA and NfL: $p = 0.017$; NfH: $p = 0.002$; GFAP: $p = 0.099$.

^d NfH levels: $p = 0.037$.

Figure 1 NfL levels in the 2 CIS groups



Results adjusted for CIS topography and disease-modifying treatment. CDMS = clinically definite multiple sclerosis; CIS = clinically isolated syndrome; NfL = neurofilament light chain.

converted to CDMS or fulfilled McDonald MS over time (data not shown).

When evaluating NfL levels as a continuous variable in the univariate analyses, we observed a 1-point increase in risk of both CDMS and McDonald MS for every 100-ng/L increment. The adjusted hazard ratio (aHR) for CDMS remained significant in the multivariate analysis (table 3).

As for NfL status, NfL positivity was a predictor of CDMS (HR 2.279, 95% CI 1.283–4.049, $p = 0.005$) and McDonald MS (HR 2.801, 95% CI 1.761–4.455, $p < 0.0001$) in the univariate analyses; however, this significance was lost in the multivariate models (aHR 1.220, 95% CI 0.656–2.269, $p = 0.530$ and aHR 1.347, 95% CI 0.809–2.244, $p = 0.252$, respectively).

Regarding disability, although NfL levels were 2,635.6 (1,226.4–4,044.8) ng/L in the 11 patients with EDSS score ≥ 3.0 and 1,560.5 (934.8–2,186.2) ng/L if < 3.0 , this difference was not statistically significant ($p = 0.172$).

Finally, we found significant correlations between NfL levels and T2 lesion volume and Gd-enhancing lesion number on baseline MRIs ($n = 63$, $r_s = 0.517$,

$p < 0.0001$ and $n = 146$, $r_s = 0.469$, $p < 0.0001$, respectively) and follow-up MRIs ($n = 36$, $r_s = 0.420$, $p = 0.011$ for new T2 lesion volume and $n = 94$, $r_s = 0.231$, $p = 0.025$ for Gd-enhancing lesions). Higher NfL levels were associated with a higher T2 lesion number at baseline and 1 year (data not shown).

DISCUSSION In the screening phase, we aimed to identify differences in biomarker levels under the rationale that, if none were found between 2 opposite CIS groups,²⁶ none would be found in consecutive patients, a scenario that better resembles clinical practice. In addition, this phase allows a strict use of biological samples. Only NfL levels were significantly higher in patients who converted to MS compared to nonconverters. Neurofilaments are type IV intermediate filaments specific for neurons, released into the CSF when axonal damage occurs.^{16,27,28} A study with 38 patients reported higher NfL levels in CIS-CDMS compared to CIS-CIS,¹⁸ a finding unconfirmed in other investigations including 9 to 36 patients per group.^{20,29,30} Such discrepancies could be attributable to a small sample size in the converter group,^{20,30} homogeneity in baseline inflammatory parameters such as proportion of OCBs present in both CIS groups,²⁹ or the method used to detect NfL.³⁰ In addition, sample size calculations are not referred and some groups may be too small to properly demonstrate any differences. Our study was adequately powered and thus confirms the differences with a well-balanced distribution between groups.

We found no associations between NfL levels and disability by the EDSS. Except for one, most studies showed significant correlations, but the analyses included CIS and other MS phenotypes, observing the strongest correlations in progressive forms.^{13,14,18,31–33} Khalil et al.²⁰ evaluated 67 patients with CIS exclusively and found a marginal correlation coefficient of $r_s = 0.324$ ($p < 0.05$). When assessing NfL levels according to EDSS score ≥ 3.0 in both phases, they were higher in patients with more severe disability but the difference was not significant, a finding probably influenced by the few patients who reached such EDSS score.

Table 2 Correlations between baseline neurofilament light chain levels and MRI measures at baseline, 1 year, and 5 years: Screening phase

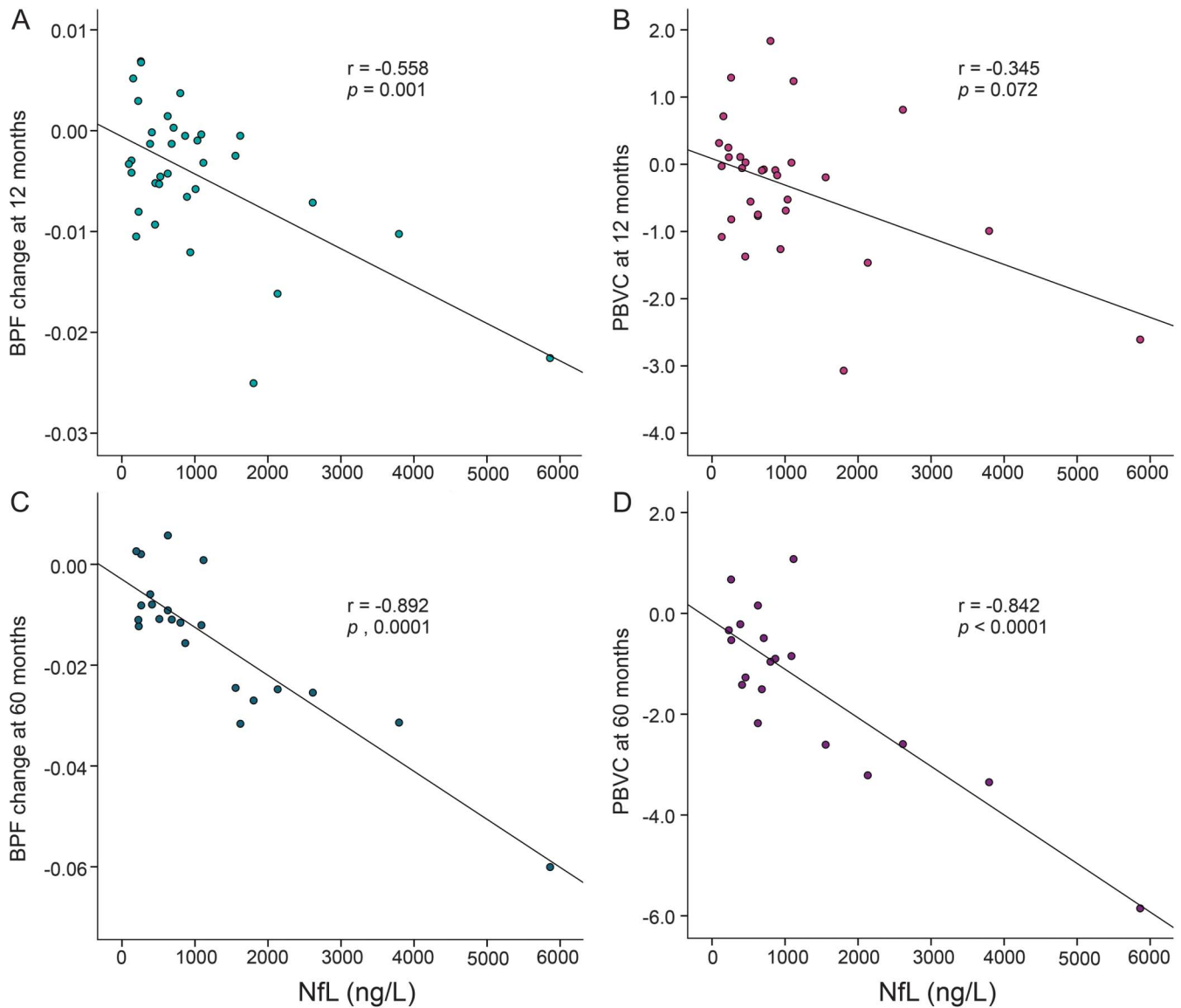
	Baseline			Year 1						Year 5					
	T2LN	T2LV	Gd+	T2LN	T2LV	T2New	Gd+	BPFΔ	PBVC	T2LN	T2LV	T2New	Gd+	BPFΔ	PBVC
No. ^a	39	39	39	38	38	40	38	33	30	21	21	23	22	21	18
r^b	0.595	0.617	0.538	0.619	0.649	0.492	0.456	-0.558	-0.345	0.570	0.609	0.589	0.167	-0.892	-0.842
p Value	<0.0001	<0.0001	<0.0001	<0.0001	<0.0001	0.001	0.004	0.001	0.072	0.007	0.003	0.003	0.456	<0.0001	<0.0001

Abbreviations: BPFΔ = brain parenchymal fraction percentage change; Gd+ = number of gadolinium-enhancing lesions; PBVC = percentage brain volume change; T2LN = T2 lesion number; T2LV = T2 lesion volume; T2New = number of new T2 lesions.

^aData assessed in MRI scans performed from 2001.

^bMRI inflammatory measures assessed with Spearman correlation. BPFΔ and PBVC values correspond to partial correlations adjusted for age and Gd+ lesions at baseline.

Figure 2 Scatterplots showing the correlations between NfL levels and brain volume changes



The graphs represent the raw data. The correlation coefficients and p values correspond to the partial correlations adjusted for age and baseline gadolinium-enhancing lesions. (A) BPF change at 1 year. (B) PBVC at 1 year. (C) BPF change at 5 years. (D) PBVC at 5 years. BPF = brain parenchymal fraction; NfL = neurofilament light chain; PBVC = percentage brain volume change.

We observed significant associations between NfL and MRI inflammatory parameters on baseline and follow-up MRIs, with similar findings during the replication phase. Regarding Gd-enhancing lesions, in the screening, we found correlations with NfL levels at baseline and 1 year, observed again in the replication phase, but not at 5 years. There are previous reports of correlations with T2 lesion number and Gd-enhancing lesions in CIS and/or MS groups,^{18,25} unconfirmed in other CIS-specific studies.^{20,34} The most striking findings concern MRI neurodegenerative parameters: our results suggest baseline NfL levels increase not only in association with lesion load, accrual, and activity, but also independently of these parameters.^{35,36} On the contrary, a previous study did

not find any correlations between NfL levels and brain volume change in CIS.²⁰ Although the authors did adjust for age and used the SIENA software, they assessed the follow-up only at 1 year and did not control by Gd-enhancing lesions. We additionally evaluated the association between baseline NfL levels and brain volume changes at 5 years. Our findings are partly supported by those of Burman et al.,¹⁵ in which NfL levels were elevated irrespective of Gd-enhancing lesions in progressive MS. Unfortunately, our appraisal is limited: our sample size was small and we were unable to repeat this evaluation in the replication phase. However, by estimating both BPF Δ and PBVC, the latter a robust method, we believe our results are reliable and should be assessed in future studies.

