

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
FACULTAD DE MEDICINA
Departamento de Microbiología I



TESIS DOCTORAL

Biomarcadores de respuesta al interferón beta en la esclerosis múltiple

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR

PRESENTADA POR

Raquel Alenda Asensi

Directores

Luisa María Villar Guimerans
José Carlos Álvarez Cermeño

Madrid, 2017

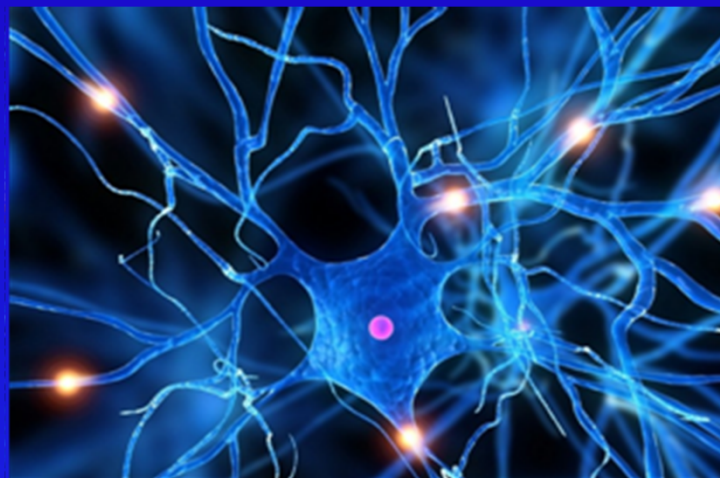
UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

Facultad de Medicina

Departamento de Microbiología I



**BIOMARCADORES DE RESPUESTA AL
INTERFERÓN BETA EN LA ESCLEROSIS
MÚLTIPLE**



Raquel Alenda Asensi

Madrid 2015



**Departamento de Microbiología I
FACULTAD DE MEDICINA
UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID**

**“BIOMARCADORES DE RESPUESTA AL INTERFERON
BETA EN LA ESCLEROSIS MÚLTIPLE”**

**Raquel Alenda Asensi
Licenciada en Biología**

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 de 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 Raquel Alenda Asensi ha realizado bajo su dirección su Tesis Doctoral titulada: “**BIOMARCADORES DE RESPUESTA AL INTERFERÓN BETA EN LA 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 catorce de octubre de 2015

Fdo: Dña. LUISA MARÍA VILLAR GUIMERANS

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

CERTIFICA: Que Doña Raquel Alenda Asensi ha realizado bajo su dirección su Tesis Doctoral titulada: **“BIOMARCADORES DE RESPUESTA AL INTERFERÓN BETA EN LA 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 catorce de octubre de 2015

Fdo: D. JOSÉ CARLOS ÁLVAREZ CERMEÑO

**A mis padres
y hermano**

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar, quiero agradecer a mis directores de tesis, la Dra. Luisa María Villar Guimerans y el Dr. José Carlos Álvarez Cermeño, por darme la oportunidad de llevar a cabo mi tesis en la Unidad de esclerosis múltiple del Hospital Universitario Ramón y Cajal, en un tema tan interesante para mí. Os agradezco el que me hayáis guiado en este largo camino que es hacer una tesis y todo lo que he aprendido de vosotros tanto profesional como personalmente.

Al Dr. Javier Coll, antiguo jefe de Servicio de Inmunología por facilitarme la incorporación al grupo de esclerosis múltiple durante mis años de residencia y por haberme permitido continuar este trabajo una vez terminada la misma. A nivel personal agradecerme que hayas sido la persona que más me ha animado a terminar esta tesis.

A Roberto Álvarez-Lafuente del Hospital Clínico San Carlos por la determinación de los anticuerpos anti-IFN-beta.

A Óscar Pastor del Servicio de Bioquímica del Hospital Ramón y Cajal por la cuantificación de los niveles de vitamina en suero.

A la Unidad de esclerosis múltiple del Hospital Vall D'Hebrón por la aportación de muestras para la validación de los biomarcadores.

A Lucciene Costa-Frossard y Susana Sainz, neurólogas de la Unidad de esclerosis múltiple del Hospital Ramón y Cajal, por su inestimable ayuda en la recopilación de datos clínicos de los pacientes.

Al personal técnico y de enfermería de la unidad de esclerosis múltiple, Dani, Belén y Ásun por su trabajo en la obtención y procesamiento de las muestras.

A Rosa del Campo, facultativo del Servicio de Microbiología del Hospital Ramón y Cajal por sus habilidades reclutando controles sanos.

A todos los pacientes y a todos los voluntarios que han participado como controles sanos, tanto del Servicio de Inmunología como del Servicio de Microbiología del Hospital Ramón y Cajal, en el estudio.

Agradecer también a los facultativos de Inmunología especialmente a Ernesto Roldán, facultativo de la sección de I. celular, por la aportación de sus conocimientos en citometría de flujo a este trabajo. A Lali Rodríguez, facultativo de la sección de I. celular por todo lo que me ha enseñado de citometría de flujo, por estar dispuesta siempre a resolverme cualquier duda y por todos los momentos que hemos compartido juntas desde que llegué al laboratorio. A Garbiñe Roy, facultativo de la sección de autoinmunidad por haber sido mi tutora en el doctorado y por ayudarme con los trámites de la tesis. A ellos y al resto de facultativos (Ángela Carrasco, José Luis Castañer, Ana de Andrés, Mercedes Espiño, Pedro González-Porqué, Nora Clerici, Manuela Cuevas) agradecerles todos los conocimientos que me han enseñado durante mi residencia.

A todos mis compañeros de Inmunoquímica pasados y presentes: Cruz, Nieves y Mercedes por haberme acogido en la sección cuando llegué y por resolver todas mis dudas cuando todavía era muy novata. A Carmen por su ayuda en la búsqueda y captura de muestras en el nitrógeno y por escucharme en los buenos y no tan buenos momentos. Al personal técnico de la sección Mercedes e Isa, de vosotras he aprendido como se trabaja en el laboratorio.

A todos mis compañeros de residencia, porque con todos ellos he compartido buenos momentos tanto dentro como fuera del laboratorio y por todo lo que hemos aprendido juntos tanto profesionalmente como de la vida durante esos cuatro años. De estos años nombrar especialmente a Gabi, porque no podría haber tenido mejor CoR, a Inma, por haberme hecho caso y elegir el Ramón y Cajal para hacer su residencia, a Silvia, porque las circunstancias de la vida hicieron que acabáramos viviendo juntas y por todo lo que eso nos ha aportado, Cristina, por enseñarme otra forma de decir las cosas y a Eva, porque de ella aprendí lo que es el orden en el laboratorio.

A todos los compañeros que llegaron tras mi residencia, con los que también he pasado muy buenos momentos, especialmente a Paula, por ser mi médico de urgencias, a Israel, por resolver todos mis problemas informáticos, a Amalia por ser la persona que más veces me ha preguntado cómo llevo la tesis y a Miguel Ángel por todos los ánimos.

De fuera del laboratorio no podría dejar de nombrar a mi grupo de amigos de Madrid, porque vosotros habéis sido mi familia aquí durante todos estos años: A Ida, ir a Suecia ha sido una de mis mejores decisiones y una de las razones de ello fue conocerte, por todo lo que hemos vivido juntas y por todo lo que nos queda por vivir. A Gema, Palma, Vicen, Miguel y David; porque vosotros mejor que nadie habéis entendido por lo que estaba pasando, por todos los ánimos y porque pronto tendremos que repetir esa foto de doctores. Y a Elia, nuestra última incorporación, gracias por todos los ánimos.

A todas mis amigas de Aspe (Diana, M^a Isabel, Almudena, Milagros, Olga, Ana, Nieves y Pili) y a mis amigos de la Universidad (Cristina, Irene, Mabel, Esperanza, Javi B, Javi A, Cuti y Alex) por todos los momentos compartidos juntos en una época de mucho crecimiento.

A Ana y Vanesa, mis compañeras de Oviedo, porque junto a vosotras empezó todo.

A todo el grupo de marionetas (Laura, Blas, Ida, Alicia, Marisa, Javi, Alberto, Rosa, Robert, Simona, Nuria, Rosa y Charo) por todo lo que hemos compartido juntos y por todo lo que me habéis animado durante estos dos años.

Por último pero no menos importante a mi familia; A mí hermano, por todos los consejos que me has dado y por estar ahí cuando te he necesitado. A mi cuñada, porque gracias a ti estoy un poquito más cerca de vosotros con todas las fotos que me mandas, a mis sobrinos; porque verlos es de las cosas que más alegría me producen. El agradecimiento más especial para mis padres por haber confiado siempre en mí, apoyado todas mis elecciones y darme la fuerza para seguir adelante; porque todo lo que soy y llegué a ser en la vida os lo debo a vosotros.

A todos los que habéis formado parte de mi vida en algún momento, ya que habéis dejado un pedacito de vosotros en mí.

ÍNDICE

ABREVIATURAS	19
RESUMEN.....	23
1-INTRODUCCIÓN.....	37
1.1- ASPECTOS HISTÓRICOS.....	40
1.2- EPIDEMIOLOGIA.....	41
1.3- ETIOPATOGENIA	42
1.3.1- Factores genéticos	42
1.3.2- Factores epigenéticos.....	44
1.3.3-Factores ambientales	45
1.4-FORMAS CLÍNICAS	51
1.5-DIAGNÓSTICO	51
1.5.1-Resonancia magnética.....	52
1.5.2-Potenciales evocados	53
1.5.3-Estudio de LCR.....	53
1.6-FISIOPATOLOGIA	55
1.6.1-Principales antígenos que se han implicado en la EM.....	56
1.7-PRINCIPALES POBLACIONES CELULARES QUE SE HAN ASOCIADO CON LA EM	57
1.7.1-Linfocitos T	57
1.7.2-Linfocitos B y anticuerpos.....	60
1.7.3-Linfocitos B CD5+.....	63
1.7.4-Células natural killer.....	64
1.7.5-Microglía, macrófagos inflamatorios y activina A	65

1.8-TRATAMIENTO	67
1.8.1- Descubrimiento del interferón	68
1.8.2- Clasificación de los interferones	68
1.8.3- El interferón como tratamiento en la esclerosis múltiple ...	69
1.8.4- El interferón-beta 1b.....	70
1.8.5- El interferón-beta 1a.....	70
1.8.6- Mecanismos de acción del IFN-beta	71
1.8.7- Efectos secundarios de la terapia con interferón-beta	73
1.8.8- Anticuerpos neutralizantes frente a interferón-beta	74
1.9- BIOMARCADORES DE RESPUESTA A TRATAMIENTO	77
2- OBJETIVOS	79
3- MATERIALES Y MÉTODOS	83
3.1- PACIENTES Y MATERIALES	85
3.1.1- Pacientes	85
3.1.2- Muestras biológicas	85
3.1.3- Anticuerpos monoclonales utilizados para el estudio de poblaciones linfocitarias en sangre	86
3.1.4- Materiales usados para la estimulación celular utilizadas en el estudio intracelular de citoquinas.....	87
3.1.5- Materiales usados para la cuantificación de niveles de citoquinas en suero	88
3.1.6- Materiales usados para la cuantificación de niveles de vitaminas en suero	88
3.1.7- Materiales usados para la cuantificación de activina A en suero	88
3.2- DISEÑO DEL ESTUDIO	88
3.2.1- Definición del estudio	88
3.2.2- Duración del estudio	89

3.2.3- Criterios para definir una respuesta óptima a Interferón-beta	89
3.2.4- Protocolo RM	89
3.2.5- Seguimiento clínico del paciente.....	90
3.3- MÉTODOS	91
3.3.1- Detección de anticuerpos neutralizantes anti-IFN-beta	91
3.3.2- Detección de vitamina A y E.....	94
3.3.3- Detección de vitamina D	94
3.3.4- Detección de Activina A en suero.....	94
3.3.5- Detección de citoquinas solubles en suero.....	95
3.3.6- Estudio de poblaciones celulares en sangre periférica.....	97
3.3.7- Estudio de citoquinas intracitoplasmáticas, perforina y expresión de FoxP3 por citometría de flujo	99
3.3.7.1- Separación de células mononucleares.....	99
3.3.7.2- Estudio de citoquinas intracitoplasmáticas: TNF-alfa, IFN- gamma, IL-17 e IL-10	99
3.3.7.3- Estudio de producción de IL-10 por los linfocitos B.....	103
3.3.7.4- Estudio de factores de transcripción FoxP3	104
3.3.7.5- Estudio de expresión de perforina por los linfocitos T citotóxicos y las células NK y NKT	106
3.3.8- Análisis estadístico.....	108
4- RESULTADOS.....	109
4.1- DATOS DEMOGRÁFICOS.....	111
4.2- ABANDONOS DE TRATAMIENTO	112
4.3- ESTUDIO DE ANTICUERPOS NEUTRALIZANTES ANTI- INTERFERÓN BETA (NAbs)	113
4.3.1- Presencia de anticuerpos en relación con el tratamiento	114

4.7.3- Estudio del efecto inmunosupresor de las células reguladoras	155
5- DISCUSIÓN.....	159
5.1- PLANTEAMIENTO DEL ESTUDIO	163
5.1.1- Valoración de la respuesta al tratamiento	163
5.1.2- Anticuerpos neutralizantes anti-IFN-beta (NAbs).....	164
5.1.3- Estrategia del estudio	166
5.2- BIOMARCADORES SOLUBLES	167
5.2.1- Citoquinas solubles	167
5.2.2- Vitaminas	168
5.2.3- Activina A.....	174
5.3- BIOMARCADORES CELULARES	175
5.3.1- Linfocitos T CD4+.....	176
5.3.2- Linfocitos T CD8+.....	179
5.3.3- Linfocitos B.....	181
5.3.4- Células NK y NKT	186
5.3.5- Efecto inmunosupresor de las células reguladoras	189
5.4- CONSIDERACIONES FINALES.....	190
6- CONCLUSIONES.....	193
7- BIBLIOGRAFÍA.....	197
ANEXOS.....	231
-Patente obtenida como resultado de estos estudios	
-Publicaciones durante la tesis	

ABREVIATURAS

ABREVIATURAS

APC	Aloficocianina
ARN	Ácido ribonucleico
ARNm	Ácido ribonucleico mensajero
BHE	Barrera hematoencefálica
BOC	Bandas oligoclonales
BOCML+	Bandas oligoclonales de IgM específicas frente a lípidos
CD	Cúmulo de diferenciación (cluster of differentiation)
CNP	2'-3'- fosfodiesterasa de nucleótidos cíclicos 3'
Cy	Cianina
DMSO	Dimetil sulfóxido
EAE	Encefalitis autoinmune experimental
EBNA-1	Antígeno nuclear de Epstein-Barr
EDSS	Escala expandida del estado de discapacidad (<i>expanded standard disability statu scale</i>)
ELISA	Ensayo de inmunoabsorción ligado a enzima
EM	Esclerosis múltiple
EMRR	Esclerosis múltiple remitente recidivante
FITC	Isocianato de fluoresceína
FoxP3	Forkhead box protein 3
FRO	Fenotipo de respondedor óptimo
FRSO	Fenotipo de respondedor subóptimo
GWAS	Genome-wide association study
HHV-6	Herpes virus humano 6 (human herpesvirus 6)
HLA	Antígeno leucocitario humano
IFN	Interferón
IgG	Inmunoglobulina G
IgM	Inmunoglobulina M
IL	Interleucina
LCR	Líquido cefalorraquídeo
MAG	Glicoproteína asociada a la mielina
MBP	Proteína básica de la mielina

MCP	Proteína principal de la cápside
MHC	Complejo mayor de histocompatibilidad
MiR	Micro ácido ribonucleico
MOG	Proteína de la mielina del oligodendrocito
NAbs	Anticuerpos neutralizantes
NK	Células natura killer
NR	No respondedor
ODN	Oligonucleótido
OMS	Organización Mundial de la Salud
PE	Ficoeritrina
PLP	Proteína proteolipídica
R	Respondedor
RC	Hospital Ramón y Cajal
RMN	Resonancia magnética nuclear
SNC	Sistema nervioso central
Svcam	Molécula de adhesión vascular sérica
TCR	Receptor de células T
Th	Linfocitos T colaboradores
TNF-alfa	Factor de necrosis tumoral (<i>necrosis tumoral factor</i>)
Treg	Linfocitos T reguladores
VDH	Hospital Vall D´Hebrón
VIH	Virus de la inmunodeficiencia humana
VLA	Antígeno leucocitario vascular

RESUMEN

Introducción

La esclerosis múltiple (EM) es una enfermedad crónica del sistema nervioso central (SNC) que se caracteriza por presentar desmielinización, inflamación y daño axonal.

El Interferón beta (IFN-beta) fue el primer fármaco inmunomodulador usado en el tratamiento de la esclerosis múltiple remitente-recidivante (EMRR). Es un fármaco seguro y eficaz, capaz de disminuir la actividad de la enfermedad. Sin embargo, la respuesta a este tratamiento no es uniforme en todos los pacientes de EM. Por ello, dado el gran abanico de opciones terapéuticas que existen en la actualidad, la búsqueda de biomarcadores que permitan identificar de manera precoz a los pacientes con alta probabilidad de mostrar una respuesta óptima al interferón beta es de gran relevancia para poder realizar una medicina personalizada en la EM. Hasta ahora son los marcadores clínicos y radiológicos los que más se utilizan para establecer la eficacia de las distintas opciones terapéuticas. Sin embargo, esto implica un cierto deterioro para los pacientes no respondedores que puede repetirse con distintas terapias.

Objetivos

El primer objetivo del estudio fue identificar antes del inicio del tratamiento, biomarcadores biológicos que predigan la respuesta a IFN-beta.

En segundo lugar comparamos los niveles de todos los posibles marcadores incluidos en el estudio con los de los controles sanos.

Nuestro último objetivo fue analizar los cambios que el tratamiento podría inducir en todos los factores estudiados.

Materiales y métodos

Estudiamos 119 pacientes con EMRR y 30 controles sanos. Los pacientes fueron seguidos durante dos años y clasificados según su respuesta al tratamiento. Se consideraron como respondedores a aquellos que no presentaron nuevos brotes, nuevas lesiones en resonancia magnética nuclear (RMN) o progresión de la discapacidad medida mediante la escala EDSS durante el seguimiento. Como “no respondedores” se consideraron a aquellos que mostraron alguna de estas manifestaciones de la enfermedad a lo largo del estudio. Obtuvimos muestras de los pacientes al inicio y a los seis meses de tratamiento. Al año de tratamiento estudiamos la presencia de anticuerpos neutralizantes anti-IFN-beta y excluimos a los pacientes con anticuerpos positivos del estudio ya que estos disminuyen la biodisponibilidad del fármaco y pueden mediar “per se” una respuesta subóptima independiente de los biomarcadores biológicos prospectivos. Realizamos de forma prospectiva el estudio de diferentes subpoblaciones celulares T, B y NK mediante citometría de flujo (FACSCanto II). Evaluamos diferentes respuestas inmunológicas mediante marcajes intracelulares con FoxP3 y IL-10 (células reguladoras), TNF-alfa, IFN-gamma y IL-17 (respuesta inflamatoria) y perforina (respuesta citotóxica). Estudiamos también moléculas solubles relacionadas con la EM tales como citoquinas, vitaminas y Activina A en suero. A continuación estudiamos a los 6 meses de tratamiento si algunas de las moléculas y las poblaciones celulares estudiadas se asociaban con la respuesta óptima a IFN beta.

Resultados

Al inicio del tratamiento no encontramos relación entre los valores séricos de distintas citoquinas en suero y la respuesta al tratamiento, posiblemente porque al secretarse de manera paracrina puede ser difícil que en el suero se reflejen las variaciones de las mismas. Las vitaminas liposolubles tampoco fueron buenos biomarcadores de respuesta al tratamiento con IFN-beta. Sin embargo, hemos confirmado que la vitamina D se encuentra disminuida en el suero de pacientes respecto a controles sanos y hemos descrito que este fenómeno se produce tanto en épocas de baja como de alta exposición solar y que existe una correlación inversa entre la disminución de vitamina D y el aumento de células T CD4+ productoras de IFN-gamma en pacientes de EM. Del mismo modo se encontró que la vitamina E esta disminuida en los pacientes de EM respecto de los controles sanos, lo cual podría explicarse por un elevado consumo de la misma ya que dicha vitamina se encarga de la eliminación de radicales libres, los cuales contribuyen al proceso de desmielinización.

La activina A, el último biomarcador soluble analizado, tampoco se asocia con la respuesta al tratamiento, pero, contrariamente a lo que ocurre con las vitaminas, se encuentra aumentada en los pacientes con EM respecto a los controles. Esto puede explicarse por su papel en la diferenciación de macrófagos pro-inflamatorios, que parecen jugar un papel importante en el mantenimiento de la inflamación en la EM.

En el estudio de las subpoblaciones celulares encontramos dos marcadores predictivos de respuesta a tratamiento con IFN-beta. Un porcentaje elevado de linfocitos de B CD5+ inferior al 3%, un porcentaje elevado de

linfocitos T CD8+Perforina+ y niveles disminuidos de células T reguladoras predicen una respuesta óptima al tratamiento con IFN-beta, siendo los dos primeros marcadores los que alcanzan unos niveles mayores de significación. El estudio de validación en una cohorte de pacientes del Hospital Vall d'Hebrón confirmó el hallazgo obtenido sobre los linfocitos T CD8+Perforina+ y puso de manifiesto que la determinación de los linfocitos B CD5+ deben llevarse a cabo en sangre fresca no siendo útil su determinación en células congeladas. Al comparar estos biomarcadores con controles se observó que los linfocitos B CD5+ estaban disminuidos y los linfocitos T CD8+Perforina+ estaban aumentados en los controles respecto a los pacientes de EM.

Por último se estudiaron de forma prospectiva las mismas células y moléculas estudiadas antes del tratamiento a los seis meses del inicio del mismo. Observamos un incremento en el grupo de respondedores óptimos de tres subpoblaciones celulares con acción reguladora: las células T CD4+CD25^{high}FoxP3⁺ (Treg), las células B productoras de IL-10 (Breg) y las células NK CD56^{bright}.

Conclusiones

Los resultados de nuestro trabajo mostraron que alrededor de un tercio de los pacientes tratados con interferón beta permaneció libre de actividad de la enfermedad durante los dos años de duración del estudio. Confirmó la necesidad de monitorizar la presencia de anticuerpos neutralizantes anti-IFN-beta en los estudios de biomarcadores ya que un 9% de los pacientes tratados desarrolló anticuerpos neutralizantes anti IFN-beta. La presencia de estos anticuerpos se asoció en todos los casos con una respuesta subóptima al

tratamiento. Al estudiar las moléculas solubles no se ha encontrado correlación entre los niveles de citoquinas séricas o los niveles de vitaminas liposolubles con la respuesta a IFN beta en la EM. Los niveles disminuidos de vitamina D presentes en pacientes con EM se producen tanto en meses de alta como de baja radiación solar, lo que sugiere un consumo elevado de esta vitamina en esta patología. Existe una correlación inversa entre los niveles de vitamina D y el porcentaje de linfocitos T CD4+ productores de IFN-gamma en sangre en la EM. Esto sugiere que esta vitamina puede contribuir a frenar la respuesta inflamatoria en esta enfermedad. La activina A, molécula que favorece un fenotipo pro-inflamatorio en los macrófagos, se encuentra aumentada en los pacientes de EM. Esto podría indicar un papel para esta molécula en la activación de la inmunidad innata en la EM. En el estudio de subpoblaciones celulares hemos identificado que un porcentaje bajo de linfocitos B CD5+ y un porcentaje elevado de linfocitos T CD8+Perforina+ presentes antes del inicio del tratamiento se asocian con una respuesta óptima al IFN beta. A los 6 meses hemos observado que la respuesta óptima al IFN-beta se asocia con un incremento los niveles de células T, B y NK reguladores en sangre. Estos datos parecen indicar que el éxito de esta terapia puede estar mediado por el incremento de células reguladoras.

Estos estudios contribuyen a identificar a los respondedores óptimos a IFN-beta y aportan nuevos datos sobre el mecanismo de acción de dicho fármaco en la EM.

Introduction

Multiple sclerosis (MS) is a chronic disease of the central nervous system (CNS) characterized by presenting with demyelination, axonal damage and inflammation.

Interferon beta (IFN-beta) was the first immunomodulatory drug used in the treatment of relapsing-remitting multiple sclerosis (RRMS). It is a safe and effective treatment able to diminish the activity of the disease. However, the response to this treatment is not uniform in all MS patients. Therefore, given the wide range of therapeutic options existing actually in MS, the search for biomarkers that allow the early identification of patients with high probability of showing an optimal response to beta interferon is of great importance to perform a personalized medicine in MS. Actually, the most used markers to establish treatment efficacy are clinical and radiological data. However, this implies certain deterioration for non-responder patients, which may occur with different therapies.

Objective

The first objective of the study was to identify, before treatment initiation, biomarkers that predict patient response to IFN-beta.

Secondly we compared the levels of the different molecules and cell subsets included in the study with healthy controls.

Our ultimate goal was to analyse the changes induced by treatment in all the factors studied.

Materials and methods

We studied 119 patients with relapsing-remitting MS and 30 healthy controls. Patients were followed up for two years and classified according to their response to treatment. Responders were defined as those who did not develop new relapses, new lesions on magnetic resonance imaging (MRI) or progression of disability measured by the EDSS score during follow up. As "non-responders" we considered those patients who showed any of these manifestations of the disease during the study. Patient samples were obtained at baseline and after six months of treatment. After a year of treatment, we studied the presence of neutralizing anti-IFN-beta antibodies and excluded patients positive for these antibodies from the subsequent studies since they decrease the bioavailability of the drug and may mediate "per se" an suboptimal response independent of prospective biological biomarkers. We studied prospectively different T, B and NK cell subsets by flow cytometry (FACSCanto II). We evaluate different immune responses by intracellular marking with FoxP3 and IL-10 (regulatory cells), TNF-alpha, IFN-gamma and IL-17 (inflammatory response) and perforin (cytotoxic response). WE also studied serum levels of soluble molecules that have been related to MS like cytokines, vitamins and Activin A. We also studied changes induced in the different factors included in the study after six months of treatment and evaluated if any of them were associated with an optimal response to IFN beta.

Results

At baseline we found no relationship between serum cytokine levels and response to treatment, possibly because they are secreted in a paracrine way

not well reflected in serum. Fat-soluble vitamins are also not good biomarkers of response to treatment with IFN-beta either. However, we confirmed that vitamin D is decreased in the serum of MS patients compared to healthy controls and observed that this phenomenon occurs in times of low and high sun exposure. Additionally we found an inverse correlation between serum vitamin D levels and the percentages of CD4 + T cells producing IFN-gamma in MS patients. Similarly we found that the serum vitamin E levels are decreased in MS patients compared to healthy controls, which could be explained by a high consumption since this vitamin is responsible for the elimination of free radicals which may contribute to the demyelination in MS.

Activin A, which contributes to activate inflammation by innate immune response was also not associated with response to IFN beta treatment, but we showed that it was increased in serum of MS patients compared with controls. This can be explained by their role in differentiation of pro-inflammatory macrophages which seem to play an important role in maintaining inflammation in MS.

The study of cell subpopulations revealed two predictive markers of response to treatment with IFN-beta. A percentage of CD5 + B lymphocytes was lower than 3%, high percentages of CD8+, perforin+ T lymphocytes and decreased levels of regulatory T cells predict optimal response to treatment with IFN-beta, with the first two markers reaching higher levels of significance. A validation study in a cohort of patients from the Vall d'Hebron Hospital confirmed our results with CD8+, perforin+ T lymphocytes and indicated that the determination of CD5+ B cells should be carried out in fresh blood not being used this assay in frozen cells. When compared these biomarkers in MS and controls we observed that

CD5 + B cells were decreased and CD8+, perforin+ T cells were increased in controls with respect to MS patients.

Finally, we studied the variations of different cells and molecules included in the study induced after six months of IFN beta treatment. An optimal response to interferon beta associated with an increase of three regulatory subsets: CD4+,25highFoxP3+ T cells (Treg) T, B cells producing IL-10 (Breg) and CD56bright NK cells.

Conclusions

Our results showed that about one third of patients treated with interferon beta remained free of disease activity over the two years of the study. We confirmed the need of monitoring the presence of neutralizing anti-IFN-beta in biomarker studies as 9% of treated patients developed neutralizing antibodies to IFN-beta, which were associated in all cases with a suboptimal response to treatment. We did not find correlation between serum levels of cytokines or of fat-soluble vitamins with the response to IFN beta in MS. Decreased levels of vitamin D present in MS patients occurred both in months of high and low solar radiation. This suggests a high consumption of this vitamin in the disease. There was an inverse correlation between serum vitamin D levels and the percentage of peripheral blood CD4+ T cells producing IFN-gamma in MS. This suggests that vitamin D may help to counteract the inflammatory response in the disease. Activin A, a molecule that favours a pro-inflammatory phenotype in macrophages, was increased in MS patients. This could indicate a role for this molecule in the activation of innate immunity in MS. When studying different immune cell subpopulations we identified that a low percentage of CD5+ B cells

and a high percentage of CD8+perforin+ T lymphocytes before treatment initiation associated with an optimal response to IFN beta. After 6 months of treatment, we observed increased levels of T, B and NK regulatory cells in optimal responders to IFN beta. These data suggest that response to this therapy may be mediated by an increase in regulatory cells.

These studies help to identify MS patients with high probability of showing an optimal response to IFN-beta and provide new data on the mechanism of action of this drug in MS.

PUBLICACIONES

- Identification of the major HHV-6 antigen recognized by CSF IgG in multiple sclerosis.

Alenda R, Álvarez-Lafuente R, Costa-Frossard L, Arroyo R, Mirete S, Álvarez-Cermeño JC, Luisa; Villar LM.

Eur J Neurol. 2014 Aug; 21(8):1096-101.

-CSF immunological biomarkers associated with axonal damage in multiple sclerosis

Villar L, Picón C, Costa-Frossard L, **Alenda R**, Garcia-Caldentey J, Espiño M, Muriel A, Alvarez-Cermeño JC.

Eur J Neurol. 2015 Aug; 22(8):1169-75

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

Rodríguez-Martín E, Picón C, Costa-Frossard L, **Alenda R**, Sainz de la Maza S, Roldán E, Espiño M, Villar LM, Álvarez-Cermeño JC.

Clin Exp Immunol. 2015 May; 180(2):243-9

-Translocated LPS might cause endotoxin tolerance in circulating monocytes of Cystic Fibrosis patients.

del Campo R, Martínez E, del Fresno C, **Alenda R**, Gómez-Piña V, Fernández- Ruiz I, Siliceo M, Jurado T, Toledano V, Arnalich F, García-Río F, López-Collazo E.

PLoS One. 2011; 6(12):e29577.

1. INTRODUCCIÓN

La esclerosis múltiple (EM) es una enfermedad inflamatoria crónica del sistema nervioso central, es una de las causas más comunes de discapacidad neurológica en adultos jóvenes.¹

En la actualidad la EM sigue siguiendo una enfermedad de etiología desconocida cuyo inicio se postula que se produce como consecuencia de la interacción entre factores genéticos y ambientales.

Se estima que más de 2 millones de personas tienen EM en el mundo. Su prevalencia es mayor en mujeres que en hombres con un ratio de 3:1.¹ La prevalencia de la enfermedad ha aumentado a lo largo de los años.², siendo este aumento mayor en mujeres que en hombres.^{3,4}

Típicamente la EM se presenta en la tercera o cuarta década de la vida siendo la prevalencia en edad pediátrica baja.⁵ Se caracteriza por la aparición de lesiones focales de desmielinización.⁶ Los patrones de desmielinización son diferentes entre subgrupos de pacientes, lo que sugiere que la enfermedad es heterogénea^{7 8}. Esta heterogeneidad se manifiesta en la presentación clínica y radiológica, las características anatomopatológicas y la respuesta a tratamiento.

Dependiendo de la localización de las placas de desmielinización, los pacientes van a presentar diferentes manifestaciones clínicas entre las que se incluyen debilidad en uno o más miembros, déficits sensoriales, ataxia, alteraciones visuales etc. Estos síntomas se manifiestan normalmente en forma de brotes y solo en ocasiones tienen una evolución progresiva desde el inicio de la patología. Además de la desmielinización se puede producir daño axonal, tanto en las placas de desmielinización como en las zonas de sustancia blanca

aparentemente normal. Se acepta que el daño axonal origina la discapacidad a largo plazo.⁶

1.1-ASPECTOS HISTÓRICOS

La descripción de las primeras lesiones anatomopatológicas fue llevada a cabo por dos médicos europeos, Robert Carswell en 1838^{9,10} y Jean Cruveilhier en 1841¹¹. Sin embargo, la identificación de la enfermedad como tal la realizó Jean Martin Charcot¹² en 1868 estableciendo la primera descripción clínica y anatómica detallada de la enfermedad.

En cuanto a la etiología, la primera relación de la EM con una posible causa infecciosa data de 1884 cuando Pierre Marie observó que el empeoramiento de los pacientes ocurría después de sufrir periodos de infección o fiebre¹³.

La consideración de la EM como una enfermedad autoinmune fue introducida por Thomas Rivers tras demostrar que la encefalitis autoinmune experimental (EAE), el modelo animal de la EM, podía ser producida por una respuesta autoinmune frente a componentes autólogos del SNC.¹⁴

Otro hecho relevante es la primera punción lumbar que se realizó en 1891 por el médico alemán Quincke. Esto permitió el inicio del estudio del líquido cefalorraquídeo (LCR).¹⁵

La primera prueba del papel del sistema inmune en esta patología se obtuvo en 1942 cuando Elvin Kabat determinó un aumento de inmunoglobulinas en el LCR de pacientes con EM.¹⁶

Desde el punto de vista clínico, merece la pena destacar que la primera escala para definir el estado de discapacidad física de los pacientes, la

Disability Status Scale (DDS) fue desarrollada por Kurtzke en 1955.¹⁷ con una versión ampliada en 1983, *Expanded Disability Status Scale*,¹⁸ que es la que se utiliza actualmente para evaluar el grado de discapacidad en la EM.

Los primeros criterios diagnósticos de la enfermedad, basados sobre todo en datos clínicos, fueron publicados por Schumacher en 1965.¹⁹ Desde entonces el diagnóstico se basa en la demostración de diseminación de las lesiones en tiempo y espacio. En 1983, Poser publicaba unos nuevos criterios que incluían pruebas paraclínicas en el diagnóstico de *la EM*.²⁰ Estos criterios diagnósticos fueron mejorados por McDonald en 2001, incluyendo los nuevos datos de resonancia magnética nuclear²¹. La versión revisada de estos criterios (2010) es la que está vigente en la actualidad.²²

1.2-EPIDEMIOLOGIA

La prevalencia de la EM varía considerablemente en distintas zonas geográficas, siendo la enfermedad desmielinizante más frecuente en las zonas templadas.²³ Las áreas de mayor prevalencia son: Europa del Norte, Norteamérica y el sur de Australia²⁴. Sin embargo existen algunas excepciones, como el caso de Sicilia (200/100.00 habitantes) que presenta una prevalencia mayor que la de la zona geográfica circundante.²⁵

La prevalencia de la esclerosis múltiple está aumentando en los últimos años, principalmente en mujeres, sin que se conozca aún la causa de este fenómeno.²⁶

En España los primeros estudios epidemiológicos situaron la prevalencia en 50-60 casos por cada 100.000 habitantes. Sin embargo diferentes estudios publicados recientemente muestran que también está aumentando en nuestro

país siendo en la actualidad de entre 100 y 120 casos por cada 100.000 habitantes.^{27,28}

Se ha demostrado en estudios de poblaciones que la migración durante la infancia desde regiones de alto riesgo hacia regiones de bajo riesgo se asocia con una reducción de la susceptibilidad a sufrir la enfermedad y viceversa. Esto no sucede con la migración en edad adulta.²⁹⁻³² Todo ello sugiere un posible papel de un agente ambiental en la etiopatogenia que actuaría en edades tempranas.

1.3-ETIOPATOGENÍA

Las causas exactas que desencadenan la EM no se conocen en la actualidad. Sin embargo se acepta que su inicio se produce por una interacción entre factores ambientales y factores genéticos.

1.3.1- Factores genéticos

La implicación de factores genéticos en la susceptibilidad a EM se apoya fundamentalmente en dos hechos.

El primero es la existencia de un mayor riesgo de padecer EM entre los familiares de los paciente.^{33,34} En estudios familiares se ha observado que los hermanos de un solo progenitor tienen la mitad de riesgo de desarrollar EM que los hermanos de ambos progenitores y los hermanos adoptados no tienen mayor riesgo que la población general.³⁵

El segundo son los datos sobre concordancia entre gemelos monocigóticos que no dejan lugar a dudas sobre la existencia de un fuerte componente familiar en la EM. La concordancia entre gemelos monocigóticos

es del 30% frente al 5% en gemelos dicigóticos y otros hermanos.³⁶⁻³⁸ El riesgo absoluto es menor al 5% en individuos con un pariente en primer grado; sin embargo; este ya es de 20 a 40 veces más alto que en la población general.³⁹ Sin embargo, aún entre gemelos monocigóticos, la concordancia dista mucho de ser completa por lo que se deduce que los factores genéticos no pueden ser los únicos responsables del desencadenamiento de la enfermedad.

Se han llevado a cabo grandes esfuerzos para encontrar los genes de susceptibilidad a padecer EM. Más de 20 regiones genómicas se han asociado con un aumento de la susceptibilidad a la enfermedad⁴⁰⁻⁴⁴ Sin embargo, es dentro de la región perteneciente al complejo mayor de histocompatibilidad humano (HLA) localizado en el cromosoma 6 donde se ha establecido un asociación más fuerte. Un Genome-Wide Association Study (GWAS) colaborativo donde se incluyeron 9772 muestras recogidas por 23 grupos diferentes en 15 países distintos confirmó la asociación entre HLA-DRB1*15:01⁴⁵⁻⁴⁸ y la EM.⁴⁶ En este mismo estudio se encontró asociación con HLA-DRB1*13:03, DRB1*03:01 y A*02:01.⁴⁶

Además de los genes localizados en la región HLA se observa que hay múltiples genes, principalmente relacionados con la respuesta inmunitaria, que se asocian de forma débil con la susceptibilidad a la EM. Entre ellos se encuentran dos variantes genéticas de los receptores de IL-2^{49,51} y IL-7^{49,52,53}, una variante del CD6^{54,55}, una variante de la tirosina quinasa 2^{56,57} y los genes del receptor de TNF-alfa^{54,58}, CD58, CD40 y METTL1.⁵⁹⁻⁶¹ También se ha observado asociación de la enfermedad con una variante del gen *CYP27B1* que codifica una enzima que participa en el metabolismo de la vitamina D.⁶²

Estos estudios genéticos ponen de manifiesto que la EM no está determinada por un único gen sino que su aparición y desarrollo se produce por la interacción de múltiples genes.

1.3.2- Factores epigenéticos

La epigenética estudia los mecanismos moleculares a través de los cuales las señales ambientales se traducen en cambios en la expresión génica. Algunos de estos mecanismos incluyen la metilación del ADN, modificaciones post-transcripcionales de las histonas del nucleosoma y el efecto del ARN no codificante.

La epigenética podría contribuir a explicar la susceptibilidad a la enfermedad. En esta línea, distintas evidencias sugieren que los micro ARN (miARN), pequeñas moléculas de ARN no codificante que regulan la expresión del ARNm, podrían jugar un papel importante en la EM. Estas moléculas son esenciales para el correcto funcionamiento y desarrollo celular, y su desregulación puede romper la homeostasis celular y contribuir al desarrollo de enfermedades autoinmunes.⁶³ Los resultados de varios estudios coinciden en que la desregulación de los miARN en la EM favorece un estado proinflamatorio y promueve la progresión de la enfermedad.⁶⁴⁻⁶⁷. Entre los miRNA que se han asociado con EM están miR-155⁶⁶, miR-326⁶⁴, miR-165⁶⁸, miR-18b, miR-493 y miR-599.⁶⁹

Otro mecanismo epigenético, la metilación del ADN podría también jugar un papel en la EM. Así, se han encontrado distintos patrones de metilación en los promotores de una serie de genes cuando se comparan pacientes con EM y controles sanos⁷⁰. Además, en varios de estos genes, el estado de metilación

del promotor permite discriminar entre pacientes en remisión y en brote⁷⁰. Otro estudio observó una hipermetilación del ADN en células T CD8+ en pacientes con EM. Estos datos sugieren que estos procesos pueden jugar un papel en la patogenia de la enfermedad.⁷¹

Otro mecanismo epigenético que podría jugar un papel en la EM es la modificación post-transduccional de las histonas de los nucleosomas que podrían tener un papel diferente según el tipo celular. Se han visto altos niveles de acetilación de histonas en precursores de oligodendrocitos que se relacionan con la represión de genes que codifican proteínas de la mielina.^{72,73} Así mismo, se han observado altos niveles de desacetilación de histonas en la sustancia blanca con apariencia normal de pacientes con EM.⁷⁴

1.3.3- Factores ambientales

En la EM distintos estudios han mostrado que hay factores ambientales que aumentan el riesgo de padecer la enfermedad en individuos genéticamente predispuestos^{75,76}.

Entre los factores ambientales más estudiados están distintos agentes infecciosos y principalmente, los herpesvirus⁷⁷. De todos ellos las pruebas más consistentes de una relación con la EM se han encontrado con el virus de Epstein-Barr. Así, existe un riesgo mayor de EM en individuos que previamente habían padecido mononucleosis infecciosa.^{78,79} Además, se han asociado los periodos de enfermedad activa de la EM con periodos de reactivación de la infección por EBV.^{80,81} Por otra parte, los títulos de anticuerpos anti-EBV se encuentran elevados en los pacientes con EM, observándose que el 100% de los pacientes con EM presentan anticuerpos

anti-EBV frente al 90% de los individuos sanos.⁸⁰ También se ha visto la presencia de títulos elevados de anticuerpos IgG frente a EBNA-1 (antígeno nuclear de Epstein-Barr) tanto en suero como en el LCR de los pacientes con EM⁸²⁻⁸⁴, así como la presencia de bandas oligoclonales de IgG frente a EBNA-1⁸².

Otro herpesvirus que se ha relacionado con la EM es el herpesvirus 6 (HHV-6). Se han encontrado ADN y proteínas de este virus en tanto en oligodendrocitos como en astrocitos, linfocitos y microglía en las placas de EM⁸⁵. Además, existen niveles aumentados de anticuerpos anti HHV-6 y ADN del virus en el suero de pacientes con EM.^{86,87} Por otro parte, se ha detectado la producción intratecal de IgG frente a HHV-6 en alrededor de una quinta parte de los pacientes de EM^{88,89}, y se ha visto que la proteína principal de la cápsida (MCP) es el antígeno reconocido mayoritariamente por estos anticuerpos en la EM.⁹⁰

Las vitaminas son otro de los factores ambientes que más se han asociado con la EM en los últimos años.

La vitamina D es un heterolípido insaponificable del grupo de los esteroides. Se puede obtener de dos maneras: Por la transformación del 7-dehidrocolesterol cuando los rayos UV tienen contacto con la piel o directamente de la dieta, aunque esta es la forma minoritaria de obtención. La vitamina D no es biológicamente activa. Para activarse debe ser sometida a dos hidroxilaciones: la primera en el hígado formando 25-hidroxicolecalciferol (calcidiol) y la segunda en el riñón formando 1,25-dihidroxicolecalciferol también llamada calcitriol (forma activa)⁹¹.

La producción de vitamina D requiere la presencia de luz solar. Por tanto su síntesis está limitada por varios factores como el uso de cremas solares, la localización geográfica (distancia al ecuador), las variaciones estacionales⁹²⁻⁹⁴ y la pigmentación de la piel^{95,96}. Fue este hecho lo que la relacionó en un primer momento con la EM, debido a que la prevalencia de esta enfermedad no tiene una distribución uniforme a lo largo del planeta, observándose una menor prevalencia en las zonas de mayor incidencia de los rayos solares. Debido a ello, se estableció la hipótesis de que los déficit de vitamina D podrían estar implicados en la patogenia de la EM.^{97,98}. Esto se vio corroborado en un estudio realizado en pacientes americanos de raza blanca, donde se observó una correlación inversa entre los niveles séricos 25-hidroxivitamina D y el riesgo de EM⁹⁹. Además, se ha correlacionado el déficit de vitamina D con la presencia de linfocitos T reactivos frente a la mielina.^{100,101}. También se ha visto que los niveles de esta vitamina son más bajos en pacientes en brote que en aquellos en remisión.^{98,102}. Así mismo, se ha correlacionado la concentración en suero de 25(OH) vitamina D con un mayor incremento de la discapacidad y algunos estudios muestran una correlación inversa entre los niveles de 25(OH) vitamina D en suero y actividad en resonancia magnética, la tasa de brotes y la discapacidad medida con la escala EDSS.^{101, 103,104, 103,105,106, 101,103} En pacientes tratados con INF- β se ha visto un aumento de los niveles de vitamina D si bien estos resultados no han sido validados.¹⁰⁷

La vitamina E o α -tocoferol es una vitamina liposoluble cuyas funciones biológicas están determinadas por su capacidad como agente antioxidante eliminando del organismos las especies reactivas del oxígeno y nitrógeno. Diversas enfermedades neurodegenerativas como el Alzheimer, Parkinson,

esclerosis lateral amiotrófica, enfermedad de Huntington y esclerosis múltiple se han asociado con el estrés oxidativo.¹⁰⁸ En la EM se ha descrito que las especies reactivas del oxígeno y nitrógeno parecen jugar un papel fundamental en la inducción y la persistencia de la desmielinización.¹⁰⁹ La concentración de estas sustancias puede aumentar en condiciones inflamatorias produciendo una saturación de los mecanismos anti-oxidantes dentro de las lesiones. Este estrés oxidativo puede dañar los lípidos, proteínas y ácidos nucleicos pudiendo conducir a la muerte celular. Los oligodendrocitos, células encargadas de la mielinización, son especialmente sensibles *in vitro* a este estrés, por lo tanto *in vivo* éste podría conducir a la muerte selectiva de los oligodendrocitos y por tanto a la desmielinización.¹¹⁰ Se ha demostrado que la vitamina E reduce la desmielinización y favorece la remielinización tanto en pacientes como en modelos animales de la enfermedad.¹¹¹⁻¹¹³ Sin embargo, el suplemento con vitamina E no reduce el riesgo de padecer EM.^{112,114} Diversos estudios han mostrado niveles más bajos de vitamina E en pacientes de EM que en individuos sanos.¹¹⁵⁻¹¹⁸ El descenso en los niveles de vitamina E se asocia sobre todo con los brotes, los niveles se elevan cuando los pacientes están en remisión, indistintamente de si están tratados o no con INF- β .¹¹⁹

La vitamina A o retinol es una vitamina liposoluble cuyos efectos más conocidos se asocian con la vista, la piel y las mucosas. Sin embargo, el ácido trans-retinoico, su principal metabolito activo, tiene funciones importantes en la respuesta inmunológica¹²⁰⁻¹²² y en el sistema nervioso central ya que contribuye a la plasticidad y regeneración del mismo.^{123,124} Esto le hace un posible candidato a jugar un papel en la EM. La acción del ácido retinoico en el control de la respuesta inmune y en la regeneración y reparación del sistema

nervioso central han llevado a un interés creciente en el potencial rol del ácido retinoico en la EM.¹²⁵ Recientes estudios han demostrado que niveles subóptimos de vitamina A se asocian con un mayor riesgo de padecer esta enfermedad y que existe una correlación inversa entre niveles de retinol en suero y lesiones en resonancia magnética nuclear.¹²⁶

Respecto al papel inmunomodulador del ácido retinoico, se ha encontrado que el 9-cis-ácido retinoico induce una polarización de la respuesta inmune hacia una vía Th2 con la secreción mayoritaria de citoquinas características de esta vía tales como la IL-4, IL-5, IL-13^{127,128} y que inhibe la producción de citoquinas pro-inflamatorias como INF- γ , IL-1 β y IL-12.^{127,129,130} También se ha visto que el all-trans ácido retinoico, metabolito predominante en la mayoría de tejidos, disminuye los niveles de INF- γ ^{131,132} y aumenta los niveles de linfocitos T reguladores¹³¹ y que las líneas celulares T específicas frente a MBP generadas en presencia de all-trans ácido retinoico tienen un fenotipo Th2.¹³³ Además se ha observado que los niveles bajos de vitamina A producen un desequilibrio con una excesiva síntesis de citoquinas de la respuesta Th1 e insuficiente desarrollo de la vía Th2.¹³⁴ Sin embargo estos datos no han sido confirmados en estudios posteriores.

Otro de los factores ambientales relacionado con la EM es el tabaco. Durante los últimos años distintos estudios sugieren que existe un aumento del riesgo de EM asociado al tabaco. Esta asociación también se ha descrito en otras enfermedades autoinmunes, como el lupus eritematoso sistémico, la artritis reumatoide, la enfermedad de Graves o la cirrosis biliar primaria.¹³⁵ En la EM se ha visto que el consumo de cigarrillos aumenta el riesgo de desarrollar la enfermedad¹³⁶ con una *odd ratio* que oscila entre 1.2-1.5, siendo

mayor el riesgo para los hombres y observándose un efecto dosis dependiente que se mantiene más de 5 años después de haber dejado de fumar.¹³⁷⁻¹³⁹ El tabaco es un factor de riesgo de aparición precoz de un segundo brote.¹⁴⁰ Además, se ha demostrado que fumar aumenta el riesgo de progresión de la enfermedad. Se ha observado un empeoramiento más rápido de la discapacidad en aquellos pacientes que fuman, en comparación con los no fumadores, siendo este fenómeno más acusado en los que empezaron a fumar a edades tempranas (<15 años).¹⁴¹ Del mismo modo, el tabaco se ha asociado con un incremento en el número de lesiones observadas en RMN en los pacientes fumadores comparado con los no fumadores.¹⁴²

La obesidad también se ha relacionado con el riesgo de desarrollar EM. Se ha observado un incremento del riesgo en personas con mayor índice de masa corporal tanto en la niñez, la adolescencia y edad adulta.¹⁴³⁻¹⁴⁵ Por último, un estudio reciente relaciona la ingesta de sal como posible factor ambiental que contribuye a la patogenia de la EM. En dicho estudio se asocia la ingesta de sodio con incremento en la actividad clínica y radiológica de la enfermedad.¹⁴⁶

En el futuro el estudio integrado de los factores genéticos y ambientales y su relación con la respuesta inmunitaria anómala y el curso clínico de los pacientes, posiblemente nos ayudarán a conocer mejor los mecanismos de esta enfermedad.

