



VNIVERSITAT
ID VALÈNCIA
Facultat de Medicina i Odontologia

Programa de Doctorado en Medicina (3139)
Departamento de Medicina

VALIDACIÓN DE NUEVOS BIOMARCADORES DE VALOR DIAGNÓSTICO Y PRONÓSTICO EN SUERO Y LÍQUIDO CEFALORRAQUÍDEO PARA LA ESCLEROSIS MÚLTIPLE

TESIS DOCTORAL

Presentada por:

Jordi Tortosa Carreres

Dirigida por:

Dr. Bonaventura Casanova Estruch

Dra. Begoña Laiz Marro

Tutor:

Dr. Bonaventura Casanova Estruch

València, mayo de 2024

INFORME DIRECTORES/AS Y TUTOR/A PARA DEPÓSITO DE TESIS

Director (es) / Codirector (es):

1.- Apellidos, Nombre. Laiz Marro, Begoña . N.I.F: 15841087K, Departamento/Instituto: Servei d'Anàlisi Clíniques Centro: Hospital Universitari i Politècnic la Fe

2.- Apellidos, Nombre. Casanova Estruch, Bonaventura. N.I.F: 24309835P, Departamento/Instituto: Servei de Neurologia/Unitat de Neuroinmunologia Centro: Hospital Universitari i Politècnic la Fe

Tutor o tutora (si procede)

Apellidos, Nombre. Casanova Estruch, Bonaventura .N.I.F: 24309835P, Departamento/Instituto: Servei de Neurologia/Unitat de Neuroinmunologia Centro: Hospital Universitari i Politècnic la Fe

Directores/as y tutor/a, respectivamente, de la tesis doctoral: “Validación de Nuevos Biomarcadores de Diagnóstico y Pronóstico en Suero y Líquido Cefalorraquídeo en Esclerosis Múltiple” de D. Jordi Tortosa Carreres, estudiante del Programa de Doctorado **3139 Medicina** (RD99/2011) en Medicina de la Universitat de València, emiten informe **favorable** para la realización del depósito y la defensa de la tesis doctoral.

Fecha: València, 24 de abril de 2024

Fdo.: Bonaventura Casanova Estruch Fdo.: Begoña Laiz Marro Fdo.: Bonaventura Casanova Estruch

BONAVENTURA
A|CASANOVA|
ESTRUCH

Digitally signed by BONAVENTURA CASANOVA ESTRUCH
DN: cn=BONAVENTURA CASANOVA ESTRUCH, serialNumber=24309835P,
givenName=BONAVENTURA, sn=CASANOVA ESTRUCH,
ou=CIUDADANOS, o=ACCV, c=ES
Date: 2024.04.26 12:35:53 +02'00'

Director/a

MARIA
BEGOÑA
LAIZ MARRO
- DNI
15841087K

Firmado digitalmente por MARIA BEGOÑA LAIZ MARRO - DNI 15841087K
Fecha: 2024.04.26 10:36:17 +02'00'

Director/a

BONAVENTURA
A|CASANOVA|
ESTRUCH

Digitally signed by BONAVENTURA CASANOVA ESTRUCH
DN: cn=BONAVENTURA CASANOVA ESTRUCH, serialNumber=24309835P,
givenName=BONAVENTURA, sn=CASANOVA ESTRUCH,
ou=CIUDADANOS, o=ACCV, c=ES
Date: 2024.04.26 12:36:25 +02'00'

Tutor/a

ESCUELA DOCTORAL
UNIVERSITAT DE VALÈNCIA

AGRADECIMIENTOS

A mis queridos padres, me gustaría empezar expresándoos mi más profundo agradecimiento. Por los buenos consejos y haberme enseñado, con ejemplo, que no existe logro sin constancia y esfuerzo. *“Pega-li al ferro i al final el doblaràs”*.

También quisiera expresar mi profundo agradecimiento a los doctores Begoña Laiz y Bonaventura Casanova, por darme la oportunidad, confiar en mí desde el principio y, sobre todo, la paciencia y disposición para escucharme y apoyarme en todo momento.

A las compañeras, por supuesto, del grupo de Neuroinmunología. Jessica, por introducirme, la búsqueda de muestras y la angustiante burocracia. Laura, Sara y Raquel, por su tiempo -pese a que les escaseara-, consejos, los días de SIMOA/ELISA. Será un placer seguir trabajando codo con codo en nuevos proyectos.

A Raquel Amigo, cuya diligencia y eficiencia hicieron del Biobanco del Hospital La Fe un gran aliado.

A la futura doctora Piqueras, automatizar la cuantificación del C1q fue un verdadero punto de inflexión.

A los miembros de las Unidades de Neuroinmunología del IDIBGI y el Hospital Ramón y Cajal, su excelente contribución al aportar muestras para enriquecer la investigación con más cohortes. En particular a la increíble labor de la doctora Ana Quiroga.

Te toca a ti Piedad, que con tu infinita paciencia te has llevado la peor parte: “¿Por qué no sale esto?”, “Vaya día, ¿nos saltamos la dieta?”, “Lee esto a ver qué tal queda” ...

Y, finalmente, a todo personal del servicio de Análisis Clínicos del Hospital La Fe que en algún momento me brindó su ayuda, desde realizar una determinación hasta prestarme una pipeta.

Sin ninguno de vosotros el desarrollo de este proyecto no habría sido posible.

Con todo mi cariño,

Jor.

***“La recompensa del trabajo bien hecho
es la oportunidad de hacer más”
Jonas Salk***

ÍNDICE DE CONTENIDO

LISTADO DE ABREVIATURAS	1
LISTADO DE TABLAS	3
LISTADO DE FIGURAS.....	4
INTRODUCCIÓN.....	6
1.- Definición	8
2.- El sistema nervioso central	8
2.1.- Neurona y células gliales	8
2.2.- Estructuras.....	9
2.3.- Barreras biológicas.....	10
3.- Etiología de la EM.....	10
4.- Curso natural de la EM.....	11
5.- Fisiopatología de la EM.....	12
5.1.- Inmunopatología	12
5.2.- Destrucción axonal.....	17
5.3.- Mecanismos compensatorios	18
5.4.- Barrera hematoencefálica.....	19
5.5.- Patología	20
6.- Síntesis Intratecal de Inmunoglobulinas.....	21
7.- Diagnóstico.....	22
8.- Tratamiento.....	22
9.- Biomarcadores	24
9.1.- Marcadores de imagen	24
9.2.- Marcadores bioquímicos	27
9.2.1.- Bandas oligoclonales.....	27
9.2.2.- Cuantificación de síntesis intratecal de inmunoglobulinas mediante fórmulas matemáticas	29
Fórmulas o índices lineales.....	30
Fórmula de Reiber	30

9.2.3.- Cadenas ligeras Kappa Libres	33
9.2.4.- Cadena ligera de neurofilamento.....	35
9.2.5.- Chitinasa-3 Like-1.....	36
9.2.6.- Proteína ácida fibrilar glial	37
9.2.7.- Proteína del sistema del complemento C1q	38
HIPÓTESIS Y OBJETIVOS	42
1.- Hipótesis	44
2.- Objetivos.....	45
MATERIALES Y MÉTODOS.....	46
1.- Reclutamiento de pacientes	48
2.- Obtención de las muestras	49
3.- Cálculo de parámetros de SIT	49
4.- Determinaciones de laboratorio.....	49
5.- Estudios de imagen.....	51
6.- Análisis estadístico	52
7.- Metodología Objetivo 1.....	53
8.- Metodología Objetivo 2.....	54
9.- Metodología Objetivo 3.....	55
10.- Metodología Objetivo 4.....	57
RESULTADOS	58
Resultados Objetivo 1	60
Resultados Objetivo 2	70
Resultados Objetivo 3.....	76
Análisis exploratorio	80
Análisis de supervivencia	82
Análisis bivariante	82
Análisis multivariante	87
Resultados Objetivo 4.....	92

DISCUSIÓN.....	102
CONCLUSIONES.....	120
BIBLIOGRAFÍA	124
PUBLICACIONES.....	158
ANEXOS	162
Anexo I.- Sintomatología de la Esclerosis Múltiple en Función del Área Dañada ..	164
Anexo II.- Escala de Discapacidad Extendida (EDSS).	165
Anexo III .- Criterios de McDonald de 2017.....	167
Anexo IV.- Desórdenes neurológicos presentados por los pacientes de los grupos ENI y ENNI enrolados en el Objetivo 4.....	168

LISTADO DE ABREVIATURAS

EM: Esclerosis Múltiple; SNC: Sistema Nervioso Central; BHE; Barrera Hematoencefálica; SB: Sustancia Blanca; SG: Sustancia Gris; LCR: Líquido Ceforraquídeo; MHC-II: Complejo mayor de histocompatibilidad tipo II; CIS: Síndrome Clínico Aislado; SRA: Síndrome Radiológico Aislado; EMRR: Esclerosis Múltiple Remitente-Recurrente; EMSP: Esclerosis Múltiple Secundaria Progresiva; EMPP: Esclerosis Múltiple Progresiva Primaria; EDSS: Expanded Disability Status Scale; APC: Células Presentadoras de Antígeno; SIT: Síntesis Intratecal de Inmunoglobulinas; OPC: Células Progenitoras de Oligodendrocitos; ROS: Especies Reactivas de Oxígeno; RNS: Especies Reactivas de Nitrógeno; BOCG: Bandas Oligoclonales de IgG; DIT: Diseminación Temporal; DIS: Diseminación Espacial; FKLCi: Índice de Cadenas Ligeras Kappa Libres; TME: Tratamientos Modificadores de la Enfermedad; PIRA: Progresión de Discapacidad Independiente de Brote; RMN: Resonancia Magnética Nuclear; PBVC: Porcentaje de Cambio de Volumen Cerebral; Q_{alb}: Cociente de Albúmina en LCR y Suero; BOC: Bandas Oligoclonales; BOCM: Bandas Oligoclonales de IgM; SIT-IgM: Síntesis Intratecal de IgM; pEM: Pacientes con Esclerosis Múltiple; BOCM-LE: Bandas Oligoclonales IgM Lípido Específicas; SIT-IgG: Síntesis Intratecal de IgG; Link: Índice de Tibbling-Link; Q_{Ig}: Cociente de IgG en LCR y Suero; IgMi: Índice de IgM; Reiber IgG: Reibergrama para IgG; Reiber IgM: Reibergrama para IgM; FKLC-R: Síntesis Intratecal de Cadenas Ligeras Kappa Libres Estimada Mediante Reibergrama; NfL: Cadena Ligera de Neurofilamento; sNFL: Cadena Ligera de Neurofilamento en Suero; lcrNfL: Cadena Ligera de Neurofilamento en Líquido Ceforraquídeo; CHI3L1: Chitinasa-3 Like-1; GFAP: Proteína Ácida Fibrilar Glial; lcrGFAP: Proteína Ácida Fibrilar Glial en Líquido Ceforraquídeo; sGFAP: Proteína Ácida Fibrilar Glial en Suero; CAM: Complejo de Ataque a la Membrana; C1q: Proteína del Sistema del Complemento C1q; CT: Cohorte de Trabajo; CV: Cohorte de Validación; CP: Cohorte de Controles con Patología Diferente a la Esclerosis Múltiple; CS: Controles Sanos; sC1q: C1q en Suero; lcrC1q: C1q en Líquido Ceforraquídeo; anti-C1q: Anticuerpos Anti-C1q; T2NL: Número de Lesiones en T2; T2VL: Volumen de Lesiones en T2; IQR: Rango Intercuartílico; PCO: Punto de Corte Óptimo; S: Sensibilidad; E: Especificidad; VPP: Valor Predictivo Positivo; VPN: Valor Predictivo Negativo; A: Precisión; PRBG: Porcentaje de Reducción de Uso de Bandas

Oligoclonales IgG; CG: Cohorte originada de la fusión de las de Trabajo y Validación; PRBM: Porcentaje de Reducción en el Consumo de Bandas Oligoclonales IgM; FT: Fracaso Terapéutico; TME-ME: Tratamiento Modificador de la Enfermedad de Moderada Eficacia; TME-AE: Tratamiento Modificador de la Enfermedad de Alta Eficacia; AI: Estatus de Actividad Inflamatoria Agua de la Enfermedad; HR: Hazard Ratio; sC1q: C1q en suero; lcrC1q: C1q en Líquido Cefalorraquídeo; lcrIgG: IgG en Líquido Cefalorraquídeo; lcrIgM: IgM en Líquido Cefalorraquídeo; lcrFKLC: Cadenas Ligeras Kappa Libres en Líquido Cefalorraquídeo; lcrC3: Proteína C3 del Complemento en Líquido Cefalorraquídeo; NMO: Neuromielitis Óptica.

LISTADO DE TABLAS

Tabla 1.- Antígenos Propuestos Como Objeto de Ataque Autoinmune en la EM.	12
Tabla 2.- Algoritmos Desarrollados para Evaluar la Síntesis Intratecal de IgG.....	54
Tabla 3.- Datos Clínicos y Demográficos de los Pacientes Incluidos en el Objetivo 1.	63
Tabla 4.- Rendimiento Diagnóstico del FKLCi y el Índice de Tibbling-Tibbling-Link.	66
Tabla 5.- Rendimiento Diagnóstico de los Parámetros Cualitativos y los Algoritmos Junto Al Porcentaje de Reducción de Consumo de Bandas Oligoclonales IgG.....	68
Tabla 6 Especificidad, Sensibilidad, VPP, VPN y PRBM para Varios Puntos de Corte de IgMi, FKLCi y los Modelos Para Predecir BOCM.	73
Tabla 7.- Perfiles Clínicos y Demográficos de los Pacientes, Incluyendo Detalles sobre los Cursos de Tratamiento y Razones de Modificaciones y Pérdida del Estatus NEDA3.	79
Tabla 8.- Análisis Descriptivo, Comparativo y de Supervivencia Bivariante de los Marcadores Estudiados, Junto con el Valor Correspondiente al Tercer Cuartil (Q75) y el Número de Observaciones que lo Exceden (Q75 (n)).	83
Tabla 9.- Combinaciones de Biomarcadores Examinadas, Junto con los Resultados del Análisis Bivariante y el Número de Pacientes que las Presentan (n).	85
Tabla 10.- Datos Clínicos y Demográficos de los Pacientes Incluidos en el Objetivo 4.	94
Tabla 11.- Cofeficientes de Correlación Entre el Número y Volúmen de Lesiones y Diferentes Marcadores.....	96

LISTADO DE FIGURAS

Figura 1.- Infiltración de Diferentes Tipos de Linfocitos T en el SNC.....	14
Figura 2.- Mecanismos Inflamatorios en la EM Junto con Algunas Dianas Terapéuticas.	15
Figura 3.- Proceso de Desmielinización.	17
Figura 4.- Diferentes Fenotipos Junto con Daños Asociados de EM.	21
Figura 5.- Imágenes Obtenidas por RMN Cerebral en Pacientes con EM.	26
Figura 6.- Patrones de Bandas Oligoclonales.	28
Figura 7.- Gráfico de razones de Reiber o reibergrama.	32
Figura 8.- Estructura de las Inunoglobulinas (a) y Cadenas Ligeras Libres (b).	33
Figura 9.- Las Diferentes Vías de Activación del Complemento.	39
Figura 10.- Comparación de parámetros de SIT entre casos y controles.	64
Figura 11.- Correlación entre las variables cuantitativas predictoras de SIT.	65
Figura 12.- Curvas ROC Para el Índice de Cadenas Ligeras Kappa Libres(A) e Índice de Tibbling-Link (B).	66
Figura 13.- Diagrama de Flujo del Algoritmo KRO.	69
Figura 14.- Análisis Gráfico de los Resultados del Objetivo 2.	72
Figura 15.- Desglose de Resultados de Variables Implicadas en el Modelo C.	74
Figura 16.- Integración del Algoritmo KRO y Modelo C Para Optimizar el Consumo de Bandas Oligoclonales.	75
Figura 17.- Correlograma de los Biomarcadores Cuantitativas Incluidas en el Objetivo 3, Edad y EDSS.	80
Figura 18.- Análisis Comparativo de Biomarcadores de pEM que Presentaron o no FT.	81
Figura 19.- Curvas de Kaplan-Meyer para las Variables Significativas en la Predicción de FT.	82
Figura 20.- Curvas de Kaplan Meier de los Biomarcadores que no Mostraron Significancia en el Análisis Bivariante.	84
Figura 21.- Curvas de Kaplan Meyer de las Combinaciones de Biomarcadores que no Mostraron Significancia en el Análisis Bivariante.	86
Figura 22.- Análisis Multivariado Ajustado por Género, Edad, AI, Línea de Tratamiento, Centro de Estudio y TDETI (Modelo A) Evaluando la Capacidad Predictiva de FKLCi para el Fracaso del Tratamiento.	88

Figura 23.- Análisis Multivariado Ajustado por EDSS, Género, AI, Línea de Tratamiento, Centro de Estudio y TEDIT (Modelo B) Evaluando la Capacidad Predictiva de FKLCi para el Fracaso Terapéutico.....	89
Figura 24.- Análisis Multivariado, Ajustado por Género, AI, Línea de Tratamiento, Centro de Estudio y TDETI Evaluando la Capacidad Predictiva del Modelo Basado en Si los Valores de sNfL o FKLCi Exceden sus Respectivos Terceros Cuartiles para el Fracaso del Tratamiento.	90
Figura 25.- Análisis Multivariado, Ajustado por Género, AI, Línea de Tratamiento, Centro de Estudio y TDETI Evaluando de Forma Independiente la Capacidad Predictiva del sNfL y FKLCi para el Fracaso Terapéutico.	91
Figura 26.- Análisis Comparativo de los Valores de C1q en Suero y Líquido en los Diferentes Grupos de pEM, Controles y Estratificación por Actividad.	97
Figura 27.- Estudios de Correlación Entre sC1q y lcrC1q Con Otros Parámetros.....	98
Figura 28.- Valores de C1q presentados por los pacientes del grupo ENI.....	99
Figura 29.- Valores de C1q presentados por los pacientes del grupo ENNI.....	100

INTRODUCCIÓN

1.- Definición

La esclerosis múltiple (EM) es una enfermedad crónica neuroinflamatoria de base autoinmune que provoca una desmielinización del sistema nervioso central (SNC) (1–3). Suele manifestarse entre los 25 y 30 años, especialmente en mujeres. Aunque inicialmente su curso es impredecible, termina generando una discapacidad progresiva e irreversible (4). Es la segunda causa de discapacidad en adultos jóvenes después de los accidentes de tráfico (5) y el principal motivo de discapacidad no traumática en esta población (6). Además, constituye la enfermedad autoinmune crónica con afectación neurológica más común en países desarrollados (5–7).

Los primeros informes sobre las manifestaciones patológicas de esta patología se remontan a 1838; sin embargo, no fue hasta 1863 que fueron reconocidas como EM por Jean-Martin Charcot (8). En la actualidad, casi tres millones de personas en todo el mundo la sufren, con una prevalencia media de 36 casos por cada 100.000 habitantes, cifra que actualmente está en aumento (9). A nivel europeo, alrededor de 700.000 personas se ven afectadas, con una prevalencia estimada de 83 casos por cada 100.000 habitantes (7). En España, la prevalencia es media-alta (80-180 casos/100.000 habitantes), y estas cifras han experimentado un aumento en las últimas décadas, manteniendo una clara tendencia al alza (10).

2.- El sistema nervioso central

2.1.- Neurona y células gliales

Son la unidad funcional y estructural del SNC, existen alrededor de 100 billones de ellas y un número 100 veces superior de células gliales. Las neuronas están formadas por un cuerpo celular (soma) y una prolongación filiforme denominada axón, que tiene una longitud de 0,2-25 μm y es por donde viajan los impulsos nerviosos. Los axones están rodeados de manera concéntrica por las vainas de mielina, membranas plasmáticas originadas a través de la prolongación de unas células llamadas oligodendrocitos. La función fundamental de estas estructuras es asegurar una transmisión rápida y eficiente de los impulsos eléctricos a lo largo de los axones. Tanto las neuronas como los oligodendrocitos pierden la capacidad de proliferar una vez que han alcanzado la madurez (11).

Dentro de la glía, se distinguen los oligodendrocitos (ya descritos), las células de la microglía, los astrocitos y las células endoteliales (12).

Las células de la microglía desempeñan un papel crucial como parte del sistema inmunológico, mediante su capacidad fagocítica protegen al SNC de la presencia de patógenos, células dañadas y otros elementos extraños (12). También se encargan de regular de la homeostasis del tejido nervioso, la eliminación de detritus y la secreción de factores de crecimiento y moléculas señalizadoras que pueden influir en la supervivencia y la función neuronal. Finalmente, estas células son capaces de influir en la formación, mantenimiento y eliminación de conexiones sinápticas (plasticidad sináptica) (13).

Por otro lado, los astrocitos son células radiadas que proporcionan soporte para la transmisión nerviosa, sus ramificaciones forman parte de la barrera hematoencefálica (BHE) (12). Asimismo, desempeñan un papel crucial en el suministro de nutrientes y regulación de la composición química del líquido extracelular que rodea a las neuronas, asegurando mantenimiento del entorno adecuado para el funcionamiento de las neuronas; incluyendo la absorción y liberación de neurotransmisores y otros productos químicos importantes para la comunicación neuronal. Además, los astrocitos están implicados en el metabolismo del glutamato, un neurotransmisor excitatorio, convirtiéndolo en glutamina, que luego se utiliza para la síntesis de otros neurotransmisores y como fuente de energía para las neuronas (14–16).

Finalmente, las células endoteliales sirven de revestimiento de las cavidades del SNC, participan en la producción y circulación del líquido cefalorraquídeo (LCR) y poseen propiedad regenerativas tras un daño en el SNC (17).

2.2.- Estructuras

El SNC está compuesto por el encéfalo y la médula espinal. Histológicamente, podemos encontrar dos áreas diferentes en ambas estructuras: la sustancia blanca (SB), formada por los axones de las neuronas; y la sustancia gris (SG), que se corresponde con los somas neuronales y dendritas, junto con las células gliales (18).

Introducción

2.3.- Barreras biológicas

La interfaz entre el SNC y la circulación sanguínea está constituida por una compleja estructura celular cuya función principal es ejercer un estricto control sobre las sustancias que entran y salen. Se destacan dos estructuras importantes: la BHE, presente en todos los niveles del lecho vascular cerebral, y la barrera sangre-LCR epitelial, localizada en los plexos coroides. Ambas comparten una membrana basal situada inmediatamente después del endotelio vascular. Sin embargo, la barrera sangre-LCR está compuesta por células epiteliales con uniones estrechas, mientras que la BHE se compone de células llamadas pericitos y las bases de los astrocitos. (19).

A excepción de los gases y moléculas lipófilas con peso molecular inferior a 400 Da, el intercambio de moléculas entre la sangre y el LCR está regulado por transportadores específicos y enzimas, situados especialmente en células endoteliales y pericitos (20). Análogamente, en los astrocitos predominan distintos tipo de acuaporinas y transportadores de glutamato y potasio (21).

3.- Etiología de la EM.

La causa exacta de esta enfermedad aún se desconoce. La evidencia actual sugiere que tiene un componente genético, especialmente relacionado con los genes que codifican el complejo mayor de histocompatibilidad tipo II (MHC-II), contribuyendo aproximadamente en un 10,5% al riesgo total (22). Algunos alelos de este gen, como DQA1*01:01-DRB1*15:01 y DQB1*03:01-DQB1*03:02, se han identificado como de alto riesgo (23), así como un polimorfismo en el gen que codifica para la IL-22, conocido como IL-22BP (24).

Por otro lado, estudios epidemiológicos han propuesto la infección por algunos virus linfotropos, como el *Herpes Simplex I y II*, *Herpesvirus-6*, *Rubivirus* (rubeola), *Paramoxvirus* (paperas) y *Morbillivirus* (sarampión), como factores de riesgo (25). Sin embargo, hasta ahora, el único confirmado fehacientemente es el Epstein-Barr (26,27). Otros factores asociados incluyen el tabaquismo, la obesidad, la deficiencia de vitamina D (28) y, más recientemente, algunas alteraciones en el microbioma (29).

4.- Curso natural de la EM

El curso de la EM es heterogéneo e impredecible en el momento del diagnóstico. Acontecen dos fenómenos principalmente, la inflamación y generación progresiva de discapacidad. En muchos pacientes aparecen episodios de inflamación local agudos conocidos como “brotos”, caracterizados por aparición y/o exacerbación súbita de la sintomatología neurológica con recuperación completa o parcial (4). Paralelamente, durante el curso de la EM sobreviene un desarrollo de neurodegeneración caracterizada por la atrofia cerebral y medular, así como el aumento de lesiones desmielinizantes; ello se traducirá en un incremento de la discapacidad del paciente que puede ir acompañado o no de brotes. En función de lo anteriormente descrito, distinguimos diferentes fenotipos de EM (30–32)(Véase **Figura 4**):

- Síndrome clínico aislado (CIS, de su acrónimo en inglés) y síndrome radiológico aislado (SRA): El CIS se refiere a un brote que no cumple los criterios diagnósticos de EM, mientras que el SRA se presenta cuando hay la aparición de lesiones características de la EM, pero sin sintomatología clínica. Un gran porcentaje de estos pacientes progresará a las formas que se mencionan a continuación.
- Esclerosis múltiple remitente-recurrente (EMRR): Afecta al 85-90% de los pacientes con EM (pEM). Se caracteriza por brotes seguidos de recuperación total o parcial. Existe una variante llamada SAMS (*del inglés*, Single Attack Multiple Sclerosis) en caso de que ocurra un único brote.
- Esclerosis múltiple secundaria progresiva (EMSP): Inicia como una EMRR, pero evoluciona hacia un curso de neurodegeneración continua sin la aparición de brotes. Entre el 30% y el 40% de los pacientes con EMRR progresarán a esta forma clínica. Existe controversia en cuanto a la presencia y progresión de la neurodegeneración y discapacidad subclínica desde el inicio, lo que se conoce como formas progresivas de inicio a brotes (BOPMS, *del inglés*, Bout-Onset Progressive Multiple Sclerosis).
- Esclerosis múltiple progresiva primaria (EMPP): Caracterizada por la ausencia de brotes y una progresión sostenida de la discapacidad desde el inicio de la enfermedad. Es la menos frecuente, ya que solo la presentan un 10-15% de los pacientes.

El grado de discapacidad se cuantifica mediante la escala EDSS (*del inglés*, *Expanded Disability Status Scale*) (Anexo II) (33). Una mayor EDSS al inicio de la enfermedad asocia con peor pronóstico y mayor riesgo de conversión de formas remitentes

Introducción

recurrentes a progresivas (34). Se establece una puntuación basada en síntomas y signos sugerentes de disfunción de (35):

- Sistema piramidal
- Cerebelo
- Troncoencéfalo
- Sensibilidad
- Vejiga e intestino
- Visión
- Estado cognitivo

5.- Fisiopatología de la EM

Los mecanismos fisiopatológicos de esta enfermedad no se han terminado de dilucidar. La hipótesis más aceptada es que se debe a un ataque autoinmune a distintos componentes de las vainas mielina (Tabla 1), que generan una alteración en la estructura de la misma (36–38). Ello provocará su destrucción, con la consiguiente afectación de los axones (39).

Tabla 1.- Antígenos Propuestos Como Objeto de Ataque Autoinmune en la EM.

Antígeno
Proteína básica de la mielina
Glicoproteína asociada de la mielina
Proteína proteolipídica
Transaldolasa
Proteína de superficie del oligodendrocito
Glicoproteína de la mielina del oligodendrocito

5.1.- Inmunopatología

Los linfocitos T CD4⁺ juegan un rol fundamental en la patogenia de la EM, en la que se produce un desequilibrio entre diversas poblaciones linfocitarias. Aquellas con actividad proinflamatoria, especialmente Th1 y Th17, prevalecerán sobre las poblaciones antiinflamatorias como T_{reg} y T_{reg} inducibles (40).

Inicialmente, los linfocitos T CD4⁺ naïve se activan en los folículos linfáticos periféricos al exponerse a antígenos presentados por las células presentadoras de antígenos (APC), especialmente las células dendríticas, asociadas al HLA-II. Posteriormente, se secretarán citocinas para orquestar su diferenciación hacia diversas

subclases y, finalmente, penetrarán en el SNC superando la BHE mediante la expresión de moléculas de adhesión (41,42).

Una vez en el SNC, cada subpoblación es responsable de la liberación de diversas citocinas y otros mediadores desencadenarán una cascada de respuesta inflamatoria inmune (Figura 1) (43):

- Th1, secreta TNF- α e IFN- γ , y otras citoquinas con capacidad de activación de macrófagos, células mieloides (microglía y astrocitos), además del reclutamiento de linfocitos T CD8⁺ y B (42,44).
- Los Th17 generan rotura de la BHE, activación de la microglía y astrocitos, reclutamiento y activación de CD8 y neutrófilos (45–47).
- Th9: Existen informes que sugieren que esta subclase desempeña un papel protector (48,49).
- Otras subpoblaciones recientemente descubiertas y con capacidad proinflamatoria son Th1-Like 17, con capacidad de secretar citocinas (50). Y Th22, responsable de la secreción de IL-22, que posee acción potenciadora de Th17 y de la secreción de metaloproteasas capaces de romper la BHE (42,51).

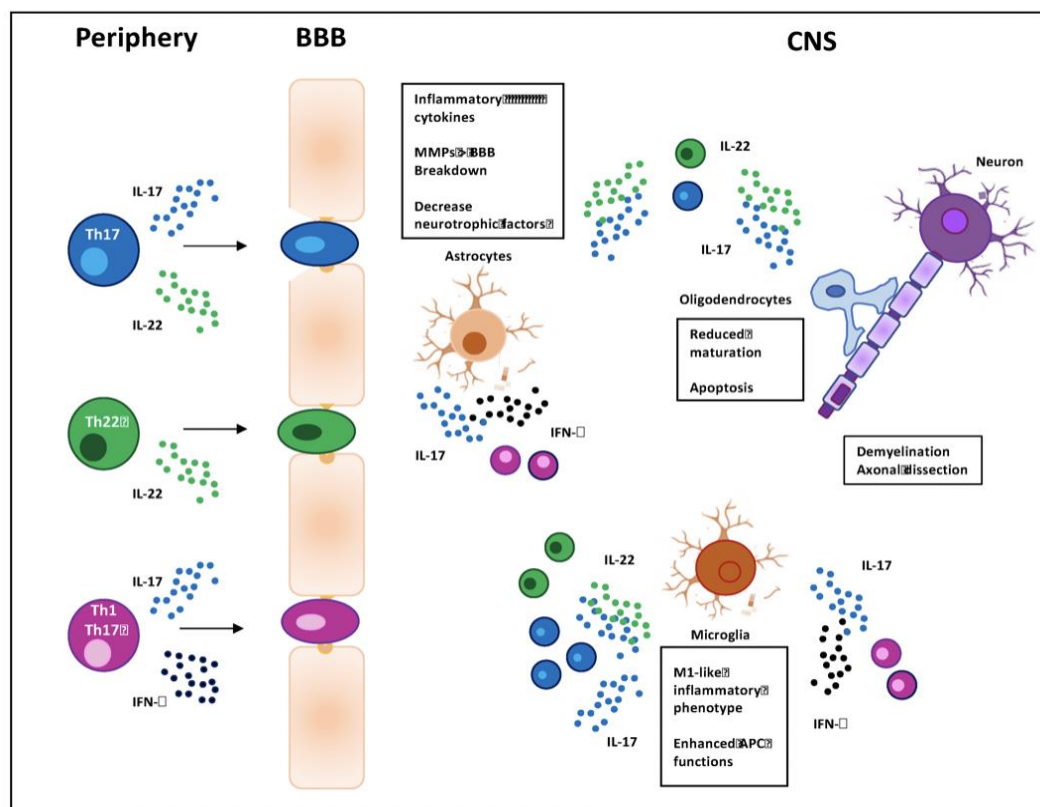


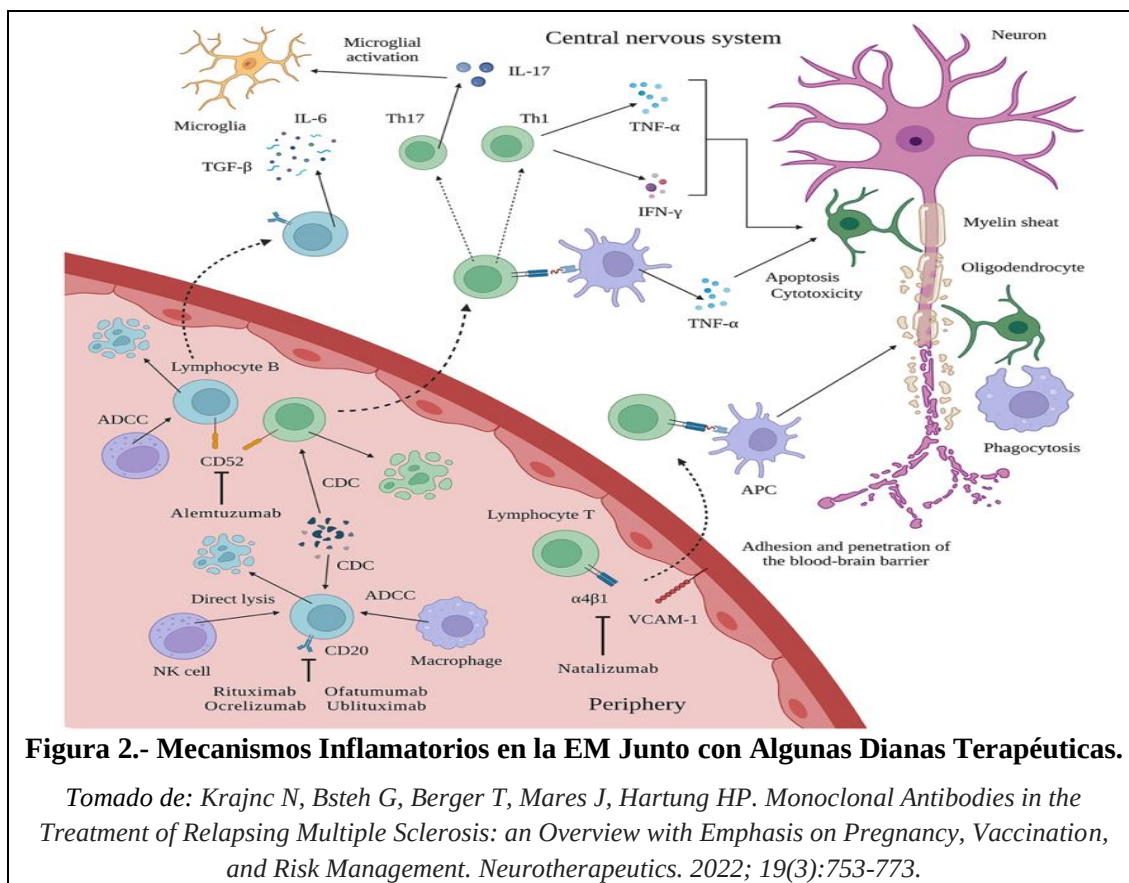
Figura 1.- Infiltración de Diferentes Tipos de Linfocitos T en el SNC

Tomado de: Kunkl M, Frasca S, Amormino C, Volpe E, Tuosto L. T Helper Cells: The Modulators of Inflammation in Multiple Sclerosis. *Cells*. 2020;9(2):482.

Los linfocitos B también desempeñan un papel clave en la patogénesis de la EM. Éstos tienden a acumularse en los espacios perivasculares de los infiltrados inflamatorios en el SNC (52,53). Una vez han penetrado a través de la barrera hematoencefálica alterada pueden desempeñar distintas funciones, siendo la más relevante la transformación en células de memoria secretoras de inmunoglobulinas (54).

Esta respuesta inmune local resulta en la síntesis intratecal de inmunoglobulinas (SIT) (Véase apartado 6), donde las células plasmáticas producen anticuerpos específicos dirigidos contra componentes del SNC. Que contribuye a la patología de la EM al causar daño directo a las células nerviosas y a la perpetuación del proceso inflamatorio.

Por otro lado, los linfocitos B que se acumulan en el SNC también pueden actuar como células presentadoras de antígeno, aumentando la respuesta inmune humoral. Además, poseen la capacidad de generar sustancias neurotóxicas y estimular auto proliferación de linfocitos T CD4+ (55–57).



La microglía y los macrófagos son componentes fundamentales para comprender la inmunopatología de la EM. Ambas células exhiben capacidad fagocítica y presentan dos fenotipos distintos: uno proinflamatorio conocido como M1 y otro antiinflamatorio denominado M2 (58).

En la EM, se observa un claro predominio del fenotipo M1. Estas células secretan diversos mediadores proinflamatorios como TNF- α , IL-6, IL-1 β o IL-23. Además, desempeñan un papel importante como células presentadoras de antígeno, facilitando el contacto entre restos de mielina y linfocitos. Las células con fenotipo M1 son las más abundantes en las características lesiones desmielinizantes del SNC. Este predominio contribuye a la inflamación y al daño en la mielina, características distintivas de la patología de la EM (59,60).

En la propagación de lesiones y neurodegeneración en SNC, la microglía desempeña un papel esencial. En su estado basal, estas células poseen miles de ramificaciones con receptores capaces de detectar daño e inflamación. Cuando se activan, adquieren el fenotipo M1 y una morfología ameboides, liberando más citoquinas proinflamatorias.

Introducción

Este proceso contribuye significativamente a la respuesta inflamatoria y al daño en el contexto de la EM (60).

Con respecto a los astrocitos, durante el curso de la EM se genera un estado de inflamación/hiperplasia conocida como astrogliosis, contribuyendo de manera significativa a los mecanismos fisiopatológicos de la enfermedad. Actúan como coestimuladores del sistema inmune al reclutar macrófagos, secretar mediadores inflamatorios, presentar antígenos (61), e interactuar bidireccionalmente con linfocitos T (62). Su activación se ha asociado con la degeneración de la barrera hematoencefálica al secretar metaloproteasas de matriz y con la disregulación del sistema glutamérgico (63). Simultáneamente, participan en la formación de cicatrices en las lesiones (64–66).

Las células T efectoras en el SNC desencadenan una cascada de eventos inflamatorios y citotóxicos que resultan en la pérdida de oligodendrocitos, desmielinización y, en última instancia, la destrucción neuronal (67).

La presencia de IL-17 e interferón γ (IFN- γ) secretados por los linfocitos Th17 y Th1 respectivamente activa la microglía y a más APC. Esto provoca la sobreexpresión del MHC de clase I y II en las APC, permitiéndoles volver a estimular las células T efectoras reactivas a la mielina. La IL-17 también induce la expresión de citoquinas proinflamatorias como IL-6, factor estimulante de colonias de granulocitos y macrófagos (GM-CSF) y TNF- α , contribuyendo aún más a la inflamación. Por otro lado, el IFN- γ tiene efectos directos, causando la muerte de oligodendrocitos. (68).

Adicionalmente, los linfocitos TCD8⁺, en respuesta a las IL-17, IL-21 e IL-22 liberada por los Th17 liberan perforinas y granzimas que generan a la destrucción de oligodendrocitos. Por otro lado, la granzima B liberada por los Th17 es capaz de interactuar con el receptor de glutamato GluR3, provocando apoptosis neuronal (68).

La vaina de mielina en la superficie axonal también sufre daños a través de diferentes mecanismos, como la acción de citocinas, la digestión de la mielina en la superficie axonal por los macrófagos y la citotoxicidad por complemento anticuerpo-dependiente (69,70). En las zonas donde ocurren estos eventos se forman las conocidas placas de desmielinización, características en la SB y SG (71).

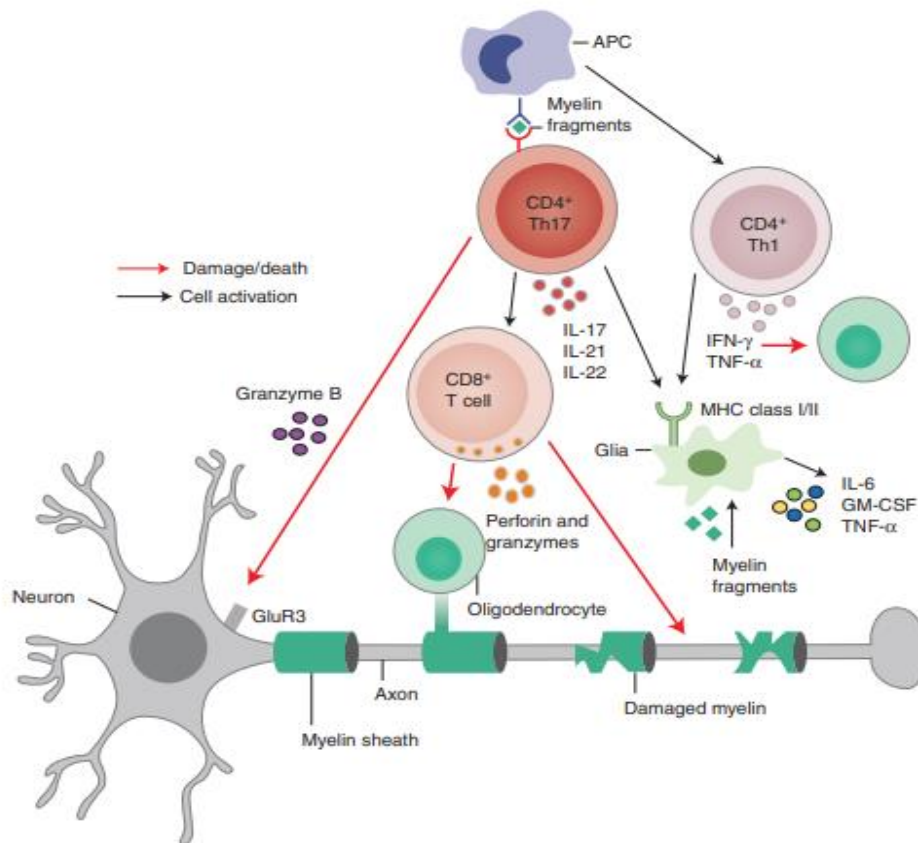


Figura 3.- Proceso de Desmielinización.

Tomado de: Kaskow BJ, Baecher-Allan C. Effector T Cells in Multiple Sclerosis. *Cold Spring Harb Perspect Med.* 2018 2;8(4):a029025.

5.2.- Destrucción axonal

Una vez se ha producido la desmielinización, los axones son sujeto de varias agresiones que conducen a su destrucción:

- En las áreas desprovistas de mielina, los antígenos presentes en la superficie axonal quedan expuestos, convirtiéndose en blancos de los linfocitos T CD8+. Que polarizan sus gránulos, cargados de perforinas y granzimas, hacia estas zonas. (28).
- La rotura de la mielina libera productos de degradación de naturaleza lipídica al medio, capaces de inducir apoptosis (61).
- Uno de los fenómenos que en primera instancia se generan es el edema, que por sí solo es capaz de generar daño neuronal (28).

Introducción

- Se producen una serie de alteraciones metabólicas originando lo que se conoce como “crisis energética”:
 - En las zonas de inflamación se producirá una hipoperfusión (72), además de la liberación de especies reactivas de oxígeno y nitrógeno (ROS y RNS) por parte de las células inmunitarias (73), que interfieren en la cadena de transporte mitocondrial y forman aniones peroxinitrito y radical superóxido, ambos capaces de producir muerte celular (72).
 - La característica elevación de glucosa en LCR reduce los niveles de oxalacetato, un inhibidor de la muerte neuronal (74).
 - Tras ser desmielinizados, los axones requieren mayor cantidad de energía para seguir manteniendo la conducción. Es por ello que las mitocondrias se desplazan desde el cuerpo neuronal hacia el axón. Sin embargo, esta demanda no puede ser compensada persistentemente, además la presencia de ROS y RNS es capaz de generar daño mitocondrial, generando un círculo vicioso “hipoxia-inflamación” (75).
- Apoptosis subsiguiente a la interacción de la granzima B (liberada por los linfocitos T CD4+) con el receptor GluR3 (68).

5.3.- Mecanismos compensatorios

Existen varios mecanismos compensatorios destinados a revertir el proceso de desmielinización y daño axonal. El más destacado es un proceso conocido como remielinización, llevado a cabo por las células progenitoras de oligodendrocitos (OPC), que son responsables de generar la mayoría de los oligodendrocitos en el adulto. Después del daño inflamatorio, las OPC se activan, migran y proliferan para intentar restaurar la mielina, generando una estructura más fina y corta que la fisiológica (76). Sin embargo, este proceso muestra una elevada variabilidad entre pacientes (77,78) y depende de la ubicación de las lesiones; por ejemplo, las periventriculares son menos susceptibles a la remielinización que las subcorticales (78,79).