Table 3 Uni- and multivariate analyses for CDMS and 2010 McDonald MS with NfL as a continuous variable

	p Value	HR/aHR ^a	95% CI
Conversion to CDMS			
Univariate analysis			
DMT ^b	0.701	1.126	0.615-2.062
Hospital	0.063	1.722	0.971-3.052
NfL-100 ^c	<0.0001	1.009	1.005-1.014
OCBs	<0.0001	6.074	2.580-14.300
T2 lesions 1-3	0.047	8.537	1.026-71.004
T2 lesions ≥4	0.002	21.709	2.982-158.026
Multivariate analysis^d			
NfL-100	0.040	1.005	1.000-1.011
OCBs	0.048	2.597	1.009-6.683
T2 lesions 1-3	0.071	7.225	0.843-61.920
T2 lesions ≥4	0.022	11.469	1.432-91.868
2010 McDonald criteria			
Univariate analysis			
DMT	0.292	0.736	0.416-1.302
NfL-100	<0.0001	1.009	1.005-1.013
Hospital ^e	0.001	2.232	1.404-3.546
OCBs	<0.0001	8.427	4.189-16.951
T2 lesions 1-3	0.020	11.842	1.480-94.741
T2 lesions ≥4	<0.0001	52.103	7.220-375.983
Multivariate analysis^f			
NfL-100	0.155	1.004	0.999-1.008
OCBs	0.012	2.669	1.236-5.762
T2 lesions 1-3	0.036	9.593	1.165-79.034
T2 lesions ≥4	0.002	25.676	3.347-196.974

Abbreviations: aHR = adjusted hazard ratio; CDMS = clinically definite multiple sclerosis; CI = confidence interval; DMT = disease-modifying treatment; HR = hazard ratio; NfL = neurofilament light chain; OCB = oligoclonal bands.

^a Univariate analyses: HR; multivariate analyses: aHR.

^b DMT: before conversion to CDMS or fulfillment of the 2010 McDonald criteria.

^c HR increase for every 100 ng/L.

^d Results were not modified before and after adjusting for DMT.

^e Higher risk of McDonald MS for cases from Ramón y Cajal Hospital.

^f Results adjusted for hospital and DMT. When only adjusting for hospital, aHR for NfL remained similar (aHR 1.004, 95% CI 0.999-1.009) but with a *p* value of 0.081.

Of note, there was a significant correlation between NfL and NfH levels, in accordance with previous publications on CIS and relapsing-remitting MS,^{18,20,31} although contrary to our results, some of these studies demonstrated associations between NfH and EDSS or MRI parameters.^{18,20} Thus, the origin of this correlation in our study is a matter of debate and deserves further study.

In the replication phase, considering that a dichotomic biomarker could be more useful in the clinical practice, we explored a 900 ng/L cutoff,²⁵ observing that more NfL-positive than -negative patients evolved

to CDMS and McDonald MS. Two other studies explored cutoff values to either identify relapses or predict evolution to secondary progressive MS.^{13,37} Their cutoff values, however, are lower than ours, a finding possibly related not only to the different outcomes but also to the use of a different assay,¹³ or the calculation methods based on NfL levels in patients with MS,^{13,37} whereas we established our cutoff using a control group with noninflammatory neurologic diseases under the rationale that this value would be more stable across studies. To assess whether this is a better approach, the cutoff should be evaluated in other cohorts. One study explored NfL levels and fulfillment of the 2010 dissemination in space criteria in optic neuritis,³⁴ whereas we used the cutoff value to investigate the risk of developing both CDMS and 2010 McDonald MS at the time of a CIS. Another contribution is the assessment of NfL as an independent risk factor for MS. In the univariate analyses, we found a higher risk of CDMS and McDonald MS for every 100-ng/L increase in NfL levels, maintained for CDMS in the multivariate analysis. The nonsignificant results for McDonald MS could be conditioned by the distribution of patients over the different categories in the multivariate analysis, the correlations between NfL levels and T2 lesions, and the strong predictive value of T2 lesions for dissemination in space fulfillment. When assessing NfL status, the increased risk of both CDMS and McDonald MS in the univariate analyses was lost in the multivariate models. Thus, although NfL status could be more practical in the clinical setting, in our study, only NfL as a continuous variable is an independent risk factor for CDMS. Nevertheless, the value of NfL should be considered in context with OCB and T2 lesion results and, according to a recent study, it could be considered a weak risk factor for MS.⁶

Despite conducting measures to minimize bias, a limitation in the replication phase concerns the NfL determination in 2 different centers. Although the corresponding intra- and interplate CVs were within the assay's standardized limits, we did not perform quality controls such as testing the same samples in both centers.³⁸ Besides, the shorter follow-up of the Vall d'Hebron cohort in the replication phase may preclude excluding patients with potential alternative diagnoses; nevertheless, the specific inclusion of typical CIS presentations lowers this risk.⁶ Furthermore, a shortcoming of NfL levels is their determination in CSF because some centers do not perform lumbar punctures routinely. It is impossible to quantify serum NfL levels with the available ELISA^{29,30}; however, a new electrochemiluminescence array showed promising results in detecting higher serum NfL levels in patients with CIS compared to healthy controls.³⁹

Our biomarker list was probably not thoroughly comprehensive. We did, however, search for updates

throughout the study duration. Besides, the properties of the selected assays could have influenced our findings. Another limitation is the difficulty in assessing all biomarkers in the same patients without compromising the sample size given the limited CSF aliquot availability. Nevertheless, the homogeneous data collection and systematic sample storage procedures could aid to minimize bias. Finally, we did not compare the NfH electrochemiluminescence assay to other methods.

Therefore, elevated NfL levels indicate a higher risk of evolving to MS. However, the increase in risk for every 100 ng/L could be difficult to interpret in the daily clinical practice and, compared to OCBs and T2 lesions, NfL levels are a weak risk factor for MS. The search for a cutoff value should be assessed in other cohorts and, finally, the value of NfL as a marker of axonal damage may be more relevant as suggested by the correlations with medium-term brain volume loss.

AUTHOR CONTRIBUTIONS

Georgina Arrambide participated in the design of the work and on the acquisition, statistical analysis, and interpretation of data for the work, drafted and revised it, approved the present version to be published, and agreed to be accountable for all aspects of the work. Carmen Espejo participated in the design of the work and on the analysis and interpretation of data for the work, drafted and revised it for important intellectual content, approved the present version to be published, and agreed to be accountable for all aspects of the work. Herena Eixarch participated in the analysis and interpretation of data for the work, drafted and revised it for important intellectual content, approved the present version to be published, and agreed to be accountable for all aspects of the work. Luisa M. Villar participated in the acquisition, analysis, and interpretation of data for the work, revised it for important intellectual content, approved the present version to be published, and agreed to be accountable for all aspects of the work. José C. Alvarez-Cermeño participated in the acquisition, analysis, and interpretation of data for the work, revised it for important intellectual content, approved the present version to be published, and agreed to be accountable for all aspects of the work. Carmen Picón participated in the acquisition and analysis of data for the work, revised it for important intellectual content, approved the present version to be published, and agreed to be accountable for all aspects of the work. Jens Kuhle participated in the acquisition, analysis, and interpretation of data for the work, revised it for important intellectual content, approved the present version to be published, and agreed to be accountable for all aspects of the work. Giulio Disanto participated in the acquisition and analysis of data for the work, revised it for important intellectual content, approved the present version to be published, and agreed to be accountable for all aspects of the work. Ludwig Kappos participated in the analysis and interpretation of data for the work, revised it for important intellectual content, approved the present version to be published, and agreed to be accountable for all aspects of the work. Jaume Sastre-Garriga participated in the design and acquisition, analysis, and interpretation of data for the work, revised it for important intellectual content, approved the present version to be published, and agreed to be accountable for all aspects of the work. Deborah Pareto participated in the acquisition, analysis, and interpretation of data for the work, revised it for important intellectual content, approved the present version to be published, and agreed to be accountable for all aspects of the work. Eva Simon participated in the acquisition of data for the work, revised it for important intellectual content, approved the present version to be published, and agreed to be accountable for all aspects of the work. Manuel Comabella participated in the acquisition and interpretation of data for the work, revised it for important intellectual content, approved the present version to be published, and agreed to be accountable for all aspects of the work. Jordi Río participated in the acquisition and interpretation of data for the

work, revised it for important intellectual content, approved the present version to be published, and agreed to be accountable for all aspects of the work. Carlos Nos participated in the interpretation of data for the work, revised it for important intellectual content, approved the present version to be published, and agreed to be accountable for all aspects of the work. Carmen Tur participated in the acquisition and interpretation of data for the work, revised it for important intellectual content, approved the present version to be published, and agreed to be accountable for all aspects of the work. Joaquín Castelló participated in the acquisition and interpretation of data for the work, revised it for important intellectual content, approved the present version to be published, and agreed to be accountable for all aspects of the work. Angela Vidal-Jordana participated in the acquisition and interpretation of data for the work, revised it for important intellectual content, approved the present version to be published, and agreed to be accountable for all aspects of the work. Ingrid Galán participated in the acquisition and interpretation of data for the work, revised it for important intellectual content, approved the present version to be published, and agreed to be accountable for all aspects of the work. María J. Arévalo participated in the acquisition of data for the work, revised it for important intellectual content, approved the present version to be published, and agreed to be accountable for all aspects of the work. Cristina Auger participated in the analysis and interpretation of data for the work, revised it for important intellectual content, approved the present version to be published, and agreed to be accountable for all aspects of the work. Alex Rovira participated in the analysis and interpretation of data for the work, revised it for important intellectual content, approved the present version to be published, and agreed to be accountable for all aspects of the work. Xavier Montalban participated in the conception and design of the work and on the acquisition, analysis, and interpretation of data for the work, revised it for important intellectual content, approved the present version to be published, and agreed to be accountable for all aspects of the work. Mar Tintore participated in the conception and design of the work and on the acquisition, analysis, and interpretation of data for the work, revised it for important intellectual content, approved the present version to be published, and agreed to be accountable for all aspects of the work.

ACKNOWLEDGMENT

The authors thank Xavier Vidal for statistical analysis support (Department of Pharmacology, Vall d'Hebron University Hospital, Barcelona, Spain), the Red Española de Esclerosis Múltiple (REEM) (RD07/0060; RD12/0032) sponsored by the Fondo de Investigación Sanitaria (FIS), the Instituto de Salud Carlos III, the Ministry of Economy and Competitiveness in Spain, and the Ajuts per donar Suport als Grups de Recerca de Catalunya (2009 SGR 0793; 2014 SGR 1082) sponsored by the Agència de Gestió d'Ajuts Universitaris i de Recerca (AGAUR) of the Generalitat de Catalunya in Spain.

STUDY FUNDING

This project was supported by FIS PI08/0788 and PI12/01313 from the FIS of the Ministry of Economy and Competitiveness of Spain, and by a McDonald Fellowship awarded to Georgina Arrambide by the MSIF. Carmen Espejo is partially supported by the Miguel Servet program (CP07/00146; CP13/00028), Herena Eixarch is supported by the Sara Borrell program (CD09/0363), and Angela Vidal-Jordana received support for research training contracts Rio Hortega (CM10/00032), all from the FIS, Instituto de Salud Carlos III, Ministry of Economy and Competitiveness of Spain. Jens Kuhle was supported by an ECTRIMS Research Fellowship Programme and by the Forschungsfonds of the University of Basel, Switzerland.