1.4- FORMAS CLÍNICAS

La esclerosis múltiple presenta heterogeneidad en su presentación clínica y evolución. Se pueden diferenciar dos formas clínicas principalmente según los últimos criterios de clasificación:

- **Remitente-recidivante (RR):** Con ella debutan alrededor del 85% de los pacientes y se caracteriza por episodios de empeoramiento agudo conocidos con el nombre de brotes, seguidos por periodos de recuperación completa o parcial de los síntomas. Los primeros síntomas aparecen más frecuentemente entre los 20 y los 40 años y es más frecuente en mujeres que en hombres, como la mayoría de las enfermedades autoinmunes.^{147,148}

- **Progresiva:** En este grupo se incluyen actualmente las formas anteriormente conocidas como primariamente progresivas y secundariamente progresivas. La EM progresiva suele comenzar en la cuarta o quinta década de la vida y presenta una relación entre hombres y mujeres de 1:1¹⁴⁹ Se caracteriza por presentar un empeoramiento gradual de los síntomas con o sin periodos de remisión y se subdivide en activa o no activa a su vez dependiendo de si los pacientes presentan o no actividad clínica (Brotos) o en resonancia (Nuevas lesiones en T2 o lesiones captantes de gadolinio)¹⁵⁰

1.5- DIAGNÓSTICO

No existe un test específico para el diagnóstico de la EM. Sin embargo, se han desarrollado una serie de pruebas paraclínicas que contribuyen a realizar un diagnóstico precoz de la enfermedad. Estas pruebas son el estudio inmunológico del LCR, la valoración de las imágenes obtenidas por RMN y el análisis de los potenciales evocados.

Un panel internacional de expertos ha establecido unos criterios que combinan el uso de estas pruebas con la evaluación clínica y que ayudan al diagnóstico de esta patología. Estos criterios se actualizan periódicamente, siendo los vigentes en la actualidad los criterios de McDonald de 2001 revisados en 2010^{21,22}

Estos criterios diagnósticos incluyen evaluaciones clínicas y paraclínicas, siendo necesario demostrar la diseminación espacial y temporal de las lesiones y la exclusión²² de otras enfermedades que pueden confundirse con la EM como el síndrome de Sjögren, el lupus eritematoso sistémico, la sarcoidosis, la vasculitis y la enfermedad de Lyme entre otros.¹⁵¹

1.5.1- Resonancia magnética

La sensibilidad de la resonancia magnética (RM) en la detección de las lesiones 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 y la respuesta a tratamiento además de ser un buen indicador de la diseminación en espacio y tiempo de las lesiones, fundamental para el diagnóstico según los criterios McDonald.^{152,153} La diseminación espacial se puede demostrar por la presencia de una o más lesiones en T2 en al menos dos de los cuatro lugares considerados característicos de la EM (yuxtacortical, periventricular, infratentorial y medular) y la diseminación temporal por la presencia de una nueva lesión en T2 y/o una lesión captante de gadolinio en comparación con

una RMN previa o por la presencia simultánea en una RMN de lesiones captantes gadolinio y no captantes.²²

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.

¹⁵⁴ 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 semicuantitativos. Estos últimos se basan en la determinación de una serie de índices. Los más utilizados en la práctica clínica son el de Reiber¹⁵⁵ y el de Tibbling o de IgG¹⁵⁶. 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 0.007 en individuos sanos. 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. 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 índice estudiado.

Los métodos cualitativos son los más sensibles y se basan en la detección de bandas oligoclonales (BOC) de IgG en muestras pareadas de LCR y suero. Más del 95% de los pacientes con EM presentan BOC de IgG restringidas al LCR.¹⁵⁷ Sin embargo, al igual que el resto de pruebas complementarias la presencia de bandas no es patognomónica de la enfermedad, aunque es rara en otras patologías inflamatorias, excluyendo las infecciones.

Otra inmunoglobulina que se ha estudiado en la EM es la IgM. Al igual que sucede con la síntesis de IgG, los métodos para la determinación de la síntesis intratecal de IgM pueden ser cuantitativos o cualitativos. Los primeros no son muy útiles ya que los índices existentes o presentan una sensibilidad baja como el índice de Reiber o muchos falsos positivos como sucede con el índice de IgM^{158,159}. Los métodos cualitativos, por el contrario, poseen una mayor sensibilidad y especificidad lo que les convierte en el mejor método para investigar síntesis intratecal de IgM.¹⁶⁰ Utilizando esta técnica hemos determinado que alrededor del 40% de los pacientes de EM-RR presentan bandas oligoclonales (BOC) de IgM en el LCR y su presencia constituye un marcador de mal pronóstico en la enfermedad.¹⁶¹⁻¹⁶⁴

1.6- FISIOPATOLOGÍA

La EM se considera una enfermedad de origen autoinmune desencadenada por linfocitos T CD4+ autorreactivos que reconocen antígenos de la mielina aún no identificados.⁴³

Las primeras etapas de la enfermedad están dominadas por la aparición de lesiones inflamatorias localizadas en la sustancia blanca (placas) caracterizadas por presentar desmielinización, inflamación y un grado variable de pérdida axonal.

Los linfocitos T autorreactivos se activan fuera del SNC, activan a otras células del sistema inmunitario (Linfocitos T CD8+, linfocitos B), atraviesan la barrera hematoencefálica, y se reactivan por células presentadoras de antígeno locales lo que desencadena una respuesta inmune que conduce a la liberación de citoquinas proinflamatorias tales como INF- γ y TNF- α . Estas citoquinas activan las células de la microglía y los astrocitos e inducen el reclutamiento de otras células del sistema inmune tales como linfocitos T, linfocitos B y monocitos hacia el SNC promoviendo la expresión de moléculas de adhesión en el endotelio vascular y moléculas de MHC de clase II en la microglía y en el endotelio vascular.¹⁶⁵ Este proceso inflamatorio conduciría al daño tisular.¹⁶⁶ Al mismo tiempo, se producen procesos de remielinización que reparan en cierto grado el mismo. El daño axonal por inflamación aparece en las lesiones desmielinizantes activas principalmente en los primeros estadios de la enfermedad.¹⁶⁷

Como consecuencia del daño tisular se liberan en la EM nuevos antígenos que producen lo que se conoce como *diseminación de epítomos*,

mediante este mecanismo las células T de los pacientes amplían el número de dianas en el SNC.¹⁶⁸

La corteza cerebral puede encontrarse también afectada desde los primeros estadios de la enfermedad. Esto se manifiesta por la presencia de inflamación, desmielinización y neurodegeneración cortical que puede inducir daño neuronal y como consecuencia atrofia cortical.¹⁶⁹

1.6.1- Principales antígenos que se han implicado en la EM

Entre los primeros antígenos estudiados en relación con la EM se encuentran la proteína básica de la mielina (MBP), la 2'-3'-fosfodiesterasa de nucleótidos cíclicos 3' (CNP), la glicoproteína asociada a la mielina (MAG), la proteína proteolipídica (PLP), la proteína de la mielina del oligodendrocito (MOG) y algunas proteínas del oligodendrocito.^{170,171}, si bien no se ha podido relacionar ninguna de ellas con la causa o curso de la enfermedad. Nuevos estudios realizados con arrays de proteínas han encontrado anticuerpos frente a algunos antígenos, como algunas proteínas de choque térmico, que parecen asociarse más claramente con la EMRR, diferenciando entre distintos tipos de la enfermedad.^{172,173}

En un intento de encontrar anticuerpos asociados con las primeras etapas de la enfermedad, se han estudiado los antígenos relevantes en la EM pediátrica y se han encontrado asociación con proteínas axogliares.¹⁷⁴ Futuros estudios demostraran la relevancia de estos trabajos.

También se ha descrito que la síntesis intratecal de anticuerpos IgM frente a lípidos se asocia con formas altamente inflamatorias de la EM, incluso en los pacientes progresivos.^{161,175,176}

Se han detectado también anticuerpos frente a los neurofilamentos que pueden contribuir al daño axonal.¹⁷⁷

Por otra parte, estudios recientes han identificado autoanticuerpos dirigidos contra el canal de potasio Kir4.1 en pacientes con EM y se ha sugerido que estos anticuerpos pueden provocar un daño directo en los astrocitos.¹⁷⁸ Sin embargo, estos hallazgos no se han podido confirmar.

Se han detectado también anticuerpos que bloquean la acción de lípidos endógenos antiinflamatorios, potenciando el avance de la enfermedad.¹⁷⁹

1.7- PRINCIPALES POBLACIONES CELULARES QUE SE HAN ASOCIADO CON LA EM

1.7.1- Linfocitos T

Linfocitos T CD4+: Estas células han sido el centro de la investigación inmunológica en EM durante mucho tiempo. Tras la observación de que la transferencia adoptiva de células T CD4+ que reconocen antígenos de la mielina era suficiente para inducir EAE (encefalomielitis autoinmune experimental) en ratones¹⁸⁰, se las consideró como las principales células mediadoras de dicha patología^{181,182}. Sin embargo, la presencia de linfocitos T CD4+ es escasa en las lesiones desmielinizantes, lo cual sugiere que existen otras células que juegan un papel más importante en esta patología.¹⁸³

Los linfocitos T autorreactivos forman parte del repertorio normal de células T. La frecuencia de estos linfocitos T en sangre periférica es similar en pacientes con EM y en individuos sanos^{184,185}, esto demuestra que la sola presencia de estos linfocitos T autorreactivos no es suficiente para poner en marcha la

respuesta autoinmune. Se ha hipotetizado que estos linfocitos T podrían presentar un perfil más inflamatorio en la EM¹⁸⁶.

Dependiendo del tipo de activación los linfocitos CD4+ pueden diferenciarse a fenotipos proinflamatorios (Th1, Th17), fenotipos se asocian preferentemente con respuestas de anticuerpos (Th2) o reguladores (Treg). En la EM juegan un papel las células Th1, Th17 y las células T reguladoras. Las células Th1, Th17 están aumentadas en los brotes y se han encontrado tanto en las lesiones, como en la sangre periférica de los pacientes. Estas células podrían contribuir a la respuesta inflamatoria que se genera en la enfermedad aumentando la expresión de moléculas de adhesión en el endotelio vascular e activando a otras células del sistema inmunitario.^{187,188} La IL-17 se ha asociado con numerosas patologías autoinmunes e inflamatorias como la artritis reumatoide, psoriasis, enfermedad de Crohn, lupus eritematosos sistémico, asma, enfermedad de Behcet y síndrome de hiper Ig-E.^{189,190} Esta citoquina juega un papel crucial en el desarrollo de la EAE.¹⁹¹ Las células T memoria producen IL-17 y IL-22 en las uniones estrechas celulares de la barrera hematoencefálica y permiten la migración de las células Th17 al interior del sistema nervioso central causando daño neuronal.^{192,193}

Otra citoquina proinflamatoria que parece jugar un papel en la EM es el GM-CSF. Se ha visto que esta citoquina es importante para inducir la EAE.¹⁹⁴ y que esta aumentada en las lesiones y en los linfocitos T de sangre periférica de los pacientes de EM.¹⁹⁵

Las células T reguladoras previenen o suprimen la autoinmunidad en condiciones normales¹⁹⁶ y son deficitarias en número o en funcionalidad en varias enfermedades autoinmunes incluida la EM^{197,198}. Las células T CD4+

reguladoras (Treg) más estudiadas en la EM se caracterizan por la expresión del factor de transcripción FoxP3^{197,198}.

En 2004 apareció publicado el primer trabajo que reportaba un potencial defecto funcional en las Treg en la EM-RR¹⁹⁹. Diversos estudios han confirmado estos hallazgos.^{200,201} El déficit de Treg también juega un papel en la actividad de la enfermedad, ya que se ha observado que estas células disminuyen durante los brotes de EM.²⁰² Por último, datos preliminares sugieren que la terapia inmunomoduladora con INF- β mejora la frecuencia y la capacidad supresora de las células T reguladoras en la EM.²⁰³ La IL-10 es secretada por linfocitos reguladores y por tanto se encuentra disminuida en la EM.^{199,204} Tras el tratamiento con INF-beta las síntesis de esta citoquinas aumenta tanto en linfocitos T como en linfocitos B.^{203,205-209}

Linfocitos T CD8+: En los últimos años distintos trabajos han demostrado que los linfocitos T CD8+ citotóxicos también tienen una importante implicación en la EM. Estas células pueden llevar a cabo la lisis de sus células diana mediante tres mecanismos: liberación de gránulos de perforina y granzima, apoptosis a través de la vía Fas/FasL y apoptosis mediada por TNF α y moléculas relacionadas. Posiblemente, el hallazgo más importante sobre su papel en la EM, proviene de los estudios patológicos que demuestran que los linfocitos T CD8+ son la población que predomina en los infiltrados inflamatorios de las lesiones.^{183,210} Su presencia se correlaciona con el daño axonal en las lesiones desmielinizantes²¹¹⁻²¹³. Además los linfocitos T CD8, a diferencia de los linfocitos T CD4, se localizan tanto en las lesiones perivasculares del SNC como en el parénquima.²¹⁴ La presencia de citoquinas Th1 como el TNF-alfa y el INF-gamma en el SNC y la sobreexpresión de

moléculas MHC I en axones y neuronas de las lesiones activas facilita la actuación de los linfocitos T CD8+ en la EM.^{213,215} Otro hecho que apoya la implicación de los linfocitos T CD8+ en la EM es que se han identificado expansión clonal de linfocitos T CD8+ en el SNC, LCR y sangre de pacientes con EM y que algunos de estos clones persisten durante más de 5 años²¹⁶. Finalmente, las células T CD8+ producen también grandes cantidades de TNF α que altera directamente la estructura y funcionalidad de la membrana neuronal,²¹⁷ interfiriendo con la funcionalidad de las neuronas e induciendo su apoptosis.²¹⁸ Así mismo, las células T CD8+ citotóxicas pueden mediar también la lisis de los oligodendrocitos impidiendo la remielinización²¹⁹⁻²²¹. Por otro lado, se ha descrito que una subpoblación de células T CD8+ podría exhibir también propiedades reguladoras en la EM, eliminando células T CD4+ autorreactivas^{222, 223}.

1.7.2- Linfocitos B y anticuerpos

La síntesis intratecal de inmunoglobulinas y la presencia de bandas oligoclonales (BOC) IgG en el LCR de más del 95% de los pacientes diagnosticados de EM fue el primer hallazgo que puso de manifiesto la importancia de la respuesta inmune humoral en estos pacientes.^{16,224} Más adelante se demostró que la presencia de bandas oligoclonales de IgM predicen una progresión más rápida de la EM y un fenotipo altamente inflamatorio de la enfermedad.^{161,175,225} La presencia de estas BOC de IgM específicas frente a lípidos (BOCML+) se ha asociado con mayor probabilidad de sufrir un segundo brote más temprano, tener más brotes, una progresión de la discapacidad medida mediante la escala EDSS y una conversión a

esclerosis múltiple secundariamente progresiva más rápida.^{163,226,227}

Recientemente, se ha visto una correlación entre la presencia de BOCML+ y un incremento temprano en la carga lesional y la atrofia cerebral.²²⁸ La progresión de la discapacidad es más lenta en pacientes con BOC negativos^{229,230}

El estudio anatomopatológico de las lesiones han confirmado el papel de los anticuerpos en la fisiopatología de la EM. Se han encontrado cuatro patrones fundamentales de desmielinización definidos en relación a la extensión y localización de las placas de desmielinización, la pérdida de la proteína básica de mielina, el patrón de destrucción de los oligodendrocitos, y la activación del complemento. Los patrones I y II, que son los predominantes, muestran desmielinización mediada por células T y macrófagos. El patrón II se diferencia por los depósitos de anticuerpos y complemento. Esto pone de manifiesto la implicación de los anticuerpos en la EM. La presencia de anticuerpos en las lesiones fue confirmada en estudios posteriores.²³¹ Los patrones III y IV, son minoritarios.^{7,8}

La evidencia más directa del papel perjudicial de los linfocitos B en la EM proviene de los resultados positivos observados con el uso de rituximab que muestran que la depleción de células B disminuye las lesiones inflamatorias en el cerebro y los brotes.²³² Estudios posteriores han comprobado la implicación de los linfocitos B en la patogenia de la EM.^{233,234}

Los linfocitos B se encuentran en las lesiones tanto agudas como crónicas,^{235,236} siendo más abundantes en las últimas.²³⁷ Dichas células se han localizado también en las meninges de pacientes con EM secundariamente progresiva²³⁸ en forma de folículos linfoides ectópicos con una organización similar a los centros germinales de los nódulos linfoides. En ellos se pueden

encontrar además de células B en diferentes estadios proliferativos, células T y células dendríticas. Algunos autores creen que estos folículos ectópicos podrían representar los nichos donde tendría lugar la expansión y maduración intratecal de las células B en la EM.^{236,239} Se ha demostrado la formación de estos folículos linfoides ectópicos en otras enfermedades crónicas autoinmunes con una respuesta humoral intensa como miastenia gravis, síndrome de Sjögren, tiroiditis autoinmune y artritis reumatoide.²⁴⁰⁻²⁴³

Las células B están aumentadas en el LCR de los pacientes con EM en comparación con otras patologías neurológicas no inflamatorias²⁴⁴ aunque existe una gran variabilidad entre los pacientes con EM en el porcentaje de las mismas.²³³ Se ha postulado que un ratio células B / monocitos aumentado en LCR se asocia con una rápida progresión de la enfermedad.²⁴⁵

La mayoría de las células B presentes en el LCR tienen un fenotipo de célula memoria^{246,247} y pero también se encuentran plasmablastos y células plasmáticas. En los primeros trabajos se postuló²⁴⁷ que las células plasmáticas serían las encargadas de la síntesis intratecal de IgG pero trabajos posteriores apuntan a los plasmablastos como responsables de la mayoría de la secreción intratecal de IgG.^{246,248,249}

La contribución de las células B en la EM se ha atribuido principalmente a su capacidad para producir anticuerpos pero además, están implicadas en la patogenia de la EM como células presentadoras de antígeno,²⁵⁰ células productoras de citoquinas²⁵¹ o células reguladoras.^{204,252}

1.7.3- Linfocitos B CD5+

Otra población que también juega un papel importante en la EM es la de las células B CD5+. Esta población presenta diversas particularidades que la diferencian de los linfocitos B convencionales. Desde el punto de vista fenotípico, lo más destacado es la expresión del antígeno de superficie CD5.²⁵³ Otras características específicas de estas células son: que no requieren la cooperación de los linfocitos T para producir anticuerpos; no experimentan generalmente reordenamiento de los genes de las inmunoglobulinas con lo que los anticuerpos producidos por estas células no sufren cambio de isotipo ni maduración de la afinidad; y no se genera memoria inmunológica tras el primer contacto con el antígeno. Por tanto estas células por regla general secretan anticuerpos de tipo IgM.

Aunque estas células B CD5+ representan una subpoblación minoritaria dentro del repertorio de linfocitos B de individuos sanos, son importantes por ser las principales células productoras de los anticuerpos naturales.²⁵⁴ A través de su receptor BCR son capaces de reconocer un repertorio de antígenos muy conservados, generalmente de naturaleza no proteica, presentes en diferentes patógenos. De ahí que jueguen un papel importante como primera línea de defensa frente a diversos microorganismos como bacterias o virus. Su número se ha encontrado elevado en enfermedades infecciosas como la meningitis aséptica, VIH y hepatitis C.²⁵⁵⁻²⁵⁷ Producen también anticuerpos que reconocen una variedad de antígenos propios, algunos de los cuales se encuentran en el SNC.²⁵⁸ En la EM estos linfocitos han sido correlacionados con la síntesis intratecal de IgM^{163,244} y con la actividad de la enfermedad.²⁵⁹ Así mismo, se ha asociado un porcentaje alto de linfocitos B CD5+ en sangre periférica con un

incremento del riesgo de una conversión temprana a EM en pacientes con síndrome neurológico aislado.²⁶⁰

1.7.4- Células Natural Killer

Las células NK son células pertenecientes a la inmunidad innata que nos defienden frente a infecciones víricas y eliminan células tumorales.^{261,262} Son células pertenecientes a la inmunidad innata que expresan multitud de receptores activadores e inhibidores. La citotoxicidad de estas células está determinada por un balance entre las señales mediadas por los mismos.²⁶³ La citólisis de las células diana se produce por una variedad de mecanismos efectores que incluyen la liberación de gránulos que contienen perforina y granzima y la expresión de receptores de muerte de la superfamilia del TNF. (Fas y FasL). El mecanismo preferentemente utilizado por las células NK para llevar a cabo su función efectora es la desgranularización.²⁶⁴ Las células NK humanas se dividen en dos subpoblaciones en función de la intensidad con la que expresan en la membrana las moléculas CD56 y CD16, la subpoblación CD56^{dim}CD16⁺ y CD56^{bright}CD16⁻. Aproximadamente el 90% de las células NK en sangre periférica son CD56^{dim}CD16⁺, las cuales producen citoquinas y lisis de las células diana ya que expresan grandes cantidades de perforina y granzima B.⁴⁶ En contraste, la subpoblación CD56^{bright}CD16⁻ se expresa preferentemente en los órganos linfoides secundarios, puede expresar un gran número de citoquinas diferentes como INF- γ , TNF- α , GM-CSF, IL-10 y expresan bajos niveles de perforina y granzima B.²⁶⁵ Diversos estudios han identificado que las células NK experimentan una disminución relativa en el LCR de pacientes con EM.²⁶⁶⁻²⁶⁹ Dicha disminución, se debe a un aumento de linfocitos

T más que a una reducción absoluta en el número de células NK²⁷⁰ y se observa sobre todo antes de la aparición de brotes en EM y nuevas lesiones en la resonancia magnética.^{268,271} El balance entre células NK reguladoras y efectoras parece estar aumentado en la EM.²⁷⁰ Basándose en datos obtenidos en el modelo animal, la EAE, se ha sugerido que estas células reguladoras podrían inhibir la función de las células T antígeno-específicas en la EM.^{267,272,273} Además, se ha observado una correlación entre la expansión de las células NK CD56^{bright} tras el tratamiento con IFN-beta y una disminución en el número de lesiones captantes de gadolinio en resonancia magnética.^{267,274}

1.7.5- Microglía, macrófagos inflamatorios y activina A

La función de las células de la microglía, los macrófagos residentes en el SNC, es la eliminación de desechos celulares y la eliminación de patógenos. En la EM, la microglía activada se localiza junto a los macrófagos que migran de la periferia en las zonas de daño axonal de las lesiones.^{275,276} Este fenómeno se detecta desde estadios tempranos de la enfermedad. Dichas células se activan por citocinas producidas por las células T y, también, por productos de la degradación de mielina.²⁷⁷ La activación contribuye a la diseminación de epítomos ya que aumenta la expresión de moléculas MHC de clase II y de las moléculas coestimuladoras CD86, CD80 y CD40,²⁷⁸ y contribuye a la presentación de antígenos del SNC los linfocitos T promoviendo la propagación la diferenciación de células patogénicas Th1 y Th17. Además estas células están implicadas en la desmielinización y fagocitosis de la mielina degradada y secretan moléculas con actividad neurotóxica directa, como el TNF- α que induce apoptosis en neuronas y la IL-1 β que también tiene

actividad neurotóxica e induce la producción de óxido nítrico que junto a otras especies reactivas de oxígeno causan daño neuronal.^{279,280}

La activina A es un dímero compuesto por dos subunidades beta idénticas o muy similares. Su principal función es aumentar la biosíntesis y secreción de la hormona folículo estimulante (FSH), y participar en la regulación del ciclo menstrual. Además, se han encontrado muchas otras funciones para esta proteína. En la respuesta inmune actúa sobre los macrófagos. Estos pueden diferenciarse hacia dos fenotipos, el fenotipo M1 (proinflamatorio) y el fenotipo M2 (antiinflamatorio), dependiendo del microambiente en el que se encuentren. Esta molécula se libera por los macrófagos M1 y bloquea la expresión de ciertos marcadores específicos de macrófagos M2 disminuyendo la liberación de IL-10.²⁸¹

La contribución de la activina A en la polarización de los macrófagos hacia un fenotipo M1 se evidenció al bloquear dicha molécula con un anticuerpo monoclonal anti-activina A que hizo que se redujeran los macrófagos M1 y se potenciara la diferenciación a M2 y la expresión de marcadores característicos de esta población de macrófagos anti-inflamatorios como FR β .²⁸¹

Estudios previos demuestran que la expresión de activina A es alta en patologías inflamatorias tales como artritis reumatoide, la enfermedad inflamatoria intestinal y la esclerosis sistémica.^{282,283}

Estudios realizados en EAE observan que el balance entre macrófagos M1 y M2 influye en la progresión de la enfermedad.^{284,285} y que en las fases iniciales de la enfermedad predomina un fenotipo M1 proinflamatorio mientras que en las fases más evolucionadas predomina un fenotipo M2

antiinflamatorio.²⁸⁴ Así mismo, la polarización a un fenotipo M1 podría estar implicada en la aparición de brotes.²⁸⁵ Sin embargo esto no ha sido demostrado en la EM. Se ha visto que la población mayoritaria en las lesiones activas podría presentar un estatus intermedio entre ambos fenotipos (M1 y M2)²⁸⁶, o un predominio de microglía M2²⁸⁷. La microglía M2 conduce a la diferenciación de los oligodendrocitos durante el proceso de remielinización del sistema nervioso central.²⁸⁸ El cambio de M1 a M2 ocurre en la microglía y en los macrófagos periféricos al comienzo de la fase de remielinización.

1.8- TRATAMIENTO

Durante la mayor parte del siglo XX el tratamiento de los pacientes de EM estaba dirigido al control de los síntomas asociados a la enfermedad, es decir se limitaba al uso de corticoides durante los brotes. En la segunda mitad del siglo se produjo un interés creciente por la búsqueda de terapias inmunomoduladoras e inmunosupresoras. Los estudios clínicos con agentes inmunosupresores empezaron en los años 70 y continuaron en los años 90. Fue durante esta década cuando se desarrollaron los nuevos tratamientos con agentes inmunomoduladores como los interferones y el acetato de glatiramero. Además, en los últimos años han surgido diversas terapias efectivas para el tratamiento de la EM, como natalizumab que impiden la entrada de leucocitos al SNC²⁸⁹ o las nuevas terapias orales como fingolimod que impide la salida de linfocitos activados de los ganglios linfáticos,²⁹⁰ dimetilfumarato que disminuye el estrés oxidativo,²⁹¹ teriflunomida que inhibe la síntesis *de novo* del ADN²⁹² y el nuevo anticuerpo monoclonal Alemtuzumab²⁹³ que provoca la depleción y

posterior repoblación de linfocitos B y T induciendo una reprogramación de la inmunidad adaptativa.

Los IFNs son una familia de citoquinas que poseen propiedades antivirales, antiproliferativas e inmunomoduladoras. Su actividad antiviral fue lo que le llevó a estudiarlo como posible agente terapéutico en la EM. Sin embargo, más tarde fueron sus propiedades inmunomoduladoras las que le confirieron utilidad en el tratamiento de esta patología.²⁹⁴

1.8.1- Descubrimiento del interferón

En 1957 fue descubierta una glicoproteína secretada por las células infectadas por un virus que interfería en la infección simultánea con otro virus por ello se le denominó interferón.²⁹⁵ En este mismo trabajo se demostró que el interferón no actuaba directamente sobre el virus, sino que inducía a las células infectadas a producir otras proteínas que inhibían la replicación viral.

En la actualidad hay descritas más de 20 glicoproteínas (Interferones) que comparten la capacidad de interferir con la infección viral, todas ellas han sido incluidas como miembros de la superfamilia de las citoquinas.²⁹⁶

1.8.2- Clasificación de los interferones

Según el análisis de las secuencias de los genes de los interferones²⁹⁶⁻²⁹⁸ y de su estructura molecular se pueden clasificar en dos grupos:

- Tipo I: Se incluyen cuatro variedades: alfa, beta, omega y tau. Siendo las más importantes las alfa y beta. Todos ellos son monoméricos. Los IFN-tipo I se sintetizan por células infectadas por virus y se unen a receptores de las células no infectadas vecinas y activan las vías de

transducción de señales de Jak-STAT, que inducen la expresión de genes cuyos productos interfieren con la replicación vírica. Se unen también a receptores sobre las células infectadas e inducen la expresión de genes cuyos productos aumentan la susceptibilidad de la célula a la muerte mediada por linfocitos T citotóxicos.

- Tipo II: Se incluye una sola variedad, el INF-gamma. Es dimérico. El INF-gamma es la principal citoquina activadora de los macrófagos y tiene funciones fundamentales en la inmunidad innata y la inmunidad celular adaptativa frente a los microorganismos intracelulares. Se le llama también IFN inmunitario. Aunque tiene una cierta actividad anti-vírica, no es una citocina antivírica potente, y actúa principalmente como activador de las células efectoras del sistema inmunitario.

1.8.3- El interferón como tratamiento en la esclerosis múltiple

Los primeros ensayos clínicos fueron llevados a cabo por investigadores californianos a finales de los años 70, probaron el INF- α natural administrado por vía subcutánea.²⁹⁹ Al mismo tiempo investigadores de Nueva York empezaron a estudiar el uso del IFN- β natural por vía intratecal.³⁰⁰ La administración del INF- β intratecal demostró eficacia en la reducción de la frecuencia de los brotes, sin embargo se terminó abandonando su uso por su elevada toxicidad. Por el contrario, en 1986 se observó que el IFN-gamma empeoraba la enfermedad.³⁰¹

1.8.4- El interferón-beta 1b

El IFN-beta 1-b (Betaferon®) se aprobó como tratamiento de la EM por la Agencia del Medicamento estadounidense en 1993 marcando un punto de inflexión en el tratamiento de esta patología. Se administraban 8 MUI cada 48 horas de forma subcutánea. El IFN-beta 1b es un producto recombinante, no glicosilado, derivado de *E. coli* que difiere del IFN- β natural por la sustitución de un único aminoácido. Tras un ensayo clínico multicéntrico de dos años de duración, doble ciego, placebo-control en 372 pacientes con EMRR se vio que la administración de 8 MUI de IFN-beta 1-b cada 48 horas por vía subcutánea disminuía la frecuencia anual de brotes en un 32%. En este estudio también se demostró que el fármaco reducía muy significativamente la carga lesional en RM. Sin embargo, el medicamento no mostró reducción significativa de la progresión de la enfermedad.³⁰²

En noviembre de 1998³⁰³ se publicó un estudio con Betaferon®, para las formas secundariamente progresivas. Se demostró una moderada disminución de la discapacidad medida por la escala EDSS, retrasando 9-12 meses la progresión en 1 punto en el EDSS.

La experiencia a largo plazo con el INF-beta nos habla de su seguridad y su eficacia reduciendo la tasa de brotes en un 30%.^{302,304-307}

1.8.5- El interferón-beta 1a

El IFN-beta-1a es un producto recombinante, glicosilado, producido en mamíferos, que ha sido también aprobado para el tratamiento de la EMRR. Se comercializan tres preparaciones diferentes de INF-beta-1a: Rebif® (22 μ g o 44

µg tres veces a la semana por vía subcutánea) y Avonex® (30 µg una vez a la semana por vía intramuscular).

En un estudio publicado en Noviembre de 1998³⁰⁴, aleatorizado a dos años, multinacional, con 560 pacientes de EMRR, se mostró que el IFN-beta-1a (22 µg o 44 µg tres veces a la semana por vía subcutánea) redujo la tasa de brotes en un 27% y en un 33% a los dos años. Ambas dosis prolongaron el tiempo entre el primer y el segundo brote y el número de pacientes libres de brote fue mayor en ambos grupos que en el control. También fue menor la acumulación de discapacidad en los dos grupos de tratamiento que en el placebo; sin embargo, en aquellos pacientes con un EDSS basal superior a 3,5 sólo se vio un beneficio significativo con la dosis alta.

También fue menor la carga lesional en ambos grupos de tratamiento en comparación con el grupo placebo; pero el beneficio fue ligeramente superior con la dosis más alta.

En un estudio aleatorizado, doble ciego, placebo-control, sobre 301 pacientes de EMRR, se demostró que AVONEX® disminuía la acumulación de discapacidad medida por la EDSS escala en un 37%, tras 104 semanas. También redujo la tasa de brotes en un 32% y el número y el volumen de lesiones captantes de gadolinio³⁰⁸

1.8.6- Mecanismos de acción de IFN-beta

Los mecanismos de acción del INF-beta en la EM no han sido establecidos de manera concluyente. Existen diversos estudios que dicen que realiza múltiples actividades biológicas que llevan a que se establezca un medio anti-inflamatorio tanto sistémico como en el SNC.

El empleo inicial del INF-beta como tratamiento en la EM se debió a su actividad antiviral ya que se creía que la enfermedad podía estar causada por una infección viral persistente o latente del SNC. Se ha visto que en aproximadamente la mitad de los pacientes de EM, los linfocitos de sangre periférica producen cantidades reducidas de IFN en respuesta a los estímulos virales, por lo que la administración exógena de IFN podría reemplazar la producción defectuosa de los linfocitos o estimular a estos a producir cantidades normales de IFN.^{309,310}

Noronha y col. descubrieron que el IFN-beta inhibía la proliferación de células T y reducía la producción de IFN-gamma³¹⁰. El IFN-beta podría afectar a la presentación de antígenos indirectamente a través de la inhibición de la expresión de MHC-II, del IFN-gamma o produciendo un decremento en la expresión de moléculas accesorias que actúan como señales coestimuladoras (B7/CD28, CD40/CD40L).^{311,312}

También se ha postulado que esta molécula podría modificar el balance de linfocitos Th1/Th2 modificando la actividad de la enfermedad. Aunque sin resultados demasiado concluyentes, algunos estudios sugieren que el IFN-beta podría polarizar la respuesta inmunitaria en la EM hacia un fenotipo Th2.^{313,314}

La infiltración de células T a través de la BHE hacia el interior del SNC es considerado un evento muy importante en la patogénesis de la EM. Esta trans migración de leucocitos a través del endotelio vascular es un proceso secuencial y que consta de múltiples etapas.³¹⁵ Estudios realizados a este respecto sugieren que el IFN-beta 1b disminuye la entrada de células T al nivel de la BHE alterando la expresión o la función de las moléculas de adhesión. Se ha observado que la concentración sérica de la molécula de adhesión vascular

1 (sVCAM) se encuentra incrementada durante el tratamiento con IFN beta en pacientes con EMRR, y este aumento se correlacionó con disminución de la carga lesional. Los investigadores propusieron que el aumento sVCAM podría bloquear la adhesión de leucocitos al endotelio vascular del cerebro mediante la unión competitiva con el receptor de integrina VLA-4.³¹⁶

El IFN-beta también podría disminuir la migración leucocitaria a través del BHE mediante la inhibición de la producción de metaloproteasas de matriz extracelular.³¹⁷

1.8.7- Efectos secundarios de la terapia con interferón-beta

Los efectos secundarios más importantes de la terapia con IFN-beta son los síntomas pseudogripales (fiebre, estornudos, mialgia, malestar y sudor) que se dan sobre todo durante los seis primeros meses de tratamiento y las reacciones cutáneas locales post-inyección (eritema, inflamación, dolor y, en ocasiones, necrosis de la piel).²⁹⁴ Estos efectos secundarios son leves y controlables en la mayoría de los casos mediante tratamiento sintomático concomitante (ibuprofeno para los síntomas pseudogripales y la aplicación de hielo o corticosteroides tópicos para las reacciones locales).

Otro de los efectos secundarios asociado al tratamiento con IFN-beta es la depresión. En los distintos ensayos pivotaes realizados con IFN-beta se han observado más síntomas depresivos e intentos de suicidio en los pacientes que recibieron el fármaco que en los que recibieron placebo; y estos síntomas fueron más frecuentes en aquellos pacientes que recibieron las dosis más altas.³⁰²

La aparición de leucopenias, anemias leves, anomalías en la función del hígado y trombocitopenia son frecuentes con el uso prolongado del IFN-beta, pero normalmente no requieren discontinuación del tratamiento.³⁰³

1.8.8- Anticuerpos neutralizantes frente a interferón-beta

Uno de los problemas asociados a la terapia con IFN-beta es el desarrollo de anticuerpos neutralizantes (NAbs) frente al fármaco. Durante la terapia con IFN-beta un porcentaje de pacientes desarrolla NAbs, los cuales se asocian con una disminución en la eficacia del tratamiento ya que interfieren en la unión de la molécula de IFN a su receptor en la superficie celular. Según los ensayos pivotaes, la incidencia de los NAbs varía entre un 5 y un 42%³¹⁸, dependiendo de diversos factores³¹⁹. La inmunogenicidad de las diferentes formulaciones de IFN puede depender de la estructura primaria de la proteína, las modificaciones post-transcripcionales, la formulación del fármaco, la ruta de administración, la frecuencia y la dosis.³²⁰ La estructura de la proteína puede influir en el grado de respuesta inmune, ya que la variación en la secuencia de aminoácidos con relación a la secuencia natural potenciará la inmunogenicidad. La glicosilación del IFN-beta puede influir en la solubilidad de la proteína, por lo que la eliminación de las cadenas laterales de azúcares por las glicopeptidasas desencadena la formación de agregados que incrementarían la inmunogenicidad relativa de la proteína. La pureza de la formulación es un elemento crítico a la hora de reducir el potencial para una respuesta inmune.³²¹ La ruta de administración también puede influir en la severidad de la respuesta inmunológica. Actualmente existen dos formulaciones disponibles de IFN-beta-1a: a través de inyección intramuscular o subcutánea. Se ha visto que la

incidencia de los NAbs es menor en aquellos pacientes que reciben la fórmula intramuscular.¹²² La dosis también afecta a la inmunogenicidad, a mayor dosis mayor incidencia de NAbs. Se ha identificado que los pacientes que reciben el Rebif® 44 presentan 16% de incidencia de NAbs frente al 5% de los pacientes que reciben Rebif® 22.³⁰⁸ Lo mismo sucedió en un ensayo dosis respuesta de IFN-beta 1-a IM: la dosis más alta (60 µg/semana) se asoció con una mayor incidencia de NAbs que la dosis más baja (30 µg/semana)³²²

A lo largo de los años, se han llevado a cabo diferentes análisis para determinar el impacto de los NAbs frente a IFN-beta sobre la progresión de la enfermedad, los brotes y las lesiones cerebrales.³²³ En los análisis longitudinales, los datos clínicos se comparaban de manera individual en los pacientes durante los períodos en los que presentaban NAbs y los que eran negativos a NAbs. En el ensayo en fase II con IFN-beta 1b a dosis baja (1,6 MIU SC en días alternos) los pacientes experimentaban un incremento en la tasa de brotes del 65% durante los períodos en los que eran positivos a NAbs ($p=0,02$).³²⁴ El impacto negativo de los NAbs sobre la tasa de brotes empezaba a ser aparente a partir de los 6-12 meses.³²⁵ Sin embargo, en un estudio longitudinal sobre la terapia con IFN-beta en pacientes con EMSP, no se vio impacto alguno del status de NAbs sobre la progresión en la enfermedad medida con la escala EDSS.^{303,326} Los análisis de periodos con altos o bajos títulos de NAbs sugirieron que la tasa se incrementa cuando se incrementan los títulos. Cuando se comparó a los pacientes NAbs positivos con los NAbs negativos, se observó que la actividad de la enfermedad vista por RMN era mayor en los pacientes NAbs positivos, que mostraron un mayor incremento en el número de lesiones que los NAbs negativos ($p=0.03$).³²⁶ En otro estudio

longitudinal sobre la inmunogenicidad relativa de las tres preparaciones que existen en el mercado de IFN-beta y el impacto del estatus de NAbs sobre la tasa de brotes se indicó que los pacientes que eran NAbs negativos presentaban un tiempo significativamente más largo que los NAbs positivos hasta la aparición del primer brote ($p=0,009$). Sin embargo, el tiempo hasta alcanzar una progresión confirmada de un punto o más en la escala EDSS, mantenido durante al menos 6 meses, no difirió entre los Nabs positivos y los Nabs negativos.³¹⁸

En el ensayo pivotal en fase III del IFN-beta 1b³⁰², los pacientes NAbs positivos tuvieron una tasa de brotes significativamente más altas durante el 2º y 3º ($p<0,01$), siendo la tasa de brote equivalente a la de los pacientes que recibieron placebo.³⁰² En la extensión del ensayo pivotal en fase III con IFN-beta 1a (Rebif®) los NAbs también causaron una clara reducción de la eficacia del tratamiento sobre los brotes.³²⁷ En el ensayo INCOMIN, un estudio randomizado, abierto para comparar el IFN-beta 1b (Betaferon®) con el 1ª IM (Avonex®), se encontró que la frecuencia de Nabs era mayor en los pacientes que tuvieron algún brote que en los que no.³²⁸ Esto ya fue demostrado en los estudios pivotaes de IFN-beta 1b, los cuales mostraron más lesiones en los pacientes NAbs positivos comparados con los NAbs negativos durante el segundo y el tercer año.^{302,329} En el estudio PRISMS se encontró una tendencia a lo largo de los dos primeros años hacia una mayor actividad en RM en los pacientes NAbs positivos³⁰⁴ En el estudio a 4 años,³²⁷ los pacientes NAbs positivos tuvieron casi 5 veces más incremento en el número de lesiones en T2 que los NAbs negativos ($p<0,001$).

La forma más habitual de medir los NAbs es mediante su efecto en la bioactividad del IFN sobre líneas celulares respondedoras mediante el ensayo de efecto citopático (CPE). Este ensayo es el método que recomienda la Organización Mundial de la Salud (OMS)³³⁰.

1.9- BIOMARCADORES DE RESPUESTA A TRATAMIENTO

Un biomarcador se puede definir como una característica que se mide y se evalúa objetivamente como un indicador de procesos biológicos normales, procesos patológicos o respuestas a una intervención terapéutica. En EM los biomarcadores se pueden clasificar en 4 grupos: predictivos, diagnósticos, de actividad de la enfermedad o de respuesta a tratamiento. Los biomarcadores de respuesta a tratamiento se miden en pacientes que están recibiendo un tratamiento en EM para evaluar si la respuesta al tratamiento falla con el fin de poder establecer una terapia individualizada.³³¹ Disponer de biomarcadores de respuesta a tratamiento antes de iniciar la terapia sería beneficioso para la identificación de pacientes con alto riesgo de fracaso del tratamiento.

En el tratamiento con IFN-beta se han descrito biomarcadores clínicos de respuesta óptima como la no aparición de nuevas lesiones en resonancia magnética nuclear (MRN) durante el primer año de tratamiento, el no aumento en al menos un punto en la escala EDSS, la no aparición de brotes clínicos durante el tratamiento o la combinación de algunos de ellos.³³²⁻³³⁴. Así mismo, se han descrito biomarcadores biológicos de respuesta a tratamiento con, tales como las células CD56^{bright} que se elevan tras el tratamiento en pacientes con una respuesta óptima a IFN-beta.³³⁵

Bajos niveles de IL17F en suero se han asociado con una buena respuesta al tratamiento con IFN-beta,³³⁶ sin embargo estos resultados no se han podido validar en estudios posteriores.³³⁷⁻³³⁹

Otro de los biomarcadores predictores de respuesta a esta terapia es la presencia de anticuerpos neutralizantes anti-IFN-beta (NAbs), lo que produciría una pérdida de la actividad biológica del IFN-beta.^{340, 341}

Se han descrito también múltiples marcadores genéticos³⁴² como la expresión temprana de TRAIL en pacientes con buena respuesta a IFN-beta.³⁴³ Finalmente se ha descrito que la presencia de BOC de IgM líquido específicas se asocia con una respuesta subóptima a este fármaco.³⁴⁴

2. OBJETIVOS

Los principales objetivos de este estudio fueron:

1. Estudio prospectivo de distintas moléculas y células que nos permitan identificar los pacientes de EM con alta probabilidad de mostrar una respuesta óptima al interferón beta antes del inicio del mismo.
2. Validación de los biomarcadores encontrados en una cohorte independiente.
3. Estudio de los factores estudiados en individuos sanos. Comparación con los pacientes de EM.
4. Evaluación de los cambios experimentados en las moléculas y células estudiadas a los seis meses de tratamiento con el fin de poder identificar distintos factores que se asocian con una respuesta óptima al IFN-beta y contribuir a dilucidar algunos de los mecanismos que contribuyen a la fisiopatología de la EM.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. PACIENTES Y MATERIALES

3.1.1- Pacientes

Se incluyeron 119 pacientes con esclerosis múltiple remitente recidivante (EM-RR) diagnosticados siguiendo los criterios de McDonald¹ estudiados en el Servicio de Neurología del Hospital Ramón y Cajal. Los pacientes fueron incluidos en el estudio de forma consecutiva. Ninguno de ellos había recibido tratamiento con fármacos inmunosupresores, inmunomoduladores ni corticoides en los seis meses precedentes a la extracción de la primera muestra de sangre periférica. Los pacientes fueron seguidos durante dos años. En todos ellos se monitorizó la aparición de nuevos brotes, la progresión de la discapacidad medida por la escala EDSS y por último el número de nuevas lesiones para ello se hizo una RM previa al inicio del tratamiento y otra al año.

En el estudio se incluyó también un grupo de 30 controles sanos. Todos ellos donaron sangre de forma voluntaria para este trabajo

3.1.2- Muestras biológicas

Este estudio fue aprobado por el Comité Ético del Hospital Ramón y Cajal. Las muestras se obtuvieron para monitorizar la evolución de los pacientes. Para su utilización en este trabajo se obtuvo siempre el consentimiento informado de cada paciente.

Las muestras de suero fueron alicuotadas y almacenadas a -80°C. Para el estudio de subpoblaciones celulares de sangre periférica se recogieron 10 ml de sangre de cada paciente en tubos de heparina de litio. Parte de los marcajes celulares se analizaron en muestras de sangre fresca. Las células restantes se alicuotaron y congelaron con DMSO al 10% en medio completo y se guardaron

en nitrógeno líquido hasta su utilización. Se obtuvieron muestras de suero y sangre periférica al inicio y a los 6 meses de tratamiento.

3.1.3. Anticuerpos monoclonales utilizados para el estudio de poblaciones linfocitarias en sangre.

Los Anticuerpos monoclonales (AcMo) utilizados para el estudio de poblaciones linfocitarias en sangre periférica se detallan en la tabla 1.

Tabla 1: Descripción de los AcMo utilizados en la detección de poblaciones linfocitarias.

Especificidad	Fluorocromo conjugado	Procedencia
CD4	FITC	Beckman Coulter
CD8	FITC	Becton Dickinson
CD16	FITC	Becton Dickinson
CD19	FITC	Becton Dickinson
CD27	FITC	Becton Dickinson
CD38	FITC	Becton Dickinson
Perforina	FITC	Becton Dickinson
IFN-gamma	FITC	Becton Dickinson
CD25	PE	Becton Dickinson
DR	PE	Becton Dickinson
CD69	PE	Becton Dickinson
CD80	PE	Becton Dickinson
CD154	PE	Becton Dickinson
IL-10	PE	Becton Dickinson
CD3	PE	Becton Dickinson
CD8	PerCP	Becton Dickinson

CD45	PerCP-Cy5.5	Becton Dickinson
TNF-alfa	PerCP-Cy5.5	Becton Dickinson
CD16	PE-Cy5	Becton Dickinson
CD19	PE-Cy5	Becton Dickinson
CD56	PE-Cy5	Becton Dickinson
CD8	PE-Cy7	Becton Dickinson
CD19	PE-Cy7	Becton Dickinson
CD4	APC	Becton Dickinson
CD5	APC	Becton Dickinson
CD19	APC	Becton Dickinson
CD45	APC	Becton Dickinson
IL-17	APC	R&D systems
FoxP3	Alexa Fluor 647	Becton Dickinson
CD3	APC-H7	Becton Dickinson
CD45	APC-H7	Becton Dickinson

3.1.4- Materiales usados para la estimulación celular utilizadas en el estudio intracelular de citoquinas.

- Phorbol myristic acetate (PMA) (Sigma Aldrich Quimica SA, Estados)
- Ionomicina (Sigma Aldrich Quimica AS, Estados)
- Brefeldina A (Becton Dickinson, Estados)
- Monensina (Becton Dickinson, Estados)
- ODN 2006: Oligonucleótico CpG ligando del receptor tipo toll TLR9 humano (InvivoGen)
- Medio RPMI (GIBCO)

- Glutamina (Biowhittaker)
- Gentamicina (Braun)
- Suero de ternera fetal (Biowhittaker)

3.1.5- Materiales usados para la cuantificación de niveles de citoquinas en suero

- Human Th1/Th2/Th9/Th17/Th22. 13 plex Kit (eBioscience)
- ELISA IL-1 β /IL-1F2 (R&D Systems)
- Citómetro FACSCanto II (Becton Dickinson)

3.1.6- Materiales usados para la cuantificación de niveles de vitaminas en suero

- Kit de HPLC para la determinación de vitamina A y E (Chromsystems)
- Kit de inmunoensayo para la determinación de la 25-OH vitamina D
- Agilent Technologies 1120 Compact LC

3.1.7- Materiales usados para la cuantificación de activina A en suero

- ELISA Activina A (R&D Systems)

3.2. DISEÑO DEL ESTUDIO

3.2.1- Definición del estudio

Estudio prospectivo donde se incluyeron de manera consecutiva todos los pacientes susceptibles de tratamiento con interferón beta en el Hospital

Universitario Ramón y Cajal de Madrid durante los años 2010 y 2011 que aceptaron participar en este estudio e iniciaron dicho tratamiento.

3.2.2- Duración del estudio

Dos años de inclusión y dos años de seguimiento

3.2.3- Criterios para definir una respuesta óptima a Interferón beta

Los pacientes fueron clasificados de acuerdo con su clínica y su actividad en RM después de 2 años de tratamiento. Se consideró respuesta óptima (NEDA 3) la ausencia de brotes, progresión o actividad en RM. Se consideró respuesta subóptima el que los pacientes tuvieran al menos un brote durante los dos años de tratamiento, o un aumento mantenido de al menos un punto en la escala EDSS o la presencia de lesiones nuevas en T2 o lesiones captantes de gadolinio en los estudios de RM realizados al año de tratamiento, o varios de los mismos

Se definió como respondedores a los pacientes con respuesta óptima y como no respondedores a los que presentaron una respuesta subóptima.

3.3.4- Protocolo de RM

A todos los pacientes se le hizo una RMN antes del inicio del tratamiento con IFN-beta y 12 meses después.

El estudio de RM anual se retrasó 30 días en los pacientes que habían sido tratados con esteroides durante una recaída para evitar cualquier influencia de los esteroides.

El estudio fue realizado con una Magnetom Vision Plus 1.5 T superconductive magnet.

3.3.5- Seguimiento clínico del paciente

Los pacientes realizaron visitas semestrales, con evaluaciones adicionales en caso de brotes.

