



Universidad de Sevilla

Programa de Doctorado

**Biología Molecular, Biomedicina e Investigación
Clínica.**

**Departamento Bioquímica Médica y Biología Molecular e
Inmunología.**

**Estudio del Índice Kappa en las
formas progresivas de Esclerosis
Múltiple**

Tesis presentada por

Sandra Fuentes Cantero

Sevilla 2023

TESIS DOCTORAL

Estudio del Índice Kappa en las formas progresivas de Esclerosis Múltiple

Trabajo realizado por la Licenciada Sandra Fuentes Cantero para optar al grado de Doctor en Bioquímica por la Universidad de Sevilla

Directoras de tesis

Dra. María Isabel García Sánchez

Dra. Carmen Bermudo Guitarte

Tutor de tesis

Dr. Víctor Sánchez Margalet

Universidad de Sevilla

Facultad de Medicina

Departamento de Bioquímica Médica y Biología Molecular e Inmunología.

Programa de Doctorado de Biología Molecular, Biomedicina e

Investigación Clínica.

Sevilla, 2023

DICTAMEN ÚNICO EN LA COMUNIDAD AUTÓNOMA DE ANDALUCÍA

D/Dª: Carlos García Pérez como secretario/a del CEI de los hospitales universitarios Virgen Macarena-Virgen del Rocío

CERTIFICA

Que este Comité ha evaluado la propuesta del promotor/investigador (No hay promotor/a asociado/a) para realizar el estudio de investigación titulado:

TÍTULO DEL ESTUDIO: EL ÍNDICE KAPPA COMO INDICADOR BIOLÓGICO DE LAS FORMAS PROGRESIVAS DE ESCLEROSIS MÚLTIPLE ,(Tesis Indice kappa en esclerosis múltiple)
 Protocolo, Versión: 5
 HIP, Versión: 5
 CI, Versión: 5

Y que considera que:

Se cumplen los requisitos necesarios de idoneidad del protocolo en relación con los objetivos del estudio y se ajusta a los principios éticos aplicables a este tipo de estudios.

La capacidad del/de la investigador/a y los medios disponibles son apropiados para llevar a cabo el estudio.

Están justificados los riesgos y molestias previsibles para los participantes.

Que los aspectos económicos involucrados en el proyecto, no interfieren con respecto a los postulados éticos.

Y que este Comité considera, que dicho estudio puede ser realizado en los Centros de la Comunidad Autónoma de Andalucía que se relacionan, para lo cual corresponde a la Dirección del Centro correspondiente determinar si la capacidad y los medios disponibles son apropiados para llevar a cabo el estudio.

Lo que firmo en Sevilla a 26/11/2019

D/Dª. Carlos García Pérez, como Secretario/a del CEI de los hospitales universitarios Virgen Macarena-Virgen del Rocío



Código Seguro De Verificación:	fe88cb0d33c1b8a83ce277da4c836d5cf99b08a1	Fecha	26/11/2019		
Normativa	Este documento incorpora firma electrónica reconocida de acuerdo a la Ley 59/2003, de 19 de diciembre, de firma electrónica.				
Firmado Por	Carlos García Pérez				
Url De Verificación	https://www.juntadeandalucia.es/salud/portaldeetica/xhtml/ayuda/verificarFirmaDocumento.iface/code/fe88cb0d33c1b8a83ce277da4c836d5cf99b08a1	Página	1/2		

CERTIFICA

Que este Comité ha ponderado y evaluado en sesión celebrada el 24/10/2019 y recogida en acta 09/2019 la propuesta del/de la Promotor/a (No hay promotor/a asociado/a), para realizar el estudio de investigación titulado:

TÍTULO DEL ESTUDIO: EL ÍNDICE KAPPA COMO INDICADOR BIOLÓGICO DE LAS FORMAS PROGRESIVAS DE ESCLEROSIS MÚLTIPLE ,(Tesis Indice kappa en esclerosis múltiple)
Protocolo, Versión: 5
HIP, Versión: 5
CI, Versión: 5

Que a dicha sesión asistieron los siguientes integrantes del Comité:

Presidente/a

D/D^a. Víctor Sánchez Margalet

Vicepresidente/a

D/D^a. Dolores Jiménez Hernández

Secretario/a

D/D^a. Carlos García Pérez

Vocales

D/D^a. José Garnacho Montero

D/D^a. Gabriel Ramírez Soto

D/D^a. Cristina Pichardo Guerrero

D/D^a. Javier Vitorica Fernandez

D/D^a. MARIA EUGENIA ACOSTA MOSQUERA

D/D^a. Luis Lopez Rodriguez

D/D^a. Enrique de Álava Casado

D/D^a. ANGELA CEJUDO LOPEZ

D/D^a. Amancio Carnero Moya

D/D^a. Jose Salas Turrents

D/D^a. ANTONIO PÉREZ PÉREZ

D/D^a. María Pilar Guadix Martín

D/D^a. ESPERANZA GALLEGO CALVENTE

Que dicho Comité, está constituido y actúa de acuerdo con la normativa vigente y las directrices de la Conferencia Internacional de Buena Práctica Clínica.

Lo que firmo en Sevilla a 26/11/2019



Código Seguro De Verificación:	fe88cb0d33c1b8a83ce277da4c836d5cf99b08a1	Fecha	26/11/2019	
Normativa	Este documento incorpora firma electrónica reconocida de acuerdo a la Ley 59/2003, de 19 de diciembre, de firma electrónica.			
Firmado Por	Carlos García Pérez			
Url De Verificación	https://www.juntadeandalucia.es/salud/portaldeetica/xhtml/ayuda/verificarFirmaDocumento.iface/code/fe88cb0d33c1b8a83ce277da4c836d5cf99b08a1	Página	2/2	

Índices

ÍNDICE GENERAL

Índice de Figuras	XII
Índice de Tablas	XV
Abreviaturas.....	XVII
Resumen	1
1. Introducción	4
1.1. Antecedentes históricos	5
1.2. Epidemiología y Factores de riesgo	10
1.3. Fisiopatología de la EM	16
1.4. Manifestaciones Clínicas	30
1.5. Diagnóstico de la EM.....	40
1.6. Importancia del laboratorio en el diagnóstico de EM.....	47
1.7. Tratamiento de la EM.....	58
2. Hipótesis y Objetivos.....	61
3. Material y Métodos.....	64
3.1. Población de Estudio:.....	65
3.2. Selección de muestras:	66
3.3. Métodos Analíticos	67
3.4. Parámetros clínicos.....	77
3.5. Parámetros de Resonancia Magnética	78
3.6. Análisis Estadístico	78
4. Resultados.....	80
4.1. Estudio de los factores de Riesgo	84
4.2. Síntesis Intratecal de Inmunoglobulinas.....	88
4.2.1. Estimación de puntos de corte para el Índice Kappa según perfil evolutivo de EM	93
4.2.2. Análisis de la eficacia diagnóstica de BOCG.....	101
4.3. Estudio de las Subclases de IgG	104
4.4. Estudio de la EDSS en los distintos perfiles y su correlación con la progresión de la enfermedad	106

4.5. Estudio de la tasa de brotes anual y de la discapacidad asociada a eventos RAW o a PIRA en pacientes con EMRR.....	108
4.6. Correlación del índice Kappa con el resto de las variables en pacientes con formas progresivas .	113
4.7. Estudio de probabilidad de conversión a EMSP	115
4.8. Algoritmo de clasificación de las formas progresivas de las remitentes	123
5. Discusión	128
5.1. Características de la cohorte de pacientes	131
5.2. Estudio de los factores de riesgo	132
5.3. Evaluación de la síntesis intratecal en pacientes con formas progresivas	134
5.4. Estudio de las Subclases de IgG	142
5.5. Estudio de la EDSS en los distintos perfiles evolutivos	144
5.6. Estudio de la tasa de brotes anual y de la discapacidad asociada a eventos RAW o a PIRA en pacientes con EMRR.....	146
5.7. Correlación del índice Kappa con el resto de las variables en pacientes con formas progresivas .	149
5.8. Estudio de probabilidad de conversión a EMSP	150
5.9. Algoritmo de clasificación de las formas progresivas de las remitentes	152
CONCLUSIONES.....	157
REFERENCIAS.....	159

Índice de Figuras

Figura 1: Prevalencia de EM en el mundo (2020).	11
Figura 2: Factores celulares y moleculares implicados en la inmunopatogénesis de la EM. ..	19
Figura 3: Esquema de una inmunoglobulina.....	21
Figura 4: Representación de la organización cromosómica de los grupos de genes Ig H, κ y λ	22
Figura 5: Etiopatogenia de la EM simplificada.....	25
Figura 6: Células T efectoras en la EM.. ..	26
Figura 7: Variantes en la evolución de la EM	33
Figura 8: Definición de eventos RAW y PIRA.....	35
Figura 9: Imágenes de la RM donde se aprecian áreas de desmielinización.....	41
Figura 10: Índice de Tourtellotte.....	48
Figura 11: Patrones de bandas oligoclonales de IgG.	50
Figura 12: Reibergrama o gráfica de las razones de Reiber	52
Figura 13: Esquema de una inmunoglobulina.....	56
Figura 14: Representación de la extracción de LCR a través de punción lumbar.....	67
Figura 15: Analizador Optilite (BindingSiteLtd.).....	68
Figura 16: Mecanismo de acción del uso de antisueros policlonales.	69
Figura 17: Representación gráfica de la curva de calibración para CLL.	70
Figura 18: Curva calibración para subunidad IgG1.	73
Figura 19: Curva calibración IgG2.....	73
Figura 20: Curva calibración para subunidad IgG3.	73
Figura 21: Curva calibración para subunidad IgG4.	74
Figura 22: Imagen del equipo BNII™ Siemens Healthcare Diagnostics Inc.....	75
Figura 23: Representación gráfica del fundamento de la quimioluminiscencia empleada para la determinación de los niveles de vitamina D	76
Figura 24: Niveles de vitamina D en función del diagnóstico	86
Figura 25: Representación mediante diagrama de cajas y bigotes del análisis por parejas mediante test U Mann-Whitney para el Índice Kappa entre los distintos fenotipos de EM y el grupo control.....	90

Figura 26: Representación mediante diagrama de cajas y bigotes del análisis por parejas mediante test U Mann-Whitney para CLL kappa en LCR entre los fenotipos de EM y el grupo control	91
Figura 27: Representación mediante diagrama de cajas y bigotes del análisis por parejas mediante test U Mann-Whitney para los valores del Índice de IgG entre los distintos fenotipos de EM.....	92
Figura 28: Curvas ROC (Receiver Operating Characteristic) de las variables índice Kappa, índice de IgG e índice de IgM entre los pacientes con EMRR frente al grupo control.....	96
Figura 29: Curvas ROC de las variables índice Kappa, índice de IgG e índice de IgM entre los pacientes con EMSP frente al grupo control.....	96
Figura 30: Curvas ROC de las variables índice Kappa, índice de IgG e índice de IgM entre los pacientes con EMPP frente al grupo control.	97
Figura 31: Pirámide de frecuencias de los valores del índice Kappa en función del tipo de fenotipo, EMRR y progresivo (EMSP más EMPP)..	98
Figura 32: Curva ROC de la variable índice Kappa (línea azul) entre pacientes con formas progresivas y pacientes con EMRR.	99
Figura 33: Representación gráfica mediante diagrama de cajas y bigotes de los valores de EDSS basal en función del fenotipo diagnóstico.	107
Figura 34: Representación de la curva de supervivencia mediante el análisis Kaplan-Meier de los pacientes con formas remitente-recurrente (EMRR) y secundaria progresiva (EMSP)...	115
Figura 35: Diagrama de barras en el que se representa la edad agrupada en función de los casos con progresión o sin progresión a secundaria progresiva.	116
Figura 36: Diagrama de barras en el que se representa la EDSS agrupada en función de los casos con progresión o sin progresión a secundaria progresiva.	117
Figura 37: Curva de supervivencia mediante el análisis Kaplan-Meier de los pacientes con EMRR, en la que se muestra la probabilidad de no progresión a EMSP.....	119
Figura 38: Curva de supervivencia mediante el análisis Kaplan-Meier de los pacientes con EMRR, en la que se muestra la probabilidad de no progresión a EMSP.....	120
Figura 39: Resumen de los principales resultados obtenidos durante el estudio entre pacientes con EMRR y EMPP	123
Figura 40: Curva ROC de los valores predichos por el modelo para la clasificación de pacientes con EMPP y pacientes con EMRR.....	127

