



VNIVERSITAT
E VALÈNCIA

TESIS DOCTORAL EN NEUROCIENCIAS

Inmunidad Innata en Esclerosis Múltiple Progresiva: Papel de la Chitinase 3-like 1

PRESENTADA POR:

LAURA CUBAS NÚÑEZ

Graduada en Bioquímica y Ciencias Biomédicas

BAJO LA DIRECCIÓN DE:

Dra. SARA GARCIA GIL-PEROTÍN

Dr. BONAVENTURA CASANOVA ESTRUCH

Valencia, Septiembre de 2020

“Si no escalas la montaña, jamás podrás disfrutar del paisaje”

Pablo Neruda

AGRADECIMIENTOS

A mis directores, Bonaventura y Sara, por haberme permitido hacer esta tesis doctoral en la Unidad de Neuroinmunología Central del Hospital La Fe. Gracias por confiar en mí y enseñarme todo lo que sé sobre la Neuroinmunología. Bonaventura, gracias por formar un grupo humilde, lleno de ilusión, en el que el trabajo se hace de corazón, por y para los que lo necesitan (también por organizar salidas a la montaña). Sara, gracias por tu apoyo y guía desde las prácticas de grado hasta hoy, y tu gran ayuda en el desarrollo de la tesis.

Al Profesor Lassmann y a su equipo, por acogerme amablemente en su laboratorio en dos ocasiones y enseñarme sobre patología en esclerosis múltiple.

A Jessica, mi compañera de batalla en el laboratorio, una amiga y consejera, por estar siempre ahí para lo bueno y para lo menos bueno, siempre con una sonrisa.

A Raquel, el nuevo fichaje de laboratorio, por su apoyo, ayuda y correcciones en los últimos momentos de la tesis.

A Sara, la ingeniera que en realidad es coordinadora del grupo, por escucharme, aconsejarme y apoyarme en todo lo que he necesitado. Siempre sabremos que nuestra vocación es organizar eventos.

A Bea, Mati, Carmen y Paco, por contribuir al buen ambiente del grupo, trabajando con ilusión y dedicación, todos son un ejemplo a seguir. Carmen, gracias por tu ayuda con los trámites del depósito.

A mis vecinos de la Torre A, Javi, Álvaro, Inma y Roger, por compartir mis altibajos en esta etapa y hacerme reír cada día, entre almuercitos y planes para cuando nos toque la lotería. Y también cerquita, a Cristian, por su salero y alegría dando ánimos.

A mi compañero de vida, Juan, por creer que puedo con todo. Tu apoyo, respeto y admiración por lo que hago me motivan a seguir.

A mi patrulla canina, Cairo y Lluvia, por acompañarme mientras escribía, aunque alguna pata se haya colado en el teclado de vez en cuando.

A mi familia, porque aunque no todos entendíais lo que era una tesis, me habéis animado a hacerla desde el principio. En especial, agradezco a mis padres y mi hermana, su apoyo en cualquier cosa que me proponga y que hayan contribuido humildemente a que llegue hasta este nivel de formación.

ÍNDICE

ABREVIATURAS	15
1. INTRODUCCIÓN	21
1.1. Definición de Esclerosis Múltiple	23
1.2. Etiología de la EM	23
1.3. Patogenia de la EM	24
1.3.1. Inmunidad innata	25
1.3.2. Inmunidad adaptativa	26
1.3.3. Papel de la inmunidad en la EM	28
1.4. Clínica. Historia natural de la EM	30
1.5. Anatomía patológica	31
1.6. Diagnóstico	33
1.7. Biomarcadores en Esclerosis múltiple	35
1.7.1. Biomarcadores de imagen	35
1.7.2. Biomarcadores biológicos	37
1.7.3. Chitinase 3-like 1	41
1.8. Tratamiento de la EM	43
1.9. Otras enfermedades desmielinizantes y diagnóstico diferencial con la EM	44
1.9.1. Neuromielitis óptica	44
1.9.2. Encefalomiелitis aguda diseminada	45
2. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS	47
3. MATERIAL Y MÉTODOS	51
3.1. Diseño del estudio	53
3.2. Metodología de los objetivos 1 y 2A	55
3.2.1. Selección de pacientes y muestras	55
3.2.2. Criterios diagnósticos	55
3.2.3. Tratamiento	58
3.2.4. Cuantificación de biomarcadores en suero y LCR	58
3.2.5. Adquisición y análisis de imagen por RM	60
3.2.6. Otros test	60
3.2.7. Análisis estadístico	60
3.3. Metodología del objetivo 2B: Estudio de expresión de CHI3L1	62

3.3.1. Selección de pacientes y muestras	62
3.3.2. Inmunohistoquímica	62
3.3.3. Cuantificación de CHI3L1 en diferentes tipos celulares.....	64
3.3.4. Cuantificación de expresión de CHI3L1 mediante densitometría digital óptica	65
3.3.5. Correlación de expresión de CHI3L1 con inflamación meníngea o perivascular	66
3.3.6. Análisis estadístico.....	67
4. RESULTADOS	69
RESULTADOS DEL OBJETIVO 1:	
Estudio de CHI3L1 en LCR y suero en EM y valor combinado con NfL para el diagnóstico de fenotipos clínicos	71
4.1.1. Niveles de CHI3L1 _{LCR} y NfL _{LCR} en EM y relación con la actividad inflamatoria responsable de brotes	73
4.1.2. Relación de CHI3L1 _{LCR} y NfL _{LCR} con la actividad radiológica y la localización de las lesiones.....	73
4.1.3. Correlación de los niveles de CHI3L1 _{LCR} y NfL _{LCR} con otras variables clínicas	75
4.1.4. Correlación entre la discapacidad neurológica y los niveles de CHI3L1 _{LCR} y NfL _{LCR} en el momento de la punción lumbar en EM	76
4.1.5. Valor de la medición combinada de los niveles de NfL _{LCR} y CHI3L1 _{LCR} en el pronóstico de la progresión y en la estratificación de la EM en los distintos subtipos	78
4.1.6. Grado de correlación entre los niveles de CHI3L1 en suero y en LCR en EM	81
RESULTADOS DEL OBJETIVO 2:	
Estudio comparativo de CHI3L1 en EM y otras enfermedades desmielinizantes	83
4.2.1. Niveles de CHI3L1 _{LCR} en diferentes enfermedades desmielinizantes.....	85
4.2.2. Correlación clínico-patológica de la expresión de CHI3L1 en muestras de EM y enfermedades desmielinizantes no progresivas.....	85
5. DISCUSIÓN.....	95
6. CONCLUSIONES FINALES.....	105
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	109
ANEXOS	125
Protocolos.....	127
Cuantificación de la cadena ligera de neurofilamento mediante ELISA.....	129

Cuantificación de Chitinase 3-like 1 mediante ELISA	131
Inmunohistoquímica	133
Inmunofluorescencia doble	134
Tinción con hematoxilina.....	137
Tinción de mielina <i>luxol fast blue</i>	139
Recuentos celulares usando Adobe Photoshop.....	140
Cuantificación de expresión mediante densitometría digital óptica	141
Publicaciones	143

ABREVIATURAS

Act: Activa

AMCase: Quitinasa ácida de mamíferos

ANCOVA: Análisis de Covarianza

APP: Proteína Precursora Amiloide

AQP4: Aquaporina 4

ARN: Ácido Ribonucleico

ASCT: del inglés *Autologous Stem Cell Transplantation* (Trasplante autólogo de células madre)

CPA: Célula Presentadora de Antígeno

BHE: Barrera Hematoencefálica

BOC: Bandas Oligoclonales

BOC-IgG: Bandas Oligoclonales de tipo IgG

BOC-IgM: Bandas Oligoclonales de tipo IgM

BOPMS: del inglés *"Bout Onset Progressive Multiple Sclerosis"* (EMP de inicio a brotes)

CHI3L1: Chitinase 3-like 1

CHI3L1_{LCR}: Chitinase 3-like 1 en líquido cefalorraquídeo

CHIT1: Quitotriosidasa

CMH: Complejo Mayor de Histocompatibilidad

CPA: Célula Presentadora de Antígeno

CTRL: Control

DAB: Diaminobencidina

DIS: del inglés *"Dissemination In Space"* (Diseminación en espacio)

DIT: del inglés *"Dissemination In Time"* (Diseminación en tiempo)

DO: Densitometría digital óptica

EA: Lesión activa temprana

EAD: Encefalomiелitis Aguda Diseminada

EAE: Encefalomiелitis Aguda Experimental

EDSS: del inglés *"Expanded Disability Status Scale"* (Escala expandida de discapacidad)

ELA: Esclerosis Lateral Amiotrófica

ELISA: del inglés *"Enzyme Linked Immunosorbent Assay"* (Ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas)

EM: Esclerosis Múltiple

EMA: Esclerosis Múltiple Aguda

EMCD: Esclerosis Múltiple Clínicamente Definida

EMP: Esclerosis Múltiple Progresiva

EMPP: Esclerosis Múltiple Primaria Progresiva

EMRR: Esclerosis Múltiple Remitente Recurrente

EMSP: Esclerosis múltiple Secundaria Progresiva

FCS: *Fetal Calf Serum* (Suero de ternera fetal)

FLAIR: del inglés "*FLuid-Attenuated Inversion Recovery*"

Gd+: Captante de gadolinio / Gadolinio positiva

GFAP: del inglés *Glial Fibrillary Acidic Protein* (Glicoproteína Fibrilar Ácida)

H: Hombre

HLA: del inglés "*Human Leukocyte Antigen*" (antígeno leucocitario humano)

HS: del inglés *Horse Serum* (Suero de caballo)

IC: Intervalo de confianza

IFN: Interferón

IFN γ : Interferón gamma

Ig: Inmunoglobulina

IL: Interleuquina

LA: Lesión Activa tardía

LCR: Líquido Cefalorraquídeo

Li: Lesión Inactiva

Log: Logaritmo

M: Mujer

MOG: del inglés *Myelin Oligodendrocyte Glycoprotein* (Glicoproteína de mielina del oligodendrocito)

MOGrd: *MOG related disorders*

NF-kB: Factor Nuclear kappa B

NfL: Cadena ligera de neurofilamento

NfL_{LCR}: Cadena ligera de neurofilamento en líquido cefalorraquídeo

NMO: Neuromielitis Óptica

NMOSD: del inglés *Neuromyelitis Optica Spectrum Disorder* (Trastorno de espectro de NMO)

PL: Punción Lumbar

PLP: Proteína Proteolípida

Q-alb: Cociente albúmina LCR/albúmina suero

RCT: Receptor de célula T

RIQ: Rango intercuartílico

RLB: Receptor de Linfocito B

RM: Resonancia Magnética

rpm: Revoluciones por minuto

SAMS: del inglés *Single Attack Multiple Sclerosis* (Esclerosis múltiple de ataque único)

SB: Sustancia Blanca

SBAN: Sustancia Blanca Aparentemente Normal

SBN: Sustancia Blanca Normal (en controles)

SCA: Síndrome Clínico Aislado

SD: del inglés *Standard Deviation* (desviación típica)

SEL: del inglés *Slow Expanding Lesion* (lesión de expansión lenta)

SG: Sustancia Gris

SGAN: Sustancia Gris de Apariencia Normal

SI: Sistema Inmune

SN: Sistema Nervioso

SNC: Sistema Nervioso Central

SRA: Síndrome Radiológico Aislado

STIR: del inglés "*Short inversion Time Inversion Recovery*"

TGF: Factor de crecimiento

Th: Linfocito T *helper* (colaborador)

TME: Tratamientos Modificadores de la Enfermedad

TNF: Factor de Necrosis Tumoral

Treg: T reguladores

vs: versus

1. INTRODUCCIÓN

1.1. Definición de Esclerosis Múltiple

La esclerosis múltiple (EM) es una enfermedad crónica de base inflamatoria y autoinmune que afecta al sistema nervioso central (SNC). Actualmente, la EM es la segunda causa más frecuente de discapacidad en adultos jóvenes, tras los accidentes de tráfico, siendo la edad habitual de inicio entre los 25 y 35 años (Kobelt et al., 2017). España es una región con prevalencia media-alta de esta enfermedad, alcanzando en la actualidad 80-180 casos por cada 100000 habitantes, y su incidencia es mayor en mujeres (Perez-Carmona et al., 2019). Además, es la enfermedad autoinmune crónica de afectación neurológica más frecuente en países desarrollados (Kobelt et al., 2017; Noseworthy et al., 2000; Pugliatti et al., 2006).

El SNC está constituido por el encéfalo (cerebro, troncoencéfalo y cerebelo) y la médula espinal y sus funciones principales son percibir estímulos de la periferia y del propio organismo, integrar y procesar dicha información y elaborar respuestas que permitan controlar las funciones corporales y relacionarnos con el entorno. Este procesamiento tiene lugar en los somas de las células especializadas del SNC o neuronas, y la información se envía a través de axones, prolongaciones nerviosas que están cubiertas por una vaina lipídica o mielina, cuya función es aislar y optimizar la transmisión nerviosa. En la EM, un mal funcionamiento del sistema inmunológico desencadena la destrucción de la mielina causando alteraciones en la transmisión nerviosa y originando la aparición de una serie de síntomas de diversa índole: fatiga, trastornos visuales, alteración sensitiva o motora, pérdida de equilibrio y/o coordinación, disfunción de esfínteres y del tránsito intestinal... por los que recibe el nombre popular de “la enfermedad de las mil caras”.

1.2. Etiología de la EM

A día de hoy, la causa de la EM es todavía desconocida. Lo que se sabe es que se trata de una enfermedad de carácter multifactorial influenciada por factores genéticos y medioambientales.

Estudios realizados en gemelos y hermanos sugieren que los factores genéticos aumentan la susceptibilidad de padecer la enfermedad (Hafler, 2004). Se han detectado variantes polimórficas en algunos genes de la región del complejo mayor de histocompatibilidad (CMH), que podrían estar relacionadas, en concreto el alelo HLADR-B1*15:01, con más prevalencia en casos de EM (Dyment et al., 2004; Ebers, 2013; Sawcer and

Hellenthal, 2011). Si atendemos a los factores ambientales, el virus Epstein Barr es el agente infeccioso más relacionado con esta patología (Almohmeed et al., 2013; Guan et al., 2019).

Numerosos estudios han demostrado que niveles bajos de vitamina D están relacionados con enfermedades autoinmunes, de ahí la influencia de la latitud en la EM y la mayor incidencia en países del hemisferio norte, con menos horas de luz solar (Handel et al., 2010). Además, estudios recientes han implicado a la microbiota intestinal como posible reguladora de la integridad en la barrera hematoencefálica (BHE), que podría regular el paso de células del sistema inmune (SI) al SNC en determinadas condiciones (Braniste et al., 2014; Michel and Prat, 2016).

Por último, otro factor externo como el tabaco está relacionado con aumento de susceptibilidad a padecer EM y también puede alterar el curso de la enfermedad si está ya establecida (Handel et al., 2010).

1.3. Patogenia de la EM

En el SNC, las células se disponen dando lugar a dos formaciones: la sustancia gris (SG), formada por el soma de las neuronas, dendritas y fibras amielínicas, y la sustancia blanca (SB), formada por los axones, envueltos en las vainas de mielina.

Como hemos comentado, en la EM se daña el recubrimiento de mielina de los axones, provocando la aparición de lesiones desmielinizantes conocidas como “placas” en la SB. Sin embargo, hace décadas que se reconoce la presencia de lesiones en la SG y la pérdida neuronal progresiva asociada a atrofia cerebral, sobre todo en fases más avanzadas de la enfermedad (Babinski J., 1885; Wegner et al., 2006). La neurodegeneración puede detectarse incluso en axones aún mielinizados y constituye un fenómeno que parece presente ya desde el momento del diagnóstico clínico y se perpetúa con el tiempo (Absinta et al., 2015; Fraenkel and Jakob, 1913). Asimismo, se ha visto que en la periferia de las lesiones el tejido aparentemente normal puede presentar signos histológicos de inflamación que las técnicas de imagen actuales no son capaces de detectar; en este caso, hablamos de sustancia blanca de apariencia normal (SBAN) o sustancia gris de apariencia normal (SGAN).

Aunque la fisiopatología de la EM no es del todo conocida, se sabe que el SI está involucrado. A este respecto, existen dos grandes tipos de respuesta inmunitaria: a) la inmunidad innata, a priori más inespecífica, presente en el organismo de forma natural, que

sirve como un primer freno al ataque de los microorganismos y, b) la inmunidad adaptativa, orquestada por los linfocitos, más específica y con memoria, necesaria para defendernos de ataques repetidos del mismo microorganismo.

1.3.1. Inmunidad innata

La respuesta inmune innata desempeña un papel importante tanto en el inicio como en la progresión de la EM, modulando la activación de los linfocitos T y B. Cuando un antígeno (molécula considerada extraña por el organismo) es detectado por las células dendríticas, las células presentadoras de antígeno (CPA) por excelencia, lo fagocitan, lo procesan en su interior y exponen parte del mismo en su membrana asociado al CMH, que puede ser de clase I o II. Esa asociación CPA-CMH-antígeno se presenta al receptor de los linfocitos T (RCT) *naïve*, formando el complejo trimolecular o “*cleft*” inmunológico, y estimula su diferenciación a los diferentes tipos de linfocitos, activando así la respuesta inmune adaptativa.

La presentación de antígenos también puede llevarse a cabo por monocitos, macrófagos y microglía ubicados en el SNC. La microglía forma parte de la glía residente del SNC, y es una célula con capacidad fagocitaria y de soporte encargada de la vigilancia inmunológica. La microglía activada tiene dos estadios: uno proinflamatorio (M1), en el que se producen citoquinas que promueven la inflamación para combatir el daño o infección, y otro antiinflamatorio (M2), en el que se secretan citoquinas que facilitan la fagocitosis de restos celulares y la reparación tisular. En la EM, la microglía adopta un fenotipo activado y recluta células de la inmunidad adaptativa. Además, participa en el proceso de desmielinización, fagocitando la mielina (Chu et al., 2018; Grajchen et al., 2018). Se desconoce si la fagocitosis de la mielina tiene una función neuroprotectora, de limpieza de restos tras la desmielinización, o bien si fagocitan mielina intacta y la presentan a los linfocitos T causando una perpetuación local de la inflamación.

Otra célula glial, la más abundante, el astrocito, al que se le ha atribuido históricamente un papel de soporte trófico en el SNC, se ha visto que puede tener un papel relevante en la neuroinflamación, incluyendo la patogenia de la EM. Inicialmente se pensaba que el astrocito reactivo tenía como función formar una “cicatriz” en la zona de lesión, pero actualmente se sabe que participan activamente en la formación de las lesiones y en el reclutamiento de células del SI periférico al SNC (Horng et al., 2017; Ponath et al., 2018). Además, estudios funcionales en astrocitos de ratón han mostrado que, tras activarlos con IFN γ , son capaces de actuar como CPA débiles activando, aunque moderadamente, a los

linfocitos T CD4+ y CD8+ (Weber et al., 1994) y liberando factores proinflamatorios como BAFF, IL-6 e IL-15 que promueven la supervivencia de las células B (Krumbholz et al., 2005; Michel et al., 2015).

1.3.2. Inmunidad adaptativa

Dentro de la respuesta inmune adaptativa, se identifican dos tipos de inmunidad: la inmunidad celular (mediada por linfocitos T) y la inmunidad humoral (mediada por linfocitos B).

Inmunidad celular

Una vez las CPA presentan el complejo antígeno-CMH a los linfocitos se produce una activación inicial de los linfocitos T en los órganos linfáticos secundarios, donde se encuentran con las CPA atraídos por quimiocinas específicas. En primer lugar, el linfocito T, a través de su receptor, RCT, reconoce el péptido antigénico. A continuación, se estabiliza la unión CPA-linfocito con ayuda de integrinas. Por último, se produce una cascada de señales activadoras desde el RCT, que es estimulada por correceptores presentes en el linfocito T, como CD3, CD4 y CD8, que contribuyen también a hacer más resistente la adhesión a la CPA. Existen coestimuladores que potencian la transmisión de la señal, como B7, que permite que se active el linfocito T y produzca IL-2 favoreciendo la proliferación y la expansión clonal. En definitiva, se construye una sinapsis inmunitaria formada por el CMH, el péptido antigénico y el RCT que hace que la señal se potencie y se transmita hacia el linfocito T.

Dependiendo de las citoquinas que liberen las CPA, los linfocitos T CD4+ *naïve* se activan dando lugar a distintas subpoblaciones de células T colaboradoras (*Th=helper*): células Th1, Th2, Th9, Th17 y T reguladoras (Treg) (Zhu et al., 2010). Las células Th1 liberan citoquinas proinflamatorias (IFN γ , TNF α , IL-2) que estimulan la inflamación local y activan a los macrófagos, optimizando su función como CPA. Las células Th2 secretan citoquinas antiinflamatorias (IL-4, IL-5, IL-13) implicadas en respuestas a patógenos extracelulares. Las células Th9 producen IL-9, inhiben la apoptosis y también se implican en la respuesta a patógenos extracelulares. Las células Th17 producen IL-17A, IL-17F, IL-21 e IL-22 que promueven la inflamación aumentando la expresión de moléculas de adhesión y reclutamiento de neutrófilos. Los linfocitos Treg producen citoquinas antiinflamatorias (IL-10, TGF- β) y su función principal es la prevención de la autoinmunidad, suprimiendo o disminuyendo la función de otros linfocitos T proinflamatorios (Haynes et al., 2019). Paralelamente, se produce la activación de otro tipo de células inmunitarias, los linfocitos T citotóxicos o CD8+, con funciones efectoras de la inmunidad celular. Los linfocitos T CD8+ *naïve* pueden ser activados

de diferentes maneras. Una forma de activación consiste en la expresión de B7 en la membrana de las CPA, bien motivada por una infección viral o bien por la interacción con los linfocitos T CD4+. También pueden activarse por la liberación de IL-2 por parte del linfocito T CD4+ directamente al linfocito T CD8+ (Peter Parham, 2006). Estas células producen citoquinas y quimiocinas para neutralizar de forma directa a las células infectadas mediante la liberación de sustancias como granzimas y perforinas que lisan la membrana de la célula diana. Los linfocitos T CD8+ son activados por los antígenos presentados por el CMH de tipo I. En condiciones normales, apenas hay linfocitos CD8+ ni se expresa el CMH de tipo I, pero en ambientes inflamatorios aumenta su expresión (Höftberger et al., 2004; Sinha et al., 2014) (Figura 1).

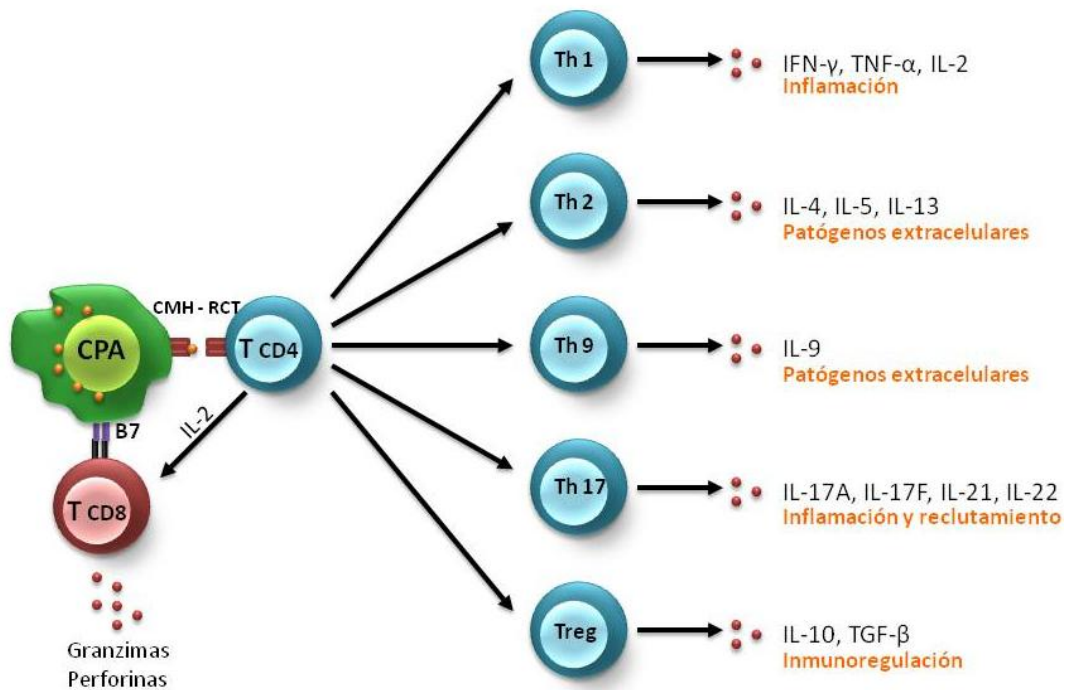


Figura 1. Inmunidad celular mediada por células T. Diferenciación de células T CD4+ *naïve* en diferentes subpoblaciones de células Th (Th1, Th2, Th9, Th17 y Treg). Estas células producen unas citoquinas determinadas implicadas en diferentes funciones en la respuesta inmunitaria. Los linfocitos T CD8+ pueden ser activados por la expresión de B7 en la CPA o por la secreción de IL-2 por parte del linfocito T CD4+, activando la producción de proteínas que participan en lisis celular.

CPA: Célula Presentadora de Antígeno; CMH: Complejo Mayor de Histocompatibilidad; RCT: Receptor de Célula T; Th: Linfocito T colaborador ("helper"); IL: Interleuquina; TNF: Factor de necrosis tumoral; IFN: Interferón; TGF: Factor de crecimiento.

Inmunidad humoral

La respuesta humoral se inicia con la interacción entre el antígeno presentado por el CMH y la IgM o la IgD expresadas en la membrana de un linfocito B *naïve*. Esta unión, junto con las proteínas Ig α e Ig β que se expresan en el linfocito B, da lugar al complejo RLB (acrónimo de Receptor de Linfocito B). La activación del linfocito B hace que produzca anticuerpos, que pueden ser IgM e IgD o incluso otros diferentes (IgA, IgE, IgG) mediante el proceso de conmutación de isotipos, que consiste en recombinar la región VDJ de los genes de inmunoglobulinas, determinando así la expresión de un tipo de Ig concreto.

Las células B pueden activarse de forma independiente de los linfocitos T (solo con la unión al antígeno de la CPA) o dependiente de los mismos. La activación dependiente de células T ocurre con antígenos proteicos que la célula B interioriza y presenta a través del CMH de tipo II. Tras la unión receptor-antígeno, la célula T expresa CD40L que se une al receptor CD40 en la célula B, la interacción se estabiliza y la célula T libera citoquinas que promueven la proliferación y diferenciación de la célula B.

Una vez activados, los linfocitos B pueden diferenciarse en plasmablastos, células plasmáticas de vida corta, que abandonan los folículos para dar respuesta rápida a un agente extraño, principalmente produciendo anticuerpos tempranos (IgM) (MacLennan et al., 2003; Nutt et al., 2015). Otros linfocitos B dan lugar a centroblastos que permanecen en los centros germinales, donde se produce la conmutación de isotipos y la hipermutación somática, proceso de mutación programada que afecta a las regiones variables de los genes de inmunoglobulina y que permite generar diferentes receptores para reconocer y dar respuesta a la diversidad de antígenos que pueda aparecer. Posteriormente, aparecen las células plasmáticas y los linfocitos B memoria, capaces de producir anticuerpos durante largo tiempo tras la exposición al antígeno inicial. Las primeras abandonan los centros germinales y migran a la médula ósea para residir allí incluso de forma indefinida, mientras que las segundas circulan por todo el organismo para garantizar una respuesta más inmediata (Shlomchik and Weisel, 2012).

1.3.3. Papel de la inmunidad en la EM

Inmunidad celular en EM: Autoinmunidad y linfocitos autorreactivos

El SI debe protegernos no solamente de los agentes externos, sino también de los componentes del organismo cuando éstos se encuentran alterados, como es el caso de las

células cancerígenas. Por ello, requiere de un complejo mecanismo de reconocimiento y presentación de antígeno que le permita discriminar entre lo propio sano y lo propio “dañado”, fenómeno que se conoce como tolerancia inmunológica. Si el receptor de un linfocito inmaduro reconoce un antígeno propio con alta afinidad, es destruido mediante muerte celular programada o apoptosis antes de madurar y salir a la circulación. En el proceso de formación de linfocitos T en el timo algunos linfocitos T CD4+ autorreactivos reconocen antígenos propios y no son eliminados, sino que se diferencian en linfocitos Treg, que se encargarán de suprimir o inactivar las respuestas autoinmunes (Matzinger, 1994).

En pacientes con enfermedades autoinmunes como la EM, los linfocitos Treg son disfuncionales y no se produce correctamente la tolerancia inmunológica, permitiendo la maduración de linfocitos autorreactivos y su liberación a la circulación. Asimismo, los linfocitos Th17, con una función opuesta a la de los Treg, favorecen el desarrollo de inflamación y autoinmunidad. Además, se ha visto que los linfocitos Th17 promueven la disrupción de la BHE y la atraviesan de forma más eficiente que el resto de células T (Kebir et al., 2007). Tanto los linfocitos Th17 como los Treg comparten una vía de señalización mediada por TGF- β , pero es la presencia o no de citoquinas proinflamatorias la que condiciona que los linfocitos T CD4+ *naïve* se diferencien en uno u otro tipo celular (Lee, 2018).

Inmunidad humoral en EM

La inmunidad adaptativa se ha relacionado con el desarrollo de los brotes en EM (Podbielska et al., 2018). A pesar de que se creía que el papel de los linfocitos B estaba restringido a la producción de anticuerpos, en el desarrollo de la EM se ha visto que, además, aumenta su número en las lesiones y en el líquido cefalorraquídeo (LCR) como consecuencia de su expansión clonal y presentan mayor grado de hipermutaciones somáticas. Su diferenciación a células plasmáticas les permite secretar anticuerpos dando lugar a las bandas oligoclonales (BOC) de tipo IgG que se observan en el LCR de la gran mayoría de pacientes con EM (Freedman et al., 2005; Wekerle, 2017). Sin embargo, aunque las BOC apoyen el diagnóstico diferencial de la EM no son específicas de esta, por lo que pueden estar presentes en otras enfermedades inflamatorias y autoinmunes. Los autoantígenos frente a los que se dirigen estos anticuerpos todavía siguen siendo desconocidos, aunque cada vez hay más datos que sugieren que se trate de lípidos de la mielina (Ho et al., 2012; Kanter et al., 2006; Quintana et al., 2008).

Además, las células B en la EM presentan una elevada producción de citoquinas proinflamatorias como la IL-6, que activa la microglía, y la IL-10, con función reguladora,

pudiendo actuar asimismo como CPA y estimulando la inmunidad innata (Staun-Ram and Miller, 2017). Todavía queda por conocer el papel de estas células en la fase de progresión de la enfermedad (Cuevas-García et al., 2018).

1.4. Clínica. Historia natural de la EM

La EM es una enfermedad heterogénea en la que suceden dos fenómenos, la inflamación y la progresión sostenida de la discapacidad. En la mayoría de los pacientes de EM predomina la presencia de episodios inflamatorios agudos, conocidos como “brotos”, con recuperación más o menos completa y en los que predomina la inflamación focal. Un brote viene definido por la aparición o empeoramiento de síntomas debido a la afectación del SNC (Lublin and Reingold, 1996; Miller et al., 2005). También puede concurrir un proceso neurodegenerativo caracterizado por la progresión constante de la discapacidad, pero sin presencia evidente de inflamación aguda o brotes. En fases inflamatorias (asociadas a brotes clínicos) de la enfermedad, se cree que el SI adaptativo (linfocito T y B) juega un papel importante, mientras que en fases progresivas, más tardías, parece que las células del SI innato cobran una mayor relevancia (Du et al., 2017; Gandhi et al., 2010; Podbielska et al., 2018).

Según se manifieste la enfermedad con brotes y/o progresión, se distinguen diferentes subtipos de EM.

La **forma clínica remitente-recurrente (EMRR)** es la más común (85-90% de los pacientes con EM) (*Figura 2*), con un curso caracterizado por brotes seguidos de una recuperación total o parcial y presencia de inflamación. Si aparecen lesiones típicas en la SB del SNC en la resonancia magnética (RM), pero la persona no presenta síntomas, hablamos de **síndrome radiológico aislado (SRA)**. Un primer episodio de brote que no cumpla los criterios diagnósticos de McDonalds 2017 se considera **síndrome clínico aislado (SCA)**. Si se cumplen los criterios para EM en el primer brote o con el seguimiento se confirma el diagnóstico de EM, pero no se presentan más brotes, hablamos de un **ataque único de EM o SAMS** (del inglés *Single Attack Multiple Sclerosis*) (Zeydan and Kantarci, 2018).

Dentro de la **esclerosis múltiple progresiva (EMP)** distinguimos: a) la forma clínica **primaria progresiva (EMPP)** que está presente en un porcentaje menor de pacientes, entre 10-15% (Tullman et al., 2004), caracterizada por progresión sostenida de la discapacidad desde el inicio y que se manifiesta con un aumento progresivo de la discapacidad (*Figura 2*) y b) la forma clínica **secundaria progresiva (EMSP)** que se inicia como una forma de EMRR

(aproximadamente un 35-40% de los casos), seguida por un periodo de neurodegeneración y progresión de la discapacidad independiente de brotes (*Figura 2*). Existe debate en cuanto si estas formas presentan neurodegeneración y progresión subclínica desde el inicio, habiéndose acuñado en estos casos el término de **formas progresivas de inicio a brotes (BOPMS**, del inglés *Bout-Onset Progressive Multiple Sclerosis*).

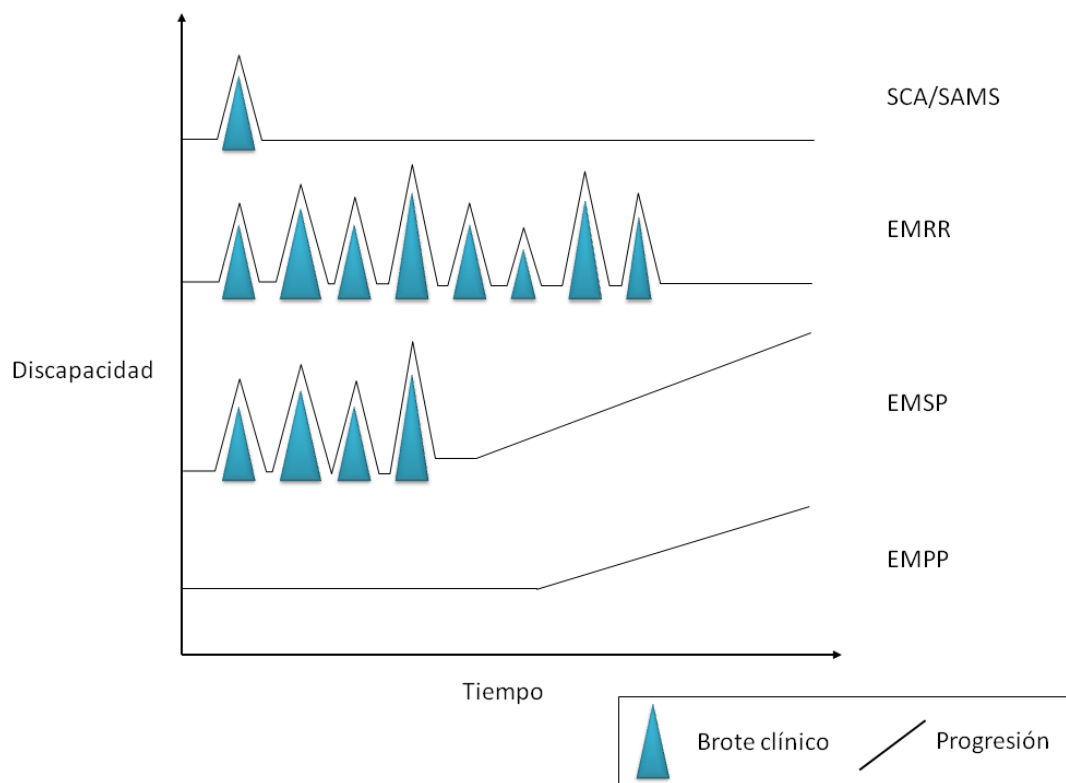


Figura 2. Diferentes fenotipos de Esclerosis múltiple.

SCA: Síndrome clínico aislado; SAMS: del inglés *Single Attack Multiple Sclerosis* (EM de ataque único); EMRR: Esclerosis Múltiple Remitente-Recurrente; EMSP: Esclerosis múltiple Secundaria Progresiva; EMPP: Esclerosis múltiple Primaria Progresiva.

1.5. Anatomía patológica

A nivel patológico, la EM se caracteriza por la pérdida de integridad de la BHE, inflamación focal, desmielinización, pérdida de oligodendrocitos y neurodegeneración (Trapp and Nave, 2008). Las lesiones o placas presentes en el SNC presentan infiltrados inflamatorios compuestos de microglía/macrófagos, astrocitos y linfocitos T y B. Se establecen cuatro tipos de lesiones según la pérdida de mielina, la geografía y extensión de las placas, los patrones de destrucción de oligodendrocitos y la activación del complemento (Lucchinetti et al., 2000):

- **Lesiones de tipo I y II:** comparten características similares. Predomina la inflamación asociada a linfocitos T y macrófagos/microglía con mielina degradada en su interior. Las placas son principalmente perivasculares. Existe pérdida de oligodendrocitos en el borde y reaparición en el centro inactivo junto con placas remielinizantes. El tipo II se diferencia del tipo I en la abundante deposición de inmunoglobulinas, sobretodo IgG, y complemento en zonas de desmielinización activa.
- **Lesiones de tipo III:** contienen infiltrados inflamatorios, compuestos por linfocitos T, macrófagos y microglía activada, pero sin deposición de IgG ni complemento. Los bordes de las placas son difusos, con pérdida de oligodendrocitos tanto en el borde activo como en el interior inactivo, sin presencia de placas de remielinización.
- **Lesiones de tipo IV:** con infiltrados inflamatorios compuestos por linfocitos T y macrófagos, distribución perivascular similar a la de los tipos I y II, sin deposición de IgG ni complemento, y muerte de oligodendrocitos tanto en el borde activo como en el centro inactivo. Están presentes exclusivamente en un subgrupo de pacientes con EMPP.

Desde el punto de vista anátomo-patológico, la patogenia de la EM se caracteriza por un aumento de linfocitos autorreactivos que atraviesan la BHE, predominando los linfocitos T CD8+ en la periferia de los vasos y, en menor medida, los T CD4+ y los linfocitos B. La proporción de linfocitos es similar en las formas EMRR y EMP, aunque en las fases progresivas el grado de inflamación linfocitaria perivascular disminuye y las lesiones presentan una mayor proporción de agregados de células B (Frischer et al., 2009). Algunos casos de EMP, presentan folículos linfoides ectópicos a nivel meníngeo, próximos a lesiones corticales. Contienen células B y, en menor proporción, células plasmáticas, linfocitos T y células dendríticas, constituyendo así una estructura similar a la de los centros germinales de los ganglios linfáticos que permite la diferenciación de células B y la producción intratecal de anticuerpos (Park and Choi, 2005; Serafini et al., 2004). Asimismo, los linfocitos B pueden actuar como CPA, activando linfocitos T, y secretar citoquinas proinflamatorias que promueven la activación del SI innato. En definitiva, la presencia de folículos meníngeos se asocia a una mayor destrucción y daño cortical, además de una progresión acelerada de la enfermedad, pero todavía se desconoce el factor que desencadena su formación (Magliozzi et al., 2007).