Un brote se definió como la aparición de un nuevo síntoma neurológico que perdura durante al menos 24h precedido de al menos tres meses de estabilidad, y al que le sigue un periodo de estabilidad clínica o de mejoría de al menos 30 días.

La progresión de la discapacidad fue definida como un incremento mantenido en la escala EDSS de al menos un punto durante al menos 6 meses y confirmado al final del período de seguimiento.

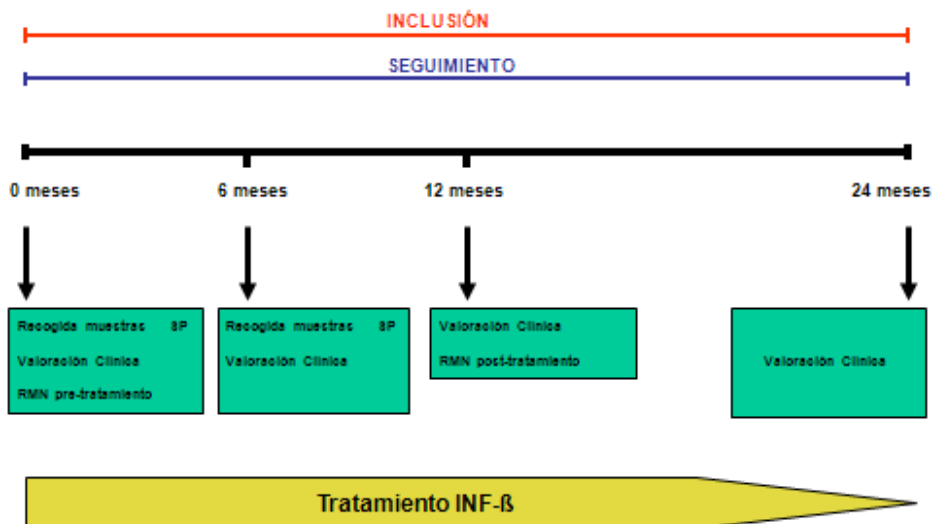


Figura 1: Cronograma del estudio.

3.3. MÉTODOS

3.3.1. Detección de anticuerpos neutralizantes anti-IFN β

Para la detección de anticuerpos neutralizantes anti-IFN β se envió una muestra de suero de los pacientes al año de tratamiento con IFN-beta a la unidad de esclerosis múltiple del Hospital Clínico San Carlos, centro de referencia para la detección de dichos anticuerpos. Se realizó la detección mediante ensayo colorimétrico de efecto citopático (CPE)

Este ensayo se hace a lo largo de 4 días partiendo de un cultivo de células de la línea A549.

1^{er} Día: Preparación de las placas de células

Se parte de un frasco de células confluentes. Se lava con suero fisiológico. Se tripsinizan durante 1 minuto a 37° C y se diluyen en 14 ml de medio DMEM al 10% de FBS. Se toman 3 ml de esta suspensión y se añaden 7 ml de medio DMEM al 10% de FBS. Con una pipeta multicanal se añaden 100 μ l de la suspensión celular a cada pocillo de una placa de 96. Se incuba 24 h a 37° C y 5% de CO₂.

2° Día: Preparación de las placas de neutralización

Se inactivan las muestras de suero a 56° C durante 30 minutos.

- Titulación del fármaco:

En cada placa, es necesario titular el IFN-beta 1b, para asegurarse de que se va a utilizar la concentración correcta en el ensayo (10 U/ml), para lo cual se usan las primeras dos columnas de cada placa. Se comienza con el IFN sin

diluir (20 U/ml) y se hacen diluciones sucesivas 1:2 hasta 1:128 en medio DMEM al 2% de FBS. El volumen final de cada pocillo debe ser de 120 μ l.

- Viabilidad máxima de las células (SC) y actividad máxima del virus (SV):

Para este efecto se destinan las dos últimas columnas de cada placa, donde se deben colocar 120 μ l de medio.

- Detección de NAbs en muestras en muestras de suero:

Se utilizan las 8 columnas interiores, dos para cada paciente. En los primeros pocillos se aplica una dilución 1:10 del suero del paciente en medio DMEM al 2% de FBS y se hacen diluciones seriadas a la mitad hasta 1:1280 en la última fila, quedando en cada pocillo un volumen de 60 μ l. Posteriormente, se añade a las columnas impares 60 μ l de medio DMEM al 2% de FBS, para analizar la presencia de interferón endógeno y, a las pares 60 μ l de IFN-beta 1b 20 U/ml.

Tras preparar la placa, se incuba durante una hora a 37° C y 5% de CO₂ para permitir que, en caso de existir NAbs, se unan al interferón y lo inactiven. Luego se transfieren 100 μ l de cada pocillo de esta placa a la placa de células preparada el día anterior.

3^{er} Día: Infección con virus

Se observan las células al microscopio para comprobar que están confluentes. En la campana de flujo se descarta el medio de las placas y se añade a cada pocillo, excepto a aquellos donde se va a analizar la viabilidad máxima de las células (SC), 100 μ l de una dilución del virus 1:200-1:500 en medio DMEM al

0% de FBS. La dilución apropiada del virus fue determinada previamente a su utilización en el ensayo.

En los pocillos SC se añaden 100 µl de medio DMEM al 0% de FBS.

4° Día: Lectura de placas

Se descarta el medio de las placas y se añade a cada pocillo 50 µl de cristal violeta, dejándolo actuar 10 minutos. Se descarta el cristal violeta y se lava la placa bajo el grifo. Se deja secar bien y se le añade a cada pocillo 100 µl de ácido acético. Inmediatamente se procede a la lectura de la placa en un espectrofotómetro a 620 nm.

Análisis de resultados

Con los valores de los pocillos SC y SV se calcula el valor de absorbancia que correspondería al 50% de muerte celular, que es el porcentaje de células que debe proteger una concentración de IFN de 10 U/ml. En las columnas de titulación del interferón, este valor de absorbancia del 50% debe encontrarse entre las diluciones 1:16 y 1:32. Se calcula el valor del título de interferón exactamente mediante la tendencia y debe de ser aproximadamente 20.

En las columnas de suero de los pacientes existen tres posibilidades:

- Si todos los pocillos tienen una absorbancia por encima del 50% significa que todas las células están vivas y que el paciente no tiene NAbs.
- Si todos los pocillos tienen una absorbancia por debajo del 50% significa que todas las células están muertas y que hay que hacer más diluciones para hallar el título exacto de NAbs.

- Si es posible encontrar un valor del 50% para las diluciones testadas, hay dos casos posibles: el 50% se encuentra en una dilución inferior a 1:20, en cuyo caso el test sería negativo; o el 50% se encuentra en una dilución superior a 1:20, en cuyo caso el test sería positivo y es posible hallar el título. Para los casos de pacientes positivos, con dilución superior a 1:20, se calcula el segundo título Kawade, a través de la fórmula:

$$t = f(n-1)/9$$

- **t** es el segundo título Kawade (que es el valor que se reporta).
- **f** es la dilución de suero
- **n** es el título de IFN encontrado en el test.

3.3.2- Detección de vitamina A y E

La detección de vitamina A y E en suero se realizó mediante HPLC de Chromsystems siguiendo las indicaciones del fabricante.

3.3.3- Detección de vitamina D

La detección de vitamina D se llevó a cabo mediante el Kit D de Architect system (Abbott) para la determinación de 25-OH vitamina siguiendo las indicaciones del fabricante.

3.3.4- Detección de Activina A en suero.

La detección de activina A se llevó a cabo mediante ELISA sándwich de (R&D Systems) siguiendo las indicaciones del fabricante.

3.3.5- Detección de citoquinas solubles en suero

La detección de citoquinas en suero se realizó mediante citometría de flujo con análisis múltiples usando el Human Th1/Th2/Th9/Th17/Th12 13plex kit flowcytomix (eBioscience)

El principio de este test consiste en la utilización de unas microesferas de tamaño conocido (A: 5 μm y B: 4 μm).

El conjunto de A consiste en 11 poblaciones de microesferas y el conjunto de B consiste en 9, cada una de ellas teñidas internamente con un colorante con una intensidad de fluorescencia diferente.

Las microesferas son excitadas por el laser azul y emiten en el rojo lejano (700 nm).

Los dos tamaños de hacen que sea posible distinguir 20 tipos diferentes en un solo canal de fluorescencia.

Cada tipo está unido a un anticuerpo de captura según se detalla en la tabla 2.

Esto permite la cuantificación simultánea de un alto número de citoquinas con una sola alícuota de 50 μl de suero. En nuestro caso se cuantificaron 13 citoquinas.

El conjunto de microesferas se incubó con los sueros o estándares correspondientes, con anticuerpos frente a cada citoquina conjugados con biotina y posteriormente con estreptavidina marcada con ficoeritrina. Tras realizar los correspondientes lavados, las muestras se analizan en un citómetro FACS Canto II (Becton Dickinson). En la figura 2 se muestra un ejemplo representativo de los resultados.

Tabla 2: microesferas utilizadas en el ensayo de flowcytomix

Anticuerpo específico	Población de microesferas	Clonalidad
h IFN- γ	A4	monoclonal
h IL-1 β	B8	monoclonal
h IL-2	A6	monoclonal
h IL-4	B6	monoclonal
h IL-5	B7	monoclonal
h IL-6	A12	monoclonal
h IL-9	A10	monoclonal
h IL-10	A8	monoclonal
h IL-12 p70	A2	monoclonal
h IL-13	B4	monoclonal
h IL-17F	A5	monoclonal
h IL-22	A11	monoclonal
h TNF- α	B9	monoclonal

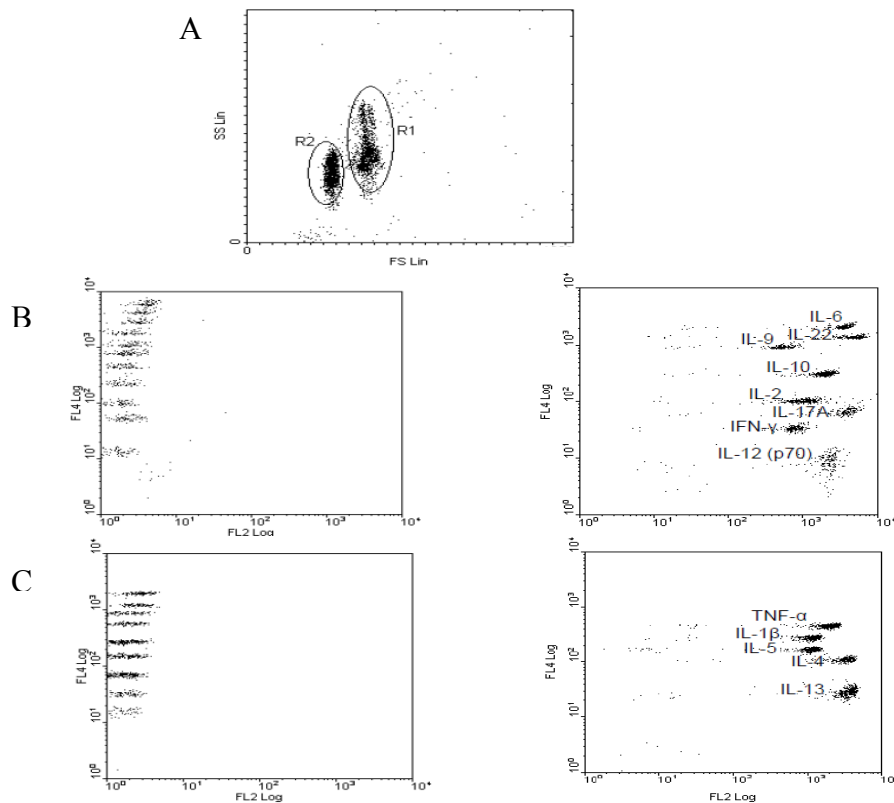


Figura 2: En la figura 1A corresponde a una imagen de FSC-SS donde vemos las dos poblaciones de bolitas a las cuales realizamos una región (R1 y R2). FL2 correspondería al canal de emisión de la ficoeritrina (PE) y FL4 al canal de emisión de las bolitas (rojo lejano). En la imagen 1B vemos las citoquinas correspondientes a las poblaciones R1, en el primer plot cuando son negativas y en el segundo plot la imagen que darían cuando son positivas. En la imagen 1C vemos las citoquinas correspondientes a las poblaciones R2, en el primer plot cuando son negativas y en el segundo plot la imagen que darían cuando son positivas.

3.3.6- Estudio de poblaciones celulares en sangre periférica

El estudio de las poblaciones celulares de los pacientes con EM y del grupo control se llevó a cabo mediante citometría de flujo. Todas las muestras fueron procesadas dentro de las 2 horas posteriores a la extracción.

Se incubaron 50 μ l de sangre total para los marcajes en superficie con el panel de anticuerpos monoclonales detallados en la tabla 3.

Tabla 3: Panel de marcaje de antígenos de membrana utilizado

	FITC	PE	PerCP	APC
Tubo 1	CD38	CD5	CD45	CD19
Tubo 2	CD4	CD25	CD8	CD45
Tubo 3	CD4	DR	CD8	CD45
Tubo 4	CD19	CD80	CD45	CD5
Tubo 5	CD19	CD86	CD45	CD5
Tubo 6	CD16	CD45	CD3	CD56

La incubación de la sangre fue de 20-30 minutos a temperatura ambiente y en oscuridad. Transcurrido este tiempo se añadieron a cada tubo una solución para lisar los hematíes (FACLYsing, Becton Dickinson). Posteriormente los tubos se centrifugaron a 1400 r.p.m 10 minutos y se descartaron los sobrenadantes. A continuación se realizaron 2 lavados con suero salino fisiológico durante 7 minutos a 1400 r.p.m. Después de los lavados, se decantaron los tubos y se resuspendieron los precipitados celulares en 200 µl de suero salino fisiológico para ser analizados 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

El número absoluto de células analizadas fue en todos los casos de 30.000.

En un gráfico biparamétrico que representaba granularidad (SSC) frente a tamaño celular (FSC) los linfocitos totales se englobaban dentro de la población con una granularidad y un tamaño celular intermedio-bajo (P2).

3.3.7- Estudio de citoquinas intracitoplasmáticas, perforina y expresión de FoxP3 por citometría de flujo.

3.3.7.1- Separación de células mononucleares

Se realizó la separación de linfocitos mediante gradiente de densidad con ficoll-hypaque utilizando 10 ml de sangre periférica heparinizada. Se realizó una dilución previa de la sangre en suero salino a 1/2. Se centrifugó 30 minutos a 1800 rpm. Se recuperó el halo y posteriormente a la realización de los lavados se resuspendió en un mililitro de medio completo y se contaron las células en cámara de Neubauer

3.3.7.2- Estudio de citoquinas intracitoplasmáticas: TNF- α , IFN- γ , IL-17 e IL-10.

Para el estudio de citoquinas intracitoplasmáticas se prepararon dos tubos por muestras en los cuales se añadieron 1×10^6 células/ml en medio completo por tubo.

Tubo Sin estimular: Añadimos 2 μ l de Brefeldina (μ g/ μ l) + 0.7 μ l de Monensina (2.9 mM)

Tubo Estimulado: Añadimos 5 μ l de PMA (μ g/100 μ l) + 7.5 μ l de inomicina (1 μ g/10 μ l) + 2 μ l de Brefeldina(μ g/ μ l) + 0.7 μ l de Monensina. (2.9 mM)

Incubamos en estufa a 37°C durante 4 horas. A continuación cada tubo se dividió en tres alícuotas iguales. Cada una se marcó uno de los paneles de anticuerpos monoclonales para los antígenos de superficie detallados a continuación (Tabla 4, en cursiva).

Tabla 4: Panel de marcaje de antígenos citoplasmáticos utilizado.

	FITC	PE	PECy5/PerCP	PECy7	APC	APC-H7
Tubo 1	<i>IFNγ*</i>	<i>DR</i>	<i>CD19</i>	<i>CD8</i>	<i>IL-17*</i>	<i>CD3</i>
Tubo 2	<i>CD8</i>	<i>DR</i>	<i>TNFα*</i>	<i>CD19</i>	<i>CD4</i>	<i>CD3</i>
Tubo 3	<i>CD8</i>	<i>IL-10*</i>	<i>CD56</i>	<i>CD19</i>	<i>CD4</i>	<i>CD3</i>

Los anticuerpos marcados con * corresponden a los marcajes intracitoplasmáticos

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 7 minutos a 1400 r.p.m. Después de los lavados, se decantaron los tubos y se resuspendieron los precipitados celulares y se añadieron 200 μ l de solución permeabilizadora (citofix) incubando durante 20 minutos a 4°C. Se llevó a cabo un lavado con 2 ml de solución de lavado (Perm-wash) diluido 1/10 durante 7 minutos a 1400 r.p.m. Realizamos el marcaje con los anticuerpos anti-antígenos intracitoplasmáticos (Tabla 4*) e incubamos durante 30 minutos a 4°C en oscuridad. Trascurrido este tiempo procedimos a realizar un lavado con 2 ml de solución de lavado (Perm-wash) diluido 1/10 durante 7 minutos a 1400 r.p.m. Resuspendimos los precipitados celulares en 400 μ l de perm-wash para ser analizados 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. El número absoluto de células analizadas fue superior en todos los casos a 30.000.

En los siguientes gráficos vemos imágenes de citometría sin estimular y estimuladas de TNF- α , IFN- γ , IL-17 e IL-10.

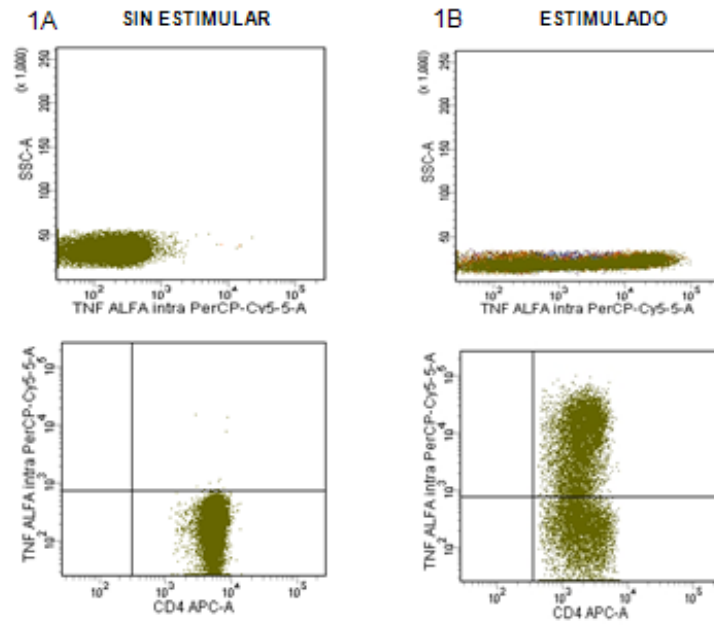


Figura 3: Producción de TNF- α sin estimular las células (1A) y posteriormente a su estimulación (1B), en los primeros plots sobre la celularidad total y en los segundos sobre linfocito T CD4+.

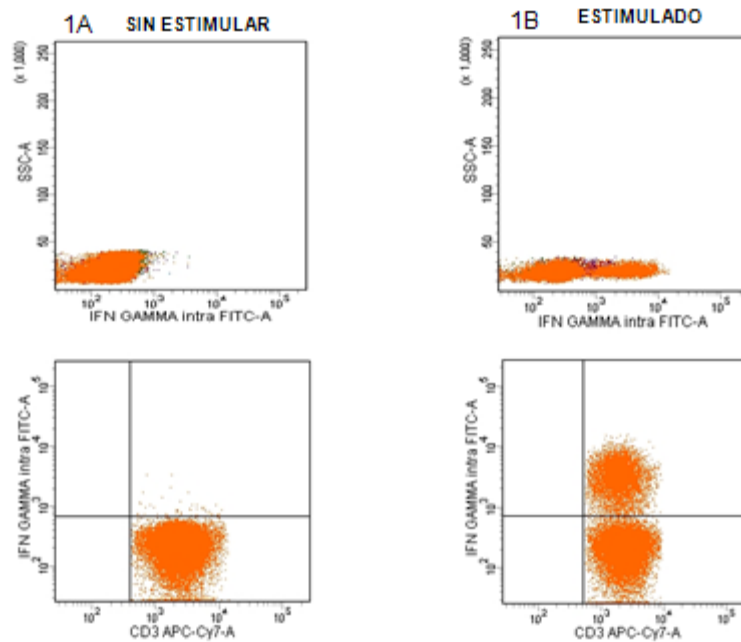


Figura 4: Producción de INF- γ sin estimular las células (1A) y posteriormente a su estimulación (1B), en los primeros plots sobre la celularidad total y en los segundos plot sobre linfocito T CD3+.

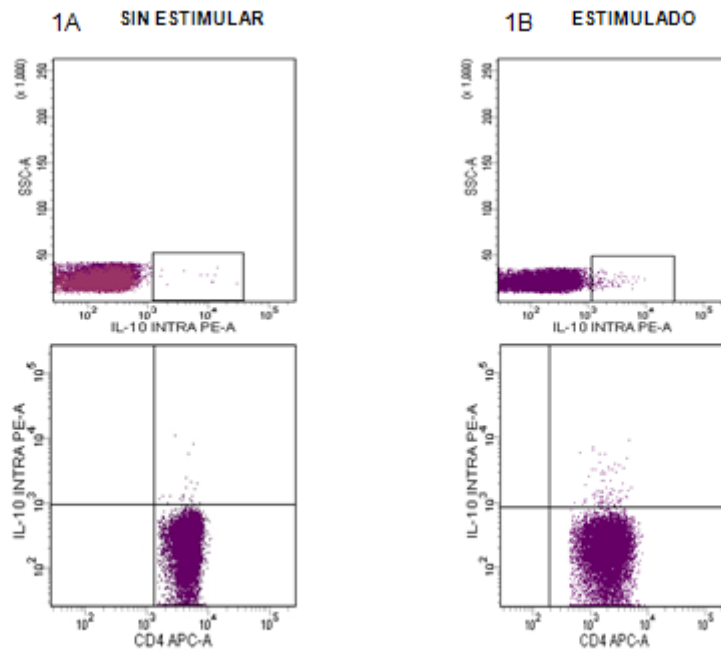


Figura 5: Producción de IL-10 sin estimular las células (1A) y posteriormente a su estimulación (1B), en los primeros plots sobre la celularidad total y en los segundos sobre linfocito T CD4+.

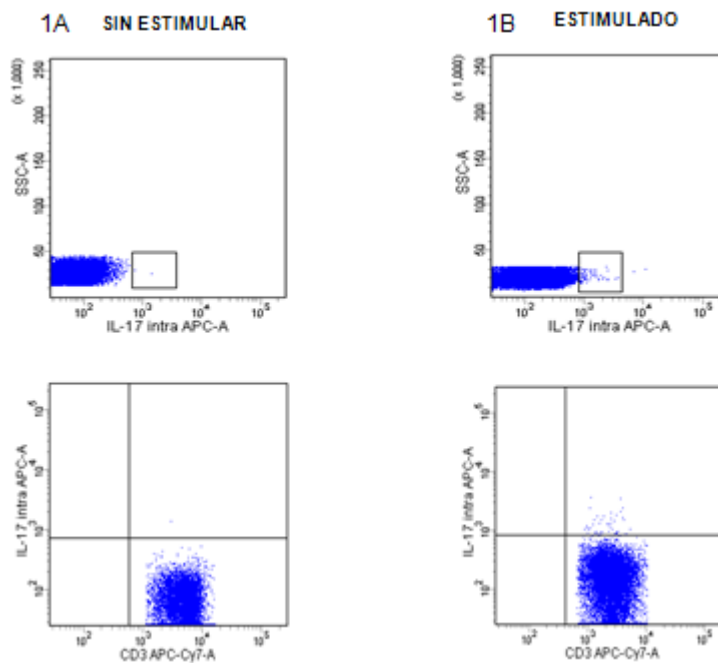


Figura 6: Producción de IL-17 sin estimular las células (1A) y posteriormente a su estimulación (1B), en los primeros plots sobre la celularidad total y en los segundos sobre linfocito T CD3+.

3.3.7.3- Estudio de producción de IL-10 por los linfocitos B

La detección de IL-10 en los linfocitos B requirió de una estimulación especial con el oligonucleótido CpG; para ello se estimularon 1×10^6 células/ml de medio completo con 10 μ l de ODN-CpG (3 μ g/10 μ l) durante 24 horas en estufa a 37°C. Cuando faltaban 4 horas para cumplirse las 24 horas de estimulación se añadieron 5 μ l de PMA (1 μ g/100 μ l) + 7.5 μ l de ionomicina (1 μ g/10 μ l) + 2 μ l de Brefeldina (1 μ g/ μ l) + 0.7 μ l de Monensina (2.9mM). Preparamos también un tubo sin estimular con 1×10^6 células/ml de medio completo el cual incubamos durante 24h y a falta de 4 horas le añadimos 2 μ l de Brefeldina + 0.7 μ l de Monensina. Transcurridas las 4 horas de incubación restantes se incubaron 1×10^6 células/100 μ l de medio completo con el siguiente panel de anticuerpos exceptuando la IL-10 que al ser un marcaje intracitoplasmático se añadirá posteriormente. (Tabla 5)

Tabla 5: Panel de marcaje de antígenos citoplasmáticos utilizado.

	FITC	PE	PECy5/PerCP	PECy7	APC	APC-H7
Tubo 1	CD27	IL-10*	CD3	CD19	CD5	CD45

Los anticuerpos marcados con * corresponden a los marcajes intracitoplasmáticos

Se prosiguió según el mismo protocolo que se detalla en el apartado 3.3.7.2.

La imagen de producción de IL-10 por los linfocitos B por células estimuladas y sin estimular se observa en la figura 7

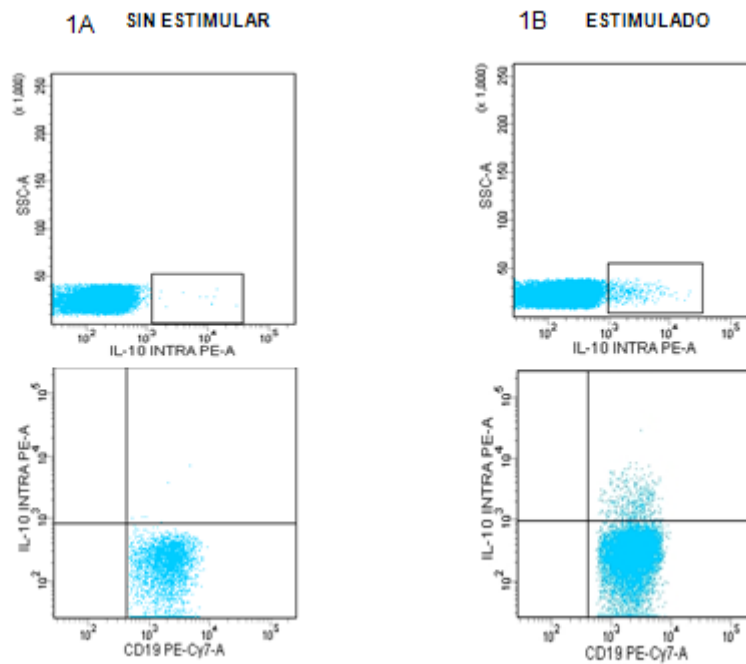


Figura 7: Producción de IL-10 por los linfocitos B sin estimular (1A) y tras la estimulación correspondiente (1B)

3.3.7.4- Estudio del factor de transcripción FoxP3

Estudiamos la expresión de FoxP3 en linfocitos T CD4+, para ello marcamos 1×10^6 células/100 μ l con los anticuerpos monoclonales anti-antígenos de superficie del siguiente panel de anticuerpos, exceptuando el FoxP3 que al ser un marcaje intracitoplasmático se añadirá posteriormente (Tabla 4).

Tabla 6: Panel de marcaje de antígenos citoplasmáticos utilizado.

	FITC	PE	PECy5/PerCP	PECy7	APC	APC-H7
Tubo 1	CD4	CD25	CD8	CD19	FoxP3*	CD45

Los anticuerpos marcados con * corresponden a los marcajes intracitoplasmáticos

Incubamos durante 20 minutos a 4°C en oscuridad. Tras este tiempo se realiza un lavado con un ml Perm wash buffer factor de transcripción 5x en centrifuga refrigerada a 6-8 °C durante 6 minutos a 1400 r.p.m. Importante a partir de este momento mantener los bufferes en hielo y las muestras siempre refrigeradas. Tras el lavado decantamos el sobrenadante, resuspendemos el precipitado celular y añadimos 7.5 ml de buffer de permeabilización (Fix/Perm buffer factor de transcripción 4x).

Agitamos en vortex e incubamos a 4°C durante 45 minutos. Trascorrido este tiempo se realiza un lavado con un ml de Perm wash buffer factor de transcripción 5x en centrifuga refrigerada a 6-8 °C durante 6 minutos a 1400 r.p.m. Volvemos a decantar el sobrenadante y a resuspender y añadimos 2 ml de Perm wash buffer factor de transcripción 5x y centrifugamos en centrifuga refrigerada a 6-8 °C durante 6 minutos a 1400 r.p.m. Decantamos el sobrenadante, resuspendemos y añadimos 20 µl de FoxP3-Alexa 647 + 80 µl de Perm wash buffer factor de transcripción 5x. Incubamos durante 45 minutos a 4°C. Tras la incubación realizamos 2 lavados con 2 ml de Perm wash buffer factor de transcripción 5x en centrifuga refrigerada a 6-8°C durante 6 minutos a 1400 r.p.m.

Por último decantamos el sobrenadante resuspendemos el precipitado celular y añadimos 300 µl de salino frio para su posterior análisis en el citómetro FACSCanto y el software FACSDiva. Siempre se adquirieron un número mínimo de 30000 eventos.

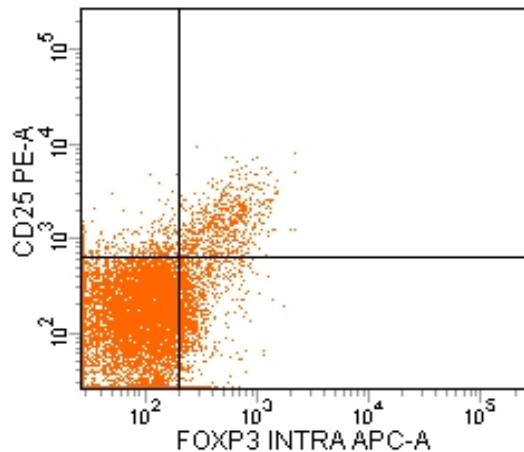


Figura 8: Linfocito T CD4+CD25+FoxP3+ de un paciente con esclerosis múltiple.

3.3.7.5- Estudio de expresión de perforina por los linfocitos T citotóxicos y las células NK.

En el estudio de expresión de perforina se marcaron 1×10^6 células/100 μ l con los anticuerpos monoclonales anti-antígeno de superficie detallados en la tabla 5.

Tabla 7: Panel de marcaje de antígenos para el estudio de la expresión de perforina.

	FITC	PE	PECy5/PerCP	PECy7	APC	APC-H7
Tubo 1	Perforina*	DR	CD16	CD8	CD56	CD45

Los anticuerpos marcados con * corresponden a los marcajes intracitoplasmáticos

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 7 minutos a 1400 r.p.m. Después de los lavados, se decantaron los tubos y se resuspendieron los precipitados celulares y se añadieron 200 μ l de solución

permeabilizadora (citofix) incubando durante 20 minutos a 4°C. Se llevó a cabo un lavado con 2 ml de solución de lavado (Perm-wash) diluido 1/10 durante 7 minutos a 1400 r.p.m. Realizamos el marcaje con perforina e incubamos durante 30 minutos a 4°C en oscuridad. Trascurrido este tiempo procedimos a realizar un lavado con 2 ml de solución de lavado (Perm-wash) diluido 1/10 durante 7 minutos a 1400 r.p.m. Resuspendimos los precipitados celulares en 400 µl de perm-wash para ser analizados en el citómetro de flujo FACSCanto II. El análisis multiparamétrico se llevó a cabo con el programa FACSDiva. El número absoluto de células analizadas fue superior en todos los casos a 30.000.

En el siguiente gráfico vemos una imagen de citometría de perforina. (figura 9).

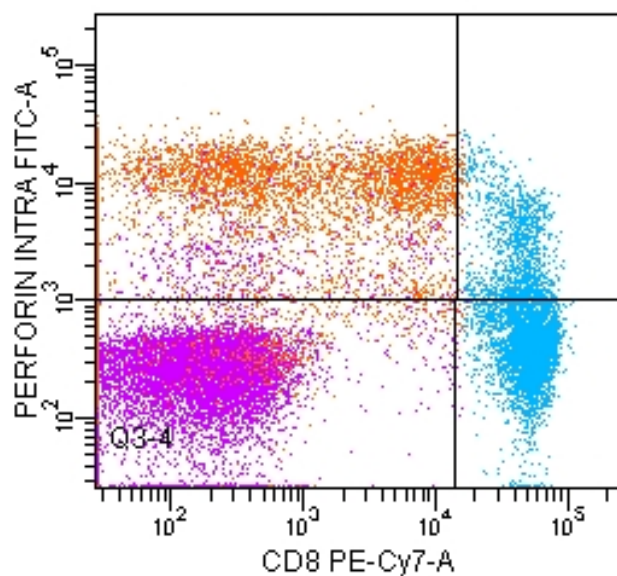


Figura 9: Producción de perforina por los linfocitos T citotóxicos y por las células NK de un paciente con esclerosis múltiple.

3.3.8- Análisis estadístico

El análisis de los resultados se realizó mediante el paquete estadístico GraphPad Prism 5.0. Las variables fueron expresadas como media \pm error estándar de la media.

Los valores en distintos grupos de una misma variable se contrastaron usando el test de la U de Mann-Whitney. Utilizamos el test exacto de Fisher para la analizar datos clasificados de dos formas distintas.

Los estudios de correlación se llevaron a cabo calculando el coeficiente de correlación de Spearman.

4. RESULTADOS

4.1.- DATOS DEMOGRÁFICOS

En el estudio se han incluido 119 pacientes con esclerosis múltiple remitente recidivante (EMRR) tratados con interferón beta y 30 controles sanos. 23 pacientes fueron tratados con Betaferón, 37 con Rebif 44 y 59 con Avonex. Los pacientes se han seguido prospectivamente durante 2 años desde el inicio del tratamiento. Las características demográficas de los pacientes y del grupo control y las características clínicas de los pacientes al inicio del tratamiento se detallan en la tabla 8. No se observan diferencias significativas en edad y sexo entre pacientes y controles.

Tabla 8: Características clínicas y demográficas de los individuos que participaron en el estudio

	EMRR n= 119	Controles n= 30	p
Sexo (F/M)	90/29	20/10	ns
Edad	36.9±1.04	33.4±1.77	ns
Tiempo de evolución	5.7±0.97	-	
EDSS inicio	1.5± 0.09	-	
EDSS inicio tratamiento	1.8±0.09	-	
EDSS fin tratamiento	2.2±0.13	-	
Nº de Brotes previos	2.2±0.14	-	
Tasa de brotes previa al tratamiento	1.4±0.15	-	
Nº de Brotes en tratamiento	0.54±0.08	-	
Tasa de Brotes en tratamiento	0.48±0.09	-	

EMRR: esclerosis múltiple remitente recidivante; F: femenino; M: masculino; ns: no significativo

4.2- ABANDONOS DE TRATAMIENTO

Cuatro pacientes abandonaron el estudio por cambio de domicilio.

Dieciséis pacientes abandonaron el tratamiento por diferentes motivos no relacionados con la eficacia del tratamiento:

En cinco casos el abandono se debió a causas no relacionadas con el fármaco:

- Cuatro por deseo de embarazo
- Uno por aparición de otra patología

En once casos el abandono se debió a causas relacionadas con el fármaco:

- Dos no toleran las inyecciones
- Tres por mala tolerancia al fármaco
- Tres por depresión
- Tres por otros efectos secundarios leves.

Veintidós pacientes fueron cambiados de tratamiento por su neurólogo antes de completar los dos años de duración del estudio por falta de eficacia del fármaco. De estos pacientes 12 cambiaron a otra presentación de interferón beta, cuatro a natalizumab, cuatro a acetato de glatiramero y dos a fingolimod. Todos ellos permanecieron en tratamiento con IFNB al menos durante un año y fueron incluidos en el estudio de biomarcadores como respondedores subóptimos.

4.3- ESTUDIO DE ANTICUERPOS NEUTRALIZANTES ANTI-INTERFERÓN BETA.

La presencia de anticuerpos neutralizantes anti-interferón beta (NAb) en suero se analizó en todos los pacientes incluidos en el estudio. Se detectaron dichos anticuerpos en nueve pacientes cuyas características se muestran en la tabla 9, todos ellos presentaron una respuesta subóptima al tratamiento. Este número representa el 9% de los pacientes estudiados.

Tabla 9: Características demográficas y clínicas de los nueve pacientes con anticuerpos anti-IFNB.

	Tto	Sexo	Edad I tto	T evol (años)	EDSS I tto	EDSS fin tto	Nº Brotes en tto	Nuevas lesiones en tto
P1	Betaferón	M	67.07	4.53	6.5	6.5	1	Si
P2	Betaferón	M	46.73	0.74	1	1.5	1	Si
P3	Rebif	M	51.16	2.97	3.5	5.5	1	Si
P4	Betaferón	M	44.02	3.4	1.5	6.5	1	Si
P5	Betaferón	M	31.4	0.98	1.5	2	2	Si
P6	Betaferón	F	44.07	0.38	2	3	2	Si
P7	Betaferón	F	41.03	0.22	0	1.5	1	Si
P8	Betaferón	M	60.08	18.18	1.5	1.5	0	Si
P9	Rebif	M	34.48	2.83	1	2	1	Si

Tto: tratamiento; I: inicio; T evol: tiempo de evolución de la enfermedad; Ac: anticuerpos; P: paciente; M: masculino; F: femenino.

4.3.1- Presencia de anticuerpos en relación con el tratamiento

De los nueve pacientes con anticuerpos neutralizantes anti interferón beta siete recibían como tratamiento betaferón (77.8% de los pacientes con NAb) y dos rebif44 (22.2% de los pacientes con NAb). El 30.4% de los pacientes tratados con betaferón presentaba NAb frente al 5.4% de los pacientes tratados con Rebif44. En ninguno de los pacientes tratados con Avonex se detectó la presencia de estos anticuerpos. Se observaron diferencias significativas en la presencia de NAb entre los pacientes tratados con betaferón y rebif ($p= 0.008$) y entre los pacientes tratados con betaferón y Avonex ($p< 0.0001$). No existían diferencias en la presencia de NAb en los pacientes tratados con Rebif y Avonex. (Figura 10)

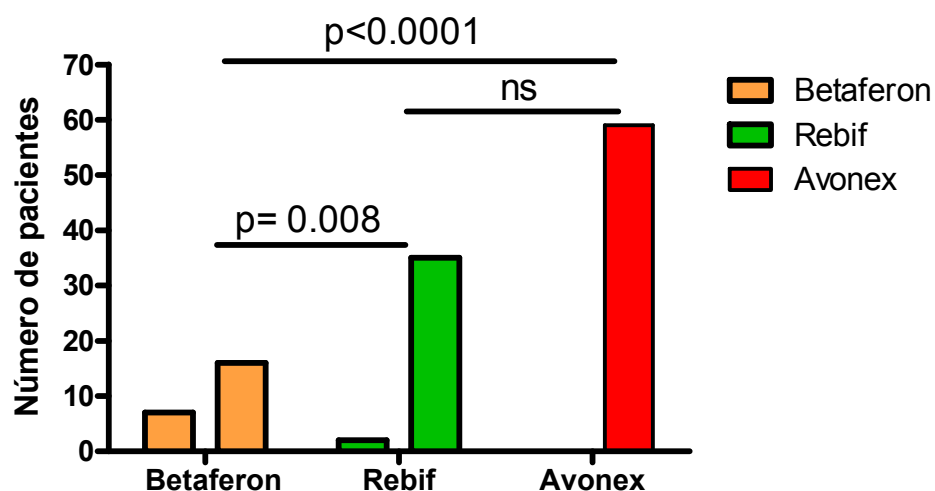


Figura 10: Pacientes que presentaban NAb tras el tratamiento con cada uno de los tres fármacos: En cada grupo de tratamiento la primera barra representa a los pacientes que no presentan NAb y la segunda barra los pacientes que si los presentan.

Estos nueve pacientes fueron excluidos del estudio de biomarcadores inmunológicos dado que la presencia de NAb bloquea la biodisponibilidad del

fármaco y por tanto no se puede asegurar que su mala respuesta al tratamiento con IFN-beta sea debida a la falta de eficacia del mismo.

4.4. VALORACIÓN DE LA RESPUESTA AL TRATAMIENTO

Clasificamos a los pacientes en respondedores y No respondedores al tratamiento según se define en el apartado 3.2.3 de materiales y métodos. Consideramos como respondedores a los pacientes que no presentaron nuevas lesiones en resonancia magnética, brotes o progresión de la discapacidad durante los dos años de seguimiento. Treinta y cuatro pacientes (37.8% de los pacientes) cumplieron estos criterios a lo largo del seguimiento (Figura 2). Se consideraron como “no respondedores” a los pacientes que presentaron nuevas lesiones en resonancia magnética, brotes o progresión de la discapacidad durante el seguimiento. Cincuenta y seis pacientes (62.2% de los pacientes) presentaron estas características. (Figura 11)

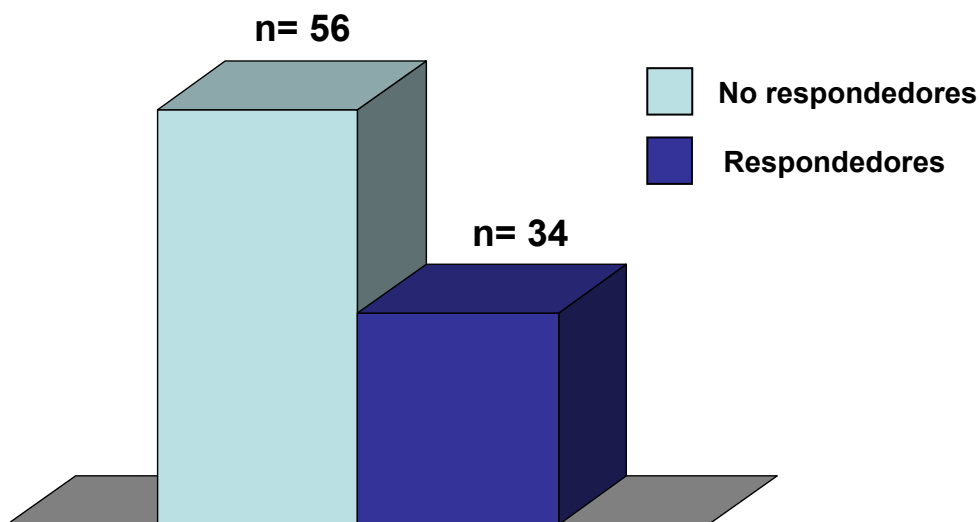


Figura 11: Clasificación de pacientes atendiendo a su respuesta al tratamiento con IFN-beta.

Al analizar las características clínicas y demográficas de ambos grupos de pacientes no se vieron diferencias significativas en cuanto a sexo, edad inicio del tratamiento, tiempo de evolución, discapacidad según la escala EDSS al inicio de tratamiento ni número de brotes previos al mismo (Tabla 10) Se encontraron claras diferencias en las variables clínicas de ambos grupos durante el tratamiento.

Tabla 10. Características clínicas y demográficas de los pacientes No respondedores y respondedores al tratamiento con IFNB.

	No		p
	respondedores	Respondedores	
	n= 56	n= 34	
Sexo (F/M)	41/15	29/5	ns
Edad inicio tratamiento	36.2±1.38	38±1.58	ns
Tiempo de evolución	4.3±0.73	6.7±1.08	ns
EDSS inicio tratamiento	1.8±0.16	1.6±0.13	ns
Nº de Brotes previos	2.2±0.21	2.5±0.29	ns
EDSS fin tratamiento	2.5±0.22	1.6±0.13	0.005
Nº de Brotes en tratamiento	0.9±0.13	0	<0.0001
Nuevas lesiones en RMN (T2) Si/No	37/18*	0/34	<0.0001
Tipo de Interferón: Betaferón/Rebif/Avonex	6/18/32	4/10/20	ns

NR: No respondedores; R: Respondedores; ns: no significativo, RMN: resonancia magnética nuclear. *A uno de los pacientes no fue posible realizarle el seguimiento mediante RMN debido a que tenía una prótesis metálica.

4.5. MONITORIZACIÓN DE MARCADORES INMUNOLÓGICOS AL INICIO DEL TRATAMIENTO

4.5.1- FACTORES SOLUBLES

4.5.1.1. Estudio de citoquinas solubles en el suero de pacientes con EM

Estudiamos los niveles séricos de trece citoquinas implicadas en la respuesta Th1, Th2, Th17 y Th22 en una muestra representativa de 41 pacientes. (28 no respondedores y 13 respondedores) al inicio del tratamiento. Las citoquinas estudiadas fueron: IL-12, IL-1 β , IFN- γ , TNF- α , IL-6, IL-17, IL-22, IL-13, IL-4, IL-2, IL-10 e IL-5. Los resultados obtenidos se muestran en la tabla 11. No se observaron diferencias significativas entre respondedores y no respondedores al tratamiento con IFN-beta en ninguna de las citoquinas estudiadas.

Tabla 11: Niveles de citoquinas en suero de pacientes respondedores y .no respondedores

	NR (n= 28)	R (n= 13)	p
IL-12 (pg/ml)	12.91 \pm 7.53	9.23 \pm 7.9	0.8413
IFN- γ (pg/ml)	12.81 \pm 3.98	8.31 \pm 3.8	0.8104
IL-17F (pg/ml)	30.56 \pm 10.85	44.12 \pm 19.12	0.5204
IL-1 β (pg/ml)	17.49 \pm 6.59	5.29 \pm 3.58	0.2133
TNF- α (pg/ml)	23.21 \pm 6.73	20.76 \pm 9.71	0.3826
IL-2 (pg/ml)	11.48 \pm 4.96	12.86 \pm 7.14	0.5728

IL-10 (pg/ml)	14.29 ± 4.22	13.54 ± 6.78	0.6643
IL-22 (pg/ml)	396.5 ± 82.36	350.9 ± 92.33	0.9882
IL-6 (pg/ml)	7.65 ± 2.13	8.82 ± 2.93	0.2972
IL-13 (pg/ml)	14.08 ± 5.58	25.65 ± 10.23	0.1999
IL-4 (pg/ml)	39.29 ± 10.03	75.07 ± 32.76	0.6627
IL-5 (pg/ml)	22.04 ± 8.3	45.27 ± 18.56	0.4024

NR: no respondedores. R: respondedores. IL: Interleucina. IFN- γ : Interferón gamma. TNF: Factor de necrosis tumoral. ns: no significativo.

4.5.1.2- Estudio de vitaminas en suero

Entre los factores ambientales relacionados con la patogenia de la EM se encuentran la disminución de los niveles de vitaminas, particularmente la vitamina D, en suero. Por ello nos propusimos estudiar los niveles de vitamina A, E y D en el suero de los pacientes incluidos en el estudio al inicio del tratamiento como el fin de utilizarlo como posible biomarcador.

Estudiamos dichos niveles en 90 pacientes con EM y 30 controles.

Comparación de niveles de vitaminas entre pacientes respondedores y No respondedores.

Se compararon los niveles de las tres vitaminas estudiadas en el suero de los pacientes respondedores y no respondedores.

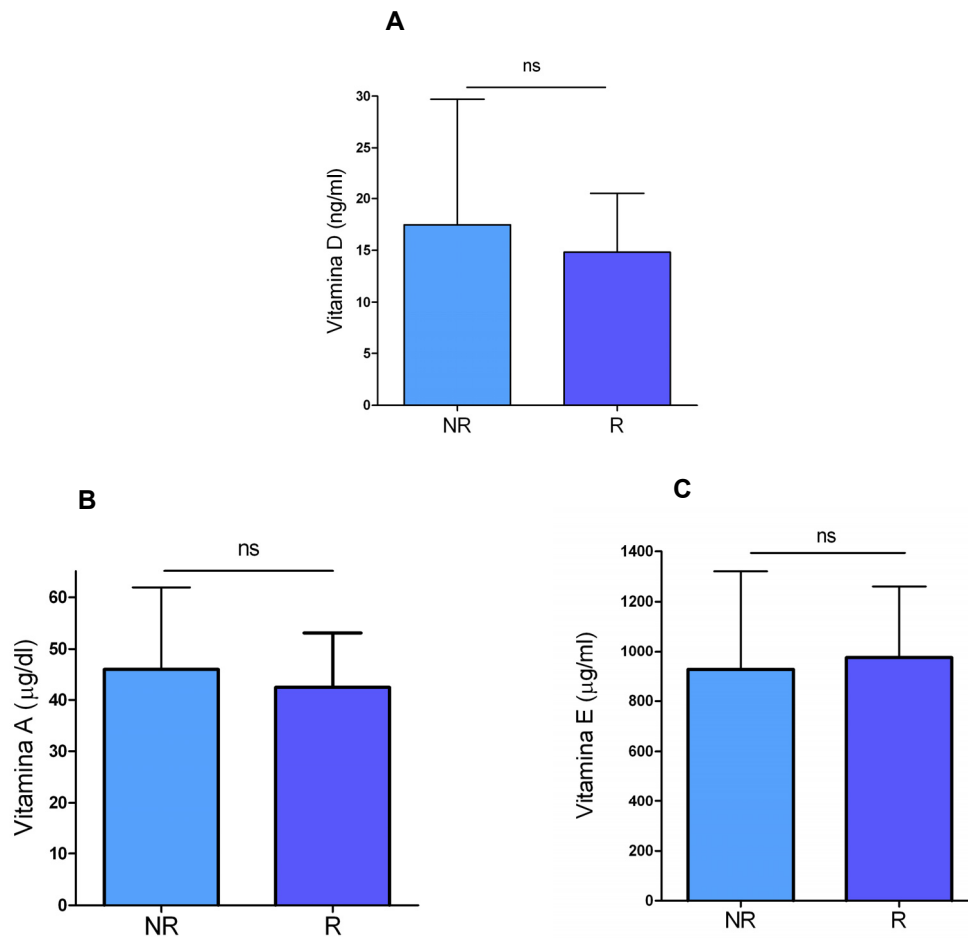


Figura 12: Comparación de los niveles de vitamina D, A y E en los pacientes con EM. R: Respondedor óptimo, NR: Respondedor subóptimo, ns: no significativo

No se observaron diferencias significativas en ninguna de las tres vitaminas analizadas. (Figura 12).