Índice de Tablas

Tabla 1: Estudios de incidencia y de prevalencia en España desde 2002 hasta la actualida... 13	13
Tabla 2: Manifestaciones clínicas más frecuentes de la EM..... 30	30
Tabla 3: Resumen de los factores clínicos que influyen en el pronóstico de la EM 37	37
Tabla 4: Escala ampliada del estado de discapacidad (EDSS) 38	38
Tabla 5: Criterios diagnósticos de Poser 44	44
Tabla 6: Protocolo diagnóstico según criterios McDonald 2017 46	46
Tabla 7: Resumen de los principales fármacos utilizados en EM. 59	59
Tabla 8: Algoritmo terapéutico para la EM 60	60
Tabla 9: Datos obtenidos para la calibración de las CLL. 70	70
Tabla 10: Rangos de medición aproximado del ensayo en función de la dilución 71	71
Tabla 11: Especificaciones técnicas CLL kappa y lambda..... 71	71
Tabla 12: Datos del ensayo de precisión aportados por el fabricante 72	72
Tabla 13: Valores de los controles de calidad para las subclases de IgG..... 74	74
Tabla 14: Características de cada grupo diagnóstico 82	82
Tabla 15: Resultados test de contraste para las variables edad en el momento de la punción lumbar (edad PL) y el sexo. 83	83
Tabla 16: Características y recuento de las distintas comorbilidades y factores de riesgo en cada grupo diagnóstico 85	85
Tabla 17: Resumen de los valores analíticos de vitamina D y su distribución en los distintos grupos, expresados en mediana y rango intercuartílico (RIC) 86	86
Tabla 18: Resumen de las distintas variables asociadas a la síntesis intratecal de inmunoglobulinas en función de los distintos perfiles evolutivos y el grupo control 88	88
Tabla 19: Resultados del test global de Kruskal Wallis y del test por parejas U Mann-Whitney de las distintas variables recogidas 90	90
Tabla 20: Datos extraídos del análisis de las curvas ROC para las variables índice kappa, índice de IgG e índice de IgM entre los distintos subtipos de EM y el grupo control 95	95
Tabla 21: Resumen del número de casos de cada subgrupo que superan o no el valor del punto de corte para el índice IgM de 0,079 calculado..... 98	98
Tabla 22: Diferencias en el rendimiento diagnóstico del punto de corte de 35,37 extraído de la curva ROC para el índice Kappa entre EMRR y formas progresivas (EMPP y EMSP) 100	100

Tabla 23: Resumen de los resultados de BOCG en los distintos grupos de diagnóstico	101
Tabla 24: Resumen rendimiento diagnóstico de las BOCG para el diagnóstico de EM en función del subgrupo y sobre el total de pacientes con EM y eficacia diagnóstica del uso combinado en serie de las BOCG y el índice Kappa según punto de corte calculado (35,37) para la estratificación entre fenotipos progresivos y remitentes-recurrentes.	102
Tabla 25: Resumen del análisis de las distintas subunidades de IgG.....	104
Tabla 26: Resumen de los resultados de los test de contrastes Kruskal Wallis y U Mann-Whitney entre las subclases de IgG	105
Tabla 27: Resultados del nivel de EDSS basal y al año de seguimiento en función del perfil de EM y la presencia o no de tratamiento.	106
Tabla 28: Estudio de correlación de la tasa de recaída con el resto de las variables (Edad punción lumbar diagnóstica, índice kappa y EDSS al final del seguimiento)	108
Tabla 29: Descriptiva del número de casos por tipo de evento (pacientes sólo con eventos RAW, pacientes con sólo eventos PIRA, pacientes con ambos eventos RAW y PIRA o pacientes sin presencia de ningún tipo de evento) y su relación con las variables.....	110
Tabla 30: Descriptiva de los diferentes tratamientos empleados según tipo de evento (PIRA, RAW o ambos).....	111
Tabla 31: Resultados del estudio de correlación Rho de Spearman según los distintos fenotipos de EM	113
Tabla 32: Resultados del análisis de comparación de curvas de supervivencia.	118
Tabla 33: Resumen del análisis multivariante de Cox.....	121
Tabla 34: Resumen modelo regresión logística para la clasificación entre EMRR y EMPP ...	126

Abreviaturas

ADEM: Encefalomiелitis diseminada aguda

AUC: Área bajo la curva

Alb: Albúmina

AQP4: Aquaporina-4

BHE: Barrera Hematoencefálica

BOC: Bandas Oligoclonales

BOCG: Bandas Oligoclonales de IgG

BTC: Criterios de Barkhof-Tintoré

CH: Cadena pesada

CL: Cadena ligera

CLL: Cadenas Ligeras Libres

CLSI: Clinical & Laboratory Standards Institute

CPAs: Células Presentadoras de Antígeno

CV: Coeficiente de Variación

DE: Desviación Estándar

EDSS: Expanded Disability Status Scale (Escala Expandida del Estado de Discapacidad)

EM: Esclerosis Múltiple

EMCD: EM Clínicamente Definida

EMPP: EM Primaria Progresiva

EMSP: EM Secundaria Progresiva

EMRR: EM Remitente Recurrente

ENI: Enfermedades Neurológicas Inflammatorias

ENNI: Enfermedades Neurológicas No Inflammatorias

HLA: Acrónimo inglés de Human Leukocyte Antigen (complejo mayor de histocompatibilidad)

HR: Hazard ratio

IFE: Isoelectroenfoque

IgG: Inmunoglobulina G

IgA: Inmunoglobulina A

IgM: Inmunoglobulina M

LCR: Líquido Cefalorraquídeo

LES: Lupus Eritematoso Sistémico

LT: Linfocitos T

MOG: Glicoproteína de oligodendrocitos de mielina

Nf: Neurofilamentos

NfH: Neurofilamentos de cadenas pesadas

NfL: Neurofilamentos de cadenas ligeras

NMOSD: Neuromielitis óptica y su espectro de trastornos clínicos asociados

OR: Odd ratio

PE: Potenciales Evocados

PIRA: Por sus siglas en inglés *Progression Independent of Relapse Activity*, empeoramiento latente independiente de la actividad de la recaída.

QC: Control de Calidad

Q_{Alb}: Albúmina LCR/ Albúmina suero

RAW: Por sus siglas en inglés *Relapse-Associated Worsening*, empeoramiento latente asociado a la recaída clínica.

RIC: Rango intercuartílico (percentil 25 - percentil 75)

ROC: Receiver Operating Characteristic o Característica Operativa del Receptor (curva ROC)

RMN: Resonancia Magnética nuclear

SNA: Síndrome Neurológicamente Aislado

SNC: Sistema Nervioso Central

VEB: Virus Epstein Barr

VPN: Valor Predictivo Negativo

VPP: Valor Predictivo Positivo

vs: Versus (frente a)

Resumen

RESUMEN

La esclerosis múltiple (EM) es una enfermedad inflamatoria, desmielinizante y neurodegenerativa del sistema nervioso central (SNC). Se desconoce su etiología, pero su patogenia es de carácter autoinmune. Actualmente, es la segunda causa de discapacidad en adultos jóvenes después de las lesiones traumáticas, siendo más frecuente en mujeres, en una proporción de 2:1 respecto a hombres, según estudios realizados en distintas cohortes de población (Mackenzie IS, 2014; Grytten N, 2015; Alonso-Magdalena L, 2022).

Esta enfermedad se caracteriza por la presencia de áreas multifocales de desmielinización, por destrucción de la mielina, y fallo en los mecanismos de reparación. También presenta daño axonal con pérdida de oligodendrocitos y esclerosis astroglial (Río J, 2014).

En cuanto al patrón y curso clínico de la EM, la enfermedad se clasifica en varios subtipos, presentando episodios de disfunción neurológica diseminados en el espacio y el tiempo que originan una gran variedad de síntomas, según la zona del SNC afectada. El 85% de los pacientes que padecen EM presentan un curso clínico caracterizado por la aparición de episodios o brotes de disfunción neurológica más o menos reversibles, que se repiten cada cierto tiempo dejando progresivamente secuelas funcionales neurológicas (Forma remitente-recurrente o remitente-recidivante, RR o EMRR). Tras un periodo variable de tiempo de unos 10 años, casi un 50% de los pacientes pasan del curso en brotes a un curso progresivo (forma secundariamente progresiva EMSP). Por otra parte, alrededor de un 15% de los pacientes desarrollan un fenotipo que se caracteriza por la falta de una fase inicial remitente-recurrente y una progresión constante desde el inicio de la enfermedad (forma progresiva primaria, EMPP) (Fernández O, 2015; Klineova S, 2018).

El diagnóstico clínico se realiza considerando criterios de diseminación espacial y de dispersión temporal, valorados mediante resonancia magnética nuclear (RMN) (criterios de McDonald 2017), además de otras pruebas complementarias, como el estudio del líquido cefalorraquídeo (LCR) y los potenciales evocados (Thompson A, 2018). Sin embargo, las diferentes pruebas diagnósticas presentan limitaciones para predecir de forma precisa el curso clínico de la enfermedad. Se han intentado validar diferentes predictores de progresión de la enfermedad, pero todos ellos han resultado ser insuficientes dado el carácter impredecible de la EM (Koch M, 2009; Stellmann JP, 2014).

Actualmente no hay curación para la enfermedad, pero sí tratamientos que modifican su evolución y mejoran la calidad de vida de los pacientes.

Esta tesis se centra en el estudio de las formas progresivas de esta enfermedad. La EMPP, como hemos comentado antes, muestra una progresión constante, con un mal pronóstico y una acumulación de discapacidad en los pacientes. Recientemente ha sido aprobado un tratamiento para estos pacientes, el ocrelizumab. Este anticuerpo monoclonal ofrece la oportunidad de reducir o atenuar el avance de la enfermedad, por lo que un diagnóstico temprano de este fenotipo puede resultar vital. Mientras que para los pacientes con EMSP, el empleo de la terapia con Siponimod ha mostrado una reducción significativa del riesgo de progresión de la discapacidad y una disminución del deterioro cognitivo en recientes ensayos, respaldando la importancia de un inicio más temprano y a largo plazo del tratamiento (Cree BA, 2022).

La EM tiene un gran impacto socioeconómico, no sólo repercute directamente a nivel personal, sino también a nivel familiar, emocional, psicológico, laboral y social, viéndose afectada no solo la persona que la presenta sino también, su entorno más cercano (red de apoyo); de ahí la importancia de un diagnóstico precoz. Un temprano diagnóstico permitiría llevar a cabo las intervenciones oportunas que conduzcan a un tratamiento adecuado, disminuyendo así las tasas de recaídas y la evolución de la discapacidad, hacia una mejor calidad de vida del paciente (Gallego D, 2016).

Con este trabajo, pretendemos evaluar la utilidad clínica del índice kappa en las formas progresivas, y si la integración de este biomarcador junto con otros parámetros bioquímicos puede ayudar a discernir entre las formas remitentes-recurrentes de las formas progresivas.

1. Introducción

1. INTRODUCCIÓN

1.1. Antecedentes históricos

Los primeros relatos de la enfermedad ya se conocían desde antes del siglo XIII. La descripción más antigua, que se conoce de una probable EM, se encuentra en el libro *“Isa Saga”* de Thorlaco Torhallsson (1133-1193), el cual fue un clérigo islandés que posteriormente fue canonizado y nombrado santo patrono de Islandia. A este le siguieron múltiples relatos como el de Santa Lidwina de Scheidam, una monja holandesa del siglo XIV que lo describió en su diario, el poeta Heine y Alan Stevenson o Richard Gough, quien lo refirió en su libro *“Antiquities and Memoyres of the Parish of Myddles, County of Salop”* en 1700 (Covo P, 2015).

No fue hasta inicios del siglo XIX, cuando Robert Carswell y Jean Cruveilhier iniciaron las primeras descripciones clínico-patológicas de esta nueva enfermedad. Carswell describió los casos estudiados por él en 1831, primero en forma de fascículos y posteriormente, en el atlas *“Pathological anatomy: illustrations of the elementary forms of disease”* (Carswell R, 1838; Hollman A, 1995; Martínez-Altarriba MC, 2015a). Jean Cruveilhier, profesor de Anatomía Patológica en la Facultad de Medicina de la Universidad de París, describió hallazgos similares a los de Carswell, tanto desde el punto de vista patológico como clínico hacia 1835, atribuyéndole el nombre de *“afección de la médula con paraplejía”* (Cruveilhier J, 1841). En 1849, Friedrich Theodor von Frerichs publicó un relato muy parecido a los conceptos actuales de la EM, resaltando que la enfermedad ocurría más comúnmente en individuos jóvenes. Dio a conocer el variado curso de la enfermedad con exacerbaciones, episodios de recaída y remisión y posterior cuadro progresivo (Moreira MA, 2002).