Hasta la fecha, se han descrito diferencias a nivel patológico entre las formas de EMRR y las formas de EMP tanto cuantitativas como cualitativas (Haider et al., 2016; Kutzelnigg et al., 2005; Lassmann, 2013; Lassmann et al., 2012). En los casos de EMRR, predominan las lesiones

clásicas activas o placas desmielinizantes focales en la SB, con gran densidad de microglía en su interior, además de una intensa inflamación linfocitaria y aumento de permeabilidad en la BHE. En las formas progresivas, sin embargo, la inflamación en la SB es más difusa y es más común que se produzca la expansión lenta de lesiones ya existentes, conocidas como SEL (del inglés "*Slow Expanding Lesions*"), que la aparición de lesiones nuevas (Frischer et al., 2015). Estas lesiones tienden a tener un centro inactivo rodeado de un borde formado por microglía activada, pero con menor densidad que en las formas activas (Prineas et al., 2001). En etapas tempranas de desmielinización y neurodegeneración, la microglía adquiere un fenotipo proinflamatorio mientras que, cuando las lesiones se tornan inactivas, su presencia se reduce significativamente y recupera su homeostasis. Aproximadamente la mitad de la microglía presente en lesiones activas es microglía residente, TMEM119+ (Zrzavy et al., 2017). En lesiones activas en ambos tipos de EM, la presencia de astrocitos activados podría deberse a un posible papel en la propagación de la inflamación y/o del daño tisular (Brosnan and Raine, 2013).

Es característica también de la EMP la presencia de lesiones desmielinizantes a nivel subcortical con un mayor grado de daño axonal irreversible (Haider et al., 2016; Kutzelnigg et al., 2005).

En la *Figura 3* se aprecia la diferencia en celularidad según el tipo de lesión y cómo se distribuyen las lesiones según el fenotipo de EM.

1.6. Diagnóstico

No existe ningún marcador de certeza para el diagnóstico de EM, por lo que el dictamen definitivo sólo se podría hacer mediante los hallazgos patológicos que definen la enfermedad. En la práctica clínica diaria el diagnóstico de EM se basa en unos criterios a partir de la combinación de los síntomas y signos clínicos característicos, junto a las lesiones típicas de RM y, recientemente, a la presencia de BOC de tipo IgG en el LCR, criterios actualizados en 2017 (Poser et al., 1983; Thompson et al., 2018). El objetivo de los criterios es documentar la diseminación en el espacio (DIS, del inglés *Dissemination In Space*) y en el tiempo (DIT, del Inglés *Dissemination In Time*) de las lesiones y nos permiten diagnosticar la EM ante el primer brote clínico típico, mejorando cada vez más la sensibilidad y especificidad (Schwenkenbecher et al., 2019; Thompson et al., 2018).

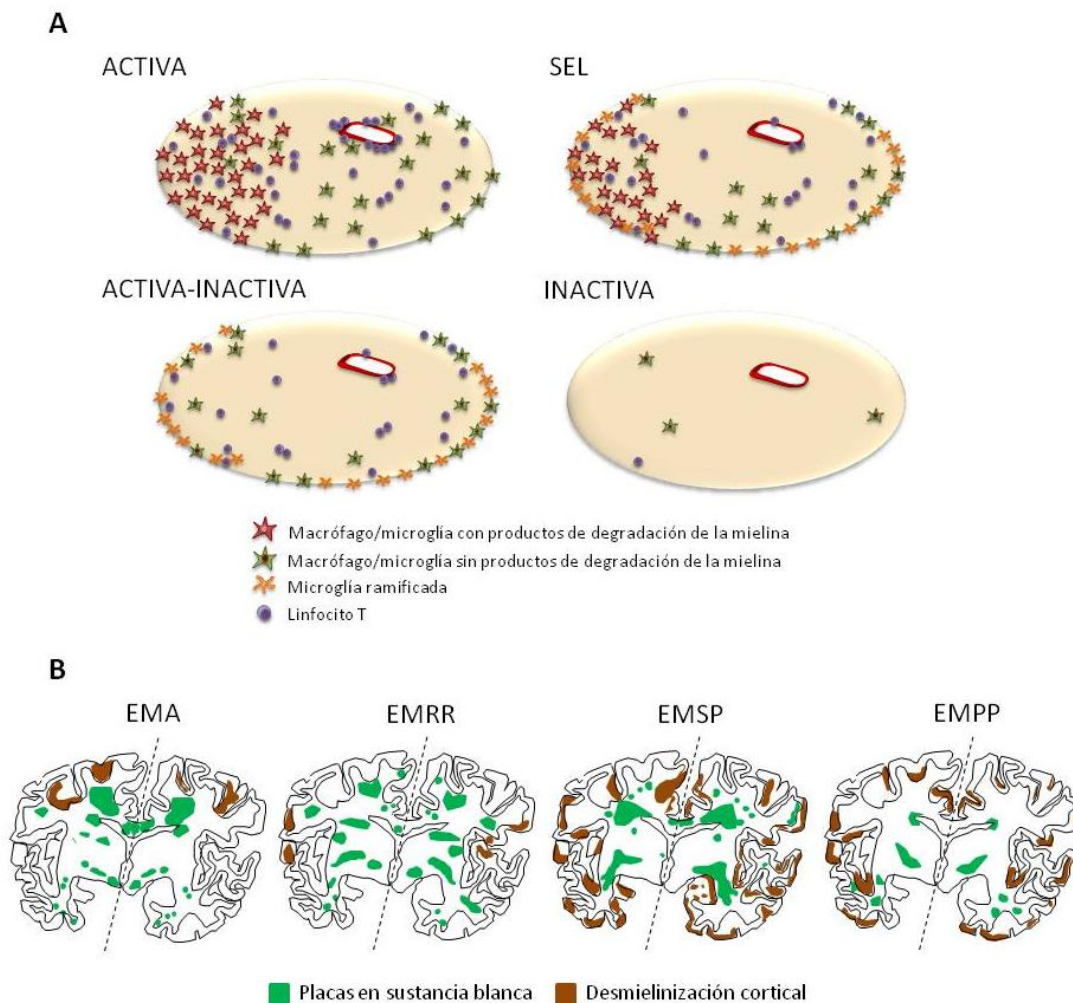


Figura 3. Características de las diferentes lesiones y su distribución según el fenotipo de EM.

A. Las lesiones activas presentan gran densidad de macrófagos/microglía en su interior, con productos de degradación de mielina, además de linfocitos. Las SEL presentan macrófagos/microglía activada en el borde de expansión y microglía ramificada en el centro inactivo. Las lesiones activas-inactivas van perdiendo celularidad y la microglía queda en reposo hasta que finalmente desaparece en las lesiones inactivas. **B.** Las formas de EM agudas y EMRR presentan predominio de lesiones focales en sustancia blanca, mientras que las formas progresivas (EMSP y EMPP), tienen una inflamación más difusa a nivel de sustancia blanca y la afectación es mayor a nivel cortical.

SEL: del inglés *Slow Expanding Lesion*; EM: Esclerosis Múltiple; EMA: Esclerosis Múltiple aguda; EMRR: Esclerosis Múltiple Remitente Recurrente; EMSP: Esclerosis Múltiple Secundaria Progresiva; EMPP: Esclerosis Múltiple Primaria Progresiva.

La DIT se puede demostrar por RM, utilizando los criterios establecidos por Montalban y cols en 2010, basándose en la aparición de, al menos, una nueva lesión o la coexistencia de lesiones que realcen gadolinio con lesiones que no, indicando un desfase temporal en la aparición de las lesiones (Polman et al., 2011). No obstante, según los criterios diagnósticos más recientes, aunque no se cumplan los criterios de DIT por RM, es suficiente la presencia de BOC en LCR (Thompson et al., 2018).

Aunque el diagnóstico de la EM usando los criterios publicados es bastante preciso, no existe una única característica clínica y/o radiológica o marcador biológico que permita el diagnóstico de la progresión y, por tanto, que informe del pronóstico de la enfermedad, sobre todo en fases precoces. En los últimos años, se han hecho algunos avances que comentamos a continuación.

1.7. Biomarcadores en Esclerosis múltiple

Un biomarcador se define como una variable que puede medirse de forma objetiva y fiable, siendo indicativa de un estado biológico normal, un estado patogénico o de respuesta a un tratamiento farmacológico (Debmalya Barh, Dipali Dhawan, 2013; Of and In, 2001).

1.7.1. Biomarcadores de imagen

Resonancia magnética

La RM constituye la herramienta más sensible para completar el diagnóstico de los pacientes con EM, y es de gran utilidad como marcador pronóstico en fases iniciales, así como a largo plazo, además de permitir evaluar la eficacia de los tratamientos actuales (Rahn et al., 2019).

Las imágenes de RM permiten ver áreas de desmielinización y establecer los criterios de DIT y DIS (Compston and Coles, 2008). En EM, las lesiones suelen localizarse a nivel yuxtacortical, infratentorial, periventricular y medular. En la *Figura 4* aparece representado un ejemplo de lesiones típicas halladas en RM, tanto en cerebro como en médula espinal.

Para detectar actividad en las lesiones, es necesario utilizar gadolinio como medio de contraste (Scheuner et al., 2008). Las secuencias en T1 con gadolinio permiten ver lesiones agudas con inflamación y ruptura de la BHE, mientras que las secuencias en T2 muestran mejor las lesiones crónicas en SB. A partir del brote inicial, se realizan controles de imagen a criterio del neurólogo.

La RM puede aportar información pronóstica. Por un lado, la localización de las lesiones en el SNC permite predecir discapacidad, pues distintos estudios confirman que las lesiones a nivel infratentorial y medular constituyen un marcador de mal pronóstico y de aumento de discapacidad a largo plazo (Filippi et al., 1994; Schwenkenbecher et al., 2019). Por otro lado, la medición de pérdida de volumen cerebral o atrofia con periodicidad anual, se ha asociado con la discapacidad a largo plazo (Kuhle et al., 2017; Popescu et al., 2013; Radue et al., 2015; Zivadinov et al., 2019), como explicaremos en el siguiente apartado.

Sin embargo, la RM tiene unos inconvenientes. Lesiones similares a las presentes en la EM pueden aparecer en otras patologías del SNC y los cambios de RM tampoco informan sobre los mecanismos patogénicos subyacentes (edema, desmielinización, inflamación, lesión axonal, remielinización o gliosis) (Barkhof, 2002). La frecuencia de realización de RM suele ser anual en los primeros años (posteriormente incluso menor) y, en consecuencia, su precisión temporal es limitada. Además, la RM no es capaz de detectar el daño en SB relacionado con la progresión de la discapacidad.

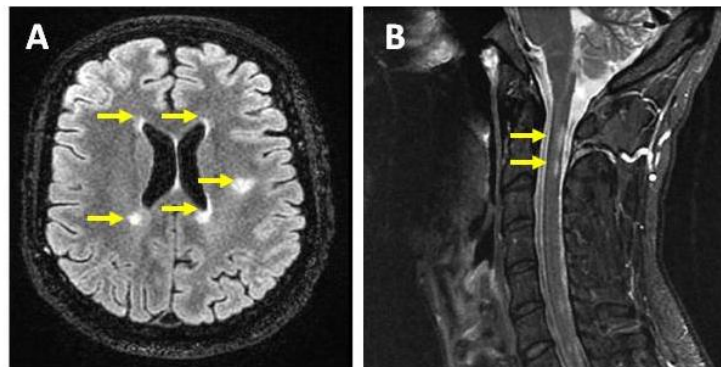


Figura 4. Lesiones típicas en RM en casos con EM. A. Imagen de RM potenciada en T2-FLAIR donde se identifican lesiones periventriculares y en parénquima cerebral (flechas) en un caso de EMRR. **B.** Lesiones focales en RM (T2-STIR) en médula a nivel cervical en un caso de EMSP (flechas).

FLAIR: FLuid-Attenuated Inversion Recovery; STIR: Short inversion Time Inversion Recovery

Atrofia cerebral y medular

En los pacientes con EM se produce una pérdida de tejido cerebral, entre el 0,5 y 1%, cada año, tanto en SB como en SG, que ocurre desde el inicio de la enfermedad en todas las formas clínicas (Filippi, 2015; Vidal-Jordana et al., 2018). Esta reducción del volumen, es más relevante atendiendo a la SG, puesto que la SB podría verse artefactada con la presencia de lesiones e inflamación (Lansley et al., 2013; Sastre-Garriga et al., 2017). Existen estudios que la relacionan con un incremento del riesgo de sufrir otro brote y, en los casos de SCA, con riesgo de conversión a EM (De Stefano et al., 2010; Sastre-garriga et al., 2005; Vidal-Jordana et al., 2016). Se ha asociado, además, con un mayor riesgo de aumento de la discapacidad, medida mediante la escala EDSS (del inglés *Expanded Disability Status Scale*), durante el primer año tras el primer brote (Dalton et al., 2004; Perez-Miralles et al., 2013), así como en años sucesivos (Di Filippo et al., 2010; Jacobsen et al., 2014; Ri et al., 2015), por lo que se convierte en una herramienta de pronóstico informativa de la discapacidad futura (Popescu et al., 2013).

Asimismo, las medidas de atrofia medular, sobre todo a nivel cervical, también se relacionan con el aumento de la discapacidad en los pacientes con EM, incluso de forma más notable que la atrofia cerebral, con una pérdida aproximada del 1,78% anual que se acentúa por encima del 2% en las formas progresivas (Bernitsas et al., 2015; Casserly et al., 2018). A pesar de que en la actualidad los mecanismos de medición son más heterogéneos que para la atrofia cerebral, en un futuro constituirá una herramienta útil que ayudará a predecir la discapacidad.

Otros marcadores de imagen

La utilización de secuencias especiales en la RM puede permitir detectar los folículos meníngicos (Magliozzi et al., 2007), característicos de las formas progresivas de la enfermedad (Kutzelnigg et al., 2005). Estas estructuras a nivel cortical contribuyen a que se alargue en el tiempo la respuesta inmunitaria y se perpetúe la degeneración cortical, que suele ocurrir de forma más difusa que las lesiones desmielinizantes de la SB (Kawachi and Lassmann, 2017; Magliozzi et al., 2010). Además, se ha demostrado la correlación de los folículos meníngicos con el deterioro cognitivo, la atrofia cerebral y la progresión de la discapacidad (Mitsdoerffer and Peters, 2016).

1.7.2. Biomarcadores biológicos

El LCR es en la actualidad la principal fuente de búsqueda de biomarcadores en EM debido a que se encuentra íntimamente ligado al SNC. Constituye el 10% del volumen intracraneal y se encarga de proporcionar protección y nutrición al SNC y transportar sustancias del metabolismo cerebral (Brodbeck A, 2010). Las proteínas que encontramos en el LCR y están ausentes o en baja concentración en la sangre, se consideran de síntesis intratecal y aportan información de lo que sucede directamente en el SNC.

Influencia de las barreras

En el SNC, debe haber un control preciso del movimiento de sustancias hacia dentro y hacia fuera, lo que se logra mediante compartimentos y barreras que controlan el flujo de sustancias selectivamente. Las dos principales son la BHE, que separa el flujo sanguíneo del tejido cerebral, y la barrera sangre-LCR, que se sitúa entre la sangre y el compartimento del LCR. La barrera sangre-LCR es 10 veces más permeable que la BHE y se localiza a nivel de los plexos coroideos y meninges, mientras que la BHE se encuentra en todo el epitelio vascular del SNC

(Engelhardt and Sorokin, 2009; Obermeier et al., 2016). Los componentes de cada barrera aparecen reflejados en la *Figura 5*.

Una de las formas de calcular la permeabilidad de la BHE es la determinación del cociente de albúmina (Q-alb), que se calcula dividiendo la concentración de la albúmina en LCR entre la del suero (Felgenhauer et al., 1976). La albúmina es una proteína que solo se produce en el hígado y puede detectarse en sangre, por lo que su presencia en LCR indica una disrupción en la BHE. A mayor disrupción de la barrera, mayor valor de Qalb.

Se debe tener en cuenta la integridad de estas barreras pues condiciona la distribución de los biomarcadores medidos y permite conocer aquellos que son de síntesis intratecal.

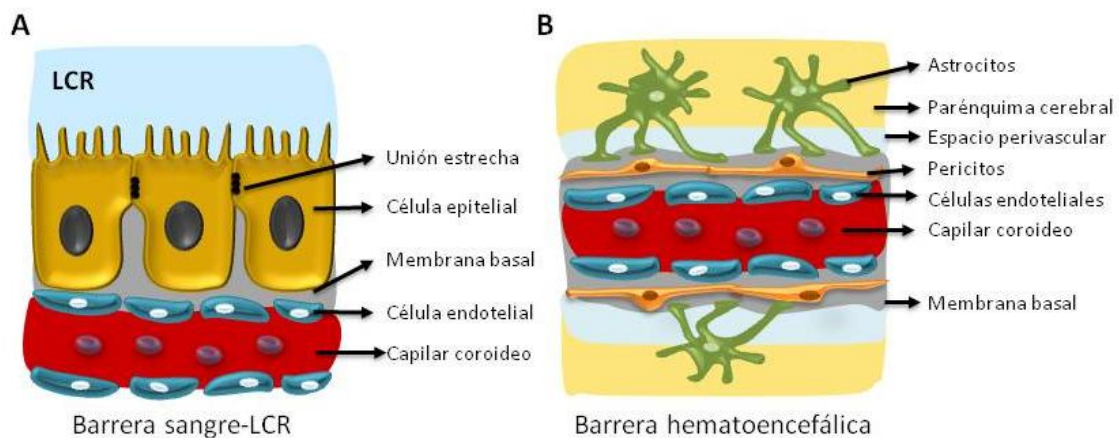


Figura 5. Barreras sangre-LCR y barrera hematoencefálica. **A.** La barrera sangre-LCR se encuentra en los plexos coroideos de los ventrículos separando el parénquima cerebral del LCR. **B.** La barrera hematoencefálica está formada por los vasos sanguíneos pequeños que se infiltran en el parénquima cerebral. La componen los pies de los astrocitos, los pericitos, la membrana basal y las células endoteliales.

Bandas oligoclonales

Las bandas oligoclonales (BOC) de tipo IgG en el LCR fueron el primer biomarcador descrito en pacientes con EM (Kostulas et al., 1987). Un porcentaje superior al 90% de los pacientes con EM presentan síntesis intratecal de la inmunoglobulina IgG (Alvarez-Cermeno and Villar, 2013). Además, su presencia en LCR y ausencia en suero indica un alto valor diagnóstico de EM y un mayor riesgo de conversión de SCA a EM clínicamente definida (EMCD) (Giannetti et al., 2014; Link and Huang, 2006). No obstante, aunque este marcador no es exclusivo de EM, es decir, está presente en otras patologías, sirve de ayuda para el diagnóstico y forma parte de los criterios de DIT de la última actualización (Thompson et al., 2018).

El cálculo del índice IgG: $[\text{IgG}(\text{LCR}) / \text{IgG}(\text{suero})] / [\text{albúmina}(\text{LCR}) / \text{albúmina}(\text{suero})]$, permite cuantificar alteraciones en la permeabilidad de la BHE y sus valores se encuentran elevados en un 80% de los pacientes con EM en la fase de brote o actividad inflamatoria (Brettschneider et al., 2005; Felgenhauer et al., 1976).

Existe otro tipo de BOC presente en el LCR de algunos pacientes de EM (40%), las de tipo IgM (BOC-IgM). Constituyen un marcador desfavorable que indica un curso más agresivo de la enfermedad. En EMRR, la presencia de BOC-IgM en LCR se ha asociado con mayor carga lesional en RM, más lesiones captantes de gadolinio, alta tasa de brote, peor respuesta a tratamiento estándar (interferón, IFN), más discapacidad neurológica y mayor pérdida de volumen cerebral en el tiempo. También se ha relacionado con riesgo de conversión a EMSP y ayuda a identificar a un grupo de pacientes con EMPP con un fenotipo más inflamatorio (Bosca et al., 2010; Magraner et al., 2012; Ozakbas et al., 2017; Villar et al., 2005, 2003, 2002). Algunas BOC-IgM reconocen lípidos de la mielina, siendo la fosfatidilcolina el antígeno más común.

Cadena ligera de neurofilamento

Los neurofilamentos son proteínas fibrosas de la familia de los filamentos intermedios que forman parte del citoesqueleto de las neuronas, concentrándose en los axones, con función de dar soporte estructural. Están formados por tres subunidades: la cadena ligera de neurofilamento (NfL), el neurofilamento intermedio (NfM) y el neurofilamento pesado (NfH), nomenclatura que hace referencia al peso molecular de cada proteína (Lycke et al., 1998). Cuando las neuronas sufren un daño, los neurofilamentos se liberan al LCR y pueden utilizarse para la detección y monitorización del daño axonal y muerte neuronal. El subtipo más estudiado en este contexto es el NfL que, aunque no sea un biomarcador específico de una enfermedad en concreto, se encuentra elevado en plasma y LCR en numerosas enfermedades neurológicas (Abdo et al., 2006; Blennow et al., 2010), e incluso alcanza valores de uno o dos órdenes de magnitud mayores en enfermedades de base neurodegenerativa pura como la enfermedad de Alzheimer o la Esclerosis lateral amiotrófica (ELA) (Gaiottino et al., 2013).

En la EM, la presencia de NfL en LCR (NfL_{LCR}) y suero constituye un biomarcador de actividad inflamatoria, pues aumenta durante los brotes clínicos (Sellebjerg et al., 2017), coincidiendo con la aparición de lesiones con realce de contraste en RM (Kuhle et al., 2011; Lim et al., 2005; Teunissen et al., 2009), y permite predecir la conversión de SCA a EMCD (Disanto et al., 2017; Imberg et al., 2018). Cuanto mayor es el daño axonal agudo, más NfL es

liberado, por lo que puede informarnos de la gravedad de los brotes y, por tanto, de las secuelas y discapacidad que estos vayan a provocar (Modvig et al., 2016; Kuhle et al., 2011; Norgren et al., 2004). Sus niveles basales se han visto aumentados en casos de EMRR y SAMS con respecto a controles (Fialova et al., 2013; Kuhle et al., 2011), de hecho, niveles altos al inicio de la enfermedad correlacionan con una mayor discapacidad a largo plazo y con una mayor atrofia cerebral y medular (Petzold et al., 2016; Grant et al., 2017; Barro et al., 2018).

Este biomarcador puede utilizarse para monitorizar la respuesta a tratamientos modificadores de la enfermedad (TME), ya que se ha demostrado que los niveles de NfL descienden con tratamientos que controlan procesos inflamatorios (Cai and Huang, 2018; Novakova et al., 2017a; Siller et al., 2019). Asimismo, la cuantificación de NfL es de gran utilidad para detectar respuestas subóptimas a tratamientos y permitir adecuarlos desde el inicio mejorando los resultados (Kuhle et al., 2019).

En la actualidad, la aparición de tecnologías más sensibles ha permitido la detección de NfL en suero, donde los niveles son más reducidos que en LCR, pero se ha demostrado que ambas concentraciones, en LCR y en suero, correlacionan (Kuhle et al., 2016; Novakova et al., 2017c; Hendricks et al., 2019). La detección en suero constituye un método menos invasivo para el paciente y más útil para hacer seguimientos en la práctica clínica diaria, por lo que se considera un marcador potencial de actividad con valor pronóstico en el curso de la EM (Disanto et al., 2017; Kuhle et al., 2017), además de ser un buen predictor de un incremento de discapacidad (Manouchehrinia et al., 2020) y de atrofia cerebral y medular (Barro et al., 2018).

Citoquinas y quimiocinas

La presencia de un estadio inflamatorio en la EM, ha despertado el interés de numerosos estudios en la cuantificación de los niveles de citoquinas y quimiocinas y su papel regulando y favoreciendo dicha inflamación. Estas proteínas están implicadas en el reclutamiento y activación de células inflamatorias y promueven una cascada de señales de activación en este proceso (macrófagos, linfocitos...)(Berghmans et al., 2012; Matsushita et al., 2013; Sellebjerg et al., 2009). Así pues, en fases de actividad de la enfermedad se han observado niveles elevados de citoquinas y quimiocinas relacionadas con la respuesta del tipo Th1 (IP-10, TNF- α , CXCL13, IL-8, CCL3, CCL4, CCL5, IL-12p40) (Pranzatelli et al., 2008) y descenso en los niveles de otras implicadas en la respuesta del tipo Th2 (IL-10, IL-4, IL-5, IL-13, MCP-1) (Matsushita et al., 2013). En concreto, la producción de TNF- α y la activación de la vía del factor nuclear kappa B (NF- κ B) están implicados en la patogenia de la EM (Ribeiro et al., 2019) y se han relacionado

con deterioro cognitivo en modelos experimentales de neuroinflamación secundaria a insuficiencia hepática crónica y en muestras humanas de pacientes cirróticos (Balzano et al., 2020, 2019; Dadsetan et al., 2016).

Además, se están estudiando quimiocinas por su implicación directa en el reclutamiento y migración de células a través de la BHE. Así, se han hallado niveles elevados de Mig/CXCL9 e IP-10/CXCL10 tanto en suero como en LCR de pacientes con EM con actividad inflamatoria (Franciotta et al., 2006; Sorensen et al., 1999), así como de RANTES/CCL5 que se eleva durante los brotes (Bartosik-Psujek and Stelmasiak, 2005). También se han estudiado los receptores de estas quimiocinas (CXCR3, CCR5, RANTES), cuyos niveles aparecen elevados en células de sangre periférica de pacientes en brote y pacientes con formas progresivas (Balashov et al., 1999; Mahad et al., 2003). Otras quimiocinas, sin embargo, disminuyen su concentración durante el brote, como ocurre en el caso de MCP-1/CCL2 (Bartosik-Psujek and Stelmasiak, 2005; Franciotta et al., 2006).

1.7.3. Chitinase 3-like 1

La familia de quitinasas son un grupo de enzimas que catalizan la hidrólisis de la quitina, el segundo polisacárido más abundante en la naturaleza después de la celulosa, que está presente principalmente en paredes celulares de hongos y exoesqueleto de insectos (Lee et al., 2011). Aunque los mamíferos carecen de quitina, se han hallado niveles elevados de quitinasas en ellos, de las que únicamente dos poseen actividad enzimática: la quitotriosidasa (CHIT1) y la quitinasa ácida de mamíferos (AMCase)(Perrakis et al., 1994; Sun et al., 2001). El resto, las llamadas lectinas similares a quitinasas, carecen de actividad enzimática a pesar de preservar la hendidura de unión a sustrato. Dentro de este grupo, se encuentra la Chitinase 3-like 1 (CHI3L1), también conocida como YKL-40, una glicoproteína de aproximadamente 40 kDa, con función todavía desconocida pero relacionada con diversos procesos patológicos. Se trata de una proteína transmembrana cuyo dominio extracelular puede ser escindido (Recklies et al., 2002) y unirse a un receptor celular o ligando soluble todavía desconocido (Johansen, 2006). Se ha descrito la expresión de CHI3L1 por diversos tipos celulares: macrófagos (Rehli et al., 2003), neutrófilos (Volck et al., 1998), condrocitos (Hakala et al., 1993), células sinoviales (De Ceuninck et al., 2001), células hepáticas (Johansen, 2006), células epiteliales del colon (Mizoguchi, 2006), células vasculares del músculo liso (Shackelton et al., 1995)...

Función de la CHI3L1

La CHI3L1 carece de actividad quitinasa, debido a mutaciones en su centro activo (Kazakova and Sarafian, 2009). Todavía se desconoce su función fisiológica en humanos, pero su presencia se asocia a inflamación, remodelación de tejido extracelular, fibrosis, progresión y diseminación del cáncer (Kazakova and Sarafian, 2009; Ober et al., 2008). Los niveles elevados de esta proteína se encuentran elevados en sangre en numerosas patologías que cursan con inflamación crónica como cirrosis, asma, dermatitis, diabetes, cáncer, artritis reumatoide... (Chupp et al., 2007; HogenEsch et al., 2006; Kawada et al., 2008; Mizoguchi, 2006; Ober et al., 2008; Rathcke et al., 2006). Asimismo, en diversas enfermedades que afectan al SNC, como Alzheimer, Esclerosis múltiple, Parkinson y ELA, se han hallado niveles elevados de CHI3L1 en LCR (CHI3L1_{LCR}), que correlacionan en todos los casos con un mal pronóstico (Hall et al., 2016; Janelidze et al., 2018; Quintana et al., 2018; Sanfilippo et al., 2017; Thompson et al., 2019; Vu et al., 2020). En Alzheimer, la CHI3L1 se expresa en el cerebro asociada tanto a neuroinflamación (Querol-Vilaseca et al., 2017), como neurodegeneración (Alcolea et al., 2015). En Parkinson, se ha asociado con deterioro cognitivo (Hall et al., 2016). En el caso de ictus isquémico agudo, sus niveles en suero son proporcionales al volumen del daño cerebral (Park et al., 2012). Se cree que en numerosas enfermedades neurodegenerativas la secreción de CHI3L1 por astrocitos y microglía activada podría acelerar la infiltración de macrófagos hacia la lesión, la angiogénesis y la muerte neuronal asociada a la neuroinflamación (Bonneh-Barkay et al., 2012a). No obstante, todavía se desconoce el mecanismo de interacción astrocito-microglía y el papel de la CHI3L1 en este proceso.

Estudios recientes defienden su implicación en la respuesta al daño oxidativo, apoptosis, equilibrio entre respuesta Th1 y Th2 y polarización de la microglía (Kim et al., 2018).

Aunque no se han identificado los receptores celulares de la CHI3L1 que median sus efectos biológicos, algunos estudios consideran que su expresión podría estar regulada por varias citoquinas proinflamatorias como IL-6, IFN- γ , IL-1 β y TNF- α (Ling and Recklies, 2004), que se liberan debido a una activación constitutiva del NF- κ B. Este factor de transcripción desempeña un papel importante en el inicio y progresión de la inflamación y está regulado al alza en pacientes con enfermedades inflamatorias crónicas. A su vez, la CHI3L1 induce la activación del NF- κ B, retroalimentando positivamente la perpetuación de la inflamación (Di Rosa and Malaguarnera, 2016).

Por lo tanto, esta proteína podría ser un biomarcador de mal pronóstico, en diversas enfermedades, en relación sobre todo con la perpetuación de la respuesta inflamatoria (Di Rosa et al., 2016, 2013).

Papel de la CHI3L1 en EM

La expresión de CHI3L1 no está restringida al SNC, pero su presencia en el LCR en EM se ha relacionado con una secreción endógena por células gliales, como astrocitos (Bonneh-Barkay et al., 2012a, 2010; Canto et al., 2015; Llorens et al., 2017) y/o microglía/monocitos (Rehli et al., 2003; Bonneh-Barkay et al., 2012, 2008; Canto et al., 2015). Niveles elevados de CHI3L1_{LCR} correlacionan con riesgo de conversión de SCA a EMCD (Comabella et al., 2010; Hinsinger et al., 2015), gran avance o progresión de la enfermedad (Canto et al., 2012; Mane-Martinez et al., 2016; Sellebjerg et al., 2017), aumento de la discapacidad (Canto et al., 2012; Hinsinger et al., 2015; Pérez-Miralles et al., 2020) y deterioro cognitivo (Quintana et al., 2018). Del mismo modo que ocurre con NfL, los niveles de CHI3L1 disminuyen en respuesta a TME en EMRR (Malmestrom et al., 2014; Novakova et al., 2017a, 2017b).

Existe poca información sobre la relación entre los niveles de CHI3L1_{LCR} y NfL_{LCR} en la EM, pero niveles elevados de ambos biomarcadores en LCR se han asociado a un mayor deterioro cognitivo en etapas tempranas de la enfermedad (Quintana et al., 2018).

CHI3L1 en otras enfermedades desmielinizantes

En otras enfermedades neurológicas desmielinizantes como la Neuromielitis óptica (NMO) (Correale and Fiol, 2011) y la Encefalomiелitis aguda diseminada (EAD) (Boesen et al., 2018) se han hallado niveles elevados de CHI3L1 durante los brotes clínicos, pero no fuera de estos. Esto también ocurre con otro biomarcador, la proteína ácida fibrilar glial, GFAP (del inglés *Glial Fibrillary Acidic Protein*), que forma parte de la estructura de los astrocitos y se libera al espacio extracelular durante los brotes clínicos (Takano et al., 2008) y, en el caso de la EM, correlaciona con la severidad de la enfermedad (Abdelhak et al., 2018). A diferencia de lo que ocurre en los pacientes con EM, en NMO y EAD la acumulación de discapacidad neurológica de forma independiente de los brotes es escasa o ausente (Collongues et al., 2014; Kawachi and Lassmann, 2017).

1.8. Tratamiento de la EM

La EM, como hemos comentado, puede presentar dos estadios clínicos caracterizados por la aparición de brotes agudos, seguidos de recuperación más o menos completa, o por el

aumento progresivo de la discapacidad sin apariencia de inflamación aguda. La discapacidad de los pacientes sería el resultado de las secuelas neurológicas de los brotes (Lublin et al., 2003), de la neurodegeneración progresiva independiente de los brotes (Cree et al., 2019; Tremlett et al., 2009) o de ambos procesos a lo largo del curso de la enfermedad.

El objetivo principal de los tratamientos es reducir la aparición de brotes y enlentecer o frenar la progresión de la discapacidad en los pacientes (Freedman et al., 2013; Kieseier et al., 2007), pero la mayoría no actúan sobre la neurodegeneración. Están dirigidos, sobretodo, a reducir la actividad inflamatoria y los fenómenos subyacentes a ella (migración de células inflamatorias a través de la BHE, activación de linfocitos, presentación de antígeno...). Estos tratamientos son más efectivos en las formas de EMRR y en aquellas formas progresivas que presentan inflamación (en forma de brote clínico o realce con gadolinio en resonancia) (Brown et al., 2019; Scott, 2017). Sin embargo, no han demostrado frenar de forma significativa la acumulación de discapacidad y neurodegeneración en los pacientes con formas progresivas sin actividad inflamatoria (Gasc et al., 2018). En la actualidad, disponemos de escasos tratamientos que han demostrado mejoría en fases progresivas de la EM, que en definitiva es la que ocasiona una mayor discapacidad en los pacientes. Por ello, es imprescindible la búsqueda de nuevos tratamientos dirigidos a frenar o reducir la neurodegeneración y/o promover la neuroregeneración.

1.9. Otras enfermedades desmielinizantes y diagnóstico diferencial con la EM

1.9.1. Neuromielitis óptica

La Neuromielitis óptica (NMO) es una enfermedad autoinmune desmielinizante del SNC que afecta a la médula espinal y los nervios ópticos (Wingerchuk et al., 2007). Tradicionalmente era considerada una variante de EM, pero después se descubrió que el 80% de los pacientes con NMO presentaban autoanticuerpos frente a la aquaporina 4 (AQP4-IgG), el canal acuoso más abundante del SNC, concentrado en los pies perivasculares de los astrocitos, formando parte de la BHE (Lennon et al., 2005, 2004). Los datos sugieren que estos autoanticuerpos derivan de las células B periféricas y causan la activación del complemento, la desmielinización inflamatoria y la necrosis que se observa en esta enfermedad (Wingerchuk et al., 2007). La presencia de depósitos de anticuerpos y complemento causa el aumento de la permeabilidad de la BHE y la apoptosis de los astrocitos, además de una degeneración secundaria de

oligodendrocitos y neuronas y la aparición de lesiones necróticas (Akaishi et al., 2017; Baghbanian et al., 2018).

El diagnóstico de NMO se realiza de acuerdo a los criterios consensuados en 2015, basados en la presencia de mielitis transversa, neuritis óptica y afectación del tronco encefálico y diencefalo, además de la presencia de anticuerpos anti-AQP4 en suero, lo que ayuda a distinguirlos de los pacientes con EM. La forma más común cursa con brotes, un mayor número que en los casos de EMRR (Wingerchuk et al., 2015, 1999). Un bajo porcentaje de pacientes presenta además, BOC en LCR, que tienden a desaparecer con el tiempo a diferencia de la EM. En casos con mayor número de recaídas, se hallan niveles elevados de la proteína ácida fibrilar glial, GFAP, en LCR y se correlaciona con mayor grado de discapacidad (Tenembaum et al., 2016). Una fracción de los pacientes considerados como del espectro NMO (NMOSD), seronegativos para anticuerpos anti-AQP4, presentan un fenotipo característico y diferenciado de la EM o de la NMO-AQP4+. En algunos de estos pacientes, en porcentaje variable, se ha detectado la presencia de otro tipo de anticuerpos dirigidos contra la glicoproteína de mielina del oligodendrocito (MOG)(Bennett, 2016). El fenotipo del paciente con anti-MOG suele cursar de forma recurrente, ser respondedor a corticoides, y presentar menos secuelas por cada brote respecto a la NMO, y el pronóstico es variable. Muy rara vez, se presentan como formas desmielinizantes con progresión de la discapacidad (Gil-Perotin et al., 2018). Por ello, en la actualidad se considera ya a la MOGrd (MOG *related disorders*) una enfermedad independiente tanto de la NMO como de la EM.

Los pacientes con NMO y NMOSD, se suelen tratar con inmunosupresión de amplio espectro en base a documentos de consenso y opiniones de expertos y se ha visto que algunos TME efectivos para EM pueden empeorar la NMO. Recientemente, se ha comprobado la eficacia del Tocilizumab en un ensayo clínico, un anticuerpo monoclonal que bloquea el receptor de la IL-6 reduciendo la actividad de la enfermedad (Araki et al., 2014; Carreón Guarnizo et al., 2019).

1.9.2. Encefalomiелitis aguda diseminada

La encefalomiелitis aguda diseminada (EAD) es una enfermedad inflamatoria autoinmune que afecta principalmente a la sustancia blanca del cerebro y de la médula espinal. El diagnóstico se basa en características clínicas y radiológicas, por lo que la RM tiene un papel fundamental en el diagnóstico con predominio de varias lesiones difusas o multifocales de la sustancia blanca del SNC en el mismo estadio de la enfermedad. Además, un alto porcentaje de

pacientes presentan anticuerpos anti-MOG, por lo que si un paciente presenta este marcador añadido a una clínica e imagen compatibles es muy sugestivo de la presencia de la enfermedad (Weber et al., 2018). La EAD afecta más comúnmente a niños que adultos (Schwarz et al., 2001) y, a diferencia de la EM, no hay sesgo entre sexos. En muchos casos la enfermedad es precedida por una infección viral o bacteriana, que suele afectar a las vías respiratorias, e incluso puede generarse tras una vacuna (Vial et al., 2007).

Los síntomas son de presentación clínica variable con presencia de encefalopatía con signos neurológicos multifocales que generalmente requieren ingreso en cuidados intensivos. Normalmente la EAD cursa como monofásica, pero a veces se han reportado casos multifásicos (Barkhof F, 2020). La enfermedad tiene un pronóstico bastante bueno si el manejo es adecuado, pero la distinción entre EM y EAD suele ser difícil y, a veces, solo un estudio prospectivo permite llevarla a cabo (Abdellaoui et al., 2019).

2. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

Hipótesis del trabajo:

- La combinación de los niveles de CHI3L1 y NfL en LCR en EM permite diferenciar los subtipos de la enfermedad.
- Los niveles de CHI3L1 y NfL en LCR son una herramienta útil en la identificación de pacientes con peor pronóstico, tanto en EM como en otras enfermedades desmielinizantes como NMO y EAD.
- La CHI3L1 es un biomarcador de progresión en EM, que no se ve influenciado por la actividad inflamatoria.
- La distribución de la CHI3L1 en diferentes lesiones de autopsias de casos de EM, NMO y EAD aporta información sobre su implicación en la progresión de la discapacidad, los tipos celulares que la expresan, así como su relación con la inflamación y/o neurodegeneración.