Tampoco se observaron valores distintos en el suero de los pacientes a los seis meses de tratamiento.

Comparación de niveles de vitaminas entre pacientes y controles

A continuación comparamos los niveles séricos de estas vitaminas en pacientes y controles. Los resultados se muestran en la figura 4. No se detectaron diferencias en los niveles de vitamina A entre pacientes y controles

(Fig 13A). Sin embargo se observó una clara disminución en los niveles de vitamina D en los pacientes con EM en relación a los controles ($p < 0.0001$, Fig. 13C). También se observaron dichas diferencias, aunque menos acusadas, en los niveles de vitamina E ($p = 0.001$). (Fig. 13B).

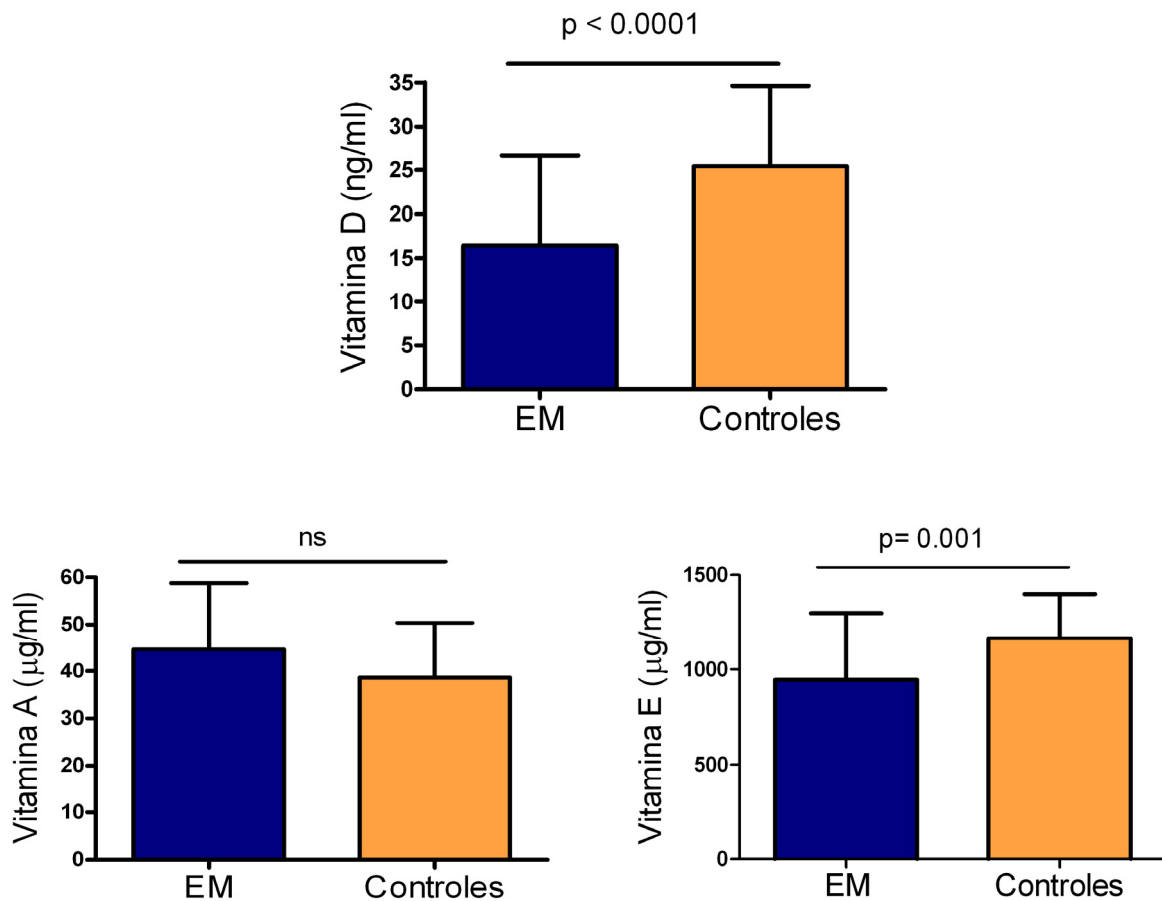


Figura 13: Niveles de vitaminas A, E y D en pacientes con EM y controles.

Relación de niveles de vitaminas D con las estaciones.

La luz solar influye en los niveles de vitamina D en suero, por ello comparamos dichos niveles entre pacientes y controles en dos épocas del años (Invierno y Verano). Los sueros considerados de invierno fueron los extraídos entre noviembre y mayo y los de verano los obtenidos entre junio y octubre.

Cuarenta y cinco pacientes se incluyeron en el grupo de esclerosis múltiple de

invierno y 36 pacientes en el grupo de esclerosis múltiple de verano. Los controles de invierno fueron 14 y los de verano 15.

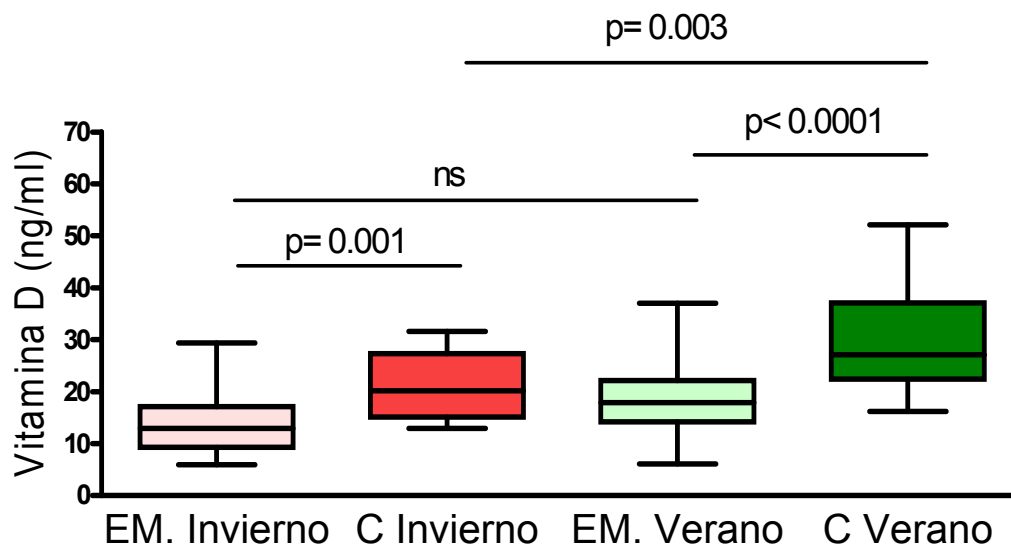


Figura 14: Comparación de niveles de vitamina D en pacientes y controles en muestras de suero extraídas en los meses de invierno y verano.

En los resultados obtenidos se observa que los pacientes tienen un menor nivel de vitamina D que los controles tanto en las muestras de invierno como en las de verano, si bien las diferencias parecen ser mayores en las muestras de verano. (Figura 14)

Cuando se compararon los niveles de vitamina D en invierno y verano se observó un aumento en las muestras controles obtenidas en verano ($p=0.003$). (Figura 14)

Relación vitaminas fenotipo inflamatorio.

Estudiamos la posible existencia de una asociación entre niveles bajos de vitaminas y la presencia de un perfil inflamatorio en los pacientes; para ello

estudiamos la correlación entre la vitamina A, E y D y distintas subpoblaciones celulares inmunológicas detalladas en la tabla 12.

Tabla 12: Estudio de la correlación de subpoblaciones leucocitarias y niveles de vitaminas A, E y D

	Subpoblaciones celulares
Linfocitos B	Células B CD19+
	Células B CD19+CD5+
	Células B CD19+CD5-
	Células CD19+CD38+
	Células CD19+CD80+
	Células CD19+CD86+
Linfocitos T CD4+	Linfocitos T CD4+
	Linfocitos T CD4+CD25hi
	Linfocitos T CD4+CD25hiFoxP3
	Linfocitos T CD4+CD25i
	Linfocitos T CD4+DR+
	Linfocitos T CD4+TNF- α
	Linfocitos T CD4+INF- γ
	Linfocitos T CD4+IL-17
	Linfocitos T CD4+IL-10

<p>Linfocitos T CD8+</p>	<p>Linfocitos T CD8+</p> <p>Linfocitos T CD8+Perf+</p> <p>Linfocitos T CD8+DR+</p> <p>Linfocitos T CD8+TNF-α</p> <p>Linfocitos T CD8+INF-γ</p> <p>Linfocitos T CD8+IL-17</p> <p>Linfocitos T CD8+IL-10</p>
<p>Células NK</p>	<p>Células CD56dim</p> <p>Células NK</p> <p>(CD56+CD16+)</p> <p>Células NKT (CD56+CD3)</p> <p>Células CD56bright</p>

Se encontró una modesta correlación inversa entre los niveles de vitamina D en suero y el porcentaje de los linfocitos T CD4+ productores de interferón gamma con una $r = -0.3495$ y $p=0.042$ (Figura 15) .

Al realizar este mismo estudio con la vitamina E se obtuvo correlación significativa entre los niveles séricos de esta vitamina y el porcentaje de linfocitos CD19+CD86+ ($r= 0.4374$, $p=0.016$). (Figura 16).

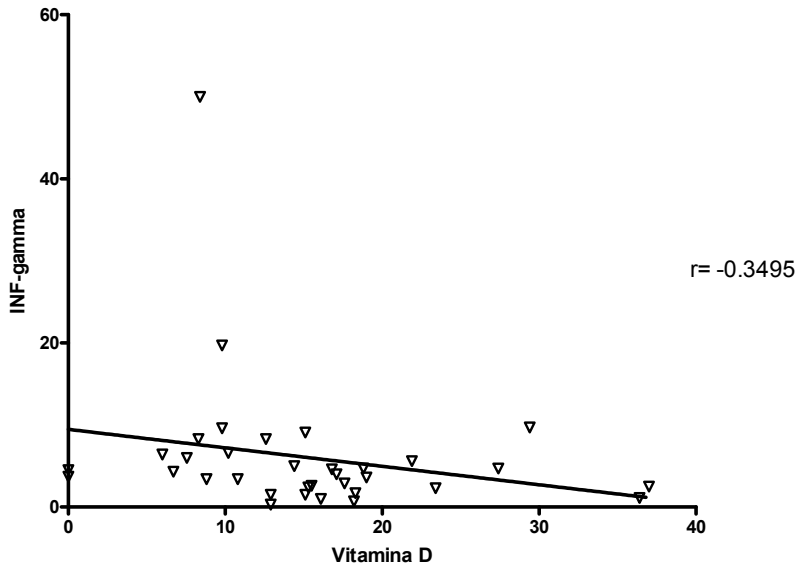


Figura 15: Correlación entre niveles de vitamina D (ng/ml) y el porcentaje de linfocitos CD4+ productores de interferon gamma.

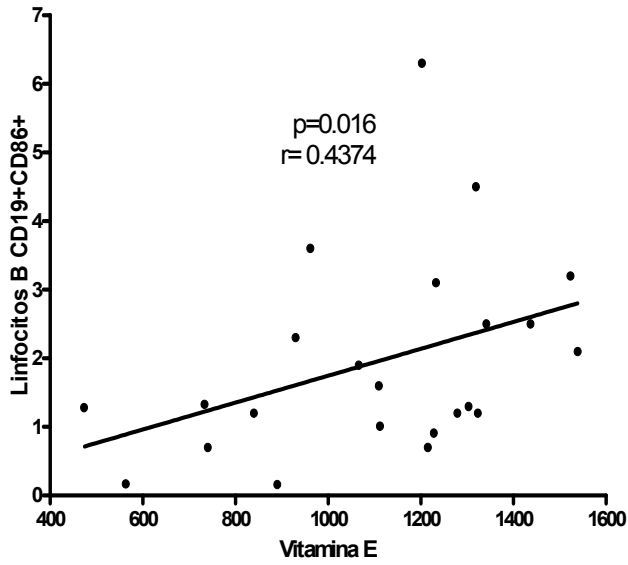


Figura 16: Correlación entre niveles de vitamina E ($\mu\text{g/ml}$) y el porcentaje de linfocitos B CD19+CD86+.

4.5.1.3. Activina A

La activina A es un mediador necesario para el establecimiento de una respuesta M1 en macrófagos.²⁸¹ Al comparar los niveles de activina A entre los dos grupos de pacientes tratados con IFN-beta (R y NR), no se encontraron diferencias significativas entre los grupos estudiados (figura 17). Sin embargo se apreció un aumento significativo de los niveles de activina A en el suero de pacientes con EM respecto a controles sanos. (figura 18)

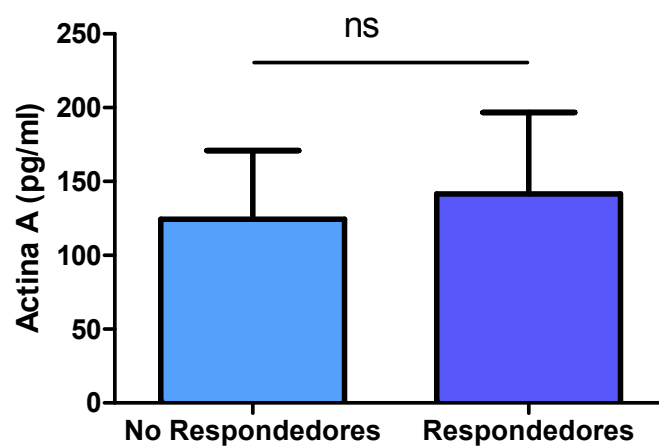


Figura 17: Comparación de los niveles de activina A en los pacientes con EM. R: Respondedor óptimo, NR: Respondedor subóptimo, ns: no significativo

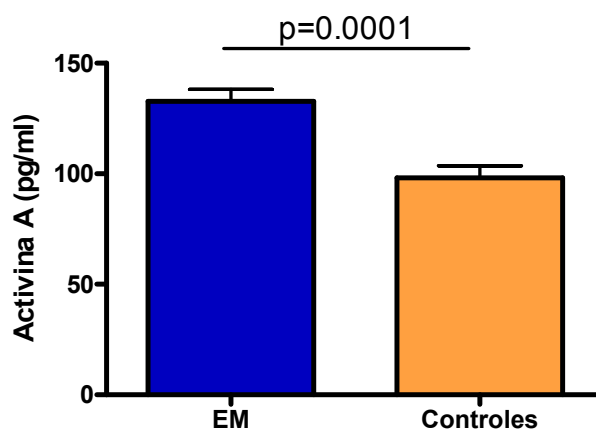


Figura 18: Comparación de los niveles de Activina A en el suero de pacientes con EM y controles sanos. EM: esclerosis múltiple.

4.5.2- SUBPOBLACIONES LEUCOCITARIAS

Estudiamos subpoblaciones celulares mediante citometría de flujo utilizando para ello marcajes tanto superficiales como intracelulares.

El estudio de antígenos superficiales se realizó en todos los pacientes incluidos en el estudio 34 pacientes respondedores 56 pacientes no respondedores.

El estudio de los antígenos intracelulares se realizó en una muestra representativa que incluyó a 20 pacientes respondedores y 20 no respondedores.

Los resultados obtenidos se detallan en las siguientes páginas divididos por tipos celulares:

4.5.2.1-Linfocitos B

Evaluamos las distintas respuestas inmunológicas en las que intervienen los linfocitos utilizando los marcajes que se muestran en la Tabla 13.

Tabla 13: *Tipos de respuestas B evaluadas.*

<i>Funcionalidad de las células B</i>	<i>Antígenos diferenciales</i>
Respuesta T independiente	CD19+CD5+
Respuesta T dependiente	CD19+CD5-
Activación	CD38
Presentación antigénica	CD80, CD86
Respuesta inflamatoria	TNF- α
Respuesta reguladora	IL-10

Los resultados obtenidos (Tabla 14) muestran que los pacientes no respondedores al tratamiento con IFN-beta presentan niveles aumentados de linfocitos B. Cuando analizamos las distintas subpoblaciones no encontramos diferencias en las células presentadoras de antígeno (CD80+ y CD86+) ni en la expresión de citoquinas intracelulares entre los dos grupos de pacientes. Sin embargo dicho aumento se objetivó en las subpoblaciones CD19+38+, CD19+CD5- y CD19+CD5+ (Figura 19), observándose las diferencias más claras se en esta última subpoblación.

Tabla 14: *Subpoblaciones celulares B en pacientes respondedores y no respondedores.*

<i>Células B</i>	<i>No respondedores</i>	<i>Respondedores</i>	<i>p</i>
Células B CD19+	11.26±0.61	7.76±0.44	0.0003
Células B CD19+CD5+	3.97±0.3	2.14±0.24	0.0002
Células B CD19+CD5-	7.3±0.42	5.6±0.31	0.013
Células CD19+CD38+	1.4±0.26	0.86±0.18	0.02
Células CD19+CD80+	3.8±0.65	3.05±0.41	ns
Células CD19+CD86+	2.1±0.43	1.75±0.28	ns
Células CD19+TNF-α	2.78±0.76	2.9±0.64	ns
Células CD19+INF-γ	0.13±0.04	0.4±0.2	ns
Células CD19+IL-17	0.12±0.04	0.07±0.01	ns
Células CD19+IL-10	0.2±0.04	0.1±0.02	ns

NR: No respondedores; R: Respondedores; ns: no significativo

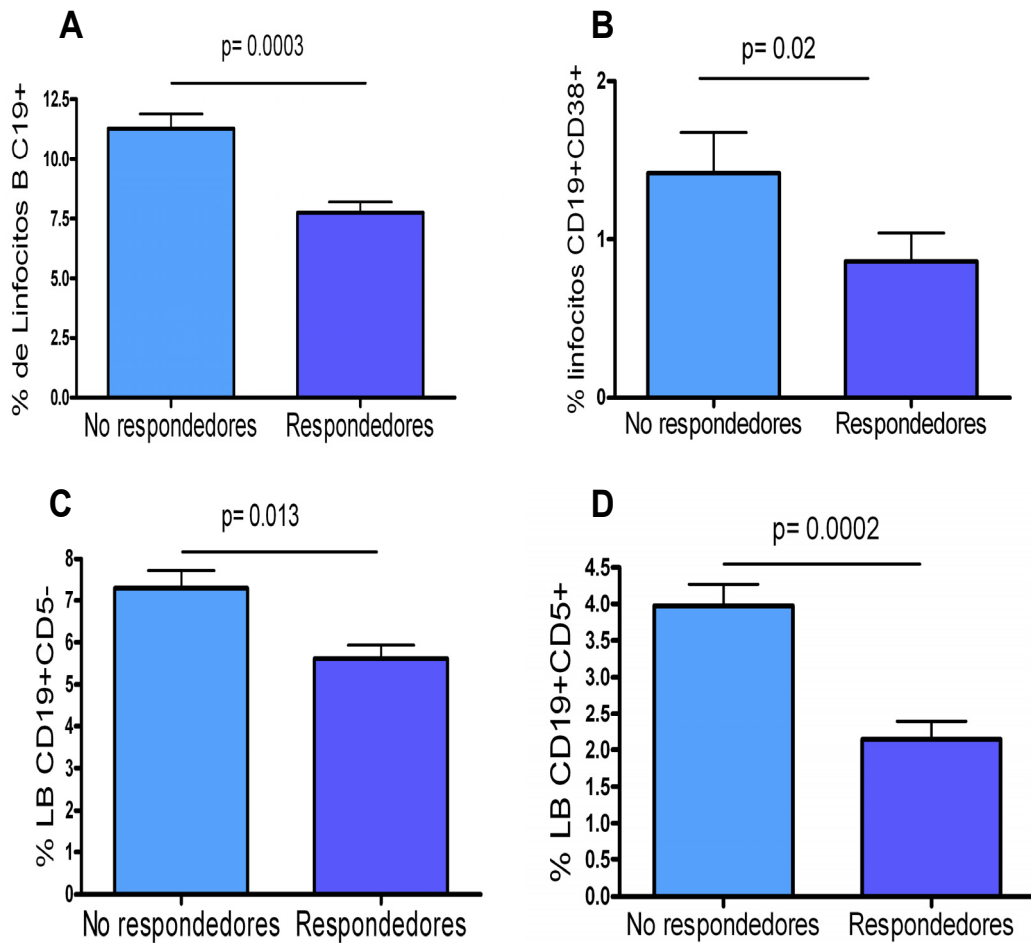


Figura 19: Comparación de los porcentajes de linfocitos B CD19 (A), linfocitos B CD19+CD38+ (B), linfocitos B CD19+CD5- (C) y linfocitos B CD19+CD5+ (D) entre el grupo de pacientes “no respondedores” y “respondedores” al tratamiento con IFN-beta.

A continuación se muestran dos ejemplos significativos de la población de linfocitos B CD5+ en pacientes no respondedores (Figura 20A) y respondedores (Figura 20B) a Interferón beta.

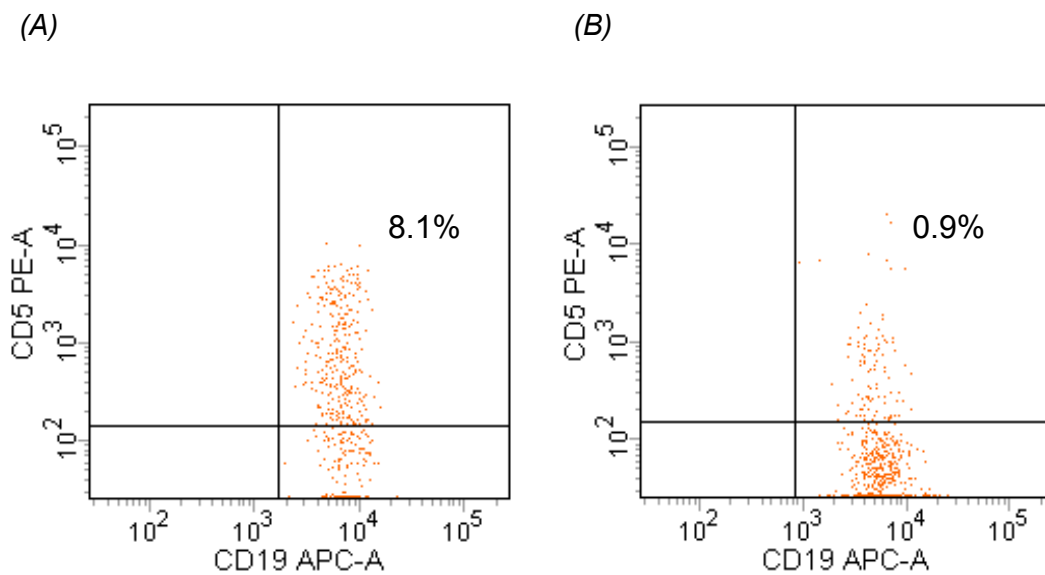


Figura 20: Imagen de citometría de flujo de la población de células B CD19+CD5+ de un paciente con EM del grupo de No respondedores (A) y de un paciente con EM del grupo de Respondedores (B).

4.5.2.2- Linfocitos T CD4+

A continuación estudiamos las distintas subpoblaciones de linfocitos T cooperadores. Los resultados obtenidos al comparar el grupo de pacientes no respondedores con el de respondedores se muestran en la tabla 15. No encontramos diferencias en los porcentajes de linfocitos CD4+ totales, en distintas subpoblaciones de linfocitos CD4+ activados (CD4+,CD25+ de intensidad intermedia, CD4+,DR+), o en los linfocitos CD4+ secretores de TNF-alfa, interferón gamma, interleuquina 17 o interleuquina 10. Sólo encontramos diferencias significativas en el porcentaje de linfocitos T reguladores (CD4+CD25hiFoxP3+) que se encuentra aumentado en el grupo de pacientes que van a mostrar una respuesta subóptima al tratamiento con IFN Beta. (Figura 21).

Tabla 15: Resultados obtenidos al comparar diferentes subpoblaciones celulares T en ambos grupos de pacientes.

Linfocitos T	NR	R	p
Linfocitos T CD4+	47.77±0.91	47.15±0.91	ns
Linfocitos T CD4+CD25hi	2.9±0.15	2.4±0.16	0.033
Linfocitos T CD4+CD25hiFoxP3	1.63±0.18	0.89±0.16	0.013
Linfocitos T CD4+CD25i	17.79±0.89	16.2±1.26	ns
Linfocitos T CD4+DR+	3.4±0.17	4.5±0.44	ns
Linfocitos T CD4+TNF-α	11.9±2.11	14.9±2.12	ns
Linfocitos T CD4+INF-γ	7±2.41	5.9±1.16	ns
Linfocitos T CD4+IL-17	0.28±0.05	0.34±0.09	ns
Linfocitos T CD4+IL-10	0.98±0.86	0.17±0.03	ns

NR: No respondedores; R: Respondedores; ns: no significativo

A continuación se muestran los resultados de los linfocitos T reguladores en ambos grupos de pacientes.

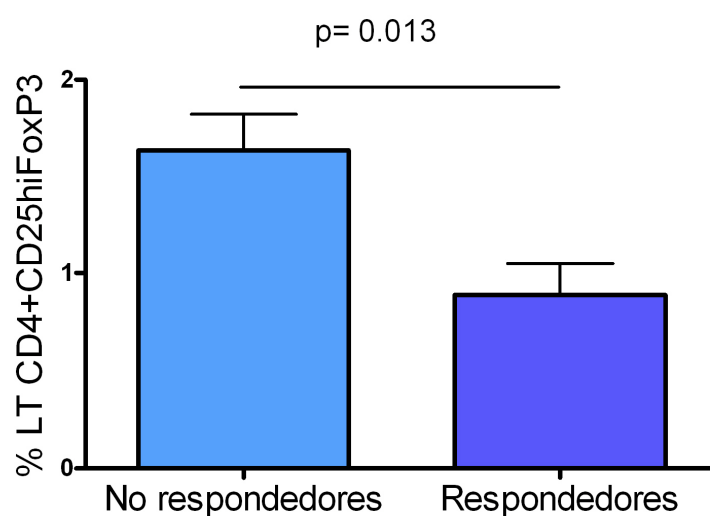


Figura 21: Comparación de porcentajes de linfocitos T reguladores entre el grupo de pacientes no respondedores y respondedores al tratamiento con IFN-beta.

4.5.2.3- Linfocitos T CD8+

Los linfocitos T CD8+ han sido relacionados con la patogenia de la EM ya que podrían contribuir al daño directo sobre la mielina debido a su acción citotóxica. Nos propusimos por ello evaluar tanto los niveles de estos linfocitos en la sangre de pacientes con esclerosis múltiples como los niveles de moléculas que participan en su acción citolítica como la perforina. Se estudió del mismo modo su activación y la producción de citoquinas tipo Th1 y Th17. (Tabla 16).

Tabla 16: *Tipos de respuestas T CD8 evaluadas.*

<i>Funcionalidad de las células T</i>	<i>Antígenos diferenciales</i>
Producción de citoquinas Th1	TNF- α , IFN- γ
Producción de citoquinas Th17	TNF- α , IL-17
Respuesta citotóxica	perforina

Se observó que los linfocitos T CD8+ productores de perforina se encontraban aumentados al inicio del tratamiento en los pacientes que van a presentar una respuesta óptima al tratamiento con IFNB (Figura 22).

No se encontraron diferencias significativas entre pacientes respondedores y no respondedores en el resto de subpoblaciones estudiadas. (Tabla 17).

Tabla 17: Resultados obtenidos al comparar subpoblaciones de linfocitos T CD8+ en ambos grupos de pacientes.

Linfocitos T	NR	R	p
Linfocitos T CD8+	24.74±0.82	26.63±0.9	ns
Linfocitos T CD8+Perf+	2.89±0.51	6.57±1.23	0.004
Linfocitos T CD8+TNF-α	6.12±1.79	7.03±1.36	ns
Linfocitos T CD8+INF-γ	5.76±1.53	5.74±1.10	ns
Linfocitos T CD8+IL-17	0.004±0.002	0.06±0.02	ns
Linfocitos T CD8+IL-10	0.02±0.01	0.01±0.009	ns

NR: No respondedores; R: Respondedores; ns: no significativo

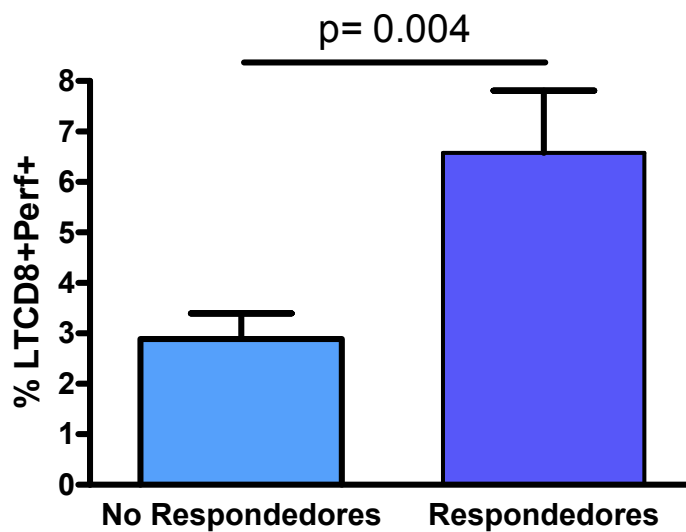


Figura 22: Comparación de porcentajes de linfocitos CD8+Perf+ entre el grupo de pacientes no respondedores y respondedores al tratamiento con IFN-beta.

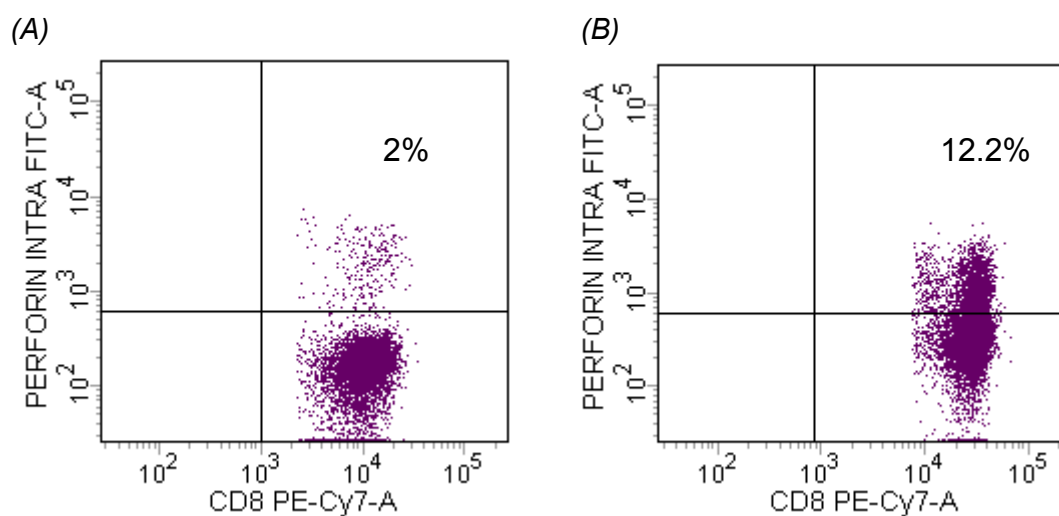


Figura 23: Imagen de citometría de flujo de la población de células T CD8+Perf+ de un paciente con EM del grupo de No respondedores (A) y de un paciente con EM del grupo de Respondedores (B).

4.5.2.4- Células natural killer (NK)

Estudiamos las diferentes subpoblaciones de células NK y NKT en los pacientes incluidos en el estudio al inicio del tratamiento con INF-beta mediante citometría de flujo. (Tabla 18).

Tabla 18: Tipos de respuestas NK evaluadas.

Funcionalidad de las células T	Antígenos diferenciales
Células NK efectoras	CD56dim, CD16, Perforina
Células NK reguladoras	CD56bright

Los resultados obtenidos muestran que no existen diferencias significativas en ninguna subpoblación de células NK entre los pacientes con

una buena respuesta al tratamiento y los que tuvieron una mala respuesta al tratamiento con IFNB. (Tabla 19)

Tabla 19: Resultados obtenidos al comparar subpoblaciones de células NK en ambos grupos de pacientes.

Células NK	NR	R	p
Células CD56dim	13.49±1.57	12.79±1.99	ns
Células NK	6.19±0.86	9.17±1.5	ns
Células NK Perf+	5.09±0.87	8.77±1.49	ns
Células NKT	5.38±0.90	3.47±0.65	ns
Células NKT Perf+	3.75±0.94	2.95±0.58	ns
CD56bright	0.69±0.009	0.69±0.09	ns

NR: No respondedores; R: Respondedores; ns: no significativo

4.5.3- Comparación con controles sanos

Analizamos los biomarcadores en los que se encontraron diferencias significativas al comparar los pacientes respondedores y no respondedores en un grupo control de 30 individuos sanos.

Los individuos sanos presentaban un porcentaje menor de linfocitos CD19+CD5+ al compararlos con el grupo de respondedores ($p= 0.007$) y más aún al compararlo con los no respondedores ($p< 0.0001$). (Figura 24).

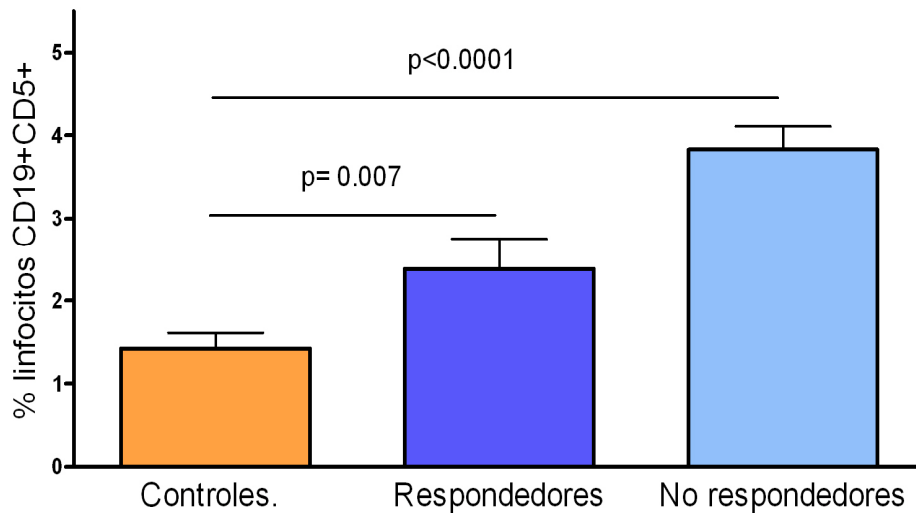


Figura 24: Comparación del porcentaje de linfocitos CD19+CD5+ entre ambos grupos de pacientes con EM y controles sanos.

En el estudio de los linfocitos T CD8+ con expresión de intracelular de perforina se detectó un porcentaje significativamente mayor en los controles sanos en comparación con los pacientes no respondedores ($p= 0.003$). No habiendo diferencias significativas entre los porcentajes de los respondedores y el grupo control (Figura 25).

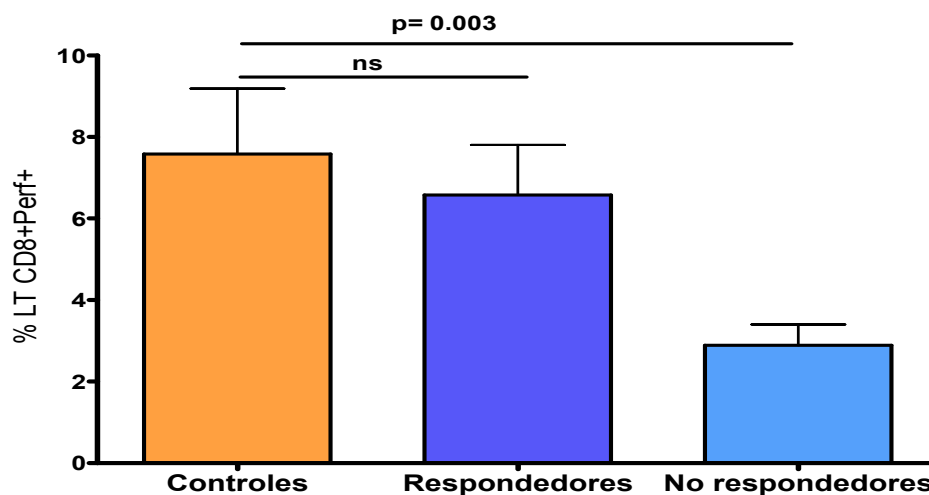


Figura 25: Comparación del porcentaje de linfocitos CD8+Perforina+ entre ambos grupos de pacientes con EM y controles sanos.

No se encontraron diferencias significativas en el porcentaje de linfocitos T CD4+ reguladores entre controles y pacientes con esclerosis múltiple. (Figura 26).

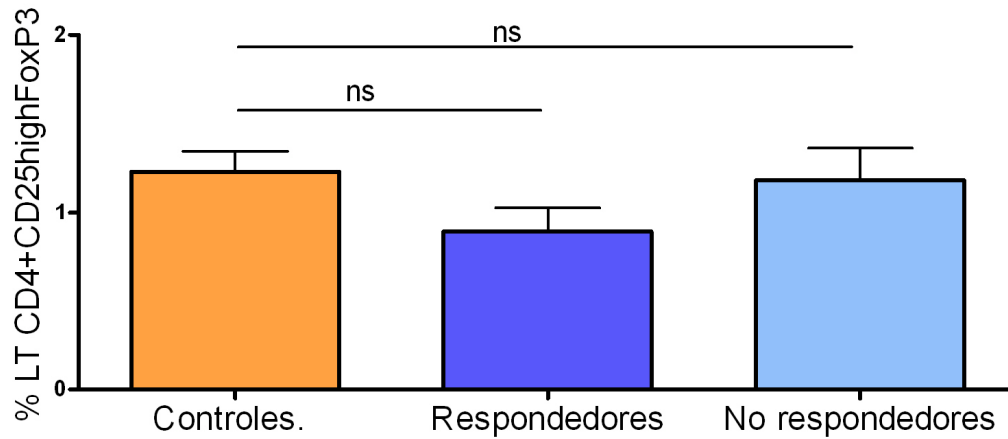


Figura 26: Comparación del porcentaje de linfocitos Treg entre ambos grupos de pacientes con esclerosis múltiple y controles sanos.

Los porcentajes de linfocitos CD19+CD5+ y linfocitos CD8+Perforina+ obtenidos en cada uno de los tres grupo estudiados se resume en la tabla 20.

Tabla 20: Linfocitos CD19+CD5+, CD8+Perf+, CD4+CD25hFoxP3+ en pacientes y controles

	No respondedores	Respondedores	Controles
Linfocitos B CD19+CD5+	3.9±0.3	2.2±0.25	1.4±0.19
Linfocitos T CD8+Perf+	2.89±0.51	6.57±1.23	8.8±1.8
Linfocitos T CD4+CD25hFoxP3	1.18±0.18	0.89±0.14	1.23±0.11

4.5.4- Marcadores de estratificación de pacientes

A continuación estudiamos si el porcentaje de linfocitos B CD19+CD5+ podría ser un buen biomarcador para predecir una respuesta óptima al tratamiento con IFN-beta. Establecimos de forma empírica un punto de corte de 3% para el porcentaje de estas células y estudiamos su capacidad para predecir la respuesta al tratamiento. Dividimos para ello a los pacientes atendiendo a si presentaban un fenotipo de respondedor óptimo (FRO;<3% de linfocitos CD19+CD5+) o subóptimo (FRSO;>3% de linfocitos CD19+CD5+). Observamos que el 63.04% de los pacientes con este fenotipo (FRO) habían mostrado una respuesta óptima al tratamiento con IFN beta. De los pacientes con un fenotipo de respondedor subóptimo (FRSO) el 88.09% presentaron una respuesta subóptima al fármaco ($p<0.0001$, Odd ratio 13.78, IC: 4.5-42.0, figura 27).

Esto demuestra que el porcentaje de linfocitos CD19+CD5+ en sangre contribuye a estratificar a los pacientes de esclerosis múltiple de acuerdo a sus probabilidades de mostrar una respuesta óptima o subóptima al tratamiento con IFN beta si bien este biomarcador identifica mejor a los pacientes con respuesta subóptima que a aquellos que van a mostrar una respuesta óptima al fármaco.

Dado que las presentaciones de IFN beta que existen actualmente en el mercado difieren en las dosis del fármaco, nos propusimos estudiar si estas podrían influir en la capacidad de nuestro biomarcador de predecir la respuesta al fármaco.

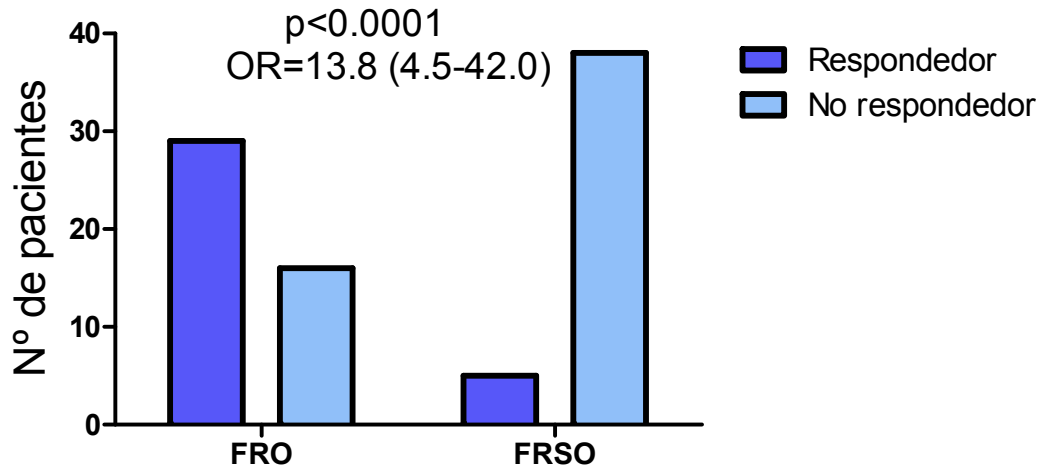


Figura 27: Estudio de la probabilidad de mostrar una respuesta óptima o subóptima a IFN-beta en pacientes clasificados de acuerdo a los porcentajes de linfocitos B CD5+ (<3%: fenotipo respondedor óptimo, FRO o >3%: fenotipo respondedor subóptimo, FRSO).

4.5.5- Diferencias entre interferones de alta y baja dosis.

Los pacientes incluidos en el estudio estaban tratados con las tres presentaciones de IFN beta que se comercializan en la actualidad: Betaferón, Rebif 44, Avonex.

De los 90 pacientes a los que se le realizó el estudio de biomarcadores inmunológicos, 10 estaban tratados con Betaferón, 27 con Rebif44 y 53 recibían Avonex. La dosis de fármaco administrada por tanto no fue la misma para todos los pacientes. Los pacientes tratados con Rebif44 y Betaferón recibían una dosis de fármaco superior a los que están tratados con Avonex.

Para ver si la dosis estaría afectando a la respuesta al tratamiento con IFN beta hicimos una nueva clasificación de los pacientes según estuvieran tratados con alta (Rebif 44 y Betaferón) o baja dosis (Avonex). Treinta y cuatro

pacientes estaban tratados con alta dosis mientras que 53 fueron tratados con dosis baja.

En el grupo de pacientes que presentaban un fenotipo de buen respondedor, un 35.5 de los pacientes mostraron una respuesta subóptima al tratamiento. De ellos un 28.9% habían sido tratados con alta dosis mientras que sólo el 6.6% habían recibido dosis altas de IFN beta. Esto podría indicar que en aquellos pacientes con fenotipo de respondedor óptimo una dosis baja de fármaco puede aumentar el riesgo de respuesta subóptima. Para confirmar esto analizamos por separado la capacidad de nuestro biomarcador de predecir la respuesta a IFN beta en pacientes que recibieron dosis alta y baja del fármaco (Figura 28). La correlación resulto más ajustada en pacientes que recibían dosis alta del fármaco (OR: 73.7, IC: 6.8-792.9, $p < 0.0001$) que en aquellos recibiendo dosis bajas (OR: 6.1, IC: 1.7-22.6, $p = 0.005$).

Aunque estos datos deben confirmarse en series mayores de pacientes, estos datos nos sugieren que en algunos de los pacientes con fenotipo de respondedor óptimo que muestran una respuesta subóptima a IFN beta, esta podría asociarse a la baja dosis del fármaco.

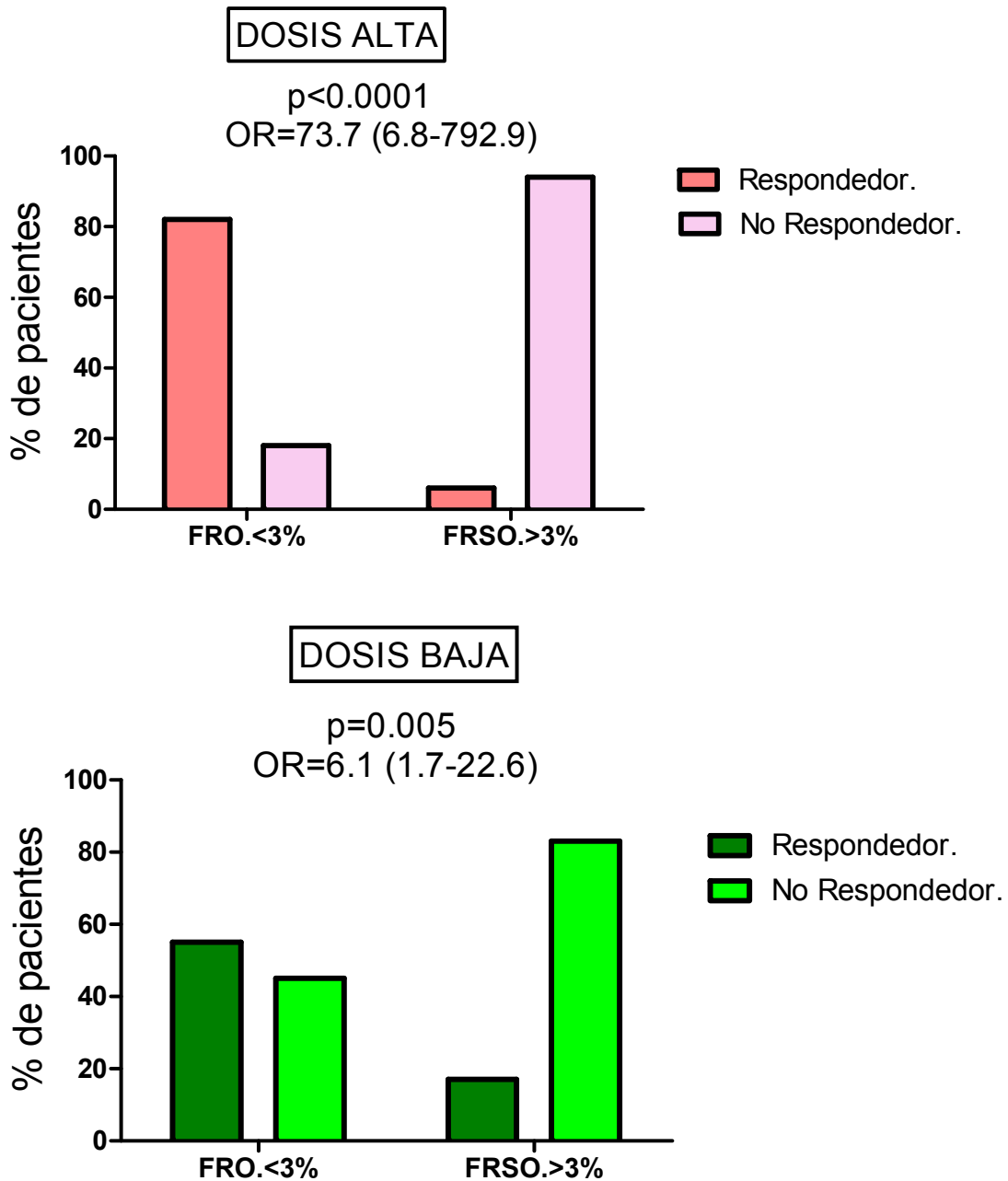


Figura 28: Estudio de la probabilidad de mostrar una respuesta óptima o subóptima a IFN-beta en pacientes clasificados de acuerdo a los porcentajes de linfocitos B CD5+ (<3%: fenotipo respondedor óptimo, FRO o >3%: fenotipo respondedor subóptimo, FRSO) y a la dosis de tratamiento recibida (Alta: Pacientes tratados con Betaferon o Rebif 44; Baja: Pacientes tratados con Avonex).

4.6- VALIDACIÓN DE LOS BIOMARCADORES IDENTIFICADOS

Para realizar la validación de los resultados obtenidos en una cohorte independiente de pacientes, estudiamos de forma retrospectiva los linfocitos B CD5+ y los linfocitos T CD8+perforina+ a partir de muestras congeladas de una serie de 50 pacientes con EMRR que habían sido tratados con IFN beta durante al menos 2 años en la Unidad de Esclerosis Múltiple del Hospital Universitario Vall d'Hebron de Barcelona. En primer lugar, analizamos la presencia de anticuerpos neutralizantes en muestras de suero obtenidas un año después del inicio del tratamiento. Tanto la presencia de NAbs como las subpoblaciones celulares se estudiaron antes de conocer los datos clínicos de los pacientes. Cuatro de los 50 pacientes (8%) mostraron NAbs en suero. Todos ellos mostraron una respuesta subóptima al fármaco.

Trece de los 46 pacientes restantes mostraron una respuesta óptima al fármaco. No encontramos diferencias significativas en el porcentaje de linfocitos B CD5+ entre ellos y los pacientes con respuesta subóptima. Es más, tanto los pacientes respondedores como los no respondedores mostraron porcentajes bajos de linfocitos B CD5+ semejantes a los que presentaban los respondedores subóptimos en nuestro estudio (Figura 29).

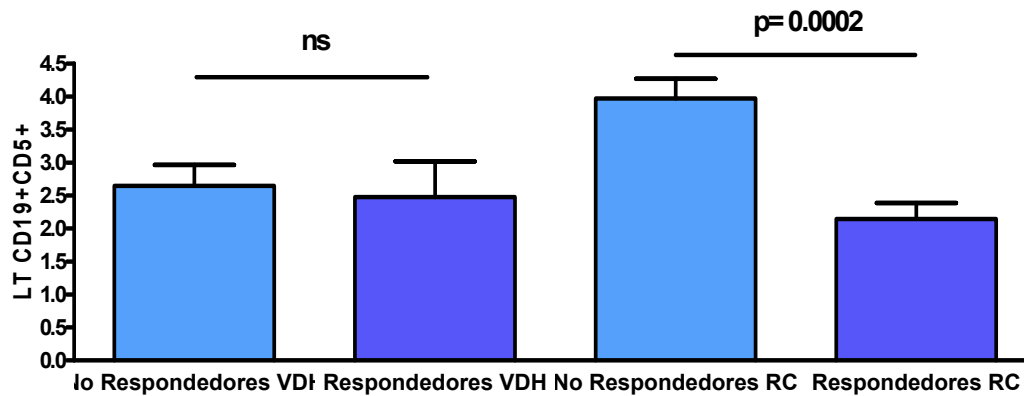


Figura 29: Comparación de porcentajes de linfocitos CD19+CD5+ entre el grupo de pacientes no respondedores y respondedores al tratamiento con IFN beta en la cohorte del Hospital Vall d'hebrón y la del hospital Ramón y Cajal.