En 1857, Carl Rokitansky utilizó técnicas avanzadas en microscopía y describió que las placas podrían representar proliferación de tejido conectivo en la médula, el puente y el bulbo, y producir paresia progresiva. El mérito de las primeras descripciones clínicas y anatómicas detalladas de la enfermedad válidas a día de hoy se atribuye a Jean-Martin Charcot. El término *“esclerosis en placas”* lo introdujo Edmé Félix Alfred Vulpian, gran colaborador de Charcot, en 1866 (Vulpian EFA, 1866). En 1868, Charcot difundió su célebre publicación *“Histologie de la sclerose en plaque”*, que identificaba una nueva enfermedad previamente confundida con parálisis, a la que denominó *Esclerosis en Placas*. Charcot

enfaticaba que la EM es una entidad clinicopatológico distinta al presentar lesiones diseminadas en el tiempo y el espacio, así como introdujo el término de desmielinización (Covo P, 2015; Charcot JM, 1868). Los primeros relatos clínicos de la EM en la literatura médica británica los publicó William Moxon en 1873.

En 1884, Pierre Marie, sucesor de Charcot en el Hospital Pitié-Salpêtrière de París, clasificó los trastornos de la marcha distinguiendo los componentes espástico y cerebelar. También reconoció la gran variabilidad de los síntomas iniciales, distinguió las formas progresiva primaria y progresiva secundaria e incluyó una nueva categoría, que denominó “EM benigna”(Marie P, 1884). Debido a los hallazgos de Louis Pasteur (1822-1895), Pierre Marie sugirió en 1884, que la EM podría ser producida por un agente infeccioso. En 1888, sir William Gowers, un neurólogo británico, relató la ocurrencia de la enfermedad en hermanos y notó una frecuencia más alta después del curso de una enfermedad exantemática, como la varicela o el sarampión. En 1899, James Samuel Risien Russell consideró poco probable una etiología infecciosa para la EM, pero consideró que la gripe podía desempeñar un papel durante su evolución (Moreira MA, 2002).

Entre finales del siglo XIX y principios del siglo XX, nos encontramos las aportaciones a la enfermedad de Eugène Devic y Lhermitte. Eugène Devic junto a su discípulo, describió una condición nerviosa diferente a la EM, que afectaba la médula espinal y el nervio óptico, hoy conocida como “*Enfermedad de Devic*” o “*neuromielitis óptica*”(Covo P, 2015). Esto ayudó al diagnóstico diferencial de la EM y a un mejor conocimiento de la enfermedad. Ya en el siglo XX, Lhermitte Bollack & Nicolás detallan por primera vez el signo de Lhermitte, el cual se describió como una “descarga eléctrica” y se estableció su relación con la EM. Sus hallazgos fueron presentados y publicados en la Sociedad Neurológica de París en 1924 (Lhermitte J, 1924).

En 1905, el descubrimiento de la treponema como agente de la sífilis por parte de Fritz Richard Schaudinn despertó un gran interés por el papel de esta bacteria como causa potencial de la EM. En la historia de la etiología de la EM se han implicado una larga lista de agentes víricos, pero nunca confirmados en estudios retrospectivos. Esta lista incluye el virus de la rabia, herpes simple, parainfluenza virus 1, virus del sarampión, Epstein Barr, citomegalovirus y coronavirus (Moreira MA, 2002). Recientemente, el virus de Epstein Barr

parece estar definitivamente ligado a la EM, según los estudios longitudinales realizados por Bjornevik y su equipo en una cohorte compuesta por adultos jóvenes, en los que 955 jóvenes presentaron EM (Bjornevik K, 2022). Actualmente, con respecto a otros microorganismos que se han asociado con la EM, los retrovirus endógenos conocidos como HERV, especialmente HERV-W, tienen el papel más importante en la patogénesis de la enfermedad y se están considerando como el puente de unión entre el VEB y otros factores ambientales y el desarrollo de la EM (Frau J, 2023).

Un poco más adelante ya en los años 30, basándose en la presencia de desmielinización en las proximidades de vénulas, Putnam, neurólogo estadounidense, creyó que el proceso desmielinizante sería primariamente trombótico, como consecuencia de esta teoría, se preconizó el tratamiento con anticoagulantes para la EM, particularmente con dicumarina. Durante los años 20 y 30 se utilizaron otros métodos como alternativas terapéuticas para la EM como: procedimientos quirúrgicos como la simpatectomía, la sección de raíz y la laminectomía, así como tratamientos parenterales como la fibrolisina, la sueroterapia hemolítica, la autotransfusión o el trasplante de bazo o el timo entre otros (Putnam TJ, 1947).

El concepto de EM como una enfermedad autoinmune lo estableció en 1935 Thomas Rivers, del Rockefeller Institute de Nueva York, mediante estudios de replicación de encefalitis alérgica experimental en monos.

El primer investigador que observó las anomalías del LCR en la EM fue WA Hinton en 1922. Para llegar a estos resultados realizó la prueba de Lange o la reacción del oro coloidal a un conjunto de pacientes con EM (Moreira MA, 2002). La reacción del oro coloidal descrita por Lange en 1912 consiste en añadir una solución coloidal de oro al LCR que da lugar a diferentes floculaciones según el contenido proteico del LCR. En los casos normales no existía precipitación del oro (estabilización del coloide), mientras que, en los casos patológicos, la floculación del oro cambiaba la coloración de la suspensión a un color rojo brillante de distinta tonalidad en función del grado de precipitación. Los tubos más concentrados en proteínas presentaban un patrón de coloración denominado “curva parética”, propia de la parálisis general progresiva o la EM. Los tubos con una concentración media producían un patrón de coloración denominado “curva luética”, propio de la meningitis o la neurosífilis (Von Storch T,

1950). En 1942, Kabat et al, utilizando la recién desarrollada técnica de electroforesis, identificó proteínas anormales en el LCR de personas afectadas por EM, con patrones conocidos como bandas oligoclonales (BOC) (Kabat EA, 1950).

Otro punto importante en el tratamiento y seguimiento de la EM se produjo en 1955, cuando Kurtzke desarrolló la primera escala descrita para definir el estado de discapacidad física en EM (Kurtzke JF, 1955). Esta escala sirvió de base para el primer ensayo doble ciego, en 1957 sobre la evaluación de la isoniacida como posible tratamiento (Kurtzke JF, 1957). En 1983, Kurtzke publicó una versión ampliada de su escala – *Expanded Disability Status Scale* (EDSS), que actualmente es la escala más utilizada en todo el mundo (Kurtzke JF, 1983).

Con respecto a los criterios diagnósticos de la EM, a lo largo de del siglo XX se han propuesto varios entre los que destacan los criterios de George Schumacher y su equipo de la Universidad de Vermont. Estos criterios fueron establecidos en 1965 y se basaron en seis características: anormalidad objetiva en el examen neurológico, evidencia de dos o más lesiones separadas en el sistema nervioso, afección de la sustancia blanca, compromiso del neuroeje, comienzo entre los 10 y los 50 años, signos y síntomas que no eran sugerentes de explicarse mejor por otra causa (Schumacher GA, 1965). Posteriormente, Charles Poser et al. publicaron en 1983 sus reconocidos criterios para el diagnóstico de EM, en los cuales sólo con la presencia de un episodio de enfermedad permitía diagnosticar la enfermedad enfatizando el diagnóstico con exámenes paraclínicos complementarios, como la existencia o determinación de bandas oligoclonales, la observación de un aumento de inmunoglobulina G (IgG) en el LCR, alteraciones en los potenciales evocados y test urodinámico (Poser CM, 1983).

Actualmente, los criterios utilizados para el diagnóstico de la EM son los de McDonald, los cuales tienen en cuenta el cuadro clínico manifestado como brotes, la diseminación de las lesiones de la RMN con gadolinio en tiempo y espacio, y además incluye las anormalidades del LCR. Estos criterios se desarrollaron por primera vez en 2001, actualizándose en 2005, 2010 y en 2017 (McDonald WI, 2001; Polman CH, 2005; Polman CH, 2011; Thompson AJ, 2018). A lo largo de ese tiempo, el LCR ha ido adquiriendo una mayor relevancia en el diagnóstico de la EM, en el que la demostración de bandas oligoclonales de LCR en ausencia

de hallazgos atípicos de LCR permite un diagnóstico de la EM, en ausencia de criterios de diseminación en el tiempo.

En cuanto a las primeras sociedades científicas para el estudio de la EM, la primera sociedad se fundó en 1946 con sede en Nueva York, bajo el nombre de *National Multiple Sclerosis Society* (NMSS). Posteriormente en 1967, se fundó la *International Federation of Multiple Sclerosis Societies* (IFMSS), que agrupa a más de 30 países, y en 1986, el *Consortium of Multiple Sclerosis Centers* (CMSC), actualmente considerado como la principal organización de profesionales interesados en el estudio y la asistencia a los portadores de EM. Del mismo modo, se fundaron el *Comité Europeo para el Tratamiento y la Investigación de la EM* (ECTRIMS), en 1982; el *Comité Americano para el Tratamiento y la Investigación de la EM* (ACTRIMS), en 1996; el *Comité Latino-Americano para el Tratamiento y la Investigación de la EM* (LACTRIMS), en 1999; y el *Comité Brasileño para el Tratamiento y la Investigación de la EM* (BCTRIMS), en 1999 (Moreira MA, 2002). En definitiva, dada la importancia de esta patología, existe un gran número de fundaciones y sociedades científicas que a día de hoy coordinan protocolos de actuación para el tratamiento y la investigación de la EM.

1.2. Epidemiología y Factores de riesgo

La incidencia y prevalencia de la EM presenta una distribución geográfica heterogénea, caracterizada por un “gradiente latitudinal”. La prevalencia media global de la EM es de 35.9 casos por cada 100.000 habitantes, con una gran variación entre diferentes países (Atlas of MSIF, 2020). De este modo, el Continente Americano y Europa tienen la mayor prevalencia (con 112 y 133 casos por cada 100.000 habitantes, respectivamente), mientras que los países del Pacífico Occidental y África son los que presentan la prevalencia más baja (5 y 5 por cada 100.000 habitantes, respectivamente). Las áreas de prevalencia clásicamente medias (España, Italia...) se consideran en la actualidad regiones de alto riesgo, en torno a los 100 casos por cada 100.000 habitantes.

Como hemos comentado anteriormente, la EM supone la segunda causa de discapacidad no traumática en adultos jóvenes, siendo más frecuente en mujeres en una proporción 2:1 respecto a los hombres. Son numerosos los estudios que ponen de manifiesto esta prevalencia en el sexo femenino en cohortes de distintas zonas de la geografía mundial. Por ejemplo en Canadá, la ratio mujer/varón para formas recurrentes ha aumentado por año de nacimiento a lo largo de los últimos 50 años (Orton SM, 2006) y, en el registro danés, la incidencia en las mujeres se ha duplicado desde 5,91 hasta 12,33 nuevos casos al año por cada 100.000 habitantes en los últimos 60 años, con sólo un ligero aumento en los varones (desde 4,52 hasta 6,08) (Koch-Henriksen N, 2018). En el área sanitaria Norte de Sevilla, un estudio longitudinal realizado por el Dr. Izquierdo entre enero del 2001 y diciembre del 2011, reportó una incidencia de 4,6 casos al año por cada 100.000 (Izquierdo G, 2015).

Por otro lado, hay estudios que también ponen de manifiesto que las mujeres tienen más probabilidades de desarrollar más precozmente EM clínicamente definida (EMCD) tras un SNA, y de tener más lesiones inflamatorias en la RMN y más brotes que los hombres (Dunn SE, 2015; Ysraelit MC, 2019). Esta diferencia en función del sexo, tanto en la EM como en otras condiciones autoinmunes, sugiere un sesgo de género y una posible asociación hormonal. Los esteroides sexuales influyen tanto en la inmunidad humoral como en la mediada por células, demostrándose en varios estudios, que las hormonas sexuales en particular, tienen un efecto inmunoprotector en las enfermedades autoinmunes impulsadas por linfocitos Th1 (Aristimuño C, 2012; Avila M, 2018).

En 2008, fue publicado por la organización Mundial de la Salud (OMS) y la *Multiple Sclerosis International Federation* (MSIF), el primer Atlas de la EM que recoge la información acerca de esta patología en 112 países (World Health Organization, 2006).

En el año 2013 y 2020, se publicó una actualización de los datos por parte de la MSIF, en el que se ponía de manifiesto que, si bien la EM está presente en todas las regiones del mundo, su prevalencia varía enormemente según la zona geográfica (Atlas MSIF 2020; MSIF, 2013).