DISCLOSURE

G. Arrambide has received compensation for consulting services from Biogen Idec and research support from Novartis. C. Espejo and H. Eixarch report no disclosures relevant to the manuscript. L. Villar has received speaking honoraria or research support from Bayer Schering Pharma, Merck Serono, Biogen Idec, Teva Pharmaceuticals, Sanofi-Aventis, Genzyme, and Novartis. J. Alvarez-Cermeño has received compensation for consulting services and speaking honoraria from Bayer Schering Pharma, Merck Serono, Biogen Idec, Teva Pharmaceuticals,

Sanofi-Aventis, and Novartis. C. Picón reports no disclosures relevant to the manuscript. J. Kuhle has received research support from the Swiss MS Society, Swiss ALS Society, Protagen AG, Roche, Genzyme, and Novartis and served on scientific advisory boards for Genzyme/Sanofi-Aventis, Merck Serono, and Novartis Pharma. G. Disanto reports no disclosures relevant to the manuscript. L. Kappos has received and dedicated to research support fees for board membership, consultancy or speaking, or grants in the last 3 years from Actelion, Advancell, Allozyne, Bayer, Bayhill, Biogen Idec, BioMarin, CSL Behring, Eli Lilly, European Union, GeNeuro, Genmab, Gianni Rubatto Foundation, Glenmark, Merck Serono, MediciNova, Mitsubishi Pharma, Novartis, Novartis Research Foundation, Novo Nordisk, Peptimmune, Roche, Roche Research Foundation, Sanofi-Aventis, Santhera, Swiss MS Society, Swiss National Research Foundation, Teva, UCB, and Wyeth. J. Sastre-Garriga has received compensation for participating on advisory boards, speaking honoraria and travel expenses for scientific meetings, consulting services or research support from Novartis, Biogen Idec, Sanofi-Aventis, Teva, Serono Symposia International Foundation, Merck Serono, Almirall, and Genzyme. D. Pareto and E. Simon report no disclosures relevant to the manuscript. M. Comabella has received compensation for consulting services and speaking honoraria from Bayer Schering Pharma, Merck Serono, Biogen Idec, Teva Pharmaceuticals, Sanofi-Aventis, and Novartis. J. Río has received speaking honoraria and personal compensation for participating on advisory boards from Almirall, Bayer Schering Healthcare, Biogen Idec, Genzyme, Merck Serono, Novartis, Teva, and Sanofi-Aventis. C. Nos, C. Tur, J. Castelló, A. Vidal-Jordana, I. Galán, M. Arévalo, and C. Auger report no disclosures relevant to the manuscript. A. Rovira serves on scientific advisory boards for Neuro-Tec and on the editorial board of the *American Journal of Neuroradiology* and *Neuroradiology*, has received speaker honoraria from Bayer Schering Pharma, Sanofi-Aventis, Bracco, Merck Serono, Teva Pharmaceutical Industries Ltd., and Biogen Idec, receives research support from Bayer Schering Pharma, and serves as a consultant for Novartis. X. Montalban has received speaking honoraria and travel expenses for scientific meetings, has been a steering committee member of clinical trials or participated in advisory boards of clinical trials in the past with Almirall, Bayer, Biogen, Genzyme, Merck, Novartis, Receptos, Roche, Sanofi Genzyme, and Teva Pharmaceuticals. M. Tintore has received compensation for consulting services and speaking honoraria from Bayer Schering Pharma, Merck Serono, Biogen Idec, Teva Pharmaceuticals, Sanofi-Aventis, Novartis, Almirall, Genzyme, and Roche. Go to Neurology.org for full disclosures.

Received August 3, 2015. Accepted in final form April 14, 2016.

REFERENCES

1. Fisniku LK, Brex PA, Altmann DR, et al. Disability and T2 MRI lesions: a 20-year follow-up of patients with relapse onset of multiple sclerosis. *Brain* 2008;131:808–817.
2. Polman CH, Reingold SC, Banwell B, et al. Diagnostic criteria for multiple sclerosis: 2010 revisions to the McDonald criteria. *Ann Neurol* 2011;69:292–302.
3. Tintore M, Rovira A, Río J, et al. Do oligoclonal bands add information to MRI in first attacks of multiple sclerosis? *Neurology* 2008;70:1079–1083.
4. Masjuan J, Alvarez-Cermeno JC, Garcia-Barragan N, et al. Clinically isolated syndromes: a new oligoclonal band test accurately predicts conversion to MS. *Neurology* 2006;66:576–578.
5. Comabella M, Montalban X. Body fluid biomarkers in multiple sclerosis. *Lancet Neurol* 2014;13:113–126.
6. Tintore M, Rovira A, Río J, et al. Defining high, medium and low impact prognostic factors for developing multiple sclerosis. *Brain* 2015;138:1863–1874.
7. Poser CM, Paty DW, Scheinberg L, et al. New diagnostic criteria for multiple sclerosis: guidelines for research protocols. *Ann Neurol* 1983;13:227–231.
8. Smith SM, Jenkinson M, Woolrich MW, et al. Advances in functional and structural MR image analysis and

implementation as FSL. *Neuroimage* 2004;23(suppl 1):S208–S219.

9. Tumani H, Lehmsiek V, Rau D, et al. CSF proteome analysis in clinically isolated syndrome (CIS): candidate markers for conversion to definite multiple sclerosis. *Neurosci Lett* 2009;452:214–217.
10. Williams A, Piaton G, Aigrot MS, et al. Semaphorin 3A and 3F: key players in myelin repair in multiple sclerosis? *Brain* 2007;130:2554–2565.
11. Eixarch H, Gutierrez-Franco A, Montalban X, Espejo C. Semaphorins 3A and 7A: potential immune and neuroregenerative targets in multiple sclerosis. *Trends Mol Med* 2013;19:157–164.
12. Petzold A, Eikelenboom MJ, Gveric D, et al. Markers for different glial cell responses in multiple sclerosis: clinical and pathological correlations. *Brain* 2002;125:1462–1473.
13. Malmstrom C, Haghighi S, Rosengren L, Andersen O, Lycke J. Neurofilament light protein and glial fibrillary acidic protein as biological markers in MS. *Neurology* 2003;61:1720–1725.
14. Norgren N, Sundstrom P, Svenningsson A, Rosengren L, Stigbrand T, Gunnarsson M. Neurofilament and glial fibrillary acidic protein in multiple sclerosis. *Neurology* 2004;63:1586–1590.
15. Burman J, Zetterberg H, Fransson M, Loskog AS, Raininko R, Fagius J. Assessing tissue damage in multiple sclerosis: a biomarker approach. *Acta Neurol Scand* 2014;130:81–89.
16. Petzold A. Neurofilament phosphoforms: surrogate markers for axonal injury, degeneration and loss. *J Neurol Sci* 2005;233:183–198.
17. Kuhle J, Regeniter A, Leppert D, et al. A highly sensitive electrochemiluminescence immunoassay for the neurofilament heavy chain protein. *J Neuroimmunol* 2010;220:114–119.
18. Teunissen CE, Iacobaeus E, Khademi M, et al. Combination of CSF N-acetylaspartate and neurofilaments in multiple sclerosis. *Neurology* 2009;72:1322–1329.
19. Kuhle J, Leppert D, Petzold A, et al. Neurofilament heavy chain in CSF correlates with relapses and disability in multiple sclerosis. *Neurology* 2011;76:1206–1213.
20. Khalil M, Enzinger C, Langkammer C, et al. CSF neurofilament and N-acetylaspartate related brain changes in clinically isolated syndrome. *Mult Scler* 2013;19:436–442.
21. Mathey EK, Derfuss T, Storch MK, et al. Neurofascin as a novel target for antibody-mediated axonal injury. *J Exp Med* 2007;204:2363–2372.
22. Kawamura N, Yamasaki R, Yonekawa T, et al. Anti-neurofascin antibody in patients with combined central and peripheral demyelination. *Neurology* 2013;81:714–722.
23. Shaw G, Yang C, Ellis R, et al. Hyperphosphorylated neurofilament NF-H is a serum biomarker of axonal injury. *Biochem Biophys Res Commun* 2005;336:1268–1277.
24. Petzold A, Keir G, Green AJ, Giovannoni G, Thompson EJ. A specific ELISA for measuring neurofilament heavy chain phosphoforms. *J Immunol Methods* 2003;278:179–190.
25. Villar LM, Picon C, Costa-Frossard L, et al. Cerebrospinal fluid immunological biomarkers associated with axonal damage in multiple sclerosis. *Eur J Neurol* 2015;22:1169–1175.
26. Comabella M, Fernandez M, Martin R, et al. Cerebrospinal fluid chitinase 3-like 1 levels are associated with conversion to multiple sclerosis. *Brain* 2010;133:1082–1093.
27. Nylen K, Csajbok LZ, Ost M, et al. CSF-neurofilament correlates with outcome after aneurysmal subarachnoid hemorrhage. *Neurosci Lett* 2006;404:132–136.

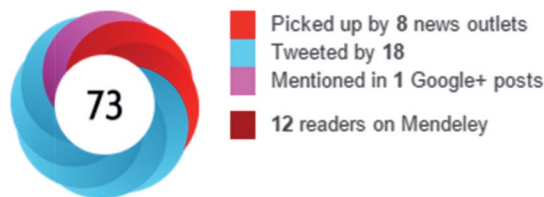
28. Petzold A, Keir G, Warren J, Fox N, Rossor MN. A systematic review and meta-analysis of CSF neurofilament protein levels as biomarkers in dementia. *Neurodegener Dis* 2007;4:185–194.
29. Fialova L, Bartos A, Svarcova J, Zimova D, Kotoucova J, Malbohan I. Serum and cerebrospinal fluid light neurofilaments and antibodies against them in clinically isolated syndrome and multiple sclerosis. *J Neuroimmunol* 2013; 262:113–120.
30. Avsar T, Korkmaz D, Tutuncu M, et al. Protein biomarkers for multiple sclerosis: semi-quantitative analysis of cerebrospinal fluid candidate protein biomarkers in different forms of multiple sclerosis. *Mult Scler* 2012;18:1081–1091.
31. Kuhle J, Plattner K, Bestwick JP, et al. A comparative study of CSF neurofilament light and heavy chain protein in MS. *Mult Scler* 2013;19:1597–1603.
32. Semra YK, Seidi OA, Sharief MK. Heightened intrathecal release of axonal cytoskeletal proteins in multiple sclerosis is associated with progressive disease and clinical disability. *J Neuroimmunol* 2002;122:132–139.
33. Trentini A, Comabella M, Tintore M, et al. N-acetylaspartate and neurofilaments as biomarkers of axonal damage in patients with progressive forms of multiple sclerosis. *J Neurol* 2014;261:2338–2343.
34. Modvig S, Degn M, Horwitz H, et al. Relationship between cerebrospinal fluid biomarkers for inflammation, demyelination and neurodegeneration in acute optic neuritis. *PLoS One* 2013;8:e77163.
35. Perez-Miralles F, Sastre-Garriga J, Tintore M, et al. Clinical impact of early brain atrophy in clinically isolated syndromes. *Mult Scler* 2013;19:1878–1886.
36. Bielekova B, McDermott MP. Will CSF biomarkers guide future therapeutic decisions in multiple sclerosis? *Neurology* 2015;84:1620–1621.
37. Salzer J, Svenningsson A, Sundstrom P. Neurofilament light as a prognostic marker in multiple sclerosis. *Mult Scler* 2010;16:287–292.
38. Petzold A, Altintas A, Andreoni L, et al. Neurofilament ELISA validation. *J Immunol Methods* 2010; 352:23–31.
39. Disanto G, Adiatori R, Dobson R, et al. Serum neurofilament light chain levels are increased in patients with a clinically isolated syndrome. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 2016;87:126–129.