Objetivos:

Objetivo 1: Determinar el valor de la concentración de CHI3L1 y NfL en LCR y suero para el diagnóstico de los fenotipos clínicos de la EM.

- a. Establecer la relación entre la concentración de CHI3L1 y la actividad inflamatoria medida por los brotes clínicos, la actividad por RM, y la localización de las lesiones por RM.
- b. Establecer la correlación entre CHI3L1 y discapacidad.
- c. Establecer el valor del análisis combinado de CHI3L1 con NfL para el diagnóstico de fenotipos clínicos y para el pronóstico de la progresión subclínica en EM.
- d. Establecer el grado de correlación entre los niveles de CHI3L1 en suero y LCR.

Objetivo 2: Establecer las diferencias en la concentración de CHI3L1 en las diferentes enfermedades inflamatorias desmielinizantes primarias del SNC.

- a. Comparar los niveles de CHI3L1 en LCR en EM, NMO y EAD, en actividad y remisión.
- b. Determinar la expresión de CHI3L1 en muestras de cerebro de pacientes con EM, NMO y EAD:
 - i. Analizar la expresión diferencial de CHI3L1 por distintos tipos celulares y su relación con la inflamación circundante.
 - ii. Estudiar la relación entre CHI3L1 y neurodegeneración.

3. MATERIAL Y MÉTODOS

3.1. Diseño del estudio

Los trabajos de investigación en los que se basa esta tesis doctoral son:

OBJETIVO 1: Estudio clínico observacional retrospectivo con seguimiento prospectivo del valor combinado de los niveles de CHI3L1_{LCR} y NfL_{LCR} de pacientes con EM para determinar su utilidad en la diferenciación de fenotipos clínicos de EM y en la predicción de discapacidad y posterior diagnóstico de las formas progresivas de la enfermedad.

OBJETIVO 2: Estudio clínico observacional retrospectivo con seguimiento prospectivo y estudio anátomo-patológico de CHI3L1 en las diferentes enfermedades inflamatorias desmielinizantes primarias del SNC:

- **OBJETIVO 2A:** Estudio observacional retrospectivo para analizar los niveles de CHI3L1, además de NfL, en LCR de pacientes con diferentes enfermedades desmielinizantes (EM, NMO y EAD), considerando la presencia o no de actividad inflamatoria clínica y radiológica, y comparándolo con controles.

- **OBJETIVO 2B:** Estudio histopatológico en tejido de cerebro procedente de autopsias de pacientes con EM, NMO y EAD, en similares estadios que los estudiados en LCR, para analizar la expresión diferencial de CHI3L1 en las lesiones de las diferentes enfermedades, y su relación con el grado de inflamación y neurodegeneración, así como los diferentes tipos celulares implicados.

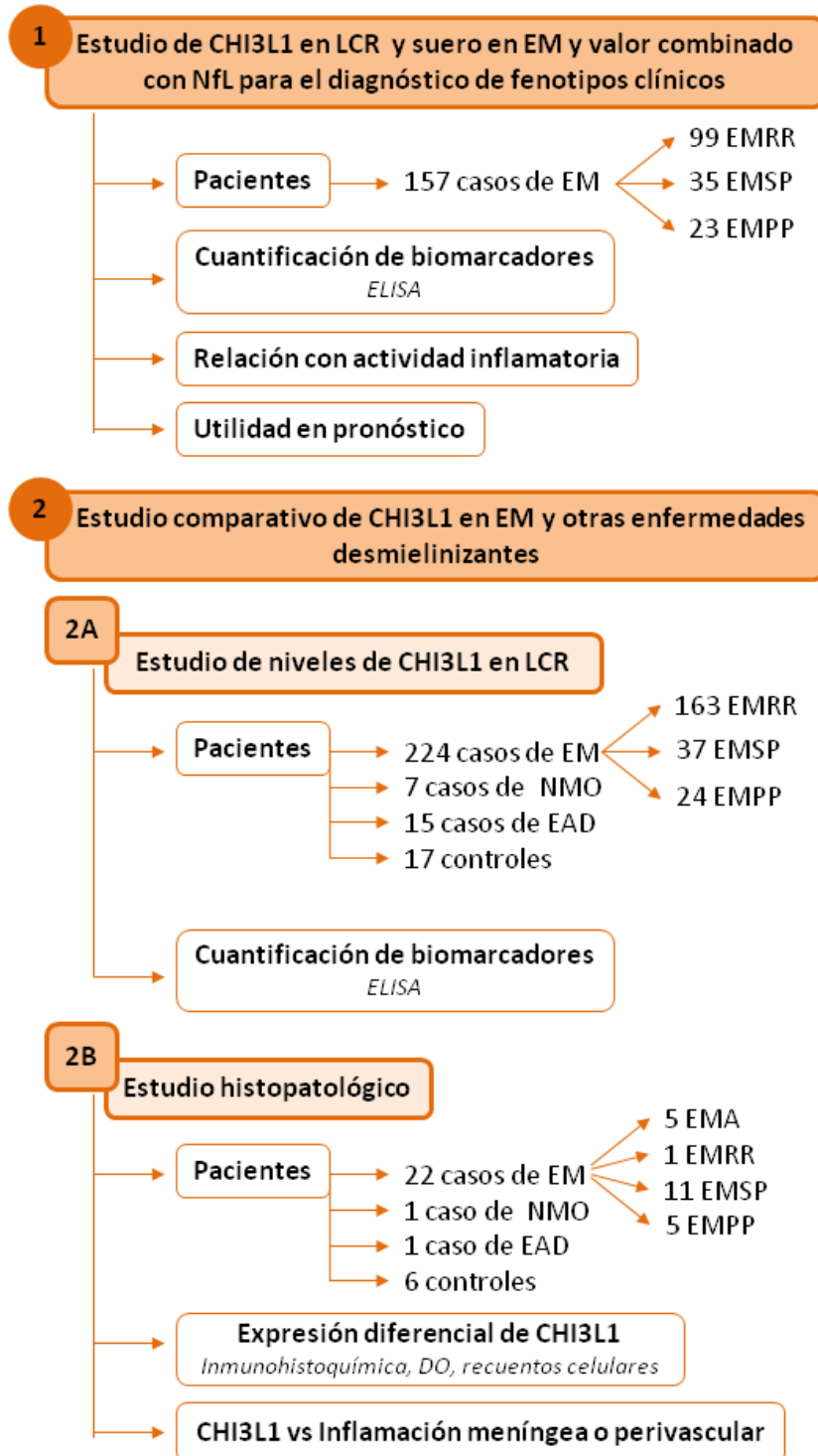


Figura 6. Esquema del estudio y plan de trabajo.

CHI3L1: Chitinase 3-like 1; NfL: Cadena ligera de neurofilamento; LCR: Líquido cefalorraquídeo; EM: Esclerosis múltiple; EMA: Esclerosis múltiple aguda; EMRR: Esclerosis múltiple remitente-recurrente; EMSP: Esclerosis múltiple secundaria progresiva; EMPP: Esclerosis múltiple primaria progresiva; NMO: Neuromielitis óptica; EAD: Encefalomiелitis aguda diseminada; DO: densitometría digital óptica; vs: versus; ELISA: Ensayo por inmun absorción ligado a enzimas.

3.2. Metodología de los objetivos 1 y 2A

3.2.1. Selección de pacientes y muestras

- **OBJETIVO 1:** Para el estudio del valor combinado de CHI3L1_{LCR} y NfL_{LCR} se seleccionaron 157 casos de EM (99 con EMRR, 35 con EMSP y 23 con EMPP).
- **OBJETIVO 2A:** Para la comparativa entre EM y otras enfermedades desmielinizantes se añadieron más pacientes llegando a un total de 224 casos de EM (163 con EMRR, 37 con EMSP y 24 con EMPP), 7 casos de NMO (AQP4+) y 15 pacientes con EAD. Las muestras de controles sin EM (n=17) fueron seleccionadas de pacientes carentes de infección evidente, inflamación, autoinmunidad o enfermedades neurodegenerativas conocidas.

Ambos estudios fueron aprobados por nuestro comité ético institucional (número de referencia PI17/01544). Todos los pacientes, para ser incluidos, habían de tener disponibilidad de LCR, suero, resonancia magnética y datos de discapacidad longitudinal. Los datos clínicos y demográficos fueron recogidos retrospectivamente y prospectivamente con la última actualización hecha en diciembre de 2019. Los datos de los pacientes reclutados para el objetivo 1 y 2A aparecen a continuación en las *Tablas 1 y 2*, respectivamente.

3.2.2. Criterios diagnósticos

El diagnóstico de EMCD fue realizado de forma prospectiva de acuerdo a los criterios de McDonald 2017 (Thompson et al., 2018). Se consideró **enfermedad activa** la presencia de un ataque clínico o brote y/o al menos una lesión captante de gadolinio (Gd+) presente en secuencias T1 de RM. Sin embargo, el incremento de lesiones en T2 no fue considerado como criterio de actividad por desconocerse el tiempo de producción de las lesiones en relación con la colección del LCR.

El **ataque clínico o brote** fue definido como un empeoramiento agudo de la función neurológica con duración mayor a 24 horas, continuado por un grado variable de recuperación, sin poder ser explicado por la presencia de fiebre o estrés físico. Los síntomas urinarios en solitario no fueron considerados para el diagnóstico de un brote.

Por su parte, se consideraron en fase de actividad las muestras de LCR obtenidas en una punción lumbar (PL) realizada dentro de los 90 días posteriores a un brote y/o detección de lesiones Gd+.

Tabla 1. Características clínicas y demográficas de los pacientes utilizados en el objetivo 1

Variable	EMRR (n = 99)	EMSP (n = 35)	EMPP (n = 23)	P*
Edad al inicio de la enfermedad (años)	28 (23,5 - 36,5)	29 (23 - 36)	41 (34,5 - 47,5)	< 0,001
Edad al momento de la PL (años)	35 (29,5 - 41)	45 (38,5 - 50)	51 (41 - 56)	< 0,001
Mujer	79 (79,8%)	21 (60%)	10 (43,5%)	< 0,001
Tiempo desde el diagnóstico a la PL (años)	2,1 (0,3 - 9,8)	15,8 (8,8 - 19,3)	8,3 (5 - 11,8)	< 0,001
Seguimiento desde la PL (años)	4,4 (3 - 5,9)	4,3 (2,3 - 5,7)	3,1 (2,5 - 5,7)	< 0,001
Brote clínico en el momento de la PL	53 (53,5%)	2 (5,88%)	1 (5%)	< 0,001
Gd+ en RM en el momento de la PL	53 (56,4%)	8 (25,81%)	6 (30%)	< 0,001
BOC-IgG	91 (91,9%)	31 (88,6%)	22 (95,7%)	1
BOC-IgM	49 (49,5%)	18 (51,4%)	10 (43,5%)	0,9
EDSS basal	2 (1 - 3)	5,5 (4,25 - 6,5)	5 (3,5 - 6)	< 0,001
NfL _{LCR} (pg/ml)	591,9 (290 - 1106)	533 (266 - 678)	450 (304 - 746)	0,6
CHI3L1 _{LCR} (ng/ml)	118,97 (81 - 186)	139,55 (96 - 212)	180,25 (146 - 265)	0,01

* Las variables continuas se analizaron con el test *U de Mann Whitney*, excepto CHI3L1 y NfL, que fueron transformadas a logaritmos y se utilizó el test *T de Student*. Para las variables categóricas se utilizó el test χ^2 .

EMRR: Esclerosis múltiple remitente-recurrente; EMSP: Esclerosis múltiple secundaria progresiva; EMPP: Esclerosis múltiple primaria progresiva; PL: Punción lumbar; Gd+: Lesión captante de gadolinio; RM: Resonancia magnética; BOC: Bandas oligoclonales; IgG: Inmunoglobulina G; IgM: Inmunoglobulina M; EDSS: *Expanded Disability Status Scale*; NfL: Cadena ligera de neurofilamento; CHI3L1: Chitinase-3-like-1; LCR: Líquido cefalorraquídeo; Las variables categóricas se han descrito por conteo (n) y porcentajes (%); las variables continuas y ordinales se han descrito por mediana (primer cuartil - tercer cuartil).

Tabla 2. Características clínicas y demográficas de los pacientes utilizados en el objetivo 2A

Variable	Controles (n = 17)	EMRR (n = 163)	EMP (n = 61)	NMO (n = 7)	EAD (n = 15)	P*
Edad al inicio de la enfermedad (años)	-	30 (24 - 37)	35 (25 - 43)	42 (31 - 48)	38 (20 - 52)	0,405
Edad al momento de la PL (años)	35 (31- 36)	34 (28 - 41)	46 (40 - 53)	42 (35 - 50)	43,50 (22 - 54)	0,273
Mujer	9 (53%)	132 (81%)	328 (47%)	7 (100%)	3 (23%)	0,002
Tiempo desde el diagnóstico a la PL (años)		0,5 (0,1 - 5)	10,5 (5,9 - 16,7)	1 (0 - 10)	0 (0 - 1)	< 0,001
Seguimiento desde la PL (años)		3,7 (1,8 - 5,4)	3,5 (2,1 - 5,8)	6,6 (4 - 9,9)	2,2 (0,7 - 4)	< 0,001
Brote clínico en el momento de la PL		93 (57%)	3 (5%)	5 (72%)	7 (62%)	0,007
Gd+ en RM en el momento de la PL		77 (48%)	15 (25%)	2 (29%)	7 (58%)	0,524
BOC-IgG	0 (0%)	142 (88%)	55 (91,6%)	2 (29%)	2 (18%)	< 0,001
BOC-IgM	0 (0%)	81 (50%)	28 (46,7%)	2 (29%)	1 (9%)	0,007
EDSS basal	0	2 (1 - 3)	5 (4 - 6,5)	7 (3 - 8)	5 (3 - 6)	< 0,001
Tratamiento en el momento de la PL (1ª línea TME, 2ª línea TME, ASCT)	-	30 (20, 9, 1)	25 (8, 17, 0)	4 (3, 1, 0)	0	-
NfL _{LCR} (pg/ml)	148,3 (119,8 - 185,5)	561,9 (269 - 1480)	479,1 (286 - 704,5)	534 (233 - 9150)	1111 (201 - 6865)	0,6
CHI3L1 _{LCR} (ng/ml)	64,8 (47,4 - 78,3)	115,6 (80,5 - 186,1)	159,93 (104 - 229,5)	208,2 (111 - 448)	374,2 (109 - 634)	0,01

* Las variables continuas se analizaron con el test *U de Mann Whitney*, excepto CHI3L1 y NfL, que fueron transformadas a logaritmos y se utilizó el test *T de Student*. Para las variables categóricas se utilizó el test χ^2 .

EMRR: Esclerosis múltiple remitente-recurrente; EMP: Esclerosis múltiple progresiva; NMO: neuromielitis óptica; EAD: Encefalomiелitis aguda diseminada; PL: Punción lumbar; Gd+: Lesión captante de gadolinio; RM: Resonancia magnética; BOC: Bandas oligoclonales; IgG: Inmunoglobulina G; IgM: Inmunoglobulina M; EDSS: *Expanded Disability Status Scale*; NFL: Cadena ligera de neurofilamento; CHI3L1: Chitinase-3-like-1; LCR: líquido cefalorraquídeo; TME: Terapias modificadoras de la enfermedad; ASCT: Trasplante autólogo de células madre, Las variables categóricas se han descrito por conteo (n) y porcentajes (%); las variables continuas y ordinales se han descrito por mediana (primer cuartil - tercer cuartil).

La **clasificación de los diferentes fenotipos clínicos** fue realizada de acuerdo con los criterios definidos por Lublin (Lublin et al., 2014). Se consideraron formas de EMSP a aquellos pacientes que tenían una puntuación mayor o igual a 3 en la EDSS y en menos de 6 meses obtuvieron una puntuación superior o igual a 4, además de tener un sistema piramidal funcional mayor o igual a 2 y ninguna evidencia de brote. El fenotipo de EMPP fue asignado a aquellos pacientes que encajaron en los criterios de McDonalds 2017.

El diagnóstico de NMO se realizó de acuerdo con los criterios de Wingerchuk de 2015 (Wingerchuk et al., 2015) y únicamente se incluyeron en el estudio los pacientes seropositivos (IgG anti-AQP4). El diagnóstico de EAD se realizó siguiendo los criterios IPMSSG establecidos en 2012 (Krupp et al., 2013).

En todos los casos, la discapacidad fue evaluada en el momento de la PL, de acuerdo con la EDSS (Kurtzke, 1983), y cada seis meses hasta la última visita.

3.2.3. Tratamiento

Los pacientes con EMCD fueron tratados con TME de primera línea, elegidos a discreción del médico, a menos que se diese alguna de las siguientes situaciones: 1) presencia de dos brotes en un año, 2) un brote y/o una nueva lesión captante de gadolinio dentro de los 3 meses posteriores al brote, 3) un brote incapacitante con un valor en la EDSS de al menos 2 puntos. En estos casos y en aquellos en los que el tratamiento previo resultó inefectivo para frenar la actividad, se administraron TME de segunda línea. Los pacientes que no respondieron a TME de primera y segunda línea fueron sometidos a un trasplante autólogo de células madre (ASCT).

3.2.4. Cuantificación de biomarcadores en suero y LCR

Las muestras de suero y LCR fueron almacenadas a -80°C en el Biobanco La Fe con la aprobación del comité científico y ético (PT17/0015/0043).

Los niveles de CHI3L1_{LCR} y NfL_{LCR} fueron cuantificados utilizando ensayos inmunoenzimáticos (ELISA tipo sándwich) disponibles a nivel comercial, siguiendo las instrucciones del fabricante. En el caso de CHI3L1, se utilizó el kit comercial *Quantikine ELISA Kit* (R&D Systems, DC3L10), y se incubaron las muestras diluidas 1:200 en diluyente de muestras con el anticuerpo monoclonal anti-CHI3L1, adherido a la placa, durante 2 horas con agitación suave. Posteriormente, tras lavados, se añadió el anticuerpo policlonal anti-CHI3L1 conjugado con el enzima durante 2 horas con agitación suave. Después, se volvió a lavar y se añadió el sustrato del enzima durante 30 minutos, se paró la reacción con ácido sulfúrico y la cantidad de CHI3L1 fue determinada midiendo la absorbancia a 450 nm con el lector de placas HaloLed 96 (longitud de onda de referencia 550 nm). Para el cálculo de la concentración de CHI3L1, se utilizó una curva estándar de ocho puntos partiendo de 4000 pg/ml y haciendo diluciones seriadas. El coeficiente de variación intraensayo fue menor al 7% y el inter ensayo, menor al 6%.

En el caso de NfL, se utilizó el kit comercial de Uman Diagnostics AB, Umea, IBL International (referencia UD51001). En este caso, se añadió el LCR, combinado con diluyente de muestras (1:1), durante 1 hora con agitación (800 rpm) sobre un anticuerpo monoclonal específico que reviste una superficie sólida. Tras realizar lavados, se añadió otro anticuerpo monoclonal conjugado con biotina y se incubó durante 45 minutos con agitación (800 rpm). Tras lavar de nuevo, se realizó una incubación con el enzima durante 30 minutos (800 rpm). Las determinaciones cuantitativas se realizaron mediante la adición de un sustrato incoloro durante 15 minutos (800 rpm) que la enzima transformó en un producto coloreado. Se paró la reacción con ácido sulfúrico y se midió la absorbancia a 450 nm (longitud de onda de referencia 620 nm). Para poder cuantificar el NfL, se incluyó una curva estándar de siete puntos partiendo de 10000 pg/ml y se hicieron diluciones seriadas. El coeficiente de variación intraensayo fue menor al 5% y el inter ensayo, menor al 4%.

En ambos ELISAS se calcularon los resultados realizando una curva Marquardt de 4 parámetros utilizando la plataforma online *myassays* (www.myassays.com). Los detalles de los protocolos pueden verse en el *Anexo: Protocolos*.

Fueron considerados como valores atípicos aquellos 1.5 veces mayores que el valor Q3 del rango intercuartílico (RIQ) (CHI3L1 > 367 ng/ml; NfL > 2027 pg/ml) calculado con los datos de toda la cohorte. Los niveles de CHI3L1 en suero fueron medidos en 88 muestras de EM utilizando el mismo kit comentado anteriormente, pero en este caso con una dilución 1:50 de las muestras. Para calcular la permeabilidad de la BHE se calculó el Q-alb para todas las

muestras como el cociente entre la concentración de albúmina en LCR (mg/l) y la concentración de albúmina en suero (g/l).

3.2.5. Adquisición y análisis de imagen por RM

Los estudios de RM incluyendo cerebro, médula cervical y dorsal, fueron analizados tras un primer brote clínico. Puesto que los estudios iniciales fueron de diferentes centros y a lo largo de un periodo largo de tiempo (2006-2019), el protocolo de adquisición y las secuencias utilizadas fueron variables. Sin embargo, en todos los casos fue posible realizar la secuencia FLAIR (planos transversales o sagitales con espesor variable entre 1 y 3 mm), la secuencia TSE T2 (grosor entre 3-5 mm), la secuencia de densidad de protones (espesor entre 3-5 mm) y la secuencia T1 después de la administración de gadolinio (plano transversal y 3-5 mm de espesor). Las lesiones se clasificaron según su ubicación, número y presencia de captación postgadolinio.

3.2.6. Otros test

Se analizó la presencia de BOC-IgM frente a lípidos mediante la técnica de enfoque isoeléctrico e inmunotransferencia como fue descrito anteriormente (Villar et al., 2002). El suero y el LCR fueron probados para descartar infecciones y otras enfermedades inflamatorias o desmielinizantes.

3.2.7. Análisis estadístico

En el **objetivo 1** se llevó a cabo un análisis estadístico con ayuda del Departamento de Bioestadística del Instituto de Investigación Sanitaria La Fe (IISLaFe). Las variables categóricas fueron descritas por conteos (n) y porcentajes (%) y, las variables continuas y ordinales, por mediana (primer - tercer cuartil). Los niveles de $NfL_{LCR}/CHI3L1_{LCR}$ fueron transformados a logaritmos ($\log NfL$ y $\log CHI3L1$) para poder asumir normalidad. Las comparaciones entre grupos se realizaron usando *U-Mann Whitney*, test *T de Student* y análisis de covarianza de una vía (ANCOVA) utilizando como covariables la edad, el sexo y la duración de la enfermedad, sin cambios significativos en los efectos estimados sobre NfL y $CHI3L1$. Para comparaciones múltiples se aplicó el método de corrección de *Bonferroni post-hoc*. Las correlaciones fueron analizadas con el test de *Pearson* y, adicionalmente, con el test de *Spearman*.

Para analizar la contribución de los valores emparejados de los dos biomarcadores, los pacientes se clasificaron en cuatro grupos con un método de división por mediana (el valor de la mediana se calculó a partir de la cohorte de EMRR sin actividad de la enfermedad):

- Grupo 1: pacientes con niveles de NfL_{LCR} y $CHI3L1_{LCR}$ por debajo del valor de la mediana.
- Grupo 2: pacientes con valores de NfL_{LCR} por encima de la mediana, pero con $CHI3L1_{LCR}$ por debajo.
- Grupo 3: pacientes con niveles de $CHI3L1_{LCR}$ por encima de la mediana, pero con NfL_{LCR} por debajo.
- Grupo 4: pacientes con concentraciones de NfL_{LCR} y $CHI3L1_{LCR}$ por encima de los niveles de la mediana.

Se realizó un análisis bivariable con las curvas de supervivencia de *Kaplan Meier* para analizar la probabilidad de incrementar 1 punto en la EDSS, tener un diagnóstico de forma progresiva, necesitar intensificación del tratamiento y aparición de primera recaída después de la PL en pacientes con EMRR. Los valores predictores fueron edad, sexo, actividad de la enfermedad, EDSS, $\log NfL$ y $\log CHI3L1$ (o, alternativamente, las categorías de biomarcadores del paciente), presencia de BOC-IgM en el LCR, y tratamiento en el momento de la PL. Se realizaron modelos de regresión de riesgos proporcionales en el subgrupo de EMRR para los mismos resultados y predictores. Después de la selección de los predictores con el algoritmo de red elástica, el modelo se reajustó con una regresión estándar de Cox para obtener valores p aproximados y estimaciones de los efectos. Además, se realizó un modelo de regresión logística multinomial incluyendo niveles de NfL_{LCR} transformados logarítmicamente y niveles de $CHI3L1_{LCR}$ como predictores. Se utilizaron como variables de respuesta los fenotipos clínicos de EM (EMRR, EMSP y EMPP) y el diagnóstico de EMSP, con EMRR como grupo de referencia. Se dibujó una trama de efectos marginales para facilitar la interpretación del modelo de regresión logística multinomial. Todos estos análisis se realizaron con SPSS 21.0 v y la versión de R 3.4.3 (proyecto CRAN).

El análisis estadístico del **objetivo 2A** fue llevado a cabo con el software IBM SPSS v 26.0. Atendiendo a los datos clínicos, nuestro primer objetivo fue analizar diferencias en los niveles de biomarcadores entre pacientes con diferentes enfermedades desmielinizantes considerando la presencia o no de actividad inflamatoria. Los valores de NfL y $CHI3L1$ fueron logaritmizados y se aplicaron test paramétricos usando análisis de covarianza y ajustando las covariables basales. En el caso de comparar más de dos grupos, los valores significativos fueron corregidos con el procedimiento de *Bonferroni-Holm*. El p-valor fue calculado utilizando pruebas de dos colas y se consideró estadísticamente significativo por debajo de 0,05. No hubo

valores perdidos entre las variables analizadas porque se utilizaron criterios de inclusión para recopilarlos todos.

3.3. Metodología del objetivo 2B: Estudio de expresión de CHI3L1

3.3.1. Selección de pacientes y muestras

El material para el estudio histológico fue concedido por el *Center for Brain Research* de la *Medical University* de Viena, aprobado por el comité ético con referencia 535/2004/2019. Se seleccionó tejido de cerebro procedente de autopsias de 22 pacientes con EM (5 formas de EM aguda, 1 caso de EMRR, 5 casos de EMPP y 11 de EMSP), además de 1 caso de NMO (AQP4+), 1 caso de EAD y 6 casos controles de edad similar. Las características de los pacientes y las lesiones analizadas se reflejan en la *Tabla 3*.

3.3.2. Inmunohistoquímica

Sobre las secciones se realizaron tinciones de histoquímica e inmunohistoquímica para diferenciar las diferentes áreas: SBAN (al menos 1 cm distante de la lesión), lesiones clásicas activas desmielinizantes de tipo I, II o III (Lucchinetti et al., 2000), lesiones de expansión lenta y lesiones inactivas. Estas lesiones fueron definidas de acuerdo a criterios publicados previamente (Bruck et al., 1995; Frischer et al., 2015; Lassmann, 2011).

La inmunohistoquímica se llevó a cabo utilizando el método con biotina-estreptavidina. Los detalles del protocolo aparecen en trabajos previos (Zrzavy et al., 2017). El anticuerpo anti-CHI3L1 se incubó con suero de caballo diluido al 10% en tampón DAKO, mientras que el resto de anticuerpos se incubaron usando suero bovino fetal diluido al 10%, para reducir uniones inespecíficas. Las características de los anticuerpos primarios usados y las condiciones específicas de las tinciones, como el desenmascaramiento antigénico, aparecen resumidas en la *Tabla 4*. En el caso de la CHI3L1, se utilizó un control negativo en ausencia del anticuerpo primario, para confirmar especificidad. Las muestras se contrastaron con hematoxilina durante 20 segundos, se lavaron y se deshidrataron en un gradiente de alcoholes crecientes acabando en inmersión en xilol para después montar con Eukitt (EMS, 5320). Los detalles del protocolo se encuentran en *Anexo: Protocolos*.

Tabla 3. Características de las muestras de cerebro procedentes de autopsia (objetivo 2B)

CASO	Tipo	Sexo	Edad	Lesión	Region de interés	Duración enfermedad (meses)
C1	Control	M	30		SBN	
C2	Control	M	36		SBN	
C3	Control	M	39		SBN	
C4	Control	H	46		SBN	
C5	Control	H	65		SBN	
C6	Control	H	70		SBN	
EM1	EMA	H	35	Lesión Act, III	SBAN, Inicial, EA, centro activo	1,5
EM2	EMA	M	45	Lesión Act, III, SEL	SBAN, Inicial, EA, LA, SEL: borde, SEL: centro	0,2
EM3	EMA	H	45	2x Lesión Act, III	SBAN, Inicial, 2x EA, LA, centro activo	0,6
EM4	EMA	H	59	Lesión Act, II	SBAN, EA, centro activo	5
EM5	EMA	M	69	Lesión Act, III	SBAN, Inicial, EA, LA	2
EM6	EMRR	M	40	Lesión Act, III	SBAN, Inicial, EA, centro activo	120
EM7	EMPP	M	34	2x Lesión inactiva	SBAN, 2x centro inactivo	204
EM8	EMPP	H	53	SEL	SBAN, SEL: borde, SEL: centro	168
EM9	EMPP	M	55	Lesion Act I	SBAN, EA, centro activo	168
EM10	EMPP	H	67	SEL	SBAN, SEL: borde, SEL: centro	87
EM11	EMPP	M	77	SEL	SBAN, SEL: borde, SEL: centro	168
EM12	EMSP	M	52	SEL e inactiva	SEL e inactiva	30
EM13	EMSP	H	34	SEL	SBAN, SEL: borde, SEL: centro	120
EM14	EMSP	H	41	SEL	SBAN, SEL: borde, SEL: centro	137
EM15	EMSP	M	46	SEL	SBAN, SEL: borde, SEL: centro	444
EM16	EMSP	M	48	Lesión Activa I	SBAN, EA, SEL e inactiva	410
EM17	EMSP	M	53	SEL	SBAN, SEL: borde, SEL: centro	241
EM18	EMSP	M	53	Lesión inactiva	SBAN, centro inactivo	360
EM19	EMSP	M	61	Lesión inactiva	SBAN, centro inactivo	288
EM20	EMSP	M	62	Lesión inactiva	SBAN, centro inactivo	144
EM21	EMSP	M	81	Lesión inactiva	SBAN, centro inactivo	432
EM22	EMSP	M	45	Lesion Activa	SBAN, EA, SEL	240
NMO	-	M	20	Lesión activa/inactiva	Activa, inactiva	48
EAD	-	H	13	Activa, perivascular	SBAN; Lesiones Activas	0,06

EMA: Esclerosis múltiple aguda; EMRR: Esclerosis múltiple remitente-recurrente; EMSP: Esclerosis múltiple secundaria progresiva; EMPP: Esclerosis múltiple primaria progresiva; NMO: Neuromielitis óptica; EAD: Encefalomiélitis aguda diseminada; SBN: Sustancia blanca normal de controles; SBAN: Sustancia blanca de apariencia normal; Act: Activa; SEL: Lesión de expansión lenta; EA: Lesión activa temprana; LA: Lesión activa tardía; M: Mujer; H: Hombre.

Tabla 4. Detalles de anticuerpos

Anticuerpos primarios	Origen	Diana	Dilución	Desenmascaramiento	Fuente
CHI3L1	Cabra (pAc IgG)	Chitinase 3-like 1	1:200 (1:50-1:100 en IF)	EDTA pH 9	AF2599; R&D
TPPP	Ratón	Proteína promotora de la polimerización de tubulina Molécula	1:2000	EDTA pH 9	Prof. Lassmann
Iba1	Conejo (pAc)	adaptadora de unión a calcio ionizado	1:1000	EDTA pH 9	019-19741; Wako
GFAP	Conejo (pAc)	Proteína ácida fibrilar glial	1:1000	EDTA pH 9	Z0334; Dako
NeuN	Ratón (mAc)	Proteína nuclear específica de neurona	1:5000 (CSA)	Citrato pH 6	MAB377; Chemicon
IgG biotinilada	Ratón	Inmunoglobulina tipo G	1:500	Proteinasa 15'	Dako
CD68	Ratón	Cluster de Diferenciación 68	1:100	EDTA pH 9	Dako
PLP	Ratón (mAc, IgG _{2a})	Proteína Proteolipídica	1:1000	EDTA pH 9	MCA839G; Serotec

pAc: Anticuerpo policlonal; mAc: Anticuerpo monoclonal; IF: Inmunofluorescencia; Prof.: profesor

Anticuerpos secundarios	Dilución	Fuente
Biotinylated donkey α -mouse	1:500	Jackson 715-065-150
Biotinylated horse α -goat	1:200	Vector BA-9500
Cy2 donkey α -goat	1:100	Jackson 705-225-147
Dylight 549 donkey α -rabbit	1:100	Jackson 711-165-152
Dylight 549 streptavidin	1:200	Jackson 016-500-084
Cy2 avidin	1:100	Jacson 016-220-084

3.3.3. Cuantificación de CHI3L1 en diferentes tipos celulares

De cada sección analizada se obtuvo una imagen panorámica, y se definió un mapa de lesión detallado antes de seleccionar el área para cuantificar. Se definieron diferentes tipos de lesión en diferentes regiones del cerebro con ayuda de las secciones teñidas con hematoxilina-eosina, tinción de mielina *luxol fast blue* y tinción de plata *Bielschowsky* para axones.

La caracterización de las lesiones también incluyó inmunohistoquímica para diferentes proteínas mielínicas (PLP, MOG y MAG), así como para marcadores de linfocitos T (CD3) y de

macrófagos/microglía (CD68). En estos mapas de lesión se seleccionaron las áreas para realizar recuentos de células positivas para CHI3L1. Se utilizaron 4 imágenes tomadas con el objetivo 40x (0,95 mm²) en cada región y lesión (cortex, SBAN, lesión activa, lesión inactiva y SEL) y en cada subtipo de EM (EMA, EMRR, EMPP y EMSP). Según el número de células contado, se asignaron los siguientes criterios: 0 si no había células positivas, +/- si había menos de 10 células por campo, + si había entre 10 y 20 células positivas, ++ si había entre 20 y 50 células positivas y +++ si había más de 50.

Se estudió la co-localización de CHI3L1 con marcadores de diferentes tipos celulares: Iba1 (microglía y macrófagos), GFAP (astrocitos), NeuN (neuronas), TPPP (oligodendrocitos). Se siguió un protocolo similar al de la inmunohistoquímica, pero con la excepción de que en este caso se utilizó el tampón *Dako antibody diluent* (Dako 53022) para diluir los anticuerpos primarios, y los anticuerpos secundarios usados estaban conjugados con fluoróforos, por lo que las incubaciones se hicieron en oscuridad. Para el marcaje nuclear se usó To-Pro 3 (MW, 642-661) y las muestras se montaron con *Prolong Gold antifade reagent* (Invitrogen, P36930).

Ante la sospecha de inespecificidad del marcaje neuronal de CHI3L1, se realizó una inmunohistoquímica con IgG conjugado con biotina para comprobar si la captación de material extracelular por parte de las neuronas se debía a un aumento de la permeabilidad de la membrana.

Los detalles de los anticuerpos usados y las condiciones de la inmunofluorescencia e inmunohistoquímica aparecen en la *Tabla 4*. El protocolo de inmunofluorescencia aparece detallado en el *Anexo Protocolos*.

3.3.4. Cuantificación de expresión de CHI3L1 mediante densitometría digital óptica

Para el estudio cuantitativo de la expresión y distribución de CHI3L1 en las diferentes regiones y lesiones estudiadas, se utilizó la técnica de densitometría digital óptica (DO), utilizando un protocolo publicado previamente (Hametner et al., 2013; Zrzavy et al., 2017) sobre imágenes tomadas de las tinciones de inmunohistoquímica de CHI3L1.

La cuantificación de CHI3L1 se llevó a cabo empleando el programa *ImageJ* para calcular la fracción de área positiva para el marcaje de diaminobencidina (DAB). Se utilizaron 3 imágenes por región de interés tomadas con el objetivo 10x (0,45 mm²). Las imágenes fueron guardadas en formato JPEG. Se aplicó un plugin de deconvolución de color para eliminar la contratinción de la hematoxilina, se convirtieron las imágenes RGB en imágenes de escala de

grises de 8 bit y después fueron invertidas. En las imágenes resultantes se fijó un umbral y se calculó el área de fracción positiva para DAB. El plugin fue creado y cedido por el grupo del Profesor Lassmann del *Center for Brain Research* en Viena y fue instalado en el programa *Image J* para su uso. Los detalles del protocolo pueden verse en el *Anexo Protocolos*.

3.3.5. Correlación de expresión de CHI3L1 con inflamación meníngea o perivascular

Se tomaron 4 imágenes no solapantes, con el objetivo 10x, de las secciones teñidas con anticuerpos anti CHI3L1 y anti CD68 (Casos EM9, EM10, EM14, EM15, EM22). En concreto, se analizaron las lesiones corticales y la SBAN en la proximidad de las lesiones. Se llevó a cabo el recuento de células positivas para CHI3L1 y CD68 usando el comando de cálculo de Photoshop. Se aislaron las células positivas en cada caso ajustando manualmente los parámetros de ruido y el umbral y fijándolos para cada imagen. La densidad celular fue calculada como el número medio de células positivas por milímetro de longitud. También se analizaron lesiones inactivas, en sustancia blanca y cortex, y lesiones de expansión lenta o SEL (tanto el borde como el centro). Las células positivas para CD68 en la periferia de vasos sanguíneos no fueron consideradas en los recuentos realizados en la SBAN. Los detalles del protocolo aparecen en *Anexo: Protocolos*.

Por otra parte, se calculó la densidad de linfocitos en los vasos sanguíneos de las mismas regiones de SBAN analizadas anteriormente y en las meninges circundantes utilizando el mismo método. Se tomaron 4 fotos no solapantes con el objetivo 10x en secciones teñidas con hematoxilina y eosina. Se estableció un gradiente de inflamación como medida de la inflamación meníngea: ausencia de linfocitos (0), presencia de un agregado de 5-50 células (+), uno o más agregados de más de 200 células (++) y uno o más agregados con más de 300 células (+++). Se estableció otro gradiente para el caso de la inflamación perivascular: inflamación leve con menos de 20 linfocitos (0+), inflamación moderada con 20-50 linfocitos (+), inflamación elevada con más de 50 linfocitos (++) e inflamación severa con más de 100 linfocitos (+++). El grado máximo de inflamación en ambos casos, en meninges y en vasos sanguíneos de la SBAN periféricos a las lesiones, fue usado para establecer el nivel máximo de inflamación (+++).

Se midió la distancia desde las áreas analizadas en las lesiones de cortex hasta los folículos meníngeos e infiltrados perivasculares en la SBAN estudiados y se estudió si existía correlación entre esta y los recuentos celulares.

3.3.6. Análisis estadístico

En este estudio, el objetivo fue estudiar la expresión diferencial de CHI3L1 por distintos tipos celulares y su relación con la inflamación circundante. El análisis descriptivo incluyó los valores de la mediana y el rango intercuartílico. Las diferencias entre grupos fueron analizadas con el test *U de Mann Whitney* asumiendo una distribución no normal de nuestros datos.

4. RESULTADOS

RESULTADOS DEL OBJETIVO 1:

Estudio de CHI3L1 en LCR y suero en EM y valor combinado con NfL para el diagnóstico de fenotipos clínicos

4.1.1. Niveles de CHI3L1_{LCR} y NfL_{LCR} en EM y relación con la actividad inflamatoria responsable de brotes

Los niveles de CHI3L1_{LCR} y NfL_{LCR} fueron mayores en los pacientes con EM respecto a los controles sin EM ($p < 0,001$). Dentro de los pacientes de EM, la dinámica de expresión y liberación de los biomarcadores fue diferente entre las diferentes formas clínicas para el caso de la CHI3L1 ($p=0,01$). Sin embargo, no se hallaron diferencias significativas entre formas clínicas en el caso del NfL ($p=0,6$) (*Tabla 1, Figura 7A*).