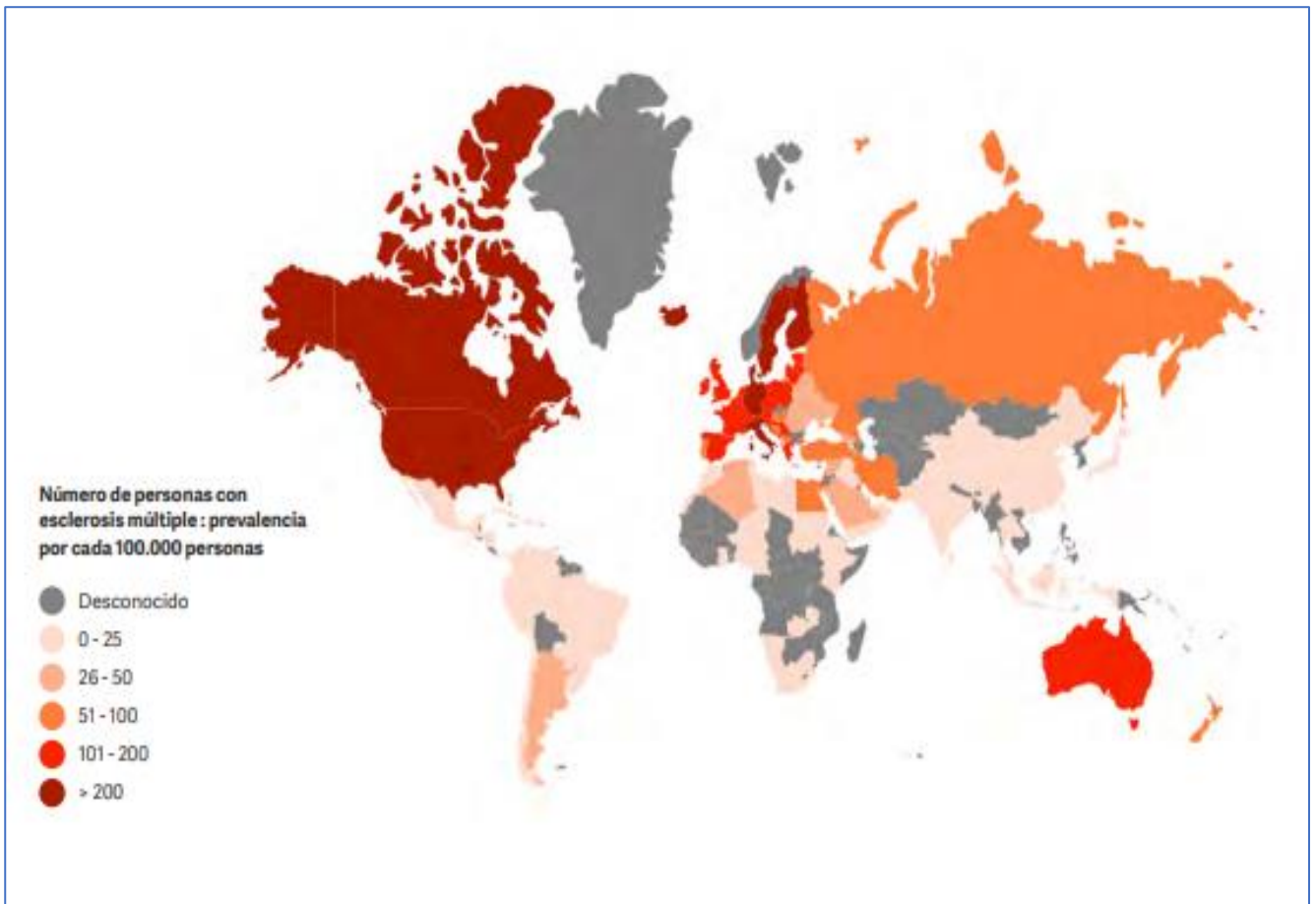


Figura 1: Prevalencia de EM en el mundo (2020). España es uno de los países con mayor prevalencia de EM a nivel global (Adaptado de “Multiple Sclerosis International Federation. Atlas of MS 2020 Mapping multiple sclerosis around the world”).

En un metaanálisis publicado en 2010, se observó un aumento casi universal de la prevalencia y la incidencia de la EM a lo largo del tiempo; este aumento desafía la teoría bien aceptada de un gradiente latitudinal de incidencia de EM en Europa y América del Norte, mientras que este gradiente todavía se evidencia en Australia y Nueva Zelanda (Koch-Henriksen N, 2010).

En España se vienen realizando estudios epidemiológicos de EM desde 1968, se han comunicado desde entonces 43 estudios que podemos agrupar en tres épocas: años 80 con una prevalencia media entre 5 y 23 casos por cada 100000 habitantes, años 90, entre 32 y 65 casos por cada 100.000 habitantes; y a partir del 2000, entre 80 y 180 casos por cada 100.000 habitantes. Los últimos datos de un reciente estudio, llevado a cabo en San Vicente del Raspeig (Alicante), obtuvieron como resultado una prevalencia de EM de 102 casos por cada 100.000 habitantes (intervalo de confianza al 95%: 79,1-132,2), y la ratio de sexo más alta descrita en España: 3,5 a 1 (Pérez-Carmona N, 2019a). También la ratio de sexo ha crecido en España a favor de las mujeres. Las cifras más elevadas de ratio de sexo han sido las descritas en Sevilla (2,5 a 1), Murcia (2,6 a 1), Las Palmas (3 a 1) y Alicante (3,5 a 1) (Izquierdo G, 2015; Candelieri-Merlicco A, 2016; Aladro Y, 2005). En cuanto a la incidencia, la media de las incidencias de los últimos estudios prospectivos es de 4,2 casos anuales por cada 100.000 habitantes (Pérez-Carmona N, 2019b).

Respecto a la edad de comienzo, la EM puede comenzar a cualquier edad, pero raramente se manifiesta antes de los 10 y después de los 60 años, siendo en torno a los 25-30 años el comienzo más habitual de la enfermedad.

	Ref.	Fecha de prevalencia	Prevalencia ^a	Incidencia ^b	Ratio de sexo ^c	Población
Las Palmas	[37]	2002	78	4,1	3 a 1	82.623
Santiago de Compostela	[62]	2003	79	5,3	1,6 a 1	90.188
Bajo Aragón	[63]	2003	75	4,6	1,9 a 1	58.666
Lanzarote	[64]	2004	47	2,2-4,6	1,4 a 1	127.218
Málaga	[34]	2008	125 ^d	–	2 a 1	1.528.851
Albacete	[65]	2009	73	–	2,3 a 1	400.891
Osona	[66]	2009	80	–	1,4 a 1	150.139
Sevilla	[35]	2011	90	4,6	2,5 a 1	163.324
La Rioja	[67]	2011	65	3,5	2 a 1	322.955
Murcia (área III)	[36]	2010	72	–	2,6 a 1	171.040
Gerona	[39]	2013	–	3,6	1,5 a 1	747.782
Tarragona	[68]	2014	73	–	2 a 1	814.000
Murcia (área I)	[69]	2014	88	5,8	2,1 a 1	257.865
Ferrol	[29]	2015	110	5,5	2,5 a 1	194.834
Ourense	[30]	2016	184	7,8	2,2 a 1	105.893
San Vicente del Raspeig (Alicante)	[31]	2017	102	4,6	3,5 a 1	56.715

^a Casos por 100.000 habitantes; ^b Casos por 100.000 habitantes/año; ^c Mujeres/hombres; ^d Metodología de captura-recaptura.

Tabla 1: Estudios de incidencia y de prevalencia en España desde 2002 hasta la actualidad (Adaptado de Pérez-Carmona N, 2019b).

1.2.1. Factores de riesgo

Además del factor geográfico anteriormente mencionado, existen otros factores de riesgo que se han relacionado con la EM. Los factores de riesgo que han recibido y reciben actualmente más atención por parte de los investigadores incluyen los factores genéticos, ambientales e inmunológicos principalmente.

- Factores genéticos:

Entre los factores genéticos que parecen contribuir al riesgo de EM, presenta una especial relevancia la variación que involucra a los diferentes haplotipos del CMH clase II. Concretamente es la asociación genética entre los loci HLA-DRB1, HLA-DRB1_01 y HLA-DQB1 los que más se han relacionado con la susceptibilidad de padecer EM. Por otra parte, la presencia de un elemento de respuesta de vitamina D (VDRE) ubicado en la región promotora de muchos alelos HLA-DRB1, sugiere que las diferencias ambientales de dicha vitamina podrían interactuar con HLA-DRB1 para influir en el riesgo de padecer EM, lo cual evidencia la interacción de los factores genéticos con los factores ambientales en esta enfermedad (Sawcer S, 2014; Goodin DS, 2018). En los últimos años, gracias a la contribución de los estudios de asociación del genoma completo (GWAS), se han identificado nuevos loci de riesgo de EM, como el locus 11q23.3, que induce la expansión de linfocitos T reguladores circulantes CXCR5 positivos (Gil-Varea E, 2020), o el locus L3MBTL3, regulador de la vía de señalización Notch, la cual participa en la neurogénesis adulta y la diferenciación de oligodendrocitos, y también es esencial para el desarrollo de células T (Alcina A, 2022).

- Factores ambientales:

Se ha descrito que existe una relación inversa entre los niveles séricos de vitamina D, relacionados con la exposición al sol y a la radiación ultravioleta B, y el riesgo de EM (Matías-Guío J, 2018; Alfredsson L, 2019). Teniendo en cuenta lo descrito anteriormente relacionado con los haplotipos HLA tipo II, la exposición solar es considerada uno de los factores ambientales más importantes de la EM. Además de su papel en el metabolismo del fósforo y el calcio, la vitamina D también juega un papel importante en la señalización inmunitaria. La vitamina D facilita la acción de las células T reguladoras y promueve un alejamiento de la respuesta inmunitaria inflamatoria (Tarlinton RE, 2019).

Un factor de riesgo ambiental que ha cobrado especial relevancia en los últimos años son las infecciones virales. Aunque muchos virus se han asociado con la EM, no ha sido hasta un estudio reciente en el que se ha vinculado de forma evidente la infección por el virus Epstein Barr (VEB) con el desarrollo de EM (Bjornevik K, 2022). La manifestación de la enfermedad mediada por VEB sugiere un mecanismo de mimetismo molecular, a través del cual las secuencias de proteínas virales del VEB imitan a las proteínas de la mielina humana y otras proteínas del SNC y, por lo tanto, inducen autoinmunidad contra la mielina y los antígenos del SNC, siendo un posible desencadenante de la enfermedad (Tengvall K, 2019; Jog NR, 2020).

Otros factores de riesgo de tipo ambiental que se han vinculado con la EM son el tabaquismo, la dieta, los cambios en el microbioma intestinal y la obesidad infantil o adolescente (Healy BC, 2009; Tarlinton RE, 2019).

En cuanto a la evolución de la enfermedad, también se ha demostrado que ciertos factores de riesgo están asociados con el empeoramiento de la discapacidad en la EM, como es el tabaquismo. Recientemente, un estudio publicado en 2022, evidenció que al menos el 13% de los casos de EM podrían prevenirse evitando este tipo de riesgo (Manouchehrinia A, 2022).

Con respecto al estado vacunal, aunque se han llevado a cabo estudios, no existen suficientes evidencias que describan una relación clara entre las vacunas, en particular las de la hepatitis B y el virus del papiloma humano (VPH), y el riesgo de desarrollar EM (Langer-Gould A, 2014).

- Factores inmunológicos:

Existen estudios que evidencian una relación entre EM y la presencia de trastornos autoinmunes, tales como la diabetes mellitus tipo 1 o la enfermedad inflamatoria intestinal (Sawcer S, 2014). Existen genes de expresión común entre la diabetes de tipo 1 y la EM (Safari-Alighiarloo N, 2020), así como similitudes en la regulación génica en diferentes niveles mediante ARN no codificante (micro-ARN, los ARN circulares y los ARN largos no codificantes) en varias enfermedades autoinmunes como la EM, el lupus eritematoso sistémico, la artritis reumatoide y la diabetes mellitus tipo 1 (Lodde V, 2020).

1.3. Fisiopatología de la EM

Aunque la causa definitiva de la EM es desconocida, a día de hoy la teoría más ampliamente aceptada, es que se considera una enfermedad de tipo autoinmune desencadenada por factores ambientales que actúan sobre un huésped genéticamente susceptible (Baecher-Allan C, 2018). El resultado es la activación anormal del sistema inmunológico, el cual reacciona contra elementos propios del SNC, produciendo inflamación y daño axonal (Compston A, 2008).