Carry the Only Card that Helps Support the AAN—and Get a \$100 Cash Rewards Bonus!

Apply for the BankAmericard Cash Rewards™ credit card today to start getting more cash back for the things you buy most—plus a \$100 cash rewards bonus offer! Visit AAN.com/view/CashRewards and enter priority code “VACN51.”

Discover Altmetrics

See real-time downloads and online activity for articles!



[See more details](#)

Authors and readers alike can view real-time data on articles including downloads and online activity across multiple sources. Click on the “Article Metrics” link in the right column of an article for details. To learn more about article metrics visit http://www.neurology.org/site/misc/article_usage.xhtml.

Lipid-Specific Immunoglobulin M Bands in Cerebrospinal Fluid Are Associated with a Reduced Risk of Developing Progressive Multifocal Leukoencephalopathy during Treatment with Natalizumab

Luisa M. Villar, PhD,^{1,2} Lucienne Costa-Frossard, MD,^{2,3}
 Thomas Masterman, MD,⁴ Oscar Fernandez, MD,^{2,5} Xavier Montalban, MD,^{2,6}
 Bonaventura Casanova, MD,^{2,7} Guillermo Izquierdo, MD,^{2,8}
 Francisco Coret, MD,^{2,9} Hayrettin Tumani, MD,¹⁰ Albert Saiz, MD,^{2,11}
 Rafael Arroyo, MD,^{2,12} Katharina Fink, MD,⁴ Laura Leyva, PhD,^{2,5}
 Carmen Espejo, PhD,^{2,6} María Simó-Castelló, PhD,^{2,7}
 María I. García-Sánchez, PhD,^{2,8} Florian Lauda, MD,¹⁰ Sara Llufríu, MD,^{2,11}
 Roberto Álvarez-Lafuente, PhD,^{2,12} Javier Olascoaga, MD,^{2,13}
 Alvaro Prada, MD,^{2,14} Agustín Oterino, MD,¹⁵ Clara de Andrés, MD,^{2,16}
 Mar Tintoré, MD,^{2,6} Lluís Ramió-Torrentà, MD,^{2,17}

View this article online at wileyonlinelibrary.com. DOI: 10.1002/ana.24345

Received Aug 26, 2014, and in revised form Dec 16, 2014. Accepted for publication Dec 24, 2014.

Address correspondence to Dr Villar, Servicio de Inmunología, Hospital Ramón y Cajal, Carretera de Colmenar Km 9.100, 28034 Madrid, Spain.
 E-mail: luisamaria.villar@salud.madrid.org

From the ¹Department of Immunology, Ramón y Cajal University Hospital, Institute Ramon y Cajal for Biomedical Research, Madrid, Spain; ²Spanish Network for the Research in Multiple Sclerosis, Spain; ³Department of Neurology, Ramon y Cajal University Hospital, Institute Ramon y Cajal for Biomedical Research, Madrid, Spain; ⁴Department of Clinical Neuroscience, Karolinska Institute, Karolinska University Hospital, Huddinge, Sweden; ⁵Department of Neurology, Regional University Hospital of Malaga, Malaga, Spain; ⁶Department of Neurology-Neuroimmunology, Catalunya Center for Multiple Sclerosis, Vall d'Hebron Institute of Research, Vall d'Hebron University Hospital, Autonomous University of Barcelona, Barcelona, Spain; ⁷Department of Neurology, La Fe University Hospital, Valencia, Spain; ⁸Department of Neurology, Virgen Macarena University Hospital, Seville, Spain; ⁹Department of Neurology, Clinic University Hospital of Valencia, Valencia, Spain; ¹⁰Department of Neurology, University of Ulm, Ulm, Germany; ¹¹Department of Neurology, Clinic Hospital and Institute August Pi i Sunyer for Biomedical Research of, University of Barcelona, Barcelona, Spain; ¹²Department of Neurology, San Carlos Clinic University Hospital, Institute for Biomedical Research of San Carlos Clinic University Hospital, Madrid, Spain; ¹³Department of Neurology, Donostia University Hospital, San Sebastián, Spain; ¹⁴Department of Immunology, Donostia University Hospital, San Sebastián, Spain; ¹⁵Department of Neurology, Marqués de Valdecilla University Hospital, Santander, Spain; ¹⁶Department of Neurology, Gregorio Marañón University Hospital, Madrid, Spain; ¹⁷Department of Neurology, Doctor Josep Trueta University Hospital, Institute for Biomedical Research of Girona, Girona, Spain; ¹⁸Institute Maimónides for Biomedical Research, Reina Sofía University Hospital, University of Córdoba, Córdoba, Spain; ¹⁹Department of Neurology, Doctor Negrín University Hospital, Las Palmas de Gran Canaria, Spain; ²⁰Department of Neurology, Nuestra Señora de Valme University Hospital, Seville, Spain; ²¹Department of Neurology, Puerta de Hierro University Hospital, Madrid, Spain; ²²Department of Neurology, Doctor Peset University Hospital, Valencia, Spain; ²³Department of Neurology, Alvarez Buylla Hospital, Mieres, Spain; ²⁴Department of Neurology, Elche General Hospital, Elche, Spain; ²⁵Department of Neurology, Hospital of El Bierzo, Ponferrada, Ponferrada, Spain; ²⁶Department of Neurology, Torrecárdenas Hospital, Almería, Spain; ²⁷Department of Neurology, Central University Hospital of Asturias, Oviedo, Spain; ²⁸Biostatistics Unit, Ramón y Cajal University Hospital, Institute Ramon y Cajal for Biomedical Research, CIBERESP, Madrid, Spain; and ²⁹Montreal Neurological Institute and Hospital, McGill University, Montreal, Quebec, Canada

Cerebrospinal fluid immunological biomarkers associated with axonal damage in multiple sclerosis

L. M. Villar^a, C. Picón^a, L. Costa-Frossard^b, R. Alenda^a, J. García-Caldentey^b, M. Espiño^a, A. Muriel^c and J. C. Álvarez-Cermeño^{b,d}

^aMultiple Sclerosis Unit, Department of Immunology, Ramón y Cajal Hospital, IRYCIS, Madrid; ^bMultiple Sclerosis Unit, Department of Neurology, Ramón y Cajal Hospital, IRYCIS, Madrid; ^cBiostatistics Unit, Ramón y Cajal Hospital, IRYCIS, CIBERESP, Madrid; and ^dDepartment of Medicine, University of Alcalá, Madrid, Spain

See editorial by Alvarez on page 1143.

Keywords:

axonal damage, CSF, immunological biomarkers, multiple sclerosis, neurodegeneration, neurofilament light chain, oligoclonal IgM bands

Received 28 April 2014
Accepted 1 August 2014

European Journal of Neurology 2015, **22**: 1169–1175

doi:10.1111/ene.12579

Background and purpose: Cerebrospinal fluid (CSF) neurofilament light protein (NFL) is a promising biomarker of axonal injury and neurodegeneration. Here CSF lymphocyte subpopulations and antibodies, potential players of neurodegeneration, are examined in relation to CSF NFL shedding in MS.

Methods: Cerebrospinal fluid NFL from 127 consecutive untreated MS patients was analysed. Samples from 37 age-matched patients with other central nervous system non-inflammatory neurological diseases (NIND) were also assessed. CD4+, CD8+, CD56+ and CD19+ cell subsets were studied by flow cytometry. Oligoclonal IgG and IgM bands (OCMB) against lipids were studied by isoelectric focusing and immunoblotting. These data were analysed in relation to clinical and magnetic resonance imaging features.

Results: A CSF NFL cut-off value of 900 ng/l (mean + 3 SD of NIND values) was calculated. MS patients with increased NFL values showed significantly higher Multiple Sclerosis Severity Score and magnetic resonance imaging lesion number. The presence of OCMB ($P < 0.0001$) and elevated T and B lymphocyte counts was associated with increased levels of CSF NFL.

Conclusions: High CSF NFL levels are associated with elevated CSF lymphocyte cell counts and intrathecal synthesis of IgM against lipids. These findings support a role for OCMB in the axonal damage of MS offering a rationale for the association of these antibodies with disability and brain atrophy progression in MS.

Introduction

Traffic of myelin-specific T lymphocytes into the central nervous system initiates a cascade of autoimmune mechanisms leading to demyelination and axonal loss in multiple sclerosis (MS) [1].

Injury to axons is the major source of permanent neurological deficits in MS [2] and magnetic resonance imaging (MRI) techniques show axonal loss from the early phases of the disease [3,4]. Accordingly, pathological studies show the presence of axonal injury in active demyelinating lesions at the initial stages of the

disease [5–7]. Nevertheless, other more diffuse neurodegenerative mechanisms of axonal damage seem to play a role in the continuous, irreversible neurological disability that occurs from the very first phases of MS [8]. Axonal injury results in disintegration of the axon membrane and neurofilament breakdown. Neurofilaments are then released into the contiguous cerebrospinal fluid (CSF) where they can be measured as biomarkers of axonal damage [9–11]. Neurofilaments consist of three distinct chains with different molecular weights: a neurofilament light chain (NFL) of 68 kDa, a neurofilament intermediate chain of 150 kDa and a neurofilament heavy chain (NFH) of 190–210 kDa [11]. CSF NFL and NFH levels have been studied in MS and there is a strong correlation between them in CSF from patients [12]. NFL proved to be a more

Correspondence: J. C. Álvarez-Cermeño, Multiple Sclerosis Unit, Department of Neurology, Ramón y Cajal Hospital, Ctra de Colmenar Km 9,100, 28034 Madrid, Spain (tel.: +34 91 3368397; fax: +34 91 3369016; e-mail: josecarlos.alvarez@salud.madrid.org).