En primer lugar quisimos descartar que esto no se debiera a un problema metodológico, ya que las muestras se habían procesado de distinta forma en ambas cohortes (En sangre completa en el hospital Ramón y Cajal y a partir de células mononucleares de sangre periférica separadas con Ficoll y congeladas en la cohorte del hospital Vall d'Hebron). Buscamos en la bibliografía y encontramos un estudio realizado en pacientes infectados con VIH que mostraba que el proceso de separación mediante gradiente de densidad, la criopreservación y posterior descongelación resulta en una pérdida de las células B CD19+ pero no de las células T CD4+ ni CD8+. ³⁴⁵

Para estudiar si la criopreservación podría estar induciendo también a la pérdida de linfocitos B en nuestra cohorte de validación, estudiamos los linfocitos B totales y la subpoblación CD5+ en una nueva serie de 5 pacientes del Hospital Ramón y Cajal de Madrid. En primer lugar se analizaron los porcentajes de estas células en muestras de sangre completa y en segundo

lugar en células mononucleares de sangre periférica procedentes de la misma extracción de sangre que se habían congelado y descongelado una semana después para su análisis. Los resultados se muestran en la tabla 21.

Tabla 21: Estudio de los los porcentajes de células CD19+ y células CD19+CD5+ en sangre total (ST) y células mononucleares de sangre periférica (CMSP) en cinco paciente con EM.

	% de Células CD19+		% de Células CD19+CD5+	
	ST	CMSP	ST	CMSP
<i>Paciente 1</i>	6.7	5.6	2.1	1.2
<i>Paciente 2</i>	10.2	8.9	2.5	1.9
<i>Paciente 3</i>	10.6	6	3.9	1.3
<i>Paciente 4</i>	15.9	11.1	4.5	1.8
<i>Paciente 5</i>	9	6.8	3.9	1.8

ST: Sangre total; CMSP: Células mononucleares de sangre periférica congeladas y descongeladas una semana después para su estudio.

Observamos que con la criopreservación disminuyen los porcentajes de los linfocitos B. Por tanto estos resultados no pudieron ser validados en una cohorte retrospectiva quedando pendiente su validación en una nueva cohorte prospectiva de pacientes.

En segundo lugar estudiamos en la misma cohorte los porcentajes de linfocitos T CD8+perforina+. Los resultados obtenidos en la cohorte de validación fueron similares a los obtenidos en la del hospital Ramón y Cajal. (Figura 30).

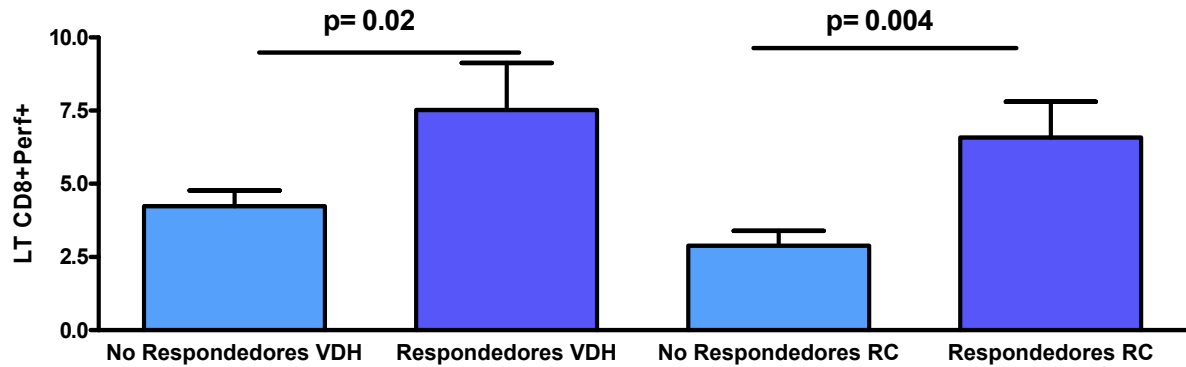


Figura 30: Estudio de los porcentajes de linfocitos CD8+Perf+ en pacientes no respondedores y respondedores al tratamiento con IFNB en la cohorte de validación del Vall d'hebrón (VDH) y la del Hospital Ramón y Cajal (RC).

Los resultados obtenidos muestran unos porcentajes similares en ambas cohortes lo que demuestra que niveles elevados de linfocitos CD8+Perforina+ en sangre se asocian con una respuesta óptima a interferón beta.

4.7- MONITORIZACIÓN DE BIOMARCADORES INMUNOLÓGICOS A LOS SEIS MESES DE TRATAMIENTO.

Los mecanismos de acción del IFN-beta no son del todo conocidos en la actualidad por ello estudiamos las poblaciones inmunológicas descritas en el apartado 4.4.2 a los seis meses de tratamiento para determinar sobre qué mecanismos inmunológicos está incidiendo el Interferón Beta.

4.7.1- Subpoblaciones celulares leucocitarias

4.7.1.1- Linfocitos T CD4+

Se encontraron diferencias significativas en el porcentaje de linfocitos T reguladores presentes en sangre a los 6 meses de tratamiento en el grupo

de pacientes respondedores al fármaco. El porcentaje de linfocitos CD4+CD25hiFoxP3+ aumenta en relación a la muestra de sangre basal. Estas diferencias no se hallaron en el grupo de pacientes no respondedores (Figura 31 y 32).

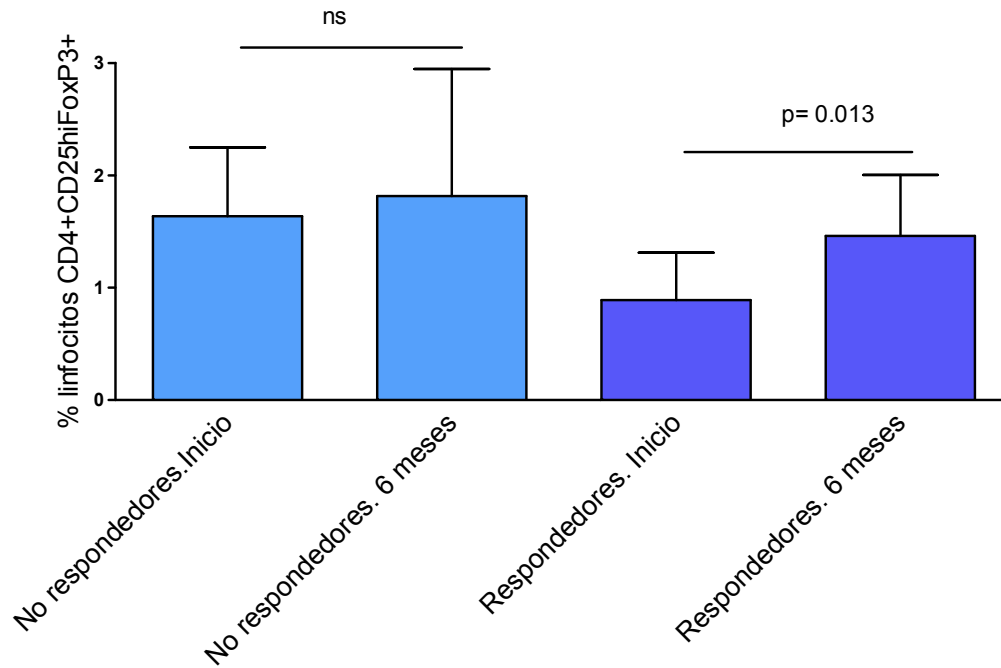
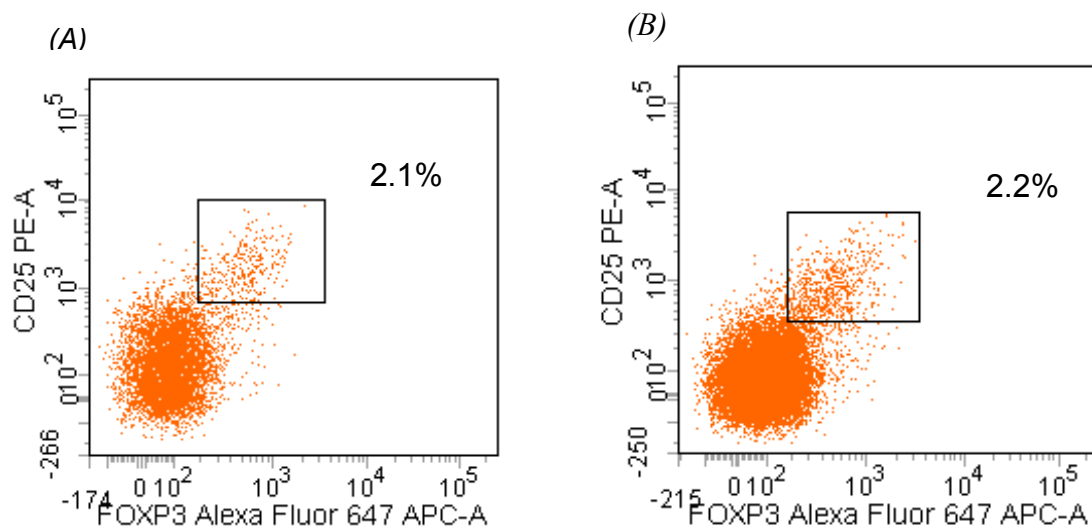


Figura 31: Comparación del porcentaje de linfocitos CD4+CD25hiFoxP3+ al inicio y a los 6 meses de tratamiento en ambos grupos de pacientes.



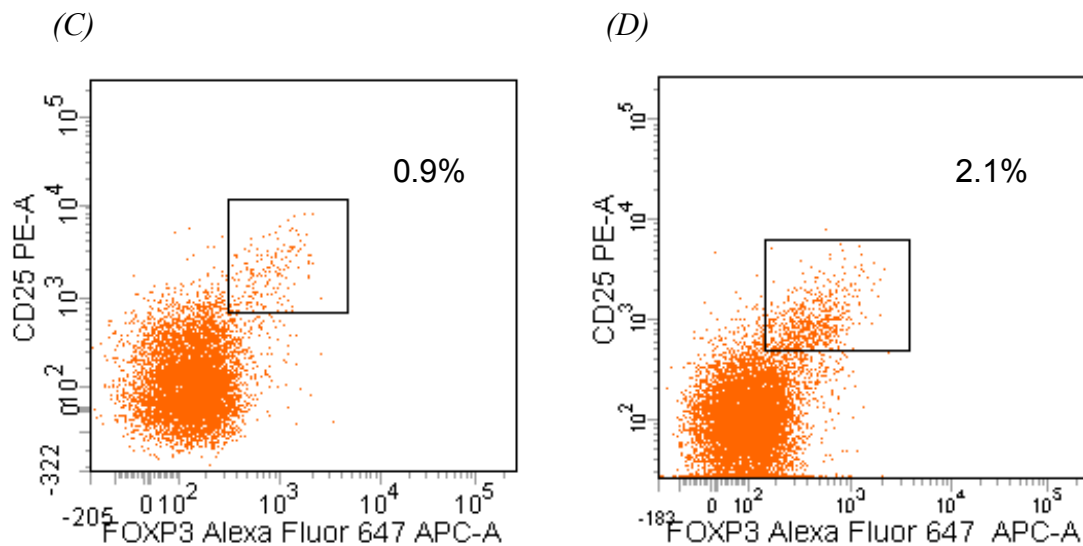


Figura 32: Ejemplos representativos de la población celular CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺ de un paciente con EM del grupo de No respondedores al inicio del tratamiento (A) y a los 6 meses de tratamiento (B) y de un paciente con EM del grupo de Respondedores al inicio del tratamiento (C) y a los 6 meses de tratamiento (D).

Los resultados del resto de subpoblaciones inmunológicas analizadas se muestran en la tabla 23. Se observa también un aumento en el porcentaje de linfocitos T CD4 totales ($p= 0.052$) y linfocitos T CD4⁺CD25^{hi} ($p= 0.0002$) en el grupo de pacientes con buena respuesta a los 6 meses de tratamiento. No se han encontrado cambios a lo largo del tratamiento en las demás subpoblaciones linfocitoides estudiadas.

Tabla 23: Comparación de porcentajes linfocitos T al inicio y 6 meses de tratamiento en los pacientes respondedores y no respondedores.

LT	NR. I	NR. 6m	p	R.I	R. 6m	p
LT CD4 ⁺	47.8±0.9	47.9±1.2	ns	47.2±0.91	51.6±1.06	ns
LT CD4 ⁺ CD25 ^{hi} FoxP3	1.6±0.2	1.8±0.3	ns	0.9±0.2	1.4±0.2	0.013
LT CD4 ⁺ DR ⁺	3.4±0.2	4.4±0.3	0.01	4.5±0.4	4.9±0.4	ns

LT CD4+TNF-α	11.9 \pm 2.1	17.9 \pm 1.7	ns	14.9 \pm 2.2	18.7 \pm 1.9	ns
LT CD4+INF-γ	7 \pm 2.4	4.4 \pm 0.7	ns	5.9 \pm 1.2	7.1 \pm 1.67	ns
LT CD4+IL-17	0.28 \pm 0.1	0.26 \pm 0.04	ns	0.34 \pm 0.09	0.23 \pm 0.04	ns
LT CD4+IL-10	0.9 \pm 0.9	0.1 \pm 0.02	ns	0.2 \pm 0.03	0.2 \pm 0.01	ns

LT: Linfocitos T; NR: No respondedores; I: Inicio; 6m: 6 meses; R: Respondedores; ns: no significativo.

4.7.1.2- Linfocitos T CD8+

Según los resultados obtenidos (Tabla 23) el tratamiento con IFN beta no estaría actuando a nivel de los linfocitos T CD8+ ya que a los 6 meses de tratamiento no se observan cambios significativos en ninguna de la subpoblaciones T CD8 estudiadas.

Tabla 23: Comparación de porcentajes al inicio y 6 meses de tratamiento en los dos grupos de pacientes estudiados para las diferentes subpoblaciones linfocitarias.

LT	NR. I	NR. 6m	p	R.I	R. 6m	p
LT CD8+	24.8 \pm 0.8	23.4 \pm 0.9	ns	26.6 \pm 0.9	25.2 \pm 1.3	ns
LT CD8+Perf+	2.89 \pm 0.5	2.8 \pm 0.6	ns	6.57 \pm 1.23	6.9 \pm 1.6	ns
LT CD8+TNF-α	6.1 \pm 1.8	6.9 \pm 1.5	ns	7.03 \pm 1.4	7.5 \pm 1.4	ns
LT CD8+INF-γ	5.8 \pm 1.5	5.5 \pm 1.2	ns	5.7 \pm 1.1	7 \pm 1.9	ns
LT CD8+IL-17	0.004 \pm 0.002	0.03 \pm 0.02	ns	0.06 \pm 0.02	0.03 \pm 0.01	ns
LT CD8+IL-10	0.02 \pm 0.01	0 \pm 0	ns	0.01 \pm 0.009	0.01 \pm 0.01	ns

LT: Linfocitos T; NR: No respondedores; I: Inicio; 6m: 6 meses; R: Respondedores; ns: no significativo

4.7.1.3- Linfocitos B

En el estudio de las subpoblaciones de linfocitos B se han detectado cambios significativos en la subpoblación de células B reguladores medidas por la expresión de IL-10. En el grupo de pacientes respondedores se vio un aumento de esta subpoblación a los 6 meses de tratamiento que no se observó en los pacientes del grupo de no respondedores. ($p = 0.002$) (Figura 33).

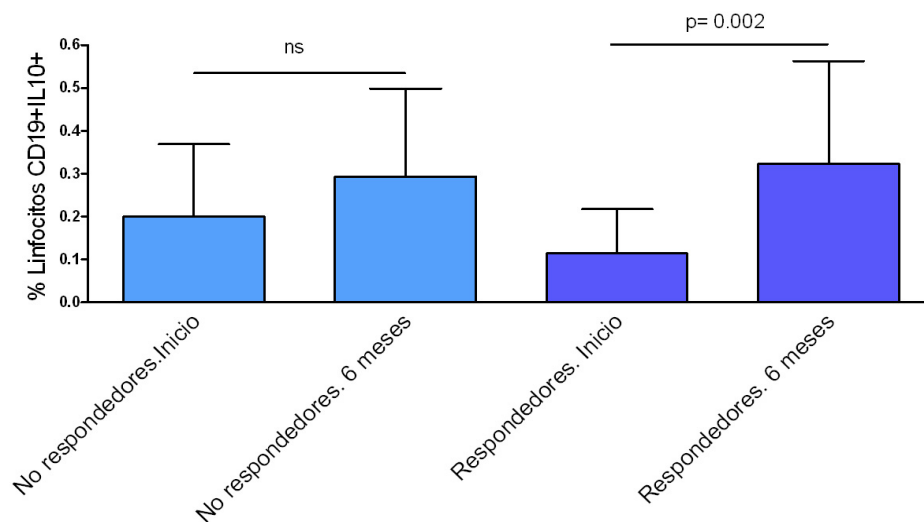


Figura 33: Comparación del porcentaje de linfocitos CD19+IL-10+ al inicio y a los 6 meses de tratamiento en ambos grupos de pacientes.

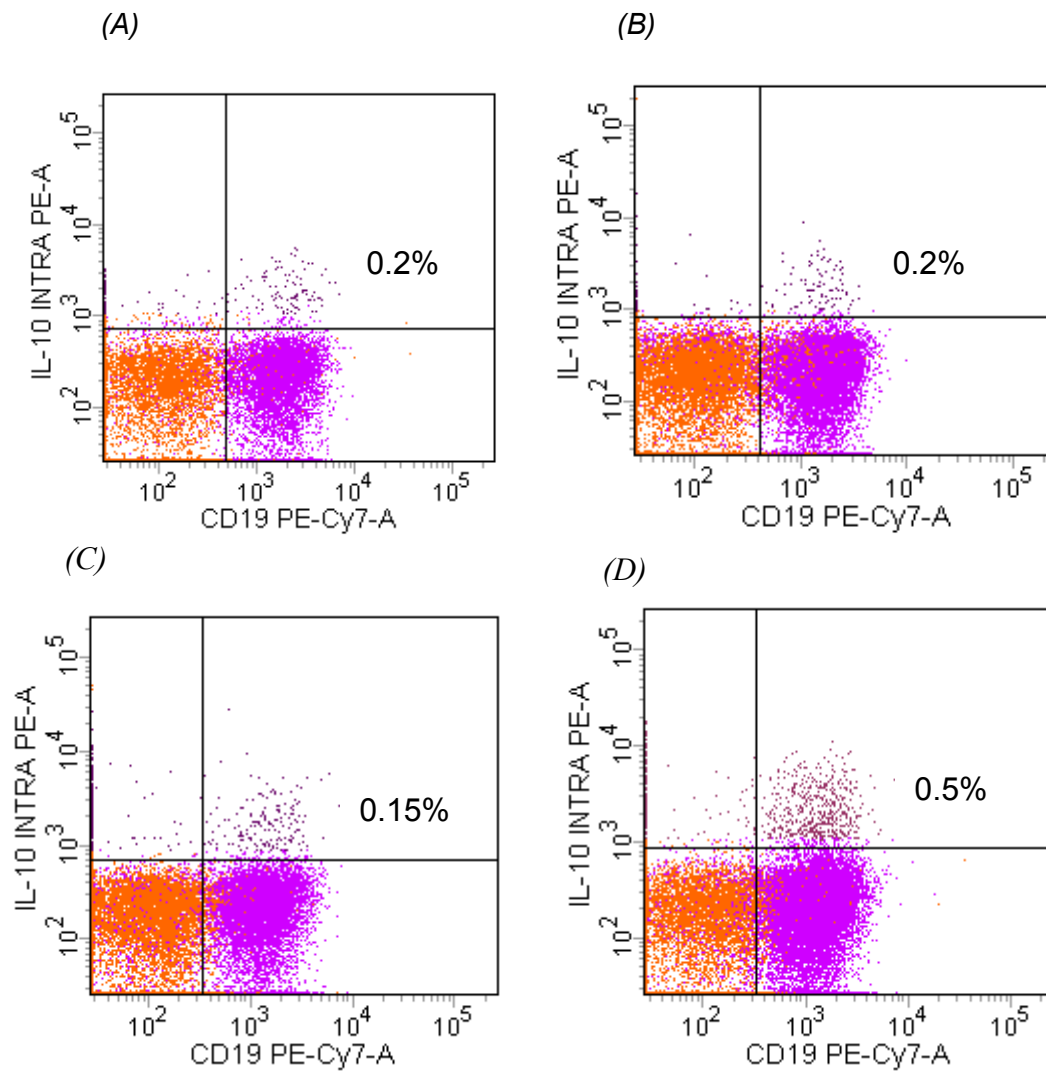


Figura 34: Ejemplos representativos de la población celular CD19+IL10+ de un paciente con EM del grupo de No respondedores al inicio del tratamiento (A) y a los 6 meses de tratamiento (B) y de un paciente con EM del grupo de Respondedores al inicio del tratamiento (C) y a los 6 meses de tratamiento (D).

Los resultados obtenidos en el resto de subpoblaciones de linfocitos B se muestran en la tabla 24.

Tabla 24: Porcentajes de linfocitos B al inicio y tras 6 meses de tratamiento en pacientes respondedores y no respondedores.

<i>LT</i>	<i>NR. I</i>	<i>NR. 6m</i>	<i>p</i>	<i>R.I</i>	<i>R. 6m</i>	<i>p</i>
LT CD19+	11.3±0.6	12.2±0.7	ns	7.8±0.4	10.3±0.7	0.009
LT CD19+CD5+	3.9±0.3	4.6±0.4	ns	2.1±0.2	2.9±0.3	0.007
LT CD19+CD5-	7.3±0.4	7.3±0.5	ns	5.6±0.31	7.1±0.6	ns
LT CD19+CD38+	1.4±0.3	2.6±0.4	0.0005	0.9±0.2	1.7±0.2	<0.0001
LT CD19+CD80+	3.8±0.6	2.7±0.8	ns	3.1±0.4	2.6±0.4	ns
LT CD19+CD86+	2.1±0.4	2.4±0.7	ns	1.7±0.3	2.4±0.4	ns
LT CD19+TNF-α	2.8±0.8	3.6±0.6	ns	2.9±0.6	2.4±0.3	ns
LT CD19+INF-γ	0.1±0.04	0.8±0.4	ns	0.4±0.2	0.2±0.1	ns
LT CD19+IL-17	0.1±0.04	0.1±0.04	ns	0.07±0.01	0.05±0.02	ns
LT CD19+IL-10	0.2±0.04	0.2±0.05	ns	0.1±0.02	0.3±0.06	0.002

LT: Linfocitos T; NR: No respondedores; I: Inicio; 6m: 6 meses; R: Respondedores; ns: no significativo

4.7.1.4- Células NK

Se han estudiado tanto los porcentajes de diferentes subpoblaciones de células NK y NKT efectoras como su funcionalidad medida por la expresión de perforina a los 6 meses de tratamiento con IFN beta. Además se han medido los porcentajes de células NK con función reguladora caracterizadas por la expresión del antígeno de superficie CD56 con alta intensidad.

Los resultados obtenidos se muestran en la tabla 26. Se observa una moderada disminución de células CD56 dim que se debe principalmente a las células NK productoras de perforinas en los pacientes respondedores. También se observa un aumento muy discreto de células NKT en el mismo grupo y

sobre todo, un aumento en las células NK reguladoras ($p= 0.0008$) en el grupo de pacientes con una respuesta óptima que no se observa en los no respondedores (Figura 35).

Tabla 25: Comparación de porcentajes al inicio y 6 meses de tratamiento en los dos grupos de pacientes estudiados para las diferentes subpoblaciones linfocitarias.

LT	NR. I	NR. 6m	p	R.I	R. 6m	p
Cels CD56 dim	13.5±1.6	9.1±1.4	ns	12.8±1.9	10.3±1.3	0.01
Cels NK	6.2±0.9	3.8±0.4	0.04	9.2±1.5	6.1±1.07	ns
Cels NK Perf+	5.09±0.9	2.8±0.5	0.04	8.8±1.5	4.9±0.9	0.03
Cels NKT	5.4±0.9	3.8±0.4	ns	3.5±0.6	6.1±1.07	0.04
Cels NKT Perf+	3.7±0.9	2.3±0.5	ns	2.9±0.6	2.2±0.6	ns
Cels 56 bright	0.7±0.009	1±0.2	ns	0.7±0.09	1.37±0.14	0.0008

Cels: Células T; NR: No respondedores; I: Inicio; 6m: 6 meses; R: Respondedores; ns: no significativo

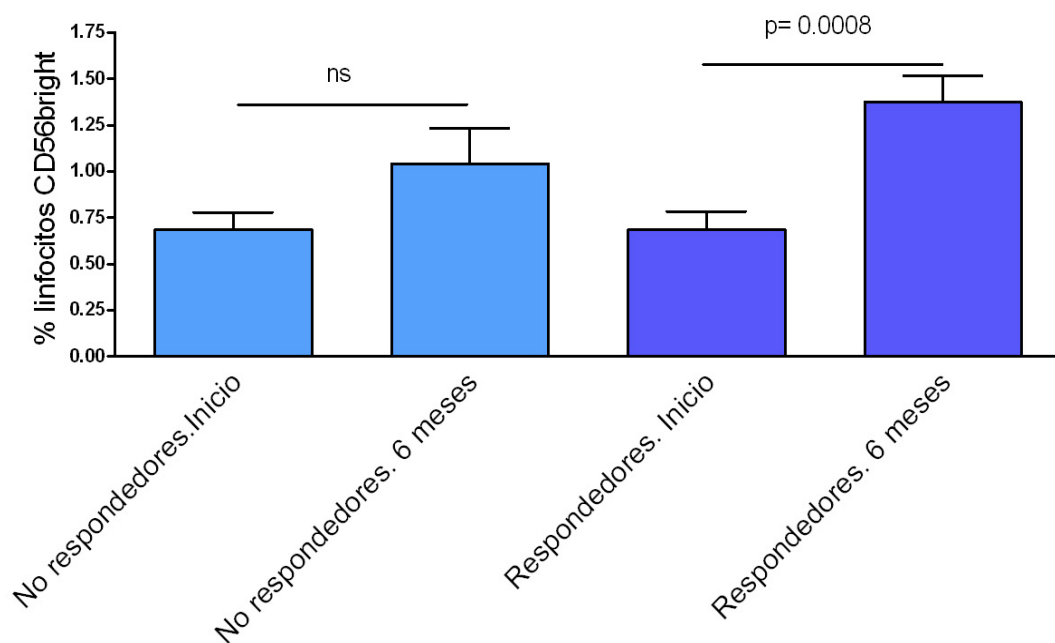


Figura 35: Comparación del porcentaje de células CD56^{bright} al inicio y a los 6 meses de tratamiento en ambos grupos de pacientes.

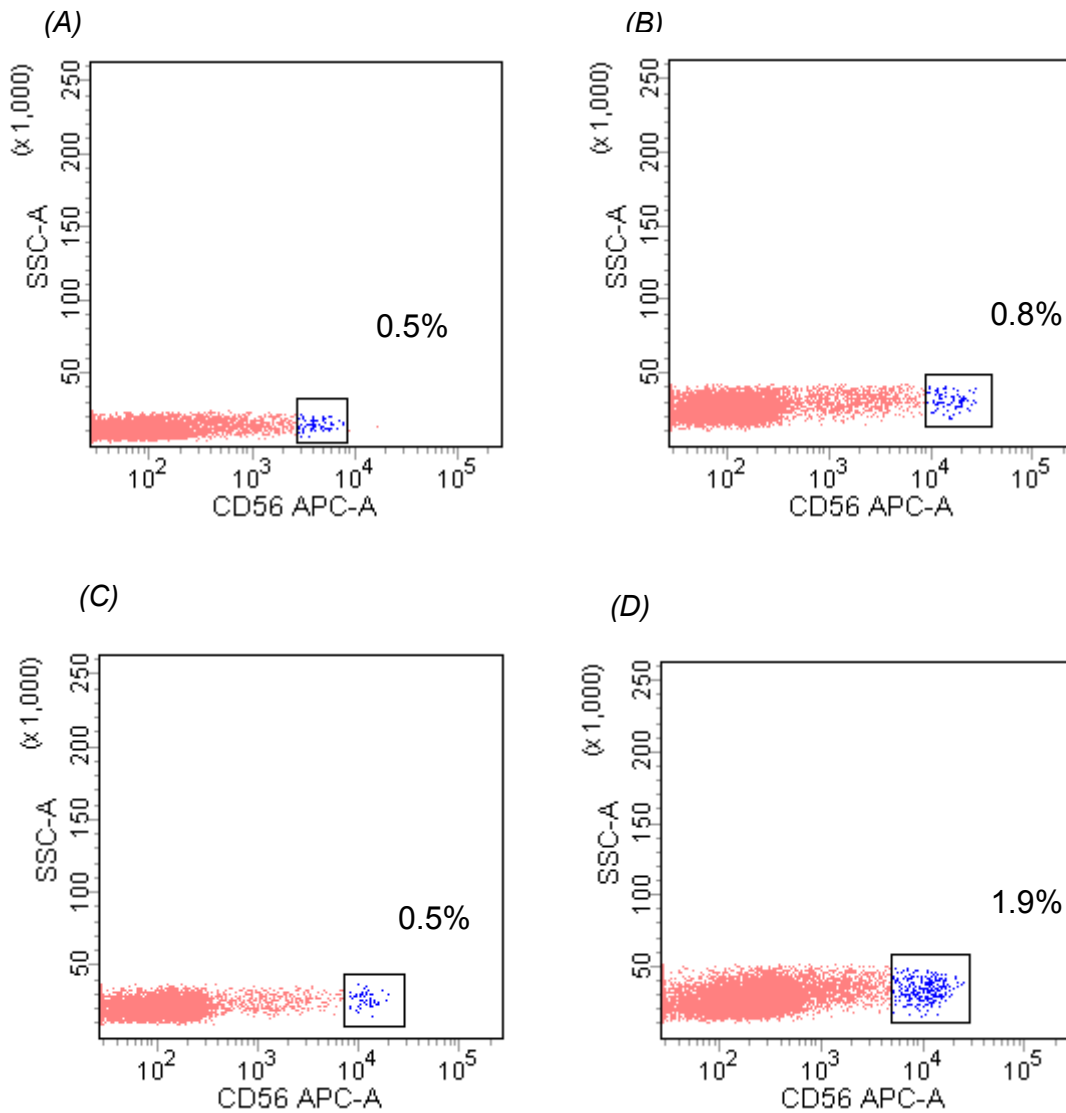


Figura 36: Ejemplo representativo de la población celular CD56^{bright} en un paciente con EM del grupo de No respondedores al inicio (A) y a los 6 meses de tratamiento (B) y de un paciente con EM del grupo de Respondedores al inicio (C) a los 6 meses de tratamiento (D).

4.7.2- Comparación con controles sanos

Los biomarcadores que habían presentado las diferencias más claras entre los pacientes respondedores y no respondedores se compararon con controles sanos.

Estudiamos las tres subpoblaciones de células reguladoras: los linfocitos CD4+ 25highFoxP3+, los linfocitos CD19+IL-10+ y las células NK CD56 bright.

En relación a los linfocitos T reguladores no se observaron diferencias significativas entre controles sanos y pacientes con esclerosis múltiple. (Figura 39).

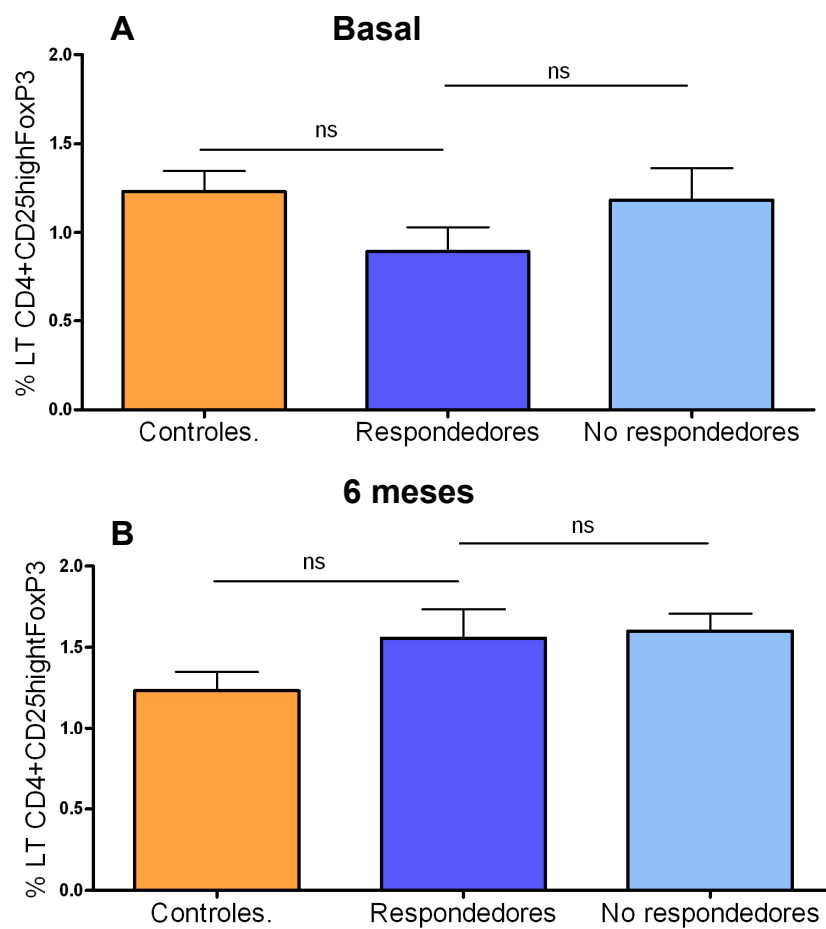


Figura 39: Porcentaje de linfocitos T CD4+CD25highFoxP3 en los controles, respondedores y No respondedores al inicio (A) y a los 6 meses de tratamiento (B).

En cuanto a los linfocitos CD19+IL10+, no se observaron diferencias significativas al comparar las muestras basales de los dos grupos de pacientes con los controles. Sin embargo, tras seis meses de tratamiento los dos grupos de pacientes (respondedores y no respondedores) mostraron niveles más elevados que los controles sanos, si bien las diferencias fueron mayores en los pacientes respondedores ($p=0.0003$) que en los no respondedores ($p= 0.01$). (Figura 38).

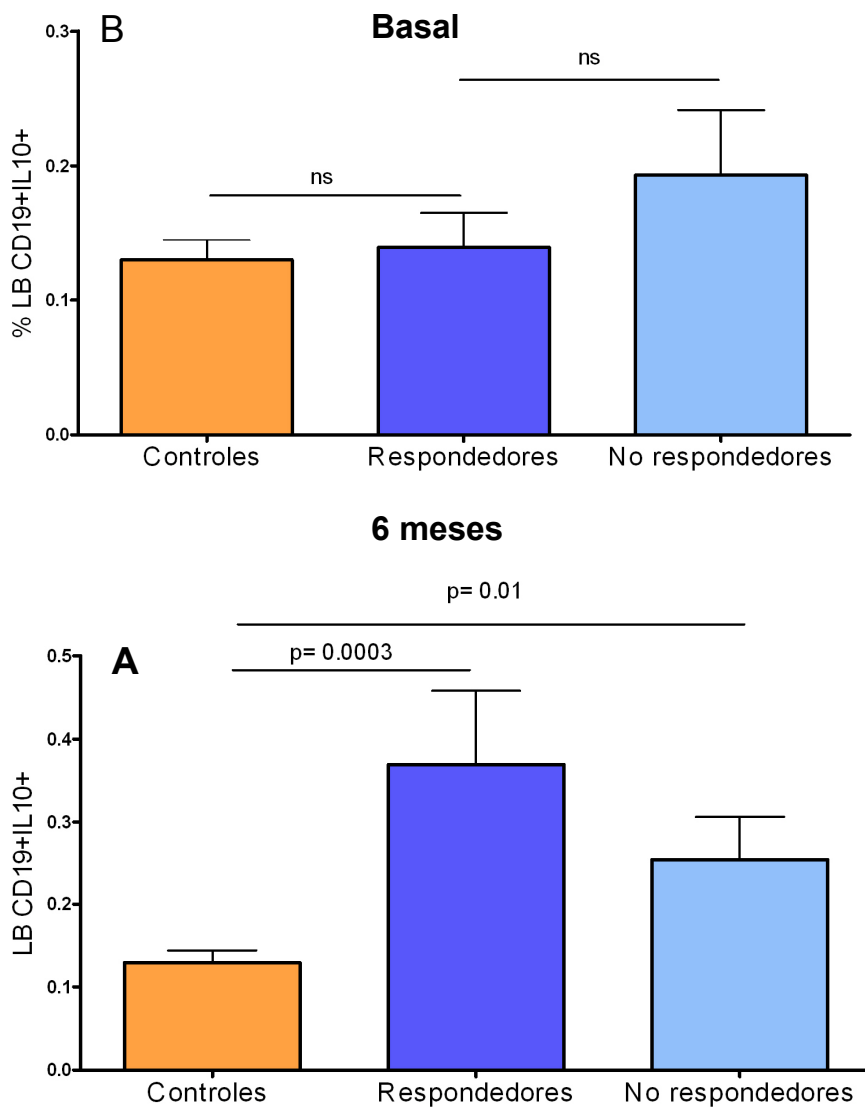


Figura 38: Porcentaje de linfocitos B CD19+IL-10+ en los controles, respondedores y No respondedores al inicio (A) y a los 6 meses de tratamiento (B).

Cuando estudiamos las células CD56 bright tampoco se vieron diferencias al comparar las células basales con los controles (Figura 39A). Sin embargo se observó un porcentaje elevado de estas células en los pacientes respondedores en relación a los controles a los 6 meses de tratamiento ($p=0.0002$, Figura 39B).

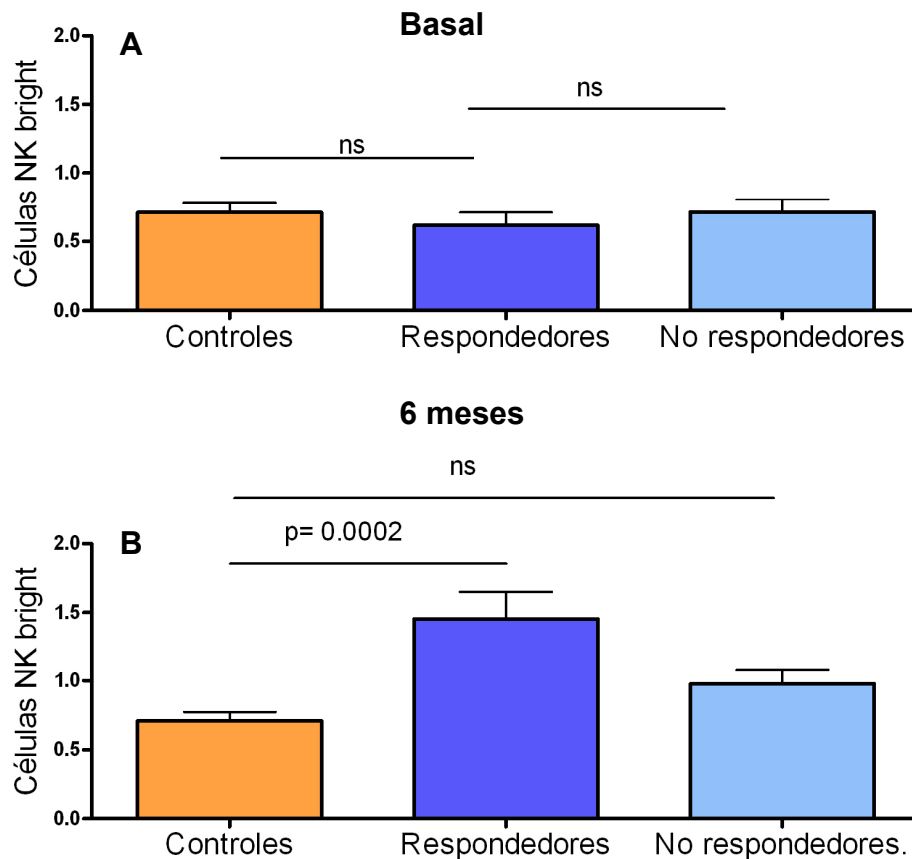


Figura 39: Porcentaje de linfocitos B CD19+IL-10+ en los controles, respondedores y No respondedores al inicio del tratamiento (A) y a los 6 meses de tratamiento (B).

4.7.3- Estudio del efecto inmunosupresor de las células reguladoras.

Quisimos ver sobre que subpoblaciones celulares estaban ejerciendo su acción inmunosupresora las celulares reguladoras aumentadas durante el tratamiento con IFN-beta aumenta, para ello estudiamos en las muestras obtenidas a los seis meses de tratamiento, la correlación entre las células T

CD4+CD25^{high}, células B CD19+IL-10⁺ y las células CD56^{bright} con las distintas subpoblaciones celulares inmunológicas detalladas en la tabla 27

Tabla 27: Estudio de la correlación de células reguladoras con subpoblaciones leucocitarias.

	Subpoblaciones celulares
Linfocitos B	Células B CD19 ⁺
	Células B CD19 ⁺ CD5 ⁺
	Células B CD19 ⁺ CD5 ⁻
	Células CD19 ⁺ CD38 ⁺
	Células CD19 ⁺ CD80 ⁺
	Células CD19 ⁺ CD86 ⁺
Linfocitos T CD4⁺	Linfocitos T CD4 ⁺
	Linfocitos T CD4 ⁺ CD25 ^{hi} FoxP3
	Linfocitos T CD4 ⁺ CD25 ⁱ
	Linfocitos T CD4 ⁺ DR ⁺
	Linfocitos T CD4 ⁺ TNF- α
	Linfocitos T CD4 ⁺ INF- γ
	Linfocitos T CD4 ⁺ IL-17
	Linfocitos T CD4 ⁺ IL-10
Linfocitos T CD8⁺	Linfocitos T CD8 ⁺
	Linfocitos T CD8 ⁺ Perf ⁺
	Linfocitos T CD8 ⁺ TNF- α
	Linfocitos T CD8 ⁺ INF- γ
	Linfocitos T CD8 ⁺ IL-17

Células NK	Linfocitos T CD8+IL-10
	Células CD56dim
	Células NK (CD56+CD16+)
	Células NKT (CD56+CD16-)
	CD56bright

No se encontraron correlaciones significativas entre la subpoblación de células B productoras de IL-10 y las diferentes subpoblaciones celulares estudiadas.

Sin embargo, se encontró una correlación inversa entre los linfocitos T CD4+CD25highFoxp3 y los linfocitos T CD8+ totales, los linfocitos T CD8+ productores de IFN-gamma, los linfocitos T CD8+ productores de TNF-alfa y las células NK (figura 42)

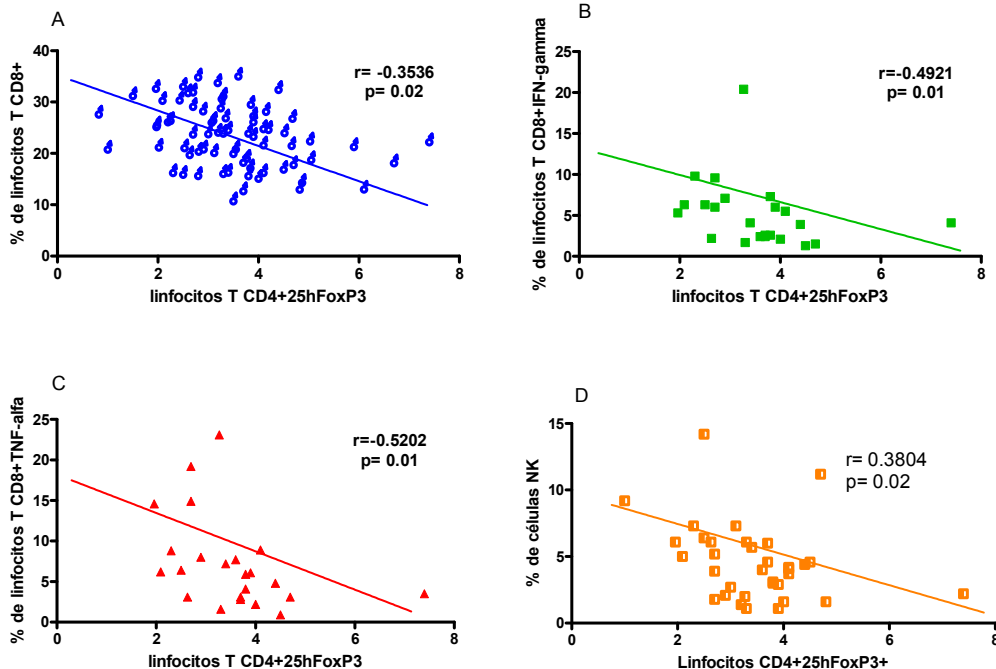


Figura 42: Correlación entre porcentaje de linfocitos T reguladores y linfocitos T CD8+ totales (A), linfocitos T CD8+IFN-gamma+ (B), linfocitos T CD8+TNF-alfa+ (C) y células NK (D) .

Al estudiar las células CD56bright se obtuvo una correlación negativa con los linfocitos B totales y linfocitos B CD19+CD5+. (Figura 43)

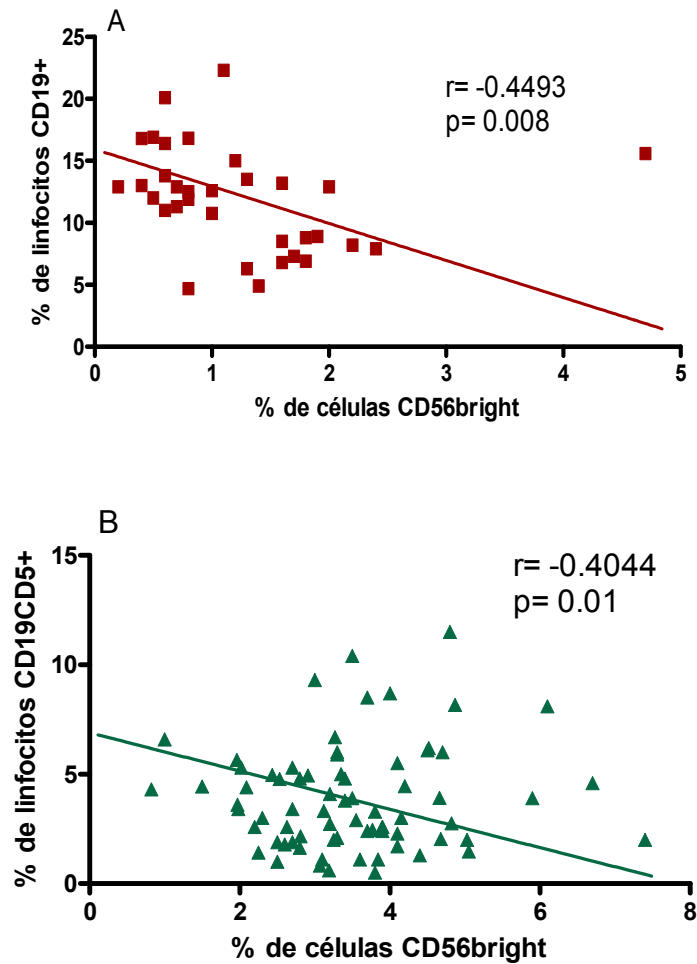


Figura 43: Correlación entre porcentaje de células CD56bright y linfocitos CD19+ (A) y CD19+CD5+ (B).

5. DISCUSIÓN

El interferón beta es el primer fármaco inmunomodulador que se ha utilizado como tratamiento de base en la EM. Es un fármaco seguro y bien tolerado, capaz de disminuir la actividad de la enfermedad y retrasar la progresión de la misma.^{302,304,308,346} Su mecanismo de acción no ha sido establecido de manera concluyente. Sin embargo, muchos estudios sugieren que tiene múltiples actividades biológicas que le permiten crear un entorno antiinflamatorio tanto a nivel sistémico como en el SNC. Algunos estudios han observado que induce una reducción de las células activadas T_H1 las cuales juegan un papel importante en la patología.^{336,347} Se ha visto también que puede aumentar la secreción de citoquinas con efecto antiinflamatorio^{313,314,348}, disminuir la permeabilidad de la barrera hematoencefálica^{316,348-350} e inducir la expresión de células reguladoras^{207,208}. Sin embargo, la respuesta a este fármaco es heterogénea. Alrededor de un tercio de los pacientes presenta una respuesta óptima al tratamiento. La respuesta heterogénea a los tratamientos se ha observado también con otros fármacos en la EM y podría estar relacionada con los distintos mecanismos fisiopatológicos que presentan los pacientes.³⁵¹

La búsqueda de biomarcadores que permitan la identificación precoz de los pacientes que van a mostrar una respuesta óptima a cada tratamiento es esencial para contribuir a establecer una terapia personalizada en la EM. Esto es especialmente importante en el momento actual en el que existe un abanico cada vez más amplio de opciones terapéuticas.²⁸⁹⁻²⁹³ Esto podría ayudar a elegir de forma precoz la terapia adecuada, evitando la progresión de la enfermedad³³², ya que existen evidencias de que hay daño axonal desde estadios tempranos de la enfermedad.³⁵²

Se han descrito distintos biomarcadores clínicos o biológicos que podrían ayudar a identificar a los respondedores óptimos al INF-beta. Como marcadores clínicos se han propuesto la aparición de nuevas lesiones en resonancia magnética nuclear (RMN) durante el primer año de tratamiento, el aumento en al menos un punto en la escala EDSS, la aparición de brotes clínicos durante el tratamiento o la combinación de algunos de ellos.³³²⁻³³⁴ Todos ellos son buenos biomarcadores de respuesta al tratamiento. Sin embargo, para poder evaluar estos biomarcadores hay que esperar a que el paciente haya sufrido un deterioro, en el caso de pacientes no respondedores, el cual en muchos casos es irrecuperable. El tiempo que debe transcurrir para la evaluación de dichos biomarcadores es de entre uno y dos años incluso cuando se utilizan variables radiológicas.³³³

Se han descrito también biomarcadores biológicos de respuesta a INF-beta como los niveles de IL17F en suero. Estudios previos asociaron una pobre respuesta a INF-beta con una respuesta Th17 en ratones con EAE e identificaron un subgrupo de pacientes no-respondedores al tratamiento con INF-beta que se caracterizan por presentar al inicio del tratamiento niveles altos de IL-17F en suero.³³⁶ Sin embargo, estos resultados no pudieron ser corroborados en estudios posteriores.³³⁷⁻³³⁹ La expresión temprana de TRAIL es otro de los biomarcadores de respuesta a IFN beta identificados previamente, pero este biomarcador es costoso y difícil de determinar y probablemente debido a ello, estos resultados tampoco han sido validados³⁴³. Las BOC de IgM lípido específicas³⁴⁴ se dan en alrededor del 33% de los pacientes e identifican muy bien a los respondedores subóptimos, pero no identifican cuales van a ser los respondedores óptimos al tratamiento en el 66%

restante de los pacientes. Además este biomarcador se realiza en LCR lo cual es una desventaja en comparación con los marcadores hemáticos.