En la fisiopatología de la enfermedad se ha descrito distintas células y moléculas implicadas, tanto del sistema inmune como células gliales, que detallaremos a continuación.

1.3.1 Células implicadas en la patogenia de la EM

✓ Microglías y macrófagos inflamatorios:

Las microglías son células neurogliales del tejido nervioso con capacidad fagocitaria y de soporte que representan al sistema inmunológico en el SNC. Se encargan de la eliminación de desechos celulares y de la detección de patógenos en el SNC. Al activarse como respuesta a lesiones, inflamación o infecciones toman un aspecto ameboides y provocan un aumento en la expresión de marcadores de superficie típicamente asociados con macrófagos como F4/80 y Mac-1 produciendo citocinas, quimiocinas y metabolitos que regulan directa e indirectamente la neurodegeneración en la EM (como CCL-2, IL12 e IL23) (Olson JK, 2004). También expresan moléculas HLA-II y HLA-III junto con moléculas coestimuladoras CD40, CD80, CD86, lo que les permite reactivar células T en el SNC. Después de su activación pueden tener una función antiinflamatoria o proinflamatoria. En los estadios tempranos de la EM, las microglías activadas y macrófagos periféricos reclutados al SNC pueden identificarse en las lesiones con daño axonal y neuronal. Estas células son activadas por citocinas producidas por las células T y por productos de la degradación de la mielina (Singh S, 2013).

Los macrófagos inflamatorios presentan actividad neurotóxica directa, como el TNF α que induce apoptosis en las neuronas y actúa de forma autocrina para promover la secreción de glutamato, o la IL1 β con actividad neurotóxica e inductor de la producción de óxido nítrico (ON), que junto con las especies reactivas de oxígeno favorece la neurotoxicidad y el daño oxidativo presente en la EM (Sofroniew MV, 2010).

✓ *Astrocitos:*

Son las células más abundantes en el SNC. Parte de la disfunción en la barrera hematoencefálica, que caracterizan la enfermedad, está relacionada con defectos en la funcionalidad de los astrocitos perivasculares. Durante el curso de la EM, distintos estímulos como citocinas y productos de degradación de la mielina activan a los astrocitos, produciendo citocinas y quimiocinas que promueven la respuesta inflamatoria en el SNC. Entre los productos resultantes de su activación está: el CCL-2, el TNF- α , además de óxido nítrico, especies reactivas de oxígeno, glutamato y ATP en las lesiones provocadas por la EM (Sofroniew MV, 2010).

Los astrocitos también regulan la actividad de otras células involucradas en la inmunopatología de la EM, como son los oligodendrocitos, células T, microglías y macrófagos, células B, células dendríticas, células NK y células T y δ (Cuevas-García C, 2017).

✓ *Células T CD4+:*

Son los subtipos Th1 y Th17 los que principalmente juegan un papel en la fisiología de la EM. Las células Th1 se activan ante la presencia de IL12 y se caracterizan por la expresión del factor de transcripción Tbet, el cual controla una cascada de expresión génica que resulta en la producción de interferón gamma (IFN γ) y otras moléculas efectoras. Sin embargo, las Th17 responden a la activación del factor de crecimiento transformante β 1 (TGF β 1), IL6, IL21 o IL23 y se caracterizan por la expresión del factor de transcripción ROR γ t, que deriva en la expresión de IL17 y otras moléculas efectoras, contribuyendo por distintos mecanismos a la patología de la EM. Las células Th1 y Th17 también promueven la activación de microglías, macrófagos, astrocitos y linfocitos B mediante la producción de citocinas y factores de crecimiento, activando mecanismos adicionales neurodegenerativos (Codarri L, 2011; Machado-Santos J, 2018).

La participación de las células CD4 es consistente con el riesgo genético asociado a las moléculas HLA de clase II (HLA-II), ya que estas moléculas son las responsables de procesar y presentar los antígenos a dichos linfocitos, provocando una activación disfuncional del mismo. Se ha observado que los genes que codifican para HLA-II son los que confieren un mayor riesgo genético de EM (Sawcer S, 2014; Goodin DS, 2018).

Las células T de los pacientes con EM pueden reconocer una gran variedad de proteínas de la mielina, incluida la proteína proteo-lipídica MBP (PLP), la glicoproteína de oligodendrocitos de mielina (MOG) y la proteína básica de oligodendrocitos asociada a la mielina, entre otras. También se han descrito antígenos de células T no amilínicas, incluyendo α B cristalino y proteínas neuronales como la contactina-2.

Los linfocitos T CD4+ Th17 se han detectado en mayor concentración en los pacientes con EM. Este subtipo entra con más facilidad al SNC y una vez dentro son capaces de mediar lesiones mediante el reclutamiento de neutrófilos polimorfonucleares y monocitos, junto con la coproducción de otras citoquinas, como la IL-22 y la IL-21 (Wu GF, 2011).

✓ *Células T CD8+:*

Son mucho más abundantes que las CD4+ en placas crónicamente inflamadas en el SNC de enfermos con EM. Las células T CD8+ interactúan con células que expresan el complejo mayor de histocompatibilidad de clase I (MHC-I), el cual se encuentra en todas las células nucleadas, formando una sinapsis inmunológica estabilizada por las moléculas de adhesión LFA-1 e ICAM-1. La citotoxicidad por células T CD8+ es mediada por dos mecanismos: Por la secreción de gránulos líticos que contienen perforina y granzimas y por la interacción de FasL con Fas expresado en neuronas. Las células T CD8+ también producen grandes cantidades de factor de necrosis tumoral alfa (TNF α) e IFN γ . El TNF α altera directamente la estructura y funcionalidad de la membrana neuronal, interfiriendo con la funcionalidad de las neuronas e induciendo su apoptosis.

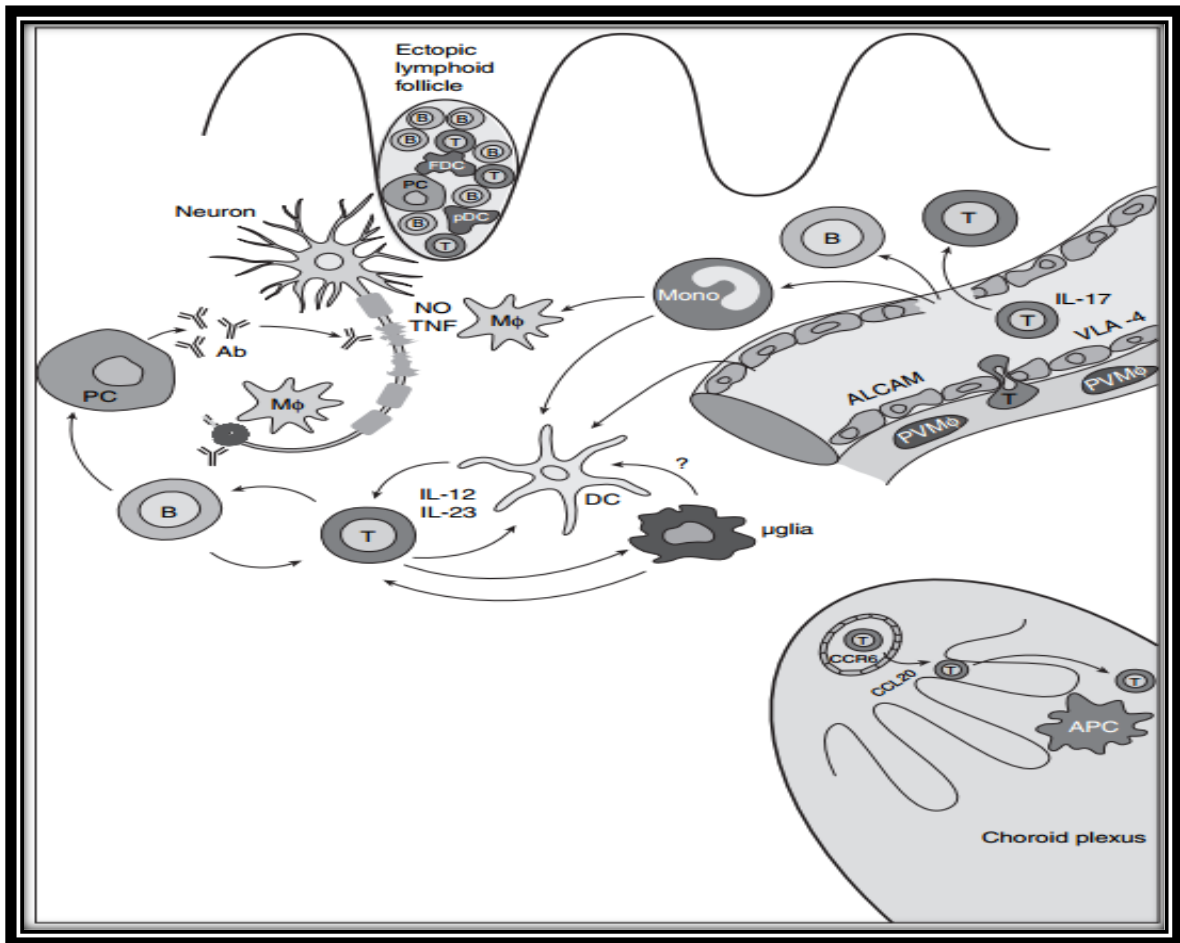


Figura 2: Factores celulares y moleculares implicados en la inmunopatogénesis de la EM. El diagrama destaca las interacciones neurales e inmunes en la EM, incluidos los factores que intervienen en el tráfico de leucocitos, la lesión axonal y la presentación de antígenos. (Mglia: microglía. Ab: anticuerpo; linfocito B; B; FDC: célula dendrítica folicular; M Φ : macrófago; Mono: monocito; PC: célula plasmática; pDC: célula dendrítica plasmocitoide; PVM ϕ : macrófago perivascular; linfocito T; T; TNF: factor de necrosis tumoral; VLA-4: antígeno 4 de activación muy tardía.) (Adaptado de Wu GF, 2011).

✓ Células B:

La evidencia actual indica que los linfocitos B están implicados en la fisiopatología de la EM. Anteriormente se conocía que tanto los linfocitos B como las células plasmáticas producen anticuerpos frente a algún agente infeccioso, aún no identificado, causante de la EM (Burgoon MP, 2004). A día de hoy, las anomalías de la función de las células B incluyen la producción de citocinas proinflamatorias, la función reguladora defectuosa de las células B y la formación de estructuras similares a los linfoides terciarios en el SNC, que son la fuente probable de la producción anormal de inmunoglobulinas detectables en el LCR (Cencioni MT, 2021). En

condiciones naturales, los linfocitos B no pueden atravesar la BHE, pero pueden hacerlo tras el proceso inflamatorio y la consecuente ruptura de la barrera, y favorecer la progresión de la EM por diferentes vías: bien como células presentadoras de antígenos a los linfocitos T, promoviendo por lo tanto la coestimulación de linfocitos T autorreactivos, o por la producción de autoanticuerpos específicos contra la mielina (Sospedra M, 2005). Existe además una población de linfocitos B residentes en el LCR, que constituye aproximadamente el 5% de las células del LCR (Ransohoff RM, 2012), que contribuyen a la secreción clonal de inmunoglobulina G, localizada dentro de los infiltrados perivasculares y en los folículos linfoides de las meninges del SNC. En estos folículos se han encontrado células B en pacientes con enfermedad EM en fase secundaria progresiva, participando en el proceso inflamatorio junto con células T y células plasmáticas (Serafini B, 2004). Las células B producen un aporte de citocinas proinflamatorias como la linfoxina y el $TNF\alpha$, que potencian el ambiente inflamatorio existente.

1.3.2. Moléculas del Sistema Inmune implicadas en la patogenia de la EM

✓ Inmunoglobulinas:

Las inmunoglobulinas (Ig) son las estructuras de reconocimiento de los linfocitos B. Están localizadas en la superficie de estas células. También las encontramos como moléculas efectoras libres, una vez han sido liberadas por los linfocitos B maduros o células plasmáticas. Son proteínas heterodiméricas compuestas por dos cadenas ligeras (L), y dos cadenas pesadas (H), unidas entre sí por puentes disulfuro. Las H pueden ser de tipo γ , μ , α , δ y ϵ , definiéndose 5 clases (isotipos) de Ig o anticuerpos: IgG (con subdivisión de subclases IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4), IgM, IgA (con subdivisión de subclases IgA1 e IgA2), IgD e IgE. Las L pueden ser de dos tipos: cadena kappa o lambda (Schroeder HW, 2010).