En cuanto a la actividad de la enfermedad, en el momento de la PL, 93 de 157 pacientes se consideraron activos (78 casos de EMRR, 9 de EMSP y 6 de EMPP), de acuerdo con la definición dada de presencia de actividad (brote clínico y/o presencia de lesión Gd+ en la RM). Tomando la población de EM sin diferenciar por fenotipos clínicos, los niveles de NfL_{LCR} se encontraron principalmente elevados en pacientes con actividad inflamatoria ($p < 0,001$) (*Figura 7B*). En el caso de los niveles de CHI3L1_{LCR}, no se hallaron diferencias significativas entre pacientes con y sin actividad inflamatoria ($p=0,862$) (*Figura 7B*).

Aunque en general los valores medios de ambos biomarcadores fueron altos en EM, los valores más extremos se correspondieron con pacientes con EMRR y enfermedad activa (*Figura 7B*).

4.1.2. Relación de CHI3L1_{LCR} y NfL_{LCR} con la actividad radiológica y la localización de las lesiones

Los niveles de NfL_{LCR} correlacionaron fuertemente con la incidencia (*Figura 8A*) ($p < 0,001$) y número de lesiones Gd+ detectadas en RM ($r=0,495$; $p < 0,001$) (*Figura 8B*). Aunque los niveles de CHI3L1 no correlacionaron en principio con la presencia de actividad clínica y/o radiológica, se halló una correlación moderada con el número de lesiones Gd+ ($r=0,398$; $p=0,001$) (*Figura 8C*). Los pacientes con valores atípicamente altos de CHI3L1_{LCR} (más de 1,5 veces por encima del Q3 del RIQ), en el contexto de un ataque clínico con niveles elevados de NfL_{LCR}, presentaron una actividad radiológica muy llamativa con un incremento en el número de lesiones Gd+, sobre todo localizadas a nivel periventricular y yuxtacortical (*Figura 8D*).

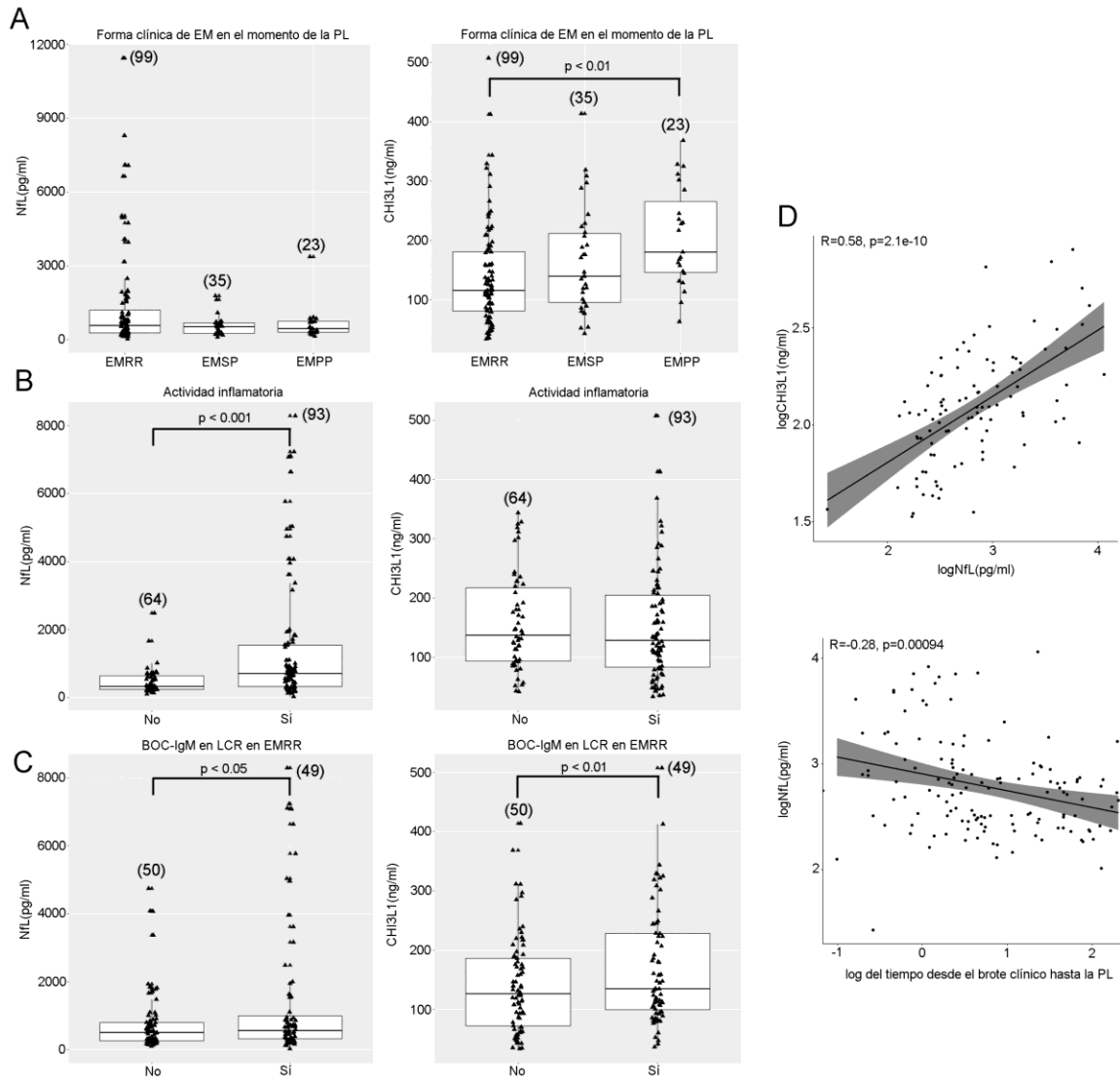


Figura 7. Niveles de CHI3L1_{LCR} y NfL_{LCR} en EM en función del fenotipo, la actividad inflamatoria y otras variables. **A.** Los niveles de NfL no fueron diferentes entre formas de EM (ANOVA $p=0,6$), mientras que los de CHI3L1 fueron mayores en EM progresiva (EMSP y EMPP) comparada con EMRR (ANOVA $p=0,01$; *Bonferroni post-hoc* EMRR vs. EMPP $p=0,009$). **B.** Los pacientes con actividad presentaron niveles mayores de NfL comparados con otros sin actividad documentada (definida como presencia de brote clínico y/o lesión Gd+ en RM en los 90 días posteriores a la PL). *T de Student* $< 0,001$. Los niveles de CHI3L1 no fueron diferentes en función de la actividad (*T de Student* $p=0,705$). **C.** Tanto NfL como CHI3L1 fueron mayores en presencia de BOC-IgM en la cohorte de EMRR (*T de Student* $p=0,02$ y $p=0,004$, respectivamente). **D.** Los niveles de NfL y CHI3L1 correlacionaron entre sí en la cohorte de EMRR ($r=0,58$, *Pearson*; $p < 0,001$). Los niveles de NfL disminuyeron con el tiempo tras el brote ($r=0,29$, *Pearson*; $p=0,04$). El tamaño muestral de cada apartado aparece entre paréntesis. El test *T de Student* y las correlaciones se realizaron con los valores de CHI3L1 y NfL transformados a logaritmos.

EM: Esclerosis múltiple; NfL: Cadena ligera de neurofilamento; CHI3L1: Chitinase 3-like 1; PL: Punción lumbar; EMRR, Esclerosis múltiple remitente-recurrente; EMSP: Esclerosis múltiple secundaria progresiva; EMPP: Esclerosis múltiple primaria progresiva; LCR: Líquido cefalorraquídeo; BOC-IgM: Bandas oligoclonales de tipo IgM; log: logaritmo.

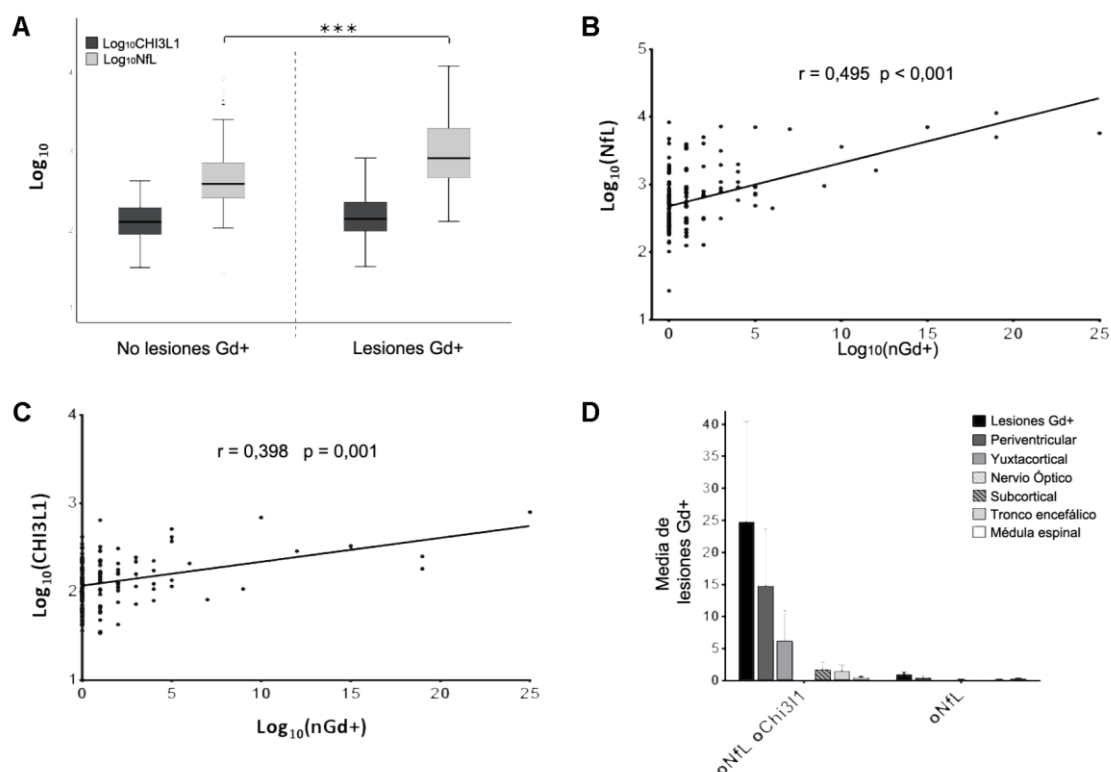


Figura 8. Relación de CHI3L1_{LCR} y NfL_{LCR} con la actividad radiológica y la localización de las lesiones.
A. Los niveles de NfL_{LCR} se asociaron a actividad radiológica, con una tendencia para CHI3L1. **B y C.** Ambos biomarcadores correlacionaron moderadamente con el número de lesiones positivas en gadolinio. **D.** Número medio de lesiones Gd+ en EM y distribución de estas lesiones en pacientes con elevados niveles de NfL y CHI3L1 (oNfL oCHI3L1) o elevado NfL y baja CHI3L1 (oNfL).

Log: Logaritmo; Gd+: captante de gadolinio; n: número; NfL: Cadena ligera de neurofilamento; CHI3L1: Chitinase 3-like 1; oNfL: Niveles elevados de NfL; oCHI3L1: Niveles elevados de CHI3L1.

4.1.3. Correlación de los niveles de CHI3L1_{LCR} y NfL_{LCR} con otras variables clínicas

Los niveles de NfL_{LCR} y CHI3L1_{LCR} fueron mayores en los pacientes con presencia de BOC-IgM (p=0,02 y p=0,004; respectivamente), pero solamente en el caso de EMRR (Figura 7C). La presencia de BOC-IgM no se asoció con la actividad de la enfermedad, considerada como la existencia de brote clínico (χ^2 ; p=0,132) o la presencia de lesiones Gd+ (χ^2 ; p=0,519) pero, a pesar de ello, los pacientes con ambas características presentaron BOC-IgM de forma más frecuente (χ^2 ; p=0,034).

Se encontró una correlación significativa entre los valores de CHI3L1_{LCR} y NfL_{LCR} en toda la cohorte analizada (r=0,46; p < 0,001), tanto al seleccionar pacientes sin actividad inflamatoria clínica o de RM (r=0,37; p=0,003) como con actividad inflamatoria (r=0,52; p < 0,001). Sin embargo, al realizar el análisis en las distintas formas clínicas de EM por separado,

solamente persistió dicha correlación en el grupo de pacientes con EMRR ($r=0,58$; $p < 0,001$) (Figura 7D), tanto con actividad ($r=0,57$; $p < 0,001$) como sin actividad ($r=0,62$; $p=0,002$). La correlación no fue significativa para el grupo de EMSP ($r=0,23$; $p=0,195$) ni para el de EMPP ($r=0,37$; $p=0,081$).

Por otro lado, se observó una leve correlación negativa entre los niveles de NfL_{LCR} con la duración de la enfermedad en el momento de la PL ($r=-0,2$; $p=0,02$), así como con el tiempo transcurrido desde el brote clínico hasta la PL ($r=-0,28$; $p=0,04$) (Figura 7D).

Los niveles elevados de CHI3L1_{LCR} se asociaron con una edad más avanzada ($r=0,2$; $p=0,013$) y mayor puntuación en la EDSS en el momento de la PL ($r=0,21$; $p=0,009$), aunque estas correlaciones fueron leves.

Por último, de los pacientes de este estudio, 49 se encontraban bajo tratamiento (26 con TME de primera línea, 20 con TME de segunda línea y 3 con ASCT). No se encontraron diferencias, en el momento de la PL, entre pacientes tratados y pacientes sin tratamiento en los niveles medios de NfL_{LCR} ($p=0,8$) y CHI3L1_{LCR} ($p=0,2$).

4.1.4. Correlación entre la discapacidad neurológica y los niveles de CHI3L1_{LCR} y NfL_{LCR} en el momento de la punción lumbar en EM

La puntuación en la EDSS en el momento de la punción lumbar correlacionó levemente con los valores de NfL_{LCR} y CHI3L1_{LCR} ($r=0,19$, $p=0,03$; $r=0,308$, $p < 0,001$; respectivamente). Sin embargo, los niveles de ambos biomarcadores no correlacionaron con la carga general lesional ($p=0,349$ y $p=0,331$; respectivamente) o con la localización de las lesiones inactivas en T2, y la correlación fue moderada con la actividad radiológica (Figura 8B y 8C). Los niveles de CHI3L1_{LCR} fueron significativamente más elevados en las formas progresivas de EM comparadas con las de EMRR (Figura 7A) ($p=0,009$), tras ajustar por sexo, edad y duración de la enfermedad (Tabla 1), aunque el influjo de la edad fue significativo ($p=0,001$).

Tras la PL, se hizo un seguimiento prospectivo a la cohorte de pacientes seleccionados para el estudio y se recogieron los datos clínicos y de discapacidad, incluyendo la tasa de brote y la fecha de conversión a forma progresiva.

Un 25% de los pacientes con EMRR incrementaron en 1 punto la discapacidad medida por la EDSS tras la PL. El análisis bivariado *Kaplan Meier* mostró que la CHI3L1 tenía un valor predictivo de dicho incremento de discapacidad (log-rank $p=0,018$), mientras que el NfL solamente experimentaba una tendencia (log-rank $p=0,0523$), y lo mismo ocurría con la

actividad de la enfermedad (log-rank $p=0,109$). El análisis multivariable Cox concluyó que solamente la CHI3L1 permanecía como un predictor independiente de la discapacidad {HR=2,99 [IC 95% (1,27 - 7,07)]} (Tabla 5).

Por su parte, un 14 % de los casos de EMRR progresaron a la forma EMSP. Mediante el análisis bivariado *Kaplan Meier* se mostró que tanto CHI3L1 (log-rank $p=0,0001$), como NfL (log-rank $p=0,015$) y la actividad de la enfermedad (log-rank $p=0,001$) eran buenos biomarcadores para diagnosticar EMSP. Mediante el análisis multivariable Cox, se mostró que los niveles elevados de CHI3L1 {HR=18 [IC 95% (2,31 - 141,3)]}, y la presencia de actividad {HR=0,186 [IC 95% (0,06 - 0,62)]} se asociaban a progresión de la enfermedad tras la PL (Tabla 5). Sin embargo, el NfL en este análisis no resultó ser buen predictor de progresión.

En general, durante el seguimiento clínico, 57 de los pacientes analizados tuvieron que cambiar a TME de segunda línea (9 fingolimod, 29 natalizumab, 14 rituximab, 2 ASCT, 1 alemtuzumab, 2 metotrexato). En este caso, el análisis bivariado *Kaplan Meier* mostró que el sexo (log-rank $p=0,043$) y la EDSS (log-rank $p=0,047$) fueron buenos marcadores pronósticos de necesidad de cambio de tratamiento. Sin embargo, el análisis multivariado no mostró ningún marcador con valor predictivo para este caso.

Por otra parte, un 42% de los pacientes EMRR presentaron un brote tras la PL. El análisis bivariado *Kaplan Meier* detectó el sexo (log-rank $p=0,043$) y la EDSS (log-rank $p=0,046$) como marcadores pronósticos de brote clínico. Sin embargo, el análisis multivariado no determinó ningún marcador con dicho valor en este caso.

Tabla 5. Análisis de regresión Cox para incremento de 1 punto en EDSS y diagnóstico de progresión en pacientes con EMRR durante el seguimiento

	Estimado	Error estándar	HR	IC < 95%	IC > 95%	p
Incremento de 1 punto en EDSS						
Log ₁₀ (CHI3L1)	1,097	0,438	2,996	1,269	7,074	0,008
Progresión de la enfermedad						
Log ₁₀ (CHI3L1)	2,893	1,050	18,044	2,305	141,3	0,0002
Actividad enfermedad	-1,682	0,607	0,186	0,057	0,611	0,002

HR: Hazard ratio; EDSS: Escala expandida de discapacidad; EMRR: Esclerosis múltiple recurrente-remitente; Log: Logaritmo; CHI3L1: Chitinase 3-like 1; IC: Intervalo de confianza.

4.1.5. Valor de la medición combinada de los niveles de NfL_{LCR} y CHI3L1_{LCR} en el pronóstico de la progresión y en la estratificación de la EM en los distintos subtipos

Con el propósito de investigar el valor de la medición combinada de NfL_{LCR} y CHI3L1_{LCR} en el pronóstico de la EM, se estratificaron los pacientes en cuatro grupos según los niveles de ambos biomarcadores, considerando como mediana el valor calculado en la cohorte de EMRR sin actividad inflamatoria (Grupo 1: NfL y CHI3L1 por debajo de la mediana; Grupo 2: elevado NfL; Grupo 3: elevada CHI3L1; Grupo 4: NfL y CHI3L1 por encima de la mediana). El análisis bivariado utilizando perfiles de biomarcadores como predictores mostró que los pacientes del grupo 4 tenían más probabilidad de recibir un diagnóstico de la forma progresiva respecto a los demás grupos ($p=0,02$) (Figura 9). Sin embargo, los niveles combinados de ambos biomarcadores no presentaron correlación significativa con el incremento en un punto en la escala de discapacidad ($p=0,094$), necesidad de terapia escalada ($p=0,173$) o brote tras la PL ($p=0,783$).

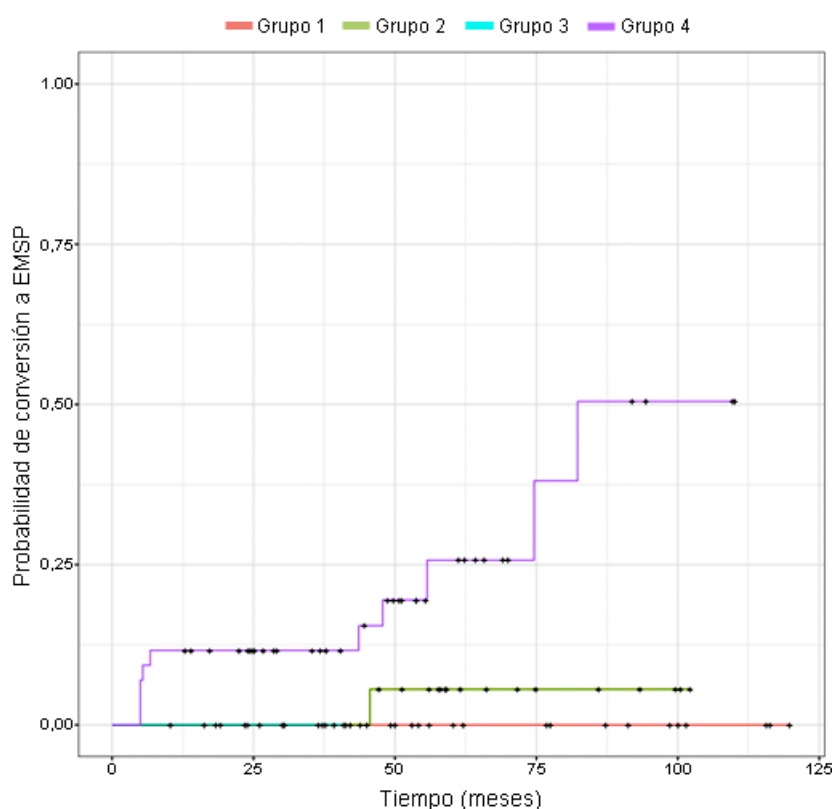


Figura 9. Probabilidad de conversión a EMSP según los niveles de NfL_{LCR} y CHI3L1_{LCR}. Grupo 1: NfL y CHI3L1 por debajo de la mediana; Grupo 2: elevado NfL; Grupo 3: elevada CHI3L1; Grupo 4: NfL y CHI3L1 por encima de la mediana. Los pacientes del grupo 4 presentaron mayor probabilidad de ser diagnosticados como EMSP durante el seguimiento, comparados con el resto de grupos. ($p=0,02$).

EMSP: Esclerosis múltiple secundaria progresiva.

La representación de los valores emparejados de NfL/CHI3L1 (cada par corresponde a un paciente), en diagramas de densidad mostró que la densidad máxima de pacientes estaba claramente distribuida entre controles sin EM y casos de EM y, dentro de estos últimos, entre las distintas formas de la enfermedad. Los pacientes con EMRR que fueron diagnosticados como EMSP durante el seguimiento, presentaron concentraciones de NfL y CHI3L1 superiores a la mediana establecida (*Figura 10*).

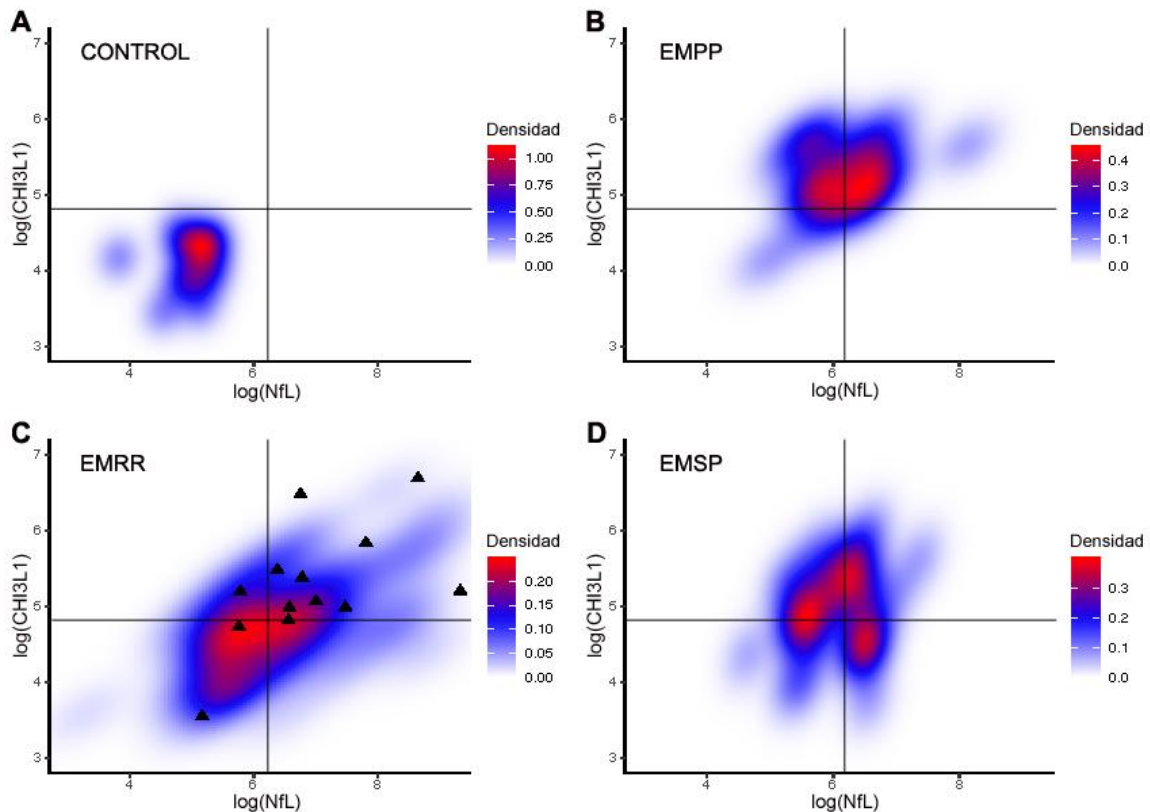


Figura 10. Mapas de densidad representando los valores de NfL y CHI3L1 en el LCR de controles sin EM y pacientes con EM. Las líneas negras de cada diagrama representan los valores logaritmicados de la mediana de NfL_{LCR} y CHI3L1_{LCR} en la cohorte completa. Cada subgrupo tiene un pico de densidad de pacientes en una posición diferente respecto a la mediana. **A.** En el grupo control sin EM casi todos los pacientes se establecen en el cuadrante inferior izquierdo. **B.** En el subgrupo de EMPP, los niveles de CHI3L1 están por encima de la mediana en la mayoría de pacientes, y se distinguen dos grupos atendiendo a los niveles de NfL. **C.** En el grupo de EMRR, los triángulos negros representan a los pacientes que tras el período de seguimiento evolucionaron a una forma progresiva. **D.** Los pacientes con EMSP constituyen un mapa de densidad intermedio con tres regiones de distribución.

NfL: Cadena ligera de neurofilamento; CHI3L1: Chitinase 3-like 1; EMRR: Esclerosis múltiple remitente-recurrente; EMSP: Esclerosis múltiple secundaria progresiva; EMPP: Esclerosis múltiple primaria progresiva; log: logaritmo.

Además, se utilizó un modelo de regresión logística multinomial para estudiar el valor combinado de ambos biomarcadores para discriminar fenotipos de EM y predecir progresión.

El análisis mostró que la combinación de NFL_{LCR} y CHI3L1_{LCR} presentaba capacidad para discriminar entre EMRR y EMSP [HR 0,41 (0,18 - 0,82)] y entre EMRR y EMPP [HR 0,46 (0,19 - 0,98)], pero no mostró poder estadístico para predecir el diagnóstico de EMSP {0,96 [IC del 95% (0,54 - 1,63)]} (Tabla 6).

Tabla 6. Modelo de regresión multinomial para el valor combinado de CHI3L1- NFL en la discriminación de fenotipos clínicos

	Estimado	Error estándar	Exp (Estimado)	IC < 95%	IC > 95%
EMPP Intercept*	-1,552	0,34	0,212	0,102	0,394
EMSP Intercept	-0.819	0,239	0,441	0,267	0,697
Switch Intercept	-2.198	0,376	0,111	0,049	0,219
Controles sin EM Intercept	-7,931	2,44	0	0	0,018
EMPP logCHI3L1	1,644	0,388	5,173	2,514	11,199
EMPP logNFL	-0,983	0,446	0,374	0,149	0,862
EMPP logCHI3L1: logNFL	-0,771	0,437	0,462	0,186	0,975
EMSP logCHI3L1	0,804	0,311	2,235	1,233	4,181
EMSP logNFL	-0,948	0,34	0,387	0,195	0,723
EMSP logCHI3L1: logNFL	-0,896	0,399	0,408	0,177	0,819
Switch logCHI3L1	0,924	0,445	2,518	1,098	6,293
Switch logNFL	-0,064	0,419	0,938	0,415	2,129
Switch logCHI3L1: logNFL	-0,04	0,285	0,961	0,544	1,631

*La categoría de referencia es EMRR. Los resultados significativos aparecen resaltados en **negrita**.

EMRR: Esclerosis múltiple remitente-recurrente; EMSP: Esclerosis múltiple secundaria progresiva; EMPP: Esclerosis múltiple primaria progresiva; Switch: diagnóstico de EMSP durante el seguimiento; logNFL: Logaritmo de los niveles de NFL en LCR; logCHI3L1: Logaritmo de los niveles de CHI3L1 en LCR; IC: Intervalo de confianza.

Sin embargo, la representación de estos datos en un gráfico de efectos marginales mostró que la probabilidad de cambiar de EMRR a enfermedad progresiva fue característica de pacientes con mayores concentraciones de NFL_{LCR} y CHI3L1_{LCR} (Figura 11C). Los fenotipos de EM correspondientes a niveles bajos y medios de NFL aparecen representados en la Figura 11A,B.

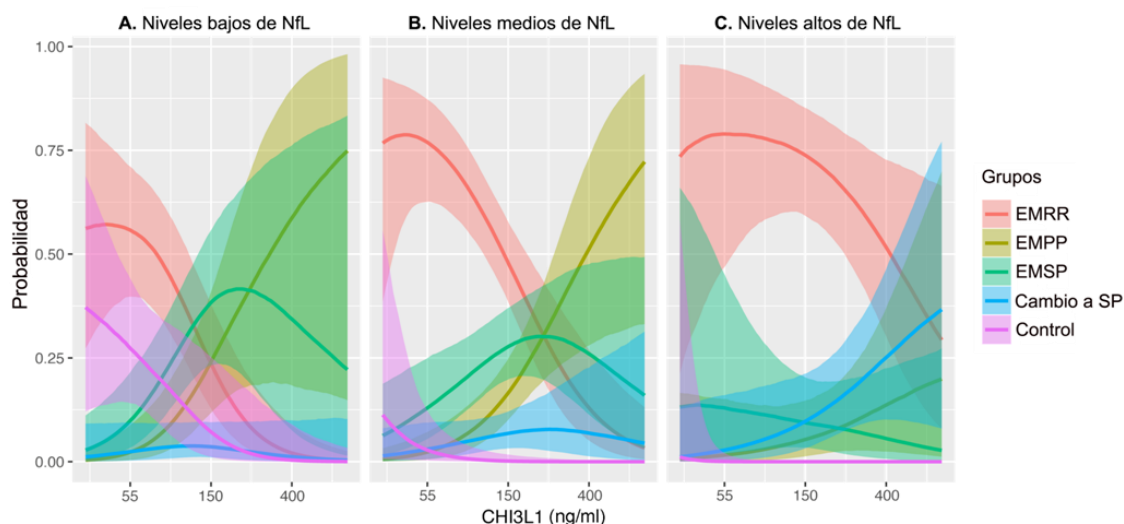


Figura 11. Gráfico de efectos marginales: probabilidad de tener un fenotipo de EM según niveles de CHI3L1 y NfL Esta representación gráfica del modelo de regresión multinomial realizado muestra la probabilidad de estar comprendido en una forma clínica de EM, incluida la probabilidad de conversión a EMSP, según los niveles de NfL_{LCR} y CHI3L1_{LCR}. Por lo tanto, este diagrama muestra la interacción entre ambos biomarcadores. **A.** Cuando los niveles de NfL son bajos, los niveles bajos de CHI3L1 implican una mayor probabilidad de ser un control sin EM (rosa) o un paciente con EMRR (rojo). Niveles altos de CHI3L1 en estos pacientes están asociados con el diagnóstico de EM progresiva (verde y verde caqui). La probabilidad de cambiar a EMSP es muy baja (azul). **B.** Con niveles promedio de NfL, la probabilidad de pertenecer a un control disminuye, y los niveles de CHI3L1 discriminan mejor entre EMRR (CHI3L1 baja) y EMPP (CHI3L1 alta). **C.** Con niveles altos de NfL, la probabilidad de formar parte del grupo de EMRR es la más alta. NfL y CHI3L1 elevados son más probables en pacientes diagnosticados de EMSP durante el seguimiento y en un subgrupo de pacientes con EMPP, probablemente pacientes con EMPP activa.

NfL: Cadena ligera de neurofilamento; CHI3L1: Chitinase 3-like 1; EMRR: Esclerosis múltiple remitente-recurrente;

EMSP: Esclerosis múltiple secundaria progresiva; EMPP: Esclerosis múltiple primaria progresiva; Cambio a SP: diagnóstico de EMSP durante el seguimiento.

4.1.6. Grado de correlación entre los niveles de CHI3L1 en suero y en LCR en EM

Puesto que los niveles de CHI3L1_{LCR} podrían ser informativos de la actividad inflamatoria innata de la enfermedad en los pacientes que cursan con brotes o en los progresivos, se estudió la correlación con los niveles en suero y su valor como potencial marcador subrogado de inflamación continua de bajo grado. La CHI3L1 en suero presentó una tendencia a ser mayor en los pacientes con EMP comparados con los pacientes con EMRR [31,9 ng/ml (25 - 40.1) y 28,63 ng/ml (22,5 - 37,6), respectivamente; $p=0,062$], y fue significativamente más elevada en los casos de EMPP [38,2 ng/ml (26,7 - 49,8); $p=0,014$]. Sin embargo, no se halló correlación con la CHI3L1_{LCR} ($r=0,150$; $p=0,162$) y no fue asociada tampoco a la presencia de actividad inflamatoria ($p=0,1$), lesiones captantes de gadolinio ($p=0,397$) o puntuación en la EDSS en el momento de la PL ($p=0,188$).

RESULTADOS DEL OBJETIVO 2:

Estudio comparativo de CHI3L1 en EM y otras enfermedades desmielinizantes

4.2.1. Niveles de CHI3L1_{LCR} en diferentes enfermedades desmielinizantes

En los pacientes de NMO seropositivos (AQP4+) la característica más destacada, además de los elevados niveles de NfL_{LCR} (*Figura 12A*), fue la elevada concentración de CHI3L1 en formas activas, dos veces mayor que la hallada en EM, y significativamente diferente tras realizar ajustes de género, edad y duración de la enfermedad ($p < 0,001$) (*Figura 12B*). Sin embargo, en remisión, los niveles fueron bajos y no se hallaron diferencias significativas con los pacientes de EM y EAD (*Figura 12B*).

Un ataque monofásico en EAD, una enfermedad inflamatoria de corta duración, viene seguido por una eliminación de la inflamación, algo de pérdida axonal perivascular, gliosis astrocítica y remielinización de los axones desmielinizados restantes. En nuestro estudio, los niveles extremadamente altos de NfL_{LCR} (*Figura 12A*) reflejaron el extenso daño axonal en la fase aguda de la EAD que se asoció a una peor puntuación en la EDSS ($r=0,622$; $p=0,031$). Del mismo modo, los niveles de CHI3L1_{LCR} reflejaron una actividad inflamatoria intensa en las primeras etapas de la enfermedad que se normaliza en etapas posteriores sin actividad o remisión (*Figura 12B*). Se obtuvo una correlación negativa entre los niveles de CHI3L1_{LCR} en EAD y el tiempo del ataque clínico ($r=-0,649$; $p=0,012$).

En los pacientes de EM analizados, el incremento de los niveles de CHI3L1_{LCR} en fases activas no fue tan acusado como en los casos de NMO y EAD (*Figura 12B*). Al analizar las formas de EMP y EMRR por separado, se observó que los niveles de CHI3L1_{LCR} fueron mayores en las formas progresivas, tanto en actividad como en remisión (*Figura 12C*). En ausencia de actividad inflamatoria, exclusivamente los casos de EMP mantuvieron los niveles elevados de CHI3L1_{LCR}, aunque el tamaño muestral analizado para NMO y EAD no fue suficiente para obtener diferencias significativas (*Figura 12D*).

4.2.2. Correlación clínico-patológica de la expresión de CHI3L1 en muestras de EM y enfermedades desmielinizantes no progresivas

Expresión de CHI3L1 en muestras de EM

La expresión global de CHI3L1 en las lesiones de EM determinada por DO siguió el patrón de liberación de CHI3L1 al LCR que se ha descrito anteriormente en este trabajo. Los cerebros con EM manifestaron una expresión mayor comparados con los controles, tanto en SBAN (*Figura 13A-C*) como en cortex (*Figura 13D-F*). La expresión fue más acusada en EM temprana (EM

aguda) (Figura 13), pero también fue muy prominente en formas progresivas de EM (Figura 15).

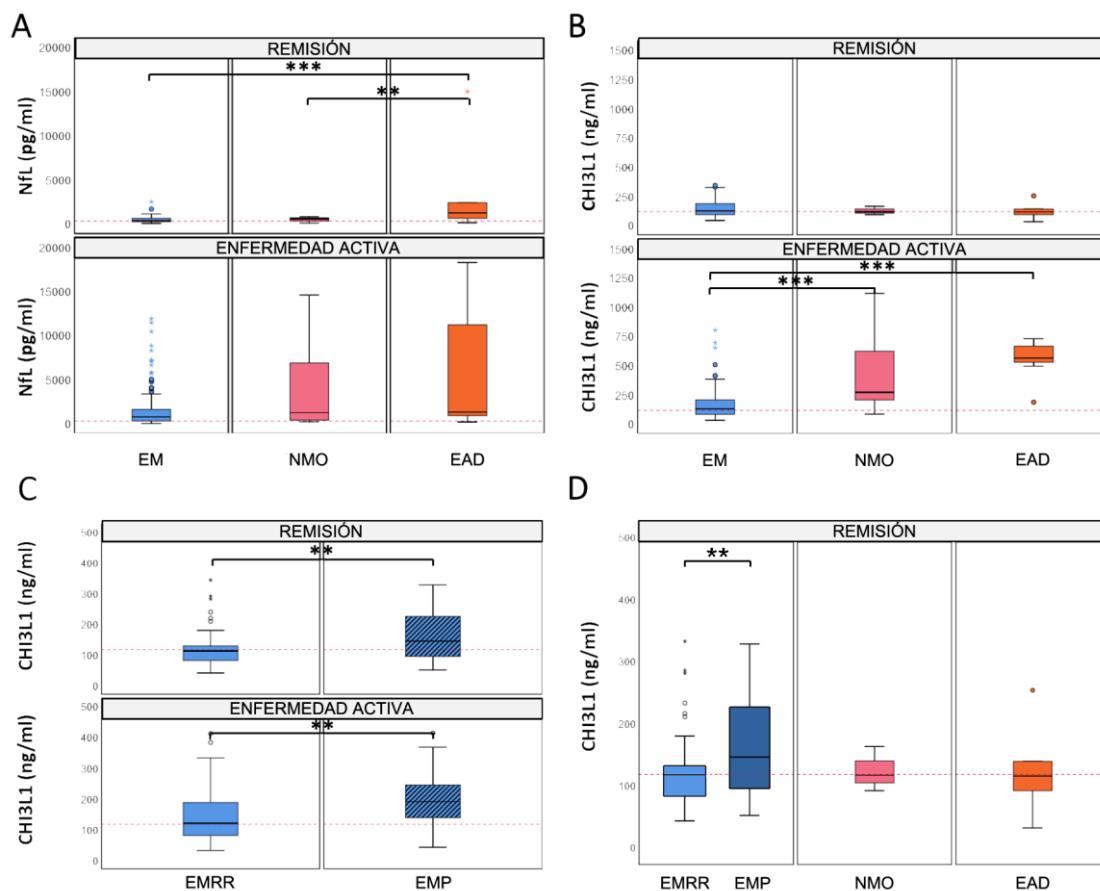


Figura 12. Niveles de NfL_{LCR} y $CHI3L1_{LCR}$ en EM, NMO y EAD atendiendo a la presencia de actividad de la enfermedad. A. Los niveles de NfL en el LCR fueron significativamente mayores en el contexto de actividad de la enfermedad solo en EM. En remisión, los niveles de NfL en EAD fueron significativamente mayores que en EM y NMO. B. Los niveles de $CHI3L1_{LCR}$ fueron mayores en EM, NMO y EAD durante la presencia de actividad, siendo mayores en NMO y EAD comparados con EM. Los niveles de $CHI3L1$ en EAD fueron significativamente mayores respecto a la fase de remisión. C. Los niveles de $CHI3L1$ fueron significativamente mayores en EMP independientemente de la actividad. D. Los pacientes con EMP presentaron una tendencia a presentar mayores niveles de $CHI3L1$ que los pacientes con NMO y EAD en remisión. La mediana de los niveles de NfL y $CHI3L1$ en EMRR fuera de brote aparece representada como una línea roja de referencia. Se consideró un p-valor < 0,05 como estadísticamente significativo.