Se ha demostrado que los oligodendrocitos maduros, en ausencia de OPC, muestran una sobreexpresión de genes implicados en la mielinización (80,81). Ello puede constituir

una explicación plausible a que la discapacidad no siempre se correlacione directamente con el grado de desmielinización (82).

Los fagocitos y la microglía desempeñan un cierto papel neuroprotector al fagocitar los lípidos resultantes de la destrucción de la mielina, que tienen un papel inhibitorio en el reclutamiento de OPC, además de poseer capacidad apoptótica (61). Con la edad, esta capacidad fagocítica se ve comprometida, generando un acumulo de estos productos, ricos en colesterol, cuya cristalización activa el inflammasoma, hecho que podría contribuir al desarrollo de cursos progresivos (83).

Diferentes estudios de proteómica y transcriptómica han evidenciado una profunda heterogeneidad de fenotipos de microglía y macrófagos, dependiendo de si la lesión está activa, inactiva o en remielinización (84).

A pesar de estos mecanismos compensatorios, el estado de inflamación crónica genera fenómenos como disfunción mitocondrial, anulación de las señales neuroprotectoras, resultando en la pérdida de capacidad para reparar la desmielinización y daño axonal. Los brotes se caracterizan por una elevada actividad inflamatoria, asociada a la acción del sistema inmunitario adaptativo (linfocitos T); mientras que las fases más progresivas se deben a la inmunidad innata y humoral, así como a fenómenos de disfunción mitocondrial, anulación de señales neuroprotectoras y pérdida de capacidad para reparar la desmielinización (69,85,86). Como resultado, se producirán bloqueos eventuales en la transmisión nerviosa y lesiones irreversibles en el SNC (87). No obstante, aún se desconocen los mecanismos exactos que conducen a la evolución de cursos RR a progresivos.

5.4.- Barrera hematoencefálica

La BHE también sufre alteraciones durante el transcurso de la enfermedad. Durante las fases iniciales, es característica su ruptura junto con la infiltración de células inmunitarias. Los mecanismos que conducen a la disfunción de la BHE no se comprenden completamente, aunque se cree que son una consecuencia de la neuroinflamación (88). De hecho, en un estudio con células madre pluripotentes diferenciadas in vitro a células similares a las células endoteliales microvasculares cerebrales se encontró que aquellas derivadas de pEM mostraron una integridad de las uniones, propiedades de barrera y actividad de bomba de eflujo reducidas en

Introducción

comparación con las células derivadas de personas sanas. Además de un fenotipo inflamatorio con aumento de la expresión de moléculas de adhesión e interacciones con células inmunitarias (89).

Sin embargo, en fases más avanzadas, se ha observado una reducción de la permeabilidad de la misma, ya que la respuesta inflamatoria tiende a limitarse en el interior del SNC. Fenómeno que también se asocia con la falta de respuesta a los tratamientos específicos (71,90).

5.5.- Patología

El proceso de desmielinización y la subsiguiente cicatrización astrocítica, previamente descritos, generan las características lesiones en el SNC. Estas tienden a aparecer alrededor de la SB periventricular, las uniones de la SB y SG yuxtacorticales, en regiones infratentoriales y en la médula espinal. Las lesiones pueden clasificarse en dos tipos: activas, cuando existe actividad inflamatoria en el momento de su hallazgo, y crónicas, si no se evidencia dicha actividad (71,91).

Paralelamente, la destrucción axonal genera un consiguiente aumento del contenido de agua, resultando en una pérdida de tejido del sistema nervioso central conocida como atrofia (92,93). Aunque no existe un claro consenso sobre los mecanismos exactos que la producen, se ha postulado que puede deberse a una expansión de las lesiones crónicas (94) y es la principal responsable de la neurodegeneración (95,96).

La atrofia tiene un carácter regional, afectando más a la sustancia SG y al cerebelo (97); por el contrario, se ha demostrado que la SB experimenta un proceso de desmielinización menor en las diferentes áreas del SNC (94). La médula espinal también sufre atrofia en la EM, especialmente a nivel cervical (99).

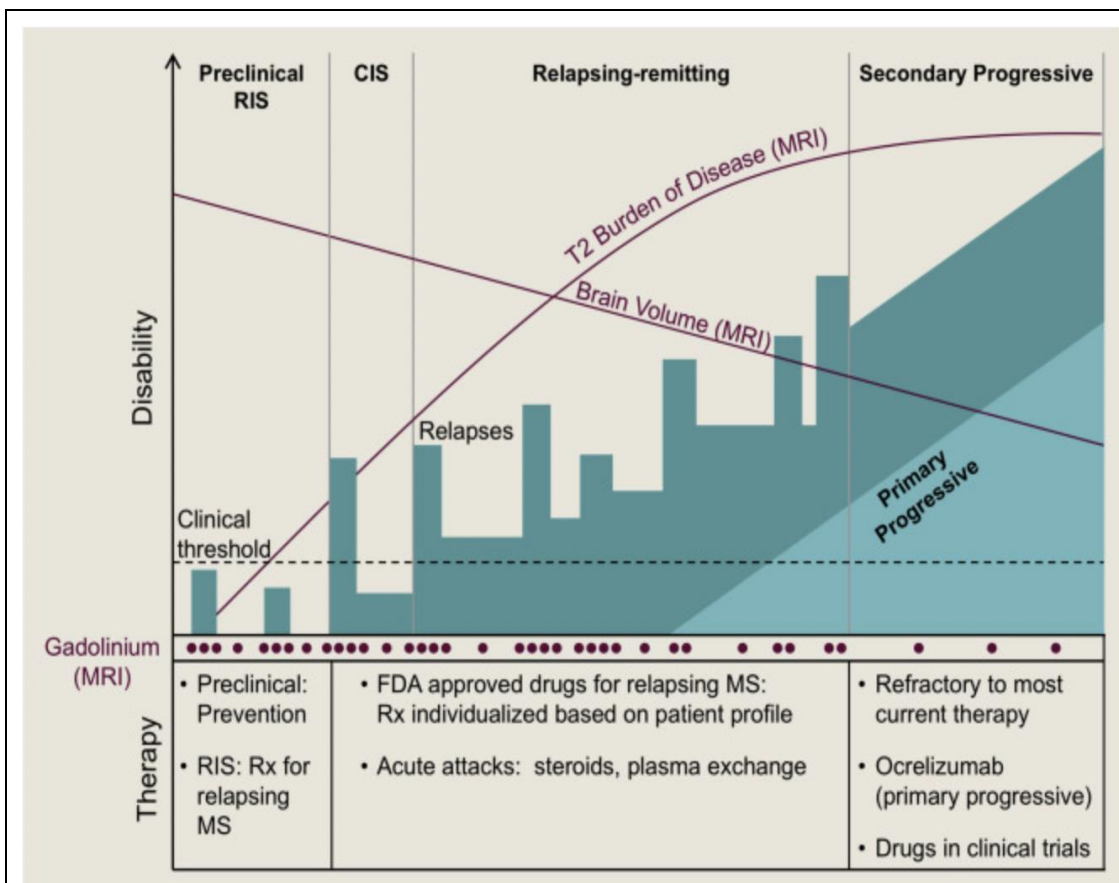


Figura 4.- Diferentes Fenotipos Junto con Daños Asociados de EM.

Se muestra la progresión de la enfermedad en color azul, las líneas violetas reflejan el aumento de lesiones y pérdida de volumen cerebral ocasionado por la creciente atrofia a lo largo del curso de la enfermedad. En el eje de ordenadas se representa la discapacidad. Finalmente, se puede observar cómo se reduce el número de lesiones activas (evidenciadas mediante captación de contraste gadolinio) en las formas progresivas. De forma adicional, en la parte inferior aparecen algunos de los tratamientos empleados en las distintas etapas de la enfermedad.

Tomado de: Baecher-Allan C, Kaskow BJ, Weiner HL. Multiple Sclerosis: Mechanisms and Immunotherapy. Neuron. 201;97(4):742-768.

6.- Síntesis Intratecal de Inmunoglobulinas

La SIT restringida al SNC es un proceso secundario a la infiltración de linfocitos B desde el torrente sanguíneo, donde estos proliferan y maduran localmente. Este fenómeno puede indicar una inflamación aguda del SNC o un proceso inflamatorio crónico autoinmune.

En un proceso inflamatorio, es característica una síntesis inicial de IgM, seguida de un cambio (switch) a IgG. Sin embargo, el patrón de expresión de la SIT posee la

Introducción

peculiaridad de mantenerse constante en el tiempo, a pesar de que en otros órganos linfoides se produzcan cambios en el subtipo liberado.

Esta falta de cambio de clase refleja el bajo nivel de células reguladoras en el LCR y la impermeabilidad que ofrece la BHE al paso de inmunoglobulinas desde el LCR al torrente circulatorio pese a su alteración (100).

7.- Diagnóstico

El diagnóstico de la EM se basa en los reconocidos criterios de McDonald, los cuales consideran síntomas y signos clínicos característicos, así como la presencia de lesiones típicas en el SNC evidenciadas mediante estudios de RMN cerebral. Además, se tiene en cuenta la presencia de bandas oligoclonales de tipo IgG (BOCG) en el LCR (101). La información radiológica está basada en la demostración de los fenómenos de (102):

- Diseminación temporal (DIT): Basados en la evaluación de las lesiones con realce de contraste en estudios de RMN. Consiste en la aparición de al menos una nueva lesión que realce contraste con gadolinio, junto con otras lesiones sin realce, sugiriendo un desfase temporal entre ellas. Destáquese que la captación de gadolinio señala actividad actual por parte del sistema inmunológico en estas lesiones; mientras que las que no lo captan son indicativas de actividad pasada.
- Diseminación espacial (DIS): Implica la evidencia de lesiones en al menos dos áreas separadas del SNC, incluyendo el cerebro, médula espinal y nervio óptico.

De acuerdo con la revisión más reciente de los criterios de McDonald en 2017 (Anexo III), la presencia de BOCG en LCR sustituye el criterio DIT (101,103). Según datos aún no publicados, se prevé que en los nuevos criterios de 2024 se incluya el índice de cadenas ligeras kappa libres (FKLCi) como un sustituto de las BOCG.

8.- Tratamiento.

La EM es una enfermedad para la cual no se dispone de cura. El objetivo principal de los tratamientos es prevenir la aparición de brotes y ralentizar la progresión de la discapacidad, razón por la cual estos tratamientos reciben el nombre modificadores de la enfermedad (TME) (104). Deben iniciarse tras el primer brote o en el momento del

diagnóstico de una clínica PP (101). Son bastante eficaces en las formas de RR y las formas progresivas que presentan inflamación, ya sea en forma de brotes o lesiones con actividad. Se ha demostrado que la administración temprana reduce el número de brotes, la aparición de lesiones y previene la discapacidad (105). Sin embargo, no son capaces de evitar la neurodegeneración ni la acumulación de discapacidad en formas progresivas a largo plazo (106,107).

La estrategia terapéutica actual se basa en una serie de moléculas con actividad inmunosupresora, estratificadas en dos líneas de tratamiento. Cuya elección se fundamenta en criterios clínicos, como el fenotipo de EM, la agresividad, el número de brotes anuales o la respuesta subóptima a una línea anterior, así como en criterios radiológicos (108).

Los de alta eficacia son aquellos que generalmente se prescriben inicialmente y son considerados como opciones de bajo riesgo con efectos secundarios más manejables. Estos tratamientos son típicamente utilizados en casos menos graves de EM o en las primeras etapas de la enfermedad. Suelen tener un efecto más moderado en el sistema inmunológico, en lugar de suprimirlo de manera intensa, trabajan para modular y regular la respuesta inmunológica. Por lo que tienden a tener perfiles de seguridad más favorables con menos riesgo de efectos secundarios graves. Se trata de principios activos convencionales como, acetato de glatirámico, fingolimod, fampirida o teriflunomida. Por el contrario, los tratamientos de alta eficacia actúan de manera más contundente en la modulación del sistema inmunológico y pueden estar asociados con un mayor riesgo de efectos secundarios. Ejemplos de tratamientos de alta eficacia incluyen los anticuerpos monoclonales ocrelizumab, alemtuzumab, natalizumab (105,109).

En el contexto de la EMRR, la respuesta a los tratamientos varía ampliamente, y es común que los pacientes necesiten cambiar a opciones de alta eficacia. En la actualidad, la toma de decisiones para identificar una respuesta subóptima al tratamiento y, por consiguiente, sustituirlo por uno más efectivo, se apoya en la pérdida o el mantenimiento del estatus NEDA3 (*del inglés, No Evidence of Disease Activity*), basados en la ausencia de aparición de nuevos brotes, de nuevas lesiones con realce de gadolinio o el incremento de la carga lesional en T2 y progresión de la discapacidad independiente de brote (PIRA) (110).

9.- Biomarcadores

9.1.- Marcadores de imagen

Desde su introducción en la década de los 80, la resonancia magnética nuclear (RMN) se ha consolidado como una herramienta fundamental en el estudio de diversas enfermedades neurológicas (111). Gracias a los avances tecnológicos, se ha convertido en un componente clave para el diagnóstico de la EM (91).

Todas las manifestaciones patológicas mencionadas pueden observarse mediante estudios de RMN en el cerebro y la médula cervical. Se emplean principalmente dos tipos de técnicas que difieren en su capacidad para medir la magnetización longitudinal (T1) o transversal (T2) (111):

- Secuencias de eco y giro y gradiente ponderadas en T1 y compromiso de la BHE (T1): Estas secuencias distinguen las estructuras que contienen moléculas ricas en lípidos, y como la mielina posee esta cualidad, permiten la visualización de las estructuras del SNC con excelente resolución. También posibilitan la diferenciación entre la SB y la SG, ya que la primera es mucho más rica en lípidos. Por lo tanto, estas secuencias son eficaces para el estudio de la atrofia de los componentes cerebrales y medulares. Además, las secuencias T1 con realce de gadolinio permiten la evaluación de lesiones agudas con inflamación y ruptura de la BHE (91).
- Secuencias de giro e inversión ponderadas en T2 (T2): En estas secuencias, los lípidos ya no se perciben como una señal de alta intensidad, mientras que el líquido se destaca. De esta manera, se pueden visualizar lesiones crónicas en la SB. Existe un tipo especial de secuencia T2 llamada FLAIR, que anula las señales procedentes del LCR para un estudio más preciso de las lesiones (112).

Estas técnicas han posibilitado una cuantificación precisa de los volúmenes de diversas regiones cerebrales, como el cerebelo, el parénquima cerebral y el tálamo, entre otras. Además, posibilitan la discriminación entre SB y SG, diferenciando entre las capas profunda y superficial. Facilitan la medición de los volúmenes de las lesiones, que suelen ser hipercaptantes de gadolinio en pacientes con EMRR, especialmente en estadios tempranos (71). Asimismo, estos avances han posibilitado el cálculo del

porcentaje de cambio de volumen cerebral (PBVC, *por sus siglas en inglés, Percentage of Brain Volume Change*) en caso de disponer de dos o más estudios de resonancia magnética cerebral en diferentes momentos temporales (99).

Durante el primer episodio clínico, se ha observado que las lesiones no activas en áreas infratentoriales, medulares e hipercaptantes de gadolinio se asocian con mayor discapacidad en los 5-7 meses siguientes al ataque (113–116). En pacientes pediátricos, las lesiones en el nervio óptico se han señalado como indicativas de una discapacidad más pronunciada (113). Además, las lesiones en la médula se han vinculado a una mayor frecuencia de brotes (117).

Los cambios en el volumen cerebral han también han demostrado ser de relevancia clínica en la EM como indicador de pérdida irreversible de tejido; es decir, atrofia cerebral (84). Ésta tiende a aumentar aproximadamente entre un 0,5% y 1% anual (118), varios estudios han mostrado consistentemente que las tasas de atrofia cerebral son más altas en pacientes con EM que en sujetos sanos desde las etapas más tempranas de la enfermedad (84). Adicionalmente, se ha vinculado con una discapacidad más acentuada en el futuro, así como con un mayor riesgo de experimentar un segundo episodio clínico y la conversión de un SCA a EMCD (119,120). En la actualidad, el PBVC es el parámetro de mayor interés para evaluar el proceso de atrofia cerebral in vivo (121).

La atrofia medular, que supera a la cerebral, ocurre a un ritmo de aproximadamente el 2% anual y es responsable de la disfunción motora, sensorial y autonómica (35,36). Se ha convertido en un marcador útil para la diseminación espacial en el diagnóstico y también es un parámetro interesante en la evaluación del curso de la enfermedad y la progresión de la discapacidad, mostrando una proporción directa con los niveles de atrofia medular (123–125). Parece que medir la variación de la atrofia medular durante el primer año predice de manera más significativa la discapacidad a corto plazo (126).

Niveles más altos de atrofia en la SG se han relacionado con una mayor carga lesional en la SB (127,128). Sin embargo, la atrofia medular es independiente de la carga lesional en esta área (129).

Hasta la fecha, no se ha establecido una relación entre la atrofia cerebral con el riesgo de conversión a formas SP (130). La atrofia medular, de hecho, se ralentiza tras la conversión de formas RR a SP (119,124). No obstante, se han observado niveles

Introducción

mayores de atrofia en el tálamo en pacientes con formas SP (124). En cuanto al curso PP, es importante destacar que tanto las lesiones como la atrofia medular al inicio de la enfermedad son mayores que en las formas recurrentes (127).

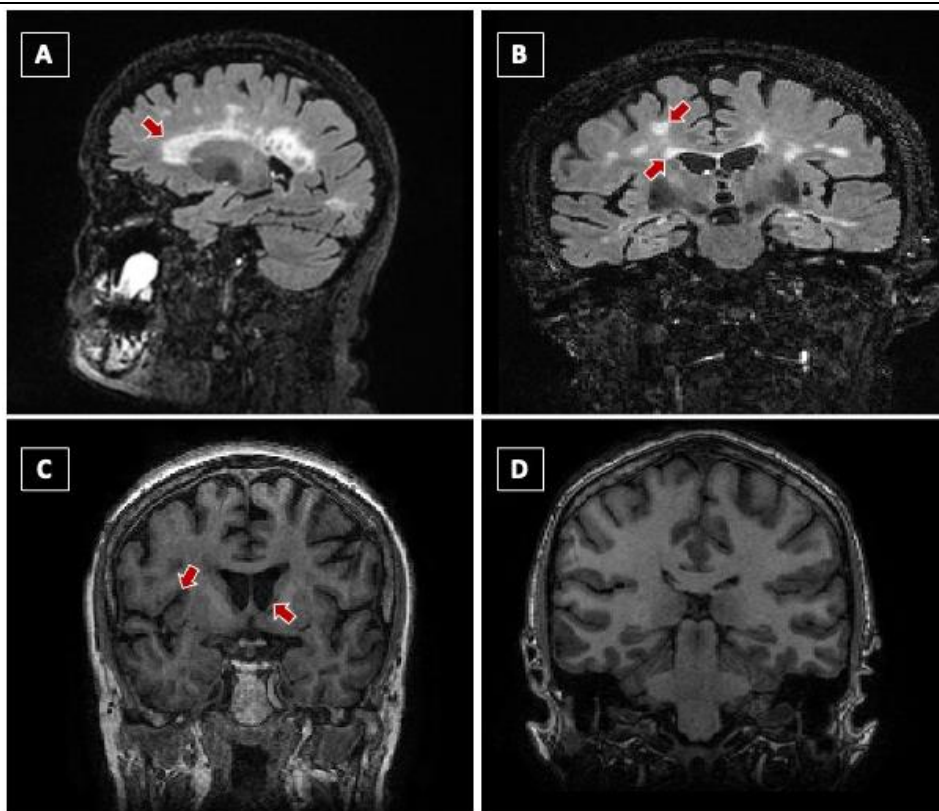


Figura 5.- Imágenes Obtenidas por RMN Cerebral en Pacientes con EM.

A y B muestran una alta carga lesional en T2; C se corresponde con un cerebro con elevada atrofia y D pertenece a un sujeto sin atrofia ni lesiones.

Más recientemente, surge el concepto de edad cerebral, basado en combinar la relación entre la enfermedad y el envejecimiento estructural normal del cerebro para comprender mejor el impacto de la EM. La diferencia entre la edad real de una persona y la edad cerebral predicha (llamada brecha de edad cerebral o brain-PAD) se considera un índice ajustado por edad que refleja la salud estructural del cerebro. Para la determinación de este parámetro, se han usado secuencias en 3D ponderadas en T1 y algoritmos de aprendizaje machine learning, comparando el estado del paciente con el de la población normal (131,132).

La introducción de nuevas secuencias de resonancia magnética, conocidas como mapeo de susceptibilidad cuántica, ha permitido la detección de lesiones no realzantes con un

borde paramagnético, las cuales se denominan anillos paramagnéticos. Que un subtipo de lesiones crónicas activas que se caracterizan por la presencia persistente de actividad de microglía/macrófagos en sus bordes y se han asociado con progresión de la discapacidad (84,133).

Otro tipo interesante de lesiones son las de expansión lenta. Se caracterizan por no mostrar realce con gadolinio en las imágenes de resonancia magnética y aumentar gradualmente de tamaño tanto en dirección radial como lineal durante un período de 1 a 2 años. Se identifican utilizando algoritmos de procesamiento de imágenes que analizan los cambios en las imágenes ponderadas en T1 y T2-FLAIR a lo largo del tiempo. Se ha observado que estas lesiones están presentes tanto en los fenotipos RR como en los progresivos. Además, se han asociado con la progresión de la enfermedad en seguimientos a largo plazo, aunque aún no hay un consenso claro al respecto (134,135)

9.2.- Marcadores bioquímicos

El estudio del líquido cefalorraquídeo (LCR) es de gran relevancia para la investigación de la EM, ya que permite identificar los marcadores sintetizados intratecalmente. Un factor relevante en la determinación de marcadores en el LCR es la integridad de la BHE la cual se puede evaluar mediante el cociente de albúmina en LCR y suero (Q_{alb}). Este coeficiente representa la proporción entre la concentración de albúmina en el LCR y la concentración en suero (136). La albúmina es una proteína de síntesis hepática que, en condiciones normales, se encuentra únicamente en la sangre. Su presencia en el LCR indica una alteración en la BHE y está directamente relacionada con el grado de afectación de esta barrera (137).

9.2.1.- Bandas oligoclonales

Las bandas oligoclonales (BOC) son patrones generados por las inmunoglobulinas al ser separadas de otras proteínas. Este proceso se lleva a cabo mediante isoelectroenfoque, y su visualización se logra a través de métodos como tinción de plata, inmunofijación o inmunoblotting. Se distinguen dos tipos de BOC según el subtipo de inmunoglobulina que estudian: las de IgG (BOCG) y las de IgM (BOCM). Su presencia en el líquido cefalorraquídeo y su ausencia en el suero indican SIT (Figura 6) (138).

La presencia de BOCG en LCR se registró como un criterio diagnóstico de EM según la revisión de los criterios de McDonald de 2010 (139). En la revisión más reciente de

Introducción

2017, se equipararon a los estudios de RMN, ya que su presencia en LCR se consideró que podía reemplazar a la DIT (101,103) (Anexo III).

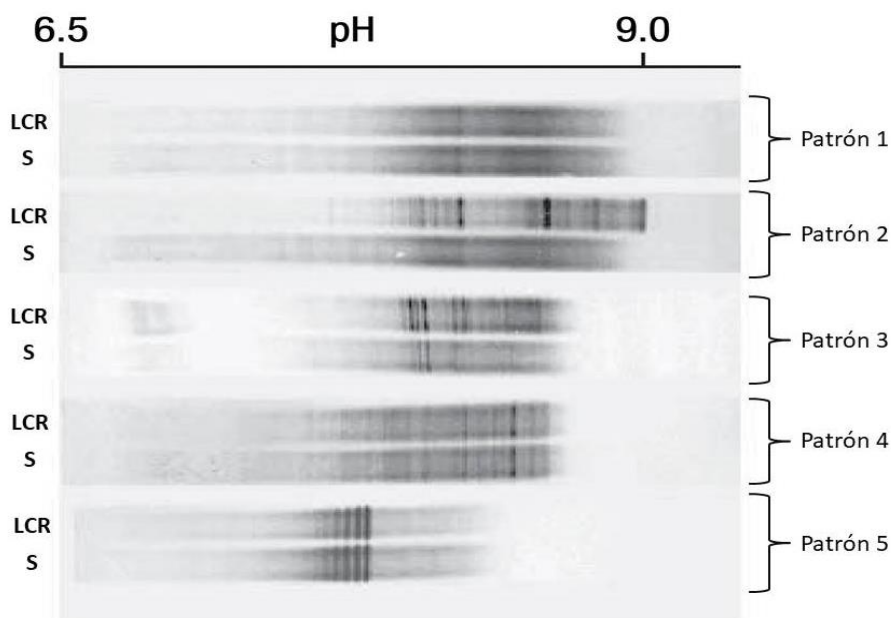


Figura 6.- Patrones de Bandas Oligoclonales.

LCR: Líquido cefalorraquídeo; S: Suero

- 1: Patrón policlonal en el suero y el LCR. No se identifican bandas individuales en el suero ni en el LCR. Presente en sujetos sanos.
- 2: Bandas oligoclonales presentes en LCR pero no en suero. Sugiere una SIT de forma aislada. Característico en la EM.
- 3: Presencia de BOC en suero y en LCR, pero con bandas adicionales en este último (Patrón “más que”). Es indicativo de respuesta sistémica además de intratecal. Se detecta en la EM e infecciones del SNC.
- 4: Patrón de BOC idéntico en LCR y suero (Patrón “en espejo”). Es indicativo de una respuesta oligoclonal sistémica con paso de las inmugoglobulinas del suero al LCR. Por tanto, no hay producción intratecal. Es característico en procesos autoinmunes, paraneoplásicos y polineuropatías periféricas autoinmunes (Guillain-Barré), pero no en EM.
- 5: Patrón monoclonal en el suero y el LCR. Presencia en suero y LCR de 3 a 5 bandas espaciadas regularmente, siendo más prominentes las que están cerca del cátodo. Característico de paraproteinemias. No sugiere síntesis intratecal

Modificado de: Freedman MS, Thompson EJ, Deisenhammer F, Giovannoni G, Grimsley G, Keir G, Ohman S, Racke MK, Sharief M, Sindic CJ, Sellebjerg F, Tourtellotte WW. Recommended standard of cerebrospinal fluid analysis in the diagnosis of multiple sclerosis: a consensus statement. Arch Neurol. 2005;62(6):865-70.

Un elevado porcentaje de pEM presenta positividad para las BOCG (140), siendo la técnica Gold Standard para la demostrar de presencia de síntesis intratecal de IgG (SIT-IgG) actualmente (141). Además, su presencia en LCR conlleva un mayor riesgo de

conversión de SCA a EM clínicamente definida (142). Algunos autores incluso han propuesto este parámetro como un predictor de un curso de la enfermedad más desfavorable (141), sin embargo, la utilidad pronóstica de las BOCG está limitada debido a su alta prevalencia en pEM (141). En la próxima actualización de los criterios de McDonald, se contempla que un RIS con presencia de BOCG se clasifique como esclerosis EM y requiera tratamiento (datos no publicados).

Las BOCG no son un marcador completamente específico de la EM, ya que pueden manifestarse en otras patologías (101). Un reciente metaanálisis que incluyó 32 estudios informa de una sensibilidad del 54% al 97%, mientras que la especificidad varía entre el 74% y el 100% (143). Asimismo, su determinación es un proceso laborioso e intrincado que requiere personal capacitado, y los resultados son de interpretación subjetiva. Por ende, esta técnica no está disponibles en todos los laboratorios clínicos, sino solo en aquellos de referencia y más especializados, que cuentan con personal entrenado para llevar a cabo la técnica.

Por otro lado, la SIT de IgM (SIT-IgM) evidenciada por BOCM, solo la presentan un 35-45% de pEM y se ha relacionado con cursos más desfavorables (144,145). En el marco de las formas RR, este fenómeno se ha asociado con una clínica más agresiva, mayor número de brotes (146), discapacidad a largo plazo, así como una probabilidad más elevada de conversión a EMSP (147,148).

Debido a la estructura pentamérica de la IgM y su menor concentración en LCR (100 veces inferior a la IgG), la detección de las BOCM implica un procedimiento más tedioso en comparación con las BOCG (149).

Se destaca la existencia de una versión más específica y avanzada de las BOCM conocida como BOCM lípido específicas (BOCM-LE) que consiste en detectar solo las IgM que reaccionan contra lípidos presentes en la mielina, especialmente la fosfatidilcolina, cuya asociación con los peores pronósticos parece ser más robusta (150).

9.2.2.- Cuantificación de síntesis intratecal de inmunoglobulinas mediante fórmulas matemáticas

Se han propuesto alrededor de 20 fórmulas para la cuantificación de la SIT, categorizadas en dos grupos: lineales y no lineales. Las fórmulas lineales, como el índice de IgG o de Tibbling-Link (Link), y los índices de IgA, IgM, IgE y cadenas

Introducción

ligeras, se basan en cocientes o razones. En contraste, las fórmulas no lineales, como la Thompson, Schuller, Felgenhauer, los índices ampliados de Ohman y la fórmula de Reiber, no siguen una distribución lineal (151).

Fórmulas o índices lineales

Constituyen un método semicuantitativo de determinar la SIT-IgG. El índice de Link, se basa en un cálculo lineal basado en dividir el cociente de IgG en LCR y suero (Q_{Ig}) entre Q_{alb} (152):

$$Link = \frac{IgG_{LCR}/IgG_{Suero}}{Albúmina_{LCR}/Albúmina_{Suero}}$$

Link, con un umbral patológico establecido en 0,6-0,7 (153), señala la posible presencia de SIT, y en ciertos casos, puede anticipar la aparición de BOCG (154). Aunque este parámetro puede elevarse en un 45%-80% de los pEM, no debe considerarse como un sustituto de las BOCG (101,153,155).

Con respecto al índice de IgM (IgMi) -calculado de manera similar al anterior, pero con la IgM-, su uso es menos frecuente. Aunque puede ser una herramienta complementaria en el diagnóstico de la EM y contribuir a la evaluación de la actividad inflamatoria en el SNC, la falta de estudios específicos limita su respaldo. Al igual que el índice de Link, no es específico de la EM y puede estar presente en otras condiciones patológicas (156). Hasta la fecha, no se ha evaluado su capacidad para predecir la aparición de BOCM.

$$IgMi = \frac{IgM_{LCR}/IgM_{Suero}}{Albúmina_{LCR}/Albúmina_{Suero}}$$

Fórmula de Reiber

Es un modelo matemático que se fundamenta en la teoría de la difusión molecular y el flujo del LCR. Su premisa principal sostiene que la disminución en la velocidad del flujo siempre se acompaña de un aumento en la difusión molecular de la sangre hacia el LCR (157).

Para llevar a cabo cálculo, también se hace uso de Q_{Ig} y Q_{alb} , pero teniendo en cuenta más factores. Inicialmente se calcula un parámetro denominado Q_{lim} , que representa un 0% de SIT. Para cada subtipo de inmunoglobulina se utiliza una ecuación diferente (148,158):

$$Q_{lim}(IgG) = \frac{[0,93 \cdot (Q_{alb}^2 + 6)^{0,5} - 1,7]}{1000}$$

$$Q_{lim}(IgA) = \frac{[0,77 \cdot (Q_{alb}^2 + 23)^{0,5} - 3,1]}{1000}$$

$$Q_{lim}(IgM) = \frac{[0,67 \cdot (Q_{alb}^2 + 120)^{0,5} - 7,1]}{1000}$$

Un valor de Q_{lim} inferior a Q_{Ig} es indicativo de SIT, en este caso se calcula su porcentaje (IgIF%) mediante las siguientes funciones (148):

1º.- Cálculo de Ig_{LOC} :

$$Ig_{LOC} = (Q_{Ig} - Q_{lim}) \cdot Ig_{suero}$$

2.- Cálculo de IgIF% utilizando el parámetro del paso anterior:

$$IgIF\% = (Ig_{LOC} / Ig_{LCR}) \cdot 100$$

Asimismo, los cálculos pueden llevarse a cabo visualmente mediante la representación de los puntos en el gráfico de razones de Reiber o Reibergrama (158).

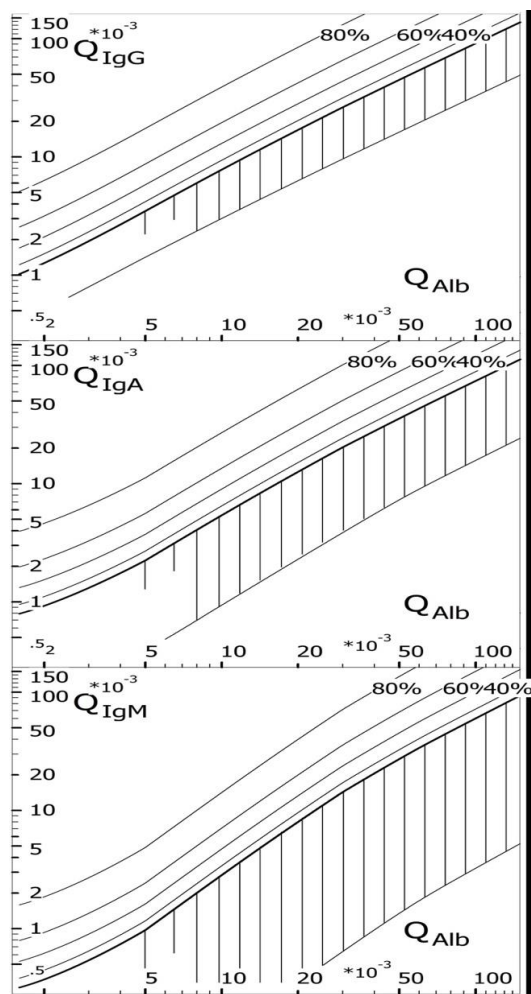


Figura 7.- Gráfico de razones de Reiber o reibergrama.

Formados por:

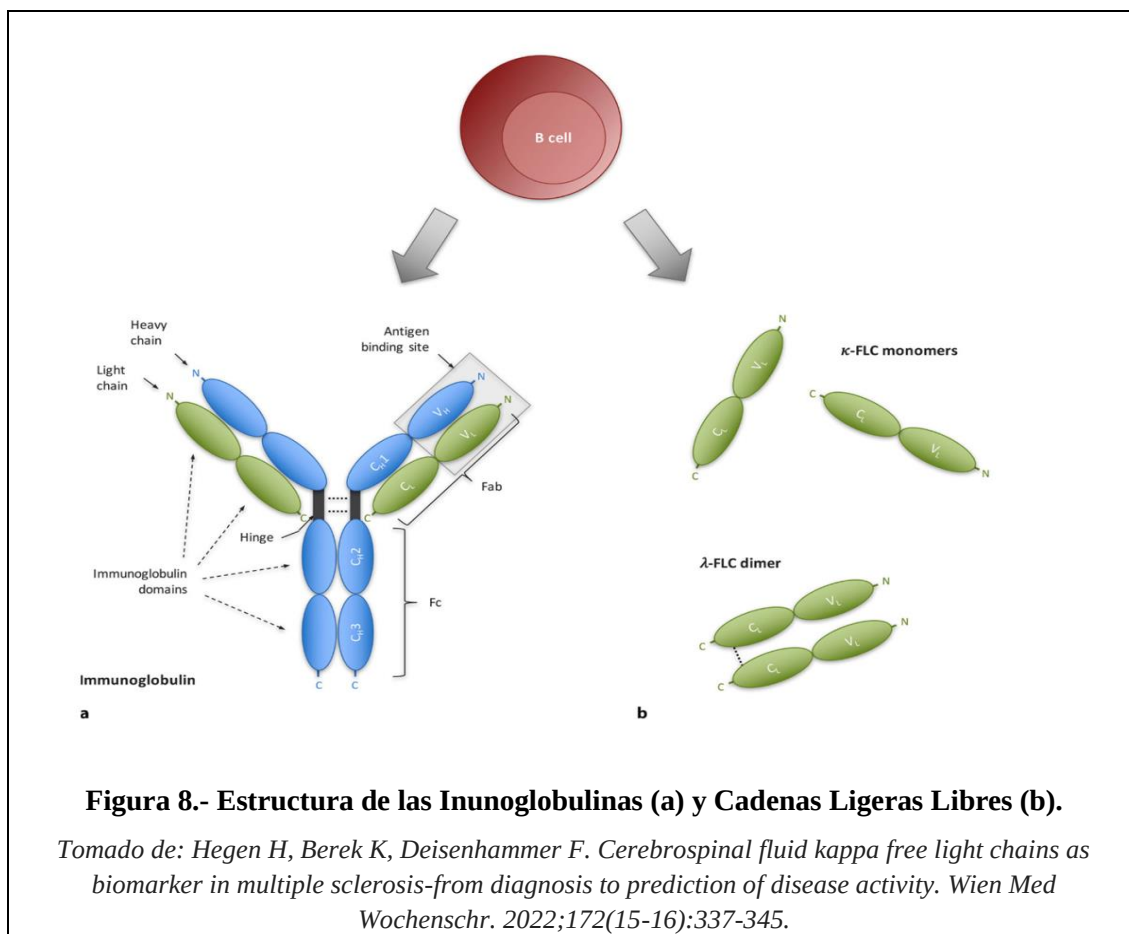
- Unas líneas verticales que indican los rangos de referencia en función de la edad para Q_{alb} .
- Una línea hiperbólica discriminadora, que viene dada por Q_{lim} , que separa la fracción de proteínas derivadas de la sangre con las sintetizadas intratecalmente.
- Unas líneas de puntos que indican el IgIF% (20%, 40%, 60% y 80%) y se calculan a partir del 0%.
- Los rangos de referencia se sitúan entre la línea discriminadora superior (Q_{lim}) representada con una línea más gruesa y el borde inferior (Q_{bajo}), que está representada por una línea más fina (151).

Existen pocas investigaciones sobre el rol de este parámetro en la EM. Al igual que las BOC, se ha propuesto que la aplicación de estos cálculos para la IgG (Reiber IgG) posee un gran potencial para predecir la aparición de BOC (100); mientras que la SIT de IgM evidenciada mediante Reibergrama (Reiber IgM) se ha asociado con peores cursos (146).

Estas ecuaciones son métodos mucho más sencillos y económicos que las BOC para determinar la SIT. Simplemente se necesitan sus concentraciones y las de albúmina tanto en suero como en LCR, cuya determinación se realiza de forma rutinaria mediante los autoanalizadores de los laboratorios clínicos. Además, se han desarrollado software que realizan los cálculos no lineales y representan los resultados en Reibergramas de manera automática (159).

9.2.3.- Cadenas ligeras Kappa Libres

Las inmunoglobulinas humanas están compuestas por una estructura simétrica de 4 cadenas polipeptídicas, dos cadenas pesadas y dos ligeras, ambos subtipos idénticos para cada inmunoglobulina. Existen 5 clases diferentes de cadenas pesadas (γ , μ , α , ϵ y δ), que determinan el isotipo de inmunoglobulina (IgG, IgM, IgA, IgE, IgD respectivamente); pero únicamente dos de ligeras, las kappa (κ) y las lambda (λ). Cada inmunoglobulina contiene un solo tipo de cadena ligera (κ o λ), dependiendo de la especie abundará más una u otra (160).



Introducción

Las cadenas ligeras se producen en los linfocitos B en un exceso de entre el 10 al 40% respecto a las pesadas. Cuando se liberan al torrente sanguíneo, la mayor parte de ellas se asocia a las pesadas para formar las inmunoglobulinas; sin embargo un pequeño porcentaje permanecerá sin enlazarse recibiendo el nombre de cadenas ligeras libres (161). Dado su elevado aclaramiento renal, éstas poseen una semivida baja (3-6 horas las κ y 2-4 horas las λ) (162), de hecho fueron descubiertas el 1847 cuando Henry Bence Jones las precipitó en la orina de un paciente con “fuertes dolores óseos” utilizando ácido nítrico (163). Es por ello que los niveles séricos son inferiores a los de las inmunoglobulinas en condiciones normales, aunque en algunas patologías como la amiloidosis o discrasias sanguíneas de células plasmáticas sus valores se verán aumentados en suero (161–164).

Las cadenas ligeras kappa libres (FKLC, *del inglés Free Kappa Light Chains*) circulantes existen en forma de monómeros y poseen un peso molecular de aproximadamente 24 kDa (160); mientras que las lambda aparecen formando dímeros y su peso molecular es de 44-55 kDa (165).

El FKLCi refleja actividad intratecal de células plasmáticas, puede determinarse del mismo modo que los índices lineales previamente expuestos -mediante la relación FKLC LCR/Suero dividiendo entre el promedio albúmina LCR/Suero- (166).

$$\text{FKLCi} = \frac{\text{FKLC}_{\text{LCR}} / \text{FKLC}_{\text{Suero}}}{\text{Albúmina}_{\text{LCR}} / \text{Albúmina}_{\text{Suero}}}$$

La importancia de las FKLC en la EM ha sido reconocida desde hace décadas (167). No obstante, los métodos para su determinación eran complejos y no ofrecían la sensibilidad adecuada para analizar las bajas concentraciones en el LCR. Gracias a los nuevos inmunoensayos, se ha logrado automatizar su determinación (168,169).

Numerosos estudios han evidenciado que las FKLC ofrecen un paradigma diagnóstico más coste-efectivo en comparación con las BOCG. A pesar de que las sensibilidades y especificidades presentadas por ambas técnicas son variables, en muchas ocasiones las FKLC muestran una mayor precisión en la predicción de SIT. Además, la determinación de las FKLC puede llevarse a cabo de manera sencilla en un autoanalizador, sin necesidad de personal especializado para el montaje del ensayo y su interpretación es sencilla al tratarse de un parámetro cuantitativo (143,170–172). De

hecho, el consenso más actual recomienda la determinación de las FKLC, reservando las BOCG para aquellos casos con valores borderline (173).

Por otro lado, la producción intratecal de FKLC (SIT-FKLC) también se puede estimar mediante el modelo no lineal de Reiber (FKLC-R) (174) :

$$Q_{kappa}(\text{lim}) = 3.27[Q_{Alb}^2 + 33]^{0.5} - 8.2(x10^{-3})$$

De manera análoga a la IgG e IgM, la SIT-FKLC se considera positiva si el cociente entre las FKLC en LCR y suero (Q_{kappa}) es superior a $Q_{kappa}(\text{lim})$. Este modelo también permite calcular su porcentaje de síntesis intratecal FKLC-IF% (172,175):

$$FKLC_{LOC} = (Q_{kappa} - Q_{kappa}(\text{lim})) \cdot FKLC_{suero}$$

$$FKLC - IF\% = (FKLC_{LOC} / FKLC_{LCR}) \cdot 100$$

Existen otras fórmulas para evaluar la SIT de FKLC, aunque no han demostrado tanta efectividad como las mencionadas (176). Una elevación del FKLCi se ha relacionado con mayor riesgo de conversión de CIS a EM clínicamente definida (177,178).

9.2.4.- Cadena ligera de neurofilamento

Los neurofilamentos son proteínas fibrosas codificadas por el gen NEFH en el cromosoma 8 (179), que forman parte de los filamentos intermedios del citoesqueleto de las neuronas, su principal función es aportar soporte estructural a los axones. Son heteropolímeros de unos 10 nm compuestos por varias subunidades, que se diferencian en función de su peso molecular: la cadena ligera de neurofilamento (NfL), el neurofilamento intermedio, el neurofilamento pesado y la α -internexina (180,181). Las masas moleculares son de 200 kDa, 145–160 kDa, 70 kDa, and 59–65 kDa respectivamente (182).

Ante un daño axonal o neuronal, se liberan los neurofilamentos al LCR siendo un buen marcador de este fenómeno. No obstante, el de más interés es el NfL, ya que se eleva tanto en suero como en LCR en diferentes enfermedades neurológicas y neurodegenerativas (183–186).

Introducción

En el contexto de la EM, gracias a la correlación entre sus niveles séricos y en LCR (187), se ha consolidado como un marcador propicio para monitorizar la dinámica inflamatoria de la enfermedad (188,189). Las concentraciones en suero experimentan un aumento simultáneo con el brote o la aparición de nuevas lesiones realizadas con gadolinio, a menudo precediendo a la sintomatología clínica y persistiendo en niveles elevados a lo largo de un periodo temporal prolongado (hasta 3 meses) (190,191).

La concentración de NfL en suero (sNfL) y LCR (lcrNfL) guarda una relación directamente proporcional con el daño axonal y, por ende, con gravedad de los brotes (189), y discapacidad resultante (192). Además, está asociado con el volumen de las lesiones detectadas mediante T2 y tiene la capacidad de predecir la conversión de un primer episodio desmielinizante a EM clínicamente definida (191,193,194).