Las Ig están constituidas por un dominio variable, con capacidad de reconocimiento de los antígenos, y un dominio constante (Fc), con especificidad de las funciones efectoras, divididas por una región bisagra (Stanfield RL, 2014).

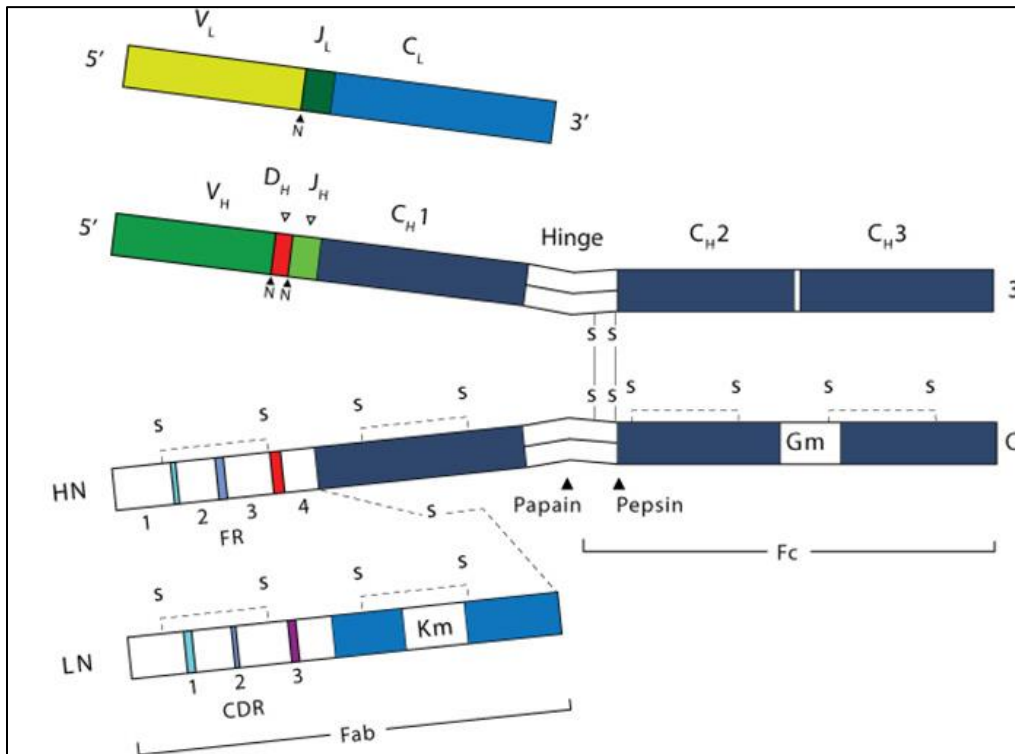


Figura 3: Esquema de una inmunoglobulina. H= cadena pesada; L= cadena ligera; Fab= dominio variable; Fc= dominio constante; N=extremo amino terminal; C= extremo carboxi terminal; S-S= puente disulfuro; CDR= regiones determinantes de complementariedad; Gm y Km= alotipo (marcador genético) (Adaptado de Schroeder HW, 2010).

Los dominios variables se crean por medio de una compleja serie de reordenamientos de genes, que sufren hipermutaciones somáticas después de la exposición al antígeno, para permitir afinar la maduración. En esta zona encontramos 3 regiones determinantes de complementariedad (CDRs), flanqueadas por regiones relativamente constantes. En los dominios constantes se produce el cambio de clase o isotipo “switch” de Ig.

Las cadenas pesadas y ligeras están codificadas por familias separadas de multigenes, y los dominios individuales variables y constantes son codificados por elementos independientes: los segmentos V(D)J para los dominios variables y exones individuales para dominios constantes. A su vez, las L y pesadas están codificadas por diferentes loci: Las L de subclase κ están codificadas por el locus con localización Chr22.q11.2, y las de subclase λ en Chr.2q1.2. Ambas contienen segmentos V, J y C. Por otro lado, las cadenas pesadas están codificadas por los genes localizados en Chr.14q32.2, las cuáles, además de contener los segmentos citados en las L, también contienen los segmentos D, responsables de la diversidad (Stanfield RL, 2014).

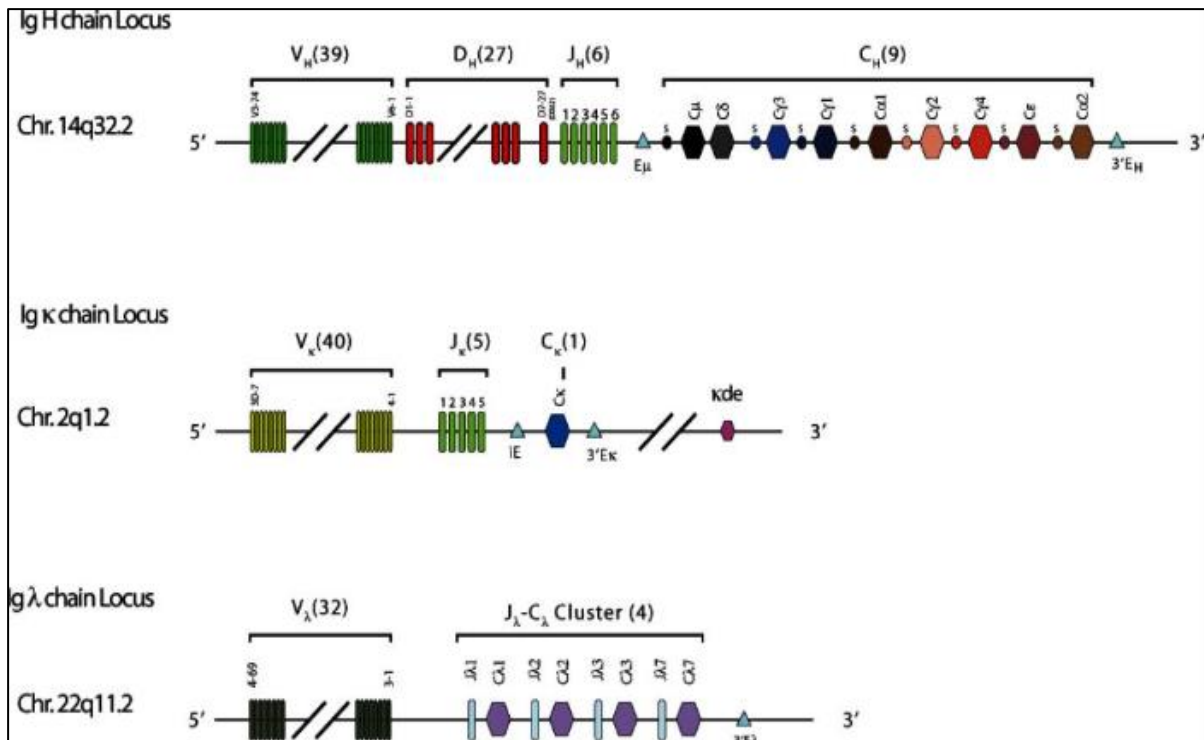


Figura 4: Representación de la organización cromosómica de los grupos de genes Ig H, κ y λ. Los números muestran la cantidad de genes funcionales de cada segmento (Adaptado de Schroeder HW, 2010).

Las cadenas pesadas y ligeras se sintetizan de forma separada en el interior de la célula plasmática y posteriormente se unen, antes de ser secretadas como inmunoglobulina completa. Para mantener la conformación normal de esta proteína, las células plasmáticas producen un exceso de L en relación a las H de aproximadamente un 40 %, y este exceso es secretado después con la inmunoglobulina completa en forma de CLL. Las CLL existen como dos isotipos (kappa o lambda), y cada uno de ellos aparece en dos formas moleculares, monómeros (25 kDa) y dímeros (50 kDa). Ambas formas de CLL se encuentran en diferentes fluidos corporales, incluyendo suero, LCR, orina, saliva, lágrimas y líquido sinovial. La concentración de las CLL de inmunoglobulinas en suero depende del equilibrio entre su producción por las células plasmáticas, que en un individuo sano es de 500 mg/día aproximadamente, y su aclaramiento renal. En determinadas patologías inflamatorias como la EM, estos niveles se encuentran alterados, siendo anormalmente altos (López-Corral L, 2010).

La producción intratecal localizada de inmunoglobulinas, que visualizada de forma cualitativa es denominada bandas oligoclonales (BOC), son un producto de las células B

expandidas por clonación dentro del compartimento del LCR. Las células plasmáticas del LCR de los pacientes con enfermedad desmielinizante inflamatoria produce anticuerpos que son capaces de unirse a la mielina y reconocer la proteína básica de mielina. La mayoría de los anticuerpos detectados en el LCR pertenecen a los isotipos IgG, principalmente de las subclases IgG1 e IgG3, y en menor medida IgM e IgA. Tanto las IgG1 e IgG3 como la IgM son activadores del complemento a través de sus dominios constantes C al componente c1q, presentando una mayor citotoxicidad mediada por dicho sistema (Losy J, 1990; Wu GF, 2011; Yu X, 2020).

La síntesis intratecal de IgM lípido-específicas, que se observan de forma cualitativa mediante la determinación de las bandas oligoclonales de IgM lípido-específicas, observa en un subconjunto de pacientes con EM, que alcanza aproximadamente el 70% de los que presentan IgM total. Algunas IgM aisladas de pacientes con EM se dirigen a una variedad de antígenos lipídicos, predominantemente la fosfatidilcolina. Estas BOC de IgM lípido-específicas persistentes están asociadas con una enfermedad más agresiva, con discapacidad, atrofia cerebral y mayor carga de lesiones en la fase inicial de la enfermedad (Álvarez-Cermeño JC, 2016; Villar LM, 2002). Un 40% de los pacientes presenta bandas IgM totales, de los cuales, la reactividad antilipídica se encuentra en casi el 70% de los pacientes (Villar LM, 2005). Estos anticuerpos se correlacionan con la síntesis intratecal de C3 y la concentración de proteína básica de mielina en el LCR, lo que respalda el papel de la IgM en la desmielinización. Por otra parte se han encontrado correlaciones entre el índice de IgM y la presencia de linfocitos CD5+ en el SNC, los cuales están implicados en la producción de IgM intratecal (Villar LM, 2008). En particular, un aumento de la IgM intratecal se asocia con una mayor puntuación en la escala de discapacidad expandida (EDSS) en el momento de la punción lumbar (PL) y también están presentes con mayor frecuencia en las formas EMSP (Villar LM, 2002).

✓ *Otras moléculas implicadas*

Los neurofilamentos son proteínas expresadas selectivamente en el citoesqueleto de las neuronas, y cuyos niveles elevados son un marcador de daño axonal. Los niveles elevados de neurofilamentos pueden servir como un marcador de actividad de la enfermedad en curso, así como una herramienta para medir la respuesta a la intervención terapéutica. La utilidad potencial de los neurofilamentos ha aumentado considerablemente a medida que los avances

recientes han permitido medir los niveles tanto en el líquido cefalorraquídeo como en la sangre. Se ha evidenciado niveles altos de cadenas ligeras de neurofilamentos (NfL) , en LCR y en sangre en pacientes con EM, vinculadas a recaídas y elevadas en pacientes con SNA que luego se convierten en EM (Gordon B, 2020).

Actualmente también se está estudiando la relación de los denominados patrones moleculares asociados al daño (DAMPs, del inglés “Damage-associated molecular patterns”) con la progresión de la EM en los distintos perfiles evolutivos. Estas moléculas están normalmente presentes en el interior de todas las células y cuando se libera en el medio extracelular por células dañadas o muertas, son capaces de provocar una respuesta proinflamatoria, induciendo la producción de citoquinas y activando el sistema inmunológico innato. Entre estos DAMPs se encuentra el ADN mitocondrial libre de células circulantes y HMGB1 (proteína no histónica de unión al ADN, que actúa como regulador de la transcripción y como estabilizador del nucleosoma) (Nasi M, 2020).

Como hemos comentado anteriormente, la inflamación, la desmielinización y la degeneración axonal son los principales mecanismos patológicos que causan las manifestaciones clínicas. La placa desmielinizante, el principal sello patológico de la EM, contiene una respuesta inmunológica dominada por células T CD8+ y CD4+, que junto con la presencia de células B productoras de inmunoglobulinas, sugieren que la EM es un trastorno inmunomediado que involucra múltiples antígenos del SNC (Lemus HN, 2018). Los infiltrados inflamatorios contienen principalmente linfocitos T CD8+ restringidas al Complejo de Histocompatibilidad humana de clase I (HLA-I), independientemente de la etapa de actividad o enfermedad. Mientras que el daño y la desmielinización de los oligodendrocitos ocurren como resultado de la inflamación, los axones están relativamente conservados en las primeras etapas de la enfermedad; sin embargo, a medida que la enfermedad progresa, se desarrolla un daño axonal irreversible. La enfermedad acaba dominada por la activación microglial y la neurodegeneración crónica (Dobson R, 2019).