NfL : Cadena ligera de neurofilamento; $CHI3L1$: Chitinase 3-like 1; EM: Esclerosis múltiple; EMP: Esclerosis múltiple progresiva; EMRR: Esclerosis múltiple remitente-recurrente; NMO: Neuromielitis óptica; EAD: Encefalomiелitis aguda diseminada.

La expresión más elevada de $CHI3L1$ se detectó en lesiones activas y en SBAN de formas agudas (Figura 13B, I; Figura 14A), pero también se registró una expresión notable en lesiones activas crónicas y SEL de los especímenes de casos con EM progresiva (Figura 14A, Figura 15J-L).

Expresión diferencial de CHI3L1 en distintos tipos celulares

Un análisis más detallado mostró que la CHI3L1 se expresaba principalmente en dos tipos celulares diferentes, los macrófagos/microglía y los astrocitos (*Figura 13J-O*). La expresión en células CD68 positivas (macrófagos/microglía) fue hallada principalmente en estadios tempranos de actividad de lesión (*Figura 13H-I*). Las células positivas para Iba1 y CHI3L1 fueron mayoritariamente células redondeadas, mientras que el hallazgo de esta colocación en microglía ramificada fue infrecuente.

En estadios más tardíos de lesiones activas (lesiones crónicas activas), en SEL y en SBAN o SGAN, predominó la expresión de CHI3L1 en astrocitos. En el caso de SBAN y SGAN, la CHI3L1 se expresó de forma difusa (*Figura 13B,C,E,F*), mientras que en el caso de las lesiones crónicas activas, incluidas las SEL, el marcaje de CHI3L1 en astrocitos se halló principalmente en la periferia de las lesiones, formando una especie de borde activo (*Figura 15J-L*). Sin embargo, en las lesiones inactivas apenas se encontró expresión de CHI3L1 (*Figura 15 O,R*).

No se encontró colocación entre CHI3L1 y marcadores de oligodendrocitos (TPPP). Sin embargo, sí se observó marcaje de CHI3L1 en algunas neuronas, pero se consideró como un marcaje inespecífico secundario a daño del tejido durante la licuefacción postmortem, la fijación y el procesamiento histológico, tras comprobar que las mismas células captaban IgG biotinilada.

Relación entre CHI3L1 y la inflamación circundante

Atendiendo a la asociación de las células CHI3L1 positivas con los infiltrados inflamatorios en lesiones activas tardías, sus números correlacionaron significativamente con la densidad de macrófagos/microglía CD68 positivos ($r=0,626$; $p < 0,001$) (*Figura 14E*). Sin embargo, aunque se halló una leve correlación entre la densidad de células CD68 positivas y la infiltración linfocitaria en el tejido (*Figura 14F*), no se halló asociación entre la densidad de CD68 y la inflamación meníngea ($p=0,621$) y tampoco entre las células CHI3L1 positivas y los agregados de linfocitos en la SBAN ($p=0,116$) o en meninges ($p=0,627$). La distancia entre las áreas seleccionadas para los recuentos celulares y los folículos meníngeos no correlacionó con los valores de densidad de CD68 y CHI3L1 obtenidos ($r=0.158$; $p=0.300$) y lo mismo ocurrió en el caso de la distancia con los infiltrados perivasculares de la SBAN ($r=-0,044$; $p=0.768$).

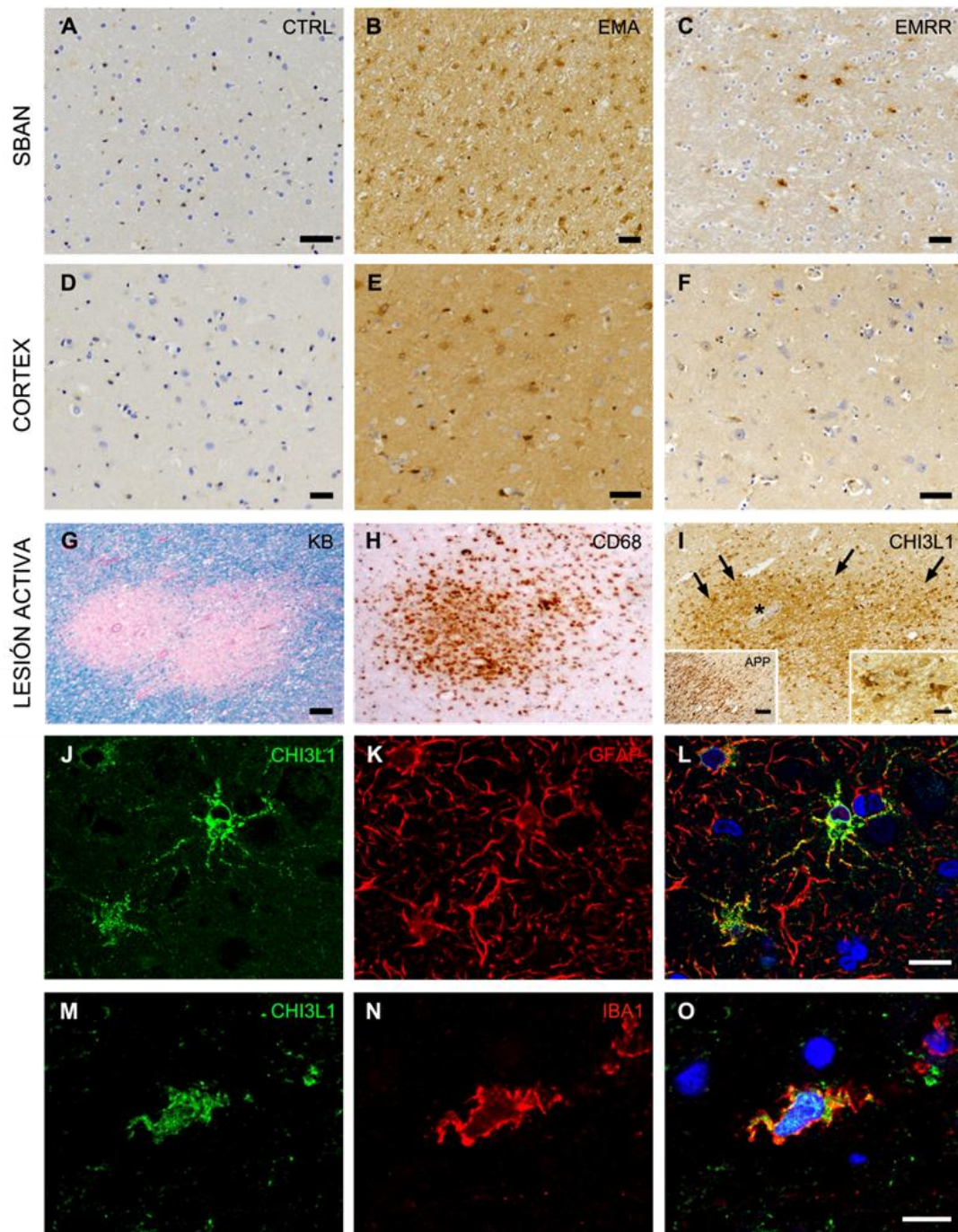
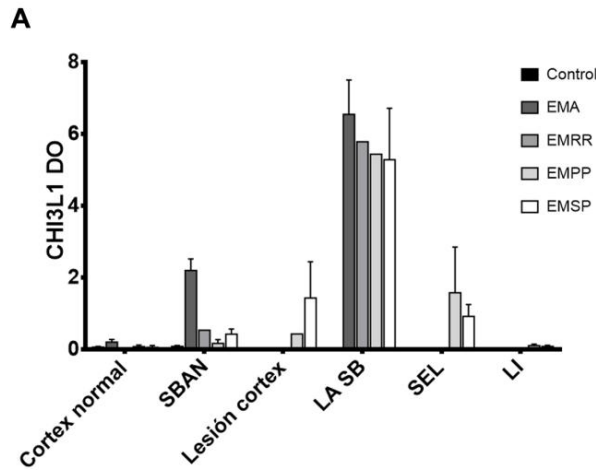


Figura 13. Distribución de CHI3L1 en cerebro de controles, EMA y EMRR. A-I. Tinciones realizadas sobre cortes de cerebro de controles y EM. **A-C. SBAN.** La expresión de CHI3L1 no fue hallada en SBN en controles (A), pero si apareció de forma difusa en la SBAN de EMA (B) y EMRR (C). **D-F. Cortex.** De forma similar, los controles no presentaron CHI3L1 en el cortex (D), mientras que ésta fue débil en el cortex de EMA (E) e indetectable en el cortex de EMRR (F). **G-I. Lesión activa.** Lesión temprana de sustancia blanca en EMA, desmielinizada (tinción *klüber barrera*) (G), con infiltrados perivenulares de células CD68+ (H). Dentro de la lesión, la expresión de CHI3L1 fue intensa (I), con células redondeadas en el centro, microglía, y un borde activo de células ramificadas correspondientes a astrocitos (detalle en I). **J-O. Inmunofluorescencia de marcadores de astrocitos y microglía.** La CHI3L1 fue coexpresada con marcadores de astrocitos (GFAP) (J-L) y de microglía (IBA1) (M-O). Escalas: 50 μm (A-F), 200 μm (G-I), 20 μm (detalle en I), 10 μm (J-O).

SBAN: Sustancia blanca de apariencia normal; CTRL: Control; CHI3L1: Chitinase 3-like-1; EMA: Esclerosis múltiple aguda; EMRR: Esclerosis múltiple remitente-recurrente; GFAP: Proteína acida fibrilar glial; Iba1: Molécula adaptadora de unión a calcio ionizada 1, marcador de microglia; KB: Klüber barrera.



B

Área	Córtex		SBN		LESIÓN SB		LESIÓN INACTIVA		SEL	
	Microglia	Astrocitos	Microglia	Astrocitos	Microglia	Astrocitos	Microglia	Astrocitos	Microglia	Astrocitos
CONTROLES	+/-	0	+/-	0						
EMA	+	0	++	+	+++	++				
EMP	+/-	++	+/-	+	++	++	0	0	+	++

EMA: Esclerosis múltiple aguda; EMP: Esclerosis múltiple progresiva; SBN: Sustancia blanca normal; SB: sustancia blanca; SEL: lesión de expansión lenta

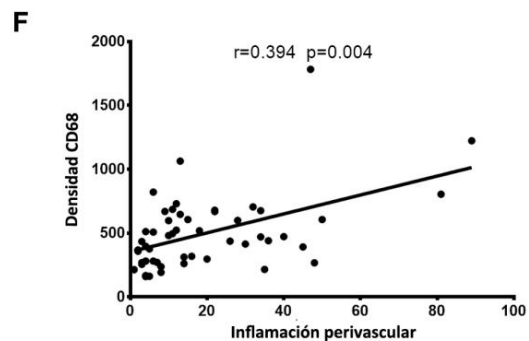
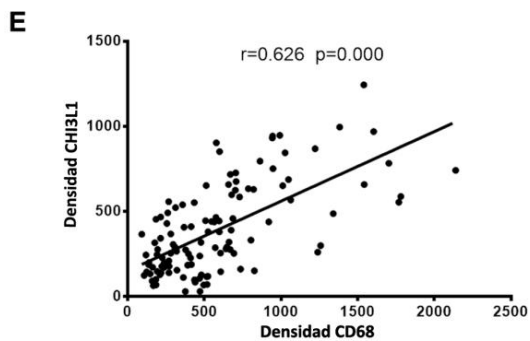
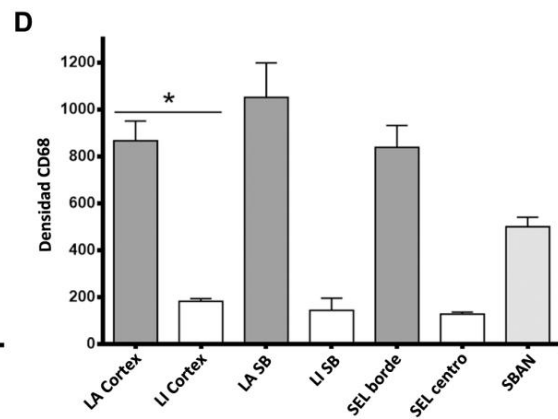
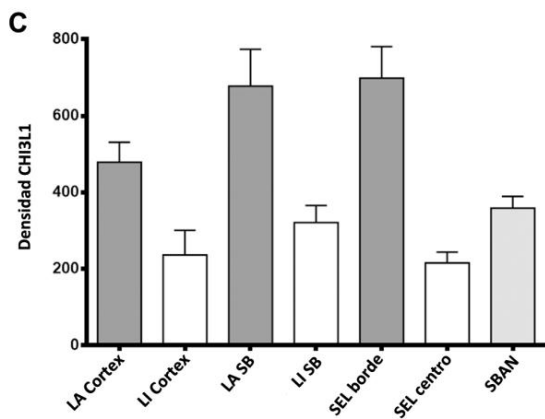


Figura 14. Expresión de CHI3L1 en diferentes regiones y estadios de Esclerosis múltiple y su relación con la respuesta inmune. **A.** Cuantificación de la expresión de CHI3L1 mediante DO en diferentes áreas en todos los fenotipos de EM y controles. **B.** Expresión cualitativa de CHI3L1 en microglía y astrocitos en las regiones analizadas de EMA, EMP y controles. 0: ausencia de células CHI3L1 positivas; +/-: <10 células/campo; +: 10-20 células/campo; ++: 20-50 células/campo; +++: >50 células/campo. **C.** Densidad de células CHI3L1 positivas atendiendo al área y tipo de lesión. **D.** Densidad de células CD68 positivas atendiendo al área y tipo de lesión. **E.** Correlación positiva entre el número de células CHI3L1 positivas y CD68 positivas en todas las regiones analizadas. **F.** Correlación positiva entre el número de infiltrados perivasculares y la densidad de células CD68 positivas. La densidad de CHI3L1 no presentó correlación con la inflamación (no mostrado).

Densidad de CHI3L1: LA córtex vs LI córtex ($p=0,053$), LA SB vs LI SB ($p=0,083$), SEL borde vs SEL centro ($p=0,053$). Densidad de CD68: LA córtex vs LI córtex ($p=0,000$), LA SB vs LI SB ($p=0,083$), SEL borde vs SEL centro ($p=0,053$).

CHI3L1: chitinase 3-like 1; EMA: Esclerosis múltiple aguda; EMP: Esclerosis múltiple progresiva, EMRR: Esclerosis múltiple remitente-recurrente; EMPP: Esclerosis múltiple primaria progresiva; EMSP: Esclerosis múltiple secundaria progresiva; LA: lesión activa; LI: lesión inactiva; SB: sustancia blanca; SBAN: sustancia blanca de apariencia normal; SEL: lesión de expansión lenta.

Asociación de CHI3L1 y neurodegeneración

Los niveles de NfL_{LCR} pueden detectarse a nivel patológico como daño agudo neuronal y axonal que se manifiesta con acumulación de la proteína precursora amiloide (APP) en axones y neuronas distróficas. Esto correlaciona con los datos observados de liberación de NfL al LCR.

En los casos de EMA y EMRR, se observó la acumulación de esferoides APP positivos en lesiones activas, coexistiendo con células CHI3L1 positivas (*Figura 13I*, detalle del lado izquierdo). En las formas de EMP, se halló el marcaje de APP en el borde de las lesiones activas de la SB, en lesiones crónicas activas y SEL (*Figura 15G-I*) con una estrecha relación espacial con la presencia de CHI3L1.

En el caso de EAD analizado, también se detectó el marcaje de APP a nivel perivascular, coexistiendo con las células CHI3L1 positivas (*Figura 16K*).

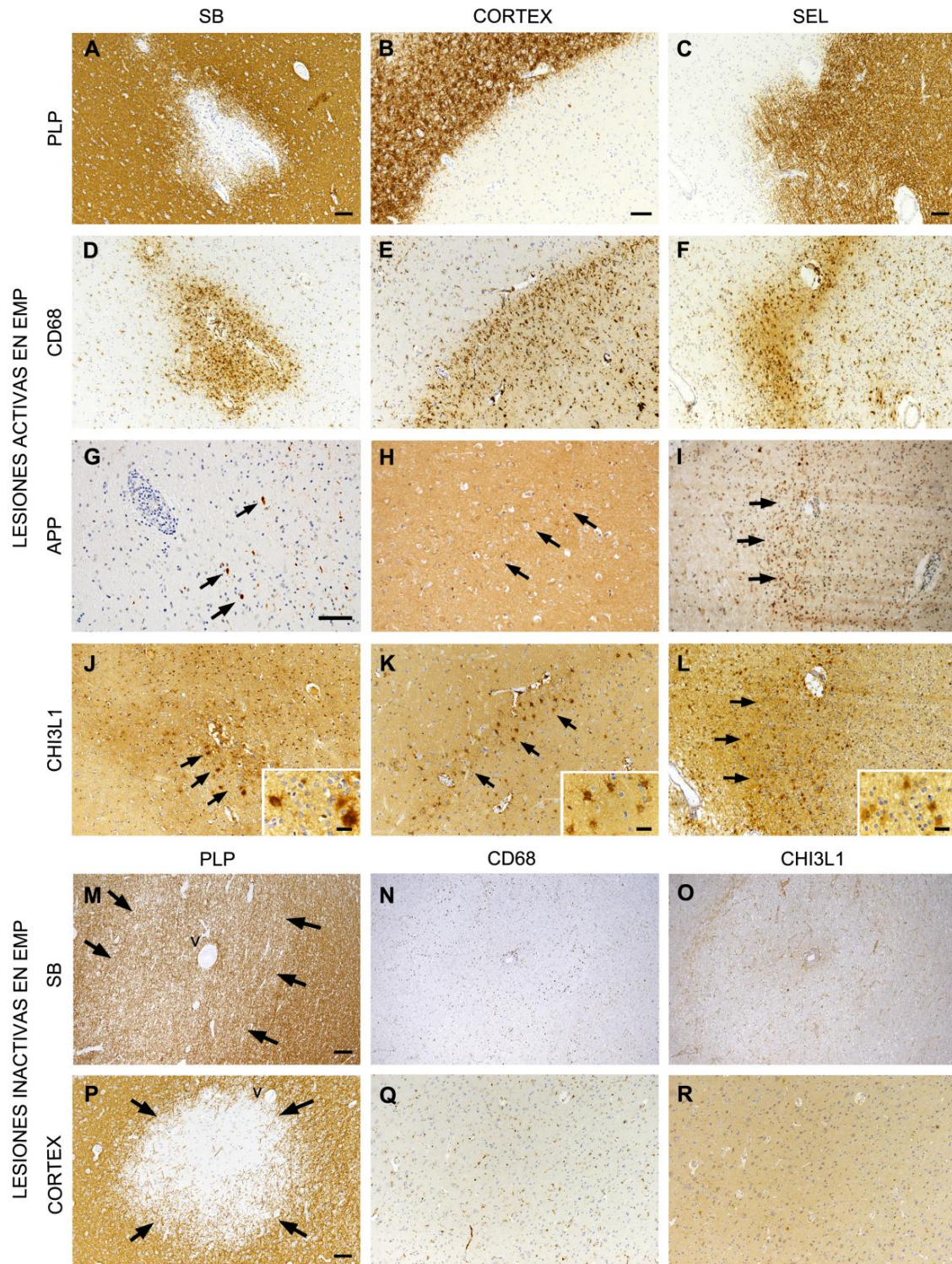


Figura 15. Distribución de la expresión de CHI3L1 en el cerebro de casos de EM progresiva.
A-L. Imágenes de lesiones activas en EMP. Lesiones activas en Sustancia blanca (columna izquierda), córtex (columna central) y SEL (columna derecha). Todas las lesiones activas mostraron desmielinización extensiva manifestada como pérdida de reactividad a PLP (A-C), presencia de infiltrados inflamatorios de células CD68+ (D-F) y acumulación de APP en axones seccionados y esferoides como signo de neurodegeneración (G-I). La expresión de CHI3L1 fue menos difusa y más restringida al borde de expansión de las lesiones (J-L, flechas), y la mayoría de células fueron morfológicamente identificadas como astrocitos (ver detalles en J-L).

M-R. Lesiones inactivas en EMP. Las lesiones inactivas fueron caracterizadas por desmielinización y ausencia de células inflamatorias (células CD68+ o CHI3L1+), tanto en SB como en lesiones corticales (M-O y P-R, respectivamente).

Escalas: 100 μ m (A-L, P-R), 250 μ m (M-O); 20 μ m (detalles en J-L).

CHI3L1: Chitinase 3-like 1; EMP: Esclerosis múltiple progresiva; SB: sustancia blanca; SEL: lesión de expansión lenta; PLP: proteína lipídica de mielina; APP: proteína precursora amiloide; v: vaso sanguíneo.

Expresión de CHI3L1 en otras enfermedades desmielinizantes inflamatorias no progresivas

En la muestra de NMO analizada, se estudiaron dos lesiones activas y una inactiva. Las tinciones de GFAP y AQP4 mostraron el centro de la lesión desprovisto de astrocitos (*Figura 16A,B*).

El centro activo se caracterizó por la presencia de células positivas para CHI3L1 y CD68, además de contar con una hilera de astrocitos hipertróficos en el borde de expansión de la lesión con co-expresión de CHI3L1 y GFAP (*Figura 16D,E*). Los astrocitos positivos para CHI3L1 presentaron la característica de ser células engrandecidas que habían perdido sus expansiones, un proceso conocido como clasmatodendrosis (*Figura 16E, detalle*), que suele ir acompañado de una necrosis posterior.

En el centro inactivo, y tanto en la sustancia blanca como en la gris de apariencia normal, no se hallaron astrocitos positivos para CHI3L1. Sin embargo, en algunas lesiones inactivas, la CHI3L1 permaneció en el espacio extracelular (*Figura 16H*), lo que podría ser explicado por una liberación masiva de esta proteína desde los astrocitos necróticos hacia el medio extracelular.

En el caso de EAD analizado, la liberación temprana de CHI3L1 en el LCR aparentemente provino de la infiltración perivascular de microglía activada en las lesiones activas, en la SBAN o en la SGAN (*Figura 16I-J*), ya que no se encontraron astrocitos que expresaran CHI3L1.

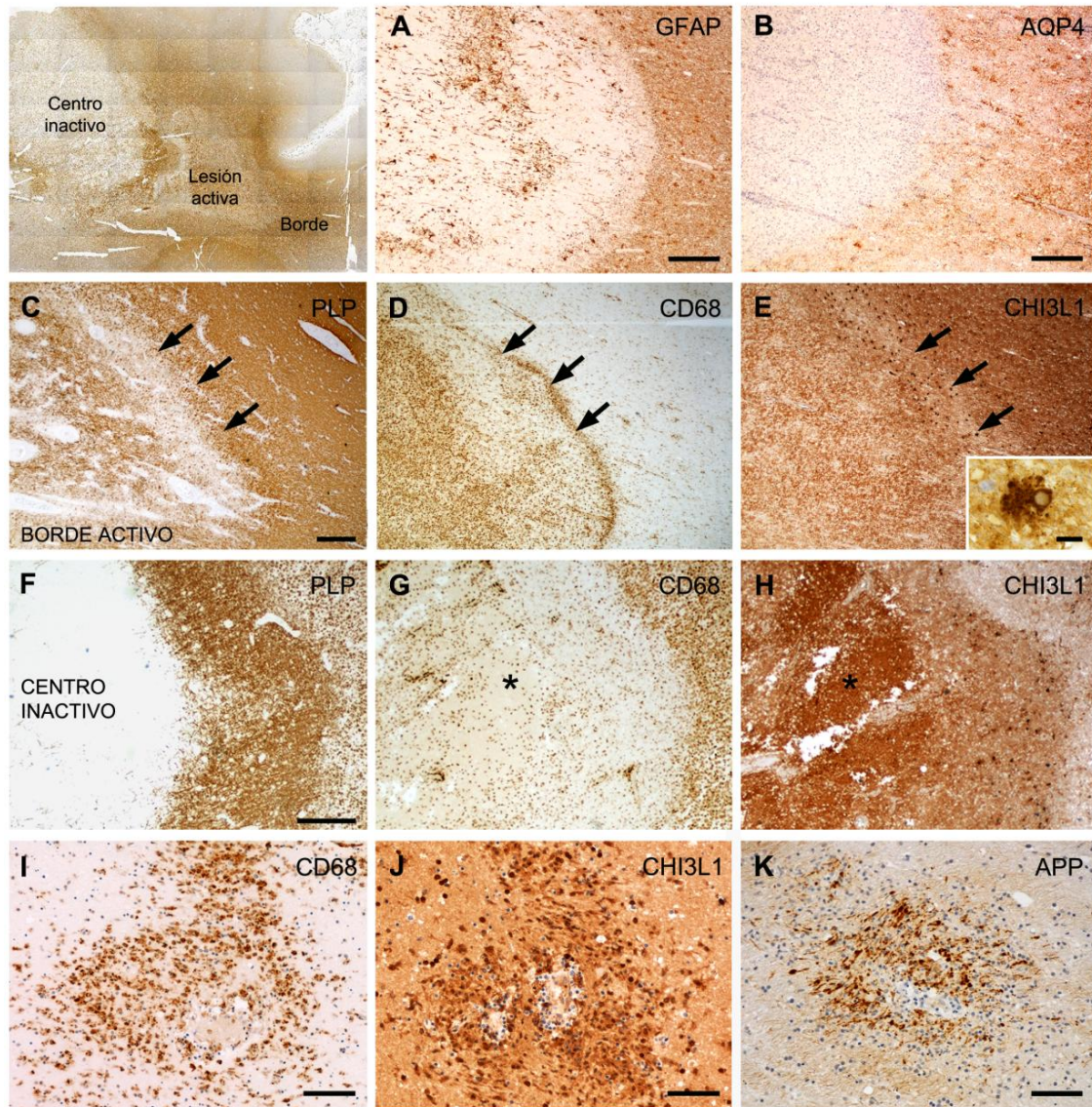


Figura 16. Expresión de CHI3L1 en NMO y EAD. A-H. NMO. A-B. Las lesiones activas en NMO son deficientes en GFAP (A) y AQP4 (B) reflejando que existe daño astrocitario. **C-E. Borde activo de lesión. C.** La pérdida de PLP en el borde activo de la lesión se debe a la presencia de desmielinización. **D.** Presencia de infiltrados de células CD68+ en el borde activo. **E.** Presencia de CHI3L1+ en el borde activo. Todos los astrocitos CHI3L1+ presentaron morfología típica de procesos necróticos, proceso conocido como clasmotodendrosis (detalle en E). **F-H. Centro inactivo de la lesión.** En el centro inactivo de la lesión, la desmielinización se manifiesta con ausencia de células inflamatorias y presencia de restos de CHI3L1 en el medio extracelular (ver asterisco en H). **EAD. I-K.** En el caso de EAD analizado, las células CHI3L1+ se concentran a nivel perivascular (J), coexistiendo con microglía activada (I) y signos de neurodegeneración (K).
Escala: 250 µm (A, B); 100 µm (C-J); 10 µm (detalle en E, K).

CHI3L1: Chitinase 3-like 1; NMO: Neuromielitis optica; EAD: Encefalomielitis aguda diseminada; GFAP: Proteína ácida fibrilar glial; AQP4: Aquaporina de tipo 4; PLP: Proteína lipídica de mielina; APP: Proteína precursora amiloide.

5. DISCUSIÓN

En este trabajo, combinando datos clínicos y patológicos, se muestra que los biomarcadores CHI3L1 y NfL son liberados al LCR en EM y en otras enfermedades desmielinizantes (NMO y EAD) en el contexto de inflamación aguda, pero la CHI3L1, además, se eleva en formas progresivas de EM tanto en inflamación como en remisión. Proponemos, por tanto, que la medición combinada de NfL_{LCR} y CHI3L1_{LCR} en un momento puntual de la evolución de la enfermedad podría ser una herramienta de utilidad en la clasificación de los pacientes con EM en distintas formas clínicas, e incluso en el diagnóstico de la progresión subclínica. La normalización de CHI3L1 en enfermedades desmielinizantes en remisión, pero no en la EMP, sugiere que la CHI3L1 podría estar relacionada no solo con la inflamación aguda, sino también con la inflamación crónica responsable de la progresión en EM. En este sentido, en el estudio patológico en muestras de pacientes con EM en distintos estadios de la enfermedad se encontró que la expresión de CHI3L1 en células del SI innato del SNC (tanto macrófagos/microglía como en astrocitos) se asociaba a daño axonal local y, concretamente en astrocitos, formaba parte del frente de desmielinización de lesiones crónicas en formas progresivas de la enfermedad.

Valores de CHI3L1 en EM y relación con actividad inflamatoria

Los niveles de CHI3L1_{LCR} en EM fueron mayores que en controles sin EM, como otros autores habían reportado anteriormente (Burman et al., 2016; Mane-Martinez et al., 2016). Además, los niveles medios de CHI3L1_{LCR} no aumentaron con la presencia de actividad inflamatoria (determinada como brote clínico y/o actividad radiológica), dato que había sido descrito previamente en otros trabajos (Canto et al., 2012).

Pese a la fuerte correlación entre CHI3L1 y NfL, los valores de NfL_{LCR}, considerado como marcador subrogado de actividad inflamatoria en EM (Teunissen et al., 2005), sí que fueron significativamente más elevados en casos de brote o actividad radiológica. Esta correlación podría ser explicada porque algunos pacientes de EMRR con actividad inflamatoria y niveles muy elevados de NfL_{LCR} presentaron valores atípicamente elevados de CHI3L1. Aunque los valores de ambos biomarcadores no correlacionaron con la carga lesional en secuencias T2/FLAIR y la correlación con la actividad radiológica (lesiones Gd+) fue moderada, la CHI3L1 se mostró elevada en pacientes con brotes clínicos caracterizados por numerosas lesiones Gd+. La presencia de BOC-IgM también correlacionó con NfL y CHI3L1, apoyando la relación de ambos biomarcadores con los pacientes más “inflamatorios”.

En el estudio patológico, las lesiones activas en EM presentaron expresión generalizada de CHI3L1 por macrófagos/microglía y astrocitos, como otros autores habían indicado (Bonneh-Barkay et al., 2010; Canto et al., 2015). Sin embargo, en el LCR, los niveles medios de CHI3L1 no fueron significativamente diferentes en el contexto de actividad inflamatoria, sino que fueron más elevados en formas progresivas de la enfermedad. Por ello, la concentración en el LCR debía depender no solo de su producción local en la lesión, sino que había que tener en cuenta otros factores.

Por un lado, un factor importante a la hora de determinar la concentración de una proteína en el SNC y en el LCR es su habilidad para difundir al espacio extracelular del cerebro y de la médula espinal. Una explicación probable podría ser la compartimentalización del cerebro y las estrechas barreras existentes entre cerebro-LCR y LCR-barreras piales, como ya se había sugerido (Burman et al., 2016). De hecho, los niveles más elevados de CHI3L1_{LCR} se correspondieron con pacientes con actividad radiológica intensa con predominancia de lesiones periventriculares o corticales y yuxtacorticales. Adicionalmente, la tasa de difusión de una proteína al espacio extracelular del cerebro también puede verse influenciada por su tamaño y carga molecular. Aunque los pesos moleculares de NfL y CHI3L1 son similares, existe una diferencia notable en la carga molecular. La CHI3L1 es una proteína altamente catiónica (Iershov et al., 2010) que podría unirse a la superficie aniónica de los astrocitos dentro del espacio extracelular del cerebro, restringiendo su difusión por el SNC, como ocurre con otras proteínas catiónicas (Vass et al., 1984), explicando la secreción diferencial de NfL y CHI3L1 al LCR, e incluso al suero, en el caso de inflamación aguda.

Valores de CHI3L1 en EM y relación con progresión clínica de la discapacidad: uso combinado de CHI3L1 y NfL para determinar el fenotipo clínico

Estudios recientes en pacientes con SCA/EMRR no encontraron una evidencia del valor de CHI3L1_{LCR} y NfL_{LCR} en el pronóstico de la progresión (Sellebjerg et al., 2019). En nuestro trabajo, en el análisis bivariado, se halló que los niveles de NfL_{LCR} podrían ser de utilidad para predecir un aumento de discapacidad y pronosticar el estadio progresivo de la EM, pero el análisis multivariado no lo confirmó como un factor predictor independiente. Sin embargo, la CHI3L1_{LCR} fue capaz de predecir un incremento de 1 punto en la EDSS y pronosticar el diagnóstico de la forma progresiva durante el seguimiento de los pacientes. Cabe destacar que el tiempo medio de conversión a la forma de EMSP es normalmente mayor a 10 años, tal y como se describe en estudios de historia natural (Koch et al., 2010). En nuestro estudio se

seleccionaron pacientes de EM con distintas formas clínicas y a diferentes tiempos del inicio de la enfermedad, con duración de hasta 19 años, mientras que la cohorte analizada por Sellebjerg et al. incluyó solamente pacientes de diagnóstico reciente y con un seguimiento medio de 5,7 años, lo que podría explicar que no encontrasen una correlación entre CHI3L1 y progresión.

Dado que se determinaron los valores de NfL y CHI3L1 en todos los pacientes, se decidió analizarlos conjuntamente y de forma individualizada, comparando el perfil de concentración con el fenotipo de EM. Los valores más elevados de NfL_{LCR} correspondieron más frecuentemente a pacientes con actividad (la mayoría en el grupo de EMRR), susceptibles de responder a los TME actuales, mientras que los valores más altos de CHI3L1_{LCR} se asociaron a EM progresiva (elevación más evidente en EMPP). Durante el seguimiento, 11 de un total de 14 pacientes de EMRR fueron diagnosticados como EMSP y presentaron niveles elevados de ambos biomarcadores en la PL. Así pues, la presencia de niveles elevados de CHI3L1_{LCR} y NfL_{LCR} era capaz de predecir (o diagnosticar) el cambio a EMSP. De este modo, usando la medición combinada de NfL y CHI3L1 se podría obtener información pronóstica a partir de una única punción, y en cualquier momento desde el inicio de la enfermedad. Esta asociación de ambos parámetros no había sido analizada en trabajos previos.

A pesar de la ventaja que supondría el uso clínico de esta combinación, la invasividad de la PL desaconseja su uso en la práctica clínica habitual, a no ser que se trate de un primer diagnóstico o una duda diagnóstica. Desafortunadamente, y a diferencia de lo que ocurre con el NfL en suero, la concentración de CHI3L1 en suero no correlacionó en nuestra cohorte con la del LCR. Esto podría explicarse porque la CHI3L1 no es específica del SNC y también es liberada a la sangre por células a nivel periférico (Yeo et al., 2019), pero además podría influir la difusión más restrictiva que presenta a través del espacio extracelular cerebral y a través de la BHE, como se ha comentado. A pesar de esto, los niveles de CHI3L1 en suero fueron mayores en pacientes con EMP, lo que sugiere un patrón diferente de liberación comparado con los casos de EMRR, que podría estar relacionado con la localización de las lesiones. Existen discrepancias entre autores en cuanto a la correlación entre los niveles de CHI3L1 en suero o plasma y la EMP (Canto et al., 2012; Hinsinger et al., 2015).

El papel de la CHI3L1 en el diagnóstico de la EMP ha sido descrito por otros grupos, que intentan compensar su falta de especificidad con la medición simultánea de otros marcadores gliales como la GFAP, integrando todos los valores en un ratio, por lo que se apoya

la idea de que los mecanismos gliales puedan tener un papel en la patogenia de la progresión (Huss et al., 2020).

Influencia de la edad en los niveles de CHI3L1 y NfL

Es importante tener en cuenta la edad, a la hora de interpretar los valores de los biomarcadores. Aunque se ha descrito una elevación de NfL con la edad en controles y en EM (Disanto et al., 2017), en este trabajo no se halló esta asociación. Esto podría deberse a la concurrencia de dos fenómenos opuestos: una mayor actividad de la enfermedad en sujetos jóvenes (Khademi et al., 2013) y la degeneración axonal debida a la edad o a comorbilidades neurológicas presentes en personas de mayor edad (Khalil et al., 2018). A raíz del subanálisis de este trabajo, se ha decidido utilizar valores de referencia de NfL de la cohorte de EM estudiada, estratificados por edad y en ausencia de actividad inflamatoria, y no datos de cohortes no EM. En casos de utilización del NfL en suero en el seguimiento de la enfermedad, incluso sería recomendable poseer un nivel basal del propio paciente para correlacionar sus fluctuaciones con los cambios clínicos.

Los niveles de CHI3L1_{LCR}, sin embargo, sí mostraron asociación con la edad en la cohorte de este estudio y en otros anteriores (Burman et al., 2016). Puesto que los pacientes con formas progresivas de la enfermedad suelen presentar edades más avanzadas que los casos de EMRR, cabría la posibilidad de que la elevación observada se debiera a la activación microglial asociada a la edad [revisado en (Norden and Godbout, 2013)]. Por ello, y aunque en el presente estudio la correlación de CHI3L1 con la edad fue débil, se ajustaron todos los análisis por edad.

Expresión de CHI3L1 en cerebro de pacientes de EM y otras enfermedades desmielinizantes y potencial implicación de la CHI3L1 astrocitaria en la neurodegeneración

En el caso de la NMO y la EAD, la CHI3L1 es liberada al LCR tras un ataque clínico o brote (Boesen et al., 2018; Correale and Fiol, 2011) y en este estudio sus niveles fueron significativamente más elevados que en EM en brote. A pesar de que en estas enfermedades, en lesiones activas, la CHI3L1 aparece presente en macrófagos y microglía activados, los niveles extremadamente elevados de CHI3L1_{LCR} en NMO podrían ser explicados por la destrucción específica de astrocitos que caracteriza esta enfermedad. La CHI3L1 se expresó de forma notable en los astrocitos degenerativos presentes en el borde de lesiones activas y

también en el espacio extracelular del centro inactivo de la lesión. Un patrón similar fue descrito anteriormente con otras proteínas astrocitarias, como GFAP y S-100b que, del mismo modo, se liberaban al espacio extracelular tras la apoptosis de los astrocitos (Misu et al., 2013), resultando en niveles elevados en LCR durante la fase aguda de la enfermedad (Takano et al., 2008).

Por su parte, en la EAD, la CHI3L1 se expresó en macrófagos/microglía, pero no en astrocitos. Esto podría ser, en parte, debido a una inducción tardía de la expresión de esta proteína en los astrocitos (el paciente analizado falleció dos días después del brote) o bien porque el mecanismo patogénico responsable de la lesión inflamatoria podría ser diferente y mediado por otro tipo de células del SI.