El único biomarcador de respuesta a tratamiento con INF-beta que se utiliza en la práctica clínica son los NAb. Estos anticuerpos están asociados con una pérdida de la bioactividad del fármaco.³⁵³. Aparecen entre los 6 y 12 meses de haber comenzado el tratamiento y pueden persistir durante largo tiempo.

El hecho de que no existan más biomarcadores que se utilicen con éxito en la práctica clínica podría deberse a una valoración heterogénea de la respuesta al tratamiento en los distintos trabajos y a que en muchos de ellos no se ha tenido en cuenta la aparición de NABs. Nosotros medimos estos anticuerpos en todos los pacientes incluidos en el estudio a los 6 y 12 meses de tratamiento con el fin de incluirlos como posible variable de confusión, e impedir que constituyeran un sesgo en el estudio de otros biomarcadores.

5.1- PLANTEAMIENTO DEL ESTUDIO

5.1.1- Valoración de la respuesta al tratamiento

Cuando se comienza un estudio de biomarcadores de respuesta a tratamiento, en primer lugar debemos definir los mejores criterios de respuesta al tratamiento.

El concepto de respuesta a IFN-beta no está bien establecido en la literatura y difiere dependiendo de las variables de respuesta seleccionadas. Si se considera una definición de respondedor muy estricta, un gran número de pacientes van a ser considerados como no respondedores. Sin embargo, si se elige una definición muy conservadora solo un pequeño número de pacientes

van a ser considerados como no respondedores. Atendiendo a los distintos criterios usados, se observa en la literatura una fluctuación en el número de pacientes considerados como respondedores (13%-50%)^{343,354-362}.

La RM y la actividad clínica han demostrado ser útiles por separado en la detección de la actividad de la enfermedad en pacientes con EMRR tratados con INF-beta.^{343,354-363}

Un estudio que investiga el papel de la combinación de ambas medidas clínicas y de RMN aplicadas a la evolución temprana de la respuesta a INF-beta ha demostrado que la combinación de medidas de la actividad de la enfermedad (al menos un brote o la confirmación del aumento de uno punto en la escala EDSS) y la presencia de nuevas lesiones en T2 podrían ser la forma más eficaz en la evolución de la respuesta al tratamiento.³³³ Las RMN deben realizarse antes del inicio del estudio y durante el seguimiento. Nosotros elegimos un criterio estricto considerando que la combinación de medidas de la actividad de la enfermedad y la presencia de nuevas lesiones era la forma más objetiva de evaluar la respuesta al tratamiento con INF-beta y nos permitiría seleccionar a los respondedores óptimos. Utilizando dicha evaluación observamos que el 37.8% de los pacientes se encontraba libre de actividad de la enfermedad mientras que el 62.2% de los pacientes presentaba una respuesta subóptima al tratamiento.

5.1.2- Anticuerpos neutralizantes anti-IFN-beta (NAbs)

Se ha descrito que en pacientes tratados con IFN-beta la prevalencia de los NAbs se sitúa entre el 5%-42%³¹⁸, dependiendo de múltiples factores, tales como la glicosilación del fármaco, la estructura primaria de la proteína, la vía de

administración y la dosis.^{319,364 365} En relación a la estructura de la molécula, la glicosilación del IFN-beta puede aumentar solubilidad de la proteína y disminuir su inmunogenicidad³²⁰. El INF-beta 1a (Rebif[®] y Avonex[®]) es un fármaco recombinante glicosilado, producido en mamíferos mientras que el INF-beta 1b (Betaferon[®]) es un fármaco recombinante no glicosilado derivado de *E. coli* y muestra una inmunogenicidad más elevada. En cuanto a la vía de administración Betaferón[®] y Rebif[®] comparten la vía subcutánea de administración del fármaco mientras que Avonex[®] se administra por vía intramuscular, ambas vías se consideran más inmunogénicas que la vía intravenosa siendo la vía intramuscular la menos inmunogénica³⁶⁵. La dosis de fármaco es más baja en el tratamiento con Avonex[®] que con los otros dos fármacos y lo que también se ha asociado a menor incidencia de NAbs. La presencia de NAbs produce una disminución de la eficacia del fármaco y se ha correlacionado con la aparición de brotes.³²⁴ La falta de estudio de los NAbs ha hecho que sea difícil la identificación de buenos biomarcadores de respuesta a INF-beta, ya que un porcentaje no desdeñable de pacientes de EM tratados con INF-beta desarrollan anticuerpos frente al fármaco lo cual puede dar como consecuencia una menor biodisponibilidad del mismo que podría ser responsable de la falta de eficacia de dicha terapia. Por todo ello, antes de comenzar con la búsqueda de biomarcadores quisimos identificar aquellos pacientes que presentaban NAbs. Encontramos que el 9% de los pacientes estudiados presentaban anticuerpos anti-INF-beta. De este 9% se observó que el 77.8% de los pacientes recibían como tratamiento Betaferón[®], el 22.2% recibía Rebif[®] 44 y ninguno recibía Avonex[®], lo que coincide con los resultados obtenidos en otros ensayos con INF-beta, que demuestran que el

INF-beta 1b es el más inmunogénico.³²⁹; al igual que la menor dosis administrada con Avonex[®] y la administración intramuscular del mismo³⁶⁵ correlaciona con el hecho de que no hayamos encontrado producción de NAbS en los pacientes tratados con Avonex[®]. La presencia de NAbS se correlaciona con la aparición de brotes y una tasa de brotes significativamente más alta.^{302,327-329} Estos estudios coinciden con los datos obtenidos en nuestro trabajo, donde se observó que ocho de los nueve pacientes con NAbS tuvieron entre uno y dos brotes durante el tratamiento. Además, todos los pacientes con NAbS presentaron nuevas lesiones T2 en RMN durante el tratamiento como se muestra en estudios previos.^{304,327} Nuestro trabajo confirma que la presencia de anticuerpos neutralizantes anti-INF-beta es buen biomarcador que se asocia con una respuesta subóptima al tratamiento y que es necesaria su determinación a la hora de buscar otros posibles biomarcadores.

5.1.3- Estrategia del estudio

Nuestro estudio constó de dos partes. La primera fue el análisis de muestras de pacientes obtenidas al inicio del tratamiento para buscar posibles biomarcadores predictores de respuesta al IFN-beta que permitieran la identificación de los mejores candidatos para recibir tratamiento con este fármaco antes del inicio de la terapia. Además estudiamos los cambios que estas poblaciones sufrían a lo largo del tratamiento, realizando un análisis de muestras obtenidas a los seis meses tras el inicio del mismo. Elegimos este tiempo porque es un periodo de tiempo corto en la que la mayoría de los pacientes no manifiestan todavía signos clínicos o radiológicos que permitan decidir un cambio de tratamiento. Por tanto, de no encontrar biomarcadores

antes del inicio del tratamiento, esta segunda opción también tendría relevancia clínica. Este segundo estudio nos permitió obtener información sobre los mecanismos fisiopatológicos de la EM y el efecto del IFN-beta sobre los mismos. Además estudiamos si los biomarcadores encontrados al inicio de la terapia sufrían o no variaciones durante el tratamiento.

Para evitar sesgos debidos a la presencia de NAb, se eliminaron los 9 pacientes que presentaban estos anticuerpos de esta parte del estudio.

5.2- BIOMARCADORES SOLUBLES

5.2.1- Citoquinas solubles

Basándonos en la disparidad de los trabajos sobre IL-17F³³⁶⁻³³⁸ nos propusimos comprobar si esta o alguna otra citoquina soluble en suero podría ser un buen biomarcador de respuesta a tratamiento con IFN-beta para ello estudiamos en el suero de los pacientes los niveles de esta interleucina y exploramos otras citoquinas que juegan un papel en las respuestas Th1, Th2, Th17, Th22 y en la respuesta innata ya que todas ellas se han involucrado en la EM.^{187,193,314} Cuantificamos las siguientes citoquinas: IL-12, IL-1 β , IFN- γ , TNF- α , IL-6, IL-17F, IL-22, IL-13, IL-4, IL-2, IL-10 e IL-5. No se encontraron diferencias significativas en ninguna de las citoquinas entre respondedores y no-respondedores al tratamiento con INF-beta, incluyendo la IL-17F; ni ningún cambio de los niveles de citoquinas a lo largo del tratamiento. Estos resultados pueden deberse a que las citoquinas son sustancias que se secretan de forma paracrina y es difícil encontrar variaciones importantes de las mismas en suero. Pensamos que, como ocurre en otras patologías autoinmunes, los niveles de citoquinas en suero no son un buen biomarcador de respuesta en la EM. Estos

datos concuerdan con otro estudio llevado a cabo en una cohorte de 118 pacientes con EMRR el cual no encuentra diferencias estadísticamente significativas en el nivel sérico de IL-17F entre pacientes con una buena respuesta de los que tuvieron una pobre respuesta a INF-beta en el suero pretratamiento.³³⁷

Por otra parte, estudios publicados anteriormente muestran que los niveles de INF- γ , L-17F, IL-10 y IL-4 secretados por PBMC activados son similares entre pacientes de EM respondedores y no-respondedores a IFN-beta³³⁸ y sugieren que los niveles de citoquinas no identifican a los respondedores al IFN-beta en la EM.

5.2-2-Vitaminas

Entre los diversos factores ambientales asociados con la esclerosis múltiple se encuentran las vitaminas, particularmente la vitamina D.

La relación de la vitamina D con la fisiopatología de la EM ha sido sobradamente demostrada.^{91,98} Se han asociado niveles altos en suero de 25 hidroxivitamina D con un bajo riesgo de padecer EM.^{99,366} Otros estudios han visto que los niveles de esta vitamina son más bajos en pacientes en brote comparados con los pacientes en remisión.^{98,102} Se ha correlacionado también la concentración en suero de 25(OH) vitamina D con la severidad de la patología y con una peor progresión de la misma.^{103,105}, mostrando algunos estudios una correlación inversa entre actividad en resonancia magnética y niveles de 25(OH) vitamina D en suero y entre EDSS y niveles de 25(OH) vitamina D en suero.^{103,104} En nuestro estudio hemos observado que los niveles vitamina D son más bajos en pacientes que en controles confirmando

los hallazgos previos de otros autores. Además hemos estudiado la diferencia en los niveles de vitamina D entre pacientes y controles dependiendo de las estaciones. En invierno, los pacientes tienen niveles claramente más bajos de vitamina D. Dichos niveles aumentan tanto en pacientes como en controles en los meses de verano, pero las diferencias se mantienen, ya que los pacientes nunca llegan a alcanzar los niveles de los individuos sanos.

Esto no se había observado en otros estudios, realizados en el norte de Europa. Así, en Finlandia no se aprecian diferencias en los niveles de vitamina D entre controles y pacientes al analizar todas las muestras de suero en conjunto, ni en las muestras recogidas en los meses de invierno (octubre a mayo). En cambio, observaron diferencias significativas en las muestras de verano (junio a septiembre), en las que los pacientes tenían niveles más bajos de vitamina D que los controles.³⁶⁷ Por el contrario, otro estudio realizado en Barcelona obtiene resultados opuestos, no observándose diferencias significativas durante los meses de verano pero sí durante los meses de invierno¹⁰⁰. Estos datos demuestran que en todos los estudios que relacionan la vitamina D con la EM y más en general, con la autoinmunidad, se debe tener en cuenta la latitud y la exposición solar, que podrían dar cuenta de algunas de las diferencias encontradas.

También estudiamos la posible asociación de los niveles de vitamina D con la respuesta al tratamiento con IFN-beta. Otros grupos han observado una relación entre niveles bajos de 25-OH vitamina D en suero y la aparición de brotes en pacientes tratados con natalizumab e INF-beta.^{107,368} Así mismo, se ha sugerido que el IFN-beta podría estar modulando el metabolismo de la vitamina D ya que los pacientes en tratamiento con IFN-beta producen tres

veces más vitamina D por hora de exposición solar y esto estaría produciendo un efecto positivo en la reducción de los brotes.¹⁰⁷ Por el contrario, otro estudio asocia unos niveles más altos de 25-OH vitamina D con una reducción en el número de lesiones en T2 antes de iniciar del tratamiento con INF-beta, sin encontrar sin embargo, asociación entre los niveles de vitamina D y la respuesta al tratamiento.¹⁰⁶

Nuestros datos concuerdan con este último trabajo. Observamos niveles similares de vitamina D en el grupo de pacientes respondedores y en el de no-respondedores y no apreciamos efecto del tratamiento sobre los niveles de vitamina D. Esta falta de correlación con la respuesta al tratamiento podría deberse a la fluctuación que los niveles de vitamina D experimentan en los pacientes a lo largo del año, pasando la mayoría por niveles bajos de esta vitamina al menos en los meses de invierno. Estos datos no descartan un posible papel coadyuvante al tratamiento por parte de la vitamina D. Para ello habría sido necesario estudiar a pacientes que residan en áreas geográficas con alta exposición solar, o suplementar con vitamina D a algunos de los pacientes del estudio.

Para confirmar el posible papel antiinflamatorio de la vitamina D estudiamos la correlación entre los niveles de vitamina D y las distintas poblaciones celulares inflamatorias y reguladoras en nuestros pacientes antes del inicio del tratamiento. El efecto inmunomodulador y anti-inflamatorio de la vitamina D sobre los linfocitos T¹⁰⁰ ha sido descrito por varios autores. Se ha sugerido que la vitamina D contribuye a la activación de los linfocitos T reguladores^{98,369} y aumenta el ratio entre las células Th2 y Th1, lo que provocaría una reducción de la inflamación. También se ha descrito que la

vitamina D aumenta el número de linfocitos T CD4+ productores de IL-10 y disminuye el número de células que producen IL-6 e IL-17.⁹⁸ Describe también una reducción en la producción de INF-gamma.⁹⁸ Sin embargo, estos trabajos están realizados *in vitro* con cultivos de células T CD4+ aislados a los que se le ha añadido 1,25 hidroxivitamina D. Nuestro estudio está realizado comparando los niveles séricos de vitamina D con células obtenidas *ex vivo*. En él observamos una correlación inversa entre los niveles de vitamina D sérica y el porcentaje de linfocitos CD4+ secretores de INF-gamma. Esto apoyaría el efecto inmunomodulador y anti-inflamatorio de la vitamina D.

También estudiamos la relación de la EM y la respuesta a tratamiento con los niveles de otras vitaminas liposolubles en suero. Existen diversos trabajos que estudian la posible relación entre la vitamina E y la respuesta al tratamiento con INF-beta en pacientes con EM. En un estudio transversal realizado con un pequeño grupo de pacientes se ha descrito que los niveles de vitamina E en plasma aumentan en pacientes tratados durante varios años con IFN-beta, sin embargo estos datos no se han ratificado en un estudio longitudinal.¹¹⁹ Otro trabajo observa niveles reducidos de vitamina E en eritrocitos de pacientes con EM comparados con controles al inicio del tratamiento con INF-beta y que estos niveles se normalizan a los seis meses de tratamiento, sin embargo estos cambios en los niveles de vitamina E no se observan en plasma.³⁷⁰ En vista de esos datos preliminares, nosotros nos propusimos estudiar los niveles de vitamina E antes del tratamiento o en las fases iniciales del mismo.

Tal y como se había descrito previamente^{112,115-118}, encontramos que los pacientes antes del tratamiento muestran niveles claramente más bajos que los

controles, probablemente debido al papel que esta vitamina con propiedades antioxidantes podría jugar para contrarrestar el estrés oxidativo que se origina en la enfermedad.^{108,109} También encontramos que los niveles de Vitamina E antes del tratamiento se correlacionan con los porcentajes de la subpoblación CD19+CD86+ que se ha relacionado con la inducción de una respuesta T antiinflamatoria.^{205,206} Esto podría indicar que la reducción del estrés oxidativo por la vitamina E podría contribuir a disminuir la respuesta inflamatoria en la EM. Por otra parte, en nuestro estudio, no encontramos diferencias en los niveles de vitamina E de los pacientes antes del tratamiento y 6 meses después del comienzo del mismo. Este estudio realizado en 90 pacientes seguidos de forma longitudinal demuestra que el IFN-beta no tiene efecto sobre los niveles séricos de vitamina E, tal y como sugerían algunos estudios previos.

Por otra parte se ha descrito que niveles altos mantenidos de vitamina E a lo largo del tratamiento disminuyen la probabilidad de nuevos brotes en pacientes tratados con IFN-beta. Sin embargo este trabajo no estudia la relación de esta vitamina con la probabilidad de quedar libre de actividad de la enfermedad.³⁷¹ Nosotros nos propusimos estudiar si los niveles de vitamina E constituyen un marcador pronóstico de respuesta al interferón beta en la EM. No encontramos diferencia en los niveles de esta vitamina entre pacientes libres de actividad de la enfermedad y aquellos con respuesta subóptima. Estos datos no descartan una relación de los niveles de vitamina E con una mejor evolución de los pacientes, pero muestran que los niveles de esta vitamina no son de utilidad para identificar de manera precoz a los respondedores óptimos a IFN-beta.

La vitamina A es un nutriente esencial cuyas acciones fisiológicas están mediadas por sus metabolitos, los ácidos retinoicos, los cuales tienen una función importante en la respuesta inmunológica^{120,121,372} y en el sistema nervioso central^{123,124}, controlando la plasticidad y la regeneración del mismo.¹²⁴

En los primeros trabajos donde se medía la vitamina A usando marcadores subrogados, se postuló que los pacientes de EM tenían valores disminuidos de dicha vitamina.³⁷³ Sin embargo estudios mas recientes no han confirmado estos resultados,³⁷⁴ pero se ha postulado que niveles séricos elevados podrían tener un efecto beneficioso, sobre todo en la carga lesional.¹²⁶ Además, cuando se ha estudiado el efecto conjunto del IFN-beta con el ácido retinoico se ha encontrado que el ácido retinoico potencia el efecto del tratamiento sobre los linfocitos T supresores.¹³¹ Sin embargo, no se ha evaluado si la vitamina A podría ser un buen biomarcador de respuesta al tratamiento con INF-beta y si los niveles de esta vitamina se elevan al recibir dicho tratamiento. Nosotros no hemos encontrado diferencias en la vitamina A entre pacientes y controles, confirmando los hallazgos más frecuentes, ni hemos visto un aumento de esta vitamina en respuesta al tratamiento con interferón. Tampoco hemos encontrado correlación entre los niveles de vitamina A y la probabilidad de quedar libre de actividad de la enfermedad. Al igual que comentamos en el caso de las otras vitaminas liposolubles, esto no excluye que la vitamina A pueda ser un coadyuvante eficaz a algunos tratamientos en la EM.

5.2.3- Activina A

En la EM y en su modelo animal, la EAE, los macrófagos periféricos infiltrados dentro del SNC, participan en la inducción y desarrollo de la enfermedad. La diferenciación y polarización de estos macrófagos está determinada por el microambiente celular. La investigación de los mecanismos subyacentes que conducen a esta diferenciación de los macrófagos a su fenotipo M1 (proinflamatorio) o M2 (anti-inflamatorio) ha llevado a la identificación de la activina A como un factor que contribuye a esta polarización.

El analizar los niveles de activina A en el suero de los pacientes incluidos en estudio como posible biomarcador indirecto de la respuesta inmune innata de los pacientes dio como resultado unos niveles más elevados de activina A en los pacientes con EM al inicio del tratamiento que los controles sanos. Sin embargo los niveles de Activina A no han podido relacionarse con el tratamiento. La presencia de niveles altos de activina A en suero de pacientes con EM sugiere que esta proteína podría contribuir a la diferenciación de los macrófagos pro-inflamatorios que contribuyen a establecer la respuesta inmune perjudicial en esta enfermedad, de acuerdo con lo encontrado en otras patologías inflamatorias.^{282,283} Por otra parte la no correlación de los niveles de activina A con la respuesta al tratamiento puede deberse a que el INF-beta tiene un efecto mayor sobre la respuesta Th1 siendo capaz de modular en mayor medida la respuesta adaptativa que la innata.

5.3- BIOMARCADORES CELULARES

Una vez estudiadas las moléculas solubles, quisimos explorar las diferentes respuestas inmunológicas celulares que intervienen en la fisiopatología de la EM con el fin de encontrar un posible biomarcador que identifique a los pacientes con una buena respuesta a INF-beta. Estudiamos en primer lugar a los linfocitos T cooperadores ya que su implicación en la fisiopatología de la EM es ampliamente aceptada.¹⁸⁶ Más en concreto analizamos las células Th1 y Th17^{192,193,375} que han sido involucradas en la respuesta inflamatoria que aparece en la enfermedad^{192,193,370} y las células reguladoras ya que el déficit o los defectos en su función se han asociado con la EM¹⁹⁹. Exploramos también las distintas subpoblaciones de linfocitos T CD8+, los cuales juegan un rol importante en la EM como posibles causantes directos del daño axonal que se produce en las lesiones desmielinizantes.²¹¹⁻²¹⁴ Consideramos de gran relevancia el análisis de las células B ya que se han asociado de maneras diversas con la fisiopatología de la enfermedad. Así las células B de LCR se asocian estrechamente con el volumen lesional en T2 y con la neuroregeneración.^{167,246} Estas células intervienen en la respuesta inmune adaptativa como productoras de IgG oligoclonal, que está presente en el LCR del 95% de los pacientes con EM³⁷⁶; en la respuesta inmune T independiente mediante la producción de IgM oligoclonal frente a lipidos por linfocitos B CD19+CD5+, que se asocian con una mayor severidad de la enfermedad.^{163,226}; como células presentadoras de antígeno,³⁷⁷ o como células reguladoras.²⁰⁴ Los linfocitos T CD5+ hemáticos se han relacionado con un mayor riesgo de conversión a EM tras un síndrome neurológico aislado y las células B reguladoras con una buena respuesta IFN-beta^{205,206}. Otra de las

poblaciones interesantes a estudiar por su asociación con la EM son las células NK²⁷¹, sobre todo la población de células NK reguladoras que se han relacionado con la respuesta al tratamiento con IFN-beta^{274,335}

5.3.1- Linfocitos T CD4+

Se considera que los linfocitos T CD4+ juegan un papel importante en la fisiopatología de la EM, sobre todo aquellos con acción proinflamatoria como las células Th1 y Th17 que se han asociado con los periodos de actividad de la enfermedad.¹⁸⁹ Estas células indirectamente se han implicado en la respuesta al tratamiento con interferón beta, aunque los resultados de los distintos estudios son controvertidos.³³⁶⁻³³⁸ Nuestros resultados al valorar las células Th1 y Th17 fueron similares a los que obtuvimos con las citoquinas solubles. Estas células no nos permitieron identificar a los respondedores óptimos a interferón beta antes del inicio del tratamiento ni después de seis meses tras el inicio del mismo.

Otra subpoblación de linfocitos CD4+ que juegan un papel importante en la EM son los linfocitos CD4+ reguladores. La supresión activa llevada a cabo por las células T reguladoras juega un papel clave en el control de las células autorreactivas y en el mantenimiento de la tolerancia periférica.^{378,379}

Se ha descrito una reducción en la capacidad supresora de las células T reguladoras CD4+CD25+FoxP3+ en varias enfermedades autoinmunes.^{330,380-384} En 2004, aparecía publicado el primer trabajo que mostraba defectos en las funciones supresoras de los linfocitos T reguladores CD4+CD25+ circulantes en pacientes con EM.¹⁹⁹ Estudios posteriores confirmaron estos datos demostrando que células T reguladoras derivadas de pacientes con EMRR

muestran una disminución en su capacidad para inhibir células T específicas frente a mielina y la proliferación de células T no-antígeno específicas.^{199,201,385} También se ha observado una disminución de las células T reguladoras en pacientes con EMRR durante los brotes²⁰² y una expansión de las mismas durante los periodos estables de la enfermedad.^{386,387} Esto ha hecho que cuando se analicen los porcentajes de estas células en comparación con controles sanos, los resultados sean contradictorios. Hay grupos que detectan una frecuencia de células T reguladoras similar entre controles sanos y pacientes de EM.³⁸⁸ En otros estudios, el porcentaje de células T reguladoras es inferior en la EM al encontrado en individuos sanos,^{389,390} mientras que un número reducido de trabajos encuentran un porcentaje de linfocitos T reguladores superior al de los controles sanos.³⁸⁷ Nosotros, estudiamos a todos los pacientes en fase estable y no encontramos diferencias significativas en el porcentaje de linfocitos T CD4+CD25+FoxP3+ al comparar los pacientes con EM y los controles sanos. Sin embargo, cuando estudiamos la relación de estas células con la respuesta al tratamiento, observamos un porcentaje elevado de linfocitos T CD4+CD25+FoxP3+ en los respondedores subóptimos al tratamiento con INF-beta al inicio del mismo. Descartamos que los niveles altos de células T reguladoras se debieran en este grupo a la proximidad del tratamiento con corticoides, que pueden aumentar el número de células T reguladoras en sangre,^{387,391} ya que no existían diferencias en el número de brotes previos al tratamiento entre ambos grupos de pacientes y el tiempo medio al último brote era similar. Una posible explicación es que este hallazgo podría deberse a que en este grupo de pacientes exista una actividad inflamatoria subclínica mayor dentro del sistema nervioso central, y que el

porcentaje aumentado de linfocitos T CD4+CD25+FoxP3+ sea un mecanismo que intente compensar dicha inflamación.

A continuación, medimos estas células a los seis meses de tratamiento. Los mecanismos de acción mediante los cuales el IFN-beta ejerce su función inmunomoduladora no son del todo conocidos. Una de las posibles dianas terapéuticas del fármaco son los linfocitos T CD4+ reguladores. Ya a principios de los años 90 se describió que el INF-beta aumentaba la función inmunosupresora en la EM y que esto se reflejaba en la progresión de la enfermedad.³⁹² Estos datos se validaron en estudios posteriores.^{203,393} Además se ha descrito que el IFN-beta puede aumentar la proporción de linfocitos T CD4+ reguladores en pacientes con EM entre los 6 y 12 meses de tratamiento^{203,207,208,387,390,394}, aunque estos datos no son concluyentes, ya que no se validaron en otros trabajos.^{388,389,395 387 396} Nuestros resultados muestran que a lo largo del tratamiento se producía un aumento significativo de la población reguladora CD4+CD25+FoxP3+ en los pacientes del grupo de respondedores óptimos y no en el resto de los pacientes. Estos resultados coinciden con los obtenidos en pacientes tratados con otra terapia inmunomoduladora en la EM, el acetato de glatiramero, que muestran un aumento de los linfocitos T reguladores tras el tratamiento en los pacientes con una respuesta óptima y no en los no respondedores.³⁸⁸ Estos datos sugieren que el déficit de linfocitos T reguladores tiene un papel importante en la EM y restaurar un balance adecuado de estas células puede asociarse con una respuesta óptima a distintas terapias.

5.3.2- Linfocitos T CD8+

Distintas evidencias prueban que los linfocitos T CD8+ juegan un papel importante en la fisiopatología de la EM.^{216,397,398} Son la población linfocitaria que predomina en las lesiones^{183,210} y se correlacionan con el daño axonal en las mismas.²¹¹⁻²¹³ y con una disminución de la remielinización.²¹⁹⁻²²¹ Estas acciones la llevan a cabo mediante su función citotóxica y la liberación de perforina, aunque también pueden inducir apoptosis neuronal mediante la secreción de altas cantidades de TNF α ^{217, 218}. Sin embargo, las células T CD8+ no solo ejercen un papel patogénico en la EM, también se ha descrito una subpoblación que podría tener también una función reguladora. Estas células reguladoras CD8+ reconocen y lisan células T CD4+ activadas específicas frente a mielina.³⁹⁷ Experimentos realizados durante la década de los 90 ya demostraron que células T CD8+ podían suprimir la respuesta de células T CD4+ activadas.³⁹⁹⁻⁴⁰¹ Esta función la desempeñan mediante la liberación de gránulos de perforina y granzima y restringidas por moléculas de MHC-I no clásica el HLA-E. Estas células reguladoras se encuentran disminuidas en pacientes EM en brote, en relación a pacientes en remisión y a controles sanos.²²² La importancia de las células T CD8+ reguladoras en el mantenimiento de la homeostasis inmunológica ha sido confirmada recientemente en varias enfermedades autoinmunes humanas y en sus modelos animales. En artritis reumatoide y diabetes mellitas tipo I, la inducción y función de las células T CD8+ reguladoras se encuentra reducida en pacientes con enfermedad activa y en modelos experimentales murinos.⁴⁰²⁻⁴⁰⁶ Un papel supresor similar de los linfocitos T CD8+ se ha descrito en lupus eritematoso sistémico, esclerosis sistémica, enfermedad de Graves, espondilitis

anquilosante y uveoretinitis autoinmune experimental.⁴⁰⁷ La transferencia pasiva de células T CD8+ reguladoras específicas frente a MOG a ratones naïve es capaz de suprimir de la inducción de la EAE. Estas células producen IFN-gamma y perforina y lisan a las células T CD4+ específicas frente a MOG.⁴⁰⁸ En pacientes de EM se ha objetivado la presencia de células T CD8+ específicas frente a autoantígenos del sistema nervioso central, pero no frente a antígenos foráneos. Dichas células muestran una actividad reguladora, suprimiendo la proliferación de células T CD4+ cuando estimuladas por los mismos antígenos. El porcentaje de estas células es similar en pacientes de EM en remisión y controles sanos pero se encuentra disminuido durante los brotes,⁴⁰⁹ donde también se observa una reducción en la expresión de perforina y granzima B^{222, 223}. En nuestro estudio, observamos que, antes del inicio del tratamiento con interferón beta, las células T CD8+perforina+ se encuentran aumentadas en los pacientes que van a responder de forma óptima al tratamiento, en relación al grupo de respondedores subóptimos y a los controles sanos. Estos datos podrían estar indicando una población celular efectora que puede ser inhibida por el interferón beta. Otra posibilidad sería que estas células sean linfocitos T CD8+perforina+ con función supresora y contribuyan a la función inmunoreguladora del IFN-beta. Esta hipótesis viene avalada por el mantenimiento de las diferencias entre respondedores óptimos y subóptimos a los seis meses de tratamiento. En cualquier caso, las diferencias claras en los niveles de estas células entre los dos grupos de pacientes hacen que esta población celular pueda ser utilizada como biomarcador de respuesta óptima al tratamiento con INF-beta. Estos datos se han validado en una cohorte

independiente y este biomarcador puede ser determinado en células congeladas, lo que limita las dificultades técnicas para su uso clínico.

Estos datos sugieren que los linfocitos T CD8+ perforina+ reguladores pueden ser necesarios para una respuesta óptima al IFN-beta en la EM.

5.3.3- Linfocitos B

El papel de los linfocitos B en la fisiopatología de la EM viene avalado por una serie de datos como el hallazgo de células B en las lesiones crónicas^{410,411} y en el LCR^{412,413} de pacientes con EM. El porcentaje de linfocitos B de LCR está aumentado en los pacientes con EM con relación a controles.²⁴⁵ Este aumento se observa más claramente en las poblaciones de células B activadas²⁴⁶ y en las que expresan el marcador de superficie CD5+^{255,414} y se asocia con la carga lesional y la concentración de la subunidad ligera de los neurofilamentos en LCR.^{167,246} Otro indicador del papel de los linfocitos B en la EM es la síntesis intratecal de inmunoglobulinas. La presencia de bandas oligoclonales de IgG (BOC) se observa en el LCR del 95% de los pacientes con EM³⁷⁶, que también pueden presentar bandas oligoclonales de IgM específicas frente a lípidos. La presencia de estas bandas IgM predice un curso más agresivo de la patología.²²⁶

Con respecto a los valores de linfocitos B en sangre periférica, en la EM se han estudiado estas células teniendo en cuenta sus distintas funciones: presentadoras de antígeno, productoras de anticuerpos y reguladoras.

Para el estudio de los linfocitos B como células presentadoras de antígeno, se estudian las moléculas coestimuladoras que presentan en superficie y la producción de citoquinas proinflamatorias. En la EAE se observó

que la expresión de la molécula CD80+ en las células presentadoras de antígeno inducía una respuesta Th1, mientras que la molécula CD86 inducía una respuesta Th2. Estos estudios sugieren que variaciones en la expresión de CD80 y CD86 podrían influir en la regulación de la respuesta autoinmune que tiene lugar en la EM.^{415,416} Se ha descrito que los pacientes de EM con enfermedad activa muestran un incremento de las células B CD80+³⁷⁷ y que la terapia con INF-beta reduce el número de células B CD80+ circulantes en sangre y aumenta el número de células B CD86+.⁴¹⁵ Estos resultados han sido validados en otros trabajos,^{205,206} que muestran que el IFN-beta es capaz de modificar la presentación antigénica de las células B disminuyendo su capacidad proinflamatoria. Sin embargo, nuestros resultados muestran que los valores basales de CD80 y CD86 o la producción de citoquinas proinflamatorias en los linfocitos B no identifican a los futuros respondedores óptimos a interferón beta. Y aunque se aprecia una tendencia al aumento de esta subpoblación en todos los pacientes durante el tratamiento, dicho aumento tampoco se asocia con estar libre de actividad de la enfermedad. Estos datos sugieren que, aunque la función de los linfocitos B como presentadores de antígeno puede ser importante en la fisiopatología de la EM, estas células no son útiles para identificar respondedores óptimos a IFN-beta.

A continuación estudiamos el papel de los linfocitos B como células productoras de anticuerpos. El marcador CD38+ se asocia con la diferenciación de los linfocitos B y la producción de altos títulos de anticuerpos. Por tanto, al inicio de nuestro estudio parecía el marcador ideal para identificar a las células altamente productoras de inmunoglobulinas. Sin embargo, recientemente se ha caracterizado una subpoblación de linfocitos B con fenotipo regulador

caracterizada por la coexpresión de CD38 y CD24. Esta subpoblación aumenta claramente en respuesta al tratamiento con IFN-beta en la EM.⁴¹⁷ Dado que el comarcaje con CD24 no estaba diseñado en nuestro estudio, no pudimos diferenciar entre las dos subpoblaciones de células CD38+. Esto ha representado un problema a la hora de identificar si los aumentos o cambios de esta subpoblación en nuestros pacientes se asocian con la producción de altos niveles de anticuerpos o con un aumento en células reguladoras. Antes del inicio del tratamiento observamos un aumento moderado de la subpoblación B CD38+ en los pacientes no respondedores. Esto hace pensar que dicho aumento podría deberse a la población efectora y que estos linfocitos B activados podrían asociarse con una peor respuesta a IFN-beta. Sin embargo, los porcentajes de las células B CD38+ aumentaron de modo muy significativo durante el tratamiento, independientemente de la respuesta al mismo. Este aumento podría deberse a la subpoblación reguladora, ya que se ha descrito que aumenta con el tratamiento. Sin embargo, esta variable no resultó útil para identificar a los pacientes con alta probabilidad de quedar libres de actividad de la enfermedad, ya que las diferencias entre respondedores óptimos y subóptimos en las muestras de inicio eran muy pequeñas y los aumentos durante el tratamiento fueron similares en ambos grupos.

A continuación, estudiamos las células CD5+ positivas responsables de la respuesta IgM T-independiente frente a antígenos muy conservados, principalmente de naturaleza no proteica. Se ha descrito que los pacientes de EM muestran un porcentaje aumentado de estas células B comparado con controles, aunque las diferencias son menores que en LCR.²⁵⁵ Además, un porcentaje de linfocitos B CD5+ elevado en sangre periférica aumenta el riesgo

de conversión a EM tras un síndrome neurológico aislado.²⁶⁰ Nosotros, observamos que los pacientes mostraban un porcentaje claramente aumentado de linfocitos B CD5+ al compararlos con el grupo de controles sanos, confirmando los datos obtenidos en estudios previos. Además, detectamos que, antes del inicio del tratamiento, este aumento era considerablemente más alto en el grupo de pacientes que iban a mostrar una respuesta subóptima al IFN-beta. Este hecho podría explicarse porque los linfocitos B CD5+ median una respuesta B T-independiente que sería difícilmente modulada por el IFN-beta, que parece actuar principalmente sobre linfocitos T.

Establecimos como punto de corte un porcentaje del 3% para estos linfocitos y observamos que un valor inferior al mismo contribuye a identificar a los pacientes con altas probabilidades de quedar libres de enfermedad si se tratan con IFN-beta. Esta asociación resulta más clara en los pacientes tratados con altas dosis del fármaco. Esto sugiere que en algunos pacientes tratados con baja dosis del mismo que muestran fenotipo de buenos respondedores.

En resumen, nuestros datos sugieren la utilidad del estudio de los linfocitos B CD5+ en sangre para establecer una terapia personalizada en la EM. Cuando intentamos validar estos resultados en una cohorte independiente, no se replicaron nuestros resultados. Dado que nuestras células habían sido analizadas en fresco y las de la cohorte de validación eran células congeladas, estudiamos si la congelación podría alterar los porcentajes de linfocitos B CD5+ en sangre. Observamos que se producía una disminución en dichos porcentajes en muestras previamente congeladas, tal y como se había descrito

en estudios previos y por tanto nuestros datos deberían validarse en estudios prospectivos.³⁴⁵

Nuestros datos indican que porcentaje de linfocitos B CD5+ analizados en fresco es un marcador fácil de analizar y reproducible para identificar pacientes con alta probabilidad de mostrar una respuesta óptima a IFN-beta en la EM. Una vez validados estos datos en estudios multicéntricos podría introducirse fácilmente en la práctica clínica habitual.

Para comprobar si los valores de estos linfocitos también podrían ser un biomarcador una vez iniciado el tratamiento, medimos los porcentajes de estas células tras seis meses de tratamiento. Tanto los linfocitos B totales, como los CD5+ aumentaron en los pacientes respondedores durante el tratamiento con IFN-beta. Esto es difícil de explicar, dada la asociación que se ha encontrado entre los linfocitos B CD5+ y la inflamación en la EM. Sin embargo, no se puede descartar que este aumento se deba a subpoblaciones reguladoras, las cuales se caracterizan por presentar en su superficie el marcador CD5.⁴¹⁸ Para analizar esto en profundidad estudiamos también los linfocitos B reguladores en nuestros pacientes. Algunos trabajos han descrito la existencia de un porcentaje disminuido de células B reguladoras secretoras de IL-10 en los pacientes con EM en relación a controles sanos y que esta disminución se acentúa durante los brotes²⁰⁴, asociándose con las manifestaciones clínicas de la enfermedad. Por el contrario, otros autores han visto en distintas enfermedades autoinmunes, entre las que se incluye la EM, que existe una expansión de dicha población en los pacientes que muestran porcentajes significativamente mayores en la sangre que los controles sanos.⁴¹⁹ Este aumento se atribuye a un intento de control de la inflamación y la

autoinmunidad. Nosotros no encontramos diferencias significativas en el porcentaje de células B productoras de IL-10 entre controles sanos y los pacientes de EM antes del inicio del tratamiento, pero observamos que los pacientes respondedores experimentaban un aumento significativo en esta población celular. Esto sugiere que parte del aumento de los linfocitos B que experimentan los pacientes respondedores puede deberse a células reguladoras. La diferencia entre el aumento de los porcentajes de linfocitos B totales y B CD5+ y los B reguladores podría deberse a la baja sensibilidad que muestran las técnicas actuales para ver secreción de IL-10 por linfocitos B o a otras poblaciones B reguladoras como la secretora de IL-35 que se ha descrito recientemente en la EM.⁴²⁰ La relación de las células B reguladoras con la respuesta óptima a IFN-beta viene avalada por una serie de datos previos. Los primeros se obtuvieron en el modelo animal, ya que se demostró que estas células eran capaces de inhibir el inicio de la EAE en ratones y de mediar resistencia a la enfermedad.^{421,422} En la EM, la disminución de las células B reguladoras se ha relacionado con los brotes de la enfermedad.²⁰⁴ Además, se ha observado que el tratamiento con IFN-beta aumenta la producción de IL-10 por los linfocitos B^{205,206}. Todo ello confirma que una de las poblaciones celulares que median el efecto del IFN-beta en la EM son los linfocitos B reguladores y que un aumento importante de estas células se asocia con la ausencia de actividad de la enfermedad durante este tratamiento.

5.3.4- Células NK y NKT

Las células natural killer (NK) son una importante población de linfocitos granulares que inducen la lisis de células infectadas por virus y células

tumorales sin necesidad de una sensibilización previa. Son células pertenecientes a la inmunidad innata que expresan multitud de receptores activadores e inhibidores. La citotoxicidad de estas células está determinada por un balance entre estas señales activadoras e inhibidoras.²⁶³ La citólisis de las células diana se alcanza por una variedad de mecanismos efectores que incluyen la liberación de gránulos que contienen perforina y granzima y la expresión de receptores de muerte de la superfamilia del TNF. (Fas y FasL). El mecanismo preferentemente utilizado por las células NK para llevar a cabo su función efectora es la desgranulación.²⁶⁴ Las células NK humanas se caracterizan en función de la intensidad con la que expresan en la membrana las moléculas CD56. Algunas expresan esta molécula con intensidad intermedia (CD56^{dim}) y otras con una intensidad alta (CD56^{brigh}). Aproximadamente el 90% de las células NK en sangre periférica son CD56^{dim}CD16⁺. Son células efectoras que producen citoquinas y lisis de las células diana ya que expresan grandes cantidades de perforina y granzima B.⁴⁶ Otra población que expresa la molécula CD56^{dim} son las células NKT, población que algunos autores consideran un subtipo de células NK y otros como una población independiente. Se caracteriza por la expresión de CD3 y en humanos la molécula CD8 α , las cuales pueden tener tanto función efectora como reguladora. Estas células están implicadas en la regulación de reacciones autoinmunes.⁴²³ Se ha mostrado que el porcentaje de células NKT esta disminuido en sangre periférica de los pacientes con EM⁴²³⁻⁴²⁵ sobre todo durante los brotes.^{426 427} En nuestro estudio no hemos encontrado diferencias significativas en estas dos poblaciones de células CD56^{dim} al inicio del

tratamiento ni a los 6 meses, corroborando lo encontrado en estudios anteriores.³³⁵

Por otro lado, la subpoblación CD56^{bright}CD16⁻ constituye menos del 10% del total de células NK en sangre periférica; se encuentra preferentemente en los órganos linfoides secundarios y puede expresar un gran número de citoquinas diferentes como INF- γ , TNF- α , GM-CSF e IL-10.²⁶⁵ Se ha demostrado que esta población de células CD56^{bright} no tiene una actividad citolítica y que producen en altas cantidades la citoquina inmunosupresora IL-10, la cual le confiere sus propiedades reguladoras. La evaluación de las células NK bright no nos han permitido predecir la respuesta al tratamiento con INF- β al inicio del tratamiento ya que no se encontraron diferencias significativas entre los pacientes respondedores y no respondedores. Tampoco se encontraron diferencias entre los pacientes de EM y los controles como se demostraba en estudios previos.³³⁵

Sin embargo se ha demostrado la expansión de las células CD56^{bright} tras el tratamiento con anticuerpos monoclonal anti-CD25 (Daclizumab)^{267,428,429} y su correlación con una respuesta óptima al mismo.⁴²⁸ Así mismo, se ha visto la expansión de las células CD56^{bright} en pacientes tratados con interferón beta.^{207,335,430} En esta línea, nuestros resultados también muestran una expansión de las células CD56^{bright} con el tratamiento con IFN-beta pero restringido al grupo de respondedores óptimos, lo que demuestra la importancia de la expansión de esta población reguladora para lograr una buena respuesta al tratamiento. Al separar a los pacientes en respondedores óptimos y subóptimos detectamos esta expansión ya a los 6 meses, mientras que en otros estudios sólo se observó tras 12²⁰⁷ o 24 meses de tratamiento³³⁵.

En resumen, nuestro trabajo demuestra que esta población celular se puede utilizar como un biomarcador de respuesta al tratamiento.

5.3.5- Efecto inmunosupresor de las células reguladoras

Hemos demostrado en este trabajo que en los respondedores óptimos, El IFN-beta está produciendo un aumento en tres poblaciones reguladoras, las cuales están ejerciendo un efecto inmunosupresor, sin embargo no conocemos que células están siendo inmunosuprimidas por dichas poblaciones reguladoras. Por ello quisimos ver si el aumento de cada una correlacionaba con la disminución de alguna subpoblación celular. En EM no se han llevado a cabo estudios amplios en sangre total de correlación entre poblaciones reguladoras y el resto de subpoblaciones celulares, las únicas poblaciones celulares entre la que se ha descrito una correlación inversa ha sido entre las células T reguladoras y la células Th17, encontrándose un ratio disminuido Treg/Th17 en EM.⁴³¹ Dicha correlación se ha encontrado también en otras patologías como abortos recurrentes tempranos.⁴³² Sin embargo, en nuestro estudio no encontramos esta correlación, lo cual podría ser debido al bajo porcentaje de células Th17 que encontramos en nuestro estudio. Otro abordaje distinto donde se deplecionaban las células T reguladoras en SNC correlacionaban con un incremento de las células T CD8+INFgamma+.⁴³³ En nuestro trabajo encontramos una correlación inversa entre células CD4+C25highFoxP3+ y las células CD8+ totales, las células CD8+ productoras de TNF-alfa e IFN-gamma y las células NK. Esto parece indicar que estas células T reguladoras podrían tener un efecto inmunosupresor sobre las células con una acción citotóxica.

Respecto a las células B reguladoras se ha demostrado *in vitro* que en pacientes infectados con VIH, dichas células inhiben a las células T citotóxicas que eliminan a los linfocitos T CD4+ infectados por el virus.⁴³⁴ En nuestro estudio no hemos encontrado correlación entre las células B reguladoras productoras de IL-10 y ninguna de las subpoblaciones celulares estudiadas. Esto puede ser debido a que en la EM estas células reguladoras parecen no estar actuando sobre una célula efectora en concreto sino que están ejerciendo una acción indirecta induciendo la activación de las células T reguladoras⁴³⁵

En relación a las células CD56^{bright}, es posible que las células CD56^{bright} interactúen con linfocitos T y B pero esto no ha sido investigado en profundidad.⁴³⁶ Encontramos que existía una correlación inversa con las células B CD19+ y especialmente las células B CD19+CD5+. Esto podría contribuir a modular una de las subpoblaciones celulares que interviene en la fisiopatología de la enfermedad.²⁵⁹

5.4- CONSIDERACIONES FINALES

El amplio abanico de terapias disponibles hoy día para el tratamiento de la EM ha hecho necesaria la identificación precoz de los pacientes que podrían beneficiarse en mayor medida de cada fármaco, para poder establecer una terapia personalizada en la enfermedad. Hasta ahora son los marcadores clínicos y radiológicos los que más se utilizan para establecer opciones terapéuticas. Sin embargo, esto implica un cierto deterioro para los pacientes no respondedores que puede repetirse con distintas terapias. Por ello la búsqueda de biomarcadores moleculares y celulares predictivos de respuesta al del tratamiento es una necesidad importante en la EM. Nosotros para

realizar este estudio establecimos unos criterios estrictos de respuesta al tratamiento con el fin de identificar biomarcadores que predijeran la ausencia de actividad de la enfermedad. Para evitar factores de confusión en nuestro estudio, se analizó la presencia de anticuerpos neutralizantes anti IFN beta que podrían producir un fracaso secundario de la terapia y se eliminaron del estudio los pacientes que presentaban estos anticuerpos.

No encontramos relación entre los valores séricos de distintas citoquinas en suero y la respuesta al tratamiento, posiblemente porque al secretarse de manera paracrina puede ser difícil que en el suero se reflejen las variaciones de las mismas.

Las vitaminas liposolubles tampoco son buenos biomarcadores de la respuesta óptima al tratamiento con IFN-beta. Sin embargo, hemos confirmado que la vitamina D se encuentra disminuida en el suero de pacientes respecto a controles sanos y hemos descrito que este fenómeno se produce tanto en épocas de baja como de alta exposición solar.

La activina A, el último biomarcador soluble analizado, tampoco se asocia con la respuesta al tratamiento, pero, contrariamente a lo que ocurre con las vitaminas, se encuentra aumentada en los pacientes con EM respecto a los controles. Esto puede explicarse por su papel en la diferenciación de macrófagos pro-inflamatorios, que parecen jugar un papel importante en el mantenimiento de la inflamación en la EM.

En estudio de poblaciones celulares hemos encontrado biomarcadores de respuesta a tratamiento, Así, un porcentaje disminuido de linfocitos B CD5+ y un porcentaje elevado de linfocitos T CD8+Perforina+ y niveles disminuidos de células Treg predicen una respuesta óptima al tratamiento con IFN-beta,

siendo los dos primeros marcadores los que alcanzan unos niveles mayores de significación.

El estudio de validación de dichos biomarcadores confirmó el hallazgo obtenido en nuestro estudio sobre los linfocitos T CD8+Perforina+ y nos mostró que el porcentaje de linfocitos B CD5+ solo se puede determinar en sangre fresca, no siendo útil su determinación en células congeladas.

Por último, el estudio de biomarcadores a los 6 meses de tratamiento nos ha mostrado que el IFN-beta está actuando sobre tres poblaciones celulares reguladoras: las células T CD4+CD25highFoxP3+, las célula B CD19+IL10+ y las células NK CD56bright, confirmando el papel que juega la inducción de las células reguladoras en el mecanismo de acción de IFN beta y el que déficit de estas células es uno de los mecanismos implicados en la fisiopatología de la EM

6. CONCLUSIONES

El INF- beta es un fármaco seguro y bien tolerado que induce la remisión completa en alrededor de un tercio de los pacientes de EM.