Todo este proceso, que sucede en varias etapas, comienza en primer lugar con la activación de las células T autorreactivas que pudiera ser desencadenado por:

- Un factor sistémico o local (infección vírica, puerperio, etc.) mediante un mecanismo de mimetismo molecular (epítomos compartidos por la mielina y los posibles agentes infecciosos).
- Por una estimulación a través de superantígenos víricos o bacterianos (proteínas bacterianas o víricas que son capaces de unirse a la molécula HLA).

Una vez las células T se encuentran activadas, se unen a la pared endotelial a través de la interacción con las moléculas LFA-1 (antígeno asociado a la función leucocitaria) y VLA-4 (la subunidad alfa 4 del antígeno de activación muy tardía) y atraviesan la barrera hematoencefálica hacia el SNC, gracias a la acción de enzimas del tipo MMP-9 (metaloproteasa-9).

Ya en el SNC, las células T activadas se unirán a la correspondiente célula presentadora de antígeno local (macrófago o microglía), junto a una molécula de HLA-II (Kamm CP, 2014; Fernández O, 2015).

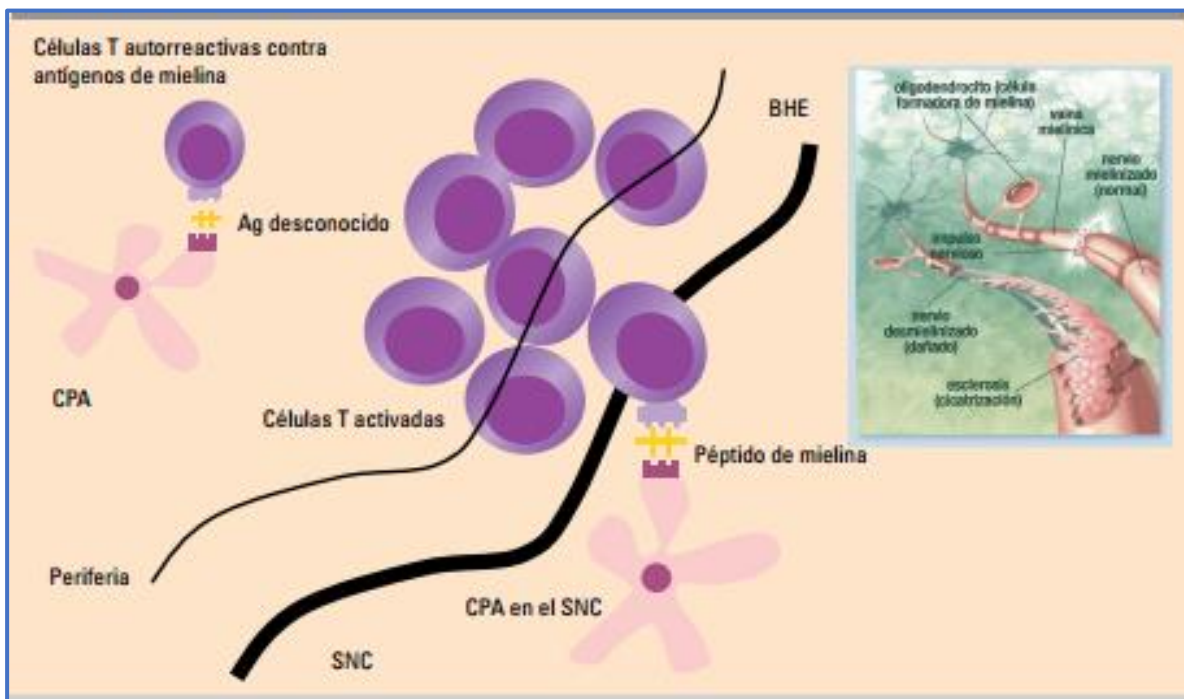


Figura 5: Etiopatogenia de la EM simplificada. Reconocimiento antigénico en la periferia, proliferación clonal, paso de la barrera hematoencefálica (BHE) y nuevo reconocimiento en el sistema nervioso central (SNC), con producción de lesiones en mielina y axones como resultado. CPA: célula presentadora de antígenos (Adaptado de Fernández O, 2015).

Una vez constituido el complejo trimolecular (receptor de la célula T o RCT, el antígeno y la molécula HLA clase II), las células T, que son de fenotipo colaborador CD4 (Th1 y Th17) producen citocinas proinflamatorias (interferón γ , factor de necrosis tumoral alfa –TNF α –, IL-1, IL-2, IL-12, IL-17) y quimiocinas, que inducen proliferación clonal de células T y que atraen a los macrófagos, células *natural killer* y a la microglía, activándolas, y poniendo en marcha la inflamación. De este modo, distintos estudios sugieren que las células T CD4+ actuarían como impulsores clave del inicio de la enfermedad y a continuación, gracias a la expansión clonal, las células T CD8+ asumirían un papel principal en las lesiones activas de EM (Machado-Santos J, 2018; Stojić-Vukanić Z, 2020).

Al mismo tiempo, los linfocitos T colaboradores tipo 2 (Th2) liberan citocinas antiinflamatorias (IL-4, IL-6, IL-10, TGF) que tienden a regular el estado proinflamatorio del sistema inmune, pero que además inducen la proliferación de células B, con la consecuente elaboración de anticuerpos. El equilibrio entre los distintos tipos de citocinas determinará el sentido de la reacción inmune (Fernández O, 2015).

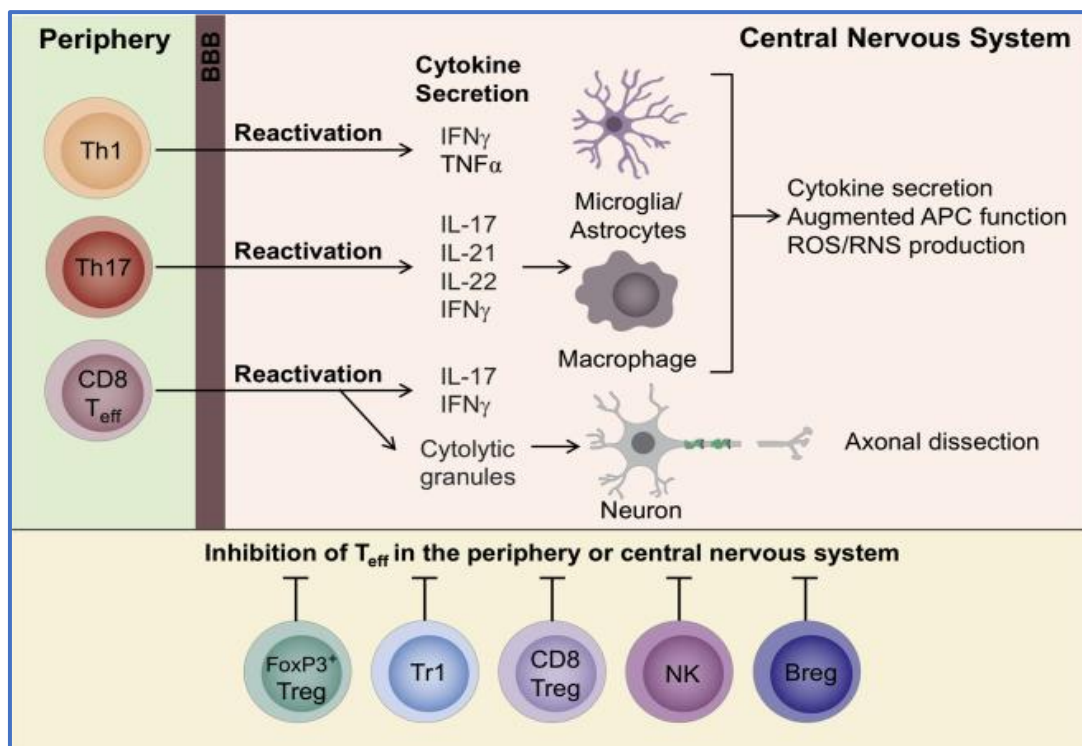


Figura 6: Células T efectoras en la EM. Las linfocitos T activados, cruzan la BBE y en el SNC se unen a las moléculas HLA donde se reactivan y comienzan a secretar citocinas para realizar sus funciones efectoras (Adaptado de Baecher-Allan C, 2018).

La respuesta inmune innata presente en el foco inflamatorio, representada principalmente por los linfocitos T CD8 citotóxicos, y los T γ y δ que no tienen restricción HLA, atacan directamente a los oligodendrocitos. Entre los mecanismos moleculares independientes de receptor involucrados en la muerte celular está el estrés oxidativo, mediado esencialmente por óxido nítrico; la excitotoxicidad mediada por glutamato; las proteasas-calpaína y el sistema perforina/granzima. Y entre los mecanismos dependientes de receptor se encuentran los mediados por receptores de muerte celular (miembros de la superfamilia de receptores del TNF), el CD95/ Fas, el TNF-R1 y DR3. En este último, hay estudios recientes en el que se han informado un aumento de los niveles de expresión genética de DR3 en pacientes con EM remitente-recurrente (EMRR) a través de su unión al ligando 1A del tipo TNF(TL1A) (Hagman S, 2015). Todos estos mecanismos conducen a la expresión anómala de las proteínas mielínicas, con apoptosis de los oligodendrocitos y, por tanto, la pérdida gradual de los mismos y como consecuencia, se produce la desmielinización (Basnyat P, 2019).

Por otra parte, la barrera hematoencefálica (BHE) restringe el intercambio de factores humorales así, como el paso de las células del sistema inmune desde la sangre al cerebro, siendo crucial en el mantenimiento de la homeostasis cerebral. Por lo tanto, un elemento clave para el daño inmunológico dentro del SNC durante la EM es el proceso por el cual estas células son capaces de acceder a este compartimiento especializado. La vía por la que puede ocurrir este proceso se debe a los cambios en las moléculas de adhesión del endotelio vascular (ICAM-1 y VCAM-1) por mediadores proinflamatorios que circulan por sangre, incluyendo el TNF y/o el lipopolisacárido (Wu GF, 2011). Este hecho produce la migración de células a través de las células endoteliales por LFA-1 y VLA-4. Estas integrinas son cruciales para la entrada de los linfocitos T y se utilizan como dianas terapéuticas para fármacos como Natalizumab (Polman CH, 2006; van Langelaar J, 2020). Por otro lado, las citoquinas y sus receptores, que median en la quimiotaxis, también contribuyen a la migración leucocitaria al SNC. Entre estas se encuentran el CXCL12, expresado constitucionalmente en el SNC. Esta citoquina se localiza en el lado baso lateral de la microvasculatura del SNC y tiene la función de retener a los leucocitos dentro del espacio perivascular. El CCR6 (receptor 6 de quimiocina) se ha demostrado su implicación en la entrada inicial de los leucocitos al SNC y es responsable de reclutar células T CD4 inflamatorias que expresan IL-17 (van Langelaar J, 2020).

1.3.3. Epigenética de la EM

La epigenética se define como el estudio de los mecanismos que cambian la regulación de la expresión génica sin modificar o alterar la secuencia de ADN.

Los principales mecanismos de regulación epigenética en la EM son la metilación del ADN, la modificación de las histonas y el silenciamiento de los miARN.

La metilación de residuos de citosina silencia los genes, posiblemente bloqueando la unión de factores transcripcionales. La acetilación de las histonas facilita la unión de los factores transcripcionales al ADN, al contrario que la desacetilación, que inhibe la transcripción, influyendo en el proceso inflamatorio. Los cambios epigenéticos pueden generarse también a nivel postranscripcional mediante microARN (miARN), que son ARNs no codificantes de una sola cadena que modulan la diferenciación celular, la proliferación y la apoptosis; su desregulación se ha asociado con autoinmunidad e inflamación (Mohamed MS, 2019; Mycko MP, 2020).

Estos procesos de regulación epigenéticos representan un mecanismo mediante el cual los factores ambientales, tales como el tabaco, los niveles de vitamina D y la exposición al virus Epstein-Barr, pueden influir en la expresión génica individual y, en consecuencia, sobre el proceso inflamatorio, la desmielinización y en la neurodegeneración que acompaña a la enfermedad.

La susceptibilidad genética más importante en la EM se relaciona con los genes del complejo mayor de histocompatibilidad, específicamente el haplotipo HLADRB1*1501, que con mayor frecuencia es transmitido por las madres y podría estar mediado por mecanismos epigenéticos como la metilación del ADN y la desacetilación de las histonas (Cuevas-García C, 2017).