Una de las principales ventajas del NfL es la buena correlación suero-LCR, ello posibilita obtener información sobre el estado de neurodegeneración o actividad inflamatoria del paciente. Además de monitorizar la respuesta a los TME sin necesidad de realizar un proceso tan invasivo como la punción lumbar, ya que estos pueden provocar disminuciones en sus niveles (195,196). Algunos autores postulan que tiene la capacidad de anticipar respuestas subóptimas a estos tratamientos, permitiendo ajustes o cambios antes de que causen consecuencias clínicas significativas (192). De hecho, se ha planteado la posibilidad de que un futuro objetivo terapéutico sea la consecución del estatus NEDA5, que engloba los criterios del NEDA3 y, además, requiere la ausencia de incremento en el PBVC y sNfL.

9.2.5.- Chitinasa-3 Like-1

La Chitinasa-3 Like-1 (CHI3L1) es una proteína de 40 kDa codificada en el cromosoma 1q32 que pertenece la familia de las quitinasas, un grupo de enzimas que catalizan la hidrólisis de la quitina (197), polisacárido que forma parte de la pared celular de los hongos y el exoesqueleto de artrópodos (198,199). Los mamíferos carecen de esta molécula, sin embargo, poseen un total de 8 quitinasas, aunque solo dos de ellas con actividad: la quitotirosidasa y quitinasa ácida de mamíferos. Estas se expresan principalmente en macrófagos y células del tracto gastrointestinal respectivamente (198,200).

Dadas las mutaciones en su centro activo, la CHI3L1 carece de esta actividad quitinasa (201). Se secreta por diferentes tipos celulares, como cartílago, sinoviocitos, adipocitos, células endoteliales, así como células del sistema inmunológico y tumorales (202). Respecto a sus funciones fisiológicas, promueve proliferación y diferenciación celular e inhibe la apoptosis al unirse a algunos receptores como el PAR2 e IL13R α 2 (203), asume un importante rol en la inflamación ya que estimula la diferenciación de T_{naive} a Th2, regula la expresión de linfocitos T citotóxicos. Y es fuertemente inducida por macrófagos en estadios tempranos de diferenciación, además posee efecto quimiotáctico (204,205) y angiogénico (203).

En relación con su papel en la EM, se ha evidenciado mediante estudios de inmunohistoquímica que la CHI3L1 se expresa en macrófagos y astrocitos presentes en lesiones desmielinizantes (206). Sus niveles en LCR son más elevados que en controles sanos (207,208); en pacientes con CIS, se han hallado concentraciones superiores en aquellos que se han transformado a EM (209–211). Esta molécula promete ser un marcador de progresión y una interesante herramienta para diferenciar entre los diferentes fenotipos de la enfermedad (212). Por el momento, en las formas PP, se ha observado una tendencia a asociarse con una mayor progresión de la discapacidad (213).

9.2.6.- Proteína ácida fibrilar glial

La proteína ácida fibrilar glial (GFAP) es la proteína principal de los filamentos intermedios de los astrocitos maduros (214), aparece como fibras empaquetadas de 8-12 nm de diámetro (215). Los genes que lo codifican se encuentran en el cromosoma 17, concretamente en la región 17q21.1-q25 (216), su expresión es mayor en la sustancia blanca que en la sustancia gris (217). Aunque es principalmente secretada por los astrocitos, algunas otras células también son capaces de sintetizarlo como las células de Schwann, condrocitos, hepatocitos y células pancreáticas (218,219).

Para formar el citoesqueleto, las moléculas de GFAP se organizan jerárquicamente. En primer lugar, los monómeros se unirán formando dímeros, posteriormente estos se empaquetarán en tetrámeros de 50 kDa que se organizan formando un entramado que constituirá el filamento intermedio (220–222). Finalmente, serán degradadas por las caspasas 3, 6 y 9 (222).

Introducción

Su transcripción aumenta en situaciones de astrogliosis, que acontece como respuesta a cualquier daño cerebral agudo (traumatismo, ictus, neurotoxicidad...) o enfermedades crónicas que afecten al SNC. Asimismo, puede ser secretado por los astrocitos en respuesta a una estímulo o estrés. Es por tanto un marcador específico de astrogliosis (223). Además, su elevación en otro fluido distinto del LCR indica disrupción de la BHE debido a una disfunción de las células del parénquima (221).

Los niveles con GFAP en pEM ha mostrado una asociación significativa con las alteraciones estructurales características en el SNC, especialmente evidentes en los fenotipos progresivos (224,225). Incluso se ha constatado que los niveles de GFAP sérico correlacionan más fuertemente que el NfL con la severidad estos cursos (226), especialmente en las EMPP (194). Por lo que los niveles de este marcador tanto en suero como en LCR también podrían aportar información de valor sobre agresividad y progresión en pacientes con EMRR (227).

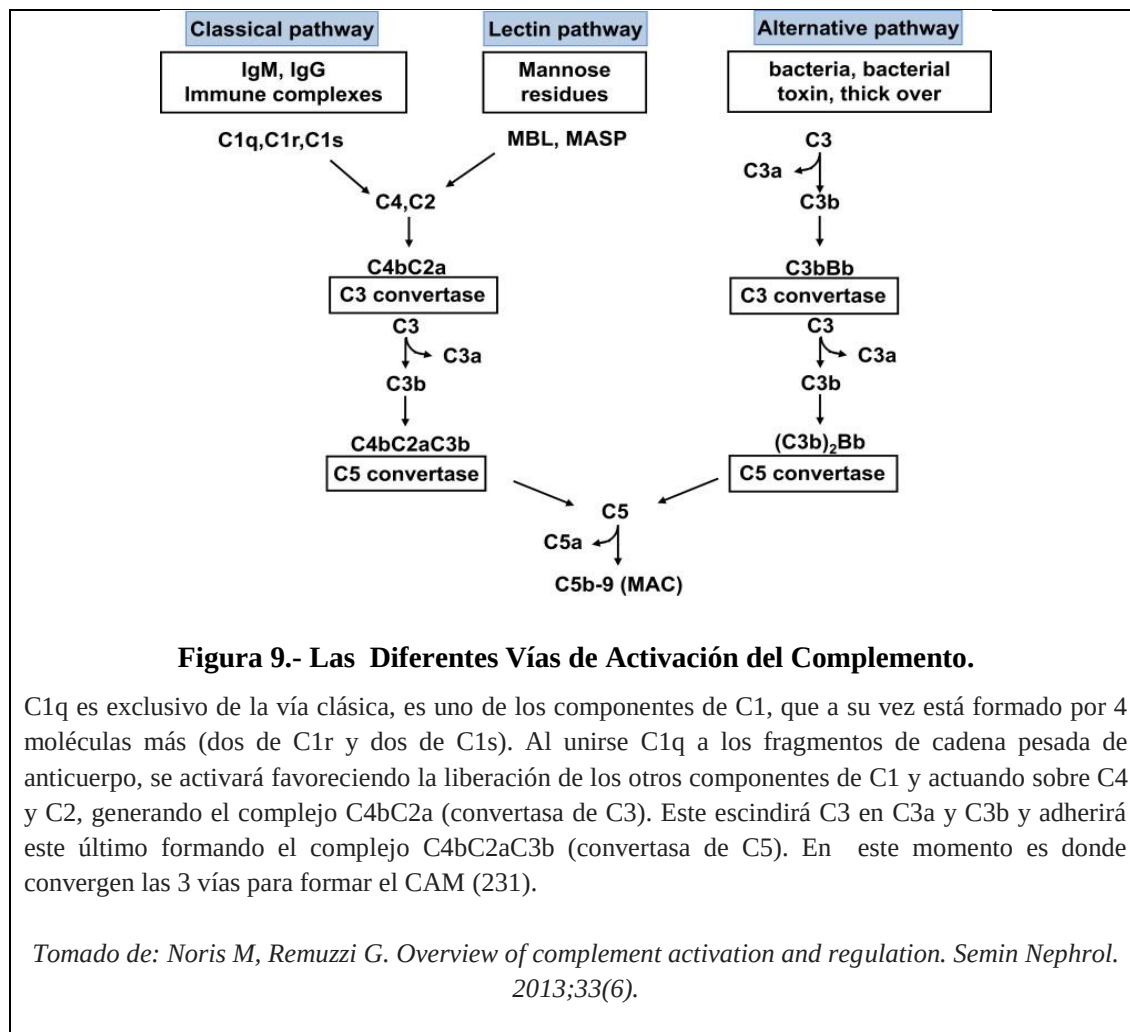
Respecto a la comparativa con individuos sanos, se ha reportado que pacientes con EMRR poseen niveles de GFAP en LCR (lcrGFAP) ligeramente superiores, esta diferencia es más pronunciada en aquellos en brote (224,225).

9.2.7.- Proteína del sistema del complemento C1q

El sistema del complemento es un componente de la respuesta inmune innata compuesto por alrededor de unas 50 proteínas que circulan en la sangre (228). Cuando se activa, genera un complejo en la superficie de la célula diana conocido como complejo de ataque a la membrana (CAM), que acaba con la opsonización y lisis de la misma (Figura 11). Además, algunas proteínas también tienen actividad anafiláctica, quimiotáctica y la capacidad de activar a otros componentes del sistema inmune (229,230). El complemento puede activarse de tres modos distintos: vía clásica, alternativa y de las lectinas (231).

La proteína del sistema del complemento C1q (C1q) es una molécula compuesta por tres tipos diferentes de cadenas (A, B y C) que se unen formando una estructura de 18 cadenas en total y un peso molecular de 460 kDa (232). Promueve la activación del complemento por medio de la vía clásica (228), además de participar en la solubilización y eliminación de inmunocomplejos (233), y mantener la integridad del endotelio vascular (234). Adicionalmente, está implicado en otros procesos biológicos

como el de desarrollo celular e inducción de la apoptosis (235), incluso favorece la agregación plaquetar (236).



Los niveles disminuidos de C1q reflejan su consumo por la activación de complemento, suceso característico de las enfermedades autoinmunes. Por otro lado, los procesos inflamatorios crónicos e infecciones se caracterizan por un incremento de sus valores séricos (237).

Dentro del SNC esta proteína facilita la maduración y migración de las células dendríticas (238) y ejerce influencia sobre el desarrollo y la plasticidad neuronal (239). Su importancia radica en servir como molécula señal para un proceso destinado a la eliminación de conexiones sin necesidad o ineficientes, conocido como “poda sináptica” (240).

Introducción

En el ámbito de la EM, la activación del complemento, con la destacada participación de C1q, respalda un vínculo causal con la neuroinflamación crónica asociada a la degeneración sináptica, la pérdida neuronal y el deterioro del tejido cerebral debido a la opsonización seguida de la fagocitosis ejecutada por las células microgliales (241).

La EM es una enfermedad compleja con alteraciones inmunológicas tanto fuera como dentro del SNC. Estos fenómenos no siempre están interconectados, como se observa en pacientes sometidos a terapias como Natalizumab o anti-CD20, en los cuales, a pesar de reducir eficazmente la inflamación periférica, la neurodegeneración continúa de manera independiente (242). Estudios previos han señalado un aumento de C1q en el SNC (243,244), pero hay investigaciones muy limitadas sobre C1q en el sistema periférico.

Por otro lado, estudios inmunohistoquímicos han delineado la presencia de C1q en lesiones desmielinizantes, que abarcan tanto la materia blanca como la gris cortical en los cerebros de individuos afectados por EM (245–247). Además, se ha vinculado a C1q con la conversión de los astrocitos a su fenotipo proinflamatorio, implicado en la destrucción neuronal y la muerte de los oligodendrocitos (248). Además, se cree puede modular la respuesta adaptativa al acelerar la maduración de APC (249).

HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

1.- Hipótesis

- El empleo conjunto de los diversos parámetros de SIT-IgG mejoraría la capacidad de ponerla de manifiesto, aumentando así su potencial como herramienta auxiliar en el diagnóstico de la EM. Esto conllevaría a una mayor reducción en el consumo de BOCG en LCR.
- La utilización de algoritmos basados en los marcadores cuantitativos de SIT-IgM y FKLCi presentaría un alto valor predictivo positivo para la presencia de BOCM, por lo que podrían ser empleados para reducir su uso.
- Niveles elevados de NfL, GFAP, CHI3L1 o SIT en el momento del diagnóstico podrían ser sugerentes de un curso más agresivo y pronóstico desfavorable.
- Tanto el C1q en suero como en el Líquido Cefalorraquídeo (LCR) podrían constituir parámetros de interés para la detección temprana, la monitorización y el avance del conocimiento inmunopatológico de la EM.

2.- Objetivos

Objetivo 1.- Combinar FKLCi con otros marcadores de SIT-IgG para incrementar la precisión diagnóstica, priorizando reducir al máximo el consumo de BOCG

Objetivo2.- Evaluar el rendimiento del FKLCi, así como del IgMi para la predecir la aparición de BOCM; reduciendo, de este modo, la necesidad de su consumo.

Objetivo 3.- Comparar la eficiencia de los distintos marcadores cuantitativos y cualitativos durante o tras el primer evento agudo desmielinizante en la predicción de la aparición de un fracaso terapéutico.

Objetivo 4.- Comparar los niveles de C1q en suero y LCR de una numerosa cohorte de pEM respecto a los de controles sanos e individuos con otras patologías y analizar su asociación con otros biomarcadores utilizados en el estudio de la EM.

MATERIALES Y MÉTODOS

1.- Reclutamiento de pacientes

Se reclutaron una serie de pEM basándose en los siguientes criterios de inclusión: diagnóstico de acuerdo con los criterios de McDonald, disponibilidad de muestras de LCR y suero tomadas en el momento del inicio de la enfermedad -que debía ser entre 2015 y 2022-, tiempo de evolución de no menos de un año y firma del documento de consentimiento informado. Los pEM se dividieron en dos cohortes en función de la procedencia de sus muestras: la de trabajo (CT), y la externa de validación (CV). Las muestras de CT se obtuvieron de la Unidad de Neuroinmunología del Hospital Universitari i Politècnic La Fe y del biobanco del Institut de Investigació Sanitària La Fe (València). Por otro lado, las muestras de la CV fueron proporcionadas por la Unidad de Neuroinmunología y Esclerosis Múltiple del Hospital Universitari Dr. Josep Trueta (Girona).

Paralelamente, se seleccionaron pacientes para formar una cohorte de controles con desórdenes neurológicos diferentes a la EM (CON), atendándose a dos criterios de inclusión: Pacientes con diversas condiciones diferentes a la EM y disponibilidad de muestras de suero y LCR tomadas en el mismo día.

Asimismo, se incorporaron muestras de suero de voluntarios sanos para formar la serie de Controles Sanos (CS), el único criterio de inclusión fue que no presentaran ningún tipo de patología conocida en el momento de la toma de muestra.

Las muestras de los grupos CON y CS se obtuvieron del biobanco del Institut de Investigació Sanitària La Fe y del Servicio de Análisis Clínicos del Hospital Universitari i Politècnic La Fe (València) respectivamente.

Para los pEM, se registraron los valores de Escala de Discapacidad Expandida (EDSS) (250) más cercana al momento de la toma de muestra y la más reciente disponible. Dado que el estudio involucraba dos centros, las EDSS se obtuvieron de diferentes neurólogos experimentados.

El protocolo de investigación utilizado en este estudio fue aprobado por el Comité de Ética y el Comité de Investigación Clínica del Hospital Universitari i Politècnic La Fe (*número de registro: 2021-761-1*).

2.- Obtención de las muestras

Las muestras de LCR y sangre se obtuvieron mediante punción lumbar y venopunción utilizando tubos estériles y separadores de gel (Gelosa) respectivamente. Fueron inmediatamente centrifugadas para obtener LCR libre de células y suero. Éstos se alicuotaron en tubos de polipropileno, se mantuvieron a 4°C durante menos de 24 horas para, finalmente, ser almacenados a -80°C para su análisis ulterior.

3.- Cálculo de parámetros de SIT

La SIT de FKLC, IgG e IgM se investigó mediante sus índices lineales (FKLCi, Link e IgMi, en el orden dado), junto con los Reibergramas (FKLC-R, Reiber IgG, Reiber IgM). Simultáneamente, se investigó la SIT de IgG e IgM mediante las BOC.

Tanto FKLCi como el Link e IgMi se expresaron como los cocientes entre su razón entre LCR y suero (Q_{FKLC} , Q_{IgG} y Q_{IgM} respectivamente) y Q_{alb} . La demostración de SIT-IgG y SIT-IgM basada en la fórmula de Reiber así como el IgGIF(%) se determinó mediante el software CSF Research Tool®. Sin embargo, para el cálculo de FKLC-R, se calculó en primer lugar $Q_{kappa}(lim)$ utilizando su fórmula específica ($Q_{kappa}(lim) = 3.27[Q_{Alb}^2 + 33]^{0.5} - 8.2(x10^{-3})$); para posteriormente compararlo con Q_{FKLC} , considerándose un resultado positivo si éste era superior. Este estudio no se centró en la cuantificación del porcentaje de FKLC sintetizadas intratecalmente determinadas mediante Reibergrama (FKLC-IF%); únicamente se evaluó si se obtuvo un resultado positivo o negativo para este parámetro. Por lo tanto, la síntesis intratecal de FKLC basada en la fórmula de Reiber se analizó como una variable cualitativa.

4.- Determinaciones de laboratorio

La cuantificación de los niveles de albúmina, IgG e IgM tanto en suero como en LCR se llevó a cabo mediante nefelometría utilizando los analizadores Immage 800® (Beckman Coulter, Nyon, Suiza) y BN-II® (Siemens Healthcare, Erlangen, Alemania), según el centro de estudio.

Dentro del dispositivo BN-II®, se emplearon los ensayos N Antiserum to Human IgG (REF#: OSAS15) y N Antiserum to Human Albumin (REF#: OSAL11) para evaluar los

Materiales y Métodos

niveles de IgG y albúmina en LCR y suero, respectivamente. Simultáneamente, los niveles de IgM en suero se determinaron mediante el ensayo N Antiserum to IgM (REF#: OSAT15); mientras que en LCR se analizaron utilizando el kit Antiserum to Human IgG N Latex IgM (REF#: OQAC11). Por otro lado, en el sistema Immage 800® se utilizaron los ensayos IGG IMMAGE Reagent Kit (REF#: 120989) para IgG; IGM-LC IMMAGE Reagent (REF#: 121010) para IgM en suero; IGM IMMAGE Reagent Kit (REF#: 130003) para IgM en LCR y Albumin IMMAGE Reagent Kit (REF#: 121009) para la albúmina en ambos fluidos.

Se utilizó el ensayo turbidimétrico Freelite Mx™ Kappa Free (REF#: LK016.M.OPT) en el instrumento Optilite® (The Binding Site, Birmingham, Reino Unido) para determinar FKLC libre en suero y LCR.

Las BOCG se analizaron mediante isoelectroenfoque seguido de inmunoblotting haciendo uso del SAS IgG IEF Kit (REF#: 102100; 102200) (Helena Biosciences Europe; Queensway; UK). Por otro lado, las BOCM se determinaron mediante los mismos principios instrumentales de acuerdo con el procedimiento descrito por Villar et al. (251). Tanto las BOCG como las BOCM se consideraron positivas en caso de visualizar los patrones 2 o 3 (Figura 6) (104,173,252).

El NfL y GFAP en suero y LCR se analizaron simultáneamente en la plataforma ultrasensitiva SIMOA, basada en una versión digital del ELISA. Se emplearon los test Simoa Neuro 2-PleB Reagent Kit® (REF#: 103520) en el analizador SIMOA SR-X® (Quanterix Corporation, Boston, USA). Algunas determinaciones de lcrNfL se realizaron en el mismo instrumento empleando el Simoa NF-Light v2 Advantage Reagent Kit® (REF#: 104073).

La CHI3L1 se cuantificó con un test basado en ELISA mediante el ensayo Quantikine® (REF#: DC3L10) (R&D Systems, Minnesota, USA). La señal originada por el sustrato cromogénico en los pocillos se midió mediante el fotómetro para microplacas Multiskan™ FC (Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, USA). Para el cálculo de las concentraciones de las muestras a partir de la señal y la curva patrón se empleó el software MyAssays®.

La cuantificación de C1q en suero (sC1q) y LCR (lcrC1q) se realizó mediante ELISA haciendo uso del Human Complement C1q ELISA Kit® (REF#: ab170246) (Abcam,

Cambridge, UK); mientras que la presencia de anticuerpos anti-C1q (anti-C1q) en suero también se valoró con ELISA empleando el ensayo QUANTA Lite Anti-C1q ELISA® (REF#:704565) (Werfen, Barcelona, España). Salvo la dilución inicial de la muestra, los procedimientos para realizar ambas determinaciones se ejecutaron en el dispositivo de automatización DS-2® (Dynex Technologies, Chantilly, USA).

En el caso de los anti-C1q, se consideró un resultado positivo cuando las unidades específicas del ensayo superaban el valor de 20. Este parámetro se determinó mediante el cociente entre la absorbancia a 450 nm de la muestra y la del control positivo, multiplicado por las unidades de dicho control.

Todos los valores medidos estaban dentro del rango de calibración. Los coeficientes de variación medios intra e inter-ensayo fueron inferiores al 10%. Asimismo, todos los coeficientes de variación de las concentraciones de determinaciones duplicadas fueron inferiores al 20%.

5.- Estudios de imagen

Se realizaron RMN del cerebro y médula espinal en un escáner Philips Achieva de 3 Tesla® (Philips Medical Systems, Best, Países Bajos) con una bobina estándar para la cabeza. La RM cerebral incluyó una secuencia axial 3D T1 (tiempo de eco 3 ms; tiempo de repetición 8 ms; grosor de corte 1 mm) y una secuencia sagital 3D T2-FLAIR (tiempo de eco 2.6 ms; tiempo de repetición 6000 ms; grosor de corte 1.1 mm). La RM de la ME incluyó una secuencia axial 3D T1 post-gadolinio (tiempo de eco 2.6 ms; tiempo de repetición 7.5 ms; grosor de corte 1 mm). El campo de visión de fase porcentual fue 100 en todos los casos.

Se determinó el número (T2NL) y volumen de lesiones (T2VL) en T2, expresado en mililitros. Se analizaron las imágenes de RMN obtenidas en el estudio con mayor proximidad al momento de examen del LCR, siempre que no transcurrieran más de 90 días antes o después del mencionado momento.

La herramienta utilizada para llevar a cabo la segmentación y cuantificación de las lesiones fue el software Lesion Segmentation Toolbox for Statistical Parametric Mapping. Todas las imágenes fueron evaluadas y controladas con precisión en busca de errores/artefactos y evaluadas de manera ciega.

6.- Análisis estadístico

La normalidad de las variables se evaluó a través de la prueba de Shapiro-Wilk. Las correlaciones fueron analizadas mediante el test de Pearson o la prueba de rango de Spearman, según la naturaleza de los datos. Las comparaciones entre dos variables cuantitativas independientes entre sí se realizaron utilizando el T-Test para muestras no pareadas y la prueba U de Mann-Whitney; en escenarios que involucraron más de dos variables independientes entre sí, se aplicó la prueba ANOVA o la de Kruskal-Wallis, seguidas de un análisis post HOC con corrección de Holm. La elección entre estos contrastes se basó en la distribución de los datos.

La comparación entre variables cuantitativas emparejadas se efectuó mediante el T-Test para muestras pareadas o el test de Friedman, según fuera pertinente. No se presentó la ocasión de realizar comparaciones simultáneas entre más de dos variables emparejadas. Por último, las variables cualitativas fueron comparadas mediante la prueba de Chi Cuadrado.

En todos los contrastes de hipótesis, se estableció un p-valor bilateral de 0.05 como umbral para establecer la significancia estadística. Las variables cualitativas se expresaron mediante recuentos y porcentajes, mientras que las cuantitativas se describieron con su mediana y rango intercuartílico (IQR, de su acrónimo en inglés).

Los datos obtenidos fueron analizados mediante el software RStudio (Versión 4.2.2), utilizando diversas librerías para distintos propósitos. Las pruebas de contraste de hipótesis se ejecutaron mediante los paquetes básicos de RStudio. Las librerías "tidyr", "dbplyr" y "dplyr" se emplearon para organizar y reestructurar las bases de datos. La creación de gráficos básicos se llevó a cabo con las librerías "ggplot2", "ggpubr", "ggsignif", "ggdist", "beeswarm" y "patchwork". Para realizar los análisis Receiver-Operator (ROC) y calcular los parámetros de validez diagnóstica de las variables cuantitativas, se utilizó la librería "pROC", con el apoyo de "ggplot2" para trazar las curvas. La evaluación de la validez diagnóstica de las variables cualitativas se determinó haciendo uso de la librería "epiR". Por otro lado, los correlogramas se visualizaron mediante el paquete "corrplot", y la generación de la matriz de los p-valoros se efectuó con "psych". Para los análisis de supervivencia, se empleó el paquete "survival", y las curvas de Kaplan-Meier se elaboraron utilizando las librerías

"survMisc" y "ggplot2". Finalmente, para las regresiones Cox, el cálculo del Hazard Ratio y su representación mediante diagramas de bosque, se recurrió al paquete "survminer".

7.- Metodología Objetivo 1

Estudio transversal, monocéntrico y retrospectivo en el que se incluyeron muestras de pacientes de CT, CV y CON. En una primera fase, se realizó un análisis comparativo de los valores de FKLCi y Link entre aquellos pacientes con resultados positivos/negativos para BOCG, Reiber IgG y FKLC-R. Este análisis se llevó a cabo de manera independiente para los pEM (CT+CV) y pacientes CON. Además se exploraron las correlaciones entre FKLCi, IFIgG(%) y Link.

Se llevó a cabo la evaluación del rendimiento diagnóstico de los parámetros BOCG, Link, Reiber IgG, FKLC-R y FKLCi. Para variables cuantitativas (FKLCi y Link), se analizaron las sensibilidades (S), especificidades (E), valor predictivo positivo (VPP), valor predictivo negativo (VPN) y precisión (A) de distintos puntos de corte mediante curvas ROC, estableciéndose el punto de corte óptimo (PCO) mediante índice de Youden. Las diferencias entre los valores de AUC de las curvas ROC se examinaron mediante el test de DeLong.

Para los parámetros cualitativos (BOCG, Reiber IgG y FKLC-R), se calcularon los parámetros de validez diagnóstica prescindiendo de puntos de corte y curvas ROC. Se crearon varios algoritmos combinando FKLCi y FKLC-R con los mismos, utilizando los PCO obtenidos para FKLCi y Link (Tabla 2).

Tabla 2.- Algoritmos Desarrollados para Evaluar la Síntesis Intratecal de IgG

Algoritmo	Determinaciones a realizar
KR	FKLCi y Reiber
KL	FKLCi y Tibbling-Link
KK	FKLCi y FKLC-R
KO	FKLCi y BOCG en caso de resultado negativo para FKLCi
RO	FKLC-R y BOCG en caso de resultado negativo para FKLC-R.
KRO	FKLCi y Reiber. Si ambos son negativos y el FKLCi es de entre un rango entre 4 y positivo. Determinar las BOCG.
KLO	FKLCi y Tibbling-Link. Si ambos son negativos y el FKLCi es de entre un rango entre 4 y positivo. Determinar las BOCG.

FKLCi: Índice de Cadenas Ligeras Kappa Libres; FKLC-R: Síntesis Intratecal de Cadenas Ligeras Kappa Libres Demostrada Mediante Reibergrama; BOCG: Bandas Oligoclonales IgG; Link: Índice de Tibbling-Link; Reiber: Síntesis Intratecal de IgG Demostrada Mediante Reibergrama

Se clasificó un resultado como positivo en los algoritmos si al menos uno de los parámetros de SIT-IgG que lo conformaba era positivo. Se evaluó su rendimiento diagnóstico de manera análoga a los parámetros cualitativos. Además, se calculó la reducción en el porcentaje de uso de BOCG (PRBG):

$$PRBG = \left(\frac{\text{Nº de determinaciones de BOCG que se hubiesen realizado según el algoritmo}}{\text{Nº de determinaciones realizadas}} \right) * 100$$

El cálculo del rendimiento de los parámetros y algoritmos se llevó a cabo de manera independiente para CT, CV y los datos combinados de ambas cohortes (CG). En los tres grupos, se utilizaron los datos de los mismos pacientes de control (CON).

8.- Metodología Objetivo 2

Estudio transversal, retrospectivo y monocéntrico en el que se incorporaron únicamente los pacientes de la CT. Mediante el uso de curvas ROC, se seleccionaron puntos de corte para el índice de IgM y el FKLCi, asegurando una especificidad superior al 89% en la predicción de la presencia de BOCM. Posteriormente, se construyeron diversos modelos con ambos parámetros utilizando estos puntos de corte para lograr el mismo objetivo. La presencia de BOCM se consideró positiva si alguno de los dos parámetros superaba el cut-off preestablecido, habiéndose de realizar su determinación en caso contrario.

De forma similar al procedimiento realizado en el Objetivo 1, para cada modelo, se llevó a cabo un análisis retrospectivo para determinar la reducción potencial en el número de determinaciones de BOCM, en caso de clasificarse como positivas de acuerdo con los modelos creados, incorporando el porcentaje de reducción su consumo (PRBM).

Simultáneamente, se desarrolló otro modelo basado en considerar la presencia de BOCM en pacientes con un índice Link inferior a 0.65 y FKLCi>10.7 (Modelo E) (véase Resultados objetivo 1), con su respectivo cálculo del PRBM.

$$PRBM = \left(\frac{N^{\circ} \text{ de determinaciones de BOCM que se hubiesen evitado mediante el modelo}}{N^{\circ} \text{ de determinaciones realizadas}} \right) * 100$$

9.- Metodología Objetivo 3

Estudio bicéntrico, longitudinal y retrospectivo en el que se incluyeron los pacientes de la CT y la CV y se analizaron de manera conjunta. En ambos centros, los pacientes fueron sometidos a seguimiento regular, que consistió en visitas programadas cada tres meses y RMN cerebral anual, siempre y cuando permanecieran asintomáticos, libres de brotes y/o sensación de empeoramiento. En caso de tales eventos, se programaron visitas adicionales para una evaluación clínica y radiológica completa. En cada visita, se documentaron los niveles de discapacidad EDSS.

Inicialmente, se excluyeron los pacientes que no iniciaron tratamiento después de su primer evento. Posteriormente, los pEM inscritos fueron estratificados en función de si necesitaron o no cambiar a terapias más eficaces o cambiar el mecanismo de acción de sus TME por un fracaso terapéutico (FT) durante el periodo de seguimiento. Este evento se consideró en caso de recurrencia de brotes, la aparición de dos o más lesiones nuevas en T2 en dos estudios de RMN separados por un año, o PIRA. El período de seguimiento se extendió desde el momento del análisis del LCR hasta agosto de 2023.

Para los pacientes que no experimentaron FT, se realizó una documentación completa de los TME administrados, junto con una explicación de la justificación detrás de cualquier ajuste terapéutico. Éstas se encapsularon en efectos adversos, deseo o baja tolerancia al tratamiento.

Materiales y Métodos

Los TME administrados se clasificaron como de moderada eficacia (TME-ME): Interferones, Acetato de Glatirámico, Teriflunomida, Dimetil fumarato y moduladores del receptor de esfingosina-1-fosfato (Fingolimod). Y alta eficacia (TME-AE): Cladribina y anticuerpos monoclonales dirigidos contra CD20 (Ocrelizumab, Ofatumumab), CD52 (Alemtuzumab) y α 4-integrina (Natalizumab).

Adicionalmente, los pEM fueron categorizados en función de la presencia o ausencia de actividad inflamatoria aguda (AI), definida como la presencia de lesiones cerebrales o espinales realizadas con gadolinio en la RMN, o un brote dentro de una ventana de 90 días antes o después de la recogida de muestras de LCR y suero. Los brotes se definieron como la aparición de un nuevo signo o el empeoramiento de uno previo, con una duración de más de 24 horas en ausencia de fiebre u otro factor de confusión.

Se llevó a cabo un análisis exploratorio inicial, comparando los valores de los biomarcadores según las estratificaciones previas. Se construyó una matriz de correlaciones y se elaboró un correlograma para examinar la relación entre los diversos marcadores analizados considerados como variables continuas (Link, IgMi, FKLCi, sNfL, sGFAP, lcrNfL, lcrGFAP y CHI3L1), así como con la edad y el EDSS. Para los marcadores incluidos como variables cualitativas (IgG/IgM BOC y Reiber), se compararon la edad y el EDSS entre pacientes positivos y negativos.

Para evaluar la capacidad predictiva de los marcadores con respecto al TF, se realizó la prueba de Log-Rank y se generaron curvas de Kaplan-Meier para visualizar y comparar las funciones de supervivencia entre los grupos definidos. Los valores cuantitativos se dicotomizaron en función de si estaban por debajo o por encima del tercer cuartil (Q75). Los pacientes que abandonaron el tratamiento, fallecieron o cambiaron a otro sistema de atención médica fueron sometidos a censura. Paralelamente, se empleó el mismo enfoque analítico para diferentes combinaciones de dos marcadores, categorizándolos según si cada uno individualmente dio positivo (en el caso de variables cualitativas) o superó el tercer cuartil (en el caso de variables cuantitativas).

Se calculó la Hazard Ratio (HR) bivalente para la variable significativa en la prueba de Log-Rank. Para cada parámetro/combinación significativa identificada en el análisis bivariado, se construyó un modelo de regresión de Cox independiente, ajustando para posibles factores de confusión como la edad, el género, AI, EDSS, la línea específica de

TME administrada, el centro de seguimiento y el tiempo desde el primer evento desmielinizante hasta el inicio del tratamiento (TEDIT). Se verificó que ninguna de las variables cuantitativas incluidas en el modelo mostrara colinealidad entre sí. Siendo un criterio de exclusión para el factor de confusión en caso de darse con el biomarcador; en caso de surgir entre las variables de confusión, se idearon múltiples modelos con el objetivo de separarlas.

10.- Metodología Objetivo 4

Se llevó a cabo un estudio retrospectivo, transversal y monocéntrico que incluyó a pacientes de las cohortes CT, CV y CS, así como muestras de suero de una tercera serie de pEM provenientes de la Unidad de Neuroinmunología del Hospital Ramón y Cajal en Madrid, denominada Cohorte de Validación 2 (CV2). Dentro del alcance de este propósito, también se incorporaron individuos de la CON. Estos participantes fueron divididos en dos grupos según la naturaleza de su trastorno neurológico: aquellos con un trastorno inflamatorio/inmunológico (ENI, de Enfermedad Neurológica Inmunológica) y aquellos cuya patología no tenía esta naturaleza (ENNI, de Enfermedad Neurológica No Inmunológica).

Se realizaron comparaciones de los niveles del sC1q respecto a los grupos de CS, ENI y ENNI. Este mismo procedimiento se realizó para los valores de lcrC1q, sin tener en cuenta a los CS. Simultáneamente, se evaluaron los niveles de sC1q y lcrC1q en pacientes con y sin presencia de AI. Estos análisis se realizaron de manera independiente para cada grupo de pEM (CT, CV y CV2).

Para los pEM, se analizaron las correlaciones entre los niveles de sC1q y lcrC1q, así como las de ambos parámetros con los marcadores de SIT, sNfL, lcrNfL, sGFAP, lcrGFAP, CHI3L1, T2NL y T2VL. Paralelamente, se evaluó la asociación sC1q con la IgG, IgM y FKLC en suero (sIgG, sIgM y sFKLC), así como lcrC1q con IgG, IgM y FKLC en LCR (lcrIgG, lcrIgM y lcrFKLC).

RESULTADOS

Resultados Objetivo 1

Estudio transversal y retrospectivo con el objetivo de evaluar el rendimiento diagnóstico del FKLCi en combinación con otros parámetros para objetivar la SIT IgG en dos cohortes de pEM tomando con otras patologías neurológicas como controles.

Resultados Objetivo 1

Se incluyeron un total de 47 CON y 145 pEM, de los cuales 100 pertenecían a la TC y 45 a la VC. Dentro de la CT, 94 individuos tenían EMRR y 6 CIS; mientras que todos los miembros de la CV eran EMRR.

Los síndromes presentados por los pacientes de la CON fueron: mielopatía (n=6), neuritis óptica no debida a la EM (n=2), encefalitis autoinmune (n=2), hemorragia subaracnoidea (n=1), hematoma cerebral y espasticidad (n=1), cefalea (n=1), leucoencefalopatía por VIH (n=1), leucoencefalopatía multifocal progresiva con uveítis (n=1), accidente cerebrovascular (n=2), polirradiculopatía (n=2), edema pupilar bilateral (n=1), síntomas sensitivos (n=2), COVID (n=1), nefropatía (n=2), enfermedad de Parkinson (n=1), lesión cerebral (n=1), adrenoleucodistrofia (n=1), enfermedad de Devic (n=1), trastorno bipolar (n=1), paresia pares craneales (n=1), espasticidad tetraparésica (n=1), vasculitis SNC (n=1), síndrome de Pelizaeus-Merzbacher (n=1), hipertensión intracraneal de etiología no filiada (n=2), fibromialgia (n=1), fibromialgia con fenómeno de Raynaud (n=1), ataxia espino-cerebelosa/Parkinsonismo (n=1), queratitis herpética (n=1), enfermedad de Whipple (n=1), neuropatía periférica (n=2), paraplejia espástica familiar (n=1), neuropatía funcional + VIH + púrpura trombocitopénica inmune (n=1), síndrome del túnel carpiano (n=1), migraña + lesiones desmielinizantes (n=1).

Ninguna de las variables cuantitativas mostró una distribución normal ($p < 0.0001$). No se hallaron diferencias significativas en los valores de FKLCi entre CT y CV. La EDSS al inicio de la enfermedad fue significativamente superior en la CV ($p = 0.035$), de igual modo que el tiempo transcurrido desde el primer brote en semanas ($p < 0.0001$). En la Tabla 3 figuran todos los datos demográficos y clínicos de los pacientes enrolados.

Tabla 3.- Datos Clínicos y Demográficos de los Pacientes Incluidos en el Objetivo 1.

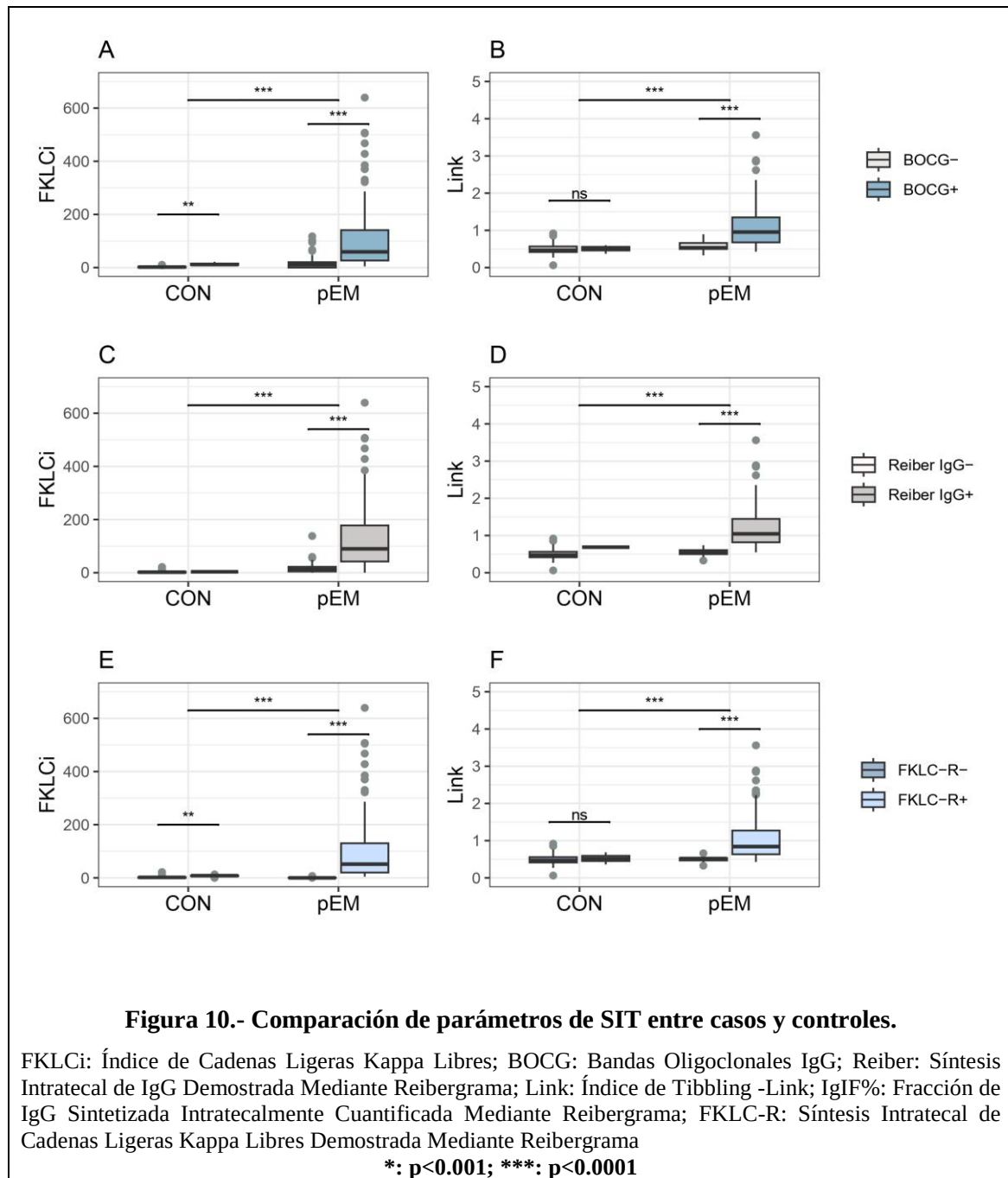
	CG (n=192)	CT (n=147)	CV (n=92)	CON (n=47)
Sexo (H/M)	67(35%)/125(65%)	24(24%)/76(76%)	14(30%)/31(70%)	29(62%)/18(38%)
Edad	38(18)	35(18)	36(17)	46(17.5)
EDSS	2(1.5)	2(1.5)	2(1.5)	-
TDPB (semanas)	9(15.5)	7(11)	16(48)	-
EMRR/CIS	139(96%)/6(4%)	94(94 %)/6(6%)	45 (100%)	-
BOCG(+/-)	114(59%)/78(41%)	78(74%)/27(26%)	35(78%)/10(22%)	4(9%)/43(91%)
Reiber(+/-)	93(48%)/99(52%)	57(57%)/43(43%)	35(78%)/10(22%)	1(2%)/46(98%)
FKLC-R(+/-)	140(73%)/52(27%)	87(87%)/13(13%)	43(96%)/2(4%)	10(21%)/37(79%)
FKLCi	22(88)	39(110)	62(118)	2(3)
Tibbling-Link	0.67(0.51)	0.72(0.61)	0.84(0.61)	0.48(0.15)

TDPB: Tiempo Transcurrido Desde el Primer Brote; BOCG: Bandas Oligoclonales IgG; Reiber: Síntesis Intratecal de IgG Demostrada Mediante Reibergrama; FKLC-R: Síntesis Intratecal de Cadenas Ligeras Kappa Libres Demostrada Mediante Reibergrama; FKLCi: Índice de Cadenas Ligeras Kappa Libres; Link: Índice de Tibbling-Link. Las variables se muestran en el siguiente orden: mediana (rango intercuartílico) para las cuantitativas y número (porcentaje) para las cualitativas.

Tanto los valores de FKLCi como de Link fueron significativamente más altos en los pEM ($p < 0.0001$).

Dentro de los pacientes con EM, los valores de FKLCi y Link fueron aún más altos en aquellos con BOCG (Figura 10A y 10B, respectivamente). Se identificó el mismo patrón en Reiber IgG (Figura 10C y 10D) y FKLC-R (Figura 10E y 10F). Dado el bajo número de pacientes del grupo CON con Reiber IgG ($n=1$), BOCG ($n=4$) y FKLC-R ($n=10$), no se realizó el análisis comparativo previo en este grupo.

Resultados Objetivo 1



Los valores de Link, FKLCi e IgIF% mostraron fuertes correlaciones (Figura 11A, 11B y 11C). La más alta se observó entre Link y Reiber ($\rho=0.9$; $p < 0,001$) (Figura 11C).