ORIGINAL ARTICLE

MRI phenotypes with high neurodegeneration are associated with peripheral blood B-cell changes

Manuel Comabella^{1,†,*}, Ester Cantó^{1,†}, Ramil Nurtdinov¹, Jordi Río¹, Luisa M. Villar^{3,4}, Carmen Picón^{3,4}, Joaquín Castelló¹, Nicolás Fissolo¹, Xavier Aymerich², Cristina Auger², Alex Rovira² and Xavier Montalban¹

¹Servei de Neurologia-Neuroimmunologia, Centre d'Esclerosi Múltiple de Catalunya (Cemcat), Institut de Recerca Vall d'Hebron (VHIR), ²Unitat de RM, Servei de Radiologia, Hospital Universitari Vall d'Hebron, Universitat Autònoma de Barcelona, Barcelona, Spain, ³Department of Neurology and ⁴Department of Immunology, Hospital Universitario Ramón y Cajal, Instituto Ramón y Cajal de Investigación Sanitaria, Madrid, Spain

*To whom correspondence should be addressed at: Unitat de Neuroimmunologia Clínica, CEM-Cat. Edif. EUI 2^a planta, Hospital Universitari Vall d'Hebron. Pg. Vall d'Hebron 119-129 08035 Barcelona, Spain. Tel: +34 932746834; Fax: +34 932746084; Email: manuel.comabella@vhir.org

Abstract

Little is known about the mechanisms leading to neurodegeneration in multiple sclerosis (MS) and the role of peripheral blood cells in this neurodegenerative component. We aimed to correlate brain radiological phenotypes defined by high and low neurodegeneration with gene expression profiling of peripheral blood mononuclear cells (PBMC) from MS patients. Magnetic resonance imaging (MRI) scans from 64 patients with relapsing-remitting MS (RRMS) were classified into radiological phenotypes characterized by low ($N = 27$) and high ($N = 37$) neurodegeneration according to the number of contrast-enhancing lesions, the relative volume of non-enhancing black holes on T1-weighted images, and the brain parenchymal fraction. Gene expression profiling was determined in PBMC using microarrays, and validation of selected genes was performed by polymerase chain reaction (PCR). B-cell immunophenotyping was conducted by flow cytometry. Microarray analysis revealed the B-cell specific genes *FCRL1*, *FCRL2*, *FCRL5* (Fc receptor-like 1, 2 and 5 respectively), and *CD22* as the top differentially expressed genes between patients with high and low neurodegeneration. Levels for these genes were significantly down-regulated in PBMC from patients with MRI phenotypes characterized by high neurodegeneration and microarray findings were validated by PCR. In patients with high neurodegeneration, immunophenotyping showed a significant increase in the expression of the B-cell activation markers CD80 in naïve B cells (CD45+/CD19+/CD27–/IgD+), unswitched memory B cells (CD45+/CD19+/CD27+/IgD+), and switched memory B cells (CD45+/CD19+/CD27+/IgD–), and CD86 in naïve and switched memory B cells. These results suggest that RRMS patients with radiological phenotypes showing high neurodegeneration have changes in B cells characterized by down-regulation of B-cell-specific genes and increased activation status.

Introduction

Multiple sclerosis (MS) pathogenesis is characterized by at least two major processes, inflammation and neurodegeneration (1). Whereas inflammation predominates in the initial phases of the disease, the neurodegenerative component is usually more

prominent in the late stages of MS, although it can be present early in the disease course (2). Current available therapies in MS have proven to be highly effective to suppress the inflammatory component of the disease. In contrast, the mechanisms leading to neurodegeneration are less well understood and,

[†]M.C. and E.C. contributed equally to this work.

Received: September 1, 2015. Revised and Accepted: November 15, 2015

© The Author 2015. Published by Oxford University Press. All rights reserved. For Permissions, please email: journals.permissions@oup.com

Natural killer cell subsets in cerebrospinal fluid of patients with multiple sclerosis

E. Rodríguez-Martín,^{*‡§} C. Picón,^{*‡}
L. Costa-Frossard,^{†‡§} R. Alenda,^{*‡§}
S. Sainz de la Maza,[†] E. Roldán,^{*‡§}
M. Espiño,^{*‡§} L. M. Villar,^{*‡§1} and
J. C. Álvarez-Cermeño^{†‡§1}

Departments of ^{*}Immunology and [†]Neurology,
Multiple Sclerosis Unit, Hospital Ramón y Cajal,
Madrid, Spain, [‡]Instituto Ramón y Cajal de
Investigación Sanitaria IRYCIS, Madrid, Spain,
[§]Red Española de Esclerosis Múltiple, REEM,
Madrid, Spain, and ¹Department of Medicine,
University of Alcalá, Alcalá de Henares, Madrid,
Spain

Accepted for publication 25 December 2014
Correspondence: L. M. Villar, Department of
Immunology, Hospital Ramón y Cajal, Ctra. de
Colmenar Km. 9-100, 28034 Madrid, Spain.
E-mail: luisamaria.villar@salud.madrid.org

¹Both authors were co-principal investigators.

Introduction

Multiple sclerosis (MS) is considered to be a T cell-mediated autoimmune disease that results in demyelination and axonal loss inducing irreversible neurological deficits. Recent studies suggest that the innate immune system plays an important role in both the initiation and progression of MS by influencing the effector function of T and B cells [1]. Natural killer (NK) cells contribute to both effector and regulatory functions of innate immunity via their cytotoxic activity and their ability to secrete pro- and anti-inflammatory cytokines and growth factors [1]. Mechanisms by which NK cells could have an impact on autoimmune responses include a rapid cytokine release before autoreactive T cell differentiation and modulation of interactions between autoreactive T and B lymphocytes and antigen-presenting cells [2]. Several NK subsets responsible for different functions have been identified [3]. Based on

Summary

Changes in blood natural killer (NK) cells, important players of the immune innate system, have been described in multiple sclerosis (MS). We studied percentages and total cell counts of different effector and regulatory NK cells in cerebrospinal fluid (CSF) of MS patients and other neurological diseases to gain clearer knowledge of the role of these cells in neuroinflammation. NK cell subsets were assessed by flow cytometry in CSF of 85 consecutive MS patients (33 with active disease and 52 with stable MS), 16 with other inflammatory diseases of the central nervous system (IND) and 17 with non-inflammatory neurological diseases (NIND). MS patients showed a decrease in percentages of different CSF NK subpopulations compared to the NIND group. However, absolute cell counts showed a significant increase of all NK subsets in MS and IND patients, revealing that the decrease in percentages does not reflect a real reduction of these immune cells. Remarkably, MS patients showed a significant increase of regulatory/effector (CD56^{bright}/CD56^{dim}) NK ratio compared to IND and NIND groups. In addition, MS activity associated with an expansion of NK T cells. These data show that NK cell subsets do not increase uniformly in all inflammatory neurological disease and suggest strongly that regulatory CD56^{bright} and NK T cells may arise in CSF of MS patients as an attempt to counteract the CNS immune activation characteristic of the disease.

Keywords: CSF, innate immunity, multiple sclerosis, natural killer cells, neuroinflammation

the surface expression of CD56, NK cells have been classified as effector (CD56^{dim}) or regulatory (CD56^{bright}) cells. Effector NK cells are characterized by intracellular expression of perforin and granzymes, which are proteolytic enzymes involved in target killing [4,5]. They may be subdivided further into CD56⁺CD16⁺ (cytotoxic effector cells) [6] and CD56⁺CD3⁺ (NK T cells), which may produce a variety of cytokines and control other immune cells [7]. Conversely, CD56^{bright} NK regulatory cells represent fewer than 10% of peripheral blood NK cells, express low levels of perforin and are able to secrete large amounts of cytokines [1,8]. In addition, CD56⁺CD16⁺ NK cells are a defective NK subset with impaired cytolytic function that increases in viraemic HIV and hepatitis C virus (HCV)-infected individuals [9,10]. A high level of these dysfunctional cells reveals a disturbance in innate cellular immunity that associates with an impaired ability to respond to anti-viral treatment with interferon (IFN)- α and ribavirin [10].

It has been suggested that NK cells play a key role at the interface of innate and adaptive responses in autoimmune diseases [11,12]. Depending on the cell subtype and milieu, both pathogenic and protective roles in the central nervous system (CNS) have been attributed to different NK subpopulations in MS and its animal model, experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE) [13–17]. In keeping with this, NK cell lines may induce lysis of oligodendrocytes. Alternatively, circulating cytotoxic NK cells may lyse autoantigen-specific encephalitogenic T cells, dampening disease activity in EAE. In addition, CNS-resident NK cells may inhibit T helper type 17 (Th17) differentiation in EAE by interacting with microglia cells [2].

It is considered that immunophenotyping of cerebrospinal fluid (CSF) cells in MS reflects cellular events within brain parenchyma and may be useful to gain insight into MS pathophysiology [18]. Different studies have described changes in the percentages of NK cells in the CSF of MS patients [19–22]. Moreover, the beneficial effect of daclizumab, a humanized monoclonal antibody (mAb) that blocks the binding site on the IL-2R α chain (CD25), is linked to the expansion of the CD56^{bright} cells in CSF [23]. We considered that it would be of interest to investigate whether changes in CSF NK cells occurring in MS are relative or absolute, and if they associate with a particular NK cell subset. In addition, we studied the relationship between CSF NK subpopulations and MS activity, which has not been explored so far.

Material and methods

Patients

This study was approved by the ethical committee of Hospital Ramón y Cajal (Madrid, Spain). Written informed consent was obtained from all patients before entry into the study. We included 85 consecutive patients diagnosed with relapsing–remitting MS (RRMS), according to modified McDonald criteria [24]. We monitored disease duration, current disability measured by the Expanded Disability Status Scale (EDSS) score and disease status (relapse or remission). Relapses were defined as worsening of neurological impairment or the appearance of new symptoms attributable to MS, lasting at least 24 h and preceded by stability of at least 1 month. Remission was considered when patients were free of relapses or progression for at least 3 months before inclusion in the study. We also divided our patients according to clinical inflammatory disease activity (IDA) status. The active group included patients with the presence of either a relapse or new magnetic resonance imaging (MRI) gadolinium-enhanced lesions ($n = 33$). The stable group included MS individuals in remission who did not show any of these variables related to disease activity ($n = 52$).

Eighty-one MS patients (95.29%) had not received any disease-modifying treatment before lumbar puncture (LP). The remaining four cases were treated previously with Rebif (three cases) or Betaferon (one case). Another three patients received high-dose steroids before inclusion in this study. In all these cases a washout period of 3 months between treatment cessation and LP was established.

We also studied 16 patients who could be defined as inflammatory neurological disease controls (IND), according to the latest consensus definitions [25]. Patients with the following diagnoses were included in this group: limbic encephalitis ($n = 2$), post-infectious cerebellitis ($n = 1$), bilateral optic neuritis ($n = 4$), herpes simplex encephalitis ($n = 1$), headache associated with neurological deficits and CSF lymphocytosis (HaNDL) syndrome ($n = 3$), transverse myelitis ($n = 1$), vasculitis ($n = 2$), pachymeningitis ($n = 1$) and neuromyelitis optica ($n = 1$). Seventeen patients with the following non-inflammatory neurological disease controls (NIND) were also studied: stroke ($n = 1$), normal pressure hydrocephalus ($n = 3$), dementia ($n = 4$), epilepsy ($n = 1$), pseudotumour cerebri ($n = 5$), amyotrophic lateral sclerosis ($n = 1$), pineal cyst ($n = 1$) and arachnoid cyst ($n = 1$). No significant differences were found in age and sex between MS [age: 38.86 ± 1.0 years (mean \pm standard error); 75% females], IND (age: 42.09 ± 4.87 years; 66.7% females) and NIND (age: 46.26 ± 3.56 ; 58.8% females) groups. Basic CSF parameters of the patients included in the three groups are shown in the Supporting information, Fig. S1.

MRI scans of the brain were performed within a month of CSF sampling at 1.5 Tesla (Phillips Gyroscan NT, Eindhoven, the Netherlands). New brain-active gadolinium-enhanced lesions, T1 and T2 lesion load were studied following a standard protocol [26]

Samples

Samples were always obtained for clinical purposes. Peripheral blood (PB) samples were collected at the time of the LP and were processed in parallel with CSF. Fresh CSF samples (4–6 ml) were centrifuged at 500 g for 15 min and the cellular pellet resuspended in 100 μ l of phosphate-buffered saline (PBS) to be labelled as described below.