La comparación de los datos clínicos y anatomopatológicos de la EM con la NMO y la EAD, enfermedades que cursan con brotes (en la EAD, normalmente uno) sin actividad inflamatoria entre ellos, permite extraer conclusiones interesantes sobre la progresión clínica en la EM. Los niveles de CHI3L1_{LCR} elevados por encima de la mediana en las formas de EMP sugieren una relación entre este biomarcador y la progresión de la discapacidad. Otra proteína, la GFAP, marcador panastrocitario, en suero y LCR, ha sido relacionada previamente con la progresión del daño en EM (Abdelhak et al., 2019, 2018). A diferencia de la expresión de GFAP, no todos los astrocitos del cerebro expresan CHI3L1, sino los astrocitos reactivos de las lesiones inflamatorias activas. Es probable que un incremento de GFAP en LCR o sangre refleje un daño en la sustancia blanca, pero la CHI3L1, que también se expresa en macrófagos/microglía, parece un marcador más específico de neuroinflamación, con potencial implicación en la patogenia de la progresión. Por lo tanto, no es un marcador completamente sustituible por GFAP. A diferencia de lo que podría haberse esperado, la presencia de un borde activo de astrocitos CHI3L1+ en las lesiones crónicas activas no se correlacionó con los infiltrados linfocíticos en la SBAN o en los folículos meníngeos próximos a las lesiones. Esto nos sugiere que la CHI3L1 en los casos de EMP podría estar ligada a la activación de una inmunidad innata originando una inflamación de grado leve, pero perpetuada en el tiempo. En esta misma línea, un estudio observó que la acumulación de linfocitos B intratecales, reflejo de la activación de la inmunidad adaptativa, no correlacionó con los niveles de CHI3L1 en el LCR (Engel et al., 2019).

Todavía es una cuestión en debate si la expresión de CHI3L1 juega un papel protector o patogénico en la enfermedad. Aunque la expresión de CHI3L1 implica un peor pronóstico en varios cánceres y en procesos inflamatorios crónicos fuera del sistema nervioso, hay trabajos

que apuntan al papel anti-inflamatorio de la CHI3L1 (Im et al., 2020). Asimismo, en el modelo de EM de ratón, la encefalomiелitis autoinmune experimental (EAE), la eliminación del gen de la CHI3L1 exacerbaba la desmielinización y el daño neuronal (Bonneh-Barkay et al., 2012b). Del mismo modo, los ratones con delección del gen de la CHI3L1 presentaban astrogliosis extensiva y un estado proinflamatorio persistente, sugiriendo una desregulación inmune en ausencia de esta proteína (Wiley et al., 2015).

No obstante, otros autores defienden un papel patogénico de la CHI3L1 y su implicación en perpetuar la inflamación o causar daño neuronal. Los niveles de NfL_{LCR} en formas de EMP inactivas son más bajos que en formas activas, pero continúan siendo más elevados que en controles, lo que refleja que existe un estado de neurodegeneración continuada. Existen estudios recientes *in vitro* con cultivos neuronales que reflejan que la CHI3L1 puede inducir daño citotóxico a través de un mecanismo desconocido (Huang et al., 2014; Matute-Blanch et al., 2020). Además, en otras enfermedades neurodegenerativas como el Alzheimer, los niveles de CHI3L1_{LCR} aumentan en relación a peor pronóstico (Baldacci et al., 2017; Craig-Schapiro et al., 2010; Muszynski et al., 2017) y en la ELA, los niveles elevados implican un curso más acelerado de la enfermedad (Andres-Benito et al., 2018). En Alzheimer, la CHI3L1 es expresada por una subpoblación de astrocitos en la periferia de los depósitos de beta-amiloide (Craig-Schapiro et al., 2010; Llorens et al., 2017; Querol-Vilaseca et al., 2017) y, del mismo modo, en los casos de ELA aparece restringida a un tipo de astrocitos reactivos situados predominantemente en la sustancia blanca de la corteza motora y de la médula espinal (Vu et al., 2020). Recientemente, se ha descrito que los astrocitos podrían tener un efecto neurotóxico y gliotóxico en lesiones de EM agudas y crónicas (Liddel et al., 2017). Con este contexto, mostramos que la tinción de APP está temporalmente y espacialmente relacionada con la CHI3L1 en todas las lesiones de EM, incluidas las lesiones crónicas corticales, por lo que la hipótesis de que los astrocitos que expresan CHI3L1 podrían jugar un papel directo en la neurodegeneración es factible.

Este estudio presenta varias limitaciones. Dada la naturaleza retrospectiva del estudio, se deben interpretar los resultados cautelosamente y las conclusiones se deben confirmar con un análisis prospectivo de cohortes de larga duración. Sin embargo, se debe resaltar que todos los pacientes tuvieron medición de niveles de CHI3L1_{LCR} y NfL_{LCR}, análisis de BOC-IgM, RM y medida de discapacidad, con un seguimiento medio de 4,2 años.

Atendiendo al objetivo 1, el número de pacientes que progresaron durante el estudio fue bajo y el LCR fue recogido a diferentes tiempos desde el inicio de la enfermedad. Por ello,

no se puede concluir de forma precisa si esta combinación de biomarcadores podría informar de la probabilidad de conversión o si detectaría progresión subclínica. A pesar de esto, el estudio se ve apoyado por largos seguimientos de estos pacientes (hasta 19 años en algún caso). Por otro lado, el hecho de medir biomarcadores en LCR supone una desventaja debido a la naturaleza invasiva de la extracción mediante PL y la imposibilidad de realizar estudios longitudinales. No obstante, hay que considerar que los niveles de CHI3L1 en suero pueden verse afectados por otras patologías fuera del SNC. En el caso del NfL en suero, en la actualidad, existen tecnologías que permiten detectarlo y, por lo tanto, realizar múltiples medidas durante el seguimiento de los pacientes (Barro et al., 2018).

Por otro lado, en el objetivo 2, la parte del estudio de CHI3L1_{LCR} se acompañó de datos completos clínicos, radiológicos y bioquímicos. Se reunió una muestra amplia de casos de EM, de los diferentes subtipos, así como de algunos casos de NMO y EAD, considerando que estas patologías son menos frecuentes y es más difícil reunir un mayor número de muestras. Para el estudio histopatológico tuvimos la posibilidad de colaborar con el Profesor Hans Lassmann, miembro activo hasta hace pocos meses del *Center for Brain Research* en Viena. Su laboratorio posee un amplio biobanco de muestras de cerebro de EM procedentes de autopsias. Sin embargo, las muestras solo constituyen la “punta del iceberg” ya que son casos de EM catastrófica que realmente no refleja el fenotipo de EMRR. Solo contamos con un caso de EMRR típico, dada la afortunada baja mortalidad de estos pacientes. Además, en la comparación de la histopatología de la EM con otras enfermedades desmielinizantes, solo se analizó un único caso de NMO y otro de EAD, cuyas muestras también son valiosas dada su escasez.

En el caso del estudio de los tipos celulares que expresan CHI3L1, solamente se ha analizado por inmunohistoquímica e inmunofluorescencia la colocalización de esta proteína con marcadores típicos de neuronas, astrocitos, microglía y oligodendrocitos. No se ha analizado la expresión de la proteína a nivel de ARN mediante hibridación *in situ*, aunque otros autores ya habían demostrado su expresión activa en astrocitos y microglía (Bonneh-Barkay et al., 2012a, 2010, 2008). A pesar de hallar marcaje positivo de CHI3L1 en neuronas, fue considerado como inespecífico por la coincidencia con el marcaje de IgG, asumiendo que las neuronas dañadas aumentaban la permeabilidad de su membrana e incorporaban material extracelular abundante. Sin embargo, anteriormente otros autores han citado la expresión de CHI3L1 en neuronas con posible papel patogénico (Long et al., 2016), por lo que no podemos descartar su capacidad de expresarla.

Asimismo, hemos asumido que la microglía expresa CHI3L1 en estadios tempranos de la inflamación mientras que su expresión en astrocitos indicaría la activación de la inmunidad innata y de una neurodegeneración progresiva sostenida en el tiempo, pero sería necesario un estudio temporal en un modelo animal de EM que lo demuestre.

Como conclusión, este trabajo muestra que la medida individual de los niveles de NfL_{LCR} y CHI3L1_{LCR} aporta información sobre la actividad y la progresión en la EM, respectivamente, pero que la combinación de ambas medidas es de mayor utilidad para diferenciar fenotipos clínicos, así como para diagnosticar aquellos pacientes con EMRR que van a progresar clínicamente. Planteamos la hipótesis de que la CHI3L1 podría estar presente desde el inicio de la EM, probablemente expresada por células del SI en respuesta a determinadas citoquinas del SI adaptativo. Sin embargo, la persistencia de la expresión de CHI3L1 en las formas progresivas podría independizarse de este tipo de inmunidad. La expresión de CHI3L1 en macrófagos/microglía parece tener un papel en la inflamación aguda en etapas tempranas de la enfermedad, mientras que la expresión en astrocitos podría estar relacionada con el avance de la desmielinización y la neurodegeneración. La investigación prospectiva de este biomarcador podría ayudar a aclarar su relación con la progresión y la neurodegeneración.

6. CONCLUSIONES FINALES

Con los resultados obtenidos podemos concluir que:

1. La cadena ligera de neurofilamento (NfL) es un biomarcador de neurodegeneración que aumenta debido a actividad inflamatoria en pacientes con EM.
2. La Chitinase 3-like 1 (CHI3L1) en EM es un marcador de daño tisular más global y en un contexto de inflamación sostenida.
3. La combinación de los niveles de CHI3L1 y NfL en LCR permite discriminar fenotipos clínicos y tiene valor pronóstico en la EM: niveles elevados de ambos biomarcadores en pacientes con EMRR indican una mayor probabilidad de conversión a forma progresiva.
4. Los niveles de CHI3L1 en LCR incrementan en el contexto de brote clínico en EAD y NMO, mientras que en los pacientes de EM esto ocurre si hay gran actividad radiológica asociada a brote.
5. Los niveles de CHI3L1 en LCR y suero son elevados en formas progresivas de EM, independientemente de la actividad inflamatoria, mientras que en NMO y EAD sus niveles fuera de brote son comparables a los de los controles.
6. Existen dos poblaciones celulares que expresan CHI3L1 en casos de EM. Durante la inflamación aguda, la CHI3L1 predomina en macrófagos/microglía y podría tener un papel en la inflamación en estadios tempranos de la enfermedad, mientras que en lesiones crónicas destaca su expresión por astrocitos que podría estar implicada en la progresión de la desmielinización y neurodegeneración, como demuestra su co-existencia con la proteína precursora amiloide (APP).
7. La expresión de CHI3L1 puede estar presente desde el inicio de la EM, en células del sistema inmune innato, pero su persistencia es independiente de los infiltrados inflamatorios de linfocitos en meninges o parénquima (inmunidad adaptativa).
8. En resumen, nuestro trabajo sugiere que la CHI3L1 en LCR en EM, en contraste con lo que ocurre en NMO y EAD, podría informar sobre el daño inflamatorio sostenido que se produce en la EM progresiva. Como causa o efecto de este daño, la CHI3L1 es expresada por una subpoblación específica de astrocitos en el borde de la lesión íntimamente ligados a la neurodegeneración presente de forma independiente a brotes.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abdelhak, A., Hottenrott, T., Morenas-Rodríguez, E., Suárez-Calvet, M., Zettl, U.K., Haass, C., Meuth, S.G., Rauer, S., Otto, M., Tumani, H., Huss, A., 2019. Glial Activation Markers in CSF and Serum From Patients With Primary Progressive Multiple Sclerosis: Potential of Serum GFAP as Disease Severity Marker? *Front. Neurol.* 10, 280. doi:10.3389/fneur.2019.00280
- Abdelhak, A., Huss, A., Kassubek, J., Tumani, H., Otto, M., 2018. Serum GFAP as a biomarker for disease severity in multiple sclerosis 1–7. doi:10.1038/s41598-018-33158-8
- Abdellaoui, M., Chaouir, S., Boumdin, H., 2019. [Imaging appearance of acute disseminated encephalomyelitis: a study of 22 cases]. *Pan Afr. Med. J.* 34, 41. doi:10.11604/pamj.2019.34.41.15312
- Abdo, W.F., van de Warrenburg, B.P.C., Munneke, M., van Geel, W.J.A., Bloem, B.R., Kremer, H.P.H., Verbeek, M.M., 2006. CSF analysis differentiates multiple-system atrophy from idiopathic late-onset cerebellar ataxia. *Neurology* 67, 474–479. doi:10.1212/01.wnl.0000227891.25592.8c
- Absinta, M., Nair, G., Sati, P., Cortese, I.C.M., Filippi, M., Reich, D.S., 2015. Direct MRI detection of impending plaque development in multiple sclerosis. *Neurol. - Neuroimmunol. Neuroinflammation* 2, e145. doi:10.1212/NXI.000000000000145
- Akaishi, T., Nakashima, I., Sato, D.K., Takahashi, T., Fujihara, K., 2017. Neuromyelitis Optica Spectrum Disorders. *Neuroimaging Clin. N. Am.* 27, 251–265. doi:10.1016/j.nic.2016.12.010
- Alcolea, D., Vilaplana, E., Pegueroles, J., Montal, V., Sánchez-Juan, P., González-Suárez, A., Pozueta, A., Rodríguez-Rodríguez, E., Bartrés-Faz, D., Vidal-Piñeiro, D., González-Ortiz, S., Medrano, S., Carmona-Iragui, M., Sánchez-Saudinós, M., Sala, I., Anton-Aguirre, S., Sampedro, F., Morenas-Rodríguez, E., Clarimón, J., Blesa, R., Lleó, A., Fortea, J., 2015. Relationship between cortical thickness and cerebrospinal fluid YKL-40 in prodromal stages of Alzheimer's disease. *Neurobiol. Aging* 36, 2018–2023. doi:10.1016/j.neurobiolaging.2015.03.001
- Almohmeed, Y.H., Avenell, A., Aucott, L., Vickers, M.A., 2013. Systematic review and meta-analysis of the sero-epidemiological association between Epstein Barr virus and multiple sclerosis. *PLoS One* 8, e61110. doi:10.1371/journal.pone.0061110
- Alvarez-Cermeno, J.C., Villar, L.M., 2013. Multiple sclerosis: Oligoclonal bands—a useful tool to avoid MS misdiagnosis. *Nat. Rev. Neurol.* 9, 303–304. doi:10.1038/nrneurol.2013.74
- Andres-Benito, P., Dominguez, R., Colomina, M.J., Llorens, F., Povedano, M., Ferrer, I., 2018. YKL40 in sporadic amyotrophic lateral sclerosis: cerebrospinal fluid levels as a prognosis marker of disease progression. *Aging (Albany, NY)*. 10, 2367–2382. doi:10.18632/aging.101551
- Araki, M., Matsuoka, T., Miyamoto, K., Kusunoki, S., Okamoto, T., Murata, M., Miyake, S., Aranami, T., Yamamura, T., 2014. Efficacy of the anti-IL-6 receptor antibody tocilizumab in neuromyelitis optica: a pilot study. *Neurology* 82, 1302–1306. doi:10.1212/WNL.0000000000000317
- Babinski J., 1885. Recherche sur l'anatomie pathologique de la sclérose en plaque et étude comparative des diverses variétés de la moelle. *Arch de physiologie normale et pathologique*, pp. 186–207.
- Baghbanian, S.M., Asgari, N., Sahraian, M.A., Moghadasi, A.N., 2018. A comparison of pediatric and adult neuromyelitis optica spectrum disorders: A review of clinical manifestation, diagnosis, and treatment. *J. Neurol. Sci.* 388, 222–231. doi:10.1016/j.jns.2018.02.028
- Balashov, K.E., Rottman, J.B., Weiner, H.L., Hancock, W.W., 1999. CCR5(+) and CXCR3(+) T cells are increased in multiple sclerosis and their ligands MIP-1alpha and IP-10 are expressed in demyelinating brain lesions. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 96, 6873–6878. doi:10.1073/pnas.96.12.6873
- Baldacci, F., Lista, S., Cavedo, E., Bonuccelli, U., Hampel, H., 2017. Diagnostic function of the neuroinflammatory biomarker YKL-40 in Alzheimer's disease and other neurodegenerative diseases. *Expert Rev. Proteomics* 14, 285–299. doi:10.1080/14789450.2017.1304217
- Balzano, T., Arenas, Y.M., Dadsetan, S., Forteza, J., Gil-Perotin, S., Cubas-Nuñez, L., Casanova, B., Gracià, F., Varela-Andrés, N., Montoliu, C., Llansola, M., Felipo, V., 2020. Sustained hyperammonemia induces TNF- α in Purkinje neurons by activating the TNFR1-NF- κ B pathway. *J. Neuroinflammation* 17, 70. doi:10.1186/s12974-020-01746-z
- Balzano, T., Dadsetan, S., Forteza, J., Cabrera-Pastor, A., Taoro-Gonzalez, L., Malaguarnera, M., Gil-Perotin, S., Cubas-Nuñez, L., Casanova, B., Castro-Quintas, A., Ponce-Mora, A., Arenas, Y.M., Leone, P., Erceg, S., Llansola, M., Felipo, V., 2019. Chronic hyperammonemia induces peripheral inflammation that leads to cognitive impairment in rats: Reversed by anti-TNF- α treatment. *J. Hepatol.* doi:10.1016/j.jhep.2019.01.008
- Barkhof, F., 2002. The clinico-radiological paradox in multiple sclerosis revisited 239–245.

- Barkhof F, K.K., 2020. Diseases of the Brain, Head and Neck, Spine 2020–2023: Diagnostic Imaging [Internet]., Springer; ed.
- Barro, C., Benkert, P., Disanto, G., Tsagkas, C., Amann, M., Naegelin, Y., Leppert, D., Gobbi, C., Michalak, Z., Wuerfel, J., Granziera, C., 2018. Serum neurofilament as a predictor of disease worsening and brain and spinal cord atrophy in multiple sclerosis 2382–2391. doi:10.1093/brain/awy154
- Bartosik-Psujek, H., Stelmasiak, Z., 2005. The levels of chemokines CXCL8, CCL2 and CCL5 in multiple sclerosis patients are linked to the activity of the disease. *Eur. J. Neurol.* 12, 49–54. doi:10.1111/j.1468-1331.2004.00951.x
- Bennett, J.L., 2016. Finding NMO: The Evolving Diagnostic Criteria of Neuromyelitis Optica. *J. Neuroophthalmol.* 36, 238–245. doi:10.1097/WNO.0000000000000396
- Berghmans, N., Heremans, H., Li, S., Martens, E., Matthys, P., Sorokin, L., Van Damme, J., Opendakker, G., 2012. Rescue from acute neuroinflammation by pharmacological chemokine-mediated deviation of leukocytes. *J. Neuroinflammation* 9, 243. doi:10.1186/1742-2094-9-243
- Bernitsas, E., Bao, F., Seraji-Bozorgzad, N., Chorostecki, J., Santiago, C., Tselis, A., Caon, C., Zak, I., Millis, S., Khan, O., 2015. Spinal cord atrophy in multiple sclerosis and relationship with disability across clinical phenotypes. *Mult. Scler. Relat. Disord.* 4, 47–51. doi:10.1016/j.msard.2014.11.002
- Blennow, K., Hampel, H., Weiner, M., Zetterberg, H., 2010. Cerebrospinal fluid and plasma biomarkers in Alzheimer disease. *Nat. Rev. Neurol.* 6, 131–144. doi:10.1038/nrneurol.2010.4
- Boesen, M.S., Jensen, P.E.H., Magyari, M., Born, A.P., Uldall, P.V., Blinkenberg, M., Sellebjerg, F., 2018. Increased cerebrospinal fluid chitinase 3-like 1 and neurofilament light chain in pediatric acquired demyelinating syndromes. *Mult. Scler. Relat. Disord.* 24, 175–183. doi:10.1016/j.msard.2018.05.017
- Bonneh-Barkay, D., Bissel, S.J., Kofler, J., Starkey, A., Wang, G., Wiley, C.A., 2012a. Astrocyte and macrophage regulation of YKL-40 expression and cellular response in neuroinflammation. *Brain Pathol.* 22, 530–546. doi:10.1111/j.1750-3639.2011.00550.x
- Bonneh-Barkay, D., Bissel, S.J., Wang, G., Fish, K.N., Nicholl, G.C.B., Darko, S.W., Medina-Flores, R., Murphey-Corb, M., Rajakumar, P.A., Nyaundi, J., Mellors, J.W., Bowser, R., Wiley, C.A., 2008. YKL-40, a marker of simian immunodeficiency virus encephalitis, modulates the biological activity of basic fibroblast growth factor. *Am. J. Pathol.* 173, 130–143. doi:10.2353/ajpath.2008.080045
- Bonneh-Barkay, D., Wang, G., Laframboise, W.A., Wiley, C.A., Bissel, S.J., 2012b. Exacerbation of experimental autoimmune encephalomyelitis in the absence of breast regression protein 39/chitinase 3-like 1. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* 71, 948–958. doi:10.1097/NEN.0b013e31826eaae7
- Bonneh-Barkay, D., Wang, G., Starkey, A., Hamilton, R.L., Wiley, C.A., 2010. In vivo CHI3L1 (YKL-40) expression in astrocytes in acute and chronic neurological diseases. *J. Neuroinflammation* 7, 34. doi:10.1186/1742-2094-7-34
- Bosca, I., Villar, L.M., Coret, F., Magraner, M.J., Simo-Castello, M., Alvarez-Cermeno, J.C., Casanova, B., 2010. Response to interferon in multiple sclerosis is related to lipid-specific oligoclonal IgM bands. *Mult. Scler.* 16, 810–815. doi:10.1177/1352458510371961
- Braniste, V., Al-Asmakh, M., Kowal, C., Anuar, F., Abbaspour, A., Tóth, M., Korecka, A., Bakocevic, N., Ng, L.G., Kundu, P., Gulyás, B., Halldin, C., Hultenby, K., Nilsson, H., Hebert, H., Volpe, B.T., Diamond, B., Pettersson, S., 2014. The gut microbiota influences blood-brain barrier permeability in mice. *Sci. Transl. Med.* 6, 263ra158. doi:10.1126/scitranslmed.3009759
- Brettschneider, J., Claus, A., Kassubek, J., Tumani, H., 2005. Isolated blood-cerebrospinal fluid barrier dysfunction: prevalence and associated diseases. *J. Neurol.* 252, 1067–1073. doi:10.1007/s00415-005-0817-9
- Brodbeck A, S.M., 2010. An anatomical and physiological basis for CSF pathway disorders. *Informa Healthcare.*
- Brosnan, C.F., Raine, C.S., 2013. The astrocyte in multiple sclerosis revisited. *Glia* 61, 453–465. doi:10.1002/glia.22443
- Brown, J.W.L., Coles, A., Horakova, D., Havrdova, E., Izquierdo, G., Prat, A., Girard, M., Duquette, P., Trojano, M., Lugaresi, A., Bergamaschi, R., Grammond, P., Alroughani, R., Hupperts, R., McCombe, P., Van Pesch, V., Sola, P., Ferraro, D., Grand'Maison, F., Terzi, M., Lechner-Scott, J., Flechter, S., Slee, M., Shaygannejad, V., Pucci, E., Granella, F., Jokubaitis, V., Willis, M., Rice, C., Scolding, N., Wilkins, A., Pearson, O.R., Ziemssen, T., Hutchinson, M., Harding, K., Jones, J., McGuigan, C., Butzkueven, H., Kalincik, T., Robertson, N., 2019. Association of Initial Disease-Modifying Therapy With Later Conversion to Secondary Progressive Multiple Sclerosis. *JAMA* 321, 175–187.

- doi:10.1001/jama.2018.20588
- Bruck, W., Porada, P., Poser, S., Rieckmann, P., Hanefeld, F., Kretschmar, H.A., Lassmann, H., 1995. Monocyte/macrophage differentiation in early multiple sclerosis lesions. *Ann. Neurol.* 38, 788–796. doi:10.1002/ana.410380514
- Burman, J., Raininko, R., Blennow, K., Zetterberg, H., Axelsson, M., Malmstrom, C., 2016. YKL-40 is a CSF biomarker of intrathecal inflammation in secondary progressive multiple sclerosis. *J. Neuroimmunol.* 292, 52–57. doi:10.1016/j.jneuroim.2016.01.013
- Cai, L., Huang, J., 2018. Neurofilament light chain as a biological marker for multiple sclerosis: a meta-analysis study. *Neuropsychiatr. Dis. Treat.* 14, 2241–2254. doi:10.2147/NDT.S173280
- Canto, E., Reverter, F., Morcillo-Suarez, C., Matesanz, F., Fernandez, O., Izquierdo, G., Vandenbroeck, K., Rodriguez-Antiguedad, A., Urcelay, E., Arroyo, R., Otaegui, D., Olascoaga, J., Saiz, A., Navarro, A., Sanchez, A., Dominguez, C., Caminero, A., Horga, A., Tintore, M., Montalban, X., Comabella, M., 2012. Chitinase 3-like 1 plasma levels are increased in patients with progressive forms of multiple sclerosis. *Mult. Scler.* 18, 983–990. doi:10.1177/1352458511433063
- Canto, E., Tintore, M., Villar, L.M., Costa, C., Nurtdinov, R., Alvarez-Cermeno, J.C., Arrambide, G., Reverter, F., Deisenhammer, F., Hegen, H., Khademi, M., Olsson, T., Tumani, H., Rodriguez-Martin, E., Piehl, F., Bartos, A., Zimova, D., Kotoucova, J., Kuhle, J., Kappos, L., Garcia-Merino, J.A., Sanchez, A.J., Saiz, A., Blanco, Y., Hintzen, R., Jafari, N., Brassat, D., Lauda, F., Roesler, R., Rejdak, K., Papuc, E., de Andres, C., Rauch, S., Khalil, M., Enzinger, C., Galimberti, D., Scarpini, E., Teunissen, C., Sanchez, A., Rovira, A., Montalban, X., Comabella, M., 2015. Chitinase 3-like 1: prognostic biomarker in clinically isolated syndromes. *Brain* 138, 918–931. doi:10.1093/brain/awv017
- Carreón Guarnizo, E., Hernández Clares, R., Castillo Triviño, T., Meca Lallana, V., Arocas Casañ, V., Iniesta Martínez, F., Olascoaga Urtaza, J., Meca Lallana, J.E., 2019. Experience with tocilizumab in patients with neuromyelitis optica spectrum disorders. *Neurologia.* doi:10.1016/j.nrl.2018.12.013
- Casserly, C., Seyman, E.E., Alcaide-Leon, P., Guenette, M., Lyons, C., Sankar, S., Svendrovski, A., Baral, S., Oh, J., 2018. Spinal Cord Atrophy in Multiple Sclerosis: A Systematic Review and Meta-Analysis. *J. Neuroimaging* 28, 556–586. doi:10.1111/jon.12553
- Chu, F., Shi, M., Zheng, C., Shen, D., Zhu, J., Zheng, X., Cui, L., 2018. The roles of macrophages and microglia in multiple sclerosis and experimental autoimmune encephalomyelitis. *J. Neuroimmunol.* 318, 1–7. doi:10.1016/j.jneuroim.2018.02.015
- Chupp, G.L., Lee, C.G., Jarjour, N., Shim, Y.M., Holm, C.T., He, S., Dziura, J.D., Reed, J., Coyle, A.J., Kiener, P., Cullen, M., Grandsaigne, M., Dombret, M.-C., Aubier, M., Pretolani, M., Elias, J.A., 2007. A chitinase-like protein in the lung and circulation of patients with severe asthma. *N. Engl. J. Med.* 357, 2016–2027. doi:10.1056/NEJMoa073600
- Collongues, N., Marignier, R., Jacob, A., Leite, M.I., Siva, A., Paul, F., Zephir, H., Akman-Demir, G., Elson, L., Jarius, S., Papeix, C., Mutch, K., Saip, S., Wildemann, B., Kitley, J., Karabudak, R., Aktas, O., Kuscu, D., Altintas, A., Palace, J., Confavreux, C., De Seze, J., 2014. Characterization of neuromyelitis optica and neuromyelitis optica spectrum disorder patients with a late onset. *Mult. Scler.* 20, 1086–1094. doi:10.1177/1352458513515085
- Comabella, M., Fernandez, M., Martin, R., Rivera-Vallve, S., Borrás, E., Chiva, C., Julia, E., Rovira, A., Canto, E., Alvarez-Cermeno, J.C., Villar, L.M., Tintore, M., Montalban, X., 2010. Cerebrospinal fluid chitinase 3-like 1 levels are associated with conversion to multiple sclerosis. *Brain* 133, 1082–1093. doi:10.1093/brain/awq035
- Compston, A., Coles, A., 2008. Multiple sclerosis. *Lancet (London, England)* 372, 1502–1517. doi:10.1016/S0140-6736(08)61620-7
- Correale, J., Fiol, M., 2011. Chitinase effects on immune cell response in neuromyelitis optica and multiple sclerosis. *Mult. Scler.* 17, 521–531. doi:10.1177/1352458510392619
- Craig-Schapiro, R., Perrin, R.J., Roe, C.M., Xiong, C., Carter, D., Cairns, N.J., Mintun, M.A., Peskind, E.R., Li, G., Galasko, D.R., Clark, C.M., Quinn, J.F., D'Angelo, G., Malone, J.P., Townsend, R.R., Morris, J.C., Fagan, A.M., Holtzman, D.M., 2010. YKL-40: a novel prognostic fluid biomarker for preclinical Alzheimer's disease. *Biol. Psychiatry* 68, 903–912. doi:10.1016/j.biopsych.2010.08.025
- Cree, B.A.C., Hollenbach, J.A., Bove, R., Kirkish, G., Sacco, S., Caverzasi, E., Bischof, A., Gundel, T., Zhu, A.H., Papinutto, N., Stern, W.A., Bevan, C., Romeo, A., Goodin, D.S., Gelfand, J.M., Graves, J., Green, A.J., Wilson, M.R., Zamvil, S.S., Zhao, C., Gomez, R., Ragan, N.R., Rush, G.Q., Barba, P., Santaniello, A., Baranzini, S.E., Oksenberg, J.R., Henry, R.G., Hauser, S.L., 2019. Silent progression in disease activity-free relapsing multiple sclerosis. *Ann. Neurol.* 85, 653–666. doi:10.1002/ana.25463

- Cuevas-García, C.F., Segura-Méndez, N.H., Herrera-Sánchez, D.A., 2018. [Actualidades en la inmunopatología de la esclerosis múltiple]. *Gac. Med. Mex.* 154, 588–597. doi:10.24875/GMM.18003407
- Dadsetan, S., Balzano, T., Forteza, J., Cabrera-Pastor, A., Taoro-Gonzalez, L., Hernandez-Rabaza, V., Gil-Perotín, S., Cubas-Núñez, L., García-Verdugo, J.-M., Agusti, A., Llansola, M., Felipo, V., 2016. Reducing Peripheral Inflammation with Infliximab Reduces Neuroinflammation and Improves Cognition in Rats with Hepatic Encephalopathy. *Front. Mol. Neurosci.* 9, 106. doi:10.3389/fnmol.2016.00106
- Dalton, C.M., Chard, D.T., Davies, G.R., Miszkiel, K.A., Altmann, D.R., Fernando, K., Plant, G.T., Thompson, A.J., Miller, D.H., 2004. Early development of multiple sclerosis is associated with progressive grey matter atrophy in patients presenting with clinically isolated syndromes. *Brain* 127, 1101–1107. doi:10.1093/brain/awh126
- De Ceuninck, F., Gauffillier, S., Bonnaud, A., Sabatini, M., Lesur, C., Pastoureaux, P., 2001. YKL-40 (cartilage gp-39) induces proliferative events in cultured chondrocytes and synoviocytes and increases glycosaminoglycan synthesis in chondrocytes. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 285, 926–931. doi:10.1006/bbrc.2001.5253
- De Stefano, N., Giorgio, A., Battaglini, M., Rovaris, M., Sormani, M.P., Barkhof, F., Korteweg, T., Enzinger, C., Fazekas, F., Calabrese, M., Dinacci, D., Tedeschi, G., Gass, A., Montalban, X., Rovira, A., Thompson, A., Comi, G., Miller, D.H., Filippi, M., 2010. Assessing brain atrophy rates in a large population of untreated multiple sclerosis subtypes. *Neurology* 74, 1868–1876. doi:10.1212/WNL.0b013e3181e24136
- Debmalya Barh, Dipali Dhawan, N.K.G., 2013. *Omics for personalized medicine*, Springer 2. ed.
- Di Filippo, M., Anderson, V.M., Altmann, D.R., Swanton, J.K., Plant, G.T., Thompson, A.J., Miller, D.H., 2010. 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* 81, 204–208. doi:10.1136/jnnp.2009.171769
- Di Rosa, M., Malaguarnera, G., De Gregorio, C., Drago, F., Malaguarnera, L., 2013. Evaluation of CHI3L1 and CHIT-1 expression in differentiated and polarized macrophages. *Inflammation* 36, 482–492. doi:10.1007/s10753-012-9569-8
- Di Rosa, M., Malaguarnera, L., 2016. Chitinase 3 Like-1: An Emerging Molecule Involved in Diabetes and Diabetic Complications. *Pathobiology* 83, 228–242. doi:10.1159/000444855
- Di Rosa, M., Tibullo, D., Saccone, S., Distefano, G., Basile, M.S., Di Raimondo, F., Malaguarnera, L., 2016. CHI3L1 nuclear localization in monocyte derived dendritic cells. *Immunobiology* 221, 347–356. doi:10.1016/j.imbio.2015.09.023
- Disanto, G., Barro, C., Benkert, P., Giardiello, A., Naegelin, Y., Sch, S., Zecca, C., Blennow, K., Zetterberg, H., Leppert, D., Kappos, L., Gobbi, C., 2017. Serum Neurofilament Light : A Biomarker of Neuronal Damage in Multiple Sclerosis. doi:10.1002/ana.24954
- Du, L., Zhang, Y., Chen, Y., Zhu, J., Yang, Y., Zhang, H.-L., 2017. Role of Microglia in Neurological Disorders and Their Potentials as a Therapeutic Target. *Mol. Neurobiol.* 54, 7567–7584. doi:10.1007/s12035-016-0245-0
- Dyment, D.A., Ebers, G.C., Sadovnick, A.D., 2004. Genetics of multiple sclerosis. *Lancet. Neurol.* 3, 104–110. doi:10.1016/s1474-4422(03)00663-x
- Ebers, G., 2013. Interactions of environment and genes in multiple sclerosis. *J. Neurol. Sci.* 334, 161–163. doi:10.1016/j.jns.2013.08.018
- Engel, S., Friedrich, M., Muthuraman, M., Steffen, F., Poplawski, A., Groppa, S., Bittner, S., Zipp, F., Luessi, F., 2019. Intrathecal B-cell accumulation and axonal damage distinguish MRI-based benign from aggressive onset in MS. *Neurol. Neuroimmunol. neuroinflammation* 6. doi:10.1212/NXI.0000000000000595
- Engelhardt, B., Sorokin, L., 2009. The blood-brain and the blood-cerebrospinal fluid barriers: function and dysfunction. *Semin. Immunopathol.* 31, 497–511. doi:10.1007/s00281-009-0177-0
- Felgenhauer, K., Schliep, G., Rapic, N., 1976. Evaluation of the blood-CSF barrier by protein gradients and the humoral immune response within the central nervous system. *J. Neurol. Sci.* 30, 113–128. doi:10.1016/0022-510x(76)90259-8
- Fialova, L., Bartos, A., Svarcova, J., Zimova, D., Kotoucova, J., Malbohan, I., 2013. Serum and cerebrospinal fluid light neurofilaments and antibodies against them in clinically isolated syndrome and multiple sclerosis. *J. Neuroimmunol.* 262, 113–120. doi:10.1016/j.jneuroim.2013.06.010

- Filippi, M., 2015. MRI measures of neurodegeneration in multiple sclerosis: implications for disability, disease monitoring, and treatment. *J. Neurol.* 262, 1–6. doi:10.1007/s00415-014-7340-9
- Filippi, M., Horsfield, M.A., Morrissey, S.P., MacManus, D.G., Rudge, P., McDonald, W.I., Miller, D.H., 1994. Quantitative brain MRI lesion load predicts the course of clinically isolated syndromes suggestive of multiple sclerosis. *Neurology* 44, 635–641. doi:10.1212/wnl.44.4.635
- Fraenkel, M., Jakob, A., 1913. Zur pathologie der multiplen sklerose mit besonderer berücksichtigung der akuten formen. *Zeitschrift für die gesamte Neurol. und Psychiatr.* 14, 565–603. doi:10.1007/BF02867902
- Franciotta, D., Zardini, E., Ravaglia, S., Piccolo, G., Andreoni, L., Bergamaschi, R., Romani, A., Tavazzi, E., Naldi, P., Ceroni, M., Marchioni, E., 2006. Cytokines and chemokines in cerebrospinal fluid and serum of adult patients with acute disseminated encephalomyelitis. *J. Neurol. Sci.* 247, 202–207. doi:10.1016/j.jns.2006.05.049
- Freedman, M.S., Selchen, D., Arnold, D.L., Prat, A., Banwell, B., Yeung, M., Morgenthau, D., Lapierre, Y., 2013. Treatment optimization in MS: Canadian MS Working Group updated recommendations. *Can. J. Neurol. Sci.* 40, 307–323. doi:10.1017/s0317167100014244
- Freedman, M.S., Thompson, E.J., Deisenhammer, F., Giovannoni, G., Grimsley, G., Keir, G., Ohman, S., Racke, M.K., Sharief, M., Sindic, C.J.M., Sellebjerg, F., Tourtellotte, W.W., 2005. Recommended standard of cerebrospinal fluid analysis in the diagnosis of multiple sclerosis: a consensus statement. *Arch. Neurol.* 62, 865–870. doi:10.1001/archneur.62.6.865
- Frischer, J.M., Bramow, S., Dal-Bianco, A., Lucchinetti, C.F., Rauschka, H., Schmidbauer, M., Laursen, H., Sorensen, P.S., Lassmann, H., 2009. The relation between inflammation and neurodegeneration in multiple sclerosis brains. *Brain* 132, 1175–1189. doi:10.1093/brain/awp070
- Frischer, J.M., Weigand, S.D., Guo, Y., Kale, N., Parisi, J.E., Pirko, I., Mandrekar, J., Bramow, S., Metz, I., Bruck, W., Lassmann, H., Lucchinetti, C.F., 2015. Clinical and pathological insights into the dynamic nature of the white matter multiple sclerosis plaque. *Ann. Neurol.* 78, 710–721. doi:10.1002/ana.24497
- Gaiottino, J., Norgren, N., Dobson, R., Topping, J., Nissim, A., Malaspina, A., Bestwick, J.P., Monsch, A.U., Regeniter, A., Lindberg, R.L., Kappos, L., Leppert, D., Petzold, A., Giovannoni, G., Kuhle, J., 2013. Increased neurofilament light chain blood levels in neurodegenerative neurological diseases. *PLoS One* 8, e75091. doi:10.1371/journal.pone.0075091
- Gandhi, R., Laroni, A., Weiner, H.L., 2010. Role of the innate immune system in the pathogenesis of multiple sclerosis. *J. Neuroimmunol.* 221, 7–14. doi:10.1016/j.jneuroim.2009.10.015
- Gasc, F., Coret, F., Pe, F.C., Alcalá, C., Escutia, M., Gil-perotin, S., Casanova, B., Bernad, A., Bosca, I., 2018. Onset of secondary progressive multiple sclerosis is not influenced by current relapsing multiple sclerosis therapies. doi:10.1177/2055217318783347
- Giannetti, P., Politis, M., Su, P., Turkheimer, F., Malik, O., Keihaninejad, S., Wu, K., Reynolds, R., Nicholas, R., Piccini, P., 2014. Microglia activation in multiple sclerosis black holes predicts outcome in progressive patients: an in vivo [(11)C](R)-PK11195-PET pilot study. *Neurobiol. Dis.* 65, 203–210. doi:10.1016/j.nbd.2014.01.018
- Gil-Perotin, S., Castillo-Villalba, J., Carreres-Polo, J., Navarré-Gimeno, A., Mallada-Frechín, J., Pérez-Miralles, F., Gascón, F., Alcalá-Vicente, C., Cubas-Nuñez, L., Casanova-Estruch, B., 2018. Progressive Demyelination in the Presence of Serum Myelin Oligodendrocyte Glycoprotein-IgG: A Case Report. *Front. Neurol.* doi:10.3389/fneur.2018.00340
- Grajchen, E., Hendriks, J.J.A., Bogie, J.F.J., 2018. The physiology of foamy phagocytes in multiple sclerosis. *Acta Neuropathol. Commun.* 6, 124. doi:10.1186/s40478-018-0628-8
- Grant, D., Morant, S., Barro, C., Pelletier, D., Giovannoni, G., 2017. Serum neurofilament is associated with progression of brain atrophy and disability in early MS ABSTRACT 826–831.
- Guan, Y., Jakimovski, D., Ramanathan, M., Weinstock-Guttman, B., Zivadinov, R., 2019. The role of Epstein-Barr virus in multiple sclerosis: from molecular pathophysiology to in vivo imaging. *Neural Regen. Res.* 14, 373–386. doi:10.4103/1673-5374.245462
- Hafler, D.A., 2004. Multiple sclerosis. *J. Clin. Invest.* 113, 788–794. doi:10.1172/JCI21357
- Haider, L., Zrzavy, T., Hametner, S., Höftberger, R., Bagnato, F., Grabner, G., Trattng, S., Pfeifenbring, S., Brück, W., Lassmann, H., 2016. The topography of demyelination and neurodegeneration in the multiple sclerosis brain. *Brain* 139, 807–815. doi:10.1093/brain/awv398
- Hakala, B.E., White, C., Recklies, A.D., 1993. Human cartilage gp-39, a major secretory product of articular chondrocytes and synovial cells, is a mammalian member of a chitinase protein family. *J. Biol. Chem.* 268, 25803–25810.