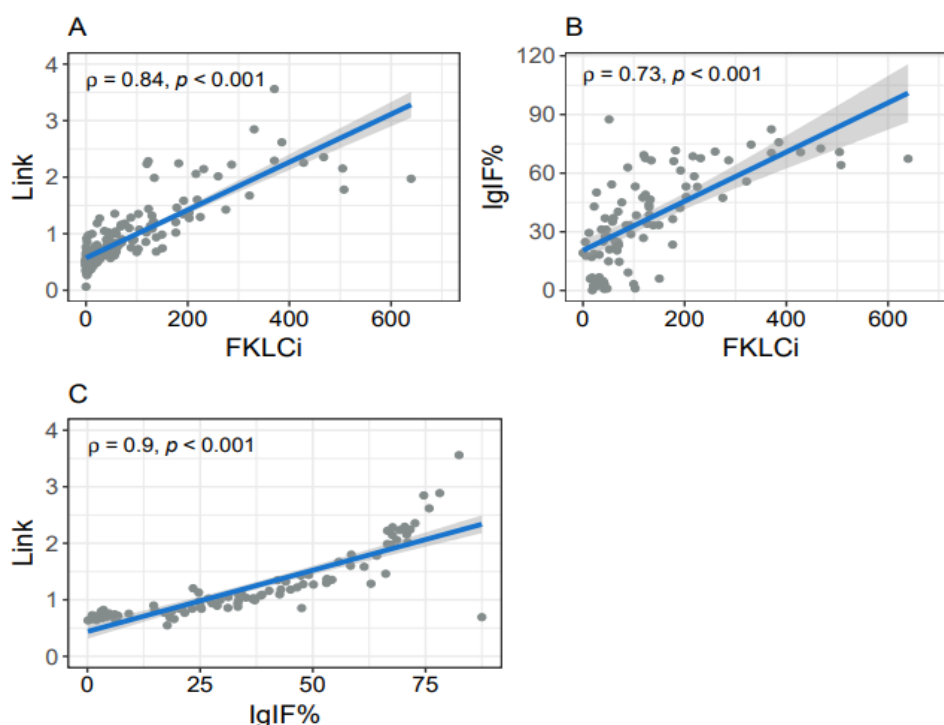


Figura 11.- Correlación entre las variables cuantitativas predictoras de SIT.

FKLCi: Índice de Cadenas Ligeras Kappa Libres; Link: Índice de Tibbling-Link; IgIF%: Fracción de IgG Sintetizada Intratecalmente Cuantificada Mediante Reibergrama;

Los VPP y el VPN se calcularon en función de la prevalencia de casos en nuestra muestra: 75% (IC: 69%-82%) para CG, 68% (IC: 60%-76%) para CT y 49% para CV (IC: 39%-60%).

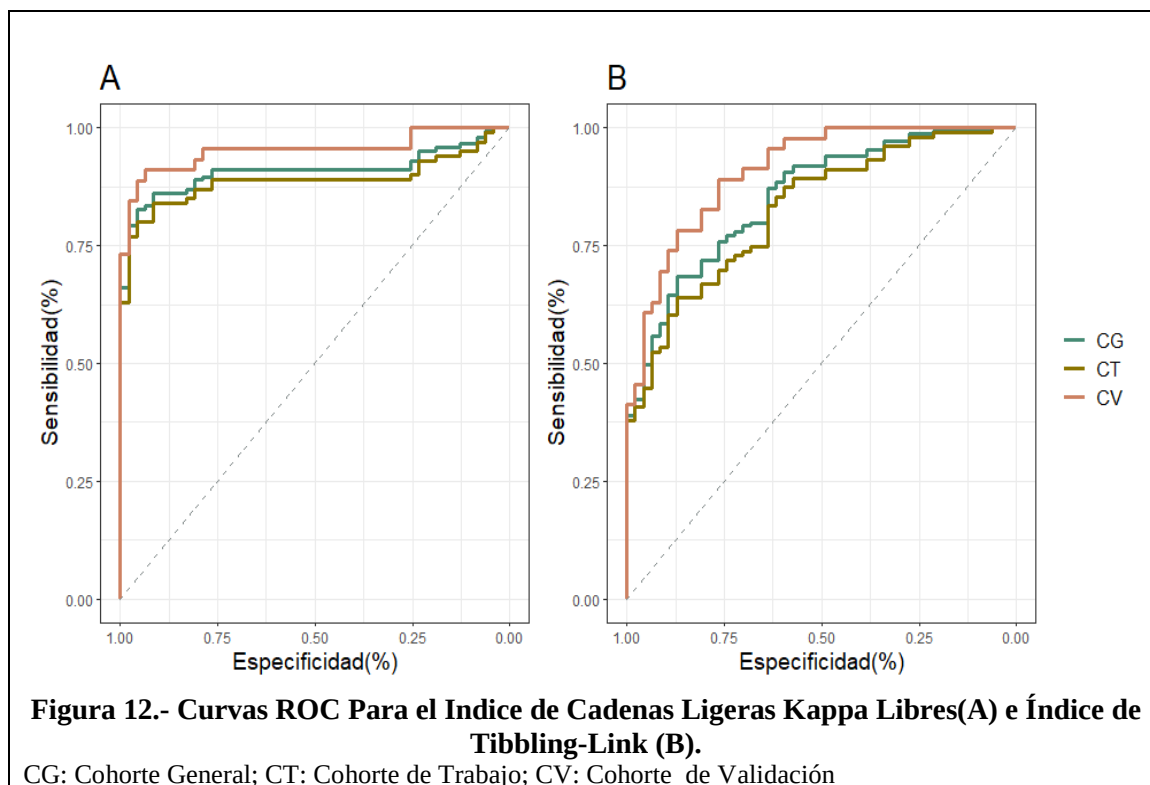
Las curvas ROC para Link y FKLCi se presentan en la Figura 12. Los puntos de corte óptimos para FKLCi oscilaron entre 10 y 11 en los tres grupos. Como se anticipaba, FKLCi demostró una mayor efectividad en la predicción de SIT (S=83%, E=96%) en comparación con Link (S=75%, E=91%). El PCO para FKLCi en la CG se determinó en 10,7, mientras que para Link, fue de 0,63 (Tabla 4). No se hallaron diferencias significativas entre las curvas ROC para los marcadores de Link y FKLCi entre la VC y la TC (Figura 12).

En la CG, un valor de corte de 6,2 para FKLCi resultó en una sensibilidad del 89%, especificidad del 79% y precisión del 86%.

Tabla 4.- Rendimiento Diagnóstico del FKLCi y el Índice de Tibbling-Tibbling-Link.

	CT	CV	CG
FKLCi			
PCO	10.9	10.2	10.7
AUC	0.95	0.88	0.9
IC	0.83-0.94	0.90-1	0.87-0.95
S (%)	80	91	83
E (%)	94	96	96
VPP (%)	91	97	98
VPN (%)	69	93	64
A (%)	85	92	86
Link			
PCO	0.63	0.6	0.63
AUC	0.85	0.9	0.85
IC	0.8-0.91	0.8-0.91	0.8-0.91
S (%)	60 (50-70)	76 (61-87)	65 (57-73)
E (%)	87 (74-95)	87 (74-95)	91 (74-95)
VPP (%)	91 (81-96)	85 (71-94)	94 (87-97)
VPN (%)	50 (39-62)	81(65-90)	44 (34-55)
A (%)	69 (61-76)	82 (72-89)	70 (63-77)

CT: Cohorte de Trabajo; CV: Cohorte de Validación; CG: Cohorte General; FKLCi: Índice de Cadenas Ligeras Kappa Libres; Link: Índice de Tibbling-Link. PCO: Punto de Corte Óptimo; AUC: Área Bajo la Curva; S: Sensibilidad; E: Especificidad; VPP: Valor Predictivo Positivo; VPN: Valor Predictivo Negativo; A: Precisión



En los tres grupos examinados, FKLCi (Tabla 4) mostró un rendimiento superior en comparación con BOCG (Tabla 5). En la CG, FKLCi demostró una S del 83% y una eficiencia E del 96%, mientras que BOCG mostró una S del 75% y una E del 91%.

Con respecto a los algoritmos, KK y RO mostraron la mayor S con un 90% y redujeron eficazmente el consumo de PRBG, con una reducción del 100% en el caso de KK y del 74% RO. Los algoritmos que incorporaron valores de Link tuvieron una precisión diagnóstica más baja, con KL un 83% y KLO un 84%. KRO y FO demostraron capacidades comparables y elevadas para predecir EM. Alcanzando KRO una S del 89%, una E del 89% y una A del 89%; mientras que FO mostró una S del 88%, una E del 91% y una A del 89%. Sin embargo, KRO presentó mayor capacidad para mejorar PRBG (91%) en comparación con FO (64%) (Tabla 5).

La Figura 13 representa un diagrama de flujo del algoritmo KRO junto al número de pEM de la CG que fueron capturados con cada parámetro.

Resultados Objetivo 1

Tabla 5.- Rendimiento Diagnóstico de los Parámetros Cualitativos y los Algoritmos Junto Al Porcentaje de Reducción de Consumo de Bandas Oligoclonales IgG.

	Ensayo	S (%)	E (%)	VPP (%)	VPN (%)	A (%)	PRBG (%)
CT	BOCG	75 (65-83)	91(80-97)	95 (88-99)	61 (50-74)	80 (73-86)	-
	Reiber	55 (45-65)	98 (89-99)	98 (91-99)	49 (39-60)	68 (61-76)	-
	FKLC-R	87 (71-93)	79 (64-89)	89 (81-95)	74 (60-85)	84 (77-89)	-
	KR	80 (71-87)	94 (82-99)	96 (90-99)	69 (60-80)	84 (77-90)	100
	KK	88 (80-94)	77 (62-88)	89 (81-94)	75 (60-86)	84 (77-90)	100
	RO	88 (80-94)	77 (62-88)	89 (81-94)	75 (60-86)	84 (77-90)	66
	KL	80 (71-87)	87 (74-95)	93 (86-97)	67 (54-79)	82 (75-88)	100
	KO	86 (78-92)	91 (80-98)	95 (89-99)	75 (62-86)	88 (81-93)	66
	KRO	88 (79-93)	89 (77-96)	95 (88-98)	78 (63-87)	89 (81-93)	89
	KLO	86 (78-92)	74 (59-86)	88 (80-93)	71(56-83)	82 (75-88)	89
CV	BOCG	76 (61-87)	91(80-97)	90 (76-97)	80 (65-89)	84 (75-90)	-
	Reiber	76 (61-87)	98 (89-99)	97 (77-99)	81 (61-90)	87 (71-93)	-
	FKLC-R	95 (84-99)	79 (64-89)	81 (68-90)	95 (83-99)	87 (78-93)	-
	KR	93 (82-98)	94 (82-99)	93 (82-99)	94 (82-99)	93 (86-98)	100
	KK	96 (85-99)	77 (62-88)	80(66-89)	95(82-99)	86(77-92)	100
	RO	96 (85-99)	77 (62-88)	80(66-89)	95(82-99)	86(77-92)	57
	KL	91 (79-97)	87 (74-95)	87 (74-95)	91 (79-97)	89 (80-94)	100
	KO	93 (81-98)	91 (80-98)	91(79-97)	93 (82-98)	92(85-97)	45
	KRO	93 (81-98)	89 (77-96)	89 (77-96)	93 (81-98)	91 (84-96)	88
	KLO	91 (79-97)	74 (59-86)	77 (64-88)	90 (76-97)	83 (73-90)	88
CG	BOCG	75 (67-81)	91(80-97)	97 (91-99)	53 (42-64)	79 (72-84)	-
	Reiber	61(52-69)	98 (89-99)	99 (94-99)	43 (34-53)	70 (63-76)	-
	FKLC-R	88 (82-93)	79 (64-89)	93 (87-96)	69 (56-81)	86 (81-91)	-
	KR	84 (77-90)	94 (82-99)	98 (93-99)	66 (53-77)	86 (80-91)	100
	KK	90 (84-95)	77 (62-88)	92 (86-96)	72 (57-84)	87 (81-91)	100
	RO	90 (84-95)	77 (62-88)	92 (86-96)	72 (57-84)	87 (81-91)	74
	KL	83 (76-89)	87 (74-95)	94 (88-97)	62 (49-74)	83 (77-88)	100
	KO	88 (81-92)	91 (80-98)	97 (92-99)	70 (57-81)	89 (83-93)	64
	KRO	89 (83-93)	89 (77-96)	96 (92-99)	72 (59-83)	89 (83-93)	90
	KLO	88 (81-92)	74 (59-86)	91(85-95)	66 (51-78)	84 (79-89)	90

CT: Cohorte de Trabajo; CV: Cohorte de Validación; CG: Cohorte General; FKLCi: Índice de Cadenas Ligeras Kappa Libres; BOCG: Bandas Oligoclonales IgG; AUC: Área Bajo la Curva; S: Sensibilidad; E: Especificidad; VPP: Valor Predictivo Positivo; VPN: Valor Predictivo Negativo; A: Precisión; PRBG: Porcentaje de Reducción del Consumo de BOCG.

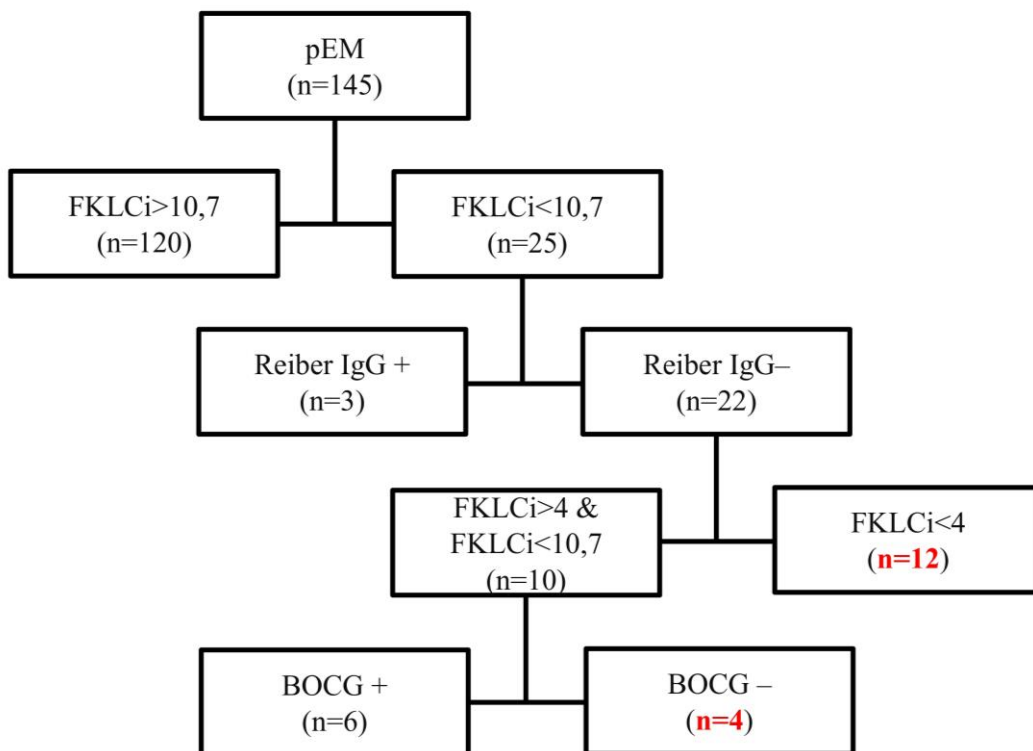


Figura 13.- Diagrama de Flujo del Algoritmo KRO.

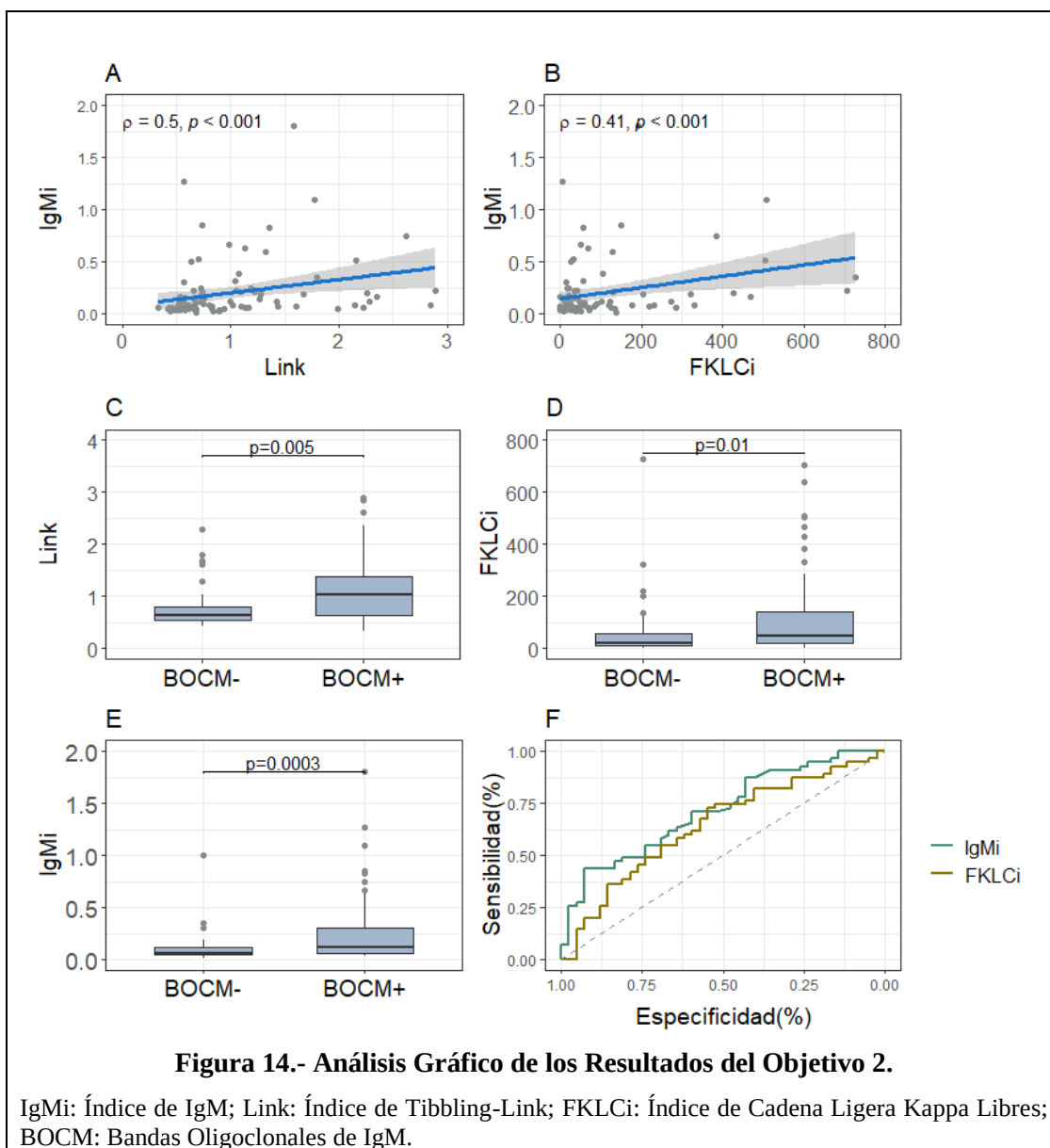
pEM: Pacientes con Diagnóstico de EM; FKLCi: Índice de Cadenas Ligeras Kappa Libres; Reiber IgG: Síntesis intratecal de IgG Evidenciada Mediante Reibergrama; BOCG: Bandas Oligoclonales IgG

Resultados Objetivo 2

Estudio transversal y retrospectivo con el objetivo de evaluar el rendimiento del FKLCi, así como del IgMi para la predecir la aparición de BOCM; reduciendo, de este modo, la necesidad de su consumo.

Resultados Objetivo 2

Un total de 97 pacientes fueron enrolados, 24 (25%) eran hombres y 73 eran mujeres (75%). 54 pacientes (56%) obtuvieron un resultado positivo para BOCM. Ninguna de las variables siguió una distribución normal ($p < 0.0001$). IgMi mostró una correlación significativa con Link y FKLCi (Figura 13A y 13B). El FKLCi, IgMi y Link de los pacientes con presencia de BOCM fueron significativamente superiores (Figura 14C, 14D y 14E). Las curvas ROC para IgMi y FKLCi en la predicción de BOCM mostraron un AUC de 0.71 (IC: 0.61-0.82) y 0.64 (IC: 0.53-0.75) respectivamente. No se halló diferencia entre ellas (Figura 13F).



Los modelos generados, junto con sus parámetros de rendimiento diagnóstico se presentan en la Tabla 1. El Modelo A logró el PRBM más alto (36%) (E=86%; VPP=86%); mientras que el Modelo C logró una mayor E y VPP (90% y 88% respectivamente) a expensas de un PRBM ligeramente menor (33%). De los 58 pacientes con BOCM+, 32 fueron detectables utilizando el Modelo C. El Modelo E exhibió la especificidad y VPP más bajas (Tabla 6).

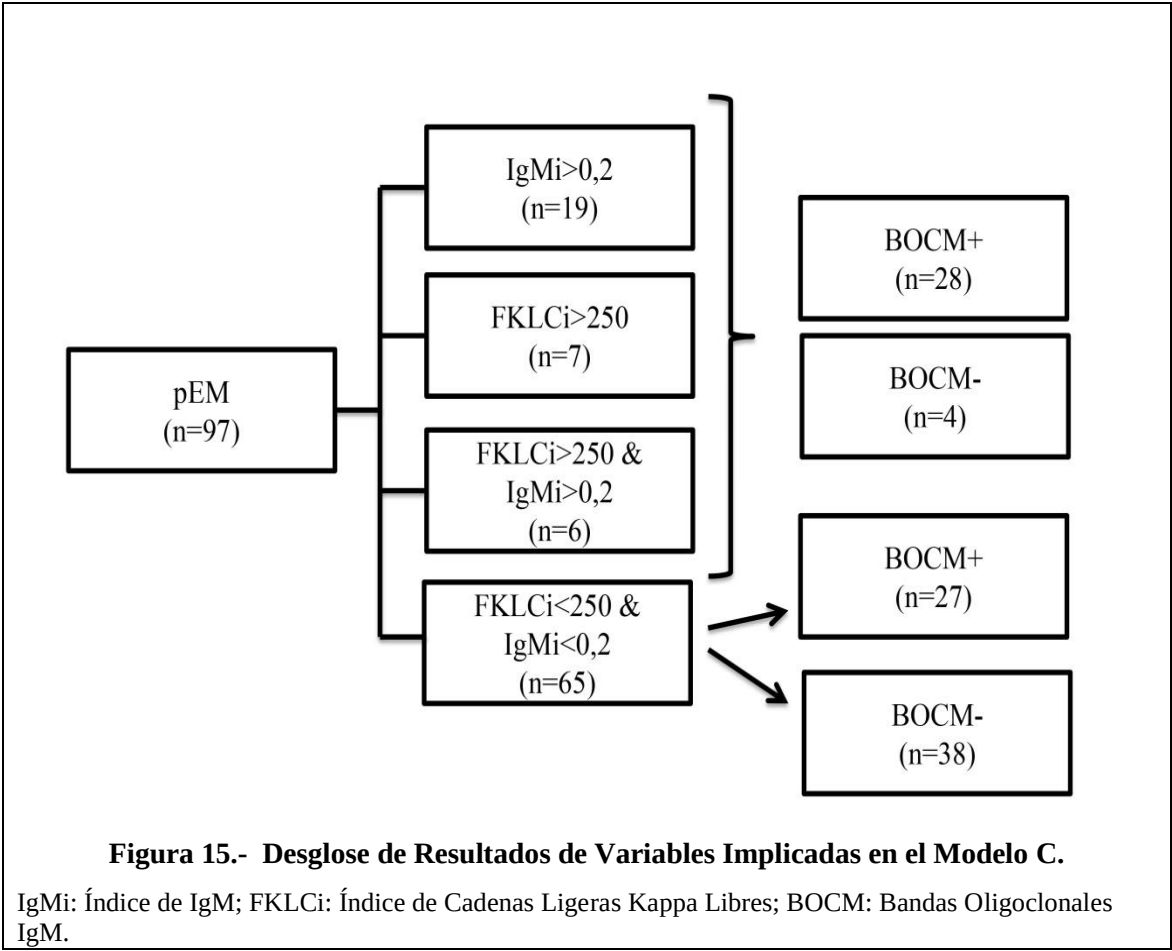
Tabla 6 Especificidad, Sensibilidad, VPP, VPN y PRBM para Varios Puntos de Corte de IgMi, FKLCi y los Modelos Para Predecir BOCM.

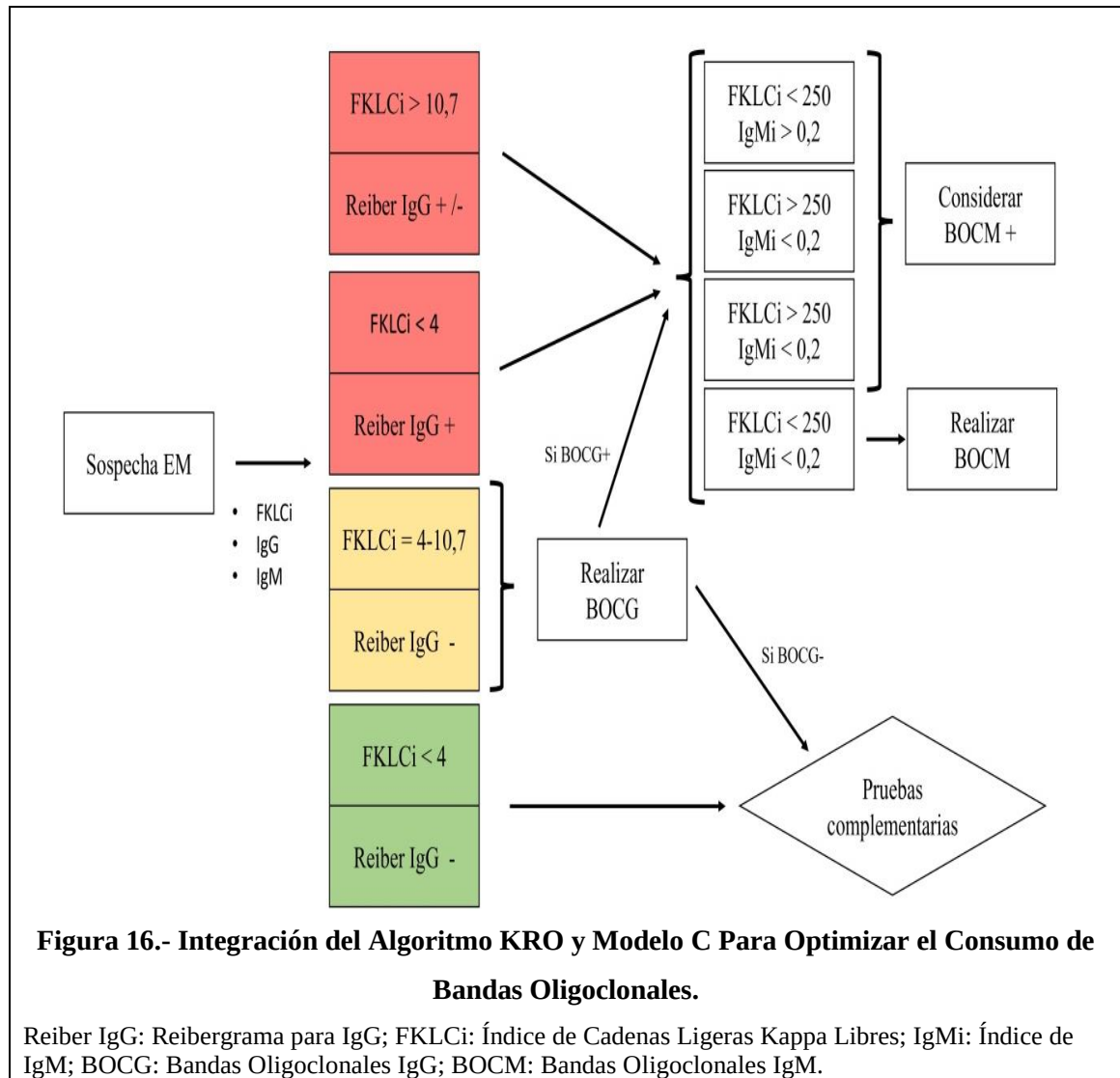
	Cutt-Off	E (%)	S (%)	VPP (%)	VPN (%)	PRBM (%)
IgMi	0,2	93(81-99)	42(29-56)	88(70-98)	55(43-67)	27%
IgMi	0,3	93 (81-99)	27 (16-41)	83 (59-96)	49 (38-61)	19%
FKLCi	200	88 (74-96)	20 (10-33)	69 (41-89)	46 (35-57)	16%
FKLCi	250	93 (81-99)	18 (9-31)	77 (46-95)	46 (35-58)	13%
Modelo A	-	86(71-95)	53(39-66)	83(66-93)	58(45-70)	36%
Modelo B	-	90(77-97)	38(25-52)	84(64-95)	53(41-65)	26%
Modelo C	-	90(77-97)	51(37-65)	88(71-96)	54(41-72)	33%
Modelo D	-	86 (71-95)	40 (27-54)	79 (59-92)	70 (55-90)	28%
Modelo E	-	76(61-88)	15(7-27)	44(22-69)	41(30-53)	19%

Los cut-off para IgMi y FKLCi en los diferentes modelos fueron los siguientes: Modelo A: 0.2/200; Modelo B: 0.3/250; Modelo C: 0.2/250; Modelo D: 0.3/200. IgMi: Índice de IgM; FKLCi: Índice de Cadenas Ligeras Kappa Libres; E: Especificidad; S: Sensibilidad; VPP: Valor Predictivo Positivo; VPN: Valor Predictivo Negativo; PRBM: Porcentaje de reducción en el consumo de BOCM.

Tal y como se muestra en la Figura 15, 28 (88%) de las 32 BOCM evitables de acuerdo con el Modelo C fueron positivas. En este algoritmo, el componente IgMi desempeñó un papel mayoritario en la predicción. De los 32 casos considerados como positivos, 19 (59%) de ellos fueron identificados exclusivamente debido a valores elevados en IgMi. En seis casos (19%) tanto el IgMi como el FKLCi sobrepasaron los puntos de cortes establecidos; mientras que los siete restantes (22%) se detectaron únicamente por el FKLCi (Figura 15).

La Figura 16 representa un mapa de procesos resultante de fusionar el algoritmo KRO del Objetivo 1 con el Modelo C. No se consideró necesaria el estudio de SIT-IgM en pacientes con SIT-IgG negativa.





Resultados Objetivo 3

Estudio bicéntrico, longitudinal y retrospectivo con el objetivo de comparar el potencial rol pronóstico de distintos marcadores en suero y LCR así como su combinación.

Resultados Objetivo 3

Inicialmente, se inscribió a una cohorte de 148 pEM, incluidos 103 pacientes de València y 45 de Girona. Antes del análisis estadístico, se excluyeron diez pacientes (siete por presentar un Síndrome Aislado Clínicamente y tres por optar por no iniciar el tratamiento). La investigación finalmente comprendió un total de 138 pEM. Durante un tiempo medio de cuatro años (IQR: 3.3), 39 pacientes (27.5%) manifestaron una transformación a peor (TF). La Tabla 1 describe las características clínicas y demográficas de los pacientes, junto con las razones específicas de la FT.

La mayoría de las FT (n=36) ocurrieron durante el tratamiento inicial, con solo tres eventos ocurriendo en pacientes que cambiaron a un segundo régimen de tratamiento debido a efectos secundarios (n=2) o intención de embarazo (n=1).

Cinco pacientes, cuyo tratamiento había sido ajustado previamente debido a una FT, experimentaron una recurrencia de tales eventos a pesar de hacer la transición a una segunda terapia. Entre ellos, dos estaban en un tratamiento de primera línea, mientras que los tres restantes estaban recibiendo un TME-AE. Ninguno de los pacientes demostró una FT al tercer tratamiento.

La tasa de FT como resultado de la primera opción de tratamiento fue del 50% para los TME-ME, y disminuyó al 21% para el TME-AE (Tabla 7).

Tabla 7.- Perfiles Clínicos y Demográficos de los Pacientes, Incluyendo Detalles sobre los Cursos de Tratamiento y Razones de Modificaciones y Pérdida del Estatus NEDA3.

Sexo(H/M)	35(25%)	102(75%)
Edad(años)	35(17)	
Centro (V/G)	103 (70%)	45 (30%)
EDSSi	2(1.5)	
EDSSf	2(1.5)	
Seguimiento (años)	4(3.3)	
TE (años)	4,6(3.2)	
TRMN (semanas)	9(16)	
TSPL (semanas)	10(18)	
TPIT (semanas)	9(8)	
TLPMR (semanas)	3(6)	
TDETI (semanas)	21(19)	
AI (Sí/No)	104(77%)	34(23%)
Razones de Modificación de Tratamiento		
FT	39(50%)	
Deseo Gestacional	8(11%)	
Efecto adverso	20(29%)	
Intolerancia	4(6%)	
Otros	3(4%)	
Tratamiento		
	No FT	FT
TME-ME	64 (47%)	32(23%)
TME-AE	34(25%)	7 (5%)
Motivo de FT		
Brote	20 (51%)	
$\Delta T2 > 2$	5 (13%)	
PIRA	3 (7%)	
Brotos + $\Delta T2 > 2$	10 (26%)	
$\Delta T2 > 2$ + PIRA	1 (3%)	

H: Hombre; M: Mujer; V: València; G: Girona; EDSSi: EDSS al Inicio del Periodo de Seguimiento; EDSSf: EDSS al Final de Periodo de Seguimiento; TE: Tiempo de Evolución; TRMN: Tiempo desde Primer Evento Desmielinizante Hasta Estudio de Imagen; TSPL: Tiempo desde el Evento Desmielinizante Inicial hasta la Punción Lumbar. TPIT: Tiempo desde la Punción hasta el Inicio del Tratamiento; TLPMR: Diferencia de Tiempo Entre Punción Lumbar y Estudio de Imagen; TDETI: Tiempo Desde Primer Evento Desmielinizante Hasta Instauración del Tratamiento; AI: Actividad Inflamatoria Aguda; FT: Fracaso Terapéutico; TME-ME: Tratamiento Modificador de la Enfermedad de Moderada Eficacia; TME-AE: Tratamiento Modificador de la Enfermedad de Alta Eficacia; $\Delta T2 > 2$: Aparición de Dos o Más Nuevas Lesiones en T2; PIRA: Progresión de la Discapacidad Independiente de Brote.

Análisis exploratorio

Ninguna de las variables cuantitativas se ajustó a una distribución normal ($p < 0.0001$). Se observó una correlación robusta y estadísticamente significativa entre los biomarcadores cuantitativos de SIT. Se identificó una correlación pronunciada entre NfL, GFAP en suero y LCR, y CHI3L1 (Figura 1). La EDSS mostró correlaciones significativas con la edad, sNfL, lcrNfL, sGFAP, lcrGFAP y CHI3L1. Por el contrario, la edad se correlacionó con sGFAP, lcrGFAP y CHI3L1 (Figura 17).

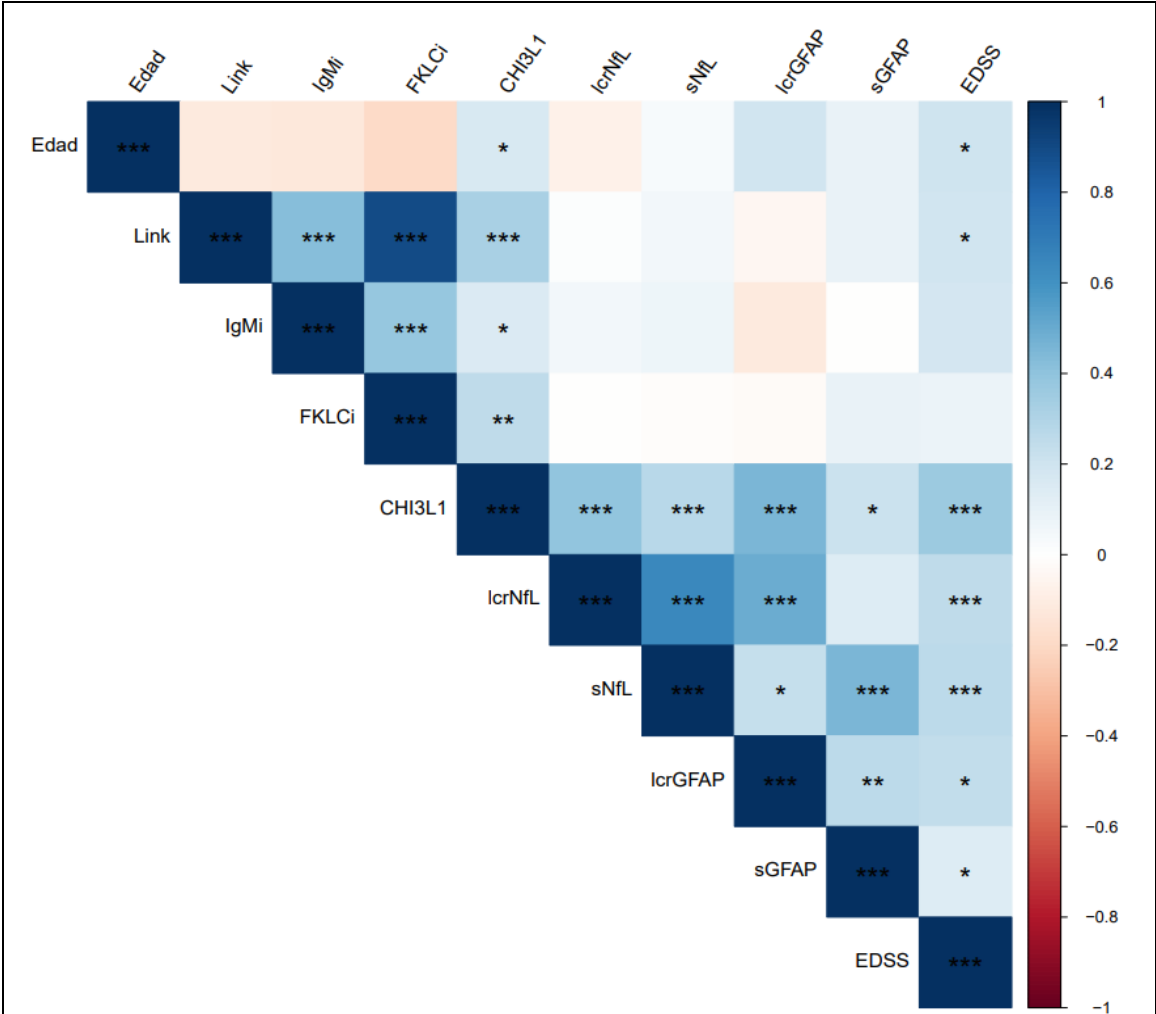


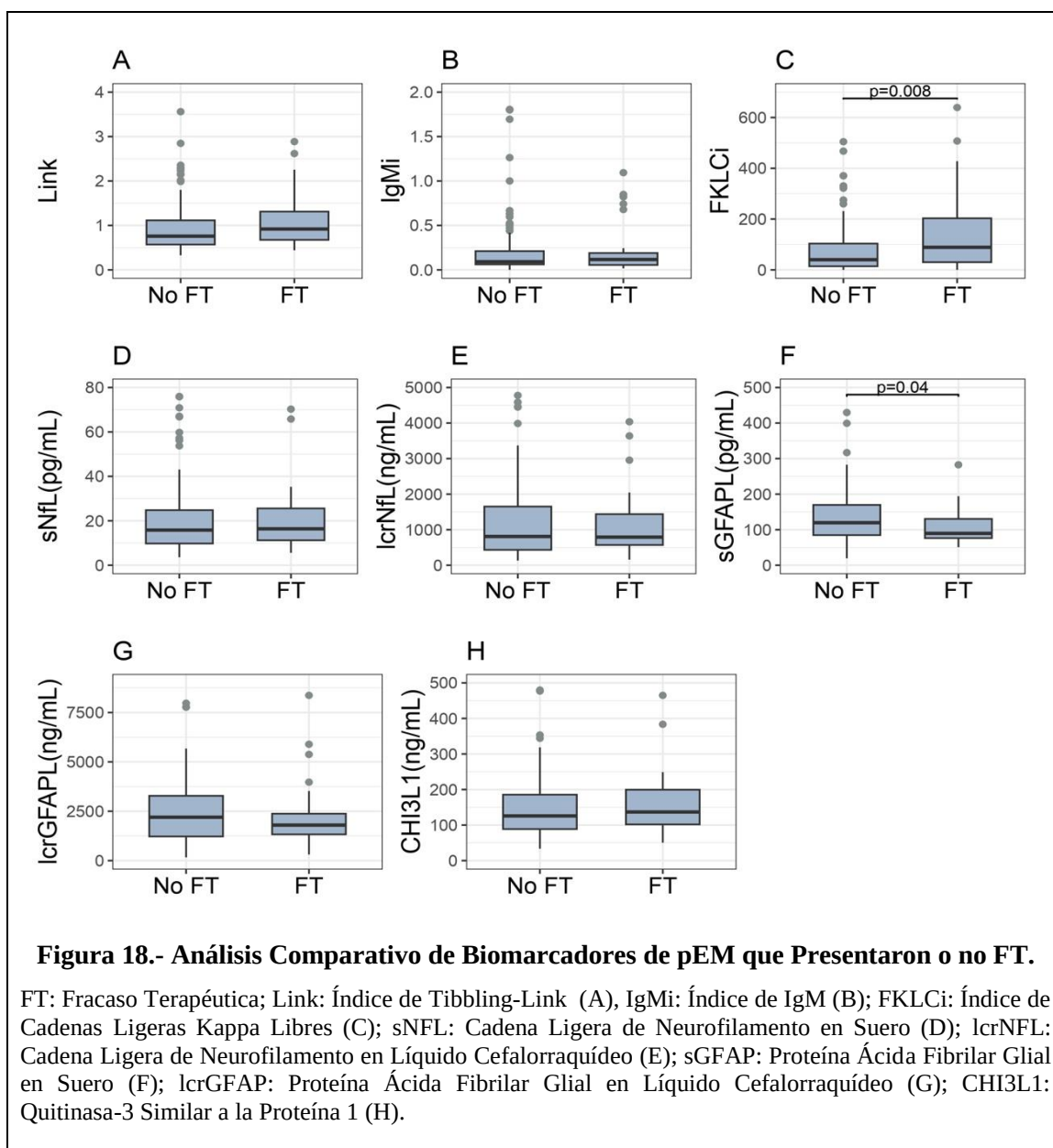
Figura 17.- Correlograma de los Biomarcadores Cuantitativos Incluidas en el Objetivo 3, Edad y EDSS.

Link: Índice de Tibbling-Link; IgMi: Índice de IgM; FKLCi: Índice de Cadenas Ligeras Kappa Libres; sNfL: Cadena Ligera de Neurofilamento en Suero; sGFAP: Proteína Ácida Fibrilar Glial en Suero; CHI3L1: Quitinasa-3 Like-1; lcrNfL: Cadena Ligera de Neurofilamento en Líquido Cefalorraquídeo; lcrGFAP: Proteína Ácida Fibrilar Glial en Líquido Cefalorraquídeo.

***: $p < 0.001$; **: $p < 0.01$, * $p < 0.05$

Los coeficientes rho de Spearman se representan mediante el gradiente de colores.

No se observaron diferencias entre la edad y EDSS en pacientes BOC o Reiber IgG y/o IgM positivos. La prueba de chi-cuadrado no reveló variaciones significativas en estas variables cualitativas al comparar las categorizaciones de FT y AI. sNfL y lcrNfL fueron significativamente más altos en pEM con AI en comparación con pacientes sin AI ($p=0.024$ y $p=0.03$, respectivamente). El FKLCi basal demostró un aumento estadísticamente significativo en pEM que presentaron FT ($p=0.008$) (Figura 18C); mientras que los niveles de sGFAP fueron más bajos en estos pacientes ($p=0.04$) (Figura 18F).



Análisis de supervivencia

Durante el período de estudio, dos pacientes fueron censurados debido al abandono del tratamiento, uno debido a mortalidad y otro debido a un cambio en el sistema de atención médica. Los tres pacientes que evolucionaron a fenotipos progresivos secundarios experimentaron un brotes previo, lo que llevó a su censura. La duración de seguimiento más corta del paciente fue de 1.2 años, mientras que la duración más larga fue de 8.56 años.

Análisis bivalente

Con respecto al examen de biomarcadores, solo FKLCi mostró una asociación significativa con FT (Figura 19A) (Log-Rank $p=0.004$; HR=2.5 (IC: 1.2-4.6)). La Tabla 8 proporciona el recuento de observaciones para cada biomarcador, junto con sus valores Q75 correspondientes y los resultados del análisis bivalente. Para las combinaciones, solo se observó significancia en el caso de FKLCi combinado con sNfL (Log-Rank $p=0.04$; HR=2 (IC: 1.1-3.9)) (Figura 19B). La Tabla 9 delinea estas combinaciones, incluidos los recuentos de pacientes respectivos y los resultados de la prueba de Log-Rank. Las Figuras 20 y 21 ilustran las curvas de Kaplan-Meier de parámetros no significativos en el análisis de los biomarcadores y sus respectivas combinaciones, respectivamente.