Flow cytometry analysis

CSF and PB cells were analysed for expression of surface markers using flow cytometry. The following monoclonal antibodies were used: control mouse isotypes and anti-human CD3, CD16, CD45 and CD56 (BD Biosciences, San Jose, CA, USA). Cells were labelled with optimal concentrations of these monoclonal antibodies. CSF cell staining was performed at 4°C in the dark and washes and incubations were carried out in PBS. Whole PB samples were labelled for 20 min at room temperature, and then lysed with 2 ml

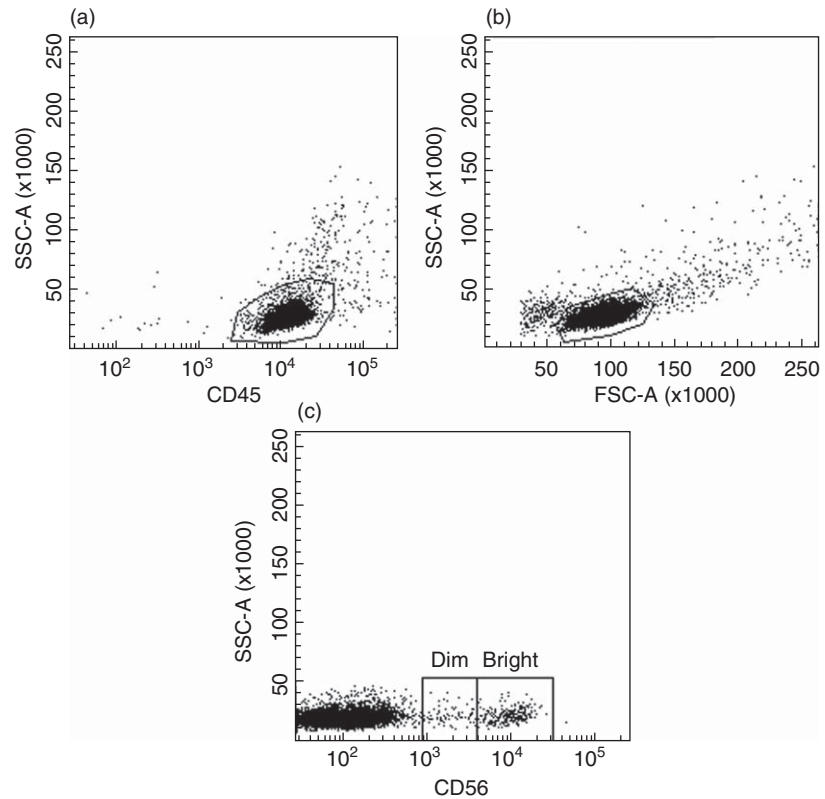


Fig. 1. Representative dot-plots showing gating strategy to select natural killer (NK) cells for analysis. (a) Cerebrospinal fluid (CSF) lymphocytes were identified on a dot-plot display with side-scatter (SSC) and CD45. A gate was set around CD45⁺ bright cells with low side-scatter. (b) A second region was then set on the forward (FSC)/side-scatter dot-plot to select a lymphocyte population free of debris and apoptotic cells. (c) Finally, CSF NK cells were identified on a dot-plot display with SSC and CD56. A gate was then set around CD56^{dim} cells and a second region was set around CD56^{bright} cells.

of lysis solution [fluorescence activated cell sorter (FACS) Lysis Solution; Becton Dickinson, San Jose, CA, USA]. Cells were then washed twice. Data acquisition was performed with a FACSCanto II cytometer and analysed with FACSDiva software (BD Immunocytometry Systems, San Jose, CA, USA).

An initial region was set around cells expressing intermediate to high CD45 with low to intermediate side-scatter, and then a second region was set on the forward-/side-scatter dot-plot to exclude debris or apoptotic cells and include lymphocytes. Only cells that included both regions were accepted for analysis. A minimum of 500 events were collected for analysis of antigen staining in CSF. The cursor was set so that fewer than 1% of the cells in each sample stained positively with the isotype control antibodies. The percentage and total counts of cells that stained positively was recorded for each sample. The results were reported as percentages of total lymphocytes and as absolute cell counts. CD56^{dim} and CD56^{bright} NK cell subsets were identified according to the staining intensity with the specific mAb. Representative examples of cell gating are shown in Fig. 1 and the Supporting information, Fig. S2. Every sample was analysed by immunologists blind to clinical data.

Statistical analysis

Results were analysed with the Prism version 5.0 statistical package (GraphPad Software, San Diego, CA, USA). We used the Mann–Whitney *U*-test for comparisons between

two groups and the Kruskal–Wallis test with Dunn's *post-hoc* test for comparisons between more than two groups. *P*-values below 0.05 were considered significant.

Results

The percentages of different NK cell subsets in CSF samples of our three patient groups (MS, IND and NIND) are depicted in Table 1. No differences were found in either the percentages of total NK CD56⁺ or regulatory NK CD56^{bright} cells between the three patient groups. However, MS patients showed lower percentages of total effector NK (CD56^{dim}) cells than the NIND group ($P < 0.001$). This decrease was due to the NK T (CD56^{dim} CD3⁺) subset, which was diminished in MS patients compared to NIND patients ($P < 0.001$). The defective CD56^{dim}CD16⁺ NK subset was also diminished in MS patients compared to the NIND group ($P < 0.01$). These data demonstrate a relative decrease of effector NK cells in MS patients compared to non-inflammatory diseases of the CNS. Other inflammatory diseases of the CNS also showed a decreased NK T cell percentage compared to NIND ($P < 0.05$).

We also studied the ratio between regulatory and effector (CD56^{bright}/CD56^{dim}) NK cells in CSF. MS patients showed a significantly higher ratio than the IND and NIND groups, which presented similar CD56^{bright}/CD56^{dim} ratio values (Fig. 2a). This was the best variable to discriminate MS and

Table 1. Cerebrospinal fluid (CSF) percentages of different natural killer (NK) cell subpopulations.

CSF NK cells	MS <i>n</i> = 85	IND <i>n</i> = 16	NIND <i>n</i> = 17	<i>P</i> -values
NK CD56 ⁺ cells	3.00 (2.20–4.15)	2.85 (2.02–4.72)	5.30 (2.95–8.25)	<i>P</i> = 0.04; a,b,c: n.s.
CD56 ^{bright} cells	1.40 (0.80–2.25)	0.90 (0.32–2.62)	1.60 (0.85–2.95)	<i>P</i> = 0.19; a,b,c: n.s.
CD 56 ^{dim} cells	1.40 (1.0–2.0)	1.70 (1.07–2.57)	2.90 (1.70–4.5)	<i>P</i> = 0.001; a,c: n.s., b***
CD 56 ^{dim} CD3 ⁺	1.10 (0.70–1.45)	1.20 (0.72–1.50)	2.0 (1.40–3.60)	<i>P</i> = 0.001; a: n.s., b***, c*
CD56 ^{dim} CD16 ⁺	0.30 (0.15–0.50)	0.35 (0.20–0.65)	0.30 (0.20–0.90)	<i>P</i> = 0.52; a,b,c: n.s.
CD56 ⁻ CD16 ⁺ cells	1.30 (0.80–2.10)	1.45 (0.92–3.3)	3.2 (1.55–5.30)	<i>P</i> = 0.003; a,c: n.s., b**

Values shown are calculated as percentage of lymphocytes in CSF and presented as median (25–75% interquartile range). MS = multiple sclerosis; IND = other inflammatory neurological diseases; NIND = non-inflammatory neurological diseases. *P* = *P*-value of overall comparison (Kruskal–Wallis test); a = Dunn's *post-hoc* test comparisons between a: MS versus IND, b: MS versus NIND, c: IND versus NIND. **P* < 0.05; ***P* < 0.01; ****P* < 0.001.

IND patients in our series. Representative dot-plots are shown in Fig. 2b.

We next studied total CSF leucocyte counts in the three groups, and observed that MS and IND patients showed clearly higher cell numbers than the NIND group (*P* < 0.0001). Accordingly, they also had increased values of all NK subsets (Table 2).

Although no significant differences were found between the MS and IND groups, IND patients tended to show higher number of NK effector cells and, conversely, the MS group seem to have higher CSF CD56^{bright} cell counts (Table 2).

The distribution of the NK cell subsets in peripheral blood is shown in the Supporting information, Table S1. No significant differences were observed between the three groups of patients.

In a further subanalysis, we assessed the influence of MS clinical inflammatory disease activity (IDA) on CSF NK cell

subsets. We found no differences in CSF NK cell percentages associated with inflammatory status (Supporting information, Table S2). However, the study of absolute cell numbers provided significant results (Table 3). We found a moderate increase in total cell numbers in the active MS group (*P* = 0.033). Differences were higher when studying CD56^{dim} cells. This was due mainly to an increase of the CD56^{dim}CD3⁺ subpopulation in active patients (*P* = 0.018). The increase of CD56^{dim}CD16⁺ cells was less relevant (*P* = 0.043). No significant differences were found in CD56^{bright} or CD56⁻CD16⁺ subsets in relation to disease activity.

We found no differences in percentages or total numbers of any NK cell subset between active MS patients and the IND group (data not shown). However, the bright/dim ratio remained higher in active MS [1.0 (0.57–1.89), median (25–75% interquartile range)] when compared to IND patients [0.43 (0.25–1.28), *P* = 0.019].

Fig. 2. (a) CD56 bright/dim ratio in cerebrospinal fluid (CSF) of patients with multiple sclerosis (MS), other inflammatory neurological diseases (IND) and non-inflammatory neurological diseases (NIND). *P* = *P*-value of overall comparison (Kruskal–Wallis test). **P* < 0.05 in Dunn's *post-hoc* test comparison. (b) Representative dot-plots showing CD56 cells from a patient with MS, other inflammatory neurological disease (IND) and non-inflammatory neurological disease (NIND).

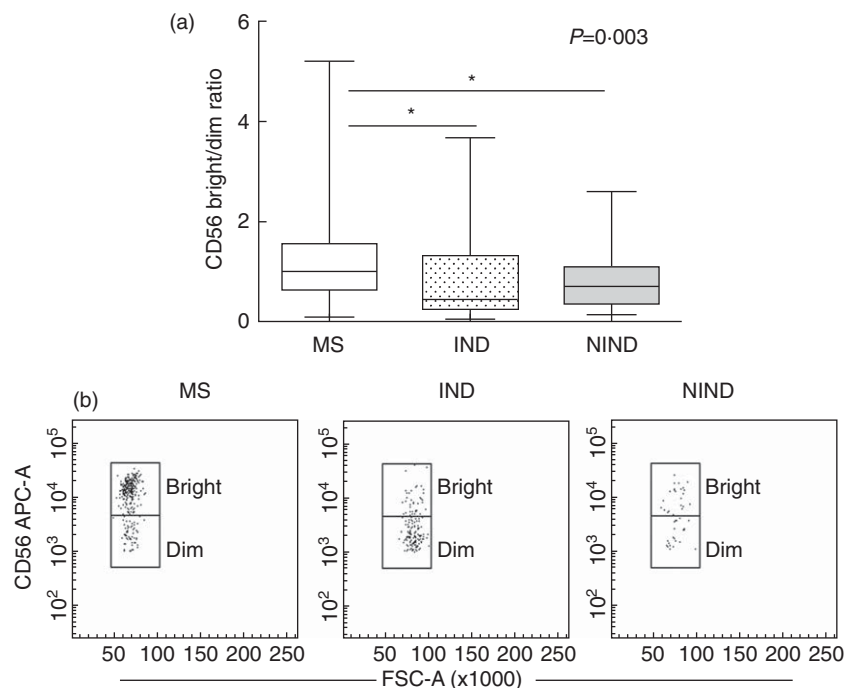


Table 2. Absolute number of different natural killer (NK) cell subpopulations in cerebrospinal fluid (CSF).