1. Para el estudio de biomarcadores de respuesta al tratamiento es necesario el establecimiento de unos criterios de respuesta que incluyan parámetros clínicos como de resonancia.
2. Es necesario además monitorizar la presencia de anticuerpos neutralizantes frente al fármaco a los 6-12 meses de tratamiento, pues puede inducir pérdida de eficacia en alrededor del 10% de los pacientes.
4. El análisis inicial de las subpoblaciones linfocitarias nos ha permitido la identificación de dos biomarcadores precoces de respuesta al tratamiento con IFN-beta: un porcentaje disminuido de linfocitos B CD5+ y un porcentaje aumentado de linfocitos T CD8+Perforina+ van a predecir una buena respuesta a la terapia.
5. La vitamina D se encuentra disminuida en los pacientes de EM y podría tener un papel inmunomodulador sobre los linfocitos T CD4+ productores de IFN-gamma contribuyendo a frenar la inflamación característica de la EM.
6. Los niveles de vitamina E en el suero de los pacientes de EM están disminuidos, puede ser debido a un consumo excesivo de dicha vitamina por su papel anti-oxidante eliminando los radicales libres implicados en los procesos de desmielinización.
7. La activina A, molécula que favorece un fenotipo pro-inflamatorio en los macrófagos, se encuentra aumentada en los pacientes de EM lo que podría indicar un papel de la inmunidad innata en la fisiopatología de la EM.
8. El tratamiento con IFN-beta incrementa los niveles de células reguladoras (linfocitos T CD4+CD25highFoxP3+, linfocitos B IL10+, células CD56brigh) en los pacientes con una respuesta óptima al fármaco. Esto nos ha

permitido esclarecer un poco más el mecanismo de acción del IFN-beta y los mecanismos fisiopatológicos de la EM.

7. BIBLIOGRAFÍA

- 1 Kingwell, E. *et al.* Incidence and prevalence of multiple sclerosis in Europe: a systematic review. *BMC neurology* **13**, 1471-2377 (2013).
- 2 Mayr, W. T. *et al.* Incidence and prevalence of multiple sclerosis in Olmsted County, Minnesota, 1985-2000. *Neurology* **61**, 1373-1377 (2003).
- 3 Orton, S. M. *et al.* Sex ratio of multiple sclerosis in Canada: a longitudinal study. *The Lancet. Neurology* **5**, 932-936 (2006).
- 4 Ramagopalan, S. V. *et al.* Sex ratio of multiple sclerosis and clinical phenotype. *European journal of neurology : the official journal of the European Federation of Neurological Societies* **17**, 634-637 (2010).
- 5 Reinhardt, K., Weiss, S., Rosenbauer, J., Gartner, J. & von Kries, R. Multiple sclerosis in children and adolescents: incidence and clinical picture - new insights from the nationwide German surveillance (2009-2011). *European journal of neurology : the official journal of the European Federation of Neurological Societies* **21**, 654-659 (2014).
- 6 Bruck, W. The pathology of multiple sclerosis is the result of focal inflammatory demyelination with axonal damage. *J Neurol* **3** (2005).
- 7 Lucchinetti, C. *et al.* Heterogeneity of multiple sclerosis lesions: implications for the pathogenesis of demyelination. *Annals of neurology* **47**, 707-717 (2000).
- 8 Metz, I. *et al.* Pathologic heterogeneity persists in early active multiple sclerosis lesions. *Annals of neurology* **75**, 728-738 (2014).
- 9 Carswell, R. Pathological anatomy: illustrations of the elementary forms of disease. (1838).
- 10 Courville, C. B. The ancestry of neuropathology: Sir Robert Carswell, dean of the English atlas-makers. *Bull Los Angel Neuro Soc* **13**, 143-164 (1948).
- 11 Cruveilhier, J. Anatomie pathologique du corps humain; descriptions avec figures lithographiées et coloriées; des diverses alterations morbides dont le corps humain est susceptible. (1841).
- 12 JM, C. Histologie de la sclerose en plaque. *Gazette Hospital (Paris)* **41**, 554-566 (1868).
- 13 P, M. La sclerose en plaques et maladies infectieuses. *La Progres Medicale* **12**, 287-289 (1884).
- 14 Rivers, T. M. & Schwentker, F. F. Encephalomyelitis Accompanied by Myelin Destruction Experimentally Produced in Monkeys. *The Journal of experimental medicine* **61**, 689-702 (1935).
- 15 H, Q. Lumbar punktion des hydrocefalus. *Klin Wochenschr* **20**, 929-933 (1891).

- 16 Kabat, E. A., Moore, D. H. & Landow, H. An Electrophoretic Study of the Protein Components in Cerebrospinal Fluid and Their Relationship to the Serum Proteins. *The Journal of clinical investigation* **21**, 571-577 (1942).
- 17 Kurtzke, J. F. A new scale for evaluating disability in multiple sclerosis. *Neurology* **5**, 580-583 (1955).
- 18 Kurtzke, J. F. Rating neurologic impairment in multiple sclerosis: an expanded disability status scale (EDSS). *Neurology* **33**, 1444-1452 (1983).
- 19 Schumacker, G. A. *et al.* PROBLEMS OF EXPERIMENTAL TRIALS OF THERAPY IN MULTIPLE SCLEROSIS: REPORT BY THE PANEL ON THE EVALUATION OF EXPERIMENTAL TRIALS OF THERAPY IN MULTIPLE SCLEROSIS. *Annals of the New York Academy of Sciences* **122**, 552-568 (1965).
- 20 Poser, C. M. Taxonomy and diagnostic parameters in multiple sclerosis. *Annals of the New York Academy of Sciences* **436**, 233-246 (1984).
- 21 McDonald, W. I. *et al.* Recommended diagnostic criteria for multiple sclerosis: guidelines from the International Panel on the diagnosis of multiple sclerosis. *Annals of neurology* **50**, 121-127 (2001).
- 22 Polman, C. H. *et al.* Diagnostic criteria for multiple sclerosis: 2010 revisions to the McDonald criteria. *Annals of neurology* **69**, 292-302 (2011).
- 23 Rosati, G. The prevalence of multiple sclerosis in the world: an update. *Neurol Sci* **22**, 117-139 (2001).
- 24 Handel, A. E., Handunnetthi, L., Giovannoni, G., Ebers, G. C. & Ramagopalan, S. V. Genetic and environmental factors and the distribution of multiple sclerosis in Europe. *European journal of neurology : the official journal of the European Federation of Neurological Societies* **17**, 1210-1214 (2010).
- 25 Pugliatti, M., Sotgiu, S. & Rosati, G. The worldwide prevalence of multiple sclerosis. *Clin Neurol Neurosurg* **104**, 182-191 (2002).
- 26 Kingwell, E. *et al.* Incidence and prevalence of multiple sclerosis in Europe: a systematic review. *BMC neurology* **13**, 128, doi:10.1186/1471-2377-13-128 (2013).
- 27 Fernandez, O. *et al.* Multiple sclerosis prevalence in Malaga, Southern Spain estimated by the capture-recapture method. *Multiple sclerosis (Houndmills, Basingstoke, England)* **18**, 372-376 (2012).
- 28 Otero-Romero, S. *et al.* Increase in the prevalence of multiple sclerosis over a 17-year period in Osona, Catalonia, Spain. *Multiple sclerosis (Houndmills, Basingstoke, England)* **19**, 245-248 (2013).
- 29 Detels, R. *et al.* Evidence for lower susceptibility to multiple sclerosis in Japanese-Americans. *Am J Epidemiol* **105**, 303-310 (1977).

- 30 Weinshenker, B. G. Epidemiology of multiple sclerosis. *Neurol Clin* **14**, 291-308 (1996).
- 31 Alter, M., Leibowitz, U. & Speer, J. Risk of multiple sclerosis related to age at immigration to Israel. *Archives of neurology* **15**, 234-237 (1966).
- 32 Dean, G. & Kurtzke, J. F. On the risk of multiple sclerosis according to age at immigration to South Africa. *Br Med J* **3**, 725-729 (1971).
- 33 Risch, N. Linkage strategies for genetically complex traits. III. The effect of marker polymorphism on analysis of affected relative pairs. *Am J Hum Genet* **46**, 242-253 (1990).
- 34 Lindsey, J. W. Familial recurrence rates and genetic models of multiple sclerosis. *Am J Med Genet A* **135**, 53-58 (2005).
- 35 Sadovnick, A. D., Ebers, G. C., Dyment, D. A. & Risch, N. J. Evidence for genetic basis of multiple sclerosis. The Canadian Collaborative Study Group. *Lancet (London, England)* **347**, 1728-1730 (1996).
- 36 Dyment, D. A., Ebers, G. C. & Sadovnick, A. D. Genetics of multiple sclerosis. *The Lancet. Neurology* **3**, 104-110 (2004).
- 37 Hansen, T. *et al.* Concordance for multiple sclerosis in Danish twins: an update of a nationwide study. *Multiple sclerosis (Houndmills, Basingstoke, England)* **11**, 504-510 (2005).
- 38 Willer, C. J., Dyment, D. A., Risch, N. J., Sadovnick, A. D. & Ebers, G. C. Twin concordance and sibling recurrence rates in multiple sclerosis. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**, 12877-12882 (2003).
- 39 Sadovnick, A. D. *et al.* A population-based study of multiple sclerosis in twins: update. *Annals of neurology* **33**, 281-285 (1993).
- 40 Jersild, C., Svejgaard, A. & Fog, T. HL-A antigens and multiple sclerosis. *Lancet (London, England)* **1**, 1240-1241 (1972).
- 41 Naito, S., Namerow, N., Mickey, M. R. & Terasaki, P. I. Multiple sclerosis: association with HL-A3. *Tissue Antigens* **2**, 1-4 (1972).
- 42 Olerup, O. & Hillert, J. HLA class II-associated genetic susceptibility in multiple sclerosis: a critical evaluation. *Tissue Antigens* **38**, 1-15 (1991).
- 43 Sospedra, M. & Martin, R. Immunology of multiple sclerosis. *Annu Rev Immunol* **23**, 683-747 (2005).
- 44 Barcellos, L. F. *et al.* Heterogeneity at the HLA-DRB1 locus and risk for multiple sclerosis. *Hum Mol Genet* **15**, 2813-2824 (2006).
- 45 Oksenberg, J. R. & Barcellos, L. F. Multiple sclerosis genetics: leaving no stone unturned. *Genes Immun* **6**, 375-387 (2005).

- 46 Sawcer, S. *et al.* Genetic risk and a primary role for cell-mediated immune mechanisms in multiple sclerosis. *Nature* **476**, 214-219 (2011).
- 47 Brynedal, B. *et al.* HLA-A confers an HLA-DRB1 independent influence on the risk of multiple sclerosis. *PLoS One* **2** (2007).
- 48 Harbo, H. F. *et al.* Genes in the HLA class I region may contribute to the HLA class II-associated genetic susceptibility to multiple sclerosis. *Tissue Antigens* **63**, 237-247 (2004).
- 49 Hafler, D. A. *et al.* Risk alleles for multiple sclerosis identified by a genomewide study. *The New England journal of medicine* **357**, 851-862 (2007).
- 50 *Refining genetic associations in multiple sclerosis.* (Lancet Neurol. 2008 Jul;7(7):567-9. doi: 10.1016/S1474-4422(08)70122-4.).
- 51 Maier, L. M. *et al.* Soluble IL-2RA levels in multiple sclerosis subjects and the effect of soluble IL-2RA on immune responses. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* **182**, 1541-1547 (2009).
- 52 Babron, M. C. *et al.* Determination of the real effect of genes identified in GWAS: the example of IL2RA in multiple sclerosis. *Eur J Hum Genet* **20**, 321-325 (2012).
- 53 Gregory, S. G. *et al.* Interleukin 7 receptor alpha chain (IL7R) shows allelic and functional association with multiple sclerosis. *Nat Genet* **39**, 1083-1091 (2007).
- 54 De Jager, P. L. *et al.* Meta-analysis of genome scans and replication identify CD6, IRF8 and TNFRSF1A as new multiple sclerosis susceptibility loci. *Nat Genet* **41**, 776-782 (2009).
- 55 Kofler, D. M., Severson, C. A., Mousissian, N., De Jager, P. L. & Hafler, D. A. The CD6 multiple sclerosis susceptibility allele is associated with alterations in CD4+ T cell proliferation. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* **187**, 3286-3291 (2011).
- 56 Couturier, N. *et al.* Tyrosine kinase 2 variant influences T lymphocyte polarization and multiple sclerosis susceptibility. *Brain* **134**, 693-703 (2011).
- 57 Ban, M. *et al.* Replication analysis identifies TYK2 as a multiple sclerosis susceptibility factor. *Eur J Hum Genet* **17**, 1309-1313 (2009).
- 58 Gregory, A. P. *et al.* TNF receptor 1 genetic risk mirrors outcome of anti-TNF therapy in multiple sclerosis. *Nature* **488**, 508-511 (2012).
- 59 Genome-wide association study identifies new multiple sclerosis susceptibility loci on chromosomes 12 and 20. *Nat Genet* **41**, 824-828 (2009).
- 60 Oksenberg, J. R., Baranzini, S. E., Sawcer, S. & Hauser, S. L. The genetics of multiple sclerosis: SNPs to pathways to pathogenesis. *Nat Rev Genet* **9**, 516-526 (2008).

- 61 Ramagopalan, S. V., Deluca, G. C., Degenhardt, A. & Ebers, G. C. The genetics of clinical outcome in multiple sclerosis. *Journal of neuroimmunology* **202**, 183-199 (2008).
- 62 Ramagopalan, S. V. *et al.* Rare variants in the CYP27B1 gene are associated with multiple sclerosis. *Annals of neurology* **70**, 881-886 (2011).
- 63 Pauley, K. M., Cha, S. & Chan, E. K. MicroRNA in autoimmunity and autoimmune diseases. *J Autoimmun* **32**, 189-194 (2009).
- 64 Du, C. *et al.* MicroRNA miR-326 regulates TH-17 differentiation and is associated with the pathogenesis of multiple sclerosis. *Nature immunology* **10**, 1252-1259 (2009).
- 65 Lindberg, R. L., Hoffmann, F., Mehling, M., Kuhle, J. & Kappos, L. Altered expression of miR-17-5p in CD4⁺ lymphocytes of relapsing-remitting multiple sclerosis patients. *Eur J Immunol* **40**, 888-898 (2010).
- 66 Paraboschi, E. M. *et al.* Genetic association and altered gene expression of mir-155 in multiple sclerosis patients. *Int J Mol Sci* **12**, 8695-8712 (2011).
- 67 Guerau-de-Arellano, M. *et al.* Micro-RNA dysregulation in multiple sclerosis favours pro-inflammatory T-cell-mediated autoimmunity. *Brain* **134**, 3578-3589 (2011).
- 68 Keller, A. *et al.* Multiple sclerosis: microRNA expression profiles accurately differentiate patients with relapsing-remitting disease from healthy controls. *PLoS One* **4**, 0007440 (2009).
- 69 Otaegui, D. *et al.* Differential micro RNA expression in PBMC from multiple sclerosis patients. *PLoS One* **4**, 0006309 (2009).
- 70 Liggett, T. *et al.* Methylation patterns of cell-free plasma DNA in relapsing-remitting multiple sclerosis. *J Neurol Sci* **290**, 16-21 (2010).
- 71 Bos, S. D. *et al.* Genome-wide DNA methylation profiles indicate CD8⁺ T cell hypermethylation in multiple sclerosis. *PLoS One* **10** (2015).
- 72 He, Y. *et al.* The transcription factor Yin Yang 1 is essential for oligodendrocyte progenitor differentiation. *Neuron* **55**, 217-230 (2007).
- 73 Shen, S. *et al.* Age-dependent epigenetic control of differentiation inhibitors is critical for remyelination efficiency. *Nat Neurosci* **11**, 1024-1034 (2008).
- 74 Pedre, X. *et al.* Changed histone acetylation patterns in normal-appearing white matter and early multiple sclerosis lesions. *J Neurosci* **31**, 3435-3445 (2011).
- 75 Marrie, R. A. Environmental risk factors in multiple sclerosis aetiology. *The Lancet. Neurology* **3**, 709-718 (2004).
- 76 Ascherio, A. & Munger, K. L. Environmental risk factors for multiple sclerosis. Part I: the role of infection. *Annals of neurology* **61**, 288-299 (2007).

- 77 Brahic, M. Multiple sclerosis and viruses. *Annals of neurology* **68**, 6-8 (2010).
- 78 Lindberg, C., Andersen, O., Vahlne, A., Dalton, M. & Runmarker, B. Epidemiological investigation of the association between infectious mononucleosis and multiple sclerosis. *Neuroepidemiology* **10**, 62-65 (1991).
- 79 Gustavsen, M. W. *et al.* Environmental exposures and the risk of multiple sclerosis investigated in a Norwegian case-control study. *BMC neurology* **14**, 014-0196 (2014).
- 80 Wandinger, K. *et al.* Association between clinical disease activity and Epstein-Barr virus reactivation in MS. *Neurology* **55**, 178-184 (2000).
- 81 Haahr, S. & Hollsberg, P. Multiple sclerosis is linked to Epstein-Barr virus infection. *Rev Med Virol* **16**, 297-310 (2006).
- 82 Cepok, S. *et al.* Identification of Epstein-Barr virus proteins as putative targets of the immune response in multiple sclerosis. *The Journal of clinical investigation* **115**, 1352-1360 (2005).
- 83 Levin, L. I. *et al.* Temporal relationship between elevation of epstein-barr virus antibody titers and initial onset of neurological symptoms in multiple sclerosis. *Jama* **293**, 2496-2500 (2005).
- 84 Castellazzi, M. *et al.* Epstein-Barr virus-specific antibody response in cerebrospinal fluid and serum of patients with multiple sclerosis. *Multiple sclerosis (Houndmills, Basingstoke, England)* **16**, 883-887 (2010).
- 85 Challoner, P. B. *et al.* Plaque-associated expression of human herpesvirus 6 in multiple sclerosis. *Proc Natl Acad Sci U S A* **92**, 7440-7444 (1995).
- 86 Friedman, J. E. *et al.* The association of the human herpesvirus-6 and MS. *Multiple sclerosis (Houndmills, Basingstoke, England)* **5**, 355-362 (1999).
- 87 Tejada-Simon, M. V. *et al.* Detection of viral DNA and immune responses to the human herpesvirus 6 101-kilodalton virion protein in patients with multiple sclerosis and in controls. *J Virol* **76**, 6147-6154 (2002).
- 88 Derfuss, T., Hohlfeld, R. & Meinl, E. Intrathecal antibody (IgG) production against human herpesvirus type 6 occurs in about 20% of multiple sclerosis patients and might be linked to a polyspecific B-cell response. *J Neurol* **252**, 968-971 (2005).
- 89 Virtanen, J. O. *et al.* Evidence for human herpesvirus 6 variant A antibodies in multiple sclerosis: diagnostic and therapeutic implications. *J Neurovirol* **13**, 347-352 (2007).
- 90 Alenda, R. *et al.* Identification of the major HHV-6 antigen recognized by cerebrospinal fluid IgG in multiple sclerosis. *European journal of neurology : the official journal of the European Federation of Neurological Societies* **21**, 1096-1101 (2014).

- 91 Pierrot-Deseilligny, C. & Souberbielle, J. C. Contribution of vitamin D insufficiency to the pathogenesis of multiple sclerosis. *Ther Adv Neurol Disord* **6**, 81-116 (2013).
- 92 Ascherio, A., Munger, K. L. & Simon, K. C. Vitamin D and multiple sclerosis. *The Lancet. Neurology* **9**, 599-612 (2010).
- 93 Simon, K. C., Munger, K. L. & Ascherio, A. Vitamin D and multiple sclerosis: epidemiology, immunology, and genetics. *Curr Opin Neurol* **25**, 246-251 (2012).
- 94 Handel, A. E. *et al.* Seasonality of admissions with multiple sclerosis in Scotland. *European journal of neurology : the official journal of the European Federation of Neurological Societies* **18**, 1109-1111 (2011).
- 95 Gelfand, J. M. *et al.* Vitamin D in African Americans with multiple sclerosis. *Neurology* **76**, 1824-1830 (2011).
- 96 Handel, A. E., Gillie, O. & Ramagopalan, S. V. Inequities in advice on vitamin D? *Qjm* **104**, 547-549 (2011).
- 97 Nieves, J., Cosman, F., Herbert, J., Shen, V. & Lindsay, R. High prevalence of vitamin D deficiency and reduced bone mass in multiple sclerosis. *Neurology* **44**, 1687-1692 (1994).
- 98 Correale, J., Ysrraelit, M. C. & Gaitan, M. I. Immunomodulatory effects of Vitamin D in multiple sclerosis. *Brain* **132**, 1146-1160 (2009).
- 99 Munger, K. L., Levin, L. I., Hollis, B. W., Howard, N. S. & Ascherio, A. Serum 25-hydroxyvitamin D levels and risk of multiple sclerosis. *Jama* **296**, 2832-2838 (2006).
- 100 Grau-Lopez, L. *et al.* Regulatory role of vitamin D in T-cell reactivity against myelin peptides in relapsing-remitting multiple sclerosis patients. *BMC neurology* **12**, 1471-2377 (2012).
- 101 Carlson, N. G. & Rose, J. W. Vitamin D as a clinical biomarker in multiple sclerosis. *Expert Opin Med Diagn* **7**, 231-242 (2013).
- 102 Simpson, S., Jr. *et al.* Higher 25-hydroxyvitamin D is associated with lower relapse risk in multiple sclerosis. *Annals of neurology* **68**, 193-203 (2010).
- 103 Smolders, J., Menheere, P., Kessels, A., Damoiseaux, J. & Hupperts, R. Association of vitamin D metabolite levels with relapse rate and disability in multiple sclerosis. *Multiple sclerosis (Houndmills, Basingstoke, England)* **14**, 1220-1224 (2008).
- 104 van der Mei, I. A. *et al.* Vitamin D levels in people with multiple sclerosis and community controls in Tasmania, Australia. *J Neurol* **254**, 581-590 (2007).
- 105 Shahbeigi, S. *et al.* Vitamin d3 concentration correlates with the severity of multiple sclerosis. *Int J Prev Med* **4**, 585-591 (2013).

- 106 Loken-Amsrud, K. I. *et al.* Vitamin D and disease activity in multiple sclerosis before and during interferon-beta treatment. *Neurology* **79**, 267-273 (2012).
- 107 Stewart, N. *et al.* Interferon-beta and serum 25-hydroxyvitamin D interact to modulate relapse risk in MS. *Neurology* **79**, 254-260 (2012).
- 108 Butterfield, D. A., Castegna, A., Drake, J., Scapagnini, G. & Calabrese, V. Vitamin E and neurodegenerative disorders associated with oxidative stress. *Nutr Neurosci* **5**, 229-239 (2002).
- 109 Garcia-Closas, R. *et al.* Dietary sources of vitamin C, vitamin E and specific carotenoids in Spain. *Br J Nutr* **91**, 1005-1011 (2004).
- 110 Smith, K. J., Kapoor, R. & Felts, P. A. Demyelination: the role of reactive oxygen and nitrogen species. *Brain pathology (Zurich, Switzerland)* **9**, 69-92 (1999).
- 111 Goudarzvand, M., Javan, M., Mirnajafi-Zadeh, J., Mozafari, S. & Tiraihi, T. Vitamins E and D3 attenuate demyelination and potentiate remyelination processes of hippocampal formation of rats following local injection of ethidium bromide. *Cell Mol Neurobiol* **30**, 289-299 (2010).
- 112 Torkildsen, O., Loken-Amsrud, K. I., Wergeland, S., Myhr, K. M. & Holmoy, T. Fat-soluble vitamins as disease modulators in multiple sclerosis. *Acta Neurol Scand Suppl* **196**, 16-23 (2013).
- 113 Mehindate, K. *et al.* Proinflammatory cytokines promote glial heme oxygenase-1 expression and mitochondrial iron deposition: implications for multiple sclerosis. *J Neurochem* **77**, 1386-1395 (2001).
- 114 Zhang, S. M. *et al.* Intakes of carotenoids, vitamin C, and vitamin E and MS risk among two large cohorts of women. *Neurology* **57**, 75-80 (2001).
- 115 Jimenez-Jimenez, F. J. *et al.* Cerebrospinal fluid levels of alpha-tocopherol in patients with multiple sclerosis. *Neurosci Lett* **249**, 65-67 (1998).
- 116 Besler, H. T., Comoglu, S. & Okcu, Z. Serum levels of antioxidant vitamins and lipid peroxidation in multiple sclerosis. *Nutr Neurosci* **5**, 215-220 (2002).
- 117 Salemi, G. *et al.* Blood lipids, homocysteine, stress factors, and vitamins in clinically stable multiple sclerosis patients. *Lipids Health Dis* **9**, 9-19 (2010).
- 118 Besler, H. T. & Comoglu, S. Lipoprotein oxidation, plasma total antioxidant capacity and homocysteine level in patients with multiple sclerosis. *Nutr Neurosci* **6**, 189-196 (2003).
- 119 Karg, E. *et al.* Nonenzymatic antioxidants of blood in multiple sclerosis. *J Neurol* **246**, 533-539 (1999).
- 120 Mora, J. R., Iwata, M. & von Andrian, U. H. Vitamin effects on the immune system: vitamins A and D take centre stage. *Nature reviews. Immunology* **8**, 685-698 (2008).

- 121 Kim, C. H. Retinoic acid, immunity, and inflammation. *Vitam Horm* **86**, 83-101 (2011).
- 122 Ross, C. *et al.* Immunogenicity of interferon-beta in multiple sclerosis patients: influence of preparation, dosage, dose frequency, and route of administration. Danish Multiple Sclerosis Study Group. *Annals of neurology* **48**, 706-712 (2000).
- 123 Mey, J. & McCaffery, P. Retinoic acid signaling in the nervous system of adult vertebrates. *Neuroscientist* **10**, 409-421 (2004).
- 124 Shearer, K. D., Stoney, P. N., Morgan, P. J. & McCaffery, P. J. A vitamin for the brain. *Trends Neurosci* **35**, 733-741 (2012).
- 125 Filippi, M., Preziosa, P. & Rocca, M. A. Vitamin A: yet another player in multiple sclerosis pathogenesis? *Expert Rev Clin Immunol* **9**, 113-115 (2013).
- 126 Loken-Amsrud, K. I. *et al.* Retinol levels are associated with magnetic resonance imaging outcomes in multiple sclerosis. *Multiple sclerosis (Houndmills, Basingstoke, England)* **19**, 451-457 (2013).
- 127 Dawson, H. D. *et al.* Direct and indirect effects of retinoic acid on human Th2 cytokine and chemokine expression by human T lymphocytes. *BMC Immunol* **7**, 27 (2006).
- 128 Stephensen, C. B. *et al.* Vitamin A enhances in vitro Th2 development via retinoid X receptor pathway. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* **168**, 4495-4503 (2002).
- 129 Xu, J. & Drew, P. D. 9-Cis-retinoic acid suppresses inflammatory responses of microglia and astrocytes. *Journal of neuroimmunology* **171**, 135-144 (2006).
- 130 Royal, W., 3rd, Gartner, S. & Gajewski, C. D. Retinol measurements and retinoid receptor gene expression in patients with multiple sclerosis. *Multiple sclerosis (Houndmills, Basingstoke, England)* **8**, 452-458 (2002).
- 131 Qu, Z. X., Dayal, A., Jensen, M. A. & Arnason, B. G. All-trans retinoic acid potentiates the ability of interferon beta-1b to augment suppressor cell function in multiple sclerosis. *Archives of neurology* **55**, 315-321 (1998).
- 132 Cantorna, M. T., Nashold, F. E., Chun, T. Y. & Hayes, C. E. Vitamin A down-regulation of IFN-gamma synthesis in cloned mouse Th1 lymphocytes depends on the CD28 costimulatory pathway. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* **156**, 2674-2679 (1996).
- 133 Lovett-Racke, A. E. & Racke, M. K. Retinoic acid promotes the development of Th2-like human myelin basic protein-reactive T cells. *Cell Immunol* **215**, 54-60 (2002).
- 134 Cantorna, M. T., Nashold, F. E. & Hayes, C. E. Vitamin A deficiency results in a priming environment conducive for Th1 cell development. *Eur J Immunol* **25**, 1673-1679 (1995).

- 135 Arnson, Y., Shoenfeld, Y. & Amital, H. Effects of tobacco smoke on immunity, inflammation and autoimmunity. *J Autoimmun* **34**, 29 (2010).
- 136 Salzer, J. *et al.* Smoking as a risk factor for multiple sclerosis. *Multiple sclerosis (Houndmills, Basingstoke, England)* **19**, 1022-1027 (2013).
- 137 Hawkes, C. H. Smoking is a risk factor for multiple sclerosis: a metanalysis. *Multiple sclerosis (Houndmills, Basingstoke, England)* **13**, 610-615 (2007).
- 138 Hernan, M. A., Olek, M. J. & Ascherio, A. Cigarette smoking and incidence of multiple sclerosis. *Am J Epidemiol* **154**, 69-74 (2001).
- 139 Hedstrom, A. K., Hillert, J., Olsson, T. & Alfredsson, L. Smoking and multiple sclerosis susceptibility. *Eur J Epidemiol* **28**, 867-874 (2013).
- 140 Di Pauli, F. *et al.* Smoking is a risk factor for early conversion to clinically definite multiple sclerosis. *Multiple sclerosis (Houndmills, Basingstoke, England)* **14**, 1026-1030 (2008).
- 141 Sundstrom, P. & Nystrom, L. Smoking worsens the prognosis in multiple sclerosis. *Multiple sclerosis (Houndmills, Basingstoke, England)* **14**, 1031-1035 (2008).
- 142 Zivadinov, R. *et al.* Smoking is associated with increased lesion volumes and brain atrophy in multiple sclerosis. *Neurology* **73**, 504-510 (2009).
- 143 Kavak, K. S., Teter, B. E., Hagemeyer, J., Zakalik, K. & Weinstock-Guttman, B. Higher weight in adolescence and young adulthood is associated with an earlier age at multiple sclerosis onset. *Multiple sclerosis (Houndmills, Basingstoke, England)* **21**, 858-865 (2015).
- 144 Wesnes, K. *et al.* Body size and the risk of multiple sclerosis in Norway and Italy: the EnvIMS study. *Multiple sclerosis (Houndmills, Basingstoke, England)* **21**, 388-395 (2015).
- 145 Munger, K. L. *Childhood obesity is a risk factor for multiple sclerosis.* (Mult Scler. 2013 Nov;19(13):1800. doi: 10.1177/1352458513507357. Epub 2013 Sep 26.).
- 146 Farez, M. F., Fiol, M. P., Gaitan, M. I., Quintana, F. J. & Correale, J. Sodium intake is associated with increased disease activity in multiple sclerosis. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* **86**, 26-31 (2015).
- 147 Confavreux, C., Aimard, G. & Devic, M. Course and prognosis of multiple sclerosis assessed by the computerized data processing of 349 patients. *Brain* **103**, 281-300 (1980).
- 148 Hader, W. J., Elliot, M. & Ebers, G. C. Epidemiology of multiple sclerosis in London and Middlesex County, Ontario, Canada. *Neurology* **38**, 617-621 (1988).

- 149 Thompson, A. J. *et al.* Primary progressive multiple sclerosis. *Brain* **120**, 1085-1096 (1997).
- 150 Lublin, F. D. New multiple sclerosis phenotypic classification. *Eur Neurol* **1**, 1-5 (2014).
- 151 Scolding, N. The differential diagnosis of multiple sclerosis. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* **71**, ii9-15 (2001).
- 152 Barkhof, F. *et al.* Relapsing-remitting multiple sclerosis: sequential enhanced MR imaging vs clinical findings in determining disease activity. *AJR Am J Roentgenol* **159**, 1041-1047 (1992).
- 153 Compston, A. & Coles, A. Multiple sclerosis. *Lancet (London, England)* **372**, 1502-1517 (2008).
- 154 Nuwer, M. Potenciales evocados en la escleros múltiple. In: Raine C, McFarland H, Tourtellote WW, eds. *Esclerosis múltiple. Bases clínicas y patológicas*, 43-45 (1997).
- 155 Reiber, H. [Calculation of the IgG fraction of cerebrospinal fluid locally synthesized in the central nervous system (author's transl)]. *J Clin Chem Clin Biochem* **17**, 587-591 (1979).
- 156 Link, H. & Tibbling, G. Principles of albumin and IgG analyses in neurological disorders. III. Evaluation of IgG synthesis within the central nervous system in multiple sclerosis. *Scand J Clin Lab Invest* **37**, 397-401 (1977).
- 157 Villar, L. M. *et al.* Early differential diagnosis of multiple sclerosis using a new oligoclonal band test. *Archives of neurology* **62**, 574-577, doi:10.1001/archneur.62.4.574 (2005).
- 158 Kaiser, R. & Lucking, C. H. Intrathecal synthesis of IgM and IgA in neurological diseases: comparison of two formulae with isoelectric focusing. *Clinica chimica acta; international journal of clinical chemistry* **216**, 39-51 (1993).
- 159 Sharief, M. K., Keir, G. & Thompson, E. J. Intrathecal synthesis of IgM in neurological diseases: a comparison between detection of oligoclonal bands and quantitative estimation. *J Neurol Sci* **96**, 131-142 (1990).
- 160 Villar, L. M. *et al.* A sensitive and reproducible method for the detection of oligoclonal IgM bands. *J Immunol Methods* **258**, 151-155 (2001).
- 161 Villar, L. M. *et al.* Intrathecal IgM synthesis in neurologic diseases: relationship with disability in MS. *Neurology* **58**, 824-826 (2002).
- 162 Villar, L. M. *et al.* Intrathecal IgM synthesis is a prognostic factor in multiple sclerosis. *Annals of neurology* **53**, 222-226 (2003).

- 163 Villar, L. M. *et al.* Intrathecal synthesis of oligoclonal IgM against myelin lipids predicts an aggressive disease course in MS. *The Journal of clinical investigation* **115**, 187-194, doi:10.1172/jci22833 (2005).
- 164 Mandrioli, J., Sola, P., Bedin, R., Gambini, M. & Merelli, E. A multifactorial prognostic index in multiple sclerosis. Cerebrospinal fluid IgM oligoclonal bands and clinical features to predict the evolution of the disease. *J Neurol* **255**, 1023-1031 (2008).
- 165 van der Maesen, K., Hinojoza, J. R. & Sobel, R. A. Endothelial cell class II major histocompatibility complex molecule expression in stereotactic brain biopsies of patients with acute inflammatory/demyelinating conditions. *J Neuropathol Exp Neurol* **58**, 346-358 (1999).
- 166 Lassmann, H., Bruck, W. & Lucchinetti, C. F. The immunopathology of multiple sclerosis: an overview. *Brain pathology (Zurich, Switzerland)* **17**, 210-218, doi:10.1111/j.1750-3639.2007.00064.x (2007).
- 167 Villar, L. M. *et al.* Cerebrospinal fluid immunological biomarkers associated with axonal damage in multiple sclerosis. *European journal of neurology : the official journal of the European Federation of Neurological Societies*, doi:10.1111/ene.12579 (2014).
- 168 Quintana, F. J. *et al.* Epitope spreading as an early pathogenic event in pediatric multiple sclerosis. *Neurology* **83**, 2219-2226, doi:10.1212/wnl.0000000000001066 (2014).
- 169 Lucchinetti, C. F. *et al.* Inflammatory cortical demyelination in early multiple sclerosis. *The New England journal of medicine* **365**, 2188-2197, doi:10.1056/NEJMoa1100648 (2011).
- 170 Aslam, M. *et al.* The antibody response to oligodendrocyte specific protein in multiple sclerosis. *Journal of neuroimmunology* **221**, 81-86, doi:10.1016/j.jneuroim.2010.02.008 (2010).
- 171 Chan, A. *et al.* Serum antibodies to conformational and linear epitopes of myelin oligodendrocyte glycoprotein are not elevated in the preclinical phase of multiple sclerosis. *Multiple sclerosis (Houndmills, Basingstoke, England)* **16**, 1189-1192, doi:10.1177/1352458510376406 (2010).
- 172 Quintana, F. J. & Cohen, I. R. The HSP60 immune system network. *Trends in immunology* **32**, 89-95, doi:10.1016/j.it.2010.11.001 (2011).
- 173 Yeste, A. & Quintana, F. J. Antigen microarrays for the study of autoimmune diseases. *Clinical chemistry* **59**, 1036-1044, doi:10.1373/clinchem.2012.194423 (2013).
- 174 Dhaunchak, A. S. *et al.* Implication of perturbed axoglial apparatus in early pediatric multiple sclerosis. *Annals of neurology* **71**, 601-613, doi:10.1002/ana.22693 (2012).

- 175 Villar, L. M. *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* **77**, 447-457, doi:10.1002/ana.24345 (2015).
- 176 Espino, M. *et al.* Assessment of the reproducibility of oligoclonal IgM band detection for its application in daily clinical practice. *Clinica chimica acta; international journal of clinical chemistry* **438**, 67-69, doi:10.1016/j.cca.2014.08.004 (2015).
- 177 Mathey, E. K. *et al.* Neurofascin as a novel target for autoantibody-mediated axonal injury. *The Journal of experimental medicine* **204**, 2363-2372 (2007).
- 178 Srivastava, R. *et al.* Potassium channel KIR4.1 as an immune target in multiple sclerosis. *The New England journal of medicine* **367**, 115-123, doi:10.1056/NEJMoa1110740 (2012).
- 179 Quintana, F. J., Yeste, A., Weiner, H. L. & Covacu, R. Lipids and lipid-reactive antibodies as biomarkers for multiple sclerosis. *Journal of neuroimmunology* **248**, 53-57, doi:10.1016/j.jneuroim.2012.01.002 (2012).
- 180 Zamvil, S. *et al.* T-cell clones specific for myelin basic protein induce chronic relapsing paralysis and demyelination. *Nature* **317**, 355-358 (1985).
- 181 Pettinelli, C. B. & McFarlin, D. E. Adoptive transfer of experimental allergic encephalomyelitis in SJL/J mice after in vitro activation of lymph node cells by myelin basic protein: requirement for Lyt 1+ 2- T lymphocytes. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* **127**, 1420-1423 (1981).
- 182 Zamvil, S. S. & Steinman, L. The T lymphocyte in experimental allergic encephalomyelitis. *Annu Rev Immunol* **8**, 579-621 (1990).
- 183 Salou, M. *et al.* Expanded CD8 T-cell sharing between periphery and CNS in multiple sclerosis. *Annals of clinical and translational neurology* **2**, 609-622, doi:10.1002/acn3.199 (2015).
- 184 Ota, K. *et al.* T-cell recognition of an immunodominant myelin basic protein epitope in multiple sclerosis. *Nature* **346**, 183-187 (1990).
- 185 Pette, M. *et al.* Myelin basic protein-specific T lymphocyte lines from MS patients and healthy individuals. *Neurology* **40**, 1770-1776 (1990).
- 186 Voskuhl, R. R. *et al.* T helper 1 (Th1) functional phenotype of human myelin basic protein-specific T lymphocytes. *Autoimmunity* **15**, 137-143 (1993).
- 187 Edwards, L. J., Robins, R. A. & Constantinescu, C. S. Th17/Th1 phenotype in demyelinating disease. *Cytokine* **50**, 19-23 (2010).
- 188 Kebir, H. *et al.* Preferential recruitment of interferon-gamma-expressing TH17 cells in multiple sclerosis. *Annals of neurology* **66**, 390-402 (2009).

- 189 Tesmer, L. A., Lundy, S. K., Sarkar, S. & Fox, D. A. Th17 cells in human disease. *Immunol Rev* **223**, 87-113 (2008).
- 190 Shabgah, A. G., Fattahi, E. & Shahneh, F. Z. Interleukin-17 in human inflammatory diseases. *Postepy Dermatol Alergol* **31**, 256-261 (2014).
- 191 Komiyama, Y. *et al.* IL-17 plays an important role in the development of experimental autoimmune encephalomyelitis. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* **177**, 566-573 (2006).
- 192 Aranami, T. & Yamamura, T. Th17 Cells and autoimmune encephalomyelitis (EAE/MS). *Allergol Int* **57**, 115-120 (2008).
- 193 Kebir, H. *et al.* Human TH17 lymphocytes promote blood-brain barrier disruption and central nervous system inflammation. *Nat Med* **13**, 1173-1175 (2007).
- 194 Codarri, L. *et al.* ROR γ drives production of the cytokine GM-CSF in helper T cells, which is essential for the effector phase of autoimmune neuroinflammation. *Nature immunology* **12**, 560-567, doi:10.1038/ni.2027 (2011).
- 195 Rasouli, J. *et al.* Expression of GM-CSF in T Cells Is Increased in Multiple Sclerosis and Suppressed by IFN-beta Therapy. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* **194**, 5085-5093, doi:10.4049/jimmunol.1403243 (2015).
- 196 Miyara, M. *et al.* Functional delineation and differentiation dynamics of human CD4⁺ T cells expressing the FoxP3 transcription factor. *Immunity* **30**, 899-911 (2009).
- 197 Miyara, M. *et al.* Human FoxP3⁺ regulatory T cells in systemic autoimmune diseases. *Autoimmun Rev* **10**, 744-755 (2011).
- 198 Miyara, M. & Sakaguchi, S. Human FoxP3(+)CD4(+) regulatory T cells: their knowns and unknowns. *Immunol Cell Biol* **89**, 346-351 (2011).
- 199 Viglietta, V., Baecher-Allan, C., Weiner, H. L. & Hafler, D. A. Loss of functional suppression by CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells in patients with multiple sclerosis. *The Journal of experimental medicine* **199**, 971-979 (2004).
- 200 Haas, J. *et al.* Reduced suppressive effect of CD4⁺CD25^{high} regulatory T cells on the T cell immune response against myelin oligodendrocyte glycoprotein in patients with multiple sclerosis. *Eur J Immunol* **35**, 3343-3352 (2005).
- 201 Venken, 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. *J Neurosci Res* **83**, 1432-1446 (2006).
- 202 Frisullo, G. *et al.* Regulatory T cells fail to suppress CD4⁺T⁺-bet⁺ T cells in relapsing multiple sclerosis patients. *Immunology* **127**, 418-428 (2009).

- 203 Namdar, A., Nikbin, B., Ghabaee, M., Bayati, A. & Izad, M. Effect of IFN-beta therapy on the frequency and function of CD4(+)CD25(+) regulatory T cells and Foxp3 gene expression in relapsing-remitting multiple sclerosis (RRMS): a preliminary study. *Journal of neuroimmunology* **218**, 120-124 (2010).
- 204 Knippenberg, S. *et al.* Reduction in IL-10 producing B cells (Breg) in multiple sclerosis is accompanied by a reduced naive/memory Breg ratio during a relapse but not in remission. *Journal of neuroimmunology* **239**, 80-86 (2011).
- 205 Huang, H., Ito, K., Dangond, F. & Dhib-Jalbut, S. Effect of interferon beta-1a on B7.1 and B7.2 B-cell expression and its impact on T-cell proliferation. *Journal of neuroimmunology* **258**, 27-31 (2013).
- 206 Ramgolam, V. S. *et al.* B cells as a therapeutic target for IFN-beta in relapsing-remitting multiple sclerosis. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* **186**, 4518-4526 (2011).
- 207 Vandenbark, A. A. *et al.* Interferon-beta-1a treatment increases CD56bright natural killer cells and CD4+CD25+ Foxp3 expression in subjects with multiple sclerosis. *Journal of neuroimmunology* **215**, 125-128 (2009).
- 208 Chen, M. *et al.* IFN-beta induces the proliferation of CD4+CD25+Foxp3+ regulatory T cells through upregulation of GITRL on dendritic cells in the treatment of multiple sclerosis. *Journal of neuroimmunology* **242**, 39-46 (2012).
- 209 Venken, K. *et al.* Natural naive CD4+CD25+CD127low regulatory T cell (Treg) development and function are disturbed in multiple sclerosis patients: recovery of memory Treg homeostasis during disease progression. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* **180**, 6411-6420 (2008).
- 210 Hauser, S. L. *et al.* Immunohistochemical analysis of the cellular infiltrate in multiple sclerosis lesions. *Annals of neurology* **19**, 578-587 (1986).
- 211 Bitsch, A., Schuchardt, J., Bunkowski, S., Kuhlmann, T. & Bruck, W. Acute axonal injury in multiple sclerosis. Correlation with demyelination and inflammation. *Brain* **123**, 1174-1183 (2000).
- 212 Kuhlmann, T., Lingfeld, G., Bitsch, A., Schuchardt, J. & Bruck, W. Acute axonal damage in multiple sclerosis is most extensive in early disease stages and decreases over time. *Brain* **125**, 2202-2212 (2002).
- 213 Hoftberger, R. *et al.* Expression of major histocompatibility complex class I molecules on the different cell types in multiple sclerosis lesions. *Brain pathology (Zurich, Switzerland)* **14**, 43-50 (2004).
- 214 Babbe, H. *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* **192**, 393-404 (2000).
- 215 Melzer, N., Meuth, S. G. & Wiendl, H. CD8+ T cells and neuronal damage: direct and collateral mechanisms of cytotoxicity and impaired electrical

- excitability. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* **23**, 3659-3673, doi:10.1096/fj.09-136200 (2009).
- 216 Skulina, C. *et al.* Multiple sclerosis: brain-infiltrating CD8⁺ T cells persist as clonal expansions in the cerebrospinal fluid and blood. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**, 2428-2433 (2004).
- 217 Kagan, B. L., Baldwin, R. L., Munoz, D. & Wisnieski, B. J. Formation of ion-permeable channels by tumor necrosis factor-alpha. *Science (New York, N.Y.)* **255**, 1427-1430 (1992).
- 218 Venters, H. D., Dantzer, R. & Kelley, K. W. Tumor necrosis factor-alpha induces neuronal death by silencing survival signals generated by the type I insulin-like growth factor receptor. *Annals of the New York Academy of Sciences* **917**, 210-220 (2000).
- 219 Jurewicz, A., Biddison, W. E. & Antel, J. P. MHC class I-restricted lysis of human oligodendrocytes by myelin basic protein peptide-specific CD8 T lymphocytes. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* **160**, 3056-3059 (1998).
- 220 Medana, I. M. *et al.* MHC class I-restricted killing of neurons by virus-specific CD8⁺ T lymphocytes is effected through the Fas/FasL, but not the perforin pathway. *Eur J Immunol* **30**, 3623-3633 (2000).
- 221 Giuliani, F., Goodyer, C. G., Antel, J. P. & Yong, V. W. Vulnerability of human neurons to T cell-mediated cytotoxicity. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* **171**, 368-379 (2003).
- 222 Correale, J. & Villa, A. Isolation and characterization of CD8⁺ regulatory T cells in multiple sclerosis. *Journal of neuroimmunology* **195**, 121-134 (2008).
- 223 Cunnusamy, K. *et al.* Disease exacerbation of multiple sclerosis is characterized by loss of terminally differentiated autoregulatory CD8⁺ T cells. *Clinical immunology (Orlando, Fla.)* **152**, 115-126 (2014).
- 224 Johnson, K. P., Arrigo, S. C., Nelson, B. J. & Ginsberg, A. Agarose electrophoresis of cerebrospinal fluid in multiple sclerosis. A simplified method for demonstrating cerebrospinal fluid oligoclonal immunoglobulin bands. *Neurology* **27**, 273-277 (1977).
- 225 Villar, L. M. *et al.* Immunoglobulin M oligoclonal bands: biomarker of targetable inflammation in primary progressive multiple sclerosis. *Annals of neurology* **76**, 231-240, doi:10.1002/ana.24190 (2014).
- 226 Villar, L. *et al.* Influence of oligoclonal IgM specificity in multiple sclerosis disease course. *Multiple sclerosis (Houndmills, Basingstoke, England)* **14**, 183-187 (2008).

- 227 Thangarajh, M. *et al.* Lipid-specific immunoglobulin M in CSF predicts adverse long-term outcome in multiple sclerosis. *Multiple sclerosis (Houndmills, Basingstoke, England)* **14**, 1208-1213 (2008).
- 228 Magraner, M. J. *et al.* Brain atrophy and lesion load are related to CSF lipid-specific IgM oligoclonal bands in clinically isolated syndromes. *Neuroradiology* **54**, 5-12 (2012).
- 229 Joseph, F. G. *et al.* CSF oligoclonal band status informs prognosis in multiple sclerosis: a case control study of 100 patients. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* **80**, 292-296 (2009).
- 230 Imrell, K., Greiner, E., Hillert, J. & Masterman, T. HLA-DRB115 and cerebrospinal-fluid-specific oligoclonal immunoglobulin G bands lower age at attainment of important disease milestones in multiple sclerosis. *Journal of neuroimmunology* **210**, 128-130 (2009).
- 231 Sadaba, M. C. *et al.* Axonal and oligodendrocyte-localized IgM and IgG deposits in MS lesions. *Journal of neuroimmunology* **247**, 86-94, doi:10.1016/j.jneuroim.2012.03.020 (2012).
- 232 Hauser, S. L. *et al.* B-cell depletion with rituximab in relapsing-remitting multiple sclerosis. *The New England journal of medicine* **358**, 676-688 (2008).
- 233 Meinl, E., Krumbholz, M. & Hohlfeld, R. B lineage cells in the inflammatory central nervous system environment: migration, maintenance, local antibody production, and therapeutic modulation. *Annals of neurology* **59**, 880-892 (2006).
- 234 Hoglund, R. A. & Maghazachi, A. A. Multiple sclerosis and the role of immune cells. *World J Exp Med* **4**, 27-37 (2014).
- 235 Prineas, J. W. & Wright, R. G. Macrophages, lymphocytes, and plasma cells in the perivascular compartment in chronic multiple sclerosis. *Lab Invest* **38**, 409-421 (1978).
- 236 Esiri, M. M. Immunoglobulin-containing cells in multiple-sclerosis plaques. *Lancet (London, England)* **2**, 478 (1977).
- 237 Ozawa, K. *et al.* Patterns of oligodendroglia pathology in multiple sclerosis. *Brain* **117**, 1311-1322 (1994).
- 238 Magliozzi, R. *et al.* Meningeal B-cell follicles in secondary progressive multiple sclerosis associate with early onset of disease and severe cortical pathology. *Brain* **130**, 1089-1104 (2007).
- 239 Serafini, B., Rosicarelli, B., Magliozzi, R., Stigliano, E. & Aloisi, F. Detection of ectopic B-cell follicles with germinal centers in the meninges of patients with secondary progressive multiple sclerosis. *Brain pathology (Zurich, Switzerland)* **14**, 164-174 (2004).