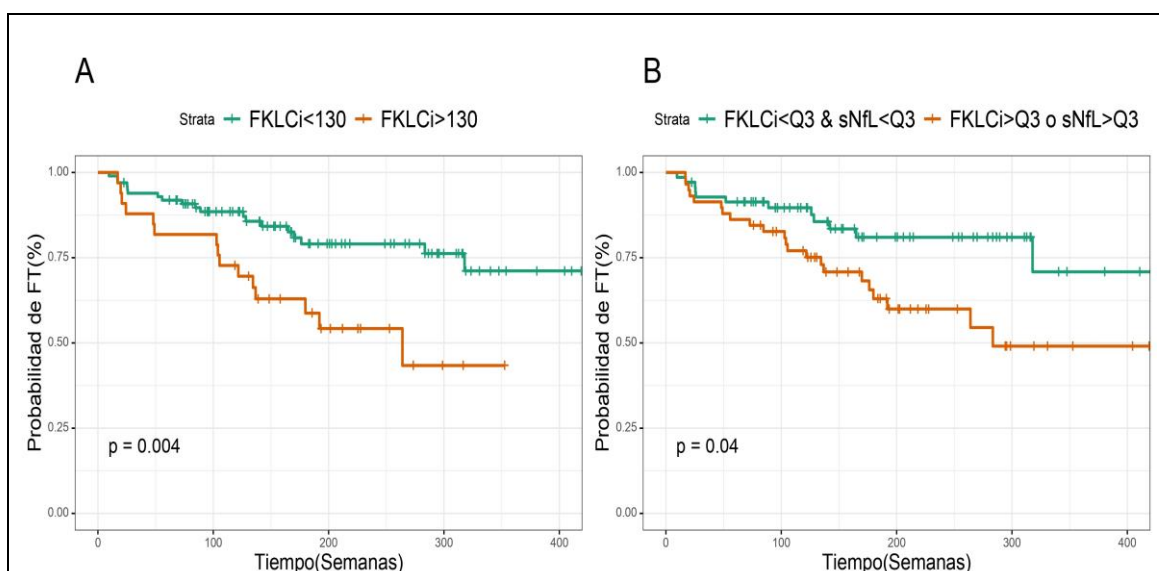


Figura 19.- Curvas de Kaplan-Meier para las Variables Significativas en la Predicción de FT.

FT: Fracaso Terapéutico; FKLCi: Índice de Cadenas Ligeras Kappa Libres; sNfL: Cadena Ligera de Neurofilamento en Suero; Q3: Tercer Cuartil

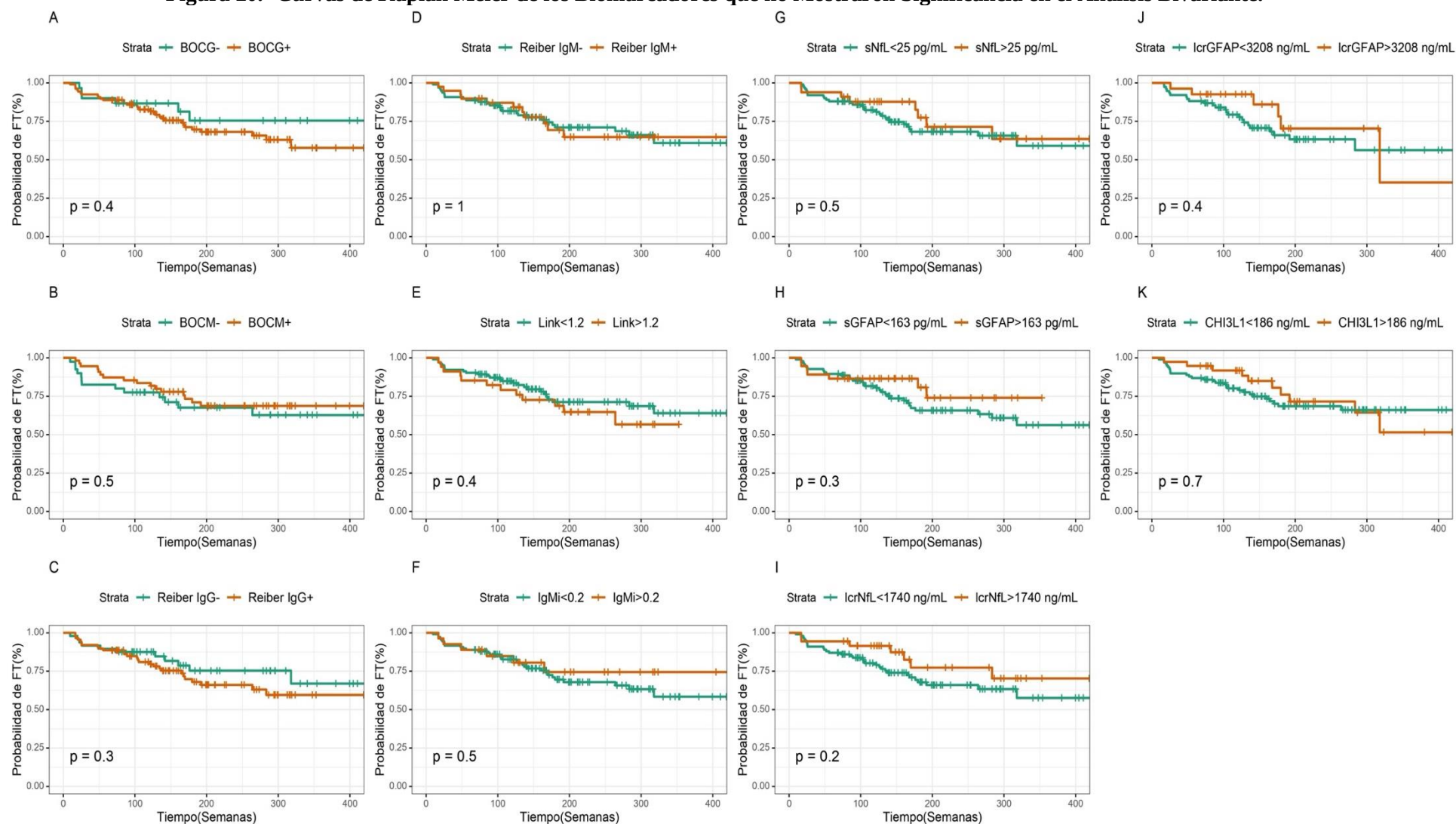
Tabla 8.- Análisis Descriptivo, Comparativo y de Supervivencia Bivariante de los Marcadores Estudiados, Junto con el Valor Correspondiente al Tercer Cuartil (Q75) y el Número de Observaciones que lo Exceden (Q75 (n)).

		Q75	Q75 (n)	Log-Rank p-valor
BOCG (+/-) (n=137)	107(78%)/30(21%)	-	-	0.4
BOCM (+/-) (n=95)	55(57%)/40(42%)	-	-	0.5
Reiber IgG (+/-) (n=136)	88(65%)/48(35%)	-	-	0.3
Reiber IgM (+/-) (n=136)	39(29%)/97(71%)			1
Link (n=136)	0.75 (0,62)	1,19	35	0.4
IgMi (n=136)	0.09 (0,14)	0,19	35	0.5
FKLCi (n=132)	45 (114)	130	33	0.008
sNFL (pg/mL) (n=133)	16 (15)	25	33	0.5
sGFAP (pg /mL) (n=133)	102 (81)	163	33	0.3
lcrNFL (ng /mL)(n=136)	829 (1296)	1740	36	0.2
lcrGFAP (ng /mL)(n=103)	2004 (1983)	3208	27	0.4
CHI3L1(ng /mL)(n=137)	130 (95)	186	38	0.7

El número desigual de observaciones para cada biomarcador surge de un volumen de muestra insuficiente en ciertas instancias. BOCG: Bandas Oligoclonales de IgG; BOCM: Bandas Oligoclonales de IgM; Reiber IgG: Reibergrama para IgG; Reiber IgM: Reibergrama para IgM; Link: Índice de Tibbling-Link IgG, IgMi: Índice de IgM; FKLCi: Índice de Cadenas Ligeras Kappa Libres; sNFL: Cadena Ligera de Neurofilamento en Suero; lcrNFL: Cadena Ligera de Neurofilamento en Líquido Ceforraquídeo; sGFAP: Proteína Ácida Fibrilar Glial en Suero; lcrGFAP: Proteína Ácida Fibrilar Glial en Líquido Ceforraquídeo; CHI3L1: Quitinasa-3 Similar a la Proteína 1.

Resultados Objetivo 3

Figura 20.- Curvas de Kaplan Meier de los Biomarcadores que no Mostraron Significancia en el Análisis Bivariante.



BOCG: Bandas Oligoclonales de IgG; BOCM: Bandas Oligoclonales de IgM; Reiber IgG: Reibergrama para IgG; Reiber IgM: Reibergrama para IgM; Link: Índice de Tibbling-Link; IgMi: Índice de IgM; sNfL: Cadena Ligera de Neurofilamento en Suero; lcrNfL: Cadena Ligera de Neurofilamento en Líquido Ceforraquídeo; sGFAP: Proteína Ácida Fibrilar Glial en Suero; lcrGFAP: Proteína Ácida Fibrilar Glial en Líquido Ceforraquídeo; CHI3L1: Quitinasa-3 Similar a la Proteína 1.

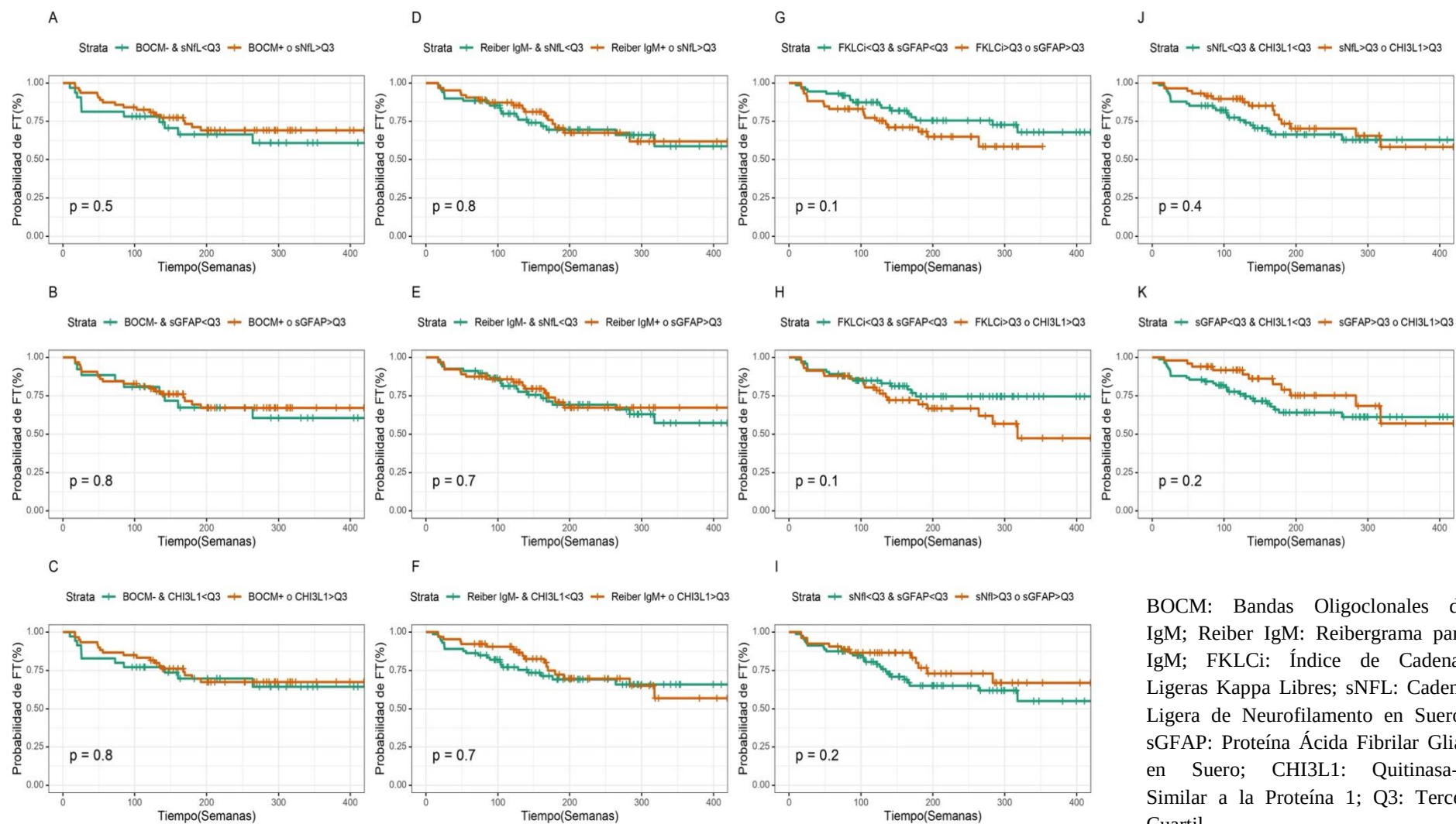
Tabla 9.- Combinaciones de Biomarcadores Examinadas, Junto con los Resultados del Análisis Bivariante y el Número de Pacientes que las Presentan (n).

Combinación		Log Rank p-valor	n
BOCM	sNfL	0.4	63(66%) *
BOCM	sGFAP	0.3	60(63%) *
BOCM	CHI3L1	0.7	60(63%) *
Reiber IgM	sNfL	0.7	63 (48%)
Reiber IgM	sGFAP	0.7	64 (48%)
Reiber IgM	CHI3L1	0.7	64 (48%)
FKLCi	sNfL	0.04	58 (45%)
FKLCi	sGFAP	0.07	59 (44%)
FKLCi	CHI3L1	0.07	60 (45%)
CHI3L1	sNfL	0.5	59 (44%)
CHI3L1	sGFAP	0.3	50 (38%)
sNfL	sGFAP	0.3	53 (40%)

Los pacientes fueron divididos en dos grupos en función de si alguno de los dos parámetros resultaba positivo (para variables cualitativas) o excedía el tercer cuartil (para variables cuantitativas). *Téngase en cuenta que los datos de BOCM de los pacientes procedentes de la CT no estuvieron disponibles. BOCM: Bandas Oligoclonales de IgM; Reiber IgM: Reibergrama para IgM; FKLCi: Índice de Cadenas Ligeras Kappa Libres; sNfL: Cadena Ligera de Neurofilamento en Suero; sGFAP: Proteína Ácida Fibrilar Glial en Suero; CHI3L1: Quitinasa-3 Similar a la Proteína 1.

Resultados Objetivo 3

Figura 21.- Curvas de Kaplan Meyer de las Combinaciones de Biomarcadores que no Mostraron Significancia en el Análisis Bivariante.

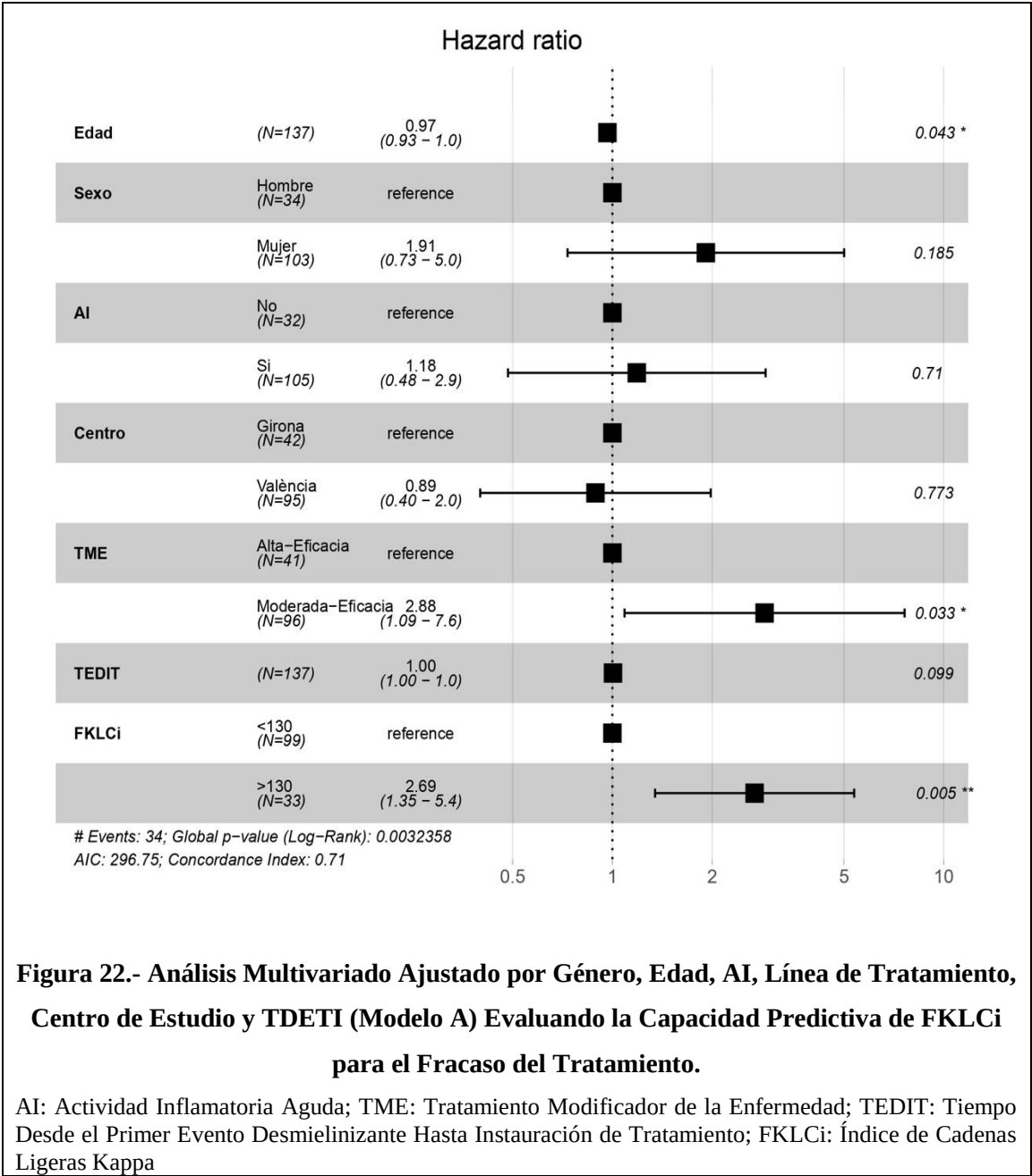


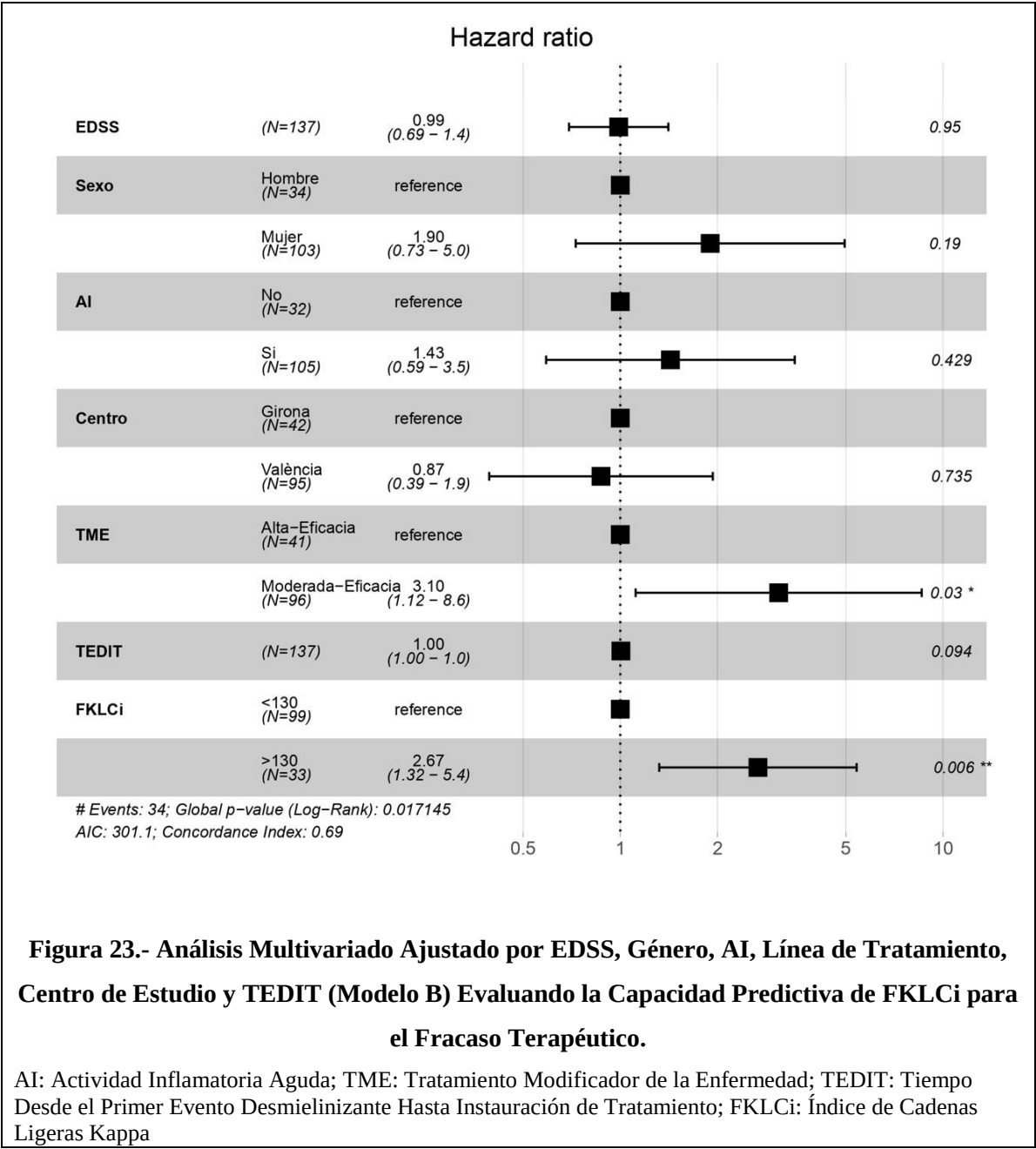
BOCM: Bandas Oligoclonales de IgM; Reiber IgM: Reibergrama para IgM; FKLCi: Índice de Cadenas Ligeras Kappa Libres; sNFL: Cadena Ligera de Neurofilamento en Suero; sGFAP: Proteína Ácida Fibrilar Glial en Suero; CHI3L1: Quitinasa-3 Similar a la Proteína 1; Q3: Tercer Cuartil

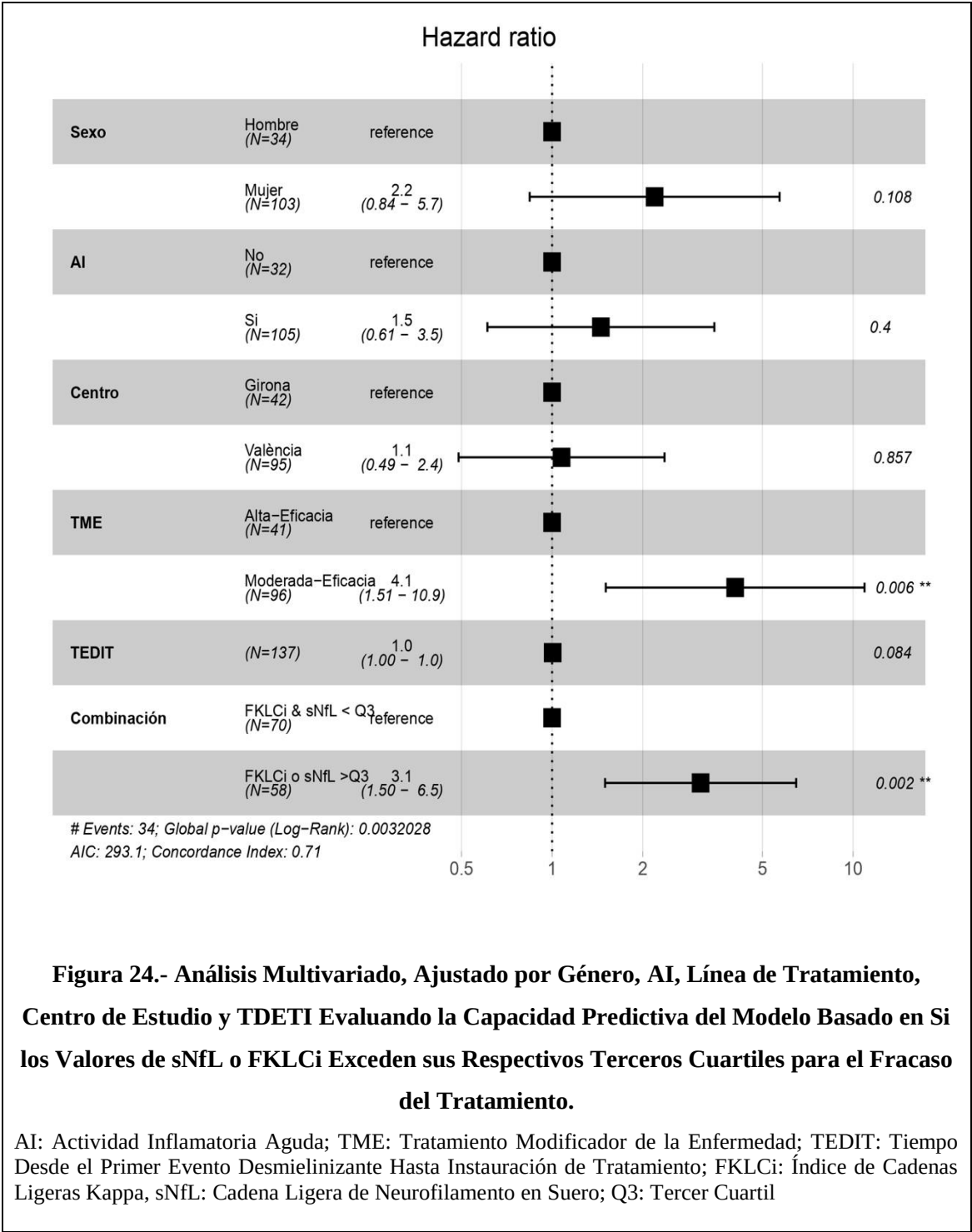
Análisis multivariante

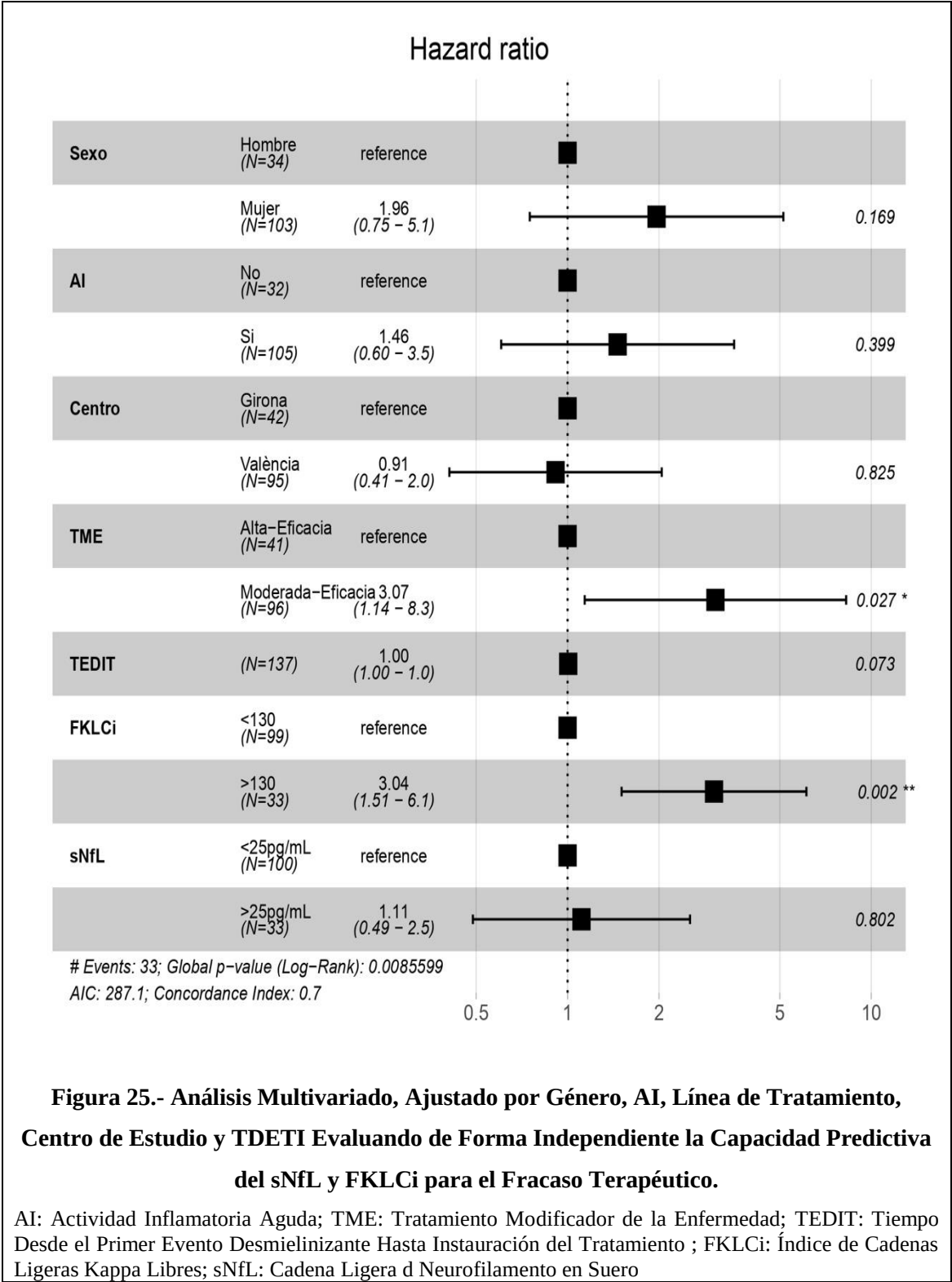
Dada la observada colinealidad entre EDSS y edad, se construyeron dos modelos multivariados con FKLCi, uno para cada variable, junto con sexo, AI, TME, centro de estudio y TDETI. El Modelo A incorporó la edad, mientras que el Modelo B incorporó EDSS. Ambos corroboraron los hallazgos del análisis bivariado; en el Modelo A, la HR para FKLCi fue de 2.69 (IC: 1.35-5.37; $p=0.005$) (Figura 22), mientras que en el Modelo B fue de 2.67 (IC: 1.32-5.4; $p=0.006$) (Figura 23). La edad emergió como un factor protector débil (HR: 0.97; IC: 0.93-1; $p=0.043$) (Figura 22).

Debido a la correlación observada entre sNfL, edad y EDSS (Figura 1), estas variables de confusión fueron excluidas de los modelos que incorporaron sNfL ya sea individualmente o en combinación. En el modelo que examinó el algoritmo combinando sNfL y FKLCi, mostró un potencial ligeramente mayor (HR: 3.11; IC: 1.5-6.5; $p=0.002$) (Figura 24) en comparación con el uso de FKLCi en solitario. Sin embargo, cuando se analizaron de forma independiente, solo el FKLCi demostró significancia estadística (HR: 3.04; IC: 1.51-6.1; $p=0.002$) (Figura 25). En todos los modelos generados el tratamiento con TME-ME se identificó como un factor de riesgo (Figura 22, Figura 23, Figura 24 y Figura 25).









Resultados Objetivo 4

Análisis comparativo de los valores de sC1q y lcrC1q de tres cohortes pEM con respecto a un grupo de controles sanos, otro con patologías neurológicas inflamatorias y otro con no inflamatorias. Y estudio de correlación de C1q de pEM con otros biomarcadores en suero y LCR.

Resultados Objetivo 4

Un total de 303 individuos fueron inscritos (222 pEM, 52 CS, 14 ENI y 15 ENNI). La Tabla 10 proporciona detalles sobre las características clínicas y demográficas de los participantes en el estudio. El Anexo IV ofrece información sobre las patologías presentadas por pacientes con otros trastornos neurológicos.

Tabla 10.- Datos Clínicos y Demográficos de los Pacientes Incluidos en el Objetivo 4.

	CT (n=97)	VC (n=45)	VC2 (n=80)	CS (n=52)	ENI (n=14)	ENNI (n=15)
Sexo (M/H)	74(76%)/23(24%)	31(69%)/14(31%)	50(63%)/30(37%)	34(65%)/18(35%)	6(43%)/8(57%)	7(47%)/8(53%)
Edad (años)	35,5(18)	36(18)	32(15)	38.5(20)	52(10)	42(17)
AI (Sí/No)	72(75%)/24(25%)	30(67%)/15(33%)	58(73%)/22(27%)	-	-	-
sC1q (mg/dL)	11(10)	9(1.7)	10(2.9)	27.3(12.6)	8,1(5)	19,8(17) †
lcrC1q (ng/mL)	280(137)*	208(135)	-	-	156,4(57)	177(71) †
anti-C1q(+/-)	4(4%)/93(96%)	4(9%)/41(91%)	1(1%)/79(99%)	-	-	-
TEPL (semanas)	7(12)	16(49)	19(256)	-	-	-
T2VL(mL)	1,68(4.67)	-	-	-	-	-
T2NL	12(13)	-	-	-	-	-
sIgG(g/L)	10.2(3.15)	10.43(2.6)	-	-	-	-
sIgM(mg/dL)	98(89)	102(90)	-	-	-	-
sFKLC(mg/L)	12.5(5)	16(5.5)	-	-	-	-
lcrIgG(mg/dL)	39(35)	34(24)	-	-	-	-
lcrIgM(mg/L)	0.48(0.7)	0.5(1)	-	-	-	-
lcrFKLC(mg/L)	12.55)	16.6(5.5)	-	-	-	-
Link	0,72(0,61)	0,84(0,62)	-	-	-	-
IgMi	0,08(0,15)	0,12(0,13)	-	-	-	-
FKLCi	37(111)	62(120)	-	-	-	-
sNfL(pg/mL)	15,9(15,5)	15,4(20,8)	-	-	-	-
lcrNfL(ng/mL)	714 (1348)	975 (1292)	-	-	-	-
sGFAP(pg/mL)	118(77)	96(80)	-	-	-	-
lcrGFAP(ng/mL)	1794(2137)	2489(1875)	-	-	-	-
CHI3L1(ng/mL)	123(95)	156(105)	-	-	-	-

M: Mujer; H: Hombre; AI: Actividad Inflamatoria Aguda; sC1q: C1q en Suero; lcrC1q: C1q en Líquido Cefalorraquídeo; TEPL: Tiempo Desde el Primer Evento Desmielinizante Hasta Punción Lumbar; T2VL: Volumen de Lesiones en T2; T2NL: Número de Lesiones en T2; sIgG: IgG en Suero, sIgM: IgM en Suero; sFKLC: Cadenas Ligeras Kappa Libres en Suero; lcrIgG: IgG en Líquido Cefalorraquídeo; lcrIgM: IgM en Líquido Cefalorraquídeo; lcrFKLC: Cadenas Ligeras Kappa Libres en Líquido

Cefalorraquídeo; Link: Índice de Tibbling-Link; IgMi: Índice de IgM; FKLCi: Índice de Cadenas Ligeras Kappa Libres; sNFL: Cadena Ligera de Neurofilamento en Suero; lcrNFL: Cadena Ligera de Neurofilamento en Líquido Cefalorraquídeo sGFAP: Proteína Acídica Fibrilar Glial en Suero; lcrGFAP: Proteína Acídica Fibrilar Glial en Líquido Cefalorraquídeo; CHI3L1: Chitinasa-3 Like-1; lcrIgG: IgG en Líquido Cefalorraquídeo; lcrFKLC: Cadenas Ligeras Kappa Libres en Líquido Cefalorraquídeo. ***En el caso del lcrC1q en la CT, el tamaño muestral fue de 75, dada la indisponibilidad de suficiente volumen de LCR para realizar la determinación de este parámetro. † En la cohorte ENNI, no fue posible obtener muestras simultáneas de suero y LCR de manera uniforme en todos los pacientes, como se ilustra en Anexo V.**

Ninguna de las variables cuantitativas siguió una distribución normal ($p < 0.0001$). No se observaron diferencias en los niveles de sC1q o lcrC1q entre géneros, y no hubo correlación con la edad ni con el tiempo desde el primer evento desmielinizante hasta el estudio del LCR.

Las tres series de pEM y el grupo ENI mostraron niveles significativamente reducidos de sC1q en comparación con los CS. Tanto CV como CV2 presentaron valores disminuidos de sC1q en comparación con ENNI, mientras que CT no mostró esta diferencia. Las concentraciones de sC1q en el grupo ENI no difirieron de las de pEM. Los niveles de sC1q fueron significativamente más bajos en el grupo ENI en comparación con ENNI. Dentro de las series de pEM, CT mostró valores de sC1q más altos que CV y CV2 (Figura 26A).

En cuanto a lcrC1q, CT demostró valores significativamente elevados en comparación con los grupos ENI y ENNI, mientras que las concentraciones en CV solo mostraron una tendencia cuando se compararon con estos grupos ($p = 0.07$). CT también mostró niveles aumentados de lcrC1q en comparación con CV (Figura 26B).

No se observaron diferencias significativas en sC1q (Figura 26C) y lcrC1q (Figura 26D) entre pEM con y sin AI en ninguna de las tres series. En cuanto a los anti-C1q, la positividad se encontró en cuatro pacientes (4%) en el grupo CT, otros cuatro en CV (9%), y uno (1%) en CV2 (Tabla 10).

Las concentraciones de sC1q y lcrC1q no mostraron correlación entre sí ni con T2VL (Figura 27 A, B y C) y T2NL. sC1q no mostró correlación con ninguno de los biomarcadores analizados. Aunque lcrC1q no mostró correlación con Link o FKLCi, sí lo hizo con lcrIgG ($\rho = 0.33$, $p < 0.0001$) (Figura 27D) y lcrFKLC ($\rho = 0.28$; $p = 0.002$) (Figura 27E). También se correlacionó con lcrGFAP ($\rho = 0.33$; $p < 0.0001$) (Figura 27I)

Resultados Objetivo 4

y CHI3L1 ($\rho=0.21$; $p=0.026$) (Figura 27H). No se encontró correlación entre lcrC1q e IgM y NfL en suero o LCR ni con el IgMi.

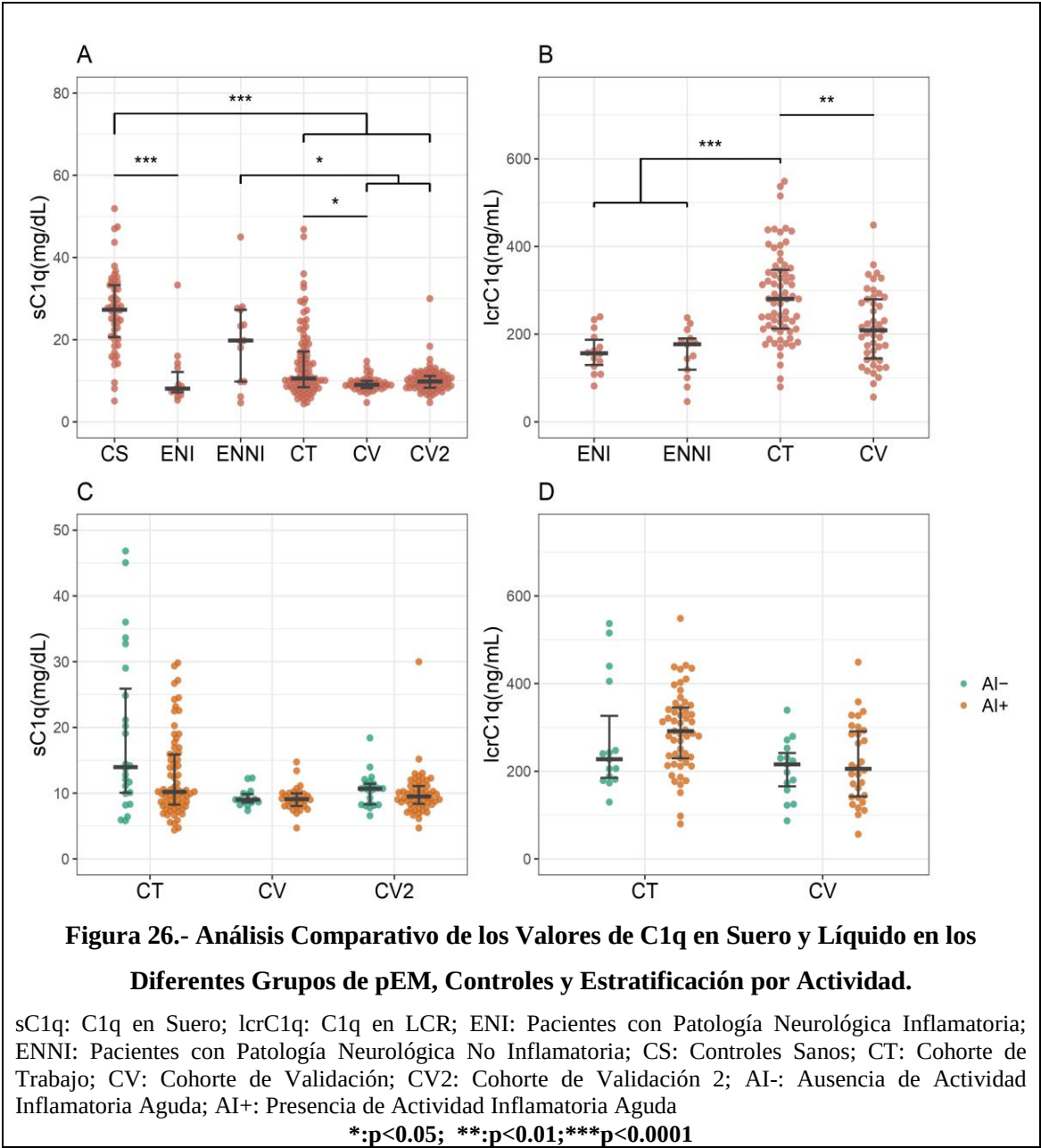
Las Figuras 28 y 29 ilustran los valores de C1q presentados para cada paciente incluido en los grupos ENI y ENNI, respectivamente.

La Tabla 11 muestra los coeficientes de correlación entre distintos marcadores cuantitativos analizados en el presente proyecto con T2VL y T2NL.

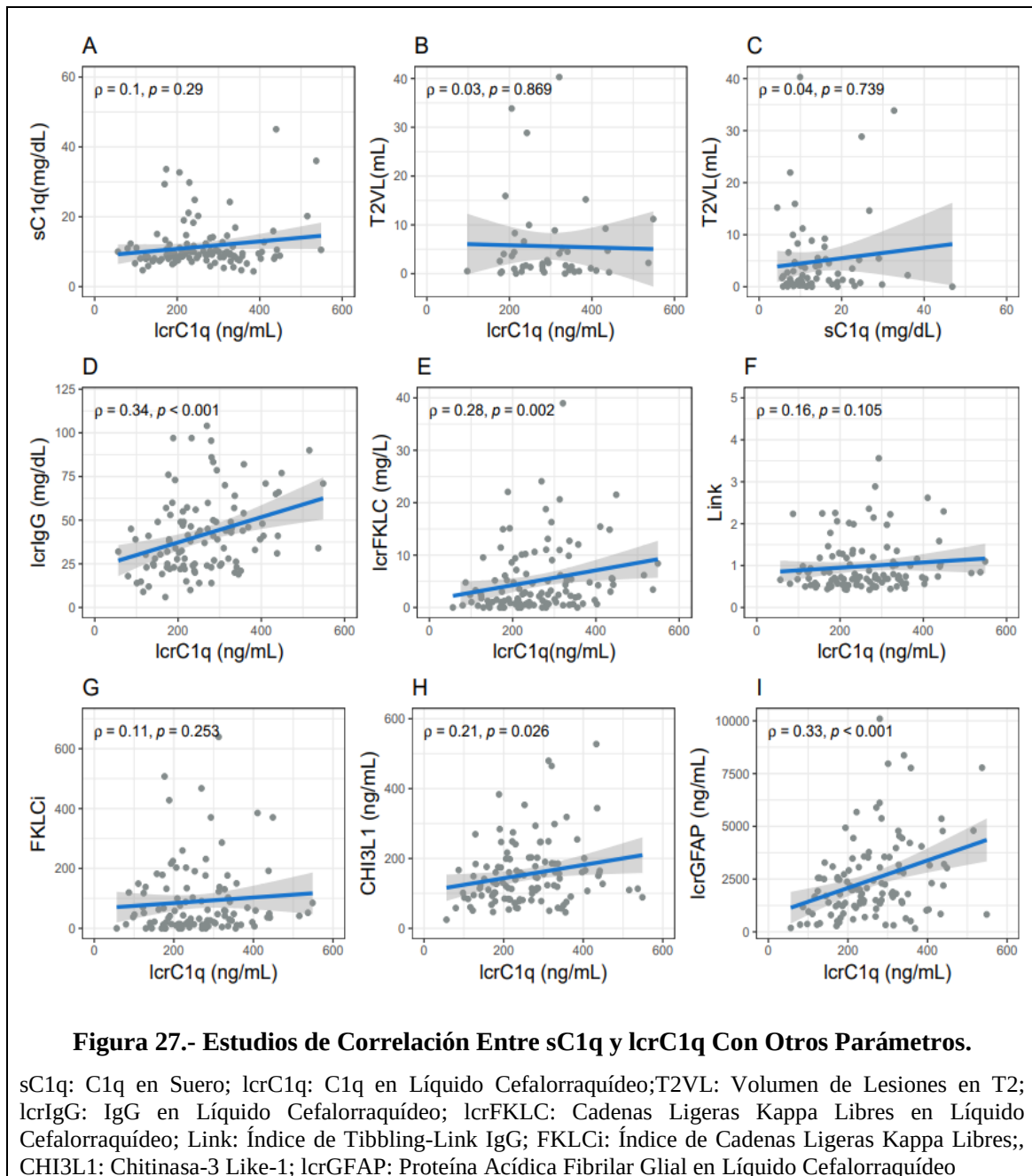
Tabla 11.- Coeficientes de Correlación Entre el Número y Volumen de Lesiones y Diferentes Marcadores.