- Hall, S., Surova, Y., Öhrfelt, A., Blennow, K., Zetterberg, H., Hansson, O., 2016. Longitudinal Measurements of Cerebrospinal Fluid Biomarkers in Parkinson's Disease. *Mov. Disord.* 31, 898–905. doi:10.1002/mds.26578
- Hametner, S., Wimmer, I., Haider, L., Pfeifenbring, S., Bruck, W., Lassmann, H., 2013. Iron and neurodegeneration in the multiple sclerosis brain. *Ann. Neurol.* 74, 848–861. doi:10.1002/ana.23974
- Handel, A.E., Giovannoni, G., Ebers, G.C., Ramagopalan, S. V., 2010. Environmental factors and their timing in adult-onset multiple sclerosis. *Nat. Rev. Neurol.* 6, 156–166. doi:10.1038/nrneurol.2010.1
- Haynes, B.F., Soderberg, K.A., Fauci, A.S., 2019. Introducción al sistema inmunitario, in: Kasper, D., Fauci, A., Hauser, S., Longo, D., Jameson, J.L., Loscalzo, J. (Eds.), *Harrison. Principios de Medicina Interna*, 19e. McGraw-Hill Education, New York, NY.
- Hendricks, R., Baker, D., Brumm, J., Davancaze, T., Harp, C., Herman, A., Büdingen, H.-C. von, Townsend, M., Fischer, S.K., 2019. Establishment of neurofilament light chain Simoa assay in cerebrospinal fluid and blood. *Bioanalysis* 11, 1405–1418. doi:10.4155/bio-2019-0163
- Hinsinger, G., Galeotti, N., Nabholz, N., Urbach, S., Rigau, V., Demattei, C., Lehmann, S., Camu, W., Labauge, P., Castelnovo, G., Brassat, D., Loussouarn, D., Salou, M., Laplaud, D., Casez, O., Bockaert, J., Marin, P., Thouvenot, E., 2015. Chitinase 3-like proteins as diagnostic and prognostic biomarkers of multiple sclerosis. *Mult. Scler.* 21, 1251–1261. doi:10.1177/1352458514561906
- Ho, P.P., Kanter, J.L., Johnson, A.M., Srinagesh, H.K., Chang, E.-J., Purdy, T.M., van Haren, K., Wikoff, W.R., Kind, T., Khademi, M., Matloff, L.Y., Narayana, S., Hur, E.M., Lindstrom, T.M., He, Z., Fiehn, O., Olsson, T., Han, X., Han, M.H., Steinman, L., Robinson, W.H., 2012. Identification of naturally occurring fatty acids of the myelin sheath that resolve neuroinflammation. *Sci. Transl. Med.* 4, 137ra73. doi:10.1126/scitranslmed.3003831
- Höftberger, R., Aboul-Enein, F., Brueck, W., Lucchinetti, C., Rodriguez, M., Schmidbauer, M., Jellinger, K., Lassmann, H., 2004. Expression of major histocompatibility complex class I molecules on the different cell types in multiple sclerosis lesions. *Brain Pathol.* 14, 43–50. doi:10.1111/j.1750-3639.2004.tb00496.x
- HogenEsch, H., Dunham, A., Seymour, R., Renninger, M., Sundberg, J.P., 2006. Expression of chitinase-like proteins in the skin of chronic proliferative dermatitis (cpdm/cpdm) mice. *Exp. Dermatol.* 15, 808–814. doi:10.1111/j.1600-0625.2006.00483.x
- Hong, S., Therattil, A., Moyon, S., Gordon, A., Kim, K., Argaw, A.T., Hara, Y., Mariani, J.N., Sawai, S., Flodby, P., Crandall, E.D., Borok, Z., Sofroniew, M. V., Chapouly, C., John, G.R., 2017. Astrocytic tight junctions control inflammatory CNS lesion pathogenesis. *J. Clin. Invest.* 127, 3136–3151. doi:10.1172/JCI91301
- Huang, C., Huang, B., Bi, F., Yan, L.H., Tong, J., Huang, J., Xia, X.-G., Zhou, H., 2014. Profiling the genes affected by pathogenic TDP-43 in astrocytes. *J. Neurochem.* 129, 932–939. doi:10.1111/jnc.12660
- Huss, A., Otto, M., Senel, M., Ludolph, A.C., Abdelhak, A., Tumani, H., 2020. A Score Based on NfL and Glial Markers May Differentiate Between Relapsing-Remitting and Progressive MS Course. *Front. Neurol.* 11, 608. doi:10.3389/fneur.2020.00608
- Iershov, A., Odynets, K., Kornelyuk, A., Kavsan, V., 2010. Homology modeling of 3D structure of human chitinase-like protein CHI3L2. *Cent. Eur. J. Biol.* 5, 407–420. doi:10.2478/s11535-010-0039-8
- Im, J.H., Yeo, I.J., Park, P.H., Choi, D.Y., Han, S.-B., Yun, J., Hong, J.T., 2020. Deletion of Chitinase-3-like 1 accelerates stroke development through enhancement of Neuroinflammation by STAT6-dependent M2 microglial inactivation in Chitinase-3-like 1 knockout mice. *Exp. Neurol.* 323, 113082. doi:10.1016/j.expneurol.2019.113082
- Imberg, H., Elias, O., Novakova, L., Axelsson, M., Malmestrom, C., Nerman, O., Lycke, J., 2018. Searching for neurodegeneration in multiple sclerosis at clinical onset : Diagnostic value of biomarkers 1–14.
- Jacobsen, C., Hagemeyer, J., Myhr, K., Nyland, H., Lode, K., Bergsland, N., Ramasamy, D.P., Dalaker, T.O., Larsen, J.P., Farbu, E., Zivadnov, R., 2014. Brain atrophy and disability progression in multiple sclerosis patients : a 10-year follow-up study 1109–1115. doi:10.1136/jnnp-2013-306906
- Janelidze, S., Mattsson, N., Stomrud, E., Lindberg, O., Palmqvist, S., Zetterberg, H., Blennow, K., Hansson, O., 2018. CSF biomarkers of neuroinflammation and cerebrovascular dysfunction in early Alzheimer disease. *Neurology* 91, e867–e877. doi:10.1212/WNL.0000000000006082
- Johansen, J.S., 2006. Studies on serum YKL-40 as a biomarker in diseases with inflammation, tissue remodelling, fibroses and cancer. *Dan. Med. Bull.* 53, 172–209.
- Kanter, J.L., Narayana, S., Ho, P.P., Catz, I., Warren, K.G., Sobel, R.A., Steinman, L., Robinson, W.H., 2006.

- Lipid microarrays identify key mediators of autoimmune brain inflammation. *Nat. Med.* 12, 138–143. doi:10.1038/nm1344
- Kawachi, I., Lassmann, H., 2017. Neurodegeneration in multiple sclerosis and neuromyelitis optica 137–145. doi:10.1136/jnnp-2016-313300
- Kawada, M., Chen, C.-C., Arihiro, A., Nagatani, K., Watanabe, T., Mizoguchi, E., 2008. Chitinase 3-like-1 enhances bacterial adhesion to colonic epithelial cells through the interaction with bacterial chitin-binding protein. *Lab. Invest.* 88, 883–895. doi:10.1038/labinvest.2008.47
- Kazakova, M.H., Sarafian, V.S., 2009. YKL-40--a novel biomarker in clinical practice? *Folia Med. (Plovdiv)*. 51, 5–14.
- Kebir, H., Kreymborg, K., Ifergan, I., Dodelet-Devillers, A., Cayrol, R., Bernard, M., Giuliani, F., Arbour, N., Becher, B., Prat, A., 2007. Human TH17 lymphocytes promote blood-brain barrier disruption and central nervous system inflammation. *Nat. Med.* 13, 1173–1175. doi:10.1038/nm1651
- Khademi, M., Dring, A.M., Gilthorpe, J.D., Wuolikainen, A., Al Nimer, F., Harris, R.A., Andersson, M., Brundin, L., Piehl, F., Olsson, T., Svenningsson, A., 2013. Intense inflammation and nerve damage in early multiple sclerosis subsides at older age: a reflection by cerebrospinal fluid biomarkers. *PLoS One* 8, e63172. doi:10.1371/journal.pone.0063172
- Khalil, M., Teunissen, C.E., Otto, M., Piehl, F., Sormani, M.P., Gattringer, T., Barro, C., Kappos, L., Comabella, M., Fazekas, F., Petzold, A., Blennow, K., Zetterberg, H., Kuhle, J., 2018. Neurofilaments as biomarkers in neurological disorders. *Nat. Rev. Neurol.* 14, 577–589. doi:10.1038/s41582-018-0058-z
- Kieseier, B.C., Wiendl, H., Hemmer, B., Hartung, H.-P., 2007. Treatment and treatment trials in multiple sclerosis. *Curr. Opin. Neurol.* 20, 286–293. doi:10.1097/WCO.0b013e3281568b80
- Kim, D.-H., Park, H.-J., Lim, S., Koo, J.-H., Lee, H.-G., Choi, J.O., Oh, J.H., Ha, S.-J., Kang, M.-J., Lee, C.-M., Lee, C.G., Elias, J.A., Choi, J.-M., 2018. Regulation of chitinase-3-like-1 in T cell elicits Th1 and cytotoxic responses to inhibit lung metastasis. *Nat. Commun.* 9, 503. doi:10.1038/s41467-017-02731-6
- Kobelt, G., Thompson, A., Berg, J., Gannedahl, M., Eriksson, J., 2017. New insights into the burden and costs of multiple sclerosis in Europe. *Mult. Scler.* 23, 1123–1136. doi:10.1177/1352458517694432
- Koch, M., Kingwell, E., Rieckmann, P., Tremlett, H., 2010. The natural history of secondary progressive multiple sclerosis. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry* 81, 1039–1043. doi:10.1136/jnnp.2010.208173
- Kostulas, V.K., Link, H., Lefvert, A.K., 1987. Oligoclonal IgG bands in cerebrospinal fluid. Principles for demonstration and interpretation based on findings in 1114 neurological patients. *Arch. Neurol.* 44, 1041–1044. doi:10.1001/archneur.1987.00520220043014
- Krumbholz, M., Theil, D., Derfuss, T., Rosenwald, A., Schrader, F., Monoranu, C.-M., Kalled, S.L., Hess, D.M., Serafini, B., Aloisi, F., Wekerle, H., Hohlfeld, R., Meinl, E., 2005. BAFF is produced by astrocytes and up-regulated in multiple sclerosis lesions and primary central nervous system lymphoma. *J. Exp. Med.* 201, 195–200. doi:10.1084/jem.20041674
- Krupp, L.B., Tardieu, M., Amato, M.P., Banwell, B., Chitnis, T., Dale, R.C., Ghezzi, A., Hintzen, R., Kornberg, A., Pohl, D., Rostasy, K., Tenenbaum, S., Wassmer, E., 2013. International Pediatric Multiple Sclerosis Study Group criteria for pediatric multiple sclerosis and immune-mediated central nervous system demyelinating disorders: revisions to the 2007 definitions. *Mult. Scler.* 19, 1261–1267. doi:10.1177/1352458513484547
- Kuhle, J., Barro, C., Andreasson, U., Derfuss, T., Lindberg, R., Sandelius, Å., Liman, V., Norgren, N., Blennow, K., Zetterberg, H., 2016. Comparison of three analytical platforms for quantification of the neurofilament light chain in blood samples: ELISA, electrochemiluminescence immunoassay and Simoa. *Clin. Chem. Lab. Med.* 54, 1655–1661. doi:10.1515/cclm-2015-1195
- Kuhle, J., Kropshofer, H., Haering, D.A., Kundu, U., Meinert, R., 2019. Blood neuro filament light chain as a biomarker of MS disease activity and treatment response 0. doi:10.1212/WNL.0000000000007032
- Kuhle, J., Leppert, D., Petzold, A., Regeniter, A., Schindler, C., Mehling, M., Anthony, D.C., Kappos, L., Lindberg, R.L.P., 2011. Neurofilament heavy chain in CSF correlates with relapses and disability in multiple sclerosis. *Neurology* 76, 1206–1213. doi:10.1212/WNL.0b013e31821432ff
- Kuhle, J., Nourbakhsh, B., Grant, D., Morant, S., Barro, C., Yaldizli, O., Pelletier, D., Giovannoni, G., Waubant, E., Gnanapavan, S., 2017. Serum neurofilament is associated with progression of brain atrophy and disability in early MS. *Neurology* 88, 826–831. doi:10.1212/WNL.0000000000003653
- Kurtzke, J.F., 1983. Rating neurologic impairment in multiple sclerosis: an expanded disability status scale (EDSS). *Neurology* 33, 1444–1452. doi:10.1212/wnl.33.11.1444

- Kutzelnigg, A., Lucchinetti, C.F., Stadelmann, C., Bruck, W., Rauschka, H., Bergmann, M., Schmidbauer, M., Parisi, J.E., Lassmann, H., 2005. Cortical demyelination and diffuse white matter injury in multiple sclerosis. *Brain* 128, 2705–2712. doi:10.1093/brain/awh641
- Lansley, J., Mataix-Cols, D., Grau, M., Radua, J., Sastre-Garriga, J., 2013. Localized grey matter atrophy in multiple sclerosis: a meta-analysis of voxel-based morphometry studies and associations with functional disability. *Neurosci. Biobehav. Rev.* 37, 819–830. doi:10.1016/j.neubiorev.2013.03.006
- Lassmann, H., 2013. Pathology and disease mechanisms in different stages of multiple sclerosis. *J. Neurol. Sci.* 333, 1–4. doi:10.1016/j.jns.2013.05.010
- Lassmann, H., 2011. Review: the architecture of inflammatory demyelinating lesions: implications for studies on pathogenesis. *Neuropathol. Appl. Neurobiol.* 37, 698–710. doi:10.1111/j.1365-2990.2011.01189.x
- Lassmann, H., van Horssen, J., Mahad, D., 2012. Progressive multiple sclerosis: pathology and pathogenesis. *Nat. Rev. Neurol.* 8, 647–656. doi:10.1038/nrneuro.2012.168
- Lee, C.G., Da Silva, C.A., Dela Cruz, C.S., Ahangari, F., Ma, B., Kang, M.-J., He, C.-H., Takyar, S., Elias, J.A., 2011. Role of chitin and chitinase/chitinase-like proteins in inflammation, tissue remodeling, and injury. *Annu. Rev. Physiol.* 73, 479–501. doi:10.1146/annurev-physiol-012110-142250
- Lee, G.R., 2018. The Balance of Th17 versus Treg Cells in Autoimmunity. *Int. J. Mol. Sci.* 19. doi:10.3390/ijms19030730
- Lennon, V.A., Kryzer, T.J., Pittock, S.J., Verkman, A.S., Hinson, S.R., 2005. IgG marker of optic-spinal multiple sclerosis binds to the aquaporin-4 water channel. *J. Exp. Med.* 202, 473–477. doi:10.1084/jem.20050304
- Lennon, V.A., Wingerchuk, D.M., Kryzer, T.J., Pittock, S.J., Lucchinetti, C.F., Fujihara, K., Nakashima, I., Weinschenker, B.G., 2004. A serum autoantibody marker of neuromyelitis optica: distinction from multiple sclerosis. *Lancet (London, England)* 364, 2106–2112. doi:10.1016/S0140-6736(04)17551-X
- Liddelwell, S.A., Guttenplan, K.A., Clarke, L.E., Bennett, F.C., Bohlen, C.J., Schirmer, L., Bennett, M.L., Münch, A.E., Chung, S., Peterson, T.C., Wilton, D.K., Frouin, A., Napier, B.A., 2017. HHS Public Access 541, 481–487. doi:10.1038/nature21029.Neurotoxic
- Lim, E.T., Sellebjerg, F., Jensen, C. V., Altmann, D.R., Grant, D., Keir, G., Thompson, E.J., Giovannoni, G., 2005. Acute axonal damage predicts clinical outcome in patients with multiple sclerosis. *Mult. Scler.* 11, 532–536. doi:10.1191/1352458505ms1218oa
- Ling, H., Recklies, A.D., 2004. The chitinase 3-like protein human cartilage glycoprotein 39 inhibits cellular responses to the inflammatory cytokines interleukin-1 and tumour necrosis factor-alpha. *Biochem. J.* 380, 651–659. doi:10.1042/BJ20040099
- Link, H., Huang, Y.-M., 2006. Oligoclonal bands in multiple sclerosis cerebrospinal fluid: an update on methodology and clinical usefulness. *J. Neuroimmunol.* 180, 17–28. doi:10.1016/j.jneuroim.2006.07.006
- Llorens, F., Thune, K., Tahir, W., Kanata, E., Diaz-Lucena, D., Xanthopoulos, K., Kovatsi, E., Pleschka, C., Garcia-Esparcia, P., Schmitz, M., Ozbay, D., Correia, S., Correia, A., Milosevic, I., Andreoletti, O., Fernandez-Borges, N., Vorberg, I.M., Glatzel, M., Sklaviadis, T., Torres, J.M., Krasemann, S., Sanchez-Valle, R., Ferrer, I., Zerr, I., 2017. YKL-40 in the brain and cerebrospinal fluid of neurodegenerative dementias. *Mol. Neurodegener.* 12, 83. doi:10.1186/s13024-017-0226-4
- Long, X., Hu, H., Li, S., Chen, M., Cai, J., Song, B., 2016. Hippocampal YKL-40 expression in rats after status epilepticus. *Epilepsy Res.* 125, 52–57. doi:10.1016/j.eplepsyres.2016.05.014
- Lublin, F.D., Baier, M., Cutter, G., 2003. Effect of relapses on development of residual deficit in multiple sclerosis. *Neurology* 61, 1528–1532. doi:10.1212/01.wnl.0000096175.39831.21
- Lublin, F.D., Reingold, S.C., 1996. Defining the clinical course of multiple sclerosis: results of an international survey. National Multiple Sclerosis Society (USA) Advisory Committee on Clinical Trials of New Agents in Multiple Sclerosis. *Neurology* 46, 907–911. doi:10.1212/wnl.46.4.907
- Lublin, F.D., Reingold, S.C., Cohen, J.A., Cutter, G.R., Sørensen, P.S., Thompson, A.J., Wolinsky, J.S., Balcer, L.J., Banwell, B., Barkhof, F., Bebo, B.J., Calabresi, P.A., Clanet, M., Comi, G., Fox, R.J., Freedman, M.S., Goodman, A.D., Inglesse, M., Kappos, L., Kieseier, B.C., Lincoln, J.A., Lubetzki, C., Miller, A.E., Montalban, X., O'Connor, P.W., Petkau, J., Pozzilli, C., Rudick, R.A., Sormani, M.P., Stüve, O., Waubant, E., Polman, C.H., 2014. Defining the clinical course of multiple sclerosis: the 2013 revisions. *Neurology* 83, 278–286. doi:10.1212/WNL.0000000000000560
- Lucchinetti, C., Bruck, W., Parisi, J., Scheithauer, B., Rodriguez, M., Lassmann, H., 2000. Heterogeneity of multiple sclerosis lesions: implications for the pathogenesis of demyelination. *Ann. Neurol.* 47, 707–717.

- Lycke, J.N., Karlsson, J.-E., Andersen, O., Rosengren, L.E., 1998. Neurofilament protein in cerebrospinal fluid: a potential marker of activity in multiple sclerosis. *J. Neurol. Neurosurg. & Psychiatry* 64, 402 LP – 404. doi:10.1136/jnnp.64.3.402
- MacLennan, I.C.M., Toellner, K.-M., Cunningham, A.F., Serre, K., Sze, D.M.-Y., Zúñiga, E., Cook, M.C., Vinuesa, C.G., 2003. Extrafollicular antibody responses. *Immunol. Rev.* 194, 8–18. doi:10.1034/j.1600-065x.2003.00058.x
- Magliozzi, R., Howell, O., Vora, A., Serafini, B., Nicholas, R., Puopolo, M., Reynolds, R., Aloisi, F., 2007. Meningeal B-cell follicles in secondary progressive multiple sclerosis associate with early onset of disease and severe cortical pathology. doi:10.1093/brain/awm038
- Magliozzi, R., Howell, O.W., Reeves, C., Roncaroli, F., Nicholas, R., Serafini, B., Aloisi, F., Reynolds, R., 2010. A Gradient of neuronal loss and meningeal inflammation in multiple sclerosis. *Ann. Neurol.* 68, 477–493. doi:10.1002/ana.22230
- Magraner, M.J., Bosca, I., Simo-Castello, M., Garcia-Marti, G., Alberich-Bayarri, A., Coret, F., Alvarez-Cermeno, J.C., Marti-Bonmati, L., Villar, L.M., Casanova, B., 2012. Brain atrophy and lesion load are related to CSF lipid-specific IgM oligoclonal bands in clinically isolated syndromes. *Neuroradiology* 54, 5–12. doi:10.1007/s00234-011-0841-7
- Mahad, D.J., Lawry, J., Howell, S.J.L., Woodroffe, M.N., 2003. Longitudinal study of chemokine receptor expression on peripheral lymphocytes in multiple sclerosis: CXCR3 upregulation is associated with relapse. *Mult. Scler.* 9, 189–198. doi:10.1191/1352458503ms899oa
- Malmestrom, C., Axelsson, M., Lycke, J., Zetterberg, H., Blennow, K., Olsson, B., 2014. CSF levels of YKL-40 are increased in MS and replaces with immunosuppressive treatment. *J. Neuroimmunol.* 269, 87–89. doi:10.1016/j.jneuroim.2014.02.004
- Mane-Martinez, M.A., Olsson, B., Bau, L., Matas, E., Cobo-Calvo, A., Andreasson, U., Blennow, K., Romero-Pinel, L., Martinez-Yelamos, S., Zetterberg, H., 2016. Glial and neuronal markers in cerebrospinal fluid in different types of multiple sclerosis. *J. Neuroimmunol.* 299, 112–117. doi:10.1016/j.jneuroim.2016.08.004
- Manouchehrinia, A., Stridh, P., Khademi, M., Leppert, D., Barro, C., Michalak, Z., Benkert, P., Lycke, J., Alfredsson, L., Kappos, L., Piehl, F., Olsson, T., Kuhle, J., Kockum, I., 2020. Plasma neurofilament light levels are associated with risk of disability in multiple sclerosis. *Neurology* 94, e2457–e2467. doi:10.1212/WNL.0000000000009571
- Matsushita, T., Tateishi, T., Isobe, N., Yonekawa, T., Yamasaki, R., Matsuse, D., Murai, H., Kira, J.-I., 2013. Characteristic cerebrospinal fluid cytokine/chemokine profiles in neuromyelitis optica, relapsing remitting or primary progressive multiple sclerosis. *PLoS One* 8, e61835. doi:10.1371/journal.pone.0061835
- Matute-Blanch, C., Calvo-Barreiro, L., Carballo-Carbajal, I., Gonzalo, R., Sanchez, A., Vila, M., Montalban, X., Comabella, M., 2020. Chitinase 3-like 1 is neurotoxic in primary cultured neurons. *Sci. Rep.* 10, 7118. doi:10.1038/s41598-020-64093-2
- Matzinger, P., 1994. Tolerance, danger, and the extended family. *Annu. Rev. Immunol.* 12, 991–1045. doi:10.1146/annurev.iy.12.040194.005015
- Michel, L., Prat, A., 2016. One more role for the gut: microbiota and blood brain barrier. *Ann. Transl. Med.* 4, 15. doi:10.3978/j.issn.2305-5839.2015.10.16
- Michel, L., Touil, H., Pikor, N.B., Gommerman, J.L., Prat, A., Bar-Or, A., 2015. B Cells in the Multiple Sclerosis Central Nervous System: Trafficking and Contribution to CNS-Compartmentalized Inflammation. *Front. Immunol.* 6, 636. doi:10.3389/fimmu.2015.00636
- Miller, D., Barkhof, F., Montalban, X., Thompson, A., Filippi, M., 2005. Clinically isolated syndromes suggestive of multiple sclerosis, part 2: non-conventional MRI, recovery processes, and management. *Lancet. Neurol.* 4, 341–348. doi:10.1016/S1474-4422(05)70095-8
- Misu, T., Höftberger, R., Fujihara, K., Wimmer, I., Takai, Y., Nishiyama, S., Nakashima, I., Konno, H., Bradl, M., Garzuly, F., Itoyama, Y., Aoki, M., Lassmann, H., 2013. Presence of six different lesion types suggests diverse mechanisms of tissue injury in neuromyelitis optica. *Acta Neuropathol.* 125, 815–827. doi:10.1007/s00401-013-1116-7
- Mitsdoerffer, M., Peters, A., 2016. Tertiary Lymphoid Organs in Central Nervous System Autoimmunity 7, 1–12. doi:10.3389/fimmu.2016.00451
- Mizoguchi, E., 2006. Chitinase 3-like-1 exacerbates intestinal inflammation by enhancing bacterial adhesion and invasion in colonic epithelial cells. *Gastroenterology* 130, 398–411. doi:10.1053/j.gastro.2005.12.007
- Modvig, S., Degn, M., Sander, B., Horwitz, H., Wanscher, B., Sellebjerg, F., Frederiksen, J.L., 2016.

- Cerebrospinal fluid neurofilament light chain levels predict visual outcome after optic neuritis. *Mult. Scler.* 22, 590–598. doi:10.1177/1352458515599074
- Muszynski, P., Groblewska, M., Kulczynska-Przybik, A., Kulakowska, A., Mroczko, B., 2017. YKL-40 as a Potential Biomarker and a Possible Target in Therapeutic Strategies of Alzheimer's Disease. *Curr. Neuropharmacol.* 15, 906–917. doi:10.2174/1570159X15666170208124324
- Neurological, D., Disease, N., 2017. Biomarkers of multiple sclerosis : current findings 19–29.
- Norden, D.M., Godbout, J.P., 2013. Review: microglia of the aged brain: primed to be activated and resistant to regulation. *Neuropathol. Appl. Neurobiol.* 39, 19–34. doi:10.1111/j.1365-2990.2012.01306.x
- Norgren, N., Sundstrom, P., Svenningsson, A., Rosengren, L., Stigbrand, T., Gunnarsson, M., 2004. Neurofilament and glial fibrillary acidic protein in multiple sclerosis. *Neurology* 63, 1586–1590. doi:10.1212/01.wnl.0000142988.49341.d1
- Noseworthy, J.H., Lucchinetti, C., Rodriguez, M., Weinshenker, B.G., 2000. Multiple sclerosis. *N. Engl. J. Med.* 343, 938–952. doi:10.1056/NEJM200009283431307
- Novakova, L., Axelsson, M., Khademi, M., Zetterberg, H., Blennow, K., Malmestrom, C., Piehl, F., Olsson, T., Lycke, J., 2017a. Cerebrospinal fluid biomarkers as a measure of disease activity and treatment efficacy in relapsing-remitting multiple sclerosis. *J. Neurochem.* 141, 296–304. doi:10.1111/jnc.13881
- Novakova, L., Axelsson, M., Khademi, M., Zetterberg, H., Blennow, K., Malmestrom, C., Piehl, F., Olsson, T., Lycke, J., 2017b. Cerebrospinal fluid biomarkers of inflammation and degeneration as measures of fingolimod efficacy in multiple sclerosis. *Mult. Scler.* 23, 62–71. doi:10.1177/1352458516639384
- Novakova, L., Zetterberg, H., Sundström, P., Axelsson, M., Khademi, M., Gunnarsson, M., Malmeström, C., Svenningsson, A., Olsson, T., Piehl, F., Blennow, K., Lycke, J., 2017c. Monitoring disease activity in multiple sclerosis using serum neurofilament light protein. *Neurology* 89, 2230–2237. doi:10.1212/WNL.0000000000004683
- Nutt, S.L., Hodgkin, P.D., Tarlinton, D.M., Corcoran, L.M., 2015. The generation of antibody-secreting plasma cells. *Nat. Rev. Immunol.* 15, 160–171. doi:10.1038/nri3795
- Ober, C., Tan, Z., Sun, Y., Possick, J.D., Pan, L., Nicolae, R., Radford, S., Parry, R.R., Heinzmann, A., Deichmann, K.A., Lester, L.A., Gern, J.E., Lemanske, R.F.J., Nicolae, D.L., Elias, J.A., Chupp, G.L., 2008. Effect of variation in CHI3L1 on serum YKL-40 level, risk of asthma, and lung function. *N. Engl. J. Med.* 358, 1682–1691. doi:10.1056/NEJMoa0708801
- Obermeier, B., Verma, A., Ransohoff, R.M., 2016. The blood-brain barrier. *Handb. Clin. Neurol.* 133, 39–59. doi:10.1016/B978-0-444-63432-0.00003-7
- Of, S.E., In, N., 2001. USE OF BIOMARKERS AND SURROGATE ENDPOINTS IN DRUG DEVELOPMENT AND REGULATORY DECISION MAKING :
- Ozakbas, S., Cinar, B.P., Ozcelik, P., Baser, H., Kosehasanogullari, G., 2017. Intrathecal IgM index correlates with a severe disease course in multiple sclerosis: Clinical and MRI results. *Clin. Neurol. Neurosurg.* 160, 27–29. doi:10.1016/j.clineuro.2017.05.026
- Park, C.-S., Choi, Y.S., 2005. How do follicular dendritic cells interact intimately with B cells in the germinal centre? *Immunology* 114, 2–10. doi:10.1111/j.1365-2567.2004.02075.x
- Park, H.Y., Jun, C.-D., Jeon, S.-J., Choi, S.-S., Kim, H.-R., Choi, D.-B., Kwak, S., Lee, H.-S., Cheong, J.S., So, H.-S., Lee, Y.-J., Park, D.-S., 2012. Serum YKL-40 levels correlate with infarct volume, stroke severity, and functional outcome in acute ischemic stroke patients. *PLoS One* 7, e51722. doi:10.1371/journal.pone.0051722
- Perez-Carmona, N., Fernandez-Jover, E., Sempere, A.P., 2019. [Epidemiology of multiple sclerosis in Spain]. *Rev. Neurol.* 69, 32–38. doi:10.33588/rn.6901.2018477
- Pérez-Miralles, F., Prefasi, D., García-Merino, A., Gascón-Giménez, F., Medrano, N., Castillo-Villalba, J., Cubas, L., Alcalá, C., Gil-Perotín, S., Gómez-Ballesteros, R., Maurino, J., Álvarez-García, E., Casanova, B., 2020. CSF chitinase 3-like-1 association with disability of primary progressive MS. *Neurol. Neuroimmunol. neuroinflammation* 7. doi:10.1212/NXI.0000000000000815
- Perez-Miralles, F., Sastre-Garriga, J., Tintore, M., Arrambide, G., Nos, C., Perkal, H., Rio, J., Edo, M.C., Horga, A., Castillo, J., Auger, C., Huerga, E., Rovira, A., Montalban, X., 2013. Clinical impact of early brain atrophy in clinically isolated syndromes. *Mult. Scler.* 19, 1878–1886. doi:10.1177/1352458513488231
- Perrakis, A., Tews, I., Dauter, Z., Oppenheim, A.B., Chet, I., Wilson, K.S., Vorgias, C.E., 1994. Crystal structure of a bacterial chitinase at 2.3 Å resolution. *Structure* 2, 1169–1180. doi:10.1016/s0969-

2126(94)00119-7

- Peter Parham, 2006. *Inmunología*, 2ª. ed. Editorial Médica Panamericana.
- Petzold, A., Steenwijk, M.D., Eikelenboom, J.M., Wattjes, M.P., Uitdehaag, B.M., 2016. Elevated CSF neurofilament proteins predict brain atrophy: A 15-year follow-up study. *Mult. Scler.* 22, 1154–1162. doi:10.1177/1352458516645206
- Podbielska, M., O’Keefe, J., Hogan, E.L., 2018. Autoimmunity in multiple sclerosis: role of sphingolipids, invariant NKT cells and other immune elements in control of inflammation and neurodegeneration. *J. Neurol. Sci.* 385, 198–214. doi:10.1016/j.jns.2017.12.022
- Polman, C.H., Reingold, S.C., Banwell, B., Clanet, M., Cohen, J.A., Filippi, M., Fujihara, K., Havrdova, E., Hutchinson, M., Kappos, L., Lublin, F.D., Montalban, X., Connor, P.O., 2011. Diagnostic Criteria for Multiple Sclerosis : 2010 Revisions to the McDonald Criteria. doi:10.1002/ana.22366
- Ponath, G., Park, C., Pitt, D., 2018. The Role of Astrocytes in Multiple Sclerosis. *Front. Immunol.* 9, 217. doi:10.3389/fimmu.2018.00217
- Popescu, V., Agosta, F., Hulst, H.E., Sluimer, I.C., Knol, D.L., Sormani, M.P., Enzinger, C., Ropele, S., Alonso, J., Sastre-Garriga, J., Rovira, A., Montalban, X., Bodini, B., Ciccarelli, O., Khaleeli, Z., Chard, D.T., Matthews, L., Palace, J., Giorgio, A., De Stefano, N., Eisele, P., Gass, A., Polman, C.H., Uitdehaag, B.M.J., Messina, M.J., Comi, G., Filippi, M., Barkhof, F., Vrenken, H., 2013. Brain atrophy and lesion load predict long term disability in multiple sclerosis. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry* 84, 1082–1091. doi:10.1136/jnnp-2012-304094
- Poser, C.M., Paty, D.W., Scheinberg, L., McDonald, W.I., Davis, F.A., Ebers, G.C., Johnson, K.P., Sibley, W.A., Silberberg, D.H., Tourtellotte, W.W., 1983. New diagnostic criteria for multiple sclerosis: guidelines for research protocols. *Ann. Neurol.* 13, 227–231. doi:10.1002/ana.410130302
- Pranzatelli, M.R., Tate, E.D., Hoefgen, E.R., Swan, J.A., Colliver, J.A., 2008. Therapeutic down-regulation of central and peripheral B-cell-activating factor (BAFF) production in pediatric opsoclonus-myoclonus syndrome. *Cytokine* 44, 26–32. doi:10.1016/j.cyto.2008.06.001
- Prineas, J.W., Kwon, E.E., Cho, E.S., Sharer, L.R., Barnett, M.H., Oleszak, E.L., Hoffman, B., Morgan, B.P., 2001. Immunopathology of secondary-progressive multiple sclerosis. *Ann. Neurol.* 50, 646–657. doi:10.1002/ana.1255
- Pugliatti, M., Rosati, G., Carton, H., Riise, T., Drulovic, J., Vécsei, L., Milanov, I., 2006. The epidemiology of multiple sclerosis in Europe. *Eur. J. Neurol.* 13, 700–722. doi:10.1111/j.1468-1331.2006.01342.x
- Querol-Vilaseca, M., Colom-Cadena, M., Pegueroles, J., San Martin-Paniello, C., Clarimon, J., Belbin, O., Fortea, J., Lleo, A., 2017. YKL-40 (Chitinase 3-like I) is expressed in a subset of astrocytes in Alzheimer’s disease and other tauopathies. *J. Neuroinflammation* 14, 118. doi:10.1186/s12974-017-0893-7
- Quintana, E., Coll, C., Salavedra-Pont, J., Munoz-San Martin, M., Robles-Cedeno, R., Tomas-Roig, J., Buxo, M., Matute-Blanch, C., Villar, L.M., Montalban, X., Comabella, M., Perkal, H., Gich, J., Ramio-Torrenta, L., 2018. Cognitive impairment in early stages of multiple sclerosis is associated with high cerebrospinal fluid levels of chitinase 3-like 1 and neurofilament light chain. *Eur. J. Neurol.* 25, 1189–1191. doi:10.1111/ene.13687
- Quintana, F.J., Farez, M.F., Vigiotta, V., Iglesias, A.H., Merbl, Y., Izquierdo, G., Lucas, M., Basso, A.S., Khoury, S.J., Lucchinetti, C.F., Cohen, I.R., Weiner, H.L., 2008. Antigen microarrays identify unique serum autoantibody signatures in clinical and pathologic subtypes of multiple sclerosis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 105, 18889–18894. doi:10.1073/pnas.0806310105
- Radue, E.-W., Barkhof, F., Kappos, L., Sprenger, T., Häring, D.A., de Vera, A., von Rosenstiel, P., Bright, J.R., Francis, G., Cohen, J.A., 2015. Correlation between brain volume loss and clinical and MRI outcomes in multiple sclerosis. *Neurology* 84, 784–793. doi:10.1212/WNL.0000000000001281
- Rahn, A.C., Köpke, S., Stellmann, J.-P., Schifffmann, I., Lukas, C., Chard, D., Heesen, C., 2019. Magnetic resonance imaging as a prognostic disability marker in clinically isolated syndrome: A systematic review. *Acta Neurol. Scand.* 139, 18–32. doi:10.1111/ane.13010
- Rathcke, C.N., Johansen, J.S., Vestergaard, H., 2006. YKL-40, a biomarker of inflammation, is elevated in patients with type 2 diabetes and is related to insulin resistance. *Inflamm. Res. Off. J. Eur. Histamine Res. Soc. ... [et al.]* 55, 53–59. doi:10.1007/s00011-005-0010-8
- Recklies, A.D., White, C., Ling, H., 2002. The chitinase 3-like protein human cartilage glycoprotein 39 (Hcgp39) stimulates proliferation of human connective-tissue cells and activates both extracellular signal-regulated kinase- and protein kinase B-mediated signalling pathways. *Biochem. J.* 365, 119–126. doi:10.1042/BJ20020075
- Rehli, M., Niller, H.-H., Ammon, C., Langmann, S., Schwarzfischer, L., Andreesen, R., Krause, S.W., 2003.