- 240 Roxanis, I., Micklem, K., McConville, J., Newsom-Davis, J. & Willcox, N. Thymic myoid cells and germinal center formation in myasthenia gravis; possible roles in pathogenesis. *Journal of neuroimmunology* **125**, 185-197 (2002).
- 241 Salomonsson, S. *et al.* Cellular basis of ectopic germinal center formation and autoantibody production in the target organ of patients with Sjogren's syndrome. *Arthritis Rheum* **48**, 3187-3201 (2003).
- 242 Armengol, M. P. *et al.* Thyroid autoimmune disease: demonstration of thyroid antigen-specific B cells and recombination-activating gene expression in chemokine-containing active intrathyroidal germinal centers. *Am J Pathol* **159**, 861-873 (2001).
- 243 Randen, I., Mellbye, O. J., Forre, O. & Natvig, J. B. The identification of germinal centres and follicular dendritic cell networks in rheumatoid synovial tissue. *Scand J Immunol* **41**, 481-486 (1995).
- 244 Villar, L. M. *et al.* Immunological mechanisms that associate with oligoclonal IgM band synthesis in multiple sclerosis. *Clinical immunology (Orlando, Fla.)* **137**, 51-59, doi:10.1016/j.clim.2010.06.007 (2010).
- 245 Cepok, S. *et al.* Patterns of cerebrospinal fluid pathology correlate with disease progression in multiple sclerosis. *Brain* **124**, 2169-2176 (2001).
- 246 Cepok, S. *et al.* Short-lived plasma blasts are the main B cell effector subset during the course of multiple sclerosis. *Brain* **128**, 1667-1676 (2005).
- 247 Corcione, A. *et al.* Recapitulation of B cell differentiation in the central nervous system of patients with multiple sclerosis. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**, 11064-11069 (2004).
- 248 Kuenz, B. *et al.* Cerebrospinal fluid B cells correlate with early brain inflammation in multiple sclerosis. *PLoS One* **3**, 0002559 (2008).
- 249 Wings, K. M. *et al.* Analysis of multiple sclerosis cerebrospinal fluid reveals a continuum of clonally related antibody-secreting cells that are predominantly plasma blasts. *Journal of neuroimmunology* **192**, 226-234 (2007).
- 250 Harp, C. T., Lovett-Racke, A. E., Racke, M. K., Frohman, E. M. & Monson, N. L. Impact of myelin-specific antigen presenting B cells on T cell activation in multiple sclerosis. *Clinical immunology (Orlando, Fla.)* **128**, 382-391 (2008).
- 251 Duddy, M. *et al.* Distinct effector cytokine profiles of memory and naive human B cell subsets and implication in multiple sclerosis. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* **178**, 6092-6099 (2007).
- 252 Correale, J. & Equiza, T. R. Regulatory B cells, helminths, and multiple sclerosis. *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)* **1190**, 257-269, doi:10.1007/978-1-4939-1161-5_18 (2014).

- 253 Berland, R. & Wortis, H. H. Origins and functions of B-1 cells with notes on the role of CD5. *Annu Rev Immunol* **20**, 253-300 (2002).
- 254 Casali, P. & Schettino, E. W. Structure and function of natural antibodies. *Curr Top Microbiol Immunol* **210**, 167-179 (1996).
- 255 Correale, J. *et al.* CD5+ B cells and CD4-8-T cells in neuroimmunological diseases. *Journal of neuroimmunology* **32**, 123-132 (1991).
- 256 Sampalo, A. *et al.* CD5+ B lymphocytes in HIV infection: relationship to immunological progression of disease. *Clin Immunol Immunopathol* **66**, 260-268 (1993).
- 257 Curry, M. P. *et al.* Expansion of peripheral blood CD5+ B cells is associated with mild disease in chronic hepatitis C virus infection. *J Hepatol* **32**, 121-125 (2000).
- 258 Pers, J. O., Jamin, C., Predine-Hug, F., Lydyard, P. & Youinou, P. The role of CD5-expressing B cells in health and disease (review). *Int J Mol Med* **3**, 239-245 (1999).
- 259 Seidi, O. A., Semra, Y. K. & Sharief, M. K. Expression of CD5 on B lymphocytes correlates with disease activity in patients with multiple sclerosis. *Journal of neuroimmunology* **133**, 205-210 (2002).
- 260 Villar, L. M. *et al.* Increased peripheral blood CD5+ B cells predict earlier conversion to MS in high-risk clinically isolated syndromes. *Multiple sclerosis (Houndmills, Basingstoke, England)* **17**, 690-694, doi:10.1177/1352458510396922 (2011).
- 261 Gerosa, F. *et al.* Reciprocal activating interaction between natural killer cells and dendritic cells. *The Journal of experimental medicine* **195**, 327-333 (2002).
- 262 Zingoni, A. *et al.* Cross-talk between activated human NK cells and CD4+ T cells via OX40-OX40 ligand interactions. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* **173**, 3716-3724 (2004).
- 263 Kim, H. S., Das, A., Gross, C. C., Bryceson, Y. T. & Long, E. O. Synergistic signals for natural cytotoxicity are required to overcome inhibition by c-Cbl ubiquitin ligase. *Immunity* **32**, 175-186 (2010).
- 264 Das, A. & Long, E. O. Lytic granule polarization, rather than degranulation, is the preferred target of inhibitory receptors in NK cells. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* **185**, 4698-4704 (2010).
- 265 Fauriat, C., Long, E. O., Ljunggren, H. G. & Bryceson, Y. T. Regulation of human NK-cell cytokine and chemokine production by target cell recognition. *Blood* **115**, 2167-2176 (2010).
- 266 De Jager, P. L. *et al.* Cytometric profiling in multiple sclerosis uncovers patient population structure and a reduction of CD8low cells. *Brain* **131**, 1701-1711 (2008).

- 267 Bielekova, B. Daclizumab therapy for multiple sclerosis. *Neurotherapeutics* **10**, 55-67 (2013).
- 268 Kastrukoff, L. F. *et al.* Natural killer cells in relapsing-remitting MS: effect of treatment with interferon beta-1B. *Neurology* **52**, 351-359 (1999).
- 269 Zhang, B., Yamamura, T., Kondo, T., Fujiwara, M. & Tabira, T. Regulation of experimental autoimmune encephalomyelitis by natural killer (NK) cells. *The Journal of experimental medicine* **186**, 1677-1687 (1997).
- 270 Rodriguez-Martin, E. *et al.* Natural killer cell subsets in cerebrospinal fluid of patients with multiple sclerosis. *Clinical and experimental immunology* **180**, 243-249, doi:10.1111/cei.12580 (2015).
- 271 Takahashi, K., Aranami, T., Endoh, M., Miyake, S. & Yamamura, T. The regulatory role of natural killer cells in multiple sclerosis. *Brain* **127**, 1917-1927 (2004).
- 272 Xu, W., Fazekas, G., Hara, H. & Tabira, T. Mechanism of natural killer (NK) cell regulatory role in experimental autoimmune encephalomyelitis. *Journal of neuroimmunology* **163**, 24-30 (2005).
- 273 Rabinovich, B. A. *et al.* Activated, but not resting, T cells can be recognized and killed by syngeneic NK cells. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* **170**, 3572-3576 (2003).
- 274 Saraste, M., Irjala, H. & Airas, L. Expansion of CD56Bright natural killer cells in the peripheral blood of multiple sclerosis patients treated with interferon-beta. *Neurol Sci* **28**, 121-126 (2007).
- 275 Peterson, J. W., Bo, L., Mork, S., Chang, A. & Trapp, B. D. Transected neurites, apoptotic neurons, and reduced inflammation in cortical multiple sclerosis lesions. *Annals of neurology* **50**, 389-400 (2001).
- 276 Singh, S. *et al.* Microglial nodules in early multiple sclerosis white matter are associated with degenerating axons. *Acta neuropathologica* **125**, 595-608, doi:10.1007/s00401-013-1082-0 (2013).
- 277 Farez, M. F. *et al.* Toll-like receptor 2 and poly(ADP-ribose) polymerase 1 promote central nervous system neuroinflammation in progressive EAE. *Nature immunology* **10**, 958-964, doi:10.1038/ni.1775 (2009).
- 278 O'Keefe, G. M., Nguyen, V. T. & Benveniste, E. N. Regulation and function of class II major histocompatibility complex, CD40, and B7 expression in macrophages and microglia: Implications in neurological diseases. *J Neurovirol* **8**, 496-512 (2002).
- 279 Raivich, G. & Banati, R. Brain microglia and blood-derived macrophages: molecular profiles and functional roles in multiple sclerosis and animal models of autoimmune demyelinating disease. *Brain Res Brain Res Rev* **46**, 261-281 (2004).

- 280 Goldmann, T. & Prinz, M. Role of microglia in CNS autoimmunity. *Clinical & developmental immunology* **2013**, 208093, doi:10.1155/2013/208093 (2013).
- 281 Sierra-Filardi, E. *et al.* Activin A skews macrophage polarization by promoting a proinflammatory phenotype and inhibiting the acquisition of anti-inflammatory macrophage markers. *Blood* **117**, 5092-5101 (2011).
- 282 Takagi, K. *et al.* Activation of the activin A-ALK-Smad pathway in systemic sclerosis. *J Autoimmun* **36**, 181-188 (2011).
- 283 Phillips, D. J., de Kretser, D. M. & Hedger, M. P. Activin and related proteins in inflammation: not just interested bystanders. *Cytokine Growth Factor Rev* **20**, 153-164 (2009).
- 284 Jiang, Z., Jiang, J. X. & Zhang, G. X. Macrophages: a double-edged sword in experimental autoimmune encephalomyelitis. *Immunol Lett* **160**, 17-22 (2014).
- 285 Mikita, J. *et al.* Altered M1/M2 activation patterns of monocytes in severe relapsing experimental rat model of multiple sclerosis. Amelioration of clinical status by M2 activated monocyte administration. *Multiple sclerosis (Houndmills, Basingstoke, England)* **17**, 2-15 (2011).
- 286 Vogel, D. Y. *et al.* Macrophages in inflammatory multiple sclerosis lesions have an intermediate activation status. *J Neuroinflammation* **10**, 1742-2094 (2013).
- 287 Zhang, Z. *et al.* Parenchymal accumulation of CD163+ macrophages/microglia in multiple sclerosis brains. *Journal of neuroimmunology* **237**, 73-79 (2011).
- 288 Miron, V. E. *et al.* M2 microglia and macrophages drive oligodendrocyte differentiation during CNS remyelination. *Nat Neurosci* **16**, 1211-1218 (2013).
- 289 Miller, D. H. *et al.* A controlled trial of natalizumab for relapsing multiple sclerosis. *The New England journal of medicine* **348**, 15-23, doi:10.1056/NEJMoa020696 (2003).
- 290 Kappos, L. *et al.* Oral fingolimod (FTY720) for relapsing multiple sclerosis. *The New England journal of medicine* **355**, 1124-1140, doi:10.1056/NEJMoa052643 (2006).
- 291 Gold, R. *et al.* Placebo-controlled phase 3 study of oral BG-12 for relapsing multiple sclerosis. *The New England journal of medicine* **367**, 1098-1107, doi:10.1056/NEJMoa1114287 (2012).
- 292 O'Connor, P. *et al.* Randomized trial of oral teriflunomide for relapsing multiple sclerosis. *The New England journal of medicine* **365**, 1293-1303, doi:10.1056/NEJMoa1014656 (2011).
- 293 Coles, A. J. *et al.* Alemtuzumab for patients with relapsing multiple sclerosis after disease-modifying therapy: a randomised controlled phase 3 trial. *Lancet (London, England)* **380**, 1829-1839, doi:10.1016/s0140-6736(12)61768-1 (2012).

- 294 P, J. K. a. C. Prophylactic Therapy with Interferon beta-1b. *New York*, 503 (2001).
- 295 Isaacs, A. & Lindenmann, J. Virus interference. I. The interferon. By A. Isaacs and J. Lindenmann, 1957. *J Interferon Res* **7**, 429-438 (1987).
- 296 Pestka, S., Langer, J. A., Zoon, K. C. & Samuel, C. E. Interferons and their actions. *Annu Rev Biochem* **56**, 727-777 (1987).
- 297 Johnson, H. M., Bazer, F. W., Szente, B. E. & Jarpe, M. A. How interferons fight disease. *Sci Am* **270**, 68-75 (1994).
- 298 Ealick, S. E. *et al.* Three-dimensional structure of recombinant human interferon-gamma. *Science (New York, N.Y.)* **252**, 698-702 (1991).
- 299 Knobler, R. L. *et al.* Clinical trial of natural alpha interferon in multiple sclerosis. *Annals of the New York Academy of Sciences* **436**, 382-388 (1984).
- 300 Jacobs, L., O'Malley, J., Freeman, A. & Ekes, R. Intrathecal interferon reduces exacerbations of multiple sclerosis. *Science (New York, N.Y.)* **214**, 1026-1028 (1981).
- 301 Panitch, H. S., Hirsch, R. L., Schindler, J. & Johnson, K. P. Treatment of multiple sclerosis with gamma interferon: exacerbations associated with activation of the immune system. *Neurology* **37**, 1097-1102 (1987).
- 302 Interferon beta-1b is effective in relapsing-remitting multiple sclerosis. I. Clinical results of a multicenter, randomized, double-blind, placebo-controlled trial. The IFNB Multiple Sclerosis Study Group. *Neurology* **43**, 655-661 (1993).
- 303 Placebo-controlled multicentre randomised trial of interferon beta-1b in treatment of secondary progressive multiple sclerosis. European Study Group on interferon beta-1b in secondary progressive MS. *Lancet (London, England)* **352**, 1491-1497 (1998).
- 304 Randomised double-blind placebo-controlled study of interferon beta-1a in relapsing/remitting multiple sclerosis. PRISMS (Prevention of Relapses and Disability by Interferon beta-1a Subcutaneously in Multiple Sclerosis) Study Group. *Lancet (London, England)* **352**, 1498-1504 (1998).
- 305 Rudick, R. A. *et al.* Impact of interferon beta-1a on neurologic disability in relapsing multiple sclerosis. 1997. *Neurology* **57**, S25-30 (2001).
- 306 Paty, D. W. & Li, D. K. Interferon beta-1b is effective in relapsing-remitting multiple sclerosis. II. MRI analysis results of a multicenter, randomized, double-blind, placebo-controlled trial. UBC MS/MRI Study Group and the IFNB Multiple Sclerosis Study Group. *Neurology* **43**, 662-667 (1993).
- 307 Jacobs, L. D. *et al.* Intramuscular interferon beta-1a for disease progression in relapsing multiple sclerosis. The Multiple Sclerosis Collaborative Research Group (MSCRG). *Annals of neurology* **39**, 285-294 (1996).

- 308 Evidence of interferon beta-1a dose response in relapsing-remitting MS: the OWIMS Study. The Once Weekly Interferon for MS Study Group. *Neurology* **53**, 679-686 (1999).
- 309 Neighbour, P. A., Miller, A. E. & Bloom, B. R. Interferon responses of leukocytes in multiple sclerosis. *Neurology* **31**, 561-566 (1981).
- 310 Neighbour, P. A. Studies of interferon production and natural killing by lymphocytes from multiple sclerosis patients. *Annals of the New York Academy of Sciences* **436**, 181-191 (1984).
- 311 Yong, V. W., Chabot, S., Stuve, O. & Williams, G. Interferon beta in the treatment of multiple sclerosis: mechanisms of action. *Neurology* **51**, 682-689 (1998).
- 312 Teleshova, N. *et al.* Elevated CD40 ligand expressing blood T-cell levels in multiple sclerosis are reversed by interferon-beta treatment. *Scand J Immunol* **51**, 312-320 (2000).
- 313 Yasuda, C. L. *et al.* Interferon beta modulates experimental autoimmune encephalomyelitis by altering the pattern of cytokine secretion. *Immunol Invest* **28**, 115-126 (1999).
- 314 Kozovska, M. E. *et al.* Interferon beta induces T-helper 2 immune deviation in MS. *Neurology* **53**, 1692-1697 (1999).
- 315 Butcher, E. C. & Picker, L. J. Lymphocyte homing and homeostasis. *Science (New York, N.Y.)* **272**, 60-66 (1996).
- 316 Dhib-Jalbut, S. & Marks, S. Interferon-beta mechanisms of action in multiple sclerosis. *Neurology* **5** (2010).
- 317 Yong, V. W., Krekoski, C. A., Forsyth, P. A., Bell, R. & Edwards, D. R. Matrix metalloproteinases and diseases of the CNS. *Trends Neurosci* **21**, 75-80 (1998).
- 318 Sorensen, P. S. *et al.* Clinical importance of neutralising antibodies against interferon beta in patients with relapsing-remitting multiple sclerosis. *Lancet (London, England)* **362**, 1184-1191 (2003).
- 319 Schellekens, H. Immunogenicity of therapeutic proteins. *Nephrol Dial Transplant* **18**, 1257-1259 (2003).
- 320 Schellekens, H. Bioequivalence and the immunogenicity of biopharmaceuticals. *Nat Rev Drug Discov* **1**, 457-462 (2002).
- 321 Runkel, L. *et al.* Structural and functional differences between glycosylated and non-glycosylated forms of human interferon-beta (IFN-beta). *Pharm Res* **15**, 641-649 (1998).
- 322 Clanet, M. *et al.* A randomized, double-blind, dose-comparison study of weekly interferon beta-1a in relapsing MS. *Neurology* **59**, 1507-1517 (2002).

- 323 Hartung, H. P. *et al.* Neutralising antibodies to interferon beta in multiple sclerosis : expert panel report. *J Neurol* **254**, 827-837 (2007).
- 324 Petkau, A. J. *et al.* Longitudinal analyses of the effects of neutralizing antibodies on interferon beta-1b in relapsing-remitting multiple sclerosis. *Multiple sclerosis (Houndmills, Basingstoke, England)* **10**, 126-138 (2004).
- 325 Deisenhammer, F. & Giovannoni, G. *Longitudinal analyses of the effects of neutralizing antibodies on interferon beta-1b in relapsing/remitting multiple sclerosis.* (Mult Scler. 2004 Dec;10(6):713-4; author reply 715.).
- 326 Polman, C. H., Kappos, L., Petkau, J. & Thompson, A. *Neutralising antibodies to interferon beta during the treatment of multiple sclerosis.* (J Neurol Neurosurg Psychiatry. 2003 Aug;74(8):1162; author reply 1162-3.).
- 327 PRISMS-4: Long-term efficacy of interferon-beta-1a in relapsing MS. *Neurology* **56**, 1628-1636 (2001).
- 328 Durelli, L. *et al.* Every-other-day interferon beta-1b versus once-weekly interferon beta-1a for multiple sclerosis: results of a 2-year prospective randomised multicentre study (INCOMIN). *Lancet (London, England)* **359**, 1453-1460 (2002).
- 329 Neutralizing antibodies during treatment of multiple sclerosis with interferon beta-1b: experience during the first three years. The IFNB Multiple Sclerosis Study Group and the University of British Columbia MS/MRI Analysis Group. *Neurology* **47**, 889-894 (1996).
- 330 WHO Expert Committee on Biological Standardization. Thirty-fifth report. *World Health Organ Tech Rep Ser* **725**, 1-140 (1985).
- 331 Comabella, M. & Montalban, X. Body fluid biomarkers in multiple sclerosis. *The Lancet. Neurology* **13**, 113-126, doi:10.1016/s1474-4422(13)70233-3 (2014).
- 332 Sormani, M. P. *et al.* Scoring treatment response in patients with relapsing multiple sclerosis. *Multiple sclerosis (Houndmills, Basingstoke, England)* **19**, 605-612 (2013).
- 333 Rio, J. *et al.* Measures in the first year of therapy predict the response to interferon beta in MS. *Multiple sclerosis (Houndmills, Basingstoke, England)* **15**, 848-853 (2009).
- 334 Sormani, M. P. *et al.* Combined MRI lesions and relapses as a surrogate for disability in multiple sclerosis. *Neurology* **77**, 1684-1690 (2011).
- 335 Martinez-Rodriguez, J. E. *et al.* Natural killer cell phenotype and clinical response to interferon-beta therapy in multiple sclerosis. *Clinical immunology (Orlando, Fla.)* **141**, 348-356 (2011).

- 336 Axtell, R. C. *et al.* T helper type 1 and 17 cells determine efficacy of interferon-beta in multiple sclerosis and experimental encephalomyelitis. *Nat Med* **16**, 406-412 (2010).
- 337 Bushnell, S. E. *et al.* Serum IL-17F does not predict poor response to IM IFNbeta-1a in relapsing-remitting MS. *Neurology* **79**, 531-537 (2012).
- 338 Bustamante, M. F. *et al.* Cellular immune responses in multiple sclerosis patients treated with interferon-beta. *Clinical and experimental immunology* **171**, 243-246 (2013).
- 339 Hartung, H. P. *et al.* Interleukin 17F level and interferon beta response in patients with multiple sclerosis. *JAMA Neurol* **70**, 1017-1021 (2013).
- 340 Bertolotto, A. *et al.* Persistent neutralizing antibodies abolish the interferon beta bioavailability in MS patients. *Neurology* **60**, 634-639 (2003).
- 341 Polman, C. H. *et al.* Recommendations for clinical use of data on neutralising antibodies to interferon-beta therapy in multiple sclerosis. *The Lancet. Neurology* **9**, 740-750, doi:10.1016/s1474-4422(10)70103-4 (2010).
- 342 Vandenberg, K. & Comabella, M. Single-nucleotide polymorphisms in response to interferon-beta therapy in multiple sclerosis. *J Interferon Cytokine Res* **30**, 727-732 (2010).
- 343 Wandinger, K. P. *et al.* TNF-related apoptosis inducing ligand (TRAIL) as a potential response marker for interferon-beta treatment in multiple sclerosis. *Lancet (London, England)* **361**, 2036-2043 (2003).
- 344 Bosca, I. *et al.* Response to interferon in multiple sclerosis is related to lipid-specific oligoclonal IgM bands. *Multiple sclerosis (Houndmills, Basingstoke, England)* **16**, 810-815, doi:10.1177/1352458510371961 (2010).
- 345 Reimann, K. A., Chernoff, M., Wilkening, C. L., Nickerson, C. E. & Landay, A. L. Preservation of lymphocyte immunophenotype and proliferative responses in cryopreserved peripheral blood mononuclear cells from human immunodeficiency virus type 1-infected donors: implications for multicenter clinical trials. The ACTG Immunology Advanced Technology Laboratories. *Clin Diagn Lab Immunol* **7**, 352-359 (2000).
- 346 Trojano, M. *et al.* Real-life impact of early interferon beta therapy in relapsing multiple sclerosis. *Annals of neurology* **66**, 513-520 (2009).
- 347 Lee, L. F. *et al.* IL-7 promotes T(H)1 development and serum IL-7 predicts clinical response to interferon-beta in multiple sclerosis. *Sci Transl Med* **3**, 3002400 (2011).
- 348 Ozenci, V. *et al.* Multiple sclerosis: pro- and anti-inflammatory cytokines and metalloproteinases are affected differentially by treatment with IFN-beta. *Journal of neuroimmunology* **108**, 236-243 (2000).

- 349 Karabudak, R. *et al.* Effect of interferon beta-1a on serum matrix metalloproteinase-9 (MMP-9) and tissue inhibitor of matrix metalloproteinase (TIMP-1) in relapsing remitting multiple sclerosis patients. One year follow-up results. *J Neurol* **251**, 279-283 (2004).
- 350 Graber, J. *et al.* Interferon-beta-1a induces increases in vascular cell adhesion molecule: implications for its mode of action in multiple sclerosis. *Journal of neuroimmunology* **161**, 169-176 (2005).
- 351 Lassmann, H., Bruck, W. & Lucchinetti, C. Heterogeneity of multiple sclerosis pathogenesis: implications for diagnosis and therapy. *Trends Mol Med* **7**, 115-121 (2001).
- 352 Trapp, B. D. *et al.* Axonal transection in the lesions of multiple sclerosis. *The New England journal of medicine* **338**, 278-285 (1998).
- 353 Pachner, A. R., Dail, D., Pak, E. & Narayan, K. The importance of measuring IFNbeta bioactivity: monitoring in MS patients and the effect of anti-IFNbeta antibodies. *Journal of neuroimmunology* **166**, 180-188 (2005).
- 354 Fusco, C. *et al.* HLA-DRB1*1501 and response to copolymer-1 therapy in relapsing-remitting multiple sclerosis. *Neurology* **57**, 1976-1979 (2001).
- 355 Kappos, L. *et al.* Final analysis of the European multicenter trial on IFNbeta-1b in secondary-progressive MS. *Neurology* **57**, 1969-1975 (2001).
- 356 Kracke, A. *et al.* Mx proteins in blood leukocytes for monitoring interferon beta-1b therapy in patients with MS. *Neurology* **54**, 193-199 (2000).
- 357 Rio, J. *et al.* Assessment of different treatment failure criteria in a cohort of relapsing-remitting multiple sclerosis patients treated with interferon beta: implications for clinical trials. *Annals of neurology* **52**, 400-406 (2002).
- 358 Sturzebecher, S. *et al.* Expression profiling identifies responder and non-responder phenotypes to interferon-beta in multiple sclerosis. *Brain* **126**, 1419-1429 (2003).
- 359 Villoslada, P., Oksenberg, J. R., Rio, J. & Montalban, X. *Clinical characteristics of responders to interferon therapy for relapsing MS.* (Neurology. 2004 May 11;62(9):1653; author reply 1653.).
- 360 Waubant, E. *et al.* Clinical characteristics of responders to interferon therapy for relapsing MS. *Neurology* **61**, 184-189 (2003).
- 361 Petzold, A. *et al.* Treatment response in relation to inflammatory and axonal surrogate marker in multiple sclerosis. *Multiple sclerosis (Houndmills, Basingstoke, England)* **10**, 281-283 (2004).
- 362 Rudick, R. A., Lee, J. C., Simon, J., Ransohoff, R. M. & Fisher, E. Defining interferon beta response status in multiple sclerosis patients. *Annals of neurology* **56**, 548-555 (2004).

- 363 Rio, J. *et al.* Defining the response to interferon-beta in relapsing-remitting multiple sclerosis patients. *Annals of neurology* **59**, 344-352 (2006).
- 364 Schellekens, H. The immunogenicity of therapeutic proteins. *Discov Med* **9**, 560-564 (2010).
- 365 Perini, P. *et al.* Interferon-beta (INF-beta) antibodies in interferon-beta1a- and interferon-beta1b-treated multiple sclerosis patients. Prevalence, kinetics, cross-reactivity, and factors enhancing interferon-beta immunogenicity in vivo. *Eur Cytokine Netw* **12**, 56-61 (2001).
- 366 Suresh Kumar, R., Syed, S., Anand Kumar, A., Subha Kumari, K. N. & Sajitha, K. Serum vitamin d levels in Indian patients with multiple sclerosis. *Indian J Clin Biochem* **28**, 255-258 (2013).
- 367 Soilu-Hanninen, M. *et al.* 25-Hydroxyvitamin D levels in serum at the onset of multiple sclerosis. *Multiple sclerosis (Houndmills, Basingstoke, England)* **11**, 266-271 (2005).
- 368 Scott, T. F., Hackett, C. T., Dworek, D. C. & Schramke, C. J. Low vitamin D level is associated with higher relapse rate in natalizumab treated MS patients. *J Neurol Sci* **330**, 27-31 (2013).
- 369 Farias, A. S. *et al.* Vitamin D3 induces IDO+ tolerogenic DCs and enhances Treg, reducing the severity of EAE. *CNS Neurosci Ther* **19**, 269-277 (2013).
- 370 Karg, E., Klivenyi, P., Bencsik, K., Turi, S. & Vecsei, L. Alpha-tocopherol and NADPH in the erythrocytes and plasma of multiple sclerosis patients. Effect of interferon-beta-1b treatment. *Eur Neurol* **50**, 215-219 (2003).
- 371 Loken-Amsrud, K. I. *et al.* Alpha-tocopherol and MRI outcomes in multiple sclerosis--association and prediction. *PLoS One* **8**, 22 (2013).
- 372 Ross, A. C. Vitamin A and retinoic acid in T cell-related immunity. *Am J Clin Nutr* **96**, 10 (2012).
- 373 Salzer, J. *et al.* Vitamin A and systemic inflammation as protective factors in multiple sclerosis. *Multiple sclerosis (Houndmills, Basingstoke, England)* **19**, 1046-1051 (2013).
- 374 Correale, J. & Farez, M. F. Parasite infections in multiple sclerosis modulate immune responses through a retinoic acid-dependent pathway. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* **191**, 3827-3837 (2013).
- 375 Harrington, L. E. *et al.* Interleukin 17-producing CD4+ effector T cells develop via a lineage distinct from the T helper type 1 and 2 lineages. *Nature immunology* **6**, 1123-1132 (2005).
- 376 Archelos, J. J., Storch, M. K. & Hartung, H. P. The role of B cells and autoantibodies in multiple sclerosis. *Annals of neurology* **47**, 694-706 (2000).

- 377 Genc, K., Dona, D. L. & Reder, A. T. Increased CD80(+) B cells in active multiple sclerosis and reversal by interferon beta-1b therapy. *The Journal of clinical investigation* **99**, 2664-2671 (1997).
- 378 Sakaguchi, S. Regulatory T cells: key controllers of immunologic self-tolerance. *Cell* **101**, 455-458 (2000).
- 379 Shevach, E. M., McHugh, R. S., Piccirillo, C. A. & Thornton, A. M. Control of T-cell activation by CD4+ CD25+ suppressor T cells. *Immunol Rev* **182**, 58-67 (2001).
- 380 Kukreja, A. *et al.* Multiple immuno-regulatory defects in type-1 diabetes. *The Journal of clinical investigation* **109**, 131-140 (2002).
- 381 Crispin, J. C., Martinez, A. & Alcocer-Varela, J. Quantification of regulatory T cells in patients with systemic lupus erythematosus. *J Autoimmun* **21**, 273-276 (2003).
- 382 de Kleer, I. M. *et al.* CD4+CD25bright regulatory T cells actively regulate inflammation in the joints of patients with the remitting form of juvenile idiopathic arthritis. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* **172**, 6435-6443 (2004).
- 383 Boyer, O. *et al.* CD4+CD25+ regulatory T-cell deficiency in patients with hepatitis C-mixed cryoglobulinemia vasculitis. *Blood* **103**, 3428-3430 (2004).
- 384 Kriegel, M. A. *et al.* Defective suppressor function of human CD4+ CD25+ regulatory T cells in autoimmune polyglandular syndrome type II. *The Journal of experimental medicine* **199**, 1285-1291 (2004).
- 385 Fritzsching, B. *et al.* In contrast to effector T cells, CD4+CD25+FoxP3+ regulatory T cells are highly susceptible to CD95 ligand- but not to TCR-mediated cell death. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* **175**, 32-36 (2005).
- 386 Sanchez-Ramon, S. *et al.* Pregnancy-induced expansion of regulatory T-lymphocytes may mediate protection to multiple sclerosis activity. *Immunol Lett* **96**, 195-201 (2005).
- 387 de Andres, C. *et al.* Interferon beta-1a therapy enhances CD4+ regulatory T-cell function: an ex vivo and in vitro longitudinal study in relapsing-remitting multiple sclerosis. *Journal of neuroimmunology* **182**, 204-211 (2007).
- 388 Saresella, M. *et al.* CD4+CD25+FoxP3+PD1- regulatory T cells in acute and stable relapsing-remitting multiple sclerosis and their modulation by therapy. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* **22**, 3500-3508 (2008).
- 389 Praksova, P. *et al.* Immunoregulatory T cells in multiple sclerosis and the effect of interferon beta and glatiramer acetate treatment on T cell subpopulations. *J Neurol Sci* **319**, 18-23 (2012).

- 390 Venken, K. *et al.* Compromised CD4+ CD25(high) regulatory T-cell function in patients with relapsing-remitting multiple sclerosis is correlated with a reduced frequency of FOXP3-positive cells and reduced FOXP3 expression at the single-cell level. *Immunology* **123**, 79-89 (2008).
- 391 Navarro, J. *et al.* Circulating dendritic cells subsets and regulatory T-cells at multiple sclerosis relapse: differential short-term changes on corticosteroids therapy. *Journal of neuroimmunology* **176**, 153-161 (2006).
- 392 Noronha, A., Toscas, A. & Jensen, M. A. Interferon beta augments suppressor cell function in multiple sclerosis. *Annals of neurology* **27**, 207-210 (1990).
- 393 Korporal, M. *et al.* Interferon beta-induced restoration of regulatory T-cell function in multiple sclerosis is prompted by an increase in newly generated naive regulatory T cells. *Archives of neurology* **65**, 1434-1439 (2008).
- 394 Penton-Rol, G. *et al.* Treatment with type I interferons induces a regulatory T cell subset in peripheral blood mononuclear cells from multiple sclerosis patients. *Int Immunopharmacol* **8**, 881-886 (2008).
- 395 Putheti, P., Pettersson, A., Soderstrom, M., Link, H. & Huang, Y. M. Circulating CD4+CD25+ T regulatory cells are not altered in multiple sclerosis and unaffected by disease-modulating drugs. *J Clin Immunol* **24**, 155-161 (2004).
- 396 de Andres, C. *et al.* Clinical response to interferon-beta-1a may be linked to low baseline circulating BDCA1 myeloid dendritic cells Differential role of circulating dendritic cells and CD4+ regulatory T-cells in relapsing-remitting multiple sclerosis: a 1-year longitudinal study. *Journal of neuroimmunology* **212**, 112-120 (2009).
- 397 Jacobsen, M. *et al.* Oligoclonal expansion of memory CD8+ T cells in cerebrospinal fluid from multiple sclerosis patients. *Brain* **125**, 538-550 (2002).
- 398 Zang, Y. C. *et al.* Increased CD8+ cytotoxic T cell responses to myelin basic protein in multiple sclerosis. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* **172**, 5120-5127 (2004).
- 399 Jiang, H., Zhang, S. I. & Pernis, B. Role of CD8+ T cells in murine experimental allergic encephalomyelitis. *Science (New York, N.Y.)* **256**, 1213-1215 (1992).
- 400 Jiang, H. *et al.* Murine CD8+ T cells that specifically delete autologous CD4+ T cells expressing V beta 8 TCR: a role of the Qa-1 molecule. *Immunity* **2**, 185-194 (1995).
- 401 Koh, D. R. *et al.* Less mortality but more relapses in experimental allergic encephalomyelitis in CD8-/- mice. *Science (New York, N.Y.)* **256**, 1210-1213 (1992).
- 402 Seo, S. K. *et al.* 4-1BB-mediated immunotherapy of rheumatoid arthritis. *Nat Med* **10**, 1088-1094 (2004).

- 403 Wang, R. *et al.* CD8⁺ regulatory T cells are responsible for GAD-IgG gene-transferred tolerance induction in NOD mice. *Immunology* **126**, 123-131 (2009).
- 404 Davila, E. *et al.* Cell-based immunotherapy with suppressor CD8⁺ T cells in rheumatoid arthritis. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* **174**, 7292-7301 (2005).
- 405 Bisikirska, B., Colgan, J., Luban, J., Bluestone, J. A. & Herold, K. C. TCR stimulation with modified anti-CD3 mAb expands CD8⁺ T cell population and induces CD8⁺CD25⁺ Tregs. *The Journal of clinical investigation* **115**, 2904-2913 (2005).
- 406 Klimiuk, P. A., Goronzy, J. J. & Weyand, C. M. IL-16 as an anti-inflammatory cytokine in rheumatoid synovitis. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* **162**, 4293-4299 (1999).
- 407 Filaci, G., Fenoglio, D. & Indiveri, F. CD8(+) T regulatory/suppressor cells and their relationships with autoreactivity and autoimmunity. *Autoimmunity* **44**, 51-57 (2011).
- 408 York, N. R. *et al.* Immune regulatory CNS-reactive CD8⁺T cells in experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Autoimmun* **35**, 33-44 (2010).
- 409 Baughman, E. J. *et al.* Neuroantigen-specific CD8⁺ regulatory T-cell function is deficient during acute exacerbation of multiple sclerosis. *J Autoimmun* **36**, 115-124 (2011).
- 410 Baranzini, S. E. *et al.* B cell repertoire diversity and clonal expansion in multiple sclerosis brain lesions. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* **163**, 5133-5144 (1999).
- 411 Owens, G. P. *et al.* Restricted use of VH4 germline segments in an acute multiple sclerosis brain. *Annals of neurology* **43**, 236-243 (1998).
- 412 Colombo, M. *et al.* Accumulation of clonally related B lymphocytes in the cerebrospinal fluid of multiple sclerosis patients. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* **164**, 2782-2789 (2000).
- 413 Qin, Y. *et al.* Clonal expansion and somatic hypermutation of V(H) genes of B cells from cerebrospinal fluid in multiple sclerosis. *The Journal of clinical investigation* **102**, 1045-1050 (1998).
- 414 Mix, E. *et al.* B cells expressing CD5 are increased in cerebrospinal fluid of patients with multiple sclerosis. *Clinical and experimental immunology* **79**, 21-27 (1990).
- 415 Kuchroo, V. K. *et al.* B7-1 and B7-2 costimulatory molecules activate differentially the Th1/Th2 developmental pathways: application to autoimmune disease therapy. *Cell* **80**, 707-718 (1995).

- 416 Freeman, G. J. *et al.* B7-1 and B7-2 do not deliver identical costimulatory signals, since B7-2 but not B7-1 preferentially costimulates the initial production of IL-4. *Immunity* **2**, 523-532 (1995).
- 417 Schubert, R. D. *et al.* IFN-beta treatment requires B cells for efficacy in neuroautoimmunity. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* **194**, 2110-2116 (2015).
- 418 Guo, Y. *et al.* Human mesenchymal stem cells upregulate CD1dCD5(+) regulatory B cells in experimental autoimmune encephalomyelitis. *Neuroimmunomodulation* **20**, 294-303 (2013).
- 419 Iwata, Y. *et al.* Characterization of a rare IL-10-competent B-cell subset in humans that parallels mouse regulatory B10 cells. *Blood* **117**, 530-541 (2011).
- 420 Shen, P. *et al.* IL-35-producing B cells are critical regulators of immunity during autoimmune and infectious diseases. *Nature* **507**, 366-370 (2014).
- 421 Matsushita, T., Yanaba, K., Bouaziz, J. D., Fujimoto, M. & Tedder, T. F. Regulatory B cells inhibit EAE initiation in mice while other B cells promote disease progression. *The Journal of clinical investigation* **118**, 3420-3430 (2008).
- 422 Marin, N. *et al.* Regulatory lymphocytes are key factors in MHC-independent resistance to EAE. *J Immunol Res* **156380**, 27 (2014).
- 423 Wu, L. & Van Kaer, L. Natural killer T cells and autoimmune disease. *Curr Mol Med* **9**, 4-14 (2009).
- 424 Illes, Z. *et al.* Differential expression of NK T cell V alpha 24J alpha Q invariant TCR chain in the lesions of multiple sclerosis and chronic inflammatory demyelinating polyneuropathy. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* **164**, 4375-4381 (2000).
- 425 van der Vliet, H. J. *et al.* Circulating V(alpha24+) Vbeta11+ NKT cell numbers are decreased in a wide variety of diseases that are characterized by autoreactive tissue damage. *Clinical immunology (Orlando, Fla.)* **100**, 144-148 (2001).
- 426 Demoulin, T., Gachelin, G., Bequet, D. & Dormont, D. A biased Valpha24+ T-cell repertoire leads to circulating NKT-cell defects in a multiple sclerosis patient at the onset of his disease. *Immunol Lett* **90**, 223-228 (2003).
- 427 Araki, M. *et al.* Th2 bias of CD4+ NKT cells derived from multiple sclerosis in remission. *Int Immunol* **15**, 279-288 (2003).
- 428 Sheridan, J. P. *et al.* Intermediate-affinity interleukin-2 receptor expression predicts CD56(bright) natural killer cell expansion after daclizumab treatment in the CHOICE study of patients with multiple sclerosis. *Multiple sclerosis (Houndmills, Basingstoke, England)* **17**, 1441-1448 (2011).
- 429 Elkins, J. *et al.* CD56(bright) natural killer cells and response to daclizumab HYP in relapsing-remitting MS. *Neurol Neuroimmunol Neuroinflamm* **2** (2015).

-
- 430 Martinez-Rodriguez, J. E. *et al.* Natural killer receptors distribution in multiple sclerosis: Relation to clinical course and interferon-beta therapy. *Clinical immunology (Orlando, Fla.)* **137**, 41-50 (2010).
- 431 Jamshidian, A., Shaygannejad, V., Pourazar, A., Zarkesh-Esfahani, S. H. & Gharagozloo, M. Biased Treg/Th17 balance away from regulatory toward inflammatory phenotype in relapsed multiple sclerosis and its correlation with severity of symptoms. *Journal of neuroimmunology* **262**, 106-112 (2013).
- 432 Wang, W. J. *et al.* Regulation of the expression of Th17 cells and regulatory T cells by IL-27 in patients with unexplained early recurrent miscarriage. *J Reprod Immunol* **99**, 39-45 (2013).
- 433 Lowther, D. E. *et al.* Th1 not Th17 cells drive spontaneous MS-like disease despite a functional regulatory T cell response. *Acta neuropathologica* **126**, 501-515 (2013).
- 434 Siewe, B. *et al.* Regulatory B cells inhibit cytotoxic T lymphocyte (CTL) activity and elimination of infected CD4 T cells after in vitro reactivation of HIV latent reservoirs. *PLoS One* **9** (2014).
- 435 Correale, J. & Equiza, T. R. Regulatory B cells, helminths, and multiple sclerosis. *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)*, 1161-1165_1118 (2014).
- 436 Poli, A. *et al.* CD56bright natural killer (NK) cells: an important NK cell subset. *Immunology* **126**, 458-465 (2009).

ANEXOS: Patentes y Publicaciones

**PATENTE OBTENIDA COMO RESULTADO DE ESTE ESTUDIO
DE INVESTIGACIÓN**

Método de predicción de respuesta al interferón beta (IFN-b)

Ref: 900 880 aga

Patente Internacional: PCT/EP2015/066163

Identification of the major HHV-6 antigen recognized by cerebrospinal fluid IgG in multiple sclerosis

R. Alenda^{a,b}, R. Álvarez-Lafuente^{b,c}, L. Costa-Frossard^{a,b}, R. Arroyo^{b,c}, S. Mirete^a, J. C. Álvarez-Cermeño^{a,b,d,*} and L. M. Villar^{a,b,*}

^aMS Unit, Departments of Immunology and Neurology, Hospital Ramón y Cajal, IRYCIS, Madrid; ^bRed Española de Esclerosis Múltiple, Madrid; ^cDepartment of Neurology, Hospital Clínico San Carlos, IdISSC, Madrid; and ^dDepartment of Medicine, University of Alcalá, Alcalá de Henares, Madrid, Spain

Keywords: antibodies, demyelinating diseases, multiple sclerosis, neuroimmunology

Received 19 December 2013
Accepted 6 March 2014

Background and purpose: Different data show an association between human herpesvirus 6 (HHV-6) and multiple sclerosis (MS). Intrathecal anti-HHV-6 immunoglobulin G (IgG) was detected in MS patients, but the antigen recognized by cerebrospinal fluid (CSF) IgG has not been characterized yet. Our objective was to identify the HHV-6 antigens recognized by IgG present in the CSF of patients with MS.

Methods: Cerebrospinal fluid IgG of 15 MS patients and eight patients with other neurological diseases was purified on protein G Sepharose columns. Purified IgG from every patient was linked to a CNBr-activated Sepharose 4B column. Fifty micrograms of viral extract was applied to each column. Bound proteins were eluted and analysed by SDS-PAGE and silver staining. The viral protein was characterized by mass spectrometry.

Results: A protein of 150 kD was eluted from CSF IgG columns of three of eight patients with primary progressive MS and one of seven with relapsing–remitting MS. After digestion and mass spectrometry analysis 10 peptides were found with 100% homology with the major capsid protein of the HHV-6A.

Discussion: These findings confirm the presence of anti-HHV-6 IgG in CSF of MS patients, particularly in progressive forms, and identify major capsid protein as the major antigen recognized by CSF IgG from MS patients.

Introduction

Multiple sclerosis (MS) is the most common demyelinating disease of the central nervous system. Although its aetiology remains unknown, different environmental factors have been associated with MS development. These include vitamin D levels, smoking and infectious agents, such as Epstein–Barr virus and human herpesvirus 6 (HHV-6).

Different studies have described a relationship between HHV-6 and MS. The presence of DNA and proteins of HHV-6 was found in oligodendrocytes, astrocytes, lymphocytes and microglia of MS plaques [1]. In addition, increased levels of anti-HHV-6-specific antibody levels and HHV-6 DNA were found in

the serum of MS patients [2–9], and a correlation was found between the reactivation of HHV-6 and disease activity [9–13].

Moreover, an intrathecal immunoglobulin G (IgG) response to anti-HHV-6 was detected in approximately one-fifth of MS patients [14,15]. This was evidenced by the presence of oligoclonal IgG bands reacting against a total virus extract. However, the HHV-6 antigens recognized by oligoclonal IgG bands present in the cerebrospinal fluid (CSF) of MS patients have not been identified yet. Oligoclonal IgG bands are a hallmark of MS. They demonstrate an antigen driven humoral immune response restricted to the CNS. However, the precise autoantigens recognized by these antibodies remain unknown. In the present study, a method was developed to purify and identify the HHV-6 antigens recognized by IgG present in the CSF of patients with MS and the relationship of these antibodies with different disease forms was studied. This can contribute to identifying autoantigens that play a relevant role in MS

Correspondence: L. M. Villar, Servicio de Inmunología, Hospital Ramón y Cajal, Carretera de Colmenar Km 9.100, 28034 Madrid, Spain (tel.: +34 913368795; fax: +34 913368809; e-mail: luisamaria.villar@salud.madrid.org).

*These authors were co-principal investigators.

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].

Translocated LPS Might Cause Endotoxin Tolerance in Circulating Monocytes of Cystic Fibrosis Patients

Rosa del Campo^{1,9}, Eriel Martínez^{2,3,9}, Carlos del Fresno³, Raquel Alenda⁴, Vanesa Gómez-Piña^{2,3}, Irene Fernández-Ruiz³, María Siliceo³, Teresa Jurado³, Víctor Toledano³, Francisco Arnalich⁵, Francisco García-Río⁶, Eduardo López-Collazo^{3*}

1 Servicio de Microbiología and CIBER en Epidemiología y Salud Pública (CIBERESP), Instituto Ramón y Cajal de Investigación Sanitaria (IRYCIS), Hospital Universitario Ramón y Cajal, Madrid, Spain, **2** EMPIREO Research S.L., Madrid, Spain, **3** Laboratory of Tumor Immunology, IdiPAZ, 'La Paz' Hospital, Madrid, Spain, **4** Department of Immunology, University Hospital Ramon y Cajal and IRYCIS, Madrid, Spain, **5** Service of Internal Medicine, 'La Paz' Hospital, Madrid, Spain, **6** Service of Respiratory Diseases, 'La Paz' Hospital, Madrid, Spain

Abstract

Cystic Fibrosis (CF) is an inherited pleiotropic disease that results from abnormalities in the gene codes of a chloride channel. The lungs of CF patients are chronically infected by several pathogens but bacteraemia have rarely been reported in this pathology. Besides that, circulating monocytes in CF patients exhibit a patent Endotoxin Tolerance (ET) state since they show a significant reduction of the inflammatory response to bacterial stimulus. Despite a previous description of this phenomenon, the direct cause of ET in CF patients remains unknown. In this study we have researched the possible role of microbial/endotoxin translocation from a localized infection to the bloodstream as a potential cause of ET induction in CF patients. Plasma analysis of fourteen CF patients revealed high levels of LPS compared to healthy volunteers and patients who suffer from Chronic Obstructive Pulmonary Disease. Experiments *in vitro* showed that endotoxin concentrations found in plasma of CF patients were enough to induce an ET phenotype in monocytes from healthy controls. In agreement with clinical data, we failed to detect bacterial DNA in CF plasma. Our results suggest that soluble endotoxin present in bloodstream of CF patients causes endotoxin tolerance in their circulating monocytes.

Citation: del Campo R, Martínez E, del Fresno C, Alenda R, Gómez-Piña V, et al. (2011) Translocated LPS Might Cause Endotoxin Tolerance in Circulating Monocytes of Cystic Fibrosis Patients. PLoS ONE 6(12): e29577. doi:10.1371/journal.pone.0029577

Editor: Antoni L. Andreu, Hospital Vall d'Hebron, Spain

Received: September 8, 2011; **Accepted:** November 30, 2011; **Published:** December 28, 2011

Copyright: © 2011 del Campo et al. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Funding: This work was supported by a "Ministerio de Ciencia e Innovación" grant to EL-C. RdC has a contract from the Instituto de Salud Carlos III-FIS (CB05/137). The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

Competing Interests: The authors have declared that no competing interests exist.

* E-mail: elopezc.hulp@salud.madrid.org

These authors contributed equally to this work.

Introduction

The incidence of Endotoxin Tolerance (ET), defined as a state of reduced responsiveness to an endotoxin challenge after a primary bacterial insult [1], has been reported in the settings of several diseases including sepsis, trauma, and coronary syndromes [2–5].

Cystic Fibrosis (CF) is a complex disease that affects essentially all exocrine epithelia [6]. CF results from abnormalities in the gene that codes for the chloride channel termed CF Transmembrane Conductance Regulator (CFTR), which belongs to the extended family of ATP-binding cassette (ABC) transporter ATPases [6]. This transmembrane glycoprotein is expressed in some epithelia, and controls chloride flux across cell surfaces. In addition, it down-regulates transepithelial sodium transport, regulates calcium-activated chloride channels and potassium channels, and may also serve important functions in exocytosis. Some clinical features of CF include injuries of primary organs (pancreas, sinus, liver, intestine and exocrine pancreas) and secondary complications such as malnutrition and diabetes. However, morbidity and mortality of CF patients are usually the result of chronic lower airway bacterial infections and inflammation of the lungs. Repeated episodes of polymicrobial infection in these patients cause a progressive deterioration of lung tissue, a

decline in pulmonary function and, ultimately, respiratory failure and death in 90% of CF patients. In this regard, the observed high frequency of pathogen colonization in these patients points to a significant deficiency of their innate immune system [6,7].

A number of studies conducted so far have focused on local and resident cells (e.g. lung epithelial cells and neutrophils), and most of them described a defective secretion of pro-inflammatory cytokines [8]. Our previous findings revealed a patent ET status in circulating monocytes (MØs) isolated from CF patients [9,10]. These cells are unable to mount a standard inflammatory response after *ex vivo* endotoxin challenge. Besides that, we also have noticed other main features of ET status in their MØs (e.g. high phagocytosis ability and poor antigen presentation) [9,10]. Additionally, a low expression of TREM-1 at cell surface has been detected in circulating CF-MØs [9]. This orphan receptor magnifies the inflammation after TLR activation in myeloid cells and is implicated in a number of inflammatory pathologies [11]. The low levels of TREM-1 expression in circulating CF MØs partially justify the non-responsiveness state in CF patients. Nevertheless, the answer to the question "Why are circulating cells from CF patients tolerant?" is largely unknown.

The translocations of microorganisms and/or microbial products have been previously described in other pathologies, such as