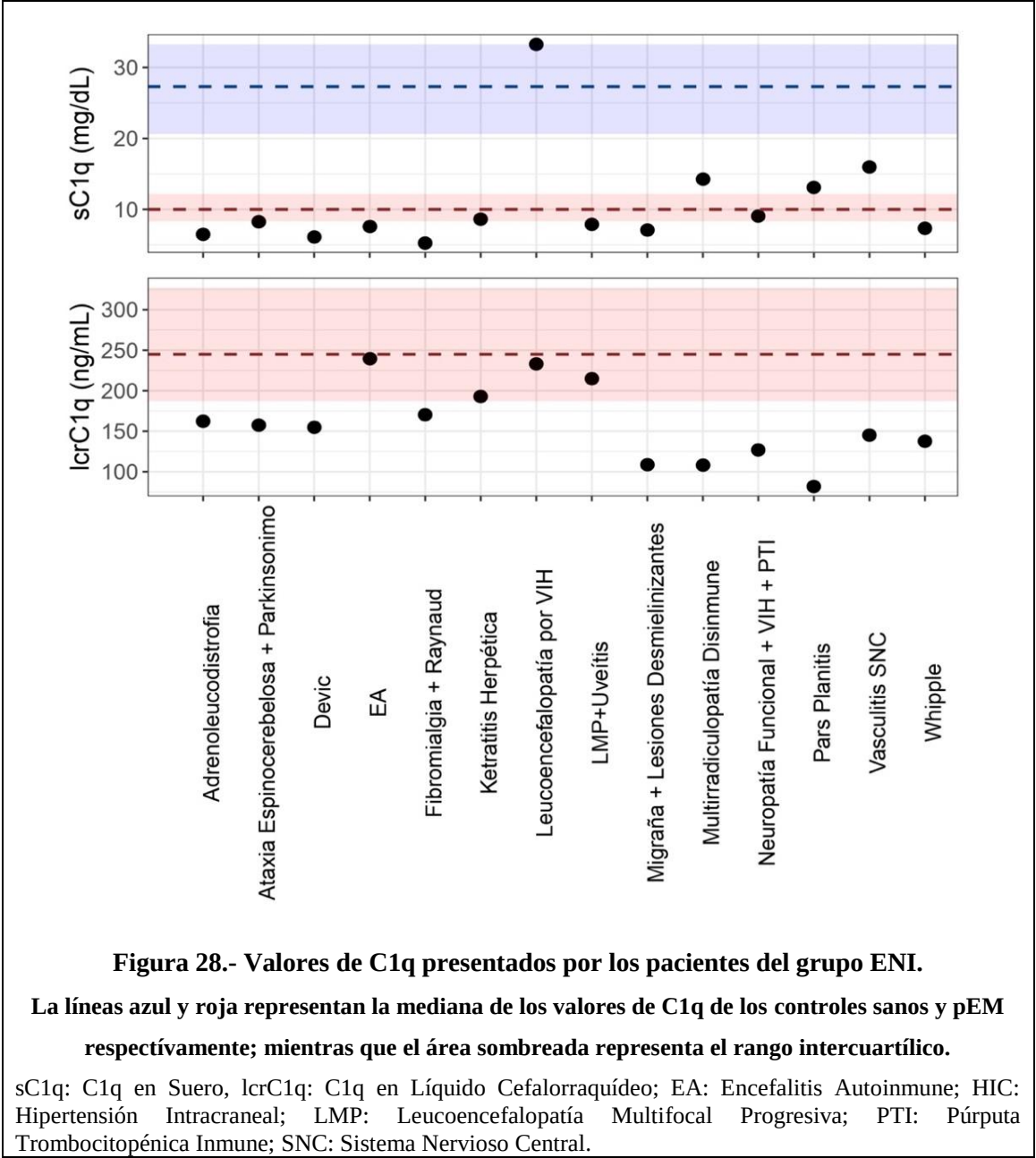
	Link*	IgMi*	FKLCi*	sNfL	lcrNfL	sGFAP	lcrGFAP	CHI3L1
T2VL	ns	ns	ns	0,41(0,0004)	ns	0,43(0,0002)	ns	0,33(0,004)
T2NL	ns	ns	ns	0,31(0,008)	0,24(0,03)	0,41(0,0004)	ns	0,3(0,007)

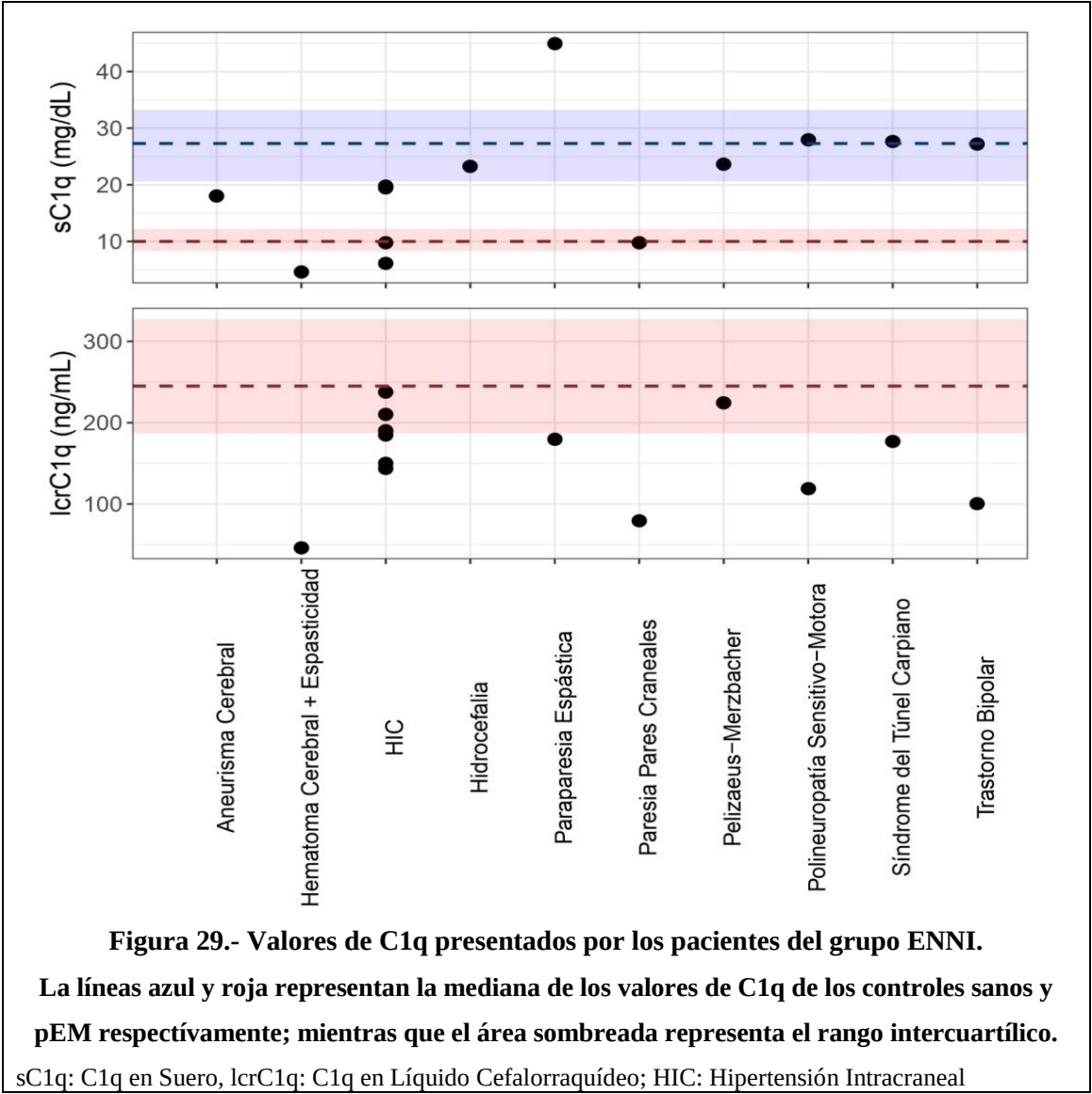
Se expone el coeficiente de correlación rho de Spearman junto con su nivel de significancia. T2VL: Volumen de Lesiones en T2; T2 NL: Número de Lesiones en T2; Link: Índice de Tibbling-Link; IgMi: Índice de IgMFKLCi: Índice de Cadenas Ligeras Kappa Libres; sNfL: Cadena Ligera de Neurofilamento en Suero; lcrMfL: Cadena Ligera de Neurofilamento en Líquido Cefalorraquídeo; sGFAP: Proteína Acídica Fibrilar Glial en Suero; lcrGFAP: Proteína Acídica Fibrilar Glial en Líquido Cefalorraquídeo; CHI3L1: Chitinasa-3 Like-1 * El análisis de correlación llevado a cabo para IgG, IgM y FKLC en LCR tampoco reveló significancia.



Resultados Objetivo 4







DISCUSIÓN

Discusión

El algoritmo desarrollado basado en la determinación de FKLCi y Reiber IgG como parámetros diagnósticos principales (KRO), ha demostrado ser el más efectivo en la reducción de la necesidad de determinar BOCG para poner de manifiesto la presencia de SIT-IgG, la cual está vinculada al diagnóstico de la EM. Se requirió realizar las BOCG únicamente en el 9% del total de muestras. Al combinar paso a paso tres técnicas diferentes (determinación cualitativa con cálculos cualitativos y cuantitativos), se mejoró la sensibilidad, precisión y VPN en la predicción de SIT-IgG, pero a expensas de una ligera disminución de la E y VPP en comparación con BOCG.

Aunque el papel de FKLCi y BOCG en la detección de la EM ha sido ampliamente discutido en varios estudios, actualmente no hay evidencia en la literatura sobre la detección de la EM utilizando nuestra metodología. La investigación realizada por Gudowska et al. propusieron un algoritmo para detectar SIT-IgG mediante el uso de un índice combinado con Q_{IgG} . Su metodología logró una sensibilidad similar pero una especificidad más baja en comparación con los hallazgos del presente estudio (253). La sensibilidad y especificidad de FKLCi y BOCG obtenida para las tres cohortes se encuentran dentro del rango de resultados recopilados en un reciente metaanálisis realizado con 32 estudios. En nuestro caso, el FKLCi mostró una E más alta en comparación con las BOCG, a diferencia de los hallazgos reportados por algunos autores (143).

El algoritmo KRO presenta un rendimiento diagnóstico comparable, e incluso superior, en comparación con estudios previos centrados en el uso en solitario de las FKLCi, realizados por Rosenstein et al., Bernardi et al., Agnello et al., Valencia-Vera et al. y otros investigadores (166,170,172,254–258). En contraposición, estudios como Duell et al. y Pieri et. al, informaron un mejor rendimiento utilizando ese marcador en solitario (259,260). Por lo tanto, se recomienda que el algoritmo KRO sea sometido a pruebas adicionales en estudios con cohortes más grandes para evaluar su rendimiento de manera más integral. Debe tenerse en cuenta que la E de los parámetros de SIT-IgG de los estudios que incluyen pacientes con otras patologías neurológicas inflamatorias como controles suele ser menor (143).

Nuestro estudio difiere de investigaciones previas que sugieren no reemplazar estas técnicas, sino utilizar ambas al mismo tiempo (256,261). Nuestro algoritmo demuestra la capacidad de reducir sustancialmente el consumo de BOCG, en línea con el nuevo

consenso (173). Los resultados obtenidos en el reciente estudio de Monreal et al. (262), con un enfoque análogo al nuestro pero sin hacer uso de Reiber IgG, contribuyen significativamente a la robustez de la presente investigación. La precisión del algoritmo propuesto por estos autores fue superior al nuestro (95%), sin embargo su cohorte de controles consistió en un grupo de pacientes CIS que no evolucionaron a EM durante un periodo de seguimiento (262).

Además, al reducir el cut-off de FKLCi para lograr una sensibilidad similar a KRO, se obtuvo una menor precisión y E que el algoritmo. Hecho que respalda la idea de que KRO supera a FKLCi.

La utilización de diferentes instrumentos para la detección de IgG en CT y CV podría explicar la discrepancia de sensibilidad observada entre Link y Reiber IgG en ambas cohortes. Sin embargo, esta disparidad también se refleja en FKLCi y en los algoritmos. El hecho de haber cuantificado las FKLC utilizando el mismo instrumento en ambas series descarta esta noción, atribuyendo la diferencia a la condición de los pacientes, como la presencia de pacientes con CIS en CT o el mayor tiempo de evolución en CV. Por otro lado, no es de extrañar que la especificidad obtenida para parámetros con resultados cualitativos fuese igual en CV, CT y CG, ya que se calcularon en base al mismo grupo de pacientes controles.

Similar a estudios anteriores, FKLC-R demostró valores de S más altas, lo que indica su capacidad para detectar esta condición. Sin embargo, su especificidad fue menor (172,175).

La principal ventaja del algoritmo KRO es que mayoría de las determinaciones involucradas (salvo las BOCG) se pueden implementar fácilmente en laboratorios ordinarios. En primer lugar, la cuantificación de FKLC, albúmina e IgG en suero y LCR puede realizarse mediante autoanalizadores. Los cálculos para el FKLCi y Reiber IgG pueden ser automatizados en el software de gestión de resultados de laboratorio.

Actualmente, existen dos pruebas disponibles para cuantificar FKLC en LCR. La prueba Freelite® (The Binding Site) es una prueba polimorfa turbidimétrica que incorpora anticuerpos policlonales anti-FKLC generados en ovejas mediante la inmunización con un pool de FKLC humanas. Por otro lado, NLatex® (Siemens) es una prueba nefelométrica monoclonal en la que el reactivo incluye una mezcla de

Discusión

anticuerpos monoclonales, cada uno producido en líneas celulares híbridas. Debido a estas distinciones, pueden surgir ciertas limitaciones; sin embargo, no se han observado diferencias discernibles en términos de rendimiento diagnóstico entre ambos ensayos para la detección de SIT-IgG (263,264). Aun así, sería prudente que los laboratorios individuales definieran sus puntos de corte específicos, acompañados de estudios exhaustivos destinados a elucidar y abordar este posible origen de la variabilidad entre lotes.

La principal limitación del uso de FKLC como principal marcador de SIT es su incapacidad para diferenciar entre los isotipos de inmunoglobulina sintetizados intratecalmente (G, A o M), ni de distinguir la clonalidad de IgG (173). Por lo tanto, sugerimos reservar el uso de BOCG para situaciones en las que esta información sea necesaria, además de los casos dictados por el algoritmo KRO (valores de FKLCi dentro de 4 y 10,7 y resultado negativo de Reiber IgG).

Un posible inconveniente vinculado al uso del algoritmo KRO es que, a pesar de haber demostrado un buen rendimiento diagnóstico en nuestra población, la determinación de FKLC, IgG y Albúmina para calcular el FKLCi y Reiber IgG requiere un volumen sustancial de LCR, el cual no siempre está disponible. En casos en los que no sea factible obtener un volumen suficiente de LCR, la única alternativa sería continuar utilizando las BOCG para evaluar la SIT-IgG, las cuales requieren únicamente 5 µL de volumen. En definitiva, el uso de las BOCG se limitaría a circunstancias específicas, tales como la necesidad de conocer el isotipo y la clonalidad de la inmunoglobulina (situación muy particular), escenarios donde las FKLCi se encuentren entre 4 y 10 en pacientes negativos para Reiber IgG, y cuando exista escasez de volumen de LCR.

Adicionalmente, la evaluación del significado pronóstico de FKLCi ha mostrado resultados notables con considerables implicaciones clínicas. Particularmente, los valores que superan el tercer cuartil han surgido como un predictor estadísticamente significativo, lo que significa una mayor probabilidad de encontrar un TF. Esto sugiere que los niveles elevados de FKLCi podrían servir como un indicador temprano para predecir este resultado, informando así el proceso de toma de decisiones para elegir un enfoque terapéutico de alta eficacia, que ha demostrado ser un robusto factor protector.

Varios autores han vinculado la SIT-IgM, evidenciada por BOCM, a los cursos de enfermedad más agresivos, una mayor tendencia a la conversión a formas progresivas así como un mayor riesgo de brotes posteriores (146,265,266). Sin embargo, no se ha establecido un consenso claro (265,267,268). De manera similar, aunque en menor medida, algunos autores han asociado un Reiber IgM positivo (144,146,269) o niveles más altos de IgMi (156,270) con una trayectoria desfavorable de la enfermedad. Nuestros análisis contradicen esta tendencia, revelando que los perfiles con una magnitud ITS más alta, independientemente del isotipo de cadena pesada presente, muestran de hecho un pronóstico más desfavorable. Esto ofrece una explicación plausible para la importancia distintiva de FKLCi en la predicción de FT, ya que incluye de manera integral cuantitativamente la SIT de IgG, IgM e IgA. Esta última, a menudo subestimada, se ha encontrado que prevalece en pEM (271). La robustez de nuestro argumento se subraya por el hecho de que solo FKLCi demostró la capacidad de predecir FT a pesar de su fuerte correlación con Link e IgMi.

En el ámbito de BOCM, especialmente las BOCM-LE, existe un mayor consenso entre los autores con respecto a su capacidad para anticipar discapacidad a largo plazo y deterioro cognitivo (147,272–274). Con respecto a la relación del FKLCi y estos eventos, una investigación reciente que comparó los valores de este biomarcador al diagnóstico entre pacientes que alcanzaron un EDSS de 6 en un período de 15 años y aquellos con un curso de enfermedad más leve no reveló diferencias significativas entre las dos cohortes; sin embargo, el tamaño de muestra en este estudio es limitado, con solo 35 pacientes incluidos (275). Por el contrario, una investigación llevada a cabo en la Universidad de Gotemburgo demostró que unos niveles basales de FKLCi superiores a 100 eran un robusto factor de riesgo para experimentar un deterioro cognitivo, objetivado mediante la obtención de una menor puntuación score SDMT (*del inglés, Symbol Digit Modalities Test*) (276).

La literatura disponible sobre el significado pronóstico de FKLCi es limitada; sin embargo, varios autores sí lo han correlacionado con la progresión de un CIS a una EM clínicamente definida (177,178). De manera similar a nuestra investigación, Rosenstein et al. establecieron de forma independiente una asociación entre los niveles de FKLCi que exceden las 100 unidades y la pérdida del estatus NEDA3, así como la aparición de eventos PIRA, en una cohorte de pacientes con un tamaño de muestra comparable al

Discusión

nuestro (277). Por otro lado, Castillo-Villalba y colegas lo identificaron como un factor de riesgo para alcanzar un EDSS de 3 (278).

De manera análoga a nuestro análisis comparativo, el reciente artículo de Miklušová et al. indica que tanto el índice FKLCi como lcrFKLC estuvieron notablemente elevados en pacientes que experimentaron el inicio de un segundo brote, presentaron lesiones realizadas con gadolinio o experimentaron un aumento en la carga de lesiones T2. Sin embargo, no se observaron distinciones en individuos que, junto con estos criterios, alcanzaron una puntuación de EDSS de 3. (279).

Abordando nuevamente el asunto de la relación entre el FKLCi y las BOCM, basándonos en nuestros hallazgos, el empleo de un algoritmo con valores de corte elevados para IgMi y FKLCi (0.2 y 250 respectivamente) puede resultar en una reducción de un tercio de la utilización de BOCM en pEM, manteniendo al mismo tiempo un alto nivel de especificidad y valor predictivo positivo. Esto, a su vez, alivia la carga de trabajo de los laboratorios clínicos y acelera la entrega de resultados. Además, permite que las entidades menos especializadas accedan a la información proporcionada por este marcador para un subconjunto de sus pacientes. A pesar de los avances en el estudio de la validez pronóstica de otros marcadores, las BOCM siguen siendo ampliamente utilizadas en el estudio de la EM.

La baja sensibilidad y el valor predictivo negativo exhibidos por los modelos generados en el Objetivo 2 son irrelevantes, ya que de acuerdo con el algoritmo propuesto las BOCM deben seguir realizándose en pacientes que no superen el umbral especificado.

De los 54 pacientes con BOCM positivas, 32 fueron detectados mediante el algoritmo. Dada la mencionada incertidumbre inherente al pronóstico asociado a las BOCM, este escenario refuerza la hipótesis de que el factor determinante para un pronóstico desfavorable es una SIT de mayor magnitud (265,267,268). Como se ha mencionado con anterioridad, algunos estudios han relacionado niveles más altos de IgMi con pronósticos menos favorables (156,270). Por ejemplo, Ozakbas y sus colegas observaron una correlación entre este parámetro y las lesiones medulares, así como con áreas hipointensas en T1 en una muestra de 85 pacientes, además de una mayor propensión a la conversión a formas secundarias progresivas en aquellos con niveles más elevados (156). Sin embargo, otro estudio realizado por Stauch et al. no encontró

asociación con peores pronósticos (280). En nuestro caso, solo las FKLCi han surgido como un factor de mal pronóstico, aunque en relación con experimentar FT. A diferencia de Ozakbas et al. (156), nuestra investigación sí encontró correlación entre Link e IgMi, que podría atribuirse a que ambos índices calculan empleando el Q_{alb} . Todo ello sugiere que es crucial no solo llevar a cabo estudios para asociar FKLCi con la progresión de la discapacidad y el deterioro cognitivo, sino también evaluar la asociación tanto de FKLCi como de IgMi con la evolución del daño estructural del sistema nervioso central y los parámetros radiológicos de mal pronóstico, como la atrofia medular o las lesiones en esta área.

Por otro lado, nuestra cohorte de pacientes mostró elevaciones de FKLCi más pronunciadas en pacientes BOCM+ en comparación con el estudio de Castillo-Villalba et al. (278). Además, la mayor correlación observada entre los valores de FKLCi y Link se puede atribuir a que la concentración de IgG en el LCR es 200 veces mayor que la de IgM (149). No es sorprendente que el rendimiento del Modelo E fuera subóptimo, dada la fuerte correlación hallada entre Link e IgMi, y sus niveles elevados en pacientes BOCM+. Por lo tanto, uno podría considerar la inclusión de puntos de corte más altos para Link en los algoritmos al igual que FKLCi; sin embargo, su alto grado de colinealidad hace que tal ajuste sea poco práctico.

Siguiendo la línea previa de argumentación, la marcada correlación entre Link e IgIF% se explica por el hecho de que ambos marcadores están aportando la misma información (SIT-IgG).

El algoritmo analítico para predecir BOCM se desarrolló utilizando datos de pEM, los cuales se caracterizan por presentar SIT-IgM en un rango del 40-60% de los casos (144,145). Es muy frecuente que en la práctica clínica diaria se solicite a los laboratorios la determinación simultánea de BOCG y BOCM en pacientes con sintomatología compatible con EM. Dado que muchos de ellos no van a ser pacientes con SIT ni EM, esta práctica protocolaria resulta en un elevado número de resultados negativos de ambas determinaciones. Por lo que aplicando los algoritmos propuestos en el presente trabajo se podría reducir el consumo de BOCG en aproximadamente un 90%; mientras que realizar el estudio de BOCM únicamente en pacientes con SIT-IgG (evidenciada mediante FKLCi, Reiber IgG o BOCG –algoritmo KRO-) reduciría en

Discusión

mayor medida su uso. Destáquese que la SIT-IgM en un paciente no diagnosticado de enfermedad desmielinizante carece de valor clínico, aunque podría

Conviene hacer hincapié en la importancia de que laboratorios individuales establezcan sus puntos de corte específicos para una mayor optimización y precisión. Por añadidura, resulta imprescindible evaluar la eficacia de esta metodología en el contexto de BOCM-LE.

Por otro lado, sNfL también se ha asociado con cursos de enfermedad más desfavorables (281–284). Hegen et al. correlacionaron de manera independiente los niveles basales de FKLCi y sNfL con la ocurrencia de un segundo brote en una cohorte que comprendía menos de 100 pacientes (281). En el estudio actual, el uso combinado de FKLCi y sNfL mostró una ligera mejora en comparación con el uso en solitario de FKLCi. Sin embargo, al analizarlos como factores independientes dentro del mismo modelo, sNfL no demostró significancia, mientras que FKLCi reflejó el potencial predictivo observado en la combinación anterior. Por lo tanto, la significancia vista en el modelo combinado podría atribuirse a la influencia de FKLCi, similar a la tendencia observada al combinar este parámetro con sGFAP y CHI3L1.

Otro aspecto ventajoso de FKLCi como marcador prometedor para distinguir fenotipos más inflamatorios es su nivel estable en pacientes con estado de AI, independientemente de la edad o gravedad de la discapacidad. Sin embargo, surge la pregunta sobre si el uso de corticoides podría influir en los valores de FKLCi, lo cual podría constituir un factor de confusión significativo. Esto se debe a que los brotes suelen tratarse con bolos intravenosos de corticoides y los análisis del LCR generalmente se realizan durante un primer evento agudo desmielinizante (brote). La administración de corticoides solo ha demostrado resultar en una disminución de los niveles séricos de FKLC en un estudio longitudinal (285). Tampoco está claro si este parámetro podría exhibir un patrón similar al de sNfL o CHI3LI, ambos de los cuales muestran un declive tras el inicio de intervenciones terapéuticas (189,207). Por el momento, la investigación de Castillo-Villalba et al. no encontró diferencias en los FKLCi de los pacientes que ya habían iniciado el TME y los que no (278).

Diversas investigaciones han vinculado niveles elevados de sNfL al inicio de la enfermedad con una mayor discapacidad a largo plazo, así como con una mayor atrofia

cerebral y medular (189,286,287). Considerando su correlación con las lesiones características de la EM y con la EDSS identificada en el actual proyecto y respaldada por literatura existente (286), se plantea la posibilidad de que la concentración de sNfL sea una herramienta de valor pronóstico relevante en este contexto. Aunque no es necesariamente una condición *sine qua non*, la presencia de una considerable neurodegeneración al inicio de la enfermedad -directamente proporcional a los niveles de sNfL- se asocia con un deterioro más pronunciado en el paciente a lo largo del tiempo (34).

Cabe destacar la relevancia de combinar el sNfL o parámetros derivados de estudios de imagen -como la atrofia cerebral o medular- con las FKLCi para desarrollar algoritmos que puedan discernir con precisión entre fenotipos de la enfermedad con mayor actividad y que resulten en una neurodegeneración más pronunciada a largo plazo, evento asociado también a la presencia de BOCM y BOCM-LE (147,272–274).

Teniendo en cuenta observada disminución después del inicio de intervenciones terapéuticas (207) y su asociación con el estatus de AI, los enfoques previamente descritos serían aplicables siempre y cuando se evalúe el sNfL con este propósito en pacientes bajo las mismas condiciones, como aquellos no tratados que estén experimentando un primer evento de agudo desmielinizante.

A pesar de esto, el sNfL es una herramienta de gran valor en la monitorización de la EM, ya que puede elevarse hasta un año antes de la aparición de un brote (282,288), inclusive en pacientes con el estatus NEDA3 consolidado (282). Además, correlaciona con la discapacidad residual posterior al brote (288). Otro aspecto de mal pronóstico a evaluar podría ser la persistencia de niveles elevados de sNfL a pesar de recibir tratamiento.

Una situación comparable a la del sNfL es evidente con la CHI3L1, la correlación con la discapacidad del paciente puede introducir complejidad en su uso como marcador pronóstico, especialmente cuando el estudio de LCR se realiza durante un brote grave. A pesar de la ausencia de una asociación entre el FT y elevaciones más sustanciales, estudios anteriores de Lucchini et al. y Petržalka et al. identificaron estas elevaciones como un factor de riesgo para la recurrencia de brotes (289,290). Al igual que otros autores, se halló una buena correlación entre la CHI3L1 y la EDSS (291,292), así como

Discusión

con la carga lesional (209,292). Del mismo modo que Cross et al., quienes también observaron asociación entre este biomarcador y un menor volumen talámico, los valores de CHI3L1 fueron independientes de la AI (292), hecho que contrastó con lo obtenido en otras investigaciones (207).

En relación con la GFAP, surge una paradoja ya que sus niveles en suero fueron más bajos en pacientes que manifestaron FT durante el periodo de seguimiento. Esto se alinea con CHI3L1 y lcrNfL, que mostraron una tendencia similar sin alcanzar significancia estadística. La explicación de estos resultados permanece incierta, aunque plausible por azar, ya que ninguno de estos parámetros emergió como un factor protector en el análisis de supervivencia. Pese a que estudios previos vinculan el sGFAP débilmente con la aparición de nuevas lesiones en T2 en 58 pacientes (284); nuestros hallazgos son coherentes con investigaciones previas que no han identificado diferencias significativas en los niveles de sGFAP entre pacientes que han seguido cursos más agresivos de EMRR (283).

Por el contrario, el sGFAP ha emergido como un potencial indicador de atrofia de la sustancia gris, además de un excelente predictor de PIRA y progresión de discapacidad al combinarse con el sNfL (ambas z-score elevadas) (226). Destáquese, que la atrofia de la sustancia gris también se ha asociado de manera independiente a este evento (84). Por añadidura, una investigación reciente sostiene que este parámetro constituye un útil marcador de progresión, especialmente cuando se estratifican los pacientes en base a sus valores de sNfL (293).

Por todo ello, la CHI3L1 y GFAP también serían parámetros interesantes para generar algoritmos junto con las FKLCi para discriminar los fenotipos más activos además de neurodegenerativos. Los mayores niveles de CHI3L1 (207,294), sGFAP (295) y lcrGFAP (296,297) en las formas progresivas podrían ser de gran utilidad a la hora de identificar las BOMPS; especialmente la CHI3L1 cuya correlación con la EDSS fue la más robusta ($\rho=0.41$ ($p<0.0001$)).

La robusta correlación encontrada entre los niveles séricos y del LCR de GFAP y NfL, respaldada por investigaciones previas (195,209), indica que no es necesario incluir estas determinaciones en el análisis inicial del LCR, ya que no aportan beneficios

sustanciales en comparación con los valores séricos. Esto permite destinar las muestras de este fluido para otros parámetros, como las FKLC.

Contradictoriamente, tanto el GFAP como el CHI3L1 mostraron correlación con la edad, a diferencia del NfL, a pesar de diversos hallazgos de investigación que sugieren que los niveles de sNfL aumentan con la edad (282). Por otro lado, uno podría considerar que un aspecto que resta validez a esta investigación es la falta de ajustes realizados por edad en los valores de NfL y GFAP, lo que podría introducir sesgos. Sin embargo, se optó por no realizar tales ajustes, teniendo en cuenta la baja mediana de edad (35 años) y la observada falta de correlación entre sNfL y edad. Hecho que podría ser plausiblemente atribuido a la alta proporción de pEM en estatus de AI (298).

En relación con este tema, algunos autores sugieren que la edad, por sí sola, no afecta significativamente sNfL. En cambio, argumentan que otros factores intrínsecos al proceso de envejecimiento, como la función hepática, el estado metabólico o la función renal comprometidas, son los responsables del incremento (298). Por otro lado, también se ha propuesto que la disminución del recambio de LCR con el avance de la edad podría ser la causa subyacente de este aumento (299). No obstante, sostenemos que esta correlación podría atribuirse a la progresión de la neurodegeneración asociada a la edad, ya que el sNfL correlaciona muy fuertemente con este evento (192,300). En efecto, Sotirchos et al. señalaron que los niveles de sNfL son más elevados en pacientes con formas más avanzadas de la enfermedad (300).

Desde una perspectiva fisiopatológica, nuestros hallazgos sugieren que la respuesta inmunitaria celular, en particular la Th1 (identificada como el iniciador de brotes), desempeña un papel fundamental en los cursos desfavorables de la enfermedad al activar los linfocitos B en el SNC, con su subsiguiente conversión a células plasmáticas secretoras de inmunoglobulinas (43). Una explicación plausible de la asociación de CHI3L1 con los marcadores de SIT podría ser el hecho de que esta molécula sea capaz de incrementar la semivida de las células plasmáticas gracias a su afinidad con los receptores PAR2 e IL13R α 2 inhibiendo, de este modo, la apoptosis (203), o por su efecto quimiotáctico para atraer más linfocitos B (204,205).

A pesar de los avances en la comprensión de los mecanismos patogénicos de la EM, la identificación de biomarcadores que reflejen la complejidad de la enfermedad sigue

Discusión

siendo un desafío crucial. En este contexto, nuestro estudio revela un comportamiento antagónico del C1q en suero y LCR en pEM. Mientras que en el primer fluido los niveles son considerablemente inferiores en comparación con los CS, los valores en el LCR muestran un aumento significativo en comparación con un grupo de individuos con otros desórdenes neurológicos.

El comportamiento de lcrC1q puede ser elucidado considerando que, en el contexto de la neurodegeneración, la microglía se activa convirtiéndose en su fenotipo ameboide M1 que tiene la capacidad de secretar TNF α , IL-1 α y C1q, los cuales, posteriormente, activan a los astrocitos, promoviendo su diferenciación hacia su fisionomía proinflamatoria (301). Este argumento justifica el alto grado de correlación entre el lcrC1q y otros marcadores relacionados con los atrociitos (GFAP y CHI3L1), no solo hallada en el presente proyecto, sino también respaldada por la investigación realizada por Håkansson y sus colegas, quienes también encontraron asociación entre el lcrC1q y otros mediadores de la inflamación (CXCL1, CXCL8 y CXCL10) (243).

Un aspecto interesante y hasta ahora no documentado en la literatura es la asociación entre el lcrC1q con lcrFKLC y, de manera más sólida, con lcrIgG. Ésta podría deberse a la capacidad de las IgG para activar las microglías en su fenotipo M1, fenómeno que ha sido encontrado en ratones tras la inyección intraventricular de IgG obtenida del suero de pacientes con lupus. En este proceso de activación, se destaca la participación de los receptores Fc-gamma (Fc γ R), que a su vez están regulados al alza por el factor activador de célula B perteneciente a la familia del TNF (BAFF) (302). Paralelamente, Zhou et al. reportaron que en pEM los agregados de IgG tienen la capacidad de inducir apoptosis neuronal mediada por la activación del complemento (303). Estos hallazgos no solo proporcionan una explicación intrigante para la correlación mencionada previamente, sino que también sugiere la posibilidad de que la inhibición de la activación de las microglías o de la subsiguiente secreción local de C1q puedan ser objetivos terapéuticos potenciales en la EM.

Sin embargo, queda aún por esclarecer el vínculo entre la SIT y la astrogliosis, vinculada a la respuesta Th1 y Th17 (46). La falta de correlación entre FKLCi y Link con GFAP plantea interrogantes sobre la premisa anteriormente expuesta acerca de la activación de la microglía (que, a su vez, puede promover la astrocitosis) por parte de la IgG. No obstante, esta condición puede ser inducida por diversos factores. Se ha

documentado que la Oncostatina M, LIF (Leucemia Inhibitory Factor en inglés) y CNTF (Ciliary Neutrotrophic Factor en inglés) son potentes inductores de la secreción de GFAP (220). Estas citocinas son liberadas por distintas células, como macrófagos, linfocitos T, fibroblastos y células gliales periféricas, en respuesta a la inflamación y otras señales patológicas, y de hecho, se han asociado a procesos de neurodegeneración (304–306). Por lo tanto, a pesar de la posible capacidad de las inmunoglobulinas para activar la microglía y, por ende, los astrocitos; GFAP muestra la correlación más pronunciada con las lesiones, mientras que ninguno de estos elementos presenta correlación con los marcadores de SIT (302).

Otro asunto en cuestión que tampoco ha sido totalmente dilucidado es la falta de correlación entre el lcrC1q y la carga de lesiones desmielinizantes a pesar de haberse encontrado esta molécula en las lesiones mediante estudios de inmunohistoquímica (245–247). Se ha identificado el C1q como un elemento crucial en la activación del eje microglía-astrocito en la EM (301); no obstante, los linfocitos T efectores son los principales responsables de la desmielinización, que también poseen la capacidad de activar a la microglía mediante la secreción de IL-17, IL-21 e IL-22 (67). Asimismo, la presencia de IgG y complemento en la mielina alterada en lesiones de EM no parece ser específica y no respalda directamente la hipótesis de desmielinización mediada por anticuerpos (241). Por lo tanto, sostenemos que la aparente falta de correlación se debe a la relación indirecta entre la desmielinización y la activación de la microglía.

Una molécula que también se presenta como un interesante marcador es el C3, especialmente en LCR (lcrC3). Esto se debe a que los astrocitos en estatus proinflamatorio muestran un aumento en la vía de señalización NF- κ B. Esta regulación al alza conduce a un aumento en la expresión de componentes del complemento (C1r, C1s, C3, C4), con el consiguiente daño sináptico. El C3 secretado se une al receptor C3aR en neuronas locales, resultando en la subsiguiente desregulación de la homeostasis intraneuronal de Ca^{2+} y excitotoxicidad (307). Por este motivo, Håkansson et al. sí encontraron una correlación entre el número total de lesiones basal. Además, en esta investigación los pacientes que experimentaron un aumento en el número de lesiones mostraron niveles basales más elevados de lcrC3 que aquellos que no lo hicieron, siendo éste proporcional con la magnitud del incremento (243).

Discusión

Dado el elevado peso molecular del C1q (459 kilodaltons) y su complejidad (18 cadenas polipeptídicas) (232), no es de extrañar que se comporte como dos entidades independientes en suero y LCR. Como se ha mencionado, el hecho de que la microglía secreta C1q es la razón del aumento en el LCR; mientras que en el suero, la disminución significativa de los niveles de sC1q en los pEM son indicativo de que los pEM mantienen un estado persistente de actividad inflamatoria sistémica, independientemente de la aparición de brotes de lesiones con realce de gadolinio, caracterizado por la activación del complemento, que resultará en un agotamiento de los niveles de C1q por consumo.

Esta hipótesis encuentra respaldo en su contraste con los grupos CS y ENNI, su semejanza con el grupo ENI, y la ausencia de una correlación entre sC1q y lcrC1q. Además, la ausencia de anti-C1q en pEM descarta la hipótesis de que la disminución de sC1q se deba a estos autoanticuerpos (308). De manera similar, la falta de diferencias en pacientes con y sin AI en ambos compartimentos (309), que depende de la permeabilidad de la BHE sugiere que los mecanismos subyacentes a las lesiones durante los brotes son impulsados por un fenómeno inflamatorio interno.

El desencadenante inicial para la activación del complemento en diversas enfermedades autoinmunes puede variar. Por ejemplo, en la artritis reumatoide, está asociado con la presencia de inmunocomplejos en unidos a las proteínas sinoviales y a la proteína C reactiva. Por el contrario, en el lupus eritematoso sistémico, está vinculado a células apoptóticas, trampas extracelulares de neutrófilos que contienen ADN y proteínas de unión a ADN modificadas, así como complejos inmunes (310). En relación con la EM, es fundamental destacar que se requieren estudios adicionales para esclarecer los mecanismos precisos que subyacen a la disminución de C1q en el suero. Una posible explicación podría atribuirse a la presencia de antígenos derivados de la mielina fuera del SNC. De hecho, la respuesta inmunopatológica de la EM se origina en los nódulos linfáticos, donde las APC exponen estos antígenos a los linfocitos T naïve (41,42).

Un motivo por el que el lcrC1q se mantiene constante durante los brotes podría radicar en la dependencia principal de estos eventos respecto a la respuesta inmune celular (71), en contraste con el sistema del complemento, que forma parte integral de la inmunidad innata.

A diferencia de otros marcadores que muestran fluctuaciones en respuesta a brotes agudos, la disminución consistente del sC1q indica alteraciones subyacentes en la homeostasis inmunológica que persisten a lo largo de la evolución de la enfermedad. La identificación de biomarcadores estables tiene implicaciones significativas para el diagnóstico temprano de la enfermedad. Por lo que este parámetro en suero podría servir potencialmente como una herramienta complementaria para detectar la enfermedad en sus primeras etapas, cuando la actividad clínica es mínima. Específicamente, podría servir como paso inicial para sugerir estudios de imagen y de LCR en pacientes con sospecha y/o síntomas compatibles con EM. Cabe recordar que la punción lumbar es un procedimiento considerablemente más invasivo que la venopunción.

Un aspecto desconcertante respecto al estudio de Håkansson et al. (243) es la discrepancia observada en la comparación entre los niveles de C1q circulantes de los pEM con controles sanos, que podrían explicarse por las diferencias en los kits empleados o los tamaños muestrales. Pese a que estos autores analizaron el C1q circulante en plasma en lugar de suero (243), es importante destacar que el fabricante de los kits utilizados en la presente investigación (Abcam) para medir los niveles de C1q en nuestros estudios no hizo hincapié en la distinción entre el empleo de ambos fluidos. Por su parte, pese la investigación mencionada no halló diferencias entre los niveles de C1q en plasma de pEM en diferentes tiempos de evolución tratados con TME de primera línea (243), es imperativo evaluar su rol en el monitoreo de la respuesta a los mismos.

Igualmente, la bibliografía respecto al lcrC1q en pEM también es escasa y discordante. Al contrario que nuestra investigación, la de Håkansson et al.(243) así como la de Schuller y Helary (244); Zelek y sus colegas no hallaron diferencias entre el lcrC1q en pEM con respecto al grupo control. Sin embargo, sí observaron que los de pacientes con NMO eran superiores a los pEM ($p=0.03$), pero no que a los CIS ($p=0.06$)(311).

Un elemento que fortalece la robustez de nuestros resultados es el amplio tamaño muestral analizado, dividido en tres poblaciones distintas de pEM. Siendo mucho mayor al de otras investigaciones que han realizado un análisis similar, Zelek et al. enroló 53 pEM, 17 CIS, 11 pacientes con Neuromielitis Óptica (NMO) y 35 controles sanos (311); mientras que Håkansson et al. 41 pEM y 22 sanos (243). Es crucial considerar que, al combinar CT y CV, los valores de lcrC1q fueron efectivamente

Discusión

significativamente más altos que ENI ($p=0.0004$) y ENNI ($p=0.0006$) (Figura 28 y Figura 29).

Una comprensión más profunda de los roles del sistema de complemento en la EM podría ser una herramienta valiosa incluso para discriminar entre ésta y la NMO. De hecho, Zelek et al. diseñaron un modelo discriminatorio que utiliza diversas proteínas del complemento con este propósito (311). Hasta el momento, los biomarcadores más específicos para la NMO son los autoanticuerpos anti-aquaporina 4 y anti-glicoproteína oligodendrocítica de la mielina. Sin embargo, una proporción considerable (20–30%) de casos de NMO resultan negativos para autoanticuerpos, dificultando su distinción de la EM (312).

En definitiva, los resultados obtenidos en el marco de este proyecto representan una valiosa contribución diversificada al campo de la EM. En primer lugar, se ha identificado una estrategia innovadora para optimizar eficientemente los flujos de trabajo en los laboratorios clínicos, resultando en la reducción significativa del consumo de BOC. Igualmente, se ha observado un potencial uso como marcador pronóstico de las FKLCi en una cohorte numerosa de pacientes; mientras que el análisis exploratorio de los biomarcadores ha enriquecido la comprensión de algunos aspectos inmunopatológicos subyacentes a la enfermedad.