Absolute cell counts	MS n = 85	IND n = 16	NIND n = 17	P-values
Total cell number	1219 (485.3–2738)	1439 (698.6–6426)	197.6 (150.1–327.3)	$P < 0.0001$ a: n.s., b ^{***} , c ^{***}
NK CD56 ⁺ cells	31.43 (14.21–86.11)	49.98 (18.77–83.41)	13.20 (6.71–14.75)	$P < 0.0001$ a: n.s., b ^{***} , c ^{***}
CD56 ^{bright} cells	14.66 (5.37–49.96)	10.30 (4.67–35.83)	3.98 (2.40–5.81)	$P < 0.0001$ a: n.s., b ^{***} , c*
CD56 ^{dim} cells	17.61 (6.96–37.82)	30.83 (10.99–53.60)	5.63 (3.42–9.96)	$P < 0.0001$ a: n.s., b ^{***} , c ^{***}
CD56 ^{dim} CD3 ⁺	11.48 (5.57–24.12)	19.0 (7.33–42.09)	3.53 (2.88–8.56)	$P = 0.0001$ a: n.s., b ^{***} , c ^{***}
CD56 ^{dim} CD16 ⁺	3.11 (0.96–9.39)	6.55 (1.22–18.54)	0.66 (0.34–2.15)	$P = 0.0022$ a: n.s., b ^{**} , c ^{**}
CD56 ⁻ CD16 ⁺ cells	18.85 (7.31–36.08)	31.05 (10.03–105.0)	6.59 (2.78–19.62)	$P = 0.0066$ a: n.s., b*, c ^{**}

Values are calculated as number of cells/ml and presented as median (25–75% interquartile range). MS = multiple sclerosis; IND = other inflammatory neurological diseases; NIND = non-inflammatory neurological diseases; P = P -value of overall comparison (Kruskal–Wallis test); a: Dunn's *post-hoc* test comparison between MS versus IND, b: Dunn's *post-hoc* test comparison between MS versus NIND, c: Dunn's *post-hoc* test comparison between IND versus NIND. * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$; *** $P < 0.001$.

Discussion

Several studies have implicated NK cells in the pathogenesis of MS. Using functional assays, NK cell dysfunction related to MS activity was found in the blood and CSF of patients [27–29]. In addition, immunophenotyping studies revealed that blood NK cell subpopulations seem to play a role in disease activity and response to treatment. In keeping with this, the expansion of regulatory CD56^{bright} NK cells associated with a good response to daclizumab [23,30] and IFN- β [31,32], while CD56^{dim} cells decreased after immunomodulatory therapy [32].

The percentage of effector NK cells has been shown to be decreased in the CSF of MS compared to NIND patients [19]. We have confirmed these differences for MS, and observe that patients with IND also have a lower proportion of these cells. This suggests strongly that the decrease of effector NK cells is associated not only with MS, but with CNS inflammation. In contrast, the CSF CD56^{bright}/CD56^{dim} ratio seemed to be increased specifically in MS patients compared to IND or NIND groups. We assessed this by comparing the values of this ratio in patients with active MS and IND. Active MS patients also showed significantly higher values of this ratio than those with other inflammatory diseases. This further supports the association of high levels of the CSF CD56^{bright}/CD56^{dim} ratio with MS and may reflect the existence of different immunoregulatory mecha-

nisms in MS and IND. Further studies will demonstrate the role of CSF CD56^{bright} NK cells in MS.

Conversely to the CSF data, we did not find differences in the percentages of any NK cell subset in peripheral blood between our three groups of patients, thus confirming previously published data on the poor correlation between systemic and CSF lymphoid cell subsets [23].

We next aimed to study absolute numbers of CSF NK cell subsets in our series, as percentages and absolute numbers of CSF cells can differ widely, depending on the clinical setting [33]. All NK cell subsets were increased significantly in MS and IND compared to NIND, which suggests that these cells may play a role in CNS inflammation. However, we observed that the increase in the number of regulatory CD56^{bright} cells was much clearer in MS patients than in IND. This confirms the CD56^{bright}/CD56^{dim} ratio data. Conversely, the expansion in CD56⁻CD16⁺ defective NK cells was more pronounced in IND patients, suggesting that the NK cell profile can differ between different inflammatory neurological diseases.

The relationship of CSF NK subpopulations and MS activity has not been studied extensively. We explored this in 33 patients with active disease and 52 with stable MS. The total CSF cell count was increased moderately in active patients. However, when exploring regulatory or defective NK cells, we did not find any changes between active and stable patients. Differences were found only in effector

Table 3. Absolute cell numbers in cerebrospinal fluid (CSF) of active and stable multiple sclerosis (MS) patients.

	MS active n = 33	MS stable n = 52	P-values
Total cell number	1854 (802.1–3885)	849.9 (427.0–2567)	$P = 0.033$
NK CD56 ⁺ cells	55.81 (21.30–128.8)	24.08 (12.43–77.39)	$P = 0.022$
CD56 ^{bright} cells	19.31 (9.12–80.95)	12.16 (4.65–42.83)	$P = 0.064$
CD 56 ^{dim} cells	22.59 (10.66–54.80)	13.29 (5.98–33.65)	$P = 0.013$
CD 56 ^{dim} CD3 ⁺	16.25 (8.73–33.90)	9.77 (5.17–19.43)	$P = 0.018$
CD56 ^{dim} CD16 ⁺	5.80 (1.66–13.27)	2.13 (0.75–8.39)	$P = 0.043$
CD56 ⁻ CD16 ⁺ cells	23.86 (7.84–37.65)	14.14 (5.99–34.71)	$P = 0.21$

Values are calculated as number of cells/ml and presented as median (25–75% interquartile range).

subsets, due mainly to an increase in NK T cell numbers. This subset is a heterogeneous lymphoid population that may have both immune-enhancing and immunosuppressive roles. It can be classified by studying the heterogeneity of T cell receptor (TCR) rearrangements into two categories, type I and type II [34]. Type I, also denominated as invariant NK T (iNK T) cells, shows strong immune regulatory properties. iNK T cells exert a protective role in EAE [35], and expand in MS in response to IFN- β treatment [36].

The role of type II NK T cells has not yet been demonstrated so clearly, but these cells can contribute to enhance the inflammatory response in different autoimmune diseases [37]. The low number of cells present in CSF prevented us from further investigating NK T isotypes in our patients. Future research will identify the nature of NK T cells present in the CSF of MS patients and demonstrate their relationship with disease activity.

In summary, our data show that absolute CSF cell numbers add important information to previous percentage data and could contribute to reveal the role of NK cells in inflammatory neurological diseases.

Acknowledgements

We acknowledge Asunción Fernández for her relevant work with patients and Belén Bonilla and Daniel Carpio for their technical work. This work was supported by grants from Plan Estatal de I+D+I 2013–2016, PI12-00239 from FIS, Instituto de Salud Carlos III and FEDER and SAF 2012-34670 from Ministerio de Economía y Competitividad. Raquel Alenda is recipient of a research contract of REEM from the Instituto de Salud Carlos III (Spain).

Disclosure

None declared.

Author contributions

E. R. M., L. M. V. and J. C. A. C. designed the study. C. P., R. A., E. R. and M. E. performed the experiments. L. C. F. and S. S. M. obtained patient samples and clinical data. E. R. M. and L. M. V. analysed the results. E. R. M., L. M. V. and J. C. A. C. drafted the manuscript. All the authors made a critical review of the manuscript.

References

- 1 Mayo L, Quintana FJ, Weiner HL. The innate immune system in demyelinating disease. *Immunol Rev* 2012; **248**:170–87.
- 2 Hao J, Liu R, Piao W *et al.* Central nervous system (CNS)-resident natural killer cells suppress Th17 responses and CNS autoimmune pathology. *J Exp Med* 2010; **207**:1907–21.

- 3 Cooper MA, Fehniger TA, Caligiuri MA. The biology of human natural killer-cell subsets. *Trends Immunol* 2001; **22**:633–40.
- 4 Vivier E, Tomasello E, Baratin M, Walzer T, Ugolini S. Functions of natural killer cells. *Nat Immunol* 2008; **9**:503–10.
- 5 Catalfamo M, Henkart PA. Perforin and the granule exocytosis cytotoxicity pathway. *Curr Opin Immunol* 2003; **15**:522–7.
- 6 Lanier LL, Le AM, Civin CI, Loken MR, Phillips JH. The relationship of CD16 (Leu-11) and Leu-19 (NKH-1) antigen expression on human peripheral blood NK cells and cytotoxic T lymphocytes. *J Immunol* 1986; **136**:4480–6.
- 7 Bendelac A, Savage PB, Teyton L. The biology of NKT cells. *Annu Rev Immunol* 2007; **25**:297–336.
- 8 Carrega P, Bonaccorsi I, Di Carlo E *et al.* CD56 (bright) perforin(low) noncytotoxic human NK cells are abundant in both healthy and neoplastic solid tissues and recirculate to secondary lymphoid organs via afferent lymph. *J Immunol* 2014; **192**:3805–15.
- 9 Mavilio D, Lombardo G, Benjamin J *et al.* Characterization of CD56–/CD16+ natural killer (NK) cells: a highly dysfunctional NK subset expanded in HIV-infected viremic individuals. *Proc Natl Acad Sci USA* 2005; **102**:2886–91.
- 10 González VD, Falconer K, Björkström NK *et al.* Expansion of functionally skewed CD56-negative NK cells in chronic hepatitis C virus infection: correlation with outcome of pegylated IFN-alpha and ribavirin treatment. *J Immunol* 2009; **183**:6612–8.
- 11 Moretta A, Marcenaro E, Parolini S, Ferlazzo G, Moretta L. NK cells at the interface between innate and adaptive immunity. *Cell Death Differ* 2008; **15**:226–33.
- 12 Nguyen MD, Julien JP, Rivest S. Innate immunity: the missing link in neuroprotection and neurodegeneration? *Nat Rev Neurosci* 2002; **3**:216–27.
- 13 Gandhi R, Laroni A, Weiner HL. Role of the innate immune system in the pathogenesis of multiple sclerosis. *J Neuroimmunol* 2010; **221**:7–14.
- 14 Antel JP, McCrea E, Ladiwala U, Qin YF, Becher B. Non-MHC-restricted cell-mediated lysis of human oligodendrocytes *in vitro*: relation with CD56 expression. *J Immunol* 1998; **160**:1606–11.
- 15 Lunemann A, Lunemann JD, Roberts S *et al.* Human NK cells kill resting but not activated microglia via NKG2D and NKP46-mediated recognition. *J Immunol* 2008; **181**:6170–7.
- 16 Hammarberg H, Lidman O, Lundberg C *et al.* Neuroprotection by encephalomyelitis: rescue of mechanically injured neurons and neurotrophin production by CNS-infiltrating T and natural killer cells. *J Neurosci* 2000; **20**:5283–91.
- 17 Xu W, Fazekas G, Hara H, Tabira T. Mechanism of natural killer (NK) cell regulatory role in experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Neuroimmunol* 2005; **163**:24–30.
- 18 Alvermann S, Henning C, Stüve O, Wiendl H, Stangel M. Immunophenotyping of cerebrospinal fluid cells in multiple sclerosis. In search of biomarkers. *JAMA Neurol* 2014; **71**:905–12.
- 19 Cepok S, Jacobsen M, Schock S *et al.* Patterns of cerebrospinal fluid pathology correlate with disease progression in multiple sclerosis. *Brain* 2001; **124**:2169–76.
- 20 Hamann I, Dörr J, Glumm R *et al.* Characterization of natural killer cells in paired CSF and blood samples during neuroinflammation. *J Neuroimmunol* 2013; **254**:165–9.
- 21 Kowarik MC, Grummel V, Wremlinger S *et al.* Immune cell subtyping in the cerebrospinal fluid of patients with neurological diseases. *J Neurol* 2014; **261**:130–43.