- Transcriptional regulation of CHI3L1, a marker gene for late stages of macrophage differentiation. *J. Biol. Chem.* 278, 44058–44067. doi:10.1074/jbc.M306792200
- Ribeiro, C.M., Oliveira, S.R., Alfieri, D.F., Flauzino, T., Kaimen-Maciel, D.R., Simão, A.N.C., Maes, M., Reiche, E.M.V., 2019. Tumor necrosis factor alpha (TNF- α) and its soluble receptors are associated with disability, disability progression and clinical forms of multiple sclerosis. *Inflamm. Res. Off. J. Eur. Histamine Res. Soc. ... [et al.]* 68, 1049–1059. doi:10.1007/s00011-019-01286-0
- Ri, J., Otero-romero, S., Arrambide, G., Tintore, M., Tur, C., Comabella, M., Nos, C., Vidal-jordana, A., Castillo, J., Palavra, F., Simon, E., 2015. Defining high , medium and low impact prognostic factors for developing multiple sclerosis 1863–1874. doi:10.1093/brain/awv105
- Sanfilippo, C., Longo, A., Lazzara, F., Cambria, D., Distefano, G., Palumbo, M., Cantarella, A., Malaguarnera, L., Di Rosa, M., 2017. CHI3L1 and CHI3L2 overexpression in motor cortex and spinal cord of sALS patients. *Mol. Cell. Neurosci.* 85, 162–169. doi:10.1016/j.mcn.2017.10.001
- Sastre-garriga, J., Ingle, G.T., Chard, D.T., Cercignani, M., Miller, D.H., Thompson, A.J., 2005. Grey and white matter volume changes in early primary progressive multiple sclerosis : a longitudinal study c, 1454–1460. doi:10.1093/brain/awh498
- Sastre-Garriga, J., Pareto, D., Rovira, A., 2017. Brain Atrophy in Multiple Sclerosis: Clinical Relevance and Technical Aspects. *Neuroimaging Clin. N. Am.* 27, 289–300. doi:10.1016/j.nic.2017.01.002
- Sawcer, S., Hellenthal, G., 2011. The major histocompatibility complex and multiple sclerosis: a smoking gun? *Brain* 134, 638–640. doi:10.1093/brain/awq384
- Scheuner, M.T., Sieverding, P., Shekelle, P.G., 2008. Delivery of genomic medicine for common chronic adult diseases: a systematic review. *JAMA* 299, 1320–1334. doi:10.1001/jama.299.11.1320
- Schwarz, S., Mohr, A., Knauth, M., Wildemann, B., Storch-Hagenlocher, B., 2001. Acute disseminated encephalomyelitis: a follow-up study of 40 adult patients. *Neurology* 56, 1313–1318. doi:10.1212/wnl.56.10.1313
- Schwenkenbecher, P., Wurster, U., Konen, F.F., Gingele, S., Sühs, K., Wattjes, M.P., Stangel, M., Skripuletz, T., Filippo, M. Di, 2019. Impact of the McDonald Criteria 2017 on Early Diagnosis of Relapsing-Remitting Multiple Sclerosis 10, 1–8. doi:10.3389/fneur.2019.00188
- Scott, T.F., 2017. Understanding the impact of relapses in the overall course of MS; refinement of the 2 stage natural history model. *J. Neuroimmunol.* 305, 162–166. doi:10.1016/j.jneuroim.2017.02.011
- Sellebjerg, F., Bornsen, L., Ammitzboll, C., Nielsen, J.E., Vinther-Jensen, T., Hjermand, L.E., von Essen, M., Ratzner, R.L., Soelberg Sorensen, P., Romme Christensen, J., 2017. Defining active progressive multiple sclerosis. *Mult. Scler.* 23, 1727–1735. doi:10.1177/1352458517726592
- Sellebjerg, F., Bornsen, L., Khademi, M., Krakauer, M., Olsson, T., Frederiksen, J.L., Sorensen, P.S., 2009. Increased cerebrospinal fluid concentrations of the chemokine CXCL13 in active MS. *Neurology* 73, 2003–2010. doi:10.1212/WNL.0b013e3181c5b457
- Sellebjerg, F., Royen, L., Soelberg Sørensen, P., Oturai, A.B., Jensen, P.E.H., 2019. Prognostic value of cerebrospinal fluid neurofilament light chain and chitinase-3-like-1 in newly diagnosed patients with multiple sclerosis. *Mult. Scler.* 25, 1444–1451. doi:10.1177/1352458518794308
- Serafini, B., Rosicarelli, B., Magliozzi, R., Stigliano, E., Aloisi, F., 2004. Detection of ectopic B-cell follicles with germinal centers in the meninges of patients with secondary progressive multiple sclerosis. *Brain Pathol.* 14, 164–174. doi:10.1111/j.1750-3639.2004.tb00049.x
- Shackelton, L.M., Mann, D.M., Millis, A.J., 1995. Identification of a 38-kDa heparin-binding glycoprotein (gp38k) in differentiating vascular smooth muscle cells as a member of a group of proteins associated with tissue remodeling. *J. Biol. Chem.* 270, 13076–13083. doi:10.1074/jbc.270.22.13076
- Shlomchik, M.J., Weisel, F., 2012. Germinal center selection and the development of memory B and plasma cells. *Immunol. Rev.* 247, 52–63. doi:10.1111/j.1600-065X.2012.01124.x
- Siller, N., Kuhle, J., Muthuraman, M., Barro, C., Uphaus, T., Groppa, S., Kappos, L., Zipp, F., Bittner, S., 2019. Serum neurofilament light chain is a biomarker of acute and chronic neuronal damage in early multiple sclerosis. *Mult. Scler.* 25, 678–686. doi:10.1177/1352458518765666
- Sinha, S., Itani, F.R., Karandikar, N.J., 2014. Immune regulation of multiple sclerosis by CD8+ T cells. *Immunol. Res.* 59, 254–265. doi:10.1007/s12026-014-8529-9
- Sorensen, T.L., Tani, M., Jensen, J., Pierce, V., Lucchinetti, C., Folcik, V.A., Qin, S., Rottman, J., Sellebjerg, F., Strieter, R.M., Frederiksen, J.L., Ransohoff, R.M., 1999. Expression of specific chemokines and chemokine receptors in the central nervous system of multiple sclerosis patients. *J. Clin. Invest.* 103, 807–815. doi:10.1172/JCI5150
- Staun-Ram, E., Miller, A., 2017. Effector and regulatory B cells in Multiple Sclerosis. *Clin. Immunol.* 184.

- doi:10.1016/j.clim.2017.04.014
- Sun, Y.J., Chang, N.C., Hung, S.I., Chang, A.C., Chou, C.C., Hsiao, C.D., 2001. The crystal structure of a novel mammalian lectin, Ym1, suggests a saccharide binding site. *J. Biol. Chem.* 276, 17507–17514. doi:10.1074/jbc.M010416200
- Takano, R., Misu, T., Takahashi, T., Izumiyama, M., Fujihara, K., Itoyama, Y., 2008. A prominent elevation of glial fibrillary acidic protein in the cerebrospinal fluid during relapse in neuromyelitis optica. *Tohoku J. Exp. Med.* 215, 55–59. doi:10.1620/tjem.215.55
- Tenembaum, S., Chitnis, T., Nakashima, I., Collongues, N., McKeon, A., Levy, M., Rostasy, K., 2016. Neuromyelitis optica spectrum disorders in children and adolescents. *Neurology* 87, S59–66. doi:10.1212/WNL.0000000000002824
- Teunissen, C.E., Dijkstra, C., Polman, C., 2005. Biological markers in CSF and blood for axonal degeneration in multiple sclerosis. *Lancet. Neurol.* 4, 32–41. doi:10.1016/S1474-4422(04)00964-0
- Teunissen, C.E., Iacobaeus, E., Khademi, M., Brundin, L., Norgren, N., Koel-Simmelink, M.J.A., Schepens, M., Bouwman, F., Twaalfhoven, H.A.M., Blom, H.J., Jakobs, C., Dijkstra, C.D., 2009. Combination of CSF N-acetylaspartate and neurofilaments in multiple sclerosis. *Neurology* 72, 1322–1329. doi:10.1212/WNL.0b013e3181a0fe3f
- Thompson, A.G., Gray, E., Bampton, A., Raciborska, D., Talbot, K., Turner, M.R., 2019. CSF chitinase proteins in amyotrophic lateral sclerosis. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry* 90, 1215–1220. doi:10.1136/jnnp-2019-320442
- Thompson, A.J., Banwell, B.L., Barkhof, F., Carroll, W.M., Coetzee, T., Comi, G., Correale, J., Fazekas, F., Filippi, M., Freedman, M.S., Fujihara, K., Galetta, S.L., Hartung, H.P., Kappos, L., Lublin, F.D., Marrie, R.A., Miller, A.E., Miller, D.H., Montalban, X., Mowry, E.M., Sorensen, P.S., Tintore, M., Traboulsee, A.L., Trojano, M., Uitdehaag, B.M.J., Vukusic, S., Waubant, E., Weinschenker, B.G., Reingold, S.C., Cohen, J.A., 2018. Diagnosis of multiple sclerosis: 2017 revisions of the McDonald criteria. *Lancet. Neurol.* 17, 162–173. doi:10.1016/S1474-4422(17)30470-2
- Trapp, B.D., Nave, K.-A., 2008. Multiple sclerosis: an immune or neurodegenerative disorder? *Annu. Rev. Neurosci.* 31, 247–269. doi:10.1146/annurev.neuro.30.051606.094313
- Tremlett, H., Yousefi, M., Devonshire, V., Rieckmann, P., Zhao, Y., 2009. Impact of multiple sclerosis relapses on progression diminishes with time. *Neurology* 73, 1616–1623. doi:10.1212/WNL.0b013e3181c1e44f
- Tullman, M.J., Oshinsky, R.J., Lublin, F.D., Cutter, G.R., 2004. Clinical characteristics of progressive relapsing multiple sclerosis. *Mult. Scler.* 10, 451–454. doi:10.1191/1352458504ms1059oa
- Vass, K., Lassmann, H., Wisniewski, H.M., Iqbal, K., 1984. Ultracytochemical distribution of myelin basic protein after injection into the cerebrospinal fluid. Evidence for transport through the blood-brain barrier and binding to the luminal surface of cerebral veins. *J. Neurol. Sci.* 63, 423–433. doi:10.1016/0022-510x(84)90165-5
- Vial, C., Pozzetto, B., Essid, A., Stephan, J.-L., Chabrier, S., 2007. [Acute encephalitis: report on 32 consecutive pediatric cases observed in one hospital]. *Med. Mal. Infect.* 37, 208–214. doi:10.1016/j.medmal.2007.01.008
- Vidal-Jordana, A., Sastre-Garriga, J., Pareto, D., Tur, C., Arrambide, G., Otero-Romero, S., Huerga, E., Mitjana, R., Auger, C., Tintore, M., Rovira, A., Montalban, X., 2018. Brain atrophy 15 years after CIS: Baseline and follow-up clinico-radiological correlations. *Mult. Scler.* 24, 721–727. doi:10.1177/1352458517707070
- Vidal-Jordana, A., Sastre-Garriga, J., Perez-Miralles, F., Pareto, D., Rio, J., Auger, C., Tintore, M., Rovira, A., Montalban, X., 2016. Brain Volume Loss During the First Year of Interferon-Beta Treatment in Multiple Sclerosis: Baseline Inflammation and Regional Brain Volume Dynamics. *J. Neuroimaging* 26, 532–538. doi:10.1111/jon.12337
- Villar, L.M., Masjuan, J., Gonzalez-Porte, P., Plaza, J., Sadaba, M.C., Roldan, E., Bootello, A., Alvarez-Cermeno, J.C., 2003. Intrathecal IgM synthesis is a prognostic factor in multiple sclerosis. *Ann. Neurol.* 53, 222–226. doi:10.1002/ana.10441
- Villar, L.M., Masjuan, J., Gonzalez-Porte, P., Plaza, J., Sadaba, M.C., Roldan, E., Bootello, A., Alvarez-Cermeno, J.C., 2002. Intrathecal IgM synthesis predicts the onset of new relapses and a worse disease course in MS. *Neurology* 59, 555–559. doi:10.1212/wnl.59.4.555
- Villar, L.M., Sadaba, M.C., Roldan, E., Masjuan, J., Gonzalez-Porte, P., Villarrubia, N., Espino, M., Garcia-Trujillo, J.A., Bootello, A., Alvarez-Cermeno, J.C., 2005. Intrathecal synthesis of oligoclonal IgM against myelin lipids predicts an aggressive disease course in MS. *J. Clin. Invest.* 115, 187–194. doi:10.1172/JCI22833

- Volck, B., Price, P.A., Johansen, J.S., Sørensen, O., Benfield, T.L., Nielsen, H.J., Calafat, J., Borregaard, N., 1998. YKL-40, a mammalian member of the chitinase family, is a matrix protein of specific granules in human neutrophils. *Proc. Assoc. Am. Physicians* 110, 351–360.
- Vu, L., An, J., Kovalik, T., Gendron, T., Petrucelli, L., Bowser, R., 2020. sectional and longitudinal measures of chitinase proteins in amyotrophic lateral sclerosis and expression of CHI3L1 in activated astrocytes 350–358. doi:10.1136/jnnp-2019-321916
- Weber, F., Meinl, E., Aloisi, F., Nevinny-Stickel, C., Albert, E., Wekerle, H., Hohlfeld, R., 1994. Human astrocytes are only partially competent antigen presenting cells. Possible implications for lesion development in multiple sclerosis. *Brain* 117 (Pt 1), 59–69. doi:10.1093/brain/117.1.59
- Weber, M.S., Derfuss, T., Brück, W., 2018. Anti-Myelin Oligodendrocyte Glycoprotein Antibody-Associated Central Nervous System Demyelination—A Novel Disease Entity? *JAMA Neurol.* 75, 909–910. doi:10.1001/jamaneurol.2018.1055
- Wegner, C., Esiri, M.M., Chance, S.A., Palace, J., Matthews, P.M., 2006. Neocortical neuronal, synaptic, and glial loss in multiple sclerosis. *Neurology* 67, 960 LP – 967. doi:10.1212/01.wnl.0000237551.26858.39
- Wekerle, H., 2017. B cells in multiple sclerosis. *Autoimmunity* 50, 57–60. doi:10.1080/08916934.2017.1281914
- Wiley, C.A., Bissel, S.J., Murdoch, G.H., 2015. Role of CHI3L1 in neuroinflammation. *Clin. Immunol.* doi:10.1016/j.clim.2015.10.003
- Wingerchuk, D.M., Banwell, B., Bennett, J.L., Cabre, P., Carroll, W., Chitnis, T., de Seze, J., Fujihara, K., Greenberg, B., Jacob, A., Jarius, S., Lana-Peixoto, M., Levy, M., Simon, J.H., Tenenbaum, S., Traboulsee, A.L., Waters, P., Wellik, K.E., Weinschenker, B.G., 2015. International consensus diagnostic criteria for neuromyelitis optica spectrum disorders. *Neurology* 85, 177–189. doi:10.1212/WNL.0000000000001729
- Wingerchuk, D.M., Hogancamp, W.F., O'Brien, P.C., Weinschenker, B.G., 1999. The clinical course of neuromyelitis optica (Devic's syndrome). *Neurology* 53, 1107–1114. doi:10.1212/wnl.53.5.1107
- Wingerchuk, D.M., Lennon, V.A., Lucchinetti, C.F., Pittock, S.J., Weinschenker, B.G., 2007. The spectrum of neuromyelitis optica. *Lancet. Neurol.* 6, 805–815. doi:10.1016/S1474-4422(07)70216-8
- Yeo, I.J., Lee, C.-K., Han, S.-B., Yun, J., Hong, J.T., 2019. Roles of chitinase 3-like 1 in the development of cancer, neurodegenerative diseases, and inflammatory diseases. *Pharmacol. Ther.* 203, 107394. doi:10.1016/j.pharmthera.2019.107394
- Zeydan, B., Kantarci, O.H., 2018. Progressive Forms of Multiple Sclerosis: Distinct Entity or Age-Dependent Phenomena. *Neurol. Clin.* 36, 163–171. doi:10.1016/j.ncl.2017.08.006
- Zhu, J., Yamane, H., Paul, W.E., 2010. Differentiation of effector CD4 T cell populations (*). *Annu. Rev. Immunol.* 28, 445–489. doi:10.1146/annurev-immunol-030409-101212
- Zivadinov, R., Horakova, D., Bergsland, N., Hagemeyer, J., Ramasamy, D.P., Uher, T., Vaneckova, M., Havrdova, E., Dwyer, M.G., 2019. A Serial 10-Year Follow-Up Study of Atrophied Brain Lesion Volume and Disability Progression in Patients with Relapsing-Remitting MS. *AJNR. Am. J. Neuroradiol.* 40, 446–452. doi:10.3174/ajnr.A5987
- Zrzavy, T., Hametner, S., Wimmer, I., Butovsky, O., Weiner, H.L., Lassmann, H., 2017. Loss of “homeostatic” microglia and patterns of their activation in active multiple sclerosis. *Brain* 140, 1900–1913. doi:10.1093/brain/awx113

ANEXOS

Protocolos

CUANTIFICACIÓN DE LA CADENA LIGERA DE NEUROFILAMENTO MEDIANTE ELISA

(Kit comercial: IBL International, UD51001)

1. Dejar todos los reactivos atemperarse a temperatura ambiente y descongelar las muestras.
2. Preparar el tampón de lavado.

40 ml del *Wash buffer concentrate* + 360 ml H₂O_d

3. Diluir las muestras de LCR 1/2 en diluyente de muestras:

105 µl LCR + 105 µl diluyente

4. Preparar las diluciones de la curva patrón:

	Concentración (pg/ml)	Diluyente de muestras (µl)	(µl)
TUBO 1	10000	Reconstituir stock con H ₂ O _d según etiqueta del vial	
TUBO 2	5000	300	300 (1)
TUBO 3	2500	300	300 (2)
TUBO 4	1000	360	240 (3)
TUBO 5	500	300	300 (4)
TUBO 6	100	240	60 (5)
TUBO 7	0	300	-

5. Lavar los pocillos con el tampón de lavado (3x300 µl). Retirar golpeando la placa en papel absorbente.
6. Añadir 100 µl de **muestra**, curva patrón o control por pocillo, con 2 duplicados. Cubrir con tira adhesiva e incubar 1 hora a temperatura ambiente con agitación a 800 rpm.
7. Lavar los pocillos con el tampón de lavado (3x300 µl). Retirar golpeando la placa en papel absorbente.
8. Añadir 100 µl de **Ac marcado diluido** a cada pocillo. Cubrir con tira e incubar 45 minutos a temperatura ambiente con agitación a 800 rpm.
 - Preparación de Anticuerpo TRAC (50x):

200 µl de TRAC + 9800 µl diluyente de muestras
9. Lavar los pocillos con el tampón de lavado (3x300 µl). Retirar golpeando la placa en papel absorbente.

10. Añadir 100 μ l del conjugado a cada pocillo. Cubrir con tira e incubar 30 minutos a temperatura ambiente, con agitación a 800 rpm. Diluir CONDIL en diluyente de muestras según la concentración del vial, dejar a 1X.
11. Lavar los pocillos con el tampón de lavado (3x300 μ l). Retirar golpeando la placa en papel absorbente.
12. Añadir 100 μ l **TMB** a cada pocillo. Incubar 15 minutos a temperatura ambiente con agitación a 800 rpm en oscuridad.
13. Añadir 50 μ l de **STOP SOLUTION** a cada pocillo. El color cambia de azul a amarillo.
14. Medir **ABSORBANCIA A 450 nm** (en los 30 minutos después del stop). Longitud de onda de corrección a 620 o 650 nm.
15. Crear una curva con software de transformación Marquardt de 4 parámetros disponible en www.myassays.com y obtener las concentraciones. Si se han efectuado diluciones, considerarlas en el análisis.

CUANTIFICACIÓN DE CHITINASE 3-LIKE 1 MEDIANTE ELISA

(Kit comercial: R&D, DC3L10)

1. Dejar todos los reactivos atemperarse a temperatura ambiente y descongelar las muestras.
2. Preparar el tampón de lavado:
20 ml del *Wash buffer concentrate* + 480 ml H₂O_d
3. Preparar el diluyente calibrador 1:5:
20 ml del calibrador concentrado + 80 ml H₂O_d
4. Diluir las muestras de LCR 1:200 en diluyente calibrador (si es suero, diluir 1:50)
5. Preparar las diluciones del patrón:
Reconstituir el estándar con H₂O_d dando un stock de 40000 pg/ml. Mínimo 15 minutos de balanceo para que se diluya.

	Concentración (pg/ml)	Diluyente calibrador (μl)	Volumen (μl)
TUBO 1	4000	900	100 (stock)
TUBO 2	2000	500	500 (1)
TUBO 3	1000	500	500 (2)
TUBO 4	500	500	500 (3)
TUBO 5	250	500	500 (4)
TUBO 6	125	500	500 (5)
TUBO 7	62,5	500	500 (6)
TUBO 8	0	1 ml	-

6. Añadir 100 μl de diluyente de ensayo por pocillo.
7. Añadir 50 μl de **muestra**, curva patrón o control por pocillo, con duplicados. Cubrir con tira adhesiva e incubar 2 horas a temperatura ambiente con agitación suave.
8. Lavar los pocillos con el tampón de lavado (4x300 μl). Retirar golpeando la placa en papel absorbente.
9. Añadir 200 μl de **Ac conjugado** a cada pocillo. Cubrir con tira e incubar 2 horas a temperatura ambiente, con agitación suave.
10. Lavar los pocillos con el tampón de lavado (4x300 μl). Retirar golpeando la placa en papel absorbente.
11. Añadir 200 μl de **de sustrato** a cada pocillo. Incubar 30 minutos a temperatura ambiente y en oscuridad.

Mezclar sustrato: 10 ml A + 10 ml B

12. Añadir 50 μl de **STOP SOLUTION** a cada pocillo. El color cambia de azul a amarillo.

13. Medir **ABSORBANCIA a 450 nm** (en los 30 min después del stop). Longitud de onda de corrección a 540 o 570 nm.
14. Crear una curva con software de transformación Marquardt de 4 parámetros disponible en *www.myassays.com* y obtener las concentraciones. Si se han efectuado diluciones, considerarlas en el análisis.

INMUNOHISTOQUÍMICA

1. Desparafinar en xileno: 2 x 15 minutos
2. Inmersión en alcohol 96% 2 veces
3. Bloquear la peroxidasa endógena: 0,2% de H₂O₂ (30%) en metanol → 30 minutos
4. Inmersión en segunda cubeta con etanol 96%
5. Rehidratar los cortes a través de un gradiente de alcoholes: 70% → 50 % → H₂O_d
6. Desenmascaramiento antigénico (si procede)
7. Lavar con TBS 5 veces
8. Bloquear uniones inespecíficas con tampón de bloqueo (10% FCS o HS en DAKO buffer), 15 minutos temperatura ambiente
9. Diluir anticuerpo primario en tampón de bloqueo e incubar a 4°C toda la noche
10. Lavar con TBS 5 veces
11. Diluir anticuerpo secundario biotinilado en tampón bloqueo e incubar la muestra 1 hora a temperatura ambiente.
12. Lavar con TBS 5 veces
13. Incubar con avidina peroxidasa diluida 1:500 (Jackson) en tampón bloqueo, 1 hora a temperatura ambiente
14. Lavar con TBS 5 veces
15. Revelado con DAB mirando al microscopio
16. Parar la reacción cuando la señal sea suficientemente intensa con agua del grifo
17. Contrateñir con hematoxilina durante 20 segundos y lavar con agua del grifo
18. Diferenciar las muestras en solución de etanol y HCl (1 ml de HCl al 37% + 100 ml etanol 70%) durante unos segundos. Incubar en solución de Scott 5 minutos y deshidratar las muestras en gradiente de alcoholes (50%-70%-96%-100%), incubar 10 minutos en xileno y montar con eukitt

TODOS LOS PASOS DE INCUBACIÓN SE HACEN EN CÁMARA HÚMEDA, NO DEJAR SECAR LOS CORTES.

INMUNOFLUORESCENCIA DOBLE

1. Desparafinar en xileno: 2 x 15 minutos
2. Inmersión en alcohol 96% 2 veces
3. Bloquear la peroxidasa endógena: 0,2% de H₂O₂ (30%) en metanol → 30 minutos
4. Inmersión en segunda cubeta con etanol 96%
5. Rehidratar los cortes a través de un gradiente de alcoholes: 70% → 50 % → H₂O_d
6. Desenmascaramiento antigénico (si procede)
7. Lavar con TBS 5 veces
8. Bloquear uniones inespecíficas con *DAKO diluent* → 20 minutos temperatura ambiente
9. Diluir anticuerpo primario en *DAKO diluent* e incubar a 4°C toda la noche
10. Lavar con TBS 5 veces
11. Diluir anticuerpo secundario en tampón bloqueo (FCS al 10% en tampón DAKO) e incubar la muestra 1 hora a temperatura ambiente
 - a. Se utiliza un anticuerpo secundario conjugado con biotina y otro anticuerpo secundario conjugado con un fluoróforo
12. Lavar con TBS 5 veces
13. Incubar con avidina conjugada con un fluoróforo, diluida en tampón bloqueo, 1 hora temperatura ambiente
14. Lavar con TBS 5 veces
15. Añadir TO-PRO 3 diluido 1:100 en PBS incubar 15 minutos
16. Lavar 3 veces con PBS y 1 con agua destilada
17. Montar con *Gold antifade reagent*

TODOS LOS PASOS DE INCUBACIÓN SE HACEN EN CÁMARA HÚMEDA, NO DEJAR SECAR LOS CORTES. MANTENER CONDICIONES DE OSCURIDAD A PARTIR DE PONER LOS ANTICUERPOS SECUNDARIOS.

Tampón TBS

TBS stock pH 7,5: 60,57g TRIS + 180g NaCl + 400ml 1N HCl + 1L H₂O_d

TBS solución de trabajo: Diluir el stock 1:20

H₂O₂/ Methanol

Preparar fresco cada día y no usar más de dos veces. 150 ml metanol + 1 ml H₂O₂ (30%)

Desenmascaramiento antigénico

1) Tampón citrato pH 6: 2,1g ácido cítrico + 1L de H₂O_d

2) Tampón EDTA

Solución stock 20x: 50ml H₂O_d + 1,21g TRIS (10 mM) + 0,37g EDTA (1 mM). Ajustar pH a 8,5 o 9 según el material.

Solución de trabajo: diluir 1:20 la solución de stock en H₂O_d

Procedimiento: poner los cortes en una cubeta de plástico con el tampón EDTA o citrato e introducir en una vaporera durante 1 hora. Sacar la cubeta y dejar a temperatura ambiente al menos 20 minutos y lavar con TBS.

Tampón de bloqueo

FCS: suero de ternera fetal

HS: suero de caballo

DAKO buffer: solución comercial de Dako corporation, 10x (#S3006). Diluir 1:10 en H₂O_d

Los anticuerpos y la solución de avidina se diluyen en 10% FCS en DAKO buffer.

DAB

- Solución de stock: 1g DAB (3,3'-Diaminobenzidine-tetrahydrochloride dihydrate) en 40ml de PBS. Hacer alícuotas de 1 ml y preservar a -20°C.

- Solución de trabajo: 1ml del stock + 50ml PBS + 16,5µl H₂O₂ (30%), filtrar.

- Procedimiento: poner los portaobjetos con el tejido en la solución de trabajo, ir mirando la señal bajo el microscopio y parar cuando sea suficientemente intensa. Suele llevar unos 15 minutos.

PBS

- Solución de stock: tampón fosfato 0,2M pH 7,4 más NaCl

13,8g de NaH₂PO₄ 0,04M + 71,2g de Na₂HPO₄ 0,16M + 2,5L H₂O_d + 90g NaCl

- Solución de trabajo: diluir 1:4 en H₂O_d

REACTIVOS:

- Xileno (Panreac 211745.1611)
- Etanol absoluto (Panreac 131086.1612)
- H₂O₂ 33% (Panreac 141077.1211)
- Metanol (Panreac 131091.1611)
- Avidina peroxidasa (Jackson 016-030-084)
- Fetal calf serum (Gibco, 16010167)
- Horse serum (Vector S-2000)
- DAB (Dako, K3468)
- NaH₂PO₄ (Panreac 141965.1211)
- Na₂HPO₄ (Panreac 141679.1211)
- Ácido cítrico (Merck C3674)
- Nacl (Panreac 131659.1211)
- HCl 37% (Panreac 141020.1611)
- TO-PRO 3-loide (MW 642-661)
- Gold antifade reagent (Invitrogen, P36930)

TINCIÓN CON HEMATOXILINA

1. Desparafinar / hidratar:
 - Xileno I 15 minutos
 - Xileno II 15 minutos
 - Etanol 100º 5 minutos
 - Etanol 96º 5 minutos
 - Etanol 70º 5 minutos
 - Etanol 50º 5 minutos
 - Agua destilada 5 minutos
2. Hematoxilina de Mayer 10 minutos
3. Lavar con agua destilada 1 minuto
4. Diferenciar con etanol 70º + HCl 0,05% 10 segundos
5. Lavar con agua destilada 30 segundos
6. Inmersión en eosina 30 segundos
 - Solución de trabajo (250 ml):
 - 28 ml de eosina al 2% en agua destilada
 - 3 ml de floxina al 2% en agua destilada
 - 218 ml etanol 96º
 - 1,25 ml ácido acético glacial
7. Lavar con agua destilada 1 minuto
8. Deshidratar en alcoholes crecientes:
 - Etanol 96º 1 minuto
 - Etanol 96º 5 minutos
 - Etanol 100º 5 minutos
 - Etanol 100º 5 minutos
 - Xileno I 10 minutos
 - Xileno II 10 minutos
9. Montar con Eukitt.

REACTIVOS:

- Xileno (Panreac, 211769.1714)
- Etanol absoluto (Panreac 131086.1612)
- Hematoxilina de Mayer (Sigma, HHS16)
- Floxina B (Merck, 15926)

- Eosina Y (Sigma, 861006)
- Ácido acético glacial 100% (Merck, 1.00066.0250)
- Eukitt (EEM, 5320)

TINCIÓN DE MIELINA LUXOL FAST BLUE

1. Desparafinar/hidratar
 - Xileno I 15 minutos
 - Xileno II 15 minutos
 - Etanol 100º 5 minutos
 - Etanol 95º 5 minutos
2. Inmersión en solución de *Luxol Fast Blue* toda la noche a 60º
3. Lavar con alcohol 80º para quitar el exceso de color
4. Lavar con agua destilada
5. Diferenciar con carbonato de litio, hasta que permita diferenciar sustancia blanca y gris
6. Diferenciar en alcohol 60º
7. Lavar con agua destilada
8. Inmersión en violeta de cresilo a 37º 20 minutos
9. Diferenciar con alcohol 95º 2 veces
10. Deshidratar en alcoholes crecientes acabando en xileno
11. Montar con Eukitt

REACTIVOS:

- Xileno (Panreac, 211769.1714)
- Etanol absoluto (Panreac 131086.1612)
- Luxol fast blue MBS solution 0,1% (EEM 26681-01)
- Violeta de cresilo 0,1% con acetato (EEM 26681-02)
- Carbonato de litio 0,05 % (EEM 26681-04)
- Eukitt (EEM, 5320)

RECUEENTOS CELULARES USANDO ADOBE PHOTOSHOP

1. Abrir imagen en Photoshop: *Archivo – Abrir*, o *Ctrl O*.
2. Aplicar contraste para resaltar el marcaje marrón: *Imagen – Contraste automático*.
3. En el caso de que la tinción azul de los núcleos (eosina) sea intensa, para evitar que sea detectada como marca, se reemplaza el color que presenten por blanco. *Imagen – Ajustes – Reemplazar color*. Seleccionar el color que deseas reemplazar, pulsar en el recuadro donde aparecerá este color (indicado como *Resultado*) y en las casillas indicadas con las letras *C*, *M*, *Y* y *K*, sustituir los números que aparezcan por 0. Pulsar *OK – OK* para confirmar. Este procedimiento se puede repetir para reemplazar todos los tonos de colores que puedan interferir en el recuento del marcaje.
4. Superponer los canales de la imagen que presenten un mayor contraste: *Imagen-Calcular*. En este caso el rojo y el azul: *Azul (Canal Origen 2) – Añadir (Fusión) – 90% (Opacidad) – OK*.
5. Ajustar el umbral: *Imagen – Ajustes – Umbral*. Seleccionar el nivel de umbral en el que se observe únicamente el marcaje a contar. Variará en función de la imagen. *OK* para confirmar.
6. Determinar el tamaño de marca que se desea tener en cuenta para el recuento. Marcajes menores son eliminados. *Filtro – Ruido – Mediana*. Variará en función de la imagen. *OK* para confirmar.
7. Comprobar que se han seleccionado las células marcadas pulsando al canal *RGB* sin dejar de mostrar el recientemente formado. En caso de que se hayan tenido en cuenta células presentes en los vasos sanguíneos o de una región que no se está analizando, se elimina la marca con el lápiz en color blanco.
9. Con la herramienta “*varita mágica*” seleccionar las células marcadas.
10. Para que tenga lugar el recuento automático: *Ventana – Registro de medidas*. Dentro del registro de medidas en el menú desplegable (esquina superior derecha): *Seleccionar puntos de datos – A medida*. De esta forma se pueden seleccionar los datos a medir, en este caso *solo Recuento – OK*. Pulsando a *Grabar medidas* aparecerán el número de células marcadas.
11. Si se analizan varias imágenes con las mismas propiedades, en lugar de repetir todos los pasos nuevamente se puede grabar una acción. En el panel *Acciones* pulsar en el menú desplegable y seleccionar *Acción nueva*. Definir el nombre de la acción y otras opciones y pulsar a *Grabar*. Realizar las operaciones y comandos que se desea grabar y tras ello pulsar *Detener grabación (cuadrado gris a la izquierda del punto rojo)*.

CUANTIFICACIÓN DE EXPRESIÓN MEDIANTE DENSITOMETRÍA DIGITAL ÓPTICA

Para captar las imágenes se utilizó el microscopio Nikon Eclipse Ci con la cámara Nikon Ds-Ri2 y el software Nikon NIS Elements BR versión 4.50.

CAPTURA DE IMÁGENES:

- Antes de cada sesión de imágenes, sin poner la muestra todavía debajo del objetivo, aplicar la función Auto White.
- Utilizar el mismo brillo en todas las imágenes utilizando el histograma RGB y fijando cada uno de los tres canales en 225/225. Fijar los mismos valores de exposición, ganancia y compensación.
- Evitar seleccionar zonas con grandes vasos o artefactos.
- Utilizar el objetivo 10x y obtener 3 imágenes por zona de interés.
- Guardar las imágenes en JPEG.

PROCESADO DE IMÁGENES EN IMAGE J:

- Abrir imagen en Image J.
- Seleccionar en Plugins > Analyze > DensIII (plugin cedido por el Profesor Lassmann).
- Anotar el segundo valor de porcentaje de área como medida del porcentaje de la imagen que es positivo para DAB (en este caso, para CHI3L1).

Publicaciones

- Balzano, T., Arenas, Y.M., Dadsetan, S., Forteza, J., Gil-Perotin, S., **Cubas-Nuñez, L.**, Casanova, B., Gracià, F., Varela-Andrés, N., Montoliu, C., Llansola, M., Felipo, V., 2020. Sustained hyperammonemia induces TNF- α IN Purkinje neurons by activating the TNFR1-NF- κ B pathway. *J. Neuroinflammation* 17, 70. doi:10.1186/s12974-020-01746-z
- Balzano, T., Dadsetan, S., Forteza, J., Cabrera-Pastor, A., Taoro-Gonzalez, L., Malaguarnera, M., Gil-Perotin, S., **Cubas-Nuñez, L.**, Casanova, B., Castro-Quintas, A., Ponce-Mora, A., Arenas, Y.M., Leone, P., Erceg, S., Llansola, M., Felipo, V., 2019. Chronic hyperammonemia induces peripheral inflammation that leads to cognitive impairment in rats: Reversed by anti-TNF- α treatment. *J. Hepatol.* doi:10.1016/j.jhep.2019.01.008
- Cantó, L.N., Boscá, S.C., Vicente, C.A., Gil-Perontín, S., Pérez-Miralles, F., Villalba, J.C., **Nuñez, L.C.**, Casanova Estruch, B., 2019. Brain Atrophy in Relapsing Optic Neuritis Is Associated With Crion Phenotype. *Front. Neurol.* 10, 1157. doi:10.3389/fneur.2019.01157
- Cubas-Nuñez, L.**, Duran-Moreno, M., Castillo-Villalba, J., Fuentes-Maestre, J., Casanova, B., García-Verdugo, J.M., Gil-Perotín, S., 2017. In situ RT-PCR Optimized for Electron Microscopy Allows Description of Subcellular Morphology of Target mRNA-Expressing Cells in the Brain. *Front. Cell. Neurosci.* 11, 141. doi:10.3389/fncel.2017.00141
- Dadsetan, S., Balzano, T., Forteza, J., Cabrera-Pastor, A., Taoro-Gonzalez, L., Hernandez-Rabaza, V., Gil-Perotín, S., **Cubas-Nuñez, L.**, García-Verdugo, J.-M., Agusti, A., Llansola, M., Felipo, V., 2016. Reducing Peripheral Inflammation with Infliximab Reduces Neuroinflammation and Improves Cognition in Rats with Hepatic Encephalopathy. *Front. Mol. Neurosci.* 9, 106. doi:10.3389/fnmol.2016.00106
- Feliciano-Sanchez, A., García-Gil, R., **Cubas-Nuñez, L.**, Castillo-Villalba, J., Fuentes-Maestre, J., Fil, M., Gil-Perotin, S., García-Verdugo, J.M., 2019. Development and optimisation of an animal model for the study of ganglion cells in degenerative diseases of the retina and optic nerve. *Arch. Soc. Esp. Oftalmol.* 94, 263–272. doi:10.1016/j.oftal.2019.01.013
- Gil-Perotin, S., Castillo-Villalba, J., Carreres-Polo, J., Navarré-Gimeno, A., Mallada-Frechín, J., Pérez-Miralles, F., Gascón, F., Alcalá-Vicente, C., **Cubas-Nuñez, L.**, Casanova-Estruch, B., 2018. Progressive Demyelination in the Presence of Serum Myelin Oligodendrocyte Glycoprotein-IgG: A Case Report. *Front. Neurol.* doi:10.3389/fneur.2018.00340
- Gil-perotin, S., Castillo-villalba, J., **Cubas-nuñez, L.**, Gasque, R., Gascon, F., Dominguez, J.A., Casanova, B., 2019. Combined Cerebrospinal Fluid Neurofilament Light Chain Protein and Chitinase-3 Like-1 Levels in Defining Disease Course and Prognosis in Multiple Sclerosis 10, 1–11. doi:10.3389/fneur.2019.01008
- Pérez-Miralles, F., Prefasi, D., García-Merino, A., Gascón-Giménez, F., Medrano, N., Castillo-Villalba, J., **Cubas, L.**, Alcalá, C., Gil-Perotín, S., Gómez-Ballesteros, R., Maurino, J., Álvarez-García, E., Casanova, B., 2020. CSF chitinase 3-like-1 association with disability of primary progressive MS. *Neurol. Neuroimmunol. neuroinflammation* 7. doi:10.1212/NXI.0000000000000815