El Objetivo 1 cuenta con una fortaleza importante debido al uso de una cohorte externa, lo que aumenta la fiabilidad y la generalización de los hallazgos. Es relevante destacar que los pEM incluidos en la cohorte fueron de reciente diagnóstico y la mayoría del grupo control presentaba síntomas similares a los de la EM. Este enfoque permitió la creación de un modelo que se asemeja mucho a escenarios frecuentes en la práctica clínica diaria. Por otro lado, la principal fortaleza del Objetivo 3 radica en la falta de literatura existente que evalúe de manera integral el papel pronóstico de múltiples marcadores simultáneamente a través de la respuesta al tratamiento. En esta misma línea, como se ha mencionado con anterioridad, el Objetivo 4 destaca por su considerable tamaño muestral de pEM.

No obstante, la presente investigación no estuvo exenta de limitaciones. En primer lugar, obtener muestras emparejadas de LCR y suero para determinar los parámetros analizados en los Objetivos 1, 2 y 3 resultó ser un desafío, especialmente en individuos

sin EM. En el caso específico del Objetivo 3, la principal limitación fue la ausencia de un análisis prospectivo de los pacientes, así como la falta de disponibilidad de un tamaño de muestra suficiente para analizar el valor predictivo de la elevación simultánea que excede el tercer cuartil/positividad de dos o más biomarcadores.

La limitación más evidente del Objetivo 4 es la falta de disponibilidad de muestras de LCR de controles sanos, lo que dificultó evaluar con precisión la magnitud de la variación de lcrC1q en relación con la normalidad. Además, el aumento significativo de lcrC1q en pEM en comparación con pacientes con otros trastornos neurológicos se observó únicamente en el caso de un cierto tipo de control, mientras que mostró solo una tendencia en otro tipo de control. No obstante, es interesante enfatizar que la ausencia de un aumento sustancial en lcrC1q entre pacientes con ciertos tipos de control puede atribuirse no solo al tamaño de muestra limitado en los grupos, sino también a la presencia de trastornos específicos en estos pacientes, que podrían potencialmente coocurrir con gliosis (313,314).

CONCLUSIONES

Conclusiones

Con los resultados obtenidos en el marco del presente trabajo, podemos concluir que:

1. El algoritmo KRO (uso combinado de FKLCi con Reiber IgG y BOCG) proporciona una mayor sensibilidad, precisión y VPN en el diagnóstico de la EM investigada en nuestra población, sin embargo, esta mejora se logra a expensas de una menor especificidad y VPP en comparación con el uso exclusivo de otros métodos.
2. La combinación de este marcador con estudios radiológicos podría ofrecer un excelente rendimiento diagnóstico. Como resultado, se requieren estudios prospectivos adicionales para analizar el uso combinado de estos marcadores y pruebas de imagen.
3. Al emplear las FKLCi y el IgMi para anticipar la presencia de BOCM, así como optimizar los protocolos para llevar a cabo exclusivamente el estudio de la SIT-IgM en pacientes con SIT-IgG comprobada, se lograría una significativa reducción en la utilización de esta técnica compleja y sujeta a interpretación subjetiva en los laboratorios clínicos.
4. El FKLCi no solo se presenta como un excelente marcador diagnóstico, sino que también se posiciona como un instrumento potencial para estratificar el riesgo de un curso desfavorable de la enfermedad.
5. La asociación significativa de elevados niveles de FKLCi con el FT nos lleva a considerar la iniciación de terapias de segunda línea los pEM que los presenten. Este paradigma estratégico se alinea con la trayectoria hacia la medicina de precisión en la EM, una progresión que está en marcha activa.
6. El valor pronóstico observado en los resultados de las FKLCi plantea que, el coste-efectividad de las BOCM debe ser objeto de cuestionamiento y comparación con las FKLCi por parte de otros investigadores en diversas poblaciones.
7. La variación de niveles de C1q presenta una dicotomía intrigante, manifestando una marcada disminución en el suero y un correlativo aumento en el LCR en comparación con individuos sanos y otros grupos patológicos.
8. Estos descubrimientos en el LCR, junto con la asociación identificada con otros marcadores, sugieren una conexión fundamental entre la activación de la microglía y la respuesta inmunopatológica en la EM, además de una posible nueva diana terapéutica.

9. La disminución de sC1q en pEM ofrece un escenario interesante para el diagnóstico temprano de la enfermedad.

BIBLIOGRAFÍA

Bibliografía

1. Oliva Ramirez A, Keenan A, Kalau O, Worthington E, Cohen L, Singh S. Prevalence and burden of multiple sclerosis-related fatigue: a systematic literature review. *BMC Neurol.* 2021;21(1):468.
2. Cao L, Li M, Yao L, Yan P, Wang X, Yang Z, et al. Siponimod for multiple sclerosis. *Cochrane Database Syst Rev.* 2021;11(11):CD013647.
3. Schwarz K, Schmitz F. Synapse Dysfunctions in Multiple Sclerosis. *Int J Mol Sci.* 2023;24(2):1639.
4. Travers BS, Tsang BKT, Barton JL. Multiple sclerosis: Diagnosis, disease-modifying therapy and prognosis. *Aust J Gen Pract.* 2022;51(4):199-206.
5. Kobelt G, Thompson A, Berg J, Gannedahl M, Eriksson J, MSCOI Study Group, et al. New insights into the burden and costs of multiple sclerosis in Europe. *Mult Scler Houndmills Basingstoke Engl.* 2017;23(8):1123-36.
6. Noseworthy JH, Lucchinetti C, Rodriguez M, Weinshenker BG. Multiple sclerosis. *N Engl J Med.* 2000;343(13):938-52.
7. Pugliatti M, Rosati G, Carton H, Riise T, Drulovic J, Vécsei L, et al. The epidemiology of multiple sclerosis in Europe. *Eur J Neurol.* 2006;13(7):700-22.
8. Compston A. The 150th anniversary of the first depiction of the lesions of multiple sclerosis. *J Neurol Neurosurg Psychiatry.* 1988;51(10):1249-52.
9. Walton C, King R, Rechtman L, Kaye W, Leray E, Marrie RA, et al. Rising prevalence of multiple sclerosis worldwide: Insights from the Atlas of MS, third edition. *Mult Scler Houndmills Basingstoke Engl.* 2020;26(14):1816-21.
10. Perez-Carmona N, Fernandez-Jover E, Sempere AP. Epidemiologia de la esclerosis multiple en España [Epidemiology of multiple sclerosis in Spain]. *Rev Neurol.* 2019;69(1):32-38.
11. Miranda García R, Santín Núñez LJ, Redolar Ripoll D, Valero Cabré A. Neuronas y comunicación neuronal. En: Redolar Ripoll D, editor. *Neurociencia Cognitiva.* 2a edición. Madrid: Médica Panamericana; 2023. p. 27-31.

12. Vainchtein ID, Molofsky AV. Astrocytes and Microglia: In Sickness and in Health. *Trends Neurosci.* 2020;43(3):144-54.
13. Kettenmann H, Hanisch UK, Noda M, Verkhratsky A. Physiology of microglia. *Physiol Rev.* 2011;91(2):461-553.
14. Verkhratsky A, Nedergaard M. Astroglial cradle in the life of the synapse. *Philos Trans R Soc B Biol Sci.* 2014;369(1654):20130595.
15. Nedergaard M, Verkhratsky A. Artifact versus reality--how astrocytes contribute to synaptic events. *Glia.* 2012;60(7):1013-23.
16. Faissner A, Pyka M, Geissler M, Sobik T, Frischknecht R, Gundelfinger ED, et al. Contributions of astrocytes to synapse formation and maturation - Potential functions of the perisynaptic extracellular matrix. *Brain Res Rev.* 2010;63(1-2):26-38.
17. Stenudd M, Sabelström H, Llorens-Bobadilla E, Zamboni M, Blom H, Brismar H, et al. Identification of a discrete subpopulation of spinal cord ependymal cells with neural stem cell properties. *Cell Rep.* 2022;38(9):110440.
18. Redolar Ripoll D. Introducción a la organización del sistema nervioso. En: Redolar Ripoll D, editor. *Neurociencia Cognitiva*. 2a edición. Madrid: Médica Panamericana; 2023. p. 74-80.
19. Obermeier B, Verma A, Ransohoff RM. The blood-brain barrier. *Handb Clin Neurol.* 2016;133:39-59.
20. Sweeney MD, Zhao Z, Montagne A, Nelson AR, Zlokovic BV. Blood-Brain Barrier: From Physiology to Disease and Back. *Physiol Rev.* 2019;99(1):21-78.
21. Zhou Z, Zhan J, Cai Q, Xu F, Chai R, Lam K, et al. The Water Transport System in Astrocytes-Aquaporins. *Cells.* 2022;11(16):2564.
22. Isobe N, Keshavan A, Gourraud PA, Zhu AH, Datta E, Schlaeger R, et al. Association of HLA Genetic Risk Burden With Disease Phenotypes in Multiple Sclerosis. *JAMA Neurol.* 2016;73(7):795-802.
23. Moutsianas L, Jostins L, Beecham AH, Dilthey AT, Xifara DK, Ban M, et al. Class II HLA interactions modulate genetic risk for multiple sclerosis. *Nat Genet.*

Bibliografia

2015;47(10):1107-13.

24. Laaksonen H, Guerreiro-Cacais AO, Adzemovic MZ, Parsa R, Zeitelhofer M, Jagodic M, et al. The multiple sclerosis risk gene IL22RA2 contributes to a more severe murine autoimmune neuroinflammation. *Genes Immun.* 2014;15(7):457-65.

25. Otto C, Oltmann A, Stein A, Frenzel K, Schroeter J, Habbel P, et al. Intrathecal EBV antibodies are part of the polyspecific immune response in multiple sclerosis. *Neurology.* 2011;76(15):1316-21.

26. Bjornevik K, Cortese M, Healy BC, Kuhle J, Mina MJ, Leng Y, et al. Longitudinal analysis reveals high prevalence of Epstein-Barr virus associated with multiple sclerosis. *Science.* 2022;375(6578):296-301.

27. Houen G, Trier NH, Frederiksen JL. Epstein-Barr Virus and Multiple Sclerosis. *Front Immunol.* 2020;11:587078.

28. Thompson AJ, Baranzini SE, Geurts J, Hemmer B, Ciccarelli O. Multiple sclerosis. *Lancet Lond Engl.* 2018;391(10130):1622-36.

29. Preiningerova JL, Jiraskova Zakostelska Z, Srinivasan A, Ticha V, Kovarova I, Kleinova P, et al. Multiple Sclerosis and Microbiome. *Biomolecules.* 2022;12(3):433.

30. Zeydan B, Kantarci OH. Progressive Forms of Multiple Sclerosis: Distinct Entity or Age-Dependent Phenomena. *Neurol Clin.* 2018;36(1):163-71.

31. Kalincik T. Multiple Sclerosis Relapses: Epidemiology, Outcomes and Management. A Systematic Review. *Neuroepidemiology.* 2015;44(4):199-214.

32. Oh J, Alikhani K, Bruno T, Devonshire V, Giacomini PS, Giuliani F, et al. Diagnosis and management of secondary-progressive multiple sclerosis: time for change. *Neurodegener Dis Manag.* 2019;9(6):301-17.

33. Meyer-Moock S, Feng YS, Maeurer M, Dippel FW, Kohlmann T. Systematic literature review and validity evaluation of the Expanded Disability Status Scale (EDSS) and the Multiple Sclerosis Functional Composite (MSFC) in patients with multiple sclerosis. *BMC Neurol.* 2014;14(1):58.

34. Tsagkas C, Magon S, Gaetano L, Pezold S, Naegelin Y, Amann M, et al. Spinal

cord volume loss: A marker of disease progression in multiple sclerosis. *Neurology*. 2018;91(4):e349-58.

35. Kurtzke JF. Rating neurologic impairment in multiple sclerosis: an expanded disability status scale (EDSS). *Neurology*. 1983;33(11):1444-52.

36. Hecker M, Fitzner B, Wendt M, Lorenz P, Flechtner K, Steinbeck F, et al. High-Density Peptide Microarray Analysis of IgG Autoantibody Reactivities in Serum and Cerebrospinal Fluid of Multiple Sclerosis Patients. *Mol Cell Proteomics MCP*. 2016;15(4):1360-80.

37. Sun X, Bakhti M, Fitzner D, Schnaars M, Kruse N, Coskun Ü, et al. Quantified CSF antibody reactivity against myelin in multiple sclerosis. *Ann Clin Transl Neurol*. 2015;2(12):1116-23.

38. Ramanathan S, Dale RC, Brilot F. Anti-MOG antibody: The history, clinical phenotype, and pathogenicity of a serum biomarker for demyelination. *Autoimmun Rev*. 2016;15(4):307-24.

39. Lassmann H, Brück W, Lucchinetti CF. The immunopathology of multiple sclerosis: an overview. *Brain Pathol Zurich Switz*. 2007;17(2):210-8.

40. Liu R, Du S, Zhao L, Jain S, Sahay K, Rizvanov A, et al. Autoreactive lymphocytes in multiple sclerosis: Pathogenesis and treatment target. *Front Immunol*. 2022;13:996469.

41. Arneth B. Contributions of T cells in multiple sclerosis: what do we currently know? *J Neurol*. 2021;268(12):4587-93.

42. Kunkl M, Frasca S, Amormino C, Volpe E, Tuosto L. T Helper Cells: The Modulators of Inflammation in Multiple Sclerosis. *Cells*. 2020;9(2):482.

43. Bar-Or A, Li R. Cellular immunology of relapsing multiple sclerosis: interactions, checks, and balances. *Lancet Neurol*. 2021;20(6):470-83.

44. Sallusto F. Heterogeneity of Human CD4⁺ T Cells Against Microbes. *Annu Rev Immunol*. 2016;34(1):317-34.

45. Korn T, Bettelli E, Oukka M, Kuchroo VK. IL-17 and Th17 Cells. *Annu Rev*

Bibliografía

Immunol. 2009;27(1):485-517.

46. Brambilla R. The contribution of astrocytes to the neuroinflammatory response in multiple sclerosis and experimental autoimmune encephalomyelitis. *Acta Neuropathol (Berl)*. 2019;137(5):757-83.

47. Pelletier M, Maggi L, Micheletti A, Lazzeri E, Tamassia N, Costantini C, et al. Evidence for a cross-talk between human neutrophils and Th17 cells. *Blood*. 2010;115(2):335-43.

48. Ruocco G, Rossi S, Motta C, Macchiarulo G, Barbieri F, De Bardi M, et al. T helper 9 cells induced by plasmacytoid dendritic cells regulate interleukin-17 in multiple sclerosis. *Clin Sci*. 2015;129(4):291-303.

49. Matsushita T, Tateishi T, Isobe N, Yonekawa T, Yamasaki R, Matsuse D, et al. Characteristic Cerebrospinal Fluid Cytokine/Chemokine Profiles in Neuromyelitis Optica, Relapsing Remitting or Primary Progressive Multiple Sclerosis. *PLOS ONE*. 2013;8(4):e61835.

50. van Langelaar J, van der Vuurst de Vries RM, Janssen M, Wierenga-Wolf AF, Spilt IM, Siepmann TA, et al. T helper 17.1 cells associate with multiple sclerosis disease activity: perspectives for early intervention. *Brain J Neurol*. 2018;141(5):1334-49.

51. Perriard G, Mathias A, Enz L, Canales M, Schluep M, Gentner M, et al. Interleukin-22 is increased in multiple sclerosis patients and targets astrocytes. *J Neuroinflammation*. 2015;12(1):119.

52. Parker Harp CR, Archambault AS, Sim J, Shlomchik MJ, Russell JH, Wu GF. B cells are capable of independently eliciting rapid reactivation of encephalitogenic CD4 T cells in a murine model of multiple sclerosis. *PloS One*. 2018;13(6):e0199694.

53. Goldschmidt CH, Hua LH. Re-Evaluating the Use of IFN- β and Relapsing Multiple Sclerosis: Safety, Efficacy and Place in Therapy. *Degener Neurol Neuromuscul Dis*. 2020;10:29-38.

54. Haase S, Linker RA. Inflammation in multiple sclerosis. *Ther Adv Neurol Disord*. 2021;14:17562864211007687.

55. Yang C, Lai W, Zhou J, Zheng X, Cai Y, Yang W, et al. Betaine Ameliorates

Experimental Autoimmune Encephalomyelitis by Inhibiting Dendritic Cell-Derived IL-6 Production and Th17 Differentiation. *J Immunol Baltim Md 1950*. 2018;200(4):1316-24.

56. Sellebjerg F, Blinkenberg M, Sorensen PS. Anti-CD20 Monoclonal Antibodies for Relapsing and Progressive Multiple Sclerosis. *CNS Drugs*. 2020;34(3):269-80.

57. Walters SN, Webster KE, Daley S, Grey ST. A role for intrathymic B cells in the generation of natural regulatory T cells. *J Immunol Baltim Md 1950*. 2014;193(1):170-6.

58. Guerrero BL, Sicotte NL. Microglia in Multiple Sclerosis: Friend or Foe? *Front Immunol*. 2020;11:374.

59. Matejuk A, Ransohoff RM. Crosstalk Between Astrocytes and Microglia: An Overview. *Front Immunol*. 2020;11:1416.

60. Choi S, Guo L, Cordeiro MF. Retinal and Brain Microglia in Multiple Sclerosis and Neurodegeneration. *Cells*. 2021;10(6):1507.

61. Podbielska M, O'Keeffe J, Pokryszko-Dragan A. New Insights into Multiple Sclerosis Mechanisms: Lipids on the Track to Control Inflammation and Neurodegeneration. *Int J Mol Sci*. 2021;22(14):7319.

62. Xie L, Yang SH. Interaction of astrocytes and T cells in physiological and pathological conditions. *Brain Res*. 2015;1623:63-73.

63. Dulamea AO. Role of Oligodendrocyte Dysfunction in Demyelination, Remyelination and Neurodegeneration in Multiple Sclerosis. *Adv Exp Med Biol*. 2017;958:91-127.

64. Kwon HS, Koh SH. Neuroinflammation in neurodegenerative disorders: the roles of microglia and astrocytes. *Transl Neurodegener*. 2020;9(1):42.

65. Silver J, Miller JH. Regeneration beyond the glial scar. *Nat Rev Neurosci*. 2004;5(2):146-56.

66. Azzolini F, Gilio L, Pavone L, Iezzi E, Dolcetti E, Bruno A, et al. Neuroinflammation Is Associated with GFAP and sTREM2 Levels in Multiple

Bibliografía

Sclerosis. *Biomolecules*. 2022;12(2):222.

67. Kaskow BJ, Baecher-Allan C. Effector T Cells in Multiple Sclerosis. *Cold Spring Harb Perspect Med*. 2018;8(4):a029025.

68. Paintlia MK, Paintlia AS, Singh AK, Singh I. Synergistic activity of interleukin-17 and tumor necrosis factor- α enhances oxidative stress-mediated oligodendrocyte apoptosis. *J Neurochem*. 2011;116(4):508-21.

69. Podbielska M, O’Keeffe J, Hogan EL. Autoimmunity in multiple sclerosis: role of sphingolipids, invariant NKT cells and other immune elements in control of inflammation and neurodegeneration. *J Neurol Sci*. 2018;385:198-214.

70. Schirmer L, Schafer DP, Bartels T, Rowitch DH, Calabresi PA. Diversity and Function of Glial Cell Types in Multiple Sclerosis. *Trends Immunol*. 2021;42(3):228-47.

71. Lassmann H. Pathogenic Mechanisms Associated With Different Clinical Courses of Multiple Sclerosis. *Front Immunol*. 2019;9:3116.

72. Kipp M. Multiple Sclerosis. En: Lammert E, Zeeb M, editores. *Metabolism of Human Diseases: Organ Physiology and Pathophysiology*. Vienna: Springer; 2014. p. 47-52.

73. Nikić I, Merkler D, Sorbara C, Brinkoetter M, Kreutzfeldt M, Bareyre FM, et al. A reversible form of axon damage in experimental autoimmune encephalomyelitis and multiple sclerosis. *Nat Med*. 2011;17(4):495-9.

74. Sinclair AJ, Viant MR, Ball AK, Burdon MA, Walker EA, Stewart PM, et al. NMR-based metabolomic analysis of cerebrospinal fluid and serum in neurological diseases--a diagnostic tool? *NMR Biomed*. 2010;23(2):123-32.

75. Rosenkranz SC, Shaposhnykov AA, Träger S, Engler JB, Witte ME, Roth V, et al. Enhancing mitochondrial activity in neurons protects against neurodegeneration in a mouse model of multiple sclerosis. *eLife*. 2021;10:e61798.

76. Cunniffe N, Coles A. Promoting remyelination in multiple sclerosis. *J Neurol*. 2021;268(1):30-44.

77. Patani R, Balaratnam M, Vora A, Reynolds R. Remyelination can be extensive in multiple sclerosis despite a long disease course. *Neuropathol Appl Neurobiol.* 2007;33(3):277-87.
78. Patrikios P, Stadelmann C, Kutzelnigg A, Rauschka H, Schmidbauer M, Laursen H, et al. Remyelination is extensive in a subset of multiple sclerosis patients. *Brain J Neurol.* 2006;129(Pt 12):3165-72.
79. Goldschmidt T, Antel J, König FB, Brück W, Kuhlmann T. Remyelination capacity of the MS brain decreases with disease chronicity. *Neurology.* 2009;72(22):1914-21.
80. Yeung MSY, Djelloul M, Steiner E, Bernard S, Salehpour M, Possnert G, et al. Dynamics of oligodendrocyte generation in multiple sclerosis. *Nature.* 2019;566(7745):538-42.
81. Jäkel S, Agirre E, Mendanha Falcão A, van Bruggen D, Lee KW, Knuesel I, et al. Altered human oligodendrocyte heterogeneity in multiple sclerosis. *Nature.* 2019;566(7745):543-7.
82. Bodini B, Veronese M, García-Lorenzo D, Battaglini M, Poirion E, Chardain A, et al. Dynamic Imaging of Individual Remyelination Profiles in Multiple Sclerosis. *Ann Neurol.* 2016;79(5):726-38.
83. Kamma E, Lasisi W, Libner C, Ng HS, Plemel JR. Central nervous system macrophages in progressive multiple sclerosis: relationship to neurodegeneration and therapeutics. *J Neuroinflammation.* 2022;19(1):45.
84. Calabrese M, Preziosa P, Scalfari A, Colato E, Marastoni D, Absinta M, et al. Determinants and Biomarkers of Progression Independent of Relapses in Multiple Sclerosis. *Ann Neurol.* 2024.
85. Du L, Zhang Y, Chen Y, Zhu J, Yang Y, Zhang HL. Role of Microglia in Neurological Disorders and Their Potentials as a Therapeutic Target. *Mol Neurobiol.* 2017;54(10):7567-84.
86. Gandhi R, Laroni A, Weiner HL. Role of the innate immune system in the pathogenesis of multiple sclerosis. *J Neuroimmunol.* 2010;221(1-2):7-14.

Bibliografía

87. Faissner S, Plemel JR, Gold R, Yong VW. Progressive multiple sclerosis: from pathophysiology to therapeutic strategies. *Nat Rev Drug Discov.* 2019;18(12):905-22.
88. Ortiz GG, Pacheco-Moisés FP, Macías-Islas MÁ, Flores-Alvarado LJ, Mireles-Ramírez MA, González-Renovato ED, et al. Role of the blood-brain barrier in multiple sclerosis. *Arch Med Res.* 2014;45(8):687-97.
89. Nishihara H, Perriot S, Gastfriend BD, Steinfort M, Cibien C, Soldati S, et al. Intrinsic blood-brain barrier dysfunction contributes to multiple sclerosis pathogenesis. *Brain J Neurol.* 2022;145(12):4334-48.
90. Machado-Santos J, Saji E, Tröscher AR, Paunovic M, Liblau R, Gabriely G, et al. The compartmentalized inflammatory response in the multiple sclerosis brain is composed of tissue-resident CD8⁺ T lymphocytes and B cells. *Brain J Neurol.* 2018;141(7):2066-82.
91. Hemond CC, Bakshi R. Magnetic Resonance Imaging in Multiple Sclerosis. *Cold Spring Harb Perspect Med.* 2018;8(5):a028969.
92. Klein JP, Arora A, Neema M, Healy BC, Tauhid S, Goldberg-Zimring D, et al. A 3T MR imaging investigation of the topography of whole spinal cord atrophy in multiple sclerosis. *AJNR Am J Neuroradiol.* 2011;32(6):1138-42.
93. Prados F, Cardoso MJ, Yiannakas MC, Hoy LR, Tebaldi E, Kearney H, et al. Fully automated grey and white matter spinal cord segmentation. *Sci Rep.* 2016;6:36151.
94. Klistorner S, Barnett MH, Klistorner A. Mechanisms of central brain atrophy in multiple sclerosis. *Mult Scler Houndmills Basingstoke Engl.* 2022;28(13):2038-45.
95. Sastre-Garriga J, Pareto D, Battaglini M, Rocca MA, Ciccarelli O, Enzinger C, et al. MAGNIMS consensus recommendations on the use of brain and spinal cord atrophy measures in clinical practice. *Nat Rev Neurol.* 2020;16(3):171-82.
96. Sinnecker T, Schädelin S, Benkert P, Ruberte E, Amann M, Lieb JM, et al. Brain atrophy measurement over a MRI scanner change in multiple sclerosis. *NeuroImage Clin.* 2022;36:103148.
97. Rekik A, Aissi M, Rekik I, Mhiri M, Frih MA. Brain atrophy patterns in

multiple sclerosis patients treated with natalizumab and its clinical correlates. *Brain Behav.* 2022;12(5):e2573.

98. Gilmore CP, Donaldson I, Bö L, Owens T, Lowe J, Evangelou N. Regional variations in the extent and pattern of grey matter demyelination in multiple sclerosis: a comparison between the cerebral cortex, cerebellar cortex, deep grey matter nuclei and the spinal cord. *J Neurol Neurosurg Psychiatry.* 2009;80(2):182-7.

99. Moccia M, Ruggieri S, Ianniello A, Toosy A, Pozzilli C, Ciccarelli O. Advances in spinal cord imaging in multiple sclerosis. *Ther Adv Neurol Disord.* 2019;12:1756286419840593.

100. Karamelic J, Delic-Sarac M, Subasic D, Jukic T, Coric J, Panjeta M, et al. Reibergram and oligoclonal bands in diagnosis of multiple sclerosis. *Med Arch Sarajevo Bosnia Herzeg.* 2012;66(4):222-5.

101. Thompson AJ, Banwell BL, Barkhof F, Carroll WM, Coetzee T, Comi G, et al. Diagnosis of multiple sclerosis: 2017 revisions of the McDonald criteria. *Lancet Neurol.* 2018;17(2):162-73.

102. Schwenkenbecher P, Wurster U, Konen FF, Gingele S, Sühs KW, Wattjes MP, Stangel M, Skripuletz T. Impact of the McDonald Criteria 2017 on Early Diagnosis of Relapsing-Remitting Multiple Sclerosis. *Front Neurol.* 2019;10:188.

103. Filippi M, Preziosa P, Meani A, Dalla Costa G, Mesaros S, Drulovic J, et al. Performance of the 2017 and 2010 Revised McDonald Criteria in Predicting MS Diagnosis After a Clinically Isolated Syndrome: A MAGNIMS Study. *Neurology.* 2022;98(1):e1-14.

104. Freedman MS, Selchen D, Arnold DL, Prat A, Banwell B, Yeung M, et al. Treatment optimization in MS: Canadian MS Working Group updated recommendations. *Can J Neurol Sci J Can Sci Neurol.* 2013;40(3):307-23.

105. Hauser SL, Cree BAC. Treatment of Multiple Sclerosis: A Review. *Am J Med.* 2020;133(12):1380-1390.e2.

106. Brown JW, Coles A, Horakova D, Havrdova E, Izquierdo G, Prat A, et al. Association of Initial Disease-Modifying Therapy With Later Conversion to Secondary

Bibliografía

Progressive Multiple Sclerosis. JAMA. 2019;321(2):175-87.

107. Scott TF. Understanding the impact of relapses in the overall course of MS; refinement of the 2 stage natural history model. J Neuroimmunol. 2017;305:162-6.

108. Yamout BI, Alroughani R. Multiple Sclerosis. Semin Neurol. 2018;38(02):212-25.

109. Krajnc N, Bsteh G, Berger T, Mares J, Hartung HP. Monoclonal Antibodies in the Treatment of Relapsing Multiple Sclerosis: an Overview with Emphasis on Pregnancy, Vaccination, and Risk Management. Neurother J Am Soc Exp Neurother. 2022;19(3):753-73.

110. Rotstein D, Solomon JM, Sormani MP, Montalban X, Ye XY, Dababneh D, et al. Association of NEDA-4 With No Long-term Disability Progression in Multiple Sclerosis and Comparison With NEDA-3: A Systematic Review and Meta-analysis. Neurol Neuroimmunol Neuroinflammation. 2022;9(6):e200032.

111. Rivera DM, Puentes S, Caballero L. Resonancia magnética cerebral: secuencias básicas e interpretación. Univ Médica. 2011;52(3):292-306.

112. Pooley RA. AAPM/RSNA physics tutorial for residents: fundamental physics of MR imaging. Radiogr Rev Publ Radiol Soc N Am Inc. 2005;25(4):1087-99.

113. De Meo E, Bonacchi R, Moiola L, Colombo B, Sangalli F, Zanetta C, et al. Early Predictors of 9-Year Disability in Pediatric Multiple Sclerosis. Ann Neurol. 2021;89(5):1011-22.

114. Brownlee WJ, Altmann DR, Alves Da Mota P, Swanton JK, Miszkiel KA, Wheeler-Kingshott CG, et al. Association of asymptomatic spinal cord lesions and atrophy with disability 5 years after a clinically isolated syndrome. Mult Scler Houndmills Basingstoke Engl. 2017;23(5):665-74.

115. Di Filippo M, Anderson VM, Altmann DR, Swanton JK, Plant GT, Thompson AJ, et al. Brain atrophy and lesion load measures over 1 year relate to clinical status after 6 years in patients with clinically isolated syndromes. J Neurol Neurosurg Psychiatry. 2010;81(2):204-8.

116. Arrambide G, Rovira A, Sastre-Garriga J, Tur C, Castelló J, Río J, et al. Spinal

cord lesions: A modest contributor to diagnosis in clinically isolated syndromes but a relevant prognostic factor. *Mult Scler Houndmills Basingstoke Engl.* 2018;24(3):301-12.

117. Zecca C, Disanto G, Sormani MP, Riccitelli GC, Cianfoni A, Del Grande F, et al. Relevance of asymptomatic spinal MRI lesions in patients with multiple sclerosis. *Mult Scler Houndmills Basingstoke Engl.* 2016;22(6):782-91.

118. Radü EW, Bendfeldt K, Mueller-Lenke N, Magon S, Sprenger T. Brain atrophy: an in-vivo measure of disease activity in multiple sclerosis. *Swiss Med Wkly.* 2013;143:w13887.

119. Rocca MA, Comi G, Filippi M. The Role of T1-Weighted Derived Measures of Neurodegeneration for Assessing Disability Progression in Multiple Sclerosis. *Front Neurol.* 2017;8:433.

120. Eshaghi A, Prados F, Brownlee WJ, Altmann DR, Tur C, Cardoso MJ, et al. Deep gray matter volume loss drives disability worsening in multiple sclerosis. *Ann Neurol.* 2018;83(2):210-22.

121. Lauerer M, Bussas M, Pongratz V, Berthele A, Kirschke JS, Wiestler B, et al. Percentage brain volume change in multiple sclerosis mainly reflects white matter and cortical volume. *Ann Clin Transl Neurol.* 2023;10(1):130-5.

122. Kearney H, Miller DH, Ciccarelli O. Spinal cord MRI in multiple sclerosis--diagnostic, prognostic and clinical value. *Nat Rev Neurol.* 2015;11(6):327-38.

123. Chen Y, Haacke EM, Bernitsas E. Imaging of the Spinal Cord in Multiple Sclerosis: Past, Present, Future. *Brain Sci.* 2020;10(11):857.

124. Bischof A, Papinutto N, Keshavan A, Rajesh A, Kirkish G, Zhang X, et al. Spinal Cord Atrophy Predicts Progressive Disease in Relapsing Multiple Sclerosis. *Ann Neurol.* 2022;91(2):268-81.

125. Petrova N, Carassiti D, Altmann DR, Baker D, Schmierer K. Axonal loss in the multiple sclerosis spinal cord revisited. *Brain Pathol Zurich Switz.* 2018;28(3):334-48.

126. Ruggieri S, Petracca M, De Giglio L, De Luca F, Giannì C, Gurreri F, et al. A matter of atrophy: differential impact of brain and spine damage on disability worsening

Bibliografia

in multiple sclerosis. *J Neurol*. 2021;268(12):4698-706.

127. Bussas M, El Husseini M, Harabacz L, Pineker V, Grahl S, Pongratz V, et al. Multiple sclerosis lesions and atrophy in the spinal cord: Distribution across vertebral levels and correlation with disability. *NeuroImage Clin*. 2022;34:103006.

128. Lie IA, Weeda MM, Mattiesing RM, Mol MAE, Pouwels PJW, Barkhof F, et al. Relationship Between White Matter Lesions and Gray Matter Atrophy in Multiple Sclerosis: A Systematic Review. *Neurology*. 2022;98(15):e1562-73.

129. Weeda MM, Zywicki S, Brouwer I, Moraal B, Killestein J, Gallo P, Barkhof F, Pouwels PJW, Vrenken H. Upper cervical cord atrophy is independent of cervical cord lesion volume in early multiple sclerosis: A two-year longitudinal study. *Mult Scler Relat Disord*. 2022;60:103713.

130. Tsagkas C, Naegelin Y, Amann M, Papadopoulou A, Barro C, Chakravarty MM, et al. Central nervous system atrophy predicts future dynamics of disability progression in a real-world multiple sclerosis cohort. *Eur J Neurol*. 2021;28(12):4153-66.

131. Denissen S, Engemann DA, De Cock A, Costers L, Baijot J, Laton J, et al. Brain age as a surrogate marker for cognitive performance in multiple sclerosis. *Eur J Neurol*. 2022;29(10):3039-49.

132. Cole JH, Raffel J, Friede T, Eshaghi A, Brownlee WJ, Chard D, et al. Longitudinal Assessment of Multiple Sclerosis with the Brain-Age Paradigm. *Ann Neurol*. 2020;88(1):93-105.

133. Meaton I, Altokhis A, Allen CM, Clarke MA, Sinnecker T, Meier D, et al. Paramagnetic rims are a promising diagnostic imaging biomarker in multiple sclerosis. *Mult Scler Houndmills Basingstoke Engl*. 2022;28(14):2212-20.

134. Calvi A, Carrasco FP, Tur C, Chard DT, Stutters J, De Angelis F, et al. Association of Slowly Expanding Lesions on MRI With Disability in People With Secondary Progressive Multiple Sclerosis. *Neurology*. 2022;98(17):e1783-93.

135. Preziosa P, Pagani E, Moiola L, Rodegher M, Filippi M, Rocca MA. Occurrence and microstructural features of slowly expanding lesions on fingolimod or natalizumab treatment in multiple sclerosis. *Mult Scler Houndmills Basingstoke Engl*.

2021;27(10):1520-32.

136. Felgenhauer K, Schliep G, Rapic N. Evaluation of the blood-CSF barrier by protein gradients and the humoral immune response within the central nervous system. *J Neurol Sci.* 1976;30(1):113-28.

137. Jeffcote T, Ho KM. Associations between cerebrospinal fluid protein concentrations, serum albumin concentrations and intracranial pressure in neurotrauma and intracranial haemorrhage. *Anaesth Intensive Care.* 2010;38(2):274-9.

138. Cabrera CM. Oligoclonal bands: An immunological and clinical approach. *Adv Clin Chem.* 2022;109:129-63.

139. Polman CH, Reingold SC, Banwell B, Clanet M, Cohen JA, Filippi M, et al. Diagnostic criteria for multiple sclerosis: 2010 revisions to the McDonald criteria. *Ann Neurol.* 2011;69(2):292-302.

140. Álvarez-Cermeño JC, Villar LM. Multiple sclerosis: Oligoclonal bands--a useful tool to avoid MS misdiagnosis. *Nat Rev Neurol.* 2013;9(6):303-4.

141. Fonderico M, Portaccio E, Razzolini L, Pastò L, Bellinva A, Addazio I, et al. Cerebrospinal Fluid IgM and Oligoclonal IgG Bands in Multiple Sclerosis: A Meta-Analysis of Prevalence and Prognosis. *Brain Sci.* 2021;11(11):1444.

142. Giannetti P, Politis M, Su P, Turkheimer F, Malik O, Keihaninejad S, et al. Microglia activation in multiple sclerosis black holes predicts outcome in progressive patients: an in vivo [(11)C](R)-PK11195-PET pilot study. *Neurobiol Dis.* 2014;65:203-10.

143. Hegen H, Walde J, Berek K, Arrambide G, Gnanapavan S, Kaplan B, et al. Cerebrospinal fluid kappa free light chains for the diagnosis of multiple sclerosis: A systematic review and meta-analysis. *Mult Scler Houndmills Basingstoke Engl.* 2023;29(2):169-81.

144. Oechtering J, Lincke T, Schaedelin S, Décard BF, Maceski A, Orleth A, et al. Intrathecal IgM Synthesis Is Associated with Spinal Cord Manifestation and Neuronal Injury in Early MS. *Ann Neurol.* 2022;91(6):814-20.

145. Revendova K, Zeman D, Kusnierova P, Bunganic R, Hanzlikova P, Karasova K,

Bibliografía

et al. Prognostic value of intrathecal IgM synthesis determined by various laboratory methods in patients with early multiple sclerosis - a prospective observational study. *Mult Scler Relat Disord*. 2022;63:103847.

146. Monreal E, Sainz de la Maza S, Costa-Frossard L, Walo-Delgado P, Zamora J, Fernández-Velasco JI, et al. Predicting Aggressive Multiple Sclerosis With Intrathecal IgM Synthesis Among Patients With a Clinically Isolated Syndrome. *Neurol Neuroimmunol Neuroinflammation*. 2021;8(5):e1047.

147. Capuano R, Zubizarreta I, Alba-Arbalat S, Sepulveda M, Sola-Valls N, Pulido-Valdeolivas I, et al. Oligoclonal IgM bands in the cerebrospinal fluid of patients with relapsing MS to inform long-term MS disability. *Mult Scler Houndmills Basingstoke Engl*. 2021;27(11):1706-16.

148. Fonderico M, Biagioli T, Lanzilao L, Bellinvia A, Fratangelo R, Pastò L, et al. Prognostic role of intrathecal IgM synthesis in multiple sclerosis: Results from a clinical series. *Mult Scler Houndmills Basingstoke Engl*. 2021;27(2):198-207.

149. Giovannoni G. Cerebrospinal fluid analysis. *Handb Clin Neurol*. 2014;122:681-702.

150. Villar LM, Sádaba MC, Roldán E, Masjuan J, González-Porqué P, Villarrubia N, et al. Intrathecal synthesis of oligoclonal IgM against myelin lipids predicts an aggressive disease course in MS. *J Clin Invest*. 2005;115(1):187-94.

151. Dorta Contreras AJ, Noris García E, Bu-Coifiú Fanego R, Padilla Docal B. Bases moleculares de la Neuroinmunología (II): El reibergrama y su uso en Neuroinmunología. *Rev Cuba Pediatría*. 2005;77(3-4):0-0.

152. 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*. 1977;37(5):397-401.

153. Naseri A, Nasiri E, Sahraian MA, Daneshvar S, Talebi M. Clinical Features of Late-Onset Multiple Sclerosis: a Systematic Review and Meta-analysis. *Mult Scler Relat Disord*. 2021;50:102816.

154. Zheng Y, Cai MT, Yang F, Zhou JP, Fang W, Shen CH, Zhang YX, Ding MP.

IgG Index Revisited: Diagnostic Utility and Prognostic Value in Multiple Sclerosis. *Front Immunol.* 2020;11:1799.

155. Freedman MS, Thompson EJ, Deisenhammer F, Giovannoni G, Grimsley G, Keir G, et al. Recommended standard of cerebrospinal fluid analysis in the diagnosis of multiple sclerosis: a consensus statement. *Arch Neurol.* 2005;62(6):865-70.

156. Ozakbas S, Cinar BP, Özcelik P, Baser H, Kosehasanoğullari G. Intrathecal IgM index correlates with a severe disease course in multiple sclerosis: Clinical and MRI results. *Clin Neurol Neurosurg.* 2017;160:27-9.

157. Reiber H. Proteins in cerebrospinal fluid and blood: barriers, CSF flow rate and source-related dynamics. *Restor Neurol Neurosci.* 2003;21(3-4):79-96.

158. Reiber H. The hyperbolic function: a mathematical solution of the protein flux/CSF flow model for blood-CSF barrier function A reply to the letter by S. t3hman (*J. Neurol. Sci.*, 126 (1994) 240-242).

159. Reiber H. Software for cerebrospinal fluid diagnostics and statistics. *Rev Cuba Investig Bioméd.* 2020;39(3).

160. Nakano T, Matsui M, Inoue I, Awata T, Katayama S, Murakoshi T. Free immunoglobulin light chain: its biology and implications in diseases. *Clin Chim Acta Int J Clin Chem.* 2011;412(11-12):843-9.

161. Gudowska-Sawczuk M, Mroczko B. Free Light Chains as a Novel Diagnostic Biomarker of Immune System Abnormalities in Multiple Sclerosis and HIV Infection. *BioMed Res Int.* 2019;2019:8382132.

162. Brebner JA, Stockley RA. Polyclonal free light chains: a biomarker of inflammatory disease or treatment target? *F1000 Med Rep.* 2013;5:4.

163. Jenner E. Serum free light chains in clinical laboratory diagnostics. *Clin Chim Acta Int J Clin Chem.* 2014;427:15-20.

164. Rajkumar SV. Multiple myeloma: 2022 update on diagnosis, risk stratification, and management. *Am J Hematol.* 2022;97(8):1086-107.

165. Abraham RS, Charlesworth MC, Owen BAL, Benson LM, Katzmann JA,

Bibliografia

Reeder CB, et al. Trimolecular complexes of lambda light chain dimers in serum of a patient with multiple myeloma. *Clin Chem*. 2002;48(10):1805-11.

166. Crespi I, Vecchio D, Serino R, Saliva E, Virgilio E, Sulas MG, et al. K Index is a Reliable Marker of Intrathecal Synthesis, and an Alternative to IgG Index in Multiple Sclerosis Diagnostic Work-Up. *J Clin Med*. 2019;8(4):446.

167. Lolli F, Siracusa G, Amato MP, Fratiglioni L, Dal Pozzo G, Galli E, et al. Intrathecal synthesis of free immunoglobulin light chains and IgM in initial multiple sclerosis. *Acta Neurol Scand*. 1991;83(4):239-43.

168. Christiansen M, Gjelstrup MC, Stilund M, Christensen T, Petersen T, Jon Møller H. Cerebrospinal fluid free kappa light chains and kappa index perform equal to oligoclonal bands in the diagnosis of multiple sclerosis. *Clin Chem Lab Med*. 2018;57(2):210-20.

169. Bradwell AR. Clinical importance of serum free light chain analysis. *Pers Med*. mayo de 2010;7(3):229-31.

170. Leurs CE, Twaalfhoven H, Lissenberg-Witte BI, van Pesch V, Dujmovic I, Drulovic J, et al. Kappa free light chains is a valid tool in the diagnostics of MS: A large multicenter study. *Mult Scler Houndmills Basingstoke Engl*. 2020;26(8):912-23.

171. Arneth B, Kraus J. The Use of Kappa Free Light Chains to Diagnose Multiple Sclerosis. *Med Kaunas Lith*. 2022;58(11):1512.

172. Rosenstein I, Rasch S, Axelsson M, Novakova L, Blennow K, Zetterberg H, et al. Kappa free light chain index as a diagnostic biomarker in multiple sclerosis: A real-world investigation. *J Neurochem*. 2021;159(3):618-28.

173. Hegen H, Arrambide G, Gnanapavan S, Kaplan B, Khalil M, Saadeh R, et al. Cerebrospinal fluid kappa free light chains for the diagnosis of multiple sclerosis: A consensus statement. *Mult Scler Houndmills Basingstoke Engl*. 2023;29(2):182-95.

174. Reiber H, Zeman D, Kušnierová P, Mundwiler E, Bernasconi L. Diagnostic relevance of free light chains in cerebrospinal fluid – The hyperbolic reference range for reliable data interpretation in quotient diagrams. *Clin Chim Acta*. 2019;497:153-62.