- 22 Han S, Lin YC, Wu T *et al.* Comprehensive immunophenotyping of cerebrospinal fluid cells in patients with neuroimmunological diseases. *J Immunol* 2014; **192**:2551–63.
- 23 Bielekova B, Richert N, Herman ML *et al.* Intrathecal effects of daclizumab treatment of multiple sclerosis. *Neurology* 2011; **77**:1877–86.
- 24 Polman CH, Reingold SC, Banwell B *et al.* Diagnostic criteria for multiple sclerosis: 2010 revisions to the McDonald criteria. *Ann Neurol* 2011; **69**:292–302.
- 25 Teunissen C, Menge T, Altintas A *et al.* Consensus definitions and application guidelines for control groups in cerebrospinal fluid biomarker studies in multiple sclerosis. *Mult Scler J* 2013; **19**:1802–9.
- 26 Masjuan J, Álvarez-Cermeño JC, García-Barragán N *et al.* Clinically isolated syndromes: a new oligoclonal band test accurately predicts conversion to MS. *Neurology* 2006; **66**:576–8.
- 27 Benczur M, Petranyl GG, Palfy GY *et al.* Dysfunction of natural killer cells in multiple sclerosis: a possible pathogenetic factor. *Clin Exp Immunol* 1980; **39**:657–62.
- 28 Merrill J, Jondal M, Seeley J, Ullberg M, Siden A. Decreased NK killing in patients with multiple sclerosis: an analysis on the level of the single effector cell in peripheral blood and cerebrospinal fluid in relation to the activity of the disease. *Clin Exp Immunol* 1982; **47**:419–30.
- 29 Kastrukoff LF, Lau A, Wee R, Zecchini D, White R, Paty DW. Clinical relapses of multiple sclerosis are associated with 'novel' valleys in natural killer cell functional activity. *J Neuroimmunol* 2003; **145**:103–14.
- 30 Bielekova B, Catalfamo M, Reichert-Scriver S *et al.* Regulatory CD56^{bright} natural killer cells mediate immunomodulatory effects of IL-2R-alpha-targeted therapy (daclizumab) in multiple sclerosis. *Proc Natl Acad Sci USA* 2006; **103**:5941–6.
- 31 Martínez-Rodríguez JE, López-Botet M, Muntels E *et al.* Natural killer cell phenotype and clinical response to interferon-beta therapy in multiple sclerosis. *Clin Immunol* 2011; **141**:348–56.
- 32 Saraste M, Irjala H, Airas L. Expansion of CD56^{bright} natural killer cells in the peripheral blood of multiple sclerosis patients treated with interferon-beta. *Neurol Sci* 2007; **28**:121–6.
- 33 Brando B, Barnett D, Janossy G *et al.* Cytofluorometric methods for assessing absolute numbers of cell subsets in blood. European Working Group on Clinical Cell Analysis. *Cytometry* 2000; **42**:327–46.
- 34 Robertson FC, Berzofsky JA, Terabe M. NKT cell networks in the regulation of tumor immunity. *Front Immunol* 2014; **5**:543.
- 35 Berzins SP, Smyth MJ, Baxter AG. Presumed guilty: natural killer T cell defects and human disease. *Nat Rev Immunol* 2011; **11**:131–42.
- 36 Gigli G, Caielli S, Cutuli D, Falcone M. Innate immunity modulates autoimmunity: type 1 interferon- β treatment in multiple sclerosis promotes growth and function of regulatory invariant natural killer T cells through dendritic cell maturation. *Immunology* 2007; **122**:409–17.
- 37 Fuss IJ, Joshi B, Yang Z *et al.* IL-13R α 2-bearing, type II NKT cells reactive to sulfatide self-antigen populate the mucosa of ulcerative colitis. *Gut* 2014; **63**:1728–36.

Supporting information

Additional Supporting information may be found in the online version of this article at the publisher's web-site:

Fig. S1. Basic cerebrospinal (CSF) parameters of the multiple sclerosis (MS), other inflammatory diseases of the central nervous system (IND) and non-inflammatory neurological diseases (NIND) patients included in the present study. (a) Albumin index, (b) immunoglobulin (Ig)G index, (c) number of leucocytes/mm³. $P = P$ -value of overall comparison (Kruskal–Wallis test) and Dunn's *post-hoc* test comparison between groups. * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$; *** $P < 0.001$.

Fig. S2. Representative dot-plots showing gating strategy in cerebrospinal (CSF) to select natural killer (NK) cell subsets for analysis. (a) CSF NK cells were identified on a dot-plot display with side-scatter (SSC) and CD56. A gate was then set around CD56^{dim} cells. (b) CD56^{dim}CD3⁺ and CD56^{dim}CD16⁺ cells were identified in a CD16, CD3 two-colour dot-plot. (c) CSF CD16⁺ cells were identified on a dot-plot display with SSC and CD16. (d) CD56-CD16⁺ cells were identified in a CD16, CD56 two-colour dot-plot.

Table S1. Peripheral blood (PB) percentages of different natural killer (NK) cell subpopulations.

Table S2. Percentages of natural killer (NK) cell subtypes in cerebrospinal (CSF) of active and stable multiple sclerosis (MS) patients.

A new risk variant for multiple sclerosis at the immunoglobulin heavy chain locus associates with intrathecal IgG, IgM index and oligoclonal bands

Mercedes Delgado-García, Fuencisla Matesanz, Antonio Alcina, María Fedetz, María Isabel García-Sánchez, Juan Luis Ruiz-Peña, Óscar Fernández, María Jesús Pinto Medel, Laura Leyva, Carmen Arnal, Concepción Delgado, José Antonio López Guerrero, Antonio González-Pérez, María E Sáez, Luisa María Villar, José Carlos Álvarez-Cermeño, Carmen Picón, Rafael Arroyo, Jezabel Varadé, Elena Urcelay, Guillermo Izquierdo and Miguel Lucas

Abstract

Background: Recent findings have shown a correlation between the intrathecal IgG index and variants at the immunoglobulin heavy chain (IGHC) locus in patients with multiple sclerosis (MS).

Objectives: The objective of this paper is to analyse the association of the locus with MS susceptibility and its relationship with intrathecal immunoglobulin (Ig) parameters.

Methods: We genotyped the rs11621145 variant, located at the *IGHC* locus, in 2726 patients with MS and 2133 healthy controls. Associations of intrathecal IgG and IgM indexes with rs11621145 were analysed by linear regression analysis in 538 MS patients.

Results: We found that rs11621145 showed statistically significant evidence for association with susceptibility to MS (odds ratio = 0.69, $p = 1.053E-09$), though validation of this result in additional cohorts would be desirable. We confirmed the association between the IgG index and the rs11621145 ($p = 6.85E-07$, Beta = 0.207). Furthermore, rs11621145 was inversely correlated with IgM index ($p = 7.24E-04$, Beta = -0.277), and therefore marks a decreased likelihood of presenting IgM oligoclonal bands (odds ratio = 0.38, $p = 2.35E-06$).

Conclusions: Our results suggest that the polymorphism of the *IGHC* locus could be altering the switching of the Ig isotype in B cells and it may be interfering with T-dependent and T-independent antibody responses.

Keywords: Multiple sclerosis (MS), intrathecal IgG/IgM index, oligoclonal bands (OCBs), immunoglobulin heavy chain (IGHC) locus, association, SNP variant.

Date received: 1 April 2014; revised: 14 July 2014; 8 September 2014; accepted: 28 September 2014

Introduction

Multiple sclerosis (MS) is the most frequent demyelinating disease of the central nervous system (CNS) with an active inflammatory and immune component.^{1,2} MS is widely accepted as an autoimmune disease, but the aetiology and pathogenic mechanisms remain unclear. Current knowledge supports that MS develops in genetically susceptible

individuals as a result of an autoimmune attack to the myelin sheath activated through environmental factors.³ In MS, activated CD4+ T cells enter the CNS and trigger an inflammatory cascade that leads to recruitment of other immune cells such as B, CD8+ T cells and macrophages and induces the production of cytokines, antibodies and complement factors.

Multiple Sclerosis Journal

2015, Vol. 21(9) 1104–1111

DOI: 10.1177/
1352458514556302

© The Author(s), 2014.
Reprints and permissions:
[http://www.sagepub.co.uk/
journalsPermissions.nav](http://www.sagepub.co.uk/journalsPermissions.nav)

Correspondence to:

Fuencisla Matesanz
Departamento de Biología
Celular e Inmunología,
Instituto de Parasitología y
Biomedicina López Neyra
(IPBLN), Consejo Superior
de Investigaciones Científicas
(CSIC), 18016 Granada,
Spain.
lindo@ipb.esic.es

María Isabel García-Sánchez
Juan Luis Ruiz-Peña
Unidad de Esclerosis
Múltiple, Hospital
Universitario Virgen
Macarena, Sevilla, Spain

Mercedes Delgado-García
Guillermo Izquierdo
Unidad de Esclerosis
Múltiple, Hospital
Universitario Virgen
Macarena, Sevilla, Spain/
These authors contributed
equally to this work

Antonio Alcina
María Fedetz
Departamento de Biología
Celular e Inmunología,
Instituto de Parasitología y
Biomedicina López Neyra
(IPBLN), Consejo Superior
de Investigaciones Científicas
CSIC, 18016 Granada, Spain

Fuencisla Matesanz
Departamento de Biología
Celular e Inmunología,
Instituto de Parasitología y
Biomedicina López Neyra
(IPBLN), Consejo Superior
de Investigaciones Científicas
CSIC, 18016 Granada, Spain/
These authors contributed
equally to this work

Óscar Fernández
María Jesús Pinto Medel
Laura Leyva
Unidad de Gestión Clínica
de Neurociencias, Instituto
de Biomedicina de Málaga
(IBIMA), Hospital Regional
Universitario de Málaga,
Málaga, Spain