175. Reiber H, Zeman D, Kušnierová P, Mundwiler E, Bernasconi L. Diagnostic

relevance of free light chains in cerebrospinal fluid - The hyperbolic reference range for reliable data interpretation in quotient diagrams. *Clin Chim Acta Int J Clin Chem.* 2019;497:153-62.

176. Schwenkenbecher P, Konen FF, Wurster U, Witte T, Gingele S, Sühs KW, et al. Reiber's Diagram for Kappa Free Light Chains: The New Standard for Assessing Intrathecal Synthesis? *Diagnostics.* 2019;9(4):194.

177. Gaetani L, Di Carlo M, Brachelente G, Valletta F, Eusebi P, Mancini A, et al. Cerebrospinal fluid free light chains compared to oligoclonal bands as biomarkers in multiple sclerosis. *J Neuroimmunol.* 2020;339:577108.

178. Voortman MM, Stojakovic T, Pirpamer L, Jehna M, Langkammer C, Scharnagl H, et al. Prognostic value of free light chains lambda and kappa in early multiple sclerosis. *Mult Scler Houndmills Basingstoke Engl.* 2017;23(11):1496-505.

179. Theunissen F, Anderton RS, Mastaglia FL, James I, Bedlack R, Akkari PA. Intronic NEFH variant is associated with reduced risk for sporadic ALS and later age of disease onset. *Sci Rep.* 2022;12(1):14739.

180. Yuan A, Nixon RA. Posttranscriptional regulation of neurofilament proteins and tau in health and disease. *Brain Res Bull.* 2023;192:115-27.

181. Lycke JN, Karlsson JE, Andersen O, Rosengren LE. Neurofilament protein in cerebrospinal fluid: a potential marker of activity in multiple sclerosis. *J Neurol Neurosurg Psychiatry.* 1998;64(3):402-4.

182. Yuan A, Rao MV, Sasaki T, Chen Y, Kumar A, Veeranna, et al. -Internexin Is Structurally and Functionally Associated with the Neurofilament Triplet Proteins in the Mature CNS. *J Neurosci.* 2006;26(39):10006-19.

183. Shahim P, Politis A, van der Merwe A, Moore B, Chou YY, Pham DL, et al. Neurofilament light as a biomarker in traumatic brain injury. *Neurology.* 2020;95(6):e610-22.

184. Farragher CD, Ku Y, Powers JE. The Potential Role of Neurofilament Light in Mild Traumatic Brain Injury Diagnosis: A Systematic Review. *Cureus.* 2022;14(11):e31301.

Bibliografía

185. Gaiottino J, Norgren N, Dobson R, Topping J, Nissim A, Malaspina A, et al. Increased neurofilament light chain blood levels in neurodegenerative neurological diseases. *PloS One*. 2013;8(9):e75091.
186. Thebault S, Booth RA, Freedman MS. Blood Neurofilament Light Chain: The Neurologist's Troponin? *Biomedicines*. 2020;8(11):523.
187. Novakova L, Zetterberg H, Sundström P, Axelsson M, Khademi M, Gunnarsson M, et al. Monitoring disease activity in multiple sclerosis using serum neurofilament light protein. *Neurology*. 2017;89(22):2230-7.
188. Khalil M, Teunissen CE, Otto M, Piehl F, Sormani MP, Gattringer T, et al. Neurofilaments as biomarkers in neurological disorders. *Nat Rev Neurol*. 2018;14(10):577-89.
189. Bittner S, Oh J, Havrdová EK, Tintoré M, Zipp F. The potential of serum neurofilament as biomarker for multiple sclerosis. *Brain J Neurol*. 2021;144(10):2954-63.
190. Bjornevik K, Munger KL, Cortese M, Barro C, Healy BC, Niebuhr DW, et al. Serum Neurofilament Light Chain Levels in Patients With Presymptomatic Multiple Sclerosis. *JAMA Neurol*. 2020;77(1):58-64.
191. Barro C, Benkert P, Disanto G, Tsagkas C, Amann M, Naegelin Y, et al. Serum neurofilament as a predictor of disease worsening and brain and spinal cord atrophy in multiple sclerosis. *Brain J Neurol*. 2018;141(8):2382-91.
192. Kuhle J, Kropshofer H, Haering DA, Kundu U, Meinert R, Barro C, et al. Blood neurofilament light chain as a biomarker of MS disease activity and treatment response. *Neurology*. 2019;92(10):e1007-15.
193. Varhaug KN, Barro C, Bjørnevik K, Myhr KM, Torkildsen Ø, Wergeland S, et al. Neurofilament light chain predicts disease activity in relapsing-remitting MS. *Neurol Neuroimmunol Neuroinflammation*. 2018;5(1):e422.
194. Barro C, Healy BC, Liu Y, Saxena S, Paul A, Polgar-Turcsanyi M, et al. Serum GFAP and NfL Levels Differentiate Subsequent Progression and Disease Activity in Patients With Progressive Multiple Sclerosis. *Neurol Neuroimmunol*

Neuroinflammation. 2023;10(1):e200052.

195. Cai L, Huang J. Neurofilament light chain as a biological marker for multiple sclerosis: a meta-analysis study. *Neuropsychiatr Dis Treat*. 2018;14:2241-54.

196. Siller N, Kuhle J, Muthuraman M, Barro C, Uphaus T, Groppa S, et al. Serum neurofilament light chain is a biomarker of acute and chronic neuronal damage in early multiple sclerosis. *Mult Scler Houndmills Basingstoke Engl*. 2019;25(5):678-86.

197. Steponaitis G, Skiriutė D, Kazlauskas A, Golubickaitė I, Stakaitis R, Tamašauskas A, et al. High CHI3L1 expression is associated with glioma patient survival. *Diagn Pathol*. 2016;11(1):42.

198. Liu X, Zhang J, Zhu KY. Chitin in Arthropods: Biosynthesis, Modification, and Metabolism. *Adv Exp Med Biol*. 2019;1142:169-207.

199. Kuusk S, Sørli M, Väljamäe P. Human Chitotriosidase Is an Endo-Processive Enzyme. *PLOS ONE*. 2017;12(1):e0171042.

200. Guan SP, Mok YK, Koo KN, Chu KL, Wong WS. Chitinases: Biomarkers for Human Diseases. *Protein Pept Lett*. 2009;16(5):490-8.

201. Kazakova MH, Sarafian VS. YKL-40--a novel biomarker in clinical practice? *Folia Med (Plovdiv)*. 2009;51(1):5-14.

202. Kim DH, Choi JM. Chitinase 3-like-1, a novel regulator of Th1/CTL responses, as a therapeutic target for increasing anti-tumor immunity. *BMB Rep*. 2018;51(5):207-8.

203. Li Z, Wu F, Xi L, Tian Z. Role of Chitinase-3-like Protein 1 in Cardioprotection and Angiogenesis by Post-Infarction Exercise Training. *Biomedicines*. 2022;10(5):1028.

204. Chen X, Jiao J, He X, Zhang J, Wang H, Xu Y, et al. CHI3L1 regulation of inflammation and the effects on osteogenesis in a *Staphylococcus aureus*-induced murine model of osteomyelitis. *FEBS J*. 2017;284(11):1738-47.

205. Zhao T, Su Z, Li Y, Zhang X, You Q. Chitinase-3 like-protein-1 function and its role in diseases. *Signal Transduct Target Ther*. 2020;5(1):1-20.

Bibliografía

206. Cubas-Núñez L, Gil-Perotín S, Castillo-Villalba J, López V, Solís Tarazona L, Gasqué-Rubio R, Carratalá-Boscá S, Alcalá-Vicente C, Pérez-Miralles F, Lassmann H, Casanova B. Potential Role of CHI3L1+ Astrocytes in Progression in MS. *Neurol Neuroimmunol Neuroinflamm*. 2021; 8(3):e972.
207. Gil-Perotin S, Castillo-Villalba J, Cubas-Núñez L, Gasque R, Hervas D, Gomez-Mateu J, et al. Combined Cerebrospinal Fluid Neurofilament Light Chain Protein and Chitinase-3 Like-1 Levels in Defining Disease Course and Prognosis in Multiple Sclerosis. *Front Neurol*. 2019;10:1008.
208. Kušnierová P, Zeman D, Hradílek P, Zapletalová O, Stejskal D. Determination of chitinase 3-like 1 in cerebrospinal fluid in multiple sclerosis and other neurological diseases. *PloS One*. 2020;15(5):e0233519.
209. Yang J, Hamade M, Wu Q, Wang Q, Axtell R, Giri S, et al. Current and Future Biomarkers in Multiple Sclerosis. *Int J Mol Sci*. 2022;23(11):5877.
210. De Fino C, Lucchini M, Lucchetti D, Nociti V, Losavio FA, Bianco A, et al. The predictive value of CSF multiple assay in multiple sclerosis: A single center experience. *Mult Scler Relat Disord*. 2019;35:176-81.
211. Cantó E, Tintoré M, Villar LM, Costa C, Nurtdinov R, Álvarez-Cermeño JC, et al. Chitinase 3-like 1: prognostic biomarker in clinically isolated syndromes. *Brain J Neurol*. 2015;138(Pt 4):918-31.
212. Floro S, Carandini T, Pietroboni AM, De Riz MA, Scarpini E, Galimberti D. Role of Chitinase 3-like 1 as a Biomarker in Multiple Sclerosis: A Systematic Review and Meta-analysis. *Neurol Neuroimmunol Neuroinflammation*. 2022;9(4):e1164.
213. Pérez-Miralles F, Prefasi D, García-Merino A, Gascón-Giménez F, Medrano N, Castillo-Villalba J, et al. CSF chitinase 3-like-1 association with disability of primary progressive MS. *Neurol Neuroimmunol Neuroinflammation*. 2020; 7(5):e815.
214. Kassubek R, Gorges M, Schocke M, Hagenston VAM, Huss A, Ludolph AC, et al. GFAP in early multiple sclerosis: A biomarker for inflammation. *Neurosci Lett*. 1 2017; 657:166-70.
215. Petzold A. Glial fibrillary acidic protein is a body fluid biomarker for glial

pathology in human disease. *Brain Res.* 2015; 1600:17-31.

216. Yang Z, Wang KKW. Glial fibrillary acidic protein: from intermediate filament assembly and gliosis to neurobiomarker. *Trends Neurosci.* 2015; 38(6):364-74.

217. Lundgaard I, Osório MJ, Kress BT, Sanggaard S, Nedergaard M. White matter astrocytes in health and disease. *Neuroscience.* 2014; 276:161-73.

218. Hainfellner JA, Voigtländer T, Ströbel T, Mazal PR, Maddalena AS, Aguzzi A, et al. Fibroblasts can express glial fibrillary acidic protein (GFAP) in vivo. *J Neuropathol Exp Neurol.* 2001; 60(5):449-61.

219. Carotti S, Morini S, Corradini SG, Burza MA, Molinaro A, Carpino G, et al. Glial fibrillary acidic protein as an early marker of hepatic stellate cell activation in chronic and posttransplant recurrent hepatitis C. *Liver Transplant Off Publ Am Assoc Study Liver Dis Int Liver Transplant Soc.* 2008; 14(6):806-14.

220. Brenner M, Messing A. Regulation of GFAP Expression. *ASN Neuro.* 2021;13:1759091420981206.

221. Janigro D, Mondello S, Posti JP, Unden J. GFAP and S100B: What You Always Wanted to Know and Never Dared to Ask. *Front Neurol.* 2022; 13:835597.

222. Halford J, Shen S, Itamura K, Levine J, Chong AC, Czerwieniec G, et al. New astroglial injury-defined biomarkers for neurotrauma assessment. *J Cereb Blood Flow Metab Off J Int Soc Cereb Blood Flow Metab.* 2017;37(10):3278-99.

223. Rioll H, Tardy M, Rolland B, Lévesque G, Murthy MR. Detection of the peripheral nervous system (PNS)-type glial fibrillary acidic protein (GFAP) and its mRNA in human lymphocytes. *J Neurosci Res.* 1997;48(1):53-62.

224. Ammitzbøll C, Dyrby TB, Börnsen L, Schreiber K, Ratzer R, Romme Christensen J, et al. NfL and GFAP in serum are associated with microstructural brain damage in progressive multiple sclerosis. *Mult Scler Relat Disord.* 2023;77:104854.

225. Aygnac X, Le Bars E, Duflos C, Hirtz C, Maleska Maceski A, Carra-Dallière C, et al. Serum GFAP in multiple sclerosis: correlation with disease type and MRI markers of disease severity. *Sci Rep.* 2020;10(1):10923.

Bibliografía

226. Meier S, Willemse EAJ, Schaedelin S, Oechtering J, Lorscheider J, Melie-Garcia L, et al. Serum Glial Fibrillary Acidic Protein Compared With Neurofilament Light Chain as a Biomarker for Disease Progression in Multiple Sclerosis. *JAMA Neurol.* 2023;80(3):287-97.
227. Biernacki T, Kokas Z, Sandi D, Füvesi J, Friczka-Nagy Z, Faragó P, et al. Emerging Biomarkers of Multiple Sclerosis in the Blood and the CSF: A Focus on Neurofilaments and Therapeutic Considerations. *Int J Mol Sci.* 2022;23(6):3383.
228. Schulz K, Trendelenburg M. C1q as a target molecule to treat human disease: What do mouse studies teach us? *Front Immunol.* 2022; 13:958273.
229. West EE, Kolev M, Kemper C. Complement and the Regulation of T Cell Responses. *Annu Rev Immunol.* 2018;36(1):309-38.
230. Sarma JV, Ward PA. The complement system. *Cell Tissue Res.* enero de 2011;343(1):227-35.
231. Noris M, Remuzzi G. Overview of complement activation and regulation. *Semin Nephrol.* 2013;33(6):479-92.
232. Kishore U, Reid KB. C1q: structure, function, and receptors. *Immunopharmacology.* 2000;49(1-2):159-70.
233. Roumenina LT, Sène D, Radanova M, Blouin J, Halbwachs-Mecarelli L, Dragon-Durey MA, et al. Functional complement C1q abnormality leads to impaired immune complexes and apoptotic cell clearance. *J Immunol Baltim Md 1950.* 2011;187(8):4369-73.
234. Prechl J, Czirják L. The endothelial deprotection hypothesis for lupus pathogenesis: the dual role of C1q as a mediator of clearance and regulator of endothelial permeability. *F1000Research.* 2015;4:24.
235. Thielens NM, Tedesco F, Bohlson SS, Gaboriaud C, Tenner AJ. C1q: A fresh look upon an old molecule. *Mol Immunol.* 2017;89:73-83.
236. Donat C, Kölm R, Csorba K, Tuncer E, Tsakiris DA, Trendelenburg M. Complement C1q Enhances Primary Hemostasis. *Front Immunol.* 2020;11:1522.

237. van de Bovenkamp FS, Dijkstra DJ, van Kooten C, Gelderman KA, Trouw LA. Circulating C1q levels in health and disease, more than just a biomarker. *Mol Immunol*. 2021;140:206-16.
238. Nayak A, Ferluga J, Tsolaki AG, Kishore U. The non-classical functions of the classical complement pathway recognition subcomponent C1q. *Immunol Lett*. 2010;131(2):139-50.
239. Gomez-Arboledas A, Acharya MM, Tenner AJ. The Role of Complement in Synaptic Pruning and Neurodegeneration. *ImmunoTargets Ther*. 2021;10:373-86.
240. Zhang W, Chen Y, Pei H. C1q and central nervous system disorders. *Front Immunol*. 2023;14:1145649.
241. Barnett MH, Parratt JDE, Cho ES, Prineas JW. Immunoglobulins and complement in postmortem multiple sclerosis tissue. *Ann Neurol*. 2009;65(1):32-46.
242. Kapoor R, Ho PR, Campbell N, Chang I, Deykin A, Forrestal F, et al. Effect of natalizumab on disease progression in secondary progressive multiple sclerosis (ASCEND): a phase 3, randomised, double-blind, placebo-controlled trial with an open-label extension. *Lancet Neurol*. 2018;17(5):405-15.
243. Håkansson I, Ernerudh J, Vrethem M, Dahle C, Ekdahl KN. Complement activation in cerebrospinal fluid in clinically isolated syndrome and early stages of relapsing remitting multiple sclerosis. *J Neuroimmunol*. 2020;340:577147.
244. Schuller E, Helary M. Determination in the nanogram range of C1q in serum and unconcentrated CSF by electro-immunodiffusion. *J Immunol Methods*. 1983;56(2):159-65.
245. Ingram G, Loveless S, Howell OW, Hakobyan S, Dancey B, Harris CL, et al. Complement activation in multiple sclerosis plaques: an immunohistochemical analysis. *Acta Neuropathol Commun*. 2014;2:53.
246. Loveless S, Neal JW, Howell OW, Harding KE, Sarkies P, Evans R, et al. Tissue microarray methodology identifies complement pathway activation and dysregulation in progressive multiple sclerosis. *Brain Pathol Zurich Switz*. 2018;28(4):507-20.
247. Evans R, Watkins LM, Hawkins K, Santiago G, Demetriou C, Naughton M,

Bibliografía

et al. Complement activation and increased anaphylatoxin receptor expression are associated with cortical grey matter lesions and the compartmentalised inflammatory response of multiple sclerosis. *Front Cell Neurosci.* 2023;17:1094106.

248. Xu X, Zhang A, Zhu Y, He W, Di W, Fang Y, et al. MFG-E8 reverses microglial-induced neurotoxic astrocyte (A1) via NF- κ B and PI3K-Akt pathways. *J Cell Physiol.* 2018;234(1):904-14.

249. Clarke EV, Weist BM, Walsh CM, Tenner AJ. Complement protein C1q bound to apoptotic cells suppresses human macrophage and dendritic cell-mediated Th17 and Th1 T cell subset proliferation. *J Leukoc Biol.* 2015;97(1):147-60.

250. Cohen RA, Kessler HR, Fischer M. The Extended Disability Status Scale (EDSS) as a predictor of impairments of functional activities of daily living in multiple sclerosis. *J Neurol Sci.* 1993;115(2):132-5.

251. Villar LM, González-Porqué P, Masjuán J, Alvarez-Cermeño JC, Bootello A, Keir G. A sensitive and reproducible method for the detection of oligoclonal IgM bands. *J Immunol Methods.* 2001;258(1-2):151-5.

252. Andersson M, Alvarez-Cermeño J, Bernardi G, Cogato I, Fredman P, Frederiksen J, et al. Cerebrospinal fluid in the diagnosis of multiple sclerosis: a consensus report. *J Neurol Neurosurg Psychiatry.* 1994;57(8):897-902.

253. Gudowska-Sawczuk M, Tarasiuk J, Kułakowska A, Kochanowicz J, Mroczko B. Kappa Free Light Chains and IgG Combined in a Novel Algorithm for the Detection of Multiple Sclerosis. *Brain Sci.* 2020;10(6):324.

254. Bernardi G, Biagioli T, Malpassi P, De Michele T, Vecchio D, Repice AM, et al. The contribute of cerebrospinal fluid free light-chain assay in the diagnosis of multiple sclerosis and other neurological diseases in an Italian multicenter study. *Mult Scler Houndmills Basingstoke Engl.* 2022;28(9):1364-72.

255. Agnello L, Lo Sasso B, Salemi G, Altavilla P, Pappalardo EM, Caldarella R, et al. Clinical Use of κ Free Light Chains Index as a Screening Test for Multiple Sclerosis. *Lab Med.* 2020;51(4):402-7.

256. Valencia-Vera E, Martinez-Escribano Garcia-Ripoll A, Enguix A, Abalos-

Garcia C, Segovia-Cuevas MJ. Application of κ free light chains in cerebrospinal fluid as a biomarker in multiple sclerosis diagnosis: development of a diagnosis algorithm. Clin Chem Lab Med. 2018;56(4):609-13.

257. Sanz Diaz CT, de Las Heras Flórez S, Carretero Perez M, Hernández Pérez MÁ, Martín García V. Evaluation of Kappa Index as a Tool in the Diagnosis of Multiple Sclerosis: Implementation in Routine Screening Procedure. Front Neurol. 2021;12:676527.

258. Bayart JL, Muls N, van Pesch V. Free Kappa light chains in neuroinflammatory disorders: Complement rather than substitute? Acta Neurol Scand. 2018;138(4):352-8.

259. Pieri M, Storto M, Pignatola S, Zenobi R, Buttari F, Bernardini S, et al. KFLC Index utility in multiple sclerosis diagnosis: Further confirmation. J Neuroimmunol. 2017;309:31-3.

260. Duell F, Evertsson B, Al Nimer F, Sandin Å, Olsson D, Olsson T, et al. Diagnostic accuracy of intrathecal kappa free light chains compared with OCBs in MS. Neurol Neuroimmunol Neuroinflammation. 2020;7(4):e775.

261. Saadeh RS, Ramos PA, Algeciras-Schimnich A, Flanagan EP, Pittock SJ, Willrich MA. An Update on Laboratory-Based Diagnostic Biomarkers for Multiple Sclerosis and Beyond. Clin Chem. 2022;68(9):1134-50.

262. Monreal E, Fernández-Velasco JI, García-Soidán A, Sainz de la Maza S, Espiño M, Villarrubia N, et al. Establishing the best combination of the kappa free light chain index and oligoclonal bands for an accurate diagnosis of multiple sclerosis. Front Immunol. 2023;14:1288169.

263. Hoedemakers RMJ, Pruijt JFM, Hol S, Teunissen E, Martens H, Stam P, et al. Clinical comparison of new monoclonal antibody-based nephelometric assays for free light chain kappa and lambda to polyclonal antibody-based assays and immunofixation electrophoresis. Clin Chem Lab Med. 2011;50(3):489-95.

264. Messiaen AS, De Sloovere MMW, Claus PE, Vercammen M, Van Hoovels L, Heylen O, et al. Performance Evaluation of Serum Free Light Chain Analysis: Nephelometry vs Turbidimetry, Monoclonal vs Polyclonal Reagents. Am J Clin Pathol. 2017;147(6):611-22.

Bibliografía

265. Fonderico M, Portaccio E, Razzolini L, Pastò L, Bellinvia A, Addazio I, et al. Cerebrospinal Fluid IgM and Oligoclonal IgG Bands in Multiple Sclerosis: A Meta-Analysis of Prevalence and Prognosis. *Brain Sci.* 2021;11(11):1444.
266. Alcalá Vicente C, Lacruz L, Gascón F, Carratalà S, Quintanilla-Bordás C, Sanz MT, et al. Oligoclonal M bands and cervical spinal cord lesions predict early secondary progressive multiple sclerosis. *Front Neurol.* 2022;13:991596.
267. Frau J, Villar LM, Sardu C, Secci MA, Schirru L, Ferraro D, et al. Intrathecal oligoclonal bands synthesis in multiple sclerosis: is it always a prognostic factor? *J Neurol.* 2018;265(2):424-30.
268. Ribes García S, Castillo-Villalba J, Gasque Rubio R, Carratalà Boscà S, Cubas-Núñez L, Alcalá C, et al. Is it cost-effective to request IgM oligoclonal bands against lipids in daily practice as a biomarker for poor prognosis in multiple sclerosis? *Mult Scler Relat Disord.* noviembre de 2023;79:105033.
269. Oechtering J, Schaedelin S, Benkert P, Müller S, Achtnichts L, Vehoff J, et al. Intrathecal Immunoglobulin M Synthesis is an Independent Biomarker for Higher Disease Activity and Severity in Multiple Sclerosis. *Ann Neurol.* 2021;90(3):477-89.
270. Jongen PJH, Lycklama a Nijeholt G, Lamers KJB, Doesburg WH, Barkhof F, Lemmens WAJG, et al. Cerebrospinal fluid IgM index correlates with cranial MRI lesion load in patients with multiple sclerosis. *Eur Neurol.* 2007;58(2):90-5.
271. Muñoz Ú, Sebal C, Escudero E, García Sánchez MI, Urcelay E, Jayo A, et al. High prevalence of intrathecal IgA synthesis in multiple sclerosis patients. *Sci Rep.* 2022;12(1):4247.
272. Coll-Martinez C, Quintana E, Buxó M, Salavedra-Pont J, Gasull-Vicens L, Quiroga-Varela A, et al. Oligoclonal IgM bands are a promising biomarker for long-term cognitive outcomes in multiple sclerosis. *Mult Scler Relat Disord.* 2022;68:104397.
273. Rosenstein I, Rasch S, Axelsson M, Novakova L, Blennow K, Zetterberg H, et al. Increased intrathecal neurofilament light and immunoglobulin M predict severe disability in relapsing-remitting multiple sclerosis. *Front Immunol.* 2022;13:967953.

274. Ribes García S, Casanova Estruch B, Gómez Pajares F, Juan Blanco MA. Prognostic utility of the IgM oligoclonal bands against myelin lipids in multiple sclerosis. *J Neuroimmunol.* 2021;359:577698.
275. Arroyo-Pereiro P, García-Serrano L, Morandeira F, Urban B, Mas V, Framil M, et al. Kappa free light chains index in multiple sclerosis very long-term prognosis. *Front Immunol.* 2023;14:1223514.
276. Rosenstein I, Axelsson M, Novakova L, Rasch S, Blennow K, Zetterberg H, et al. High levels of kappa free light chain synthesis predict cognitive decline in relapsing-remitting multiple sclerosis. *Front Immunol.* 2023;14:1106028.
277. Rosenstein I, Axelsson M, Novakova L, Malmeström C, Blennow K, Zetterberg H, et al. Intrathecal kappa free light chain synthesis is associated with worse prognosis in relapsing-remitting multiple sclerosis. *J Neurol.* 2023;270(10):4800-11.
278. Castillo-Villalba J, Gil-Perotín S, Gasque-Rubio R, Cubas-Núñez L, Carratalà-Boscà S, Alcalá C, et al. High Levels of Cerebrospinal Fluid Kappa Free Light Chains Relate to IgM Intrathecal Synthesis and Might Have Prognostic Implications in Relapsing Multiple Sclerosis. *Front Immunol.* 2022;13:827738.
279. Miklušová M, Fürst T, Zimek D, Mareš J. Prognostic value of cerebrospinal fluid biomarkers in multiple sclerosis: The key role of kappa free light chains and a multivariate predictor for disease progression. *Mult Scler Relat Disord.* 2023;82:105402.
280. Stauch C, Reiber H, Rauchenzauner M, Strasak A, Pohl D, Hanefeld F, et al. Intrathecal IgM synthesis in pediatric MS is not a negative prognostic marker of disease progression: quantitative versus qualitative IgM analysis. *Mult Scler Houndmills Basingstoke Engl.* 2011;17(3):327-34.
281. Hegen H, Berek K, Bsteh G, Auer M, Altmann P, Di Pauli F, et al. Kappa free light chain and neurofilament light independently predict early multiple sclerosis disease activity-a cohort study. *EBioMedicine.* 2023;91:104573.
282. Benkert P, Meier S, Schaedelín S, Manouchehrinia A, Yaldizli Ö, Maceski A, et al. Serum neurofilament light chain for individual prognostication of disease activity in people with multiple sclerosis: a retrospective modelling and validation study. *Lancet*

Bibliografia

Neurol. 2022;21(3):246-57.

283. Niiranen M, Kontkanen A, Jääskeläinen O, Tertsunen HM, Selander T, Hartikainen P, et al. Serum GFAP and NfL levels in benign relapsing-remitting multiple sclerosis. *Mult Scler Relat Disord*. 2021;56:103280.

284. Thebault S, Reaume M, Marrie RA, Marriott JJ, Furlan R, Laroni A, et al. High or increasing serum NfL is predictive of impending multiple sclerosis relapses. *Mult Scler Relat Disord*. 2022;59:103535.

285. Konen FF, Wurster U, Witte T, Jendretzky KF, Gingele S, Tumani H, et al. The Impact of Immunomodulatory Treatment on Kappa Free Light Chains as Biomarker in Neuroinflammation. *Cells*. 2020;9(4):842.

286. Barro C, Benkert P, Disanto G, Tsagkas C, Amann M, Naegelin Y, et al. Serum neurofilament as a predictor of disease worsening and brain and spinal cord atrophy in multiple sclerosis. *Brain J Neurol*. 2018;141(8):2382-91.

287. Dalla Costa G, Martinelli V, Sangalli F, Moiola L, Colombo B, Radaelli M, et al. Prognostic value of serum neurofilaments in patients with clinically isolated syndromes. *Neurology*. 2019;92(7):e733-41.

288. Abdelhak A, Benkert P, Schaedelin S, Boscardin WJ, Cordano C, Oechtering J, et al. Neurofilament Light Chain Elevation and Disability Progression in Multiple Sclerosis. *JAMA Neurol*. 2023;80(12):1317-25.

289. Lucchini M, De Arcangelis V, Piro G, Nociti V, Bianco A, De Fino C, et al. CSF CXCL13 and Chitinase 3-like-1 Levels Predict Disease Course in Relapsing Multiple Sclerosis. *Mol Neurobiol*. 2023;60(1):36-50.

290. Petržalka M, Meluzínová E, Libertínová J, Mojžišová H, Hanzalová J, Ročková P, et al. IL-2, IL-6 and chitinase 3-like 2 might predict early relapse activity in multiple sclerosis. *PloS One*. 2022;17(6):e0270607.

291. Floro S, Carandini T, Pietroboni AM, De Riz MA, Scarpini E, Galimberti D. Role of Chitinase 3-like 1 as a Biomarker in Multiple Sclerosis: A Systematic Review and Meta-analysis. *Neurol Neuroimmunol Neuroinflamm*. 2022;9(4):e1164.

292. Cross AH, Gelfand JM, Thebault S, Bennett JL, von Büdingen HC, Cameron B,

et al. Emerging Cerebrospinal Fluid Biomarkers of Disease Activity and Progression in Multiple Sclerosis. *JAMA Neurol.* 2024;81(4):373-83.

293. Abdelhak A, Antweiler K, Kowarik MC, Senel M, Havla J, Zettl UK, et al. Serum glial fibrillary acidic protein and disability progression in progressive multiple sclerosis. *Ann Clin Transl Neurol.* 2024;11(2):477-85.

294. Sellebjerg F, Börnsen L, Ammitzbøll C, Nielsen JE, Vinther-Jensen T, Hjermand LE, et al. Defining active progressive multiple sclerosis. *Mult Scler Houndmills Basingstoke Engl.* 2017;23(13):1727-35.

295. Abdelhak A, Huss A, Kassubek J, Tumani H, Otto M. Serum GFAP as a biomarker for disease severity in multiple sclerosis. *Sci Rep.* 2018;8(1):14798.

296. Sun M, Liu N, Xie Q, Li X, Sun J, Wang H, et al. A candidate biomarker of glial fibrillary acidic protein in CSF and blood in differentiating multiple sclerosis and its subtypes: A systematic review and meta-analysis. *Mult Scler Relat Disord.* 2021;51:102870.

297. Axelsson M, Malmeström C, Nilsson S, Haghighi S, Rosengren L, Lycke J. Glial fibrillary acidic protein: a potential biomarker for progression in multiple sclerosis. *J Neurol.* 2011;258(5):882-8.

298. Fitzgerald KC, Sotirchos ES, Smith MD, Lord HN, DuVal A, Mowry EM, et al. Contributors to Serum NfL Levels in People without Neurologic Disease. *Ann Neurol.* 2022;92(4):688-98.

299. Khalil M, Pirpamer L, Hofer E, Voortman MM, Barro C, Leppert D, et al. Serum neurofilament light levels in normal aging and their association with morphologic brain changes. *Nat Commun.* 2020;11(1):812.

300. Sotirchos ES, Fitzgerald KC, Singh CM, Smith MD, Reyes-Mantilla M, Hersh CM, et al. Associations of sNfL with clinico-radiological measures in a large MS population. *Ann Clin Transl Neurol.* 2023;10(1):84-97.

301. Lawrence JM, Schardien K, Wigdahl B, Nonnemacher MR. Roles of neuropathology-associated reactive astrocytes: a systematic review. *Acta Neuropathol Commun.* 2023;11(1):42.

Bibliografia

302. Yang C, Hou X, Feng Q, Li Y, Wang X, Qin L, et al. Lupus serum IgG induces microglia activation through Fc fragment dependent way and modulated by B-cell activating factor. *J Transl Med.* 2019;17(1):426.
303. Zhou W, Graner M, Paucek P, Beseler C, Boisen M, Bubak A, et al. Multiple sclerosis plasma IgG aggregates induce complement-dependent neuronal apoptosis. *Cell Death Dis.* 2023;14(4):254.
304. Guo H, Chen P, Luo R, Zhang Y, Xu X, Gou X. The Roles of Ciliary Neurotrophic Factor - from Neuronutrition to Energy Metabolism. *Protein Pept Lett.* 2022;29(10):815-28.
305. Butzkueven H, Emery B, Cipriani T, Marriott MP, Kilpatrick TJ. Endogenous leukemia inhibitory factor production limits autoimmune demyelination and oligodendrocyte loss. *Glia.* 2006;53(7):696-703.
306. Lin J, Niimi Y, Clausi MG, Kanal HD, Levison SW. Neuroregenerative and protective functions of Leukemia Inhibitory Factor in perinatal hypoxic-ischemic brain injury. *Exp Neurol.* 2020;330:113324.
307. Lian H, Yang L, Cole A, Sun L, Chiang ACA, Fowler SW, et al. NF κ B-activated astroglial release of complement C3 compromises neuronal morphology and function associated with Alzheimer's disease. *Neuron.* 2015;85(1):101-15.
308. Kleer JS, Rabatscher PA, Weiss J, Leonardi J, Vogt SB, Kieninger-Gräfitsch A, et al. Epitope-Specific Anti-C1q Autoantibodies in Systemic Lupus Erythematosus. *Front Immunol.* 2021;12:761395.
309. Balasa R, Barcutean L, Mosora O, Manu D. Reviewing the Significance of Blood-Brain Barrier Disruption in Multiple Sclerosis Pathology and Treatment. *Int J Mol Sci.* 2021;22(16):8370.
310. Dijkstra DJ, Joeloem Singh JV, Bajema IM, Trouw LA. Complement activation and regulation in rheumatic disease. *Semin Immunol.* 2019;45:101339.
311. Zelek WM, Fathalla D, Morgan A, Touchard S, Loveless S, Tallantyre E, et al. Cerebrospinal fluid complement system biomarkers in demyelinating disease. *Mult Scler Houndmills Basingstoke Engl.* 2020;26(14):1929-37.

312. Melamed E, Levy M, Waters PJ, Sato DK, Bennett JL, John GR, et al. Update on biomarkers in neuromyelitis optica. *Neurol Neuroimmunol Neuroinflammation*. 2015;2(4):e134.

313. Eide PK, Eidsvaag VA, Nagelhus EA, Hansson HA. Cortical astrogliosis and increased perivascular aquaporin-4 in idiopathic intracranial hypertension. *Brain Res*. 1 2016;1644:161-75.

314. Grygorowicz T, Welniak-Kamińska M, Strużyńska L. Early P2X7R-related astrogliosis in autoimmune encephalomyelitis. *Mol Cell Neurosci*. 2016;74:1-9.

PUBLICACIONES

Publicaciones

- Castillo-Villalba J, Gil-Perotín S, Gasque-Rubio R, Cubas-Núñez L, Carratalà-Boscà S, Alcalá C, Quintanilla-Bordás C, Pérez-Miralles F, Ferrer C, Cañada Martínez A, **Tortosa J**, Solís-Tarazona L, Campos L, Leivas A, Laíz Marro B, Casanova B. High Levels of Cerebrospinal Fluid Kappa Free Light Chains Relate to IgM Intrathecal Synthesis and Might Have Prognostic Implications in Relapsing Multiple Sclerosis. *Front Immunol.* 2022;13:827738
- **Tortosa-Carreres J**, Quiroga-Varela A, Castillo-Villalba J, Piqueras-Rodríguez M, Ramió-Torrenta L, Cubas-Núñez L, Gasqué-Rubio R, Quintanilla-Bordas C, Huertas-Pons JM, Miguela A, Casanova B, Laiz-Marro B, Pérez-Miralles FC. Improving the efficiency of free kappa light chains as diagnostic biomarker of Multiple Sclerosis by using a novel algorithm. *Mult Scler Relat Disord.* 2023;79:104997

ANEXOS

Anexo I.- Sintomatología de la Esclerosis Múltiple en Función del Área Dañada

Localización	Patología	Signos y Síntomas
Nervio óptico	Neuritis óptica	Dolor al realizar movimiento ocular, visión borrosa, reducción agudeza visual y desaturación de colores.
Cerebro	Síndrome focal supratentorial	Variables en función del área cerebral afectada
Cerebelo	Síndrome cerebeloso	Inestabilidad, ataxia, nistagmos...
Médula espinal	Mielitis parcial del tracto piramidal	Debilidad de miembros inferiores o superiores
	Mielitis parcial de columnas espinotalámicas posteriores.	Entumecimiento uni o bilateral, parestesias, fenómeno de L'hermitte.
	Lesiones en médula espinal	Urgencia/incontinencia urinaria fecal, disfunción eréctil...
Fascículos mediales o longitudinales del tronco encefálico	Oftalmoplejía	Visión borrosa o doble.
Tracto piramidal, espinotalámico y columnas posteriores del tronco encefálico		Similar a lo descrito en médula espinal.

Anexo II.- Escala de Discapacidad Extendida (EDSS).

0 -> Examen neurológico normal (todos los signos funcionales (SF) grado 0, se acepta grado 1 en cerebral).

1 -> Ninguna discapacidad. Signos mínimos en 1 SF (grado 1 en cualquier función excepto SF cerebral).

1.5 -> Ninguna discapacidad. Signos mínimos en más de 1 SF (más de 1 grado 1, exceptuando SF cerebral).

2 -> Discapacidad mínima en 1 SF (1 SF grado 2, el resto grados 0 o 1).

2.5 -> Discapacidad mínima en 2 SF (2 SF grado 2, el resto grados 0 o 1).

3 -> Discapacidad moderada en 1 SF (1 SF grado 3, el resto grados 0 o 1) o discapacidad leve en 3 o 4 SF (3 o 4 SF grado 2, el resto 0 o 1), pero el paciente es completamente ambulatorio.

3.5 -> Completamente ambulatorio, pero con discapacidad moderada en un SF (1 grado 3) y 1 o 2 SF grado 2; o 2 SF grado 3; o 5 grados 2 (el resto 0 o 1).

4 -> Completamente ambulatorio sin ayuda, autosuficiente, activo unas 12 horas al día a pesar de una discapacidad relativamente grave que consiste en 1 SF grado 4 (el resto 0 o 1), o combinaciones de grados menores que exceden los límites de los puntos anteriores. Capaz de caminar sin ayuda ni descanso unos 500 metros.

4.5 -> Completamente ambulatorio sin ayuda, autosuficiente, activo una gran parte del día, capaz de trabajar un día completo, puede tener algunas limitaciones para una actividad plena o requerir asistencia mínima; caracterizado por una discapacidad relativamente grave que generalmente consiste en 1 SF grado 4 (el resto 0 o 1), o combinaciones de grados menores que exceden los límites de los puntos anteriores. Capaz de caminar sin ayuda ni descanso unos 300 metros.

5 -> Camina sin ayuda ni descanso unos 200 metros; discapacidad suficientemente grave para alterar las actividades diarias (por ejemplo, trabajar un día completo sin medidas especiales). Generalmente equivale a 1 SF grado 5 solo, el resto 0 o 1; o combinaciones de grados menores que exceden las especificaciones del grado 4,0.

Anexos

5.5 -> Camina sin ayuda ni descanso unos 100 metros; discapacidad suficientemente grave para impedir las actividades diarias. Generalmente equivale a 1 SF grado 5 solo, el resto 0 o 1; o combinaciones de grados menores que exceden las especificaciones del grado 4,0.

6 -> Requiere ayuda intermitente o unilateral constante (bastón, muleta u otra ayuda) para caminar unos 100 metros con o sin descanso. Las equivalencias habituales en SF son combinaciones con más de 2 SF grado 3+ 111 6,5 Requiere ayuda bilateral constante (bastón, muleta u otra ayuda) para caminar unos 20 metros sin descanso. Las equivalencias habituales en SF son combinaciones con más de 2 SF grado 3+.

7 -> Incapaz de caminar más de 5 metros incluso con ayuda, limitado a silla de ruedas; se propulsa sin ayuda en una silla de ruedas estándar y realiza las transferencias solo; activo unas 12 horas al día. Los SF equivalentes son combinaciones con más de 1 SF grado 4+; muy raramente, grado 5 en piramidal de forma aislada.

7.5 -> Incapaz de caminar más de unos pocos pasos, limitado a silla de ruedas, puede requerir ayuda para las transferencias, se desplaza solo pero no puede desplazarse en una silla estándar un día completo; puede requerir una silla con motor. Los SF equivalentes son combinaciones con más de 1 SF grado 4+.

8 -> Básicamente limitado a la cama, silla o silla de ruedas, pero puede estar fuera de la cama la mayor parte del día; conserva muchas funciones de autocuidado; generalmente mantiene el uso efectivo de los brazos. Los SF equivalentes habituales son combinaciones, generalmente 4+ en varios sistemas.

8.5 -> Básicamente limitado a la cama gran parte del día, tiene cierto uso efectivo de los brazos, conserva algunas funciones de autocuidado. Los SF equivalentes habituales son combinaciones, generalmente 4+ en varios sistemas.

9 -> Paciente encamado incapacitado, puede comunicarse y comer. Los SF equivalentes habitualmente son combinaciones, sobre todo grado 4+.

9.5 -> Paciente encamado incapacitado, incapaz de comunicarse de forma efectiva o comer/tragar. Los SF equivalentes habituales son combinaciones, casi todos grado 4+.

10 -> Muerte debida a EM.

Anexo III .- Criterios de McDonald de 2017.

Número de Brotes	Número de lesiones	Datos adicionales
≥ 2	≥ 2	*
≥ 2	1 (así como evidencias históricas bien definidas de un ataque previo que involucró una lesión en una ubicación anatómica distinta †)	*
≥ 2	1	DIS
1	≥ 2	DIT o BOCG positivas §
1	1	DIS y DIT o BOCG positivas §

* No se requieren pruebas adicionales para demostrar la diseminación en espacio y tiempo. Sin embargo, a menos que la RNM no sea posible, se debe obtener una RNM cerebral en todos los pacientes en quienes se está considerando el diagnóstico de esclerosis múltiple. Además, se debe considerar el examen de RNM o LCR de la médula espinal en pacientes con evidencia clínica y de RNM insuficiente que apoyan la esclerosis múltiple, con una presentación que no sea un síndrome clínico típico aislado, o con características atípicas. Si las imágenes u otras pruebas (por ejemplo, LCR) son negativas, se debe tener precaución antes de hacer un diagnóstico de esclerosis múltiple, y se deben considerar diagnósticos alternativos.

† El diagnóstico clínico basado en hallazgos clínicos objetivos de dos ataques es más seguro. La evidencia histórica razonable de un ataque pasado, en ausencia de hallazgos neurológicos objetivos documentados, puede incluir eventos históricos con síntomas y características de evolución para un ataque desmielinizante inflamatorio previo; al menos un ataque, sin embargo, debe ser respaldado por hallazgos objetivos. En ausencia de evidencia objetiva residual, se necesita precaución.

§ Véase apartado 7 de la Introducción.

Anexo IV.- Desórdenes neurológicos presentados por los pacientes de los grupos ENI y ENNI enrolados en el Objetivo 4.

ENI		ENNI	
Patología	n	Patología	n
Adrenoleucodistrofia	1	Trastorno Bipolar	1
Devic	1	Paresia de Pares Craneales	1
Multirradiculopatía Disinmune	1	Pelizaeus-Merzbacher	1
Vasculitis SNC	1	HIC	6
Keratitis Herpética	1	Paraparesia Espástica	1
Migraña + Lesiones Desmielinizantes	1	Hematoma Cerebral + Espasticidad	1
EA	1	Síndrome del Túnel Carpiano	1
Fibromialgia +Raynaud	1	Polineuropatía Sensitivo-Motora	1
Neuropatía Funcional + VIH + PTI	1	Hidrocefalia	1
Whipple	1	Aneurisma Cerebral	1
LMP + Uveitis	1		
Leucoencefalopatía VIH	1		
Ataxia Espinocerebelosa + Parkinsonismo	1		
Pars Planitis	1		

EA: Encefalitis Autoinmune; HIC: Hipertensión Intracraneal; LMP: Leucoencefalopatía Multifocal Progresiva; PTI: Púrpura Trombocitopénica Inmune; SNC: Sistema Nervioso Central.

Que esta contribución sea recibida con el mismo deleite con el que fue creada.

Fin.