También se ha visto que las regiones promotoras de los genes de IL-17 experimentan acetilación de las histonas e hipermetilación del ADN. Además, existe una regulación génica mediada por miARN. Los niveles de expresión miR-155 y miR-326 están estrechamente relacionados con la diferenciación de células TCD4 hacia el fenotipo Th17. Este conjunto de actuaciones modula la respuesta de los linfocitos T (Iridoy CF, 2017).

En cuanto la relación entre los cambios epigenéticos y la progresión de la EM, se ha evidenciado la contribución de las modificaciones del ADN y las histonas en la diferenciación alterada de oligodendrocitos, en los procesos de mielinización/ remielinización defectuosa y en la vulnerabilidad neuro-axonal sostenida, como los mecanismos principales en la progresión de la enfermedad. En recientes estudios en pacientes con EM de tipo progresivo, casi el 30 % de los genes alterados por patrones de metilación fueron informados en las células inmunitarias periféricas del tejido cerebral, con la consiguiente alteración de las funciones neuronales (Kular L, 2020).

1.4. Manifestaciones Clínicas

La evolución de la EM es extremadamente variable dado que las lesiones desmielinizantes pueden afectar a diferentes áreas a lo largo del SNC. La enfermedad se puede iniciar tanto de forma brusca como ir evolucionando progresivamente. El espectro de enfermedad incluye pacientes con menos afectación, que apenas presentan traducción clínica y que únicamente tienen evidencia de desmielinización en la imagen por RMN, y en contraste, pacientes severamente afectados con discapacidad.

Las manifestaciones clínicas más comunes incluyen síntomas sensoriales en las extremidades o en un lado de la cara, pérdida visual, debilidad motora aguda o subaguda, diplopía, alteraciones de la marcha y problemas de equilibrio, signo de Lhermitte, vértigo, problemas de vejiga, ataxia de extremidades, mielitis transversa aguda y dolor. La mayoría de los pacientes experimentan fatiga, siendo la principal causa de incapacidad laboral.

En la siguiente tabla se resumen los signos clínicos más frecuentes:

Tipo trastorno	Manifestaciones clínicas
Trastornos motores	La debilidad muscular es la más frecuente (normalmente acompañado de afectación piramidal como hiperreflexia y el reflejo cutaneoplantar extensor o signo de Babinski), monoparesia o paraparesia en extremidades inferiores. En estadios avanzados, síntomas en tronco encefálico (Martínez-Altarrriba MC, 2015; Martínez-Altarrriba MC, 2015b)
Trastornos sensitivos	Es la más común inicialmente. Síntomas como entumecimiento, hormigueo, pinchazos, opresión, frialdad o hinchazón de las extremidades o el tronco (Povedano B, 2019).
Otros trastornos neurológicos	Mielitis aguda, la cual es la primera manifestación en el 40% de los casos, con lesiones a nivel cervical o dorsal con predominancia de síntomas/signos sensitivos sobre motores (Povedano B, 2019)
Trastornos esfinterianos y sexuales	Muy frecuentes, se manifiestan como urgencia miccional, aumento en la frecuencia miccional o nicturia, retraso o dificultad para el vaciado, retención urinaria e incontinencia por rebosamiento (Yang C, 2013). En varones disfunción eréctil en el 75% de los casos. En mujeres puede aparecer pérdida de la libido, anorgasmia y disminución de la lubricación vaginal (Lew-Starowicz M, 2015).
Trastornos oculares	Neuritis óptica (pérdida visión unilateral progresiva acompañada de dolor retro ocular, con empeoramiento visual debido al ejercicio y el calor, conocido como fenómeno de Uthoff) (Triviño M, 2014). Nistagmo pendular adquirido por lesiones en el tronco del encéfalo o a ceguera por lesión del nervio óptico.
Trastornos cerebelosos y de la marcha	Movimientos descoordinados de las extremidades, inestabilidad postural y de la marcha, y disartria cerebelosa, disimetría, descomposición del movimiento e hipotonía sobre todo en extremidades superiores. En cuanto a trastornos de la marcha, se incluyen marcha espástica, marcha con ataxia sensitiva y la marcha cerebelosa.
Trastornos del sueño	Insomnio con dificultad para iniciar y mantener el sueño, debido al dolor (por Síndrome de Lhermitte, neuralgia del trigémino, espasmos musculares, etc.), nocturia, síndromes psiquiátricos o por los efectos adversos de los medicamentos utilizados.
Trastornos neuropsiquiátricos y neuropsicológicos	Sintomatología depresiva, ansiedad (debido al dolor, la fatiga, el abuso de sustancias y el deterioro cognitivo). También menos frecuentes trastornos bipolares y síntomas psicóticos. Deterioro cognitivo (factor determinante en calidad de vida. Afecta a la memoria reciente, la atención mantenida, la fluencia verbal, el razonamiento abstracto, la percepción visoespacial y la velocidad de procesamiento información (Chiaravalloti N, 2008).

Tabla 2: Manifestaciones clínicas más frecuentes de la EM.

1.4.1. Curso Clínico de la EM

La EM presenta varios subtipos de perfiles clínicos y evolutivos de la enfermedad que se clasifican según la presencia de brotes o recaídas con o sin empeoramiento de la discapacidad y en la progresión constante de la discapacidad independiente de las recaídas (Lublin FD, 2014) (Koch-Henriksen N, 2019). Según estos mecanismos, nos encontramos con el subtipo recurrente-remitente y los subtipos progresivos primario y secundario (Lublin FD, 2014). Estos últimos a su vez, pueden encontrarse de forma activa o inactiva.

Patrones de evolución que van a marcar el curso de la enfermedad:

➤ **Síndrome clínicamente aislado (SNA)**: Representa el primer ataque clínico sugestivo de EM. También se le considera como parte del fenotipo de EM recurrente remitente. Se puede manifestar como una mielitis transversa parcial, como un síndrome del tronco encefálico/cerebeloso, una neuritis óptica unilateral o una diplopía indolora, entre otras manifestaciones (Brownlee WJ, 2017). La mayoría de los pacientes muestra características sugestivas de desmielinización inflamatoria y, al igual que otros ataques de EM, se espera que el episodio presente una duración de al menos 24 horas (Lublin FD, 2014; Klineova S, 2018). La mediana del tiempo estimado hasta que se produce un segundo ataque desmielinizante, que lleva a la conversión a EMCD, es de 2 años, aunque en algunos casos benignos, el intervalo entre el primer y segundo ataque puede ser de hasta 34 años (Scalfari A, 2010). La EM comienza como un SNA en aproximadamente el 85% de los pacientes, aunque gracias a la actualización de los criterios de McDonald en 2017 se han ampliado las condiciones para cumplir con los criterios de difusión en el tiempo, incrementando así la sensibilidad para el diagnóstico de EM, lo que se traduce en que la mayoría de las veces la EM se diagnostica después del primer episodio clínico, sin necesidad de adquirir más información (Calabrese M, 2021; López-Gómez J, 2021).

➤ **EM remitente-recurrente (EMRR)**: Es la forma más frecuente (aproximadamente un 85% de los casos). Requiere la presencia de múltiples eventos clínicamente distintos y claramente definidos que afectan a diferentes partes del SNC separadas en el tiempo (Kantarci OH, 2019). Hay una progresión escalonada y controlada de la enfermedad entre los periodos de recaída. Las recaídas o brotes pueden presentarse como cualquiera de las manifestaciones clínicas típicas de la EM, teniendo una duración variable de días a incluso semanas. La edad media de comienzo de los síntomas es de 28 años, siendo más frecuente en mujeres que en hombres en una relación 2:1 generalmente (Povedano B, 2019).

La magnitud de la patología inflamatoria y la frecuencia de las recaídas, más prominentes durante la edad adulta joven, disminuye con la enfermedad avanzada y la edad (Klineova S, 2018).

➤ EM secundaria progresiva (EMSP): Se caracteriza por un curso inicial de EM remitente-recurrente, en la que con el paso del tiempo, generalmente de 10 a 20 años después del inicio de la enfermedad, se va instaurando afectación mielínica permanente y deterioro continuo (Povedano B, 2019; Martínez-Altarriba MC, 2015b). Durante esta fase, los pacientes pueden seguir teniendo enfermedad activa con recaídas sintomáticas o actividad asintomática por RMN. En la mayoría de los contextos clínicos, la EMSP es diagnosticada retrospectivamente por una historia clínica de empeoramiento gradual (Lublin FD, 2014).

➤ EM primaria progresiva (EMPP): Representa el 10-15% de los pacientes con EM. La edad promedio de inicio es de aproximadamente 40 años y ocurre con una frecuencia relativamente similar entre hombres y mujeres. La presentación clínica más común es un síndrome de la médula espinal que empeora durante meses o años con paraparesia espástica asimétrica y sin nivel sensorial claro. Según la nueva clasificación, las formas progresivas de la enfermedad (EMSP y EMPP) son activas o inactivas, con o sin progresión de la discapacidad (Povedano B, 2019; Rice CM, 2013).

El Síndrome radiológico aislado (RIS) no se considera un subtipo de curso clínico. Se caracteriza por hallazgos en imágenes que sugieren desmielinización inflamatoria en ausencia de una desmielinización clínica, signos o síntomas; aunque conlleva un mayor riesgo de que se produzcan en el futuro síntomas clínicos de EM. Los resultados de la RMN pueden ser inespecíficos. Un paciente con RIS, sin signos clínicos obvios o síntomas que sugieran EM, debe ser seguido de forma prospectiva (Lublin FD, 2014).

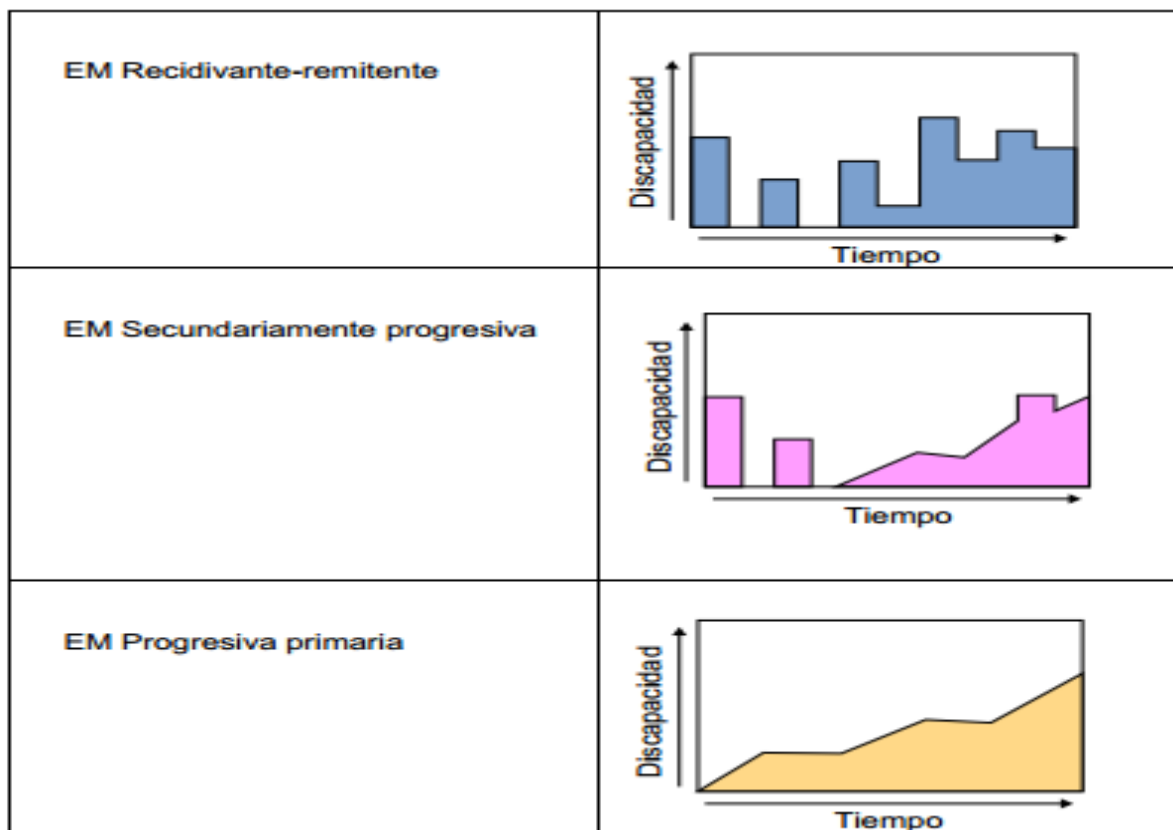


Figura 7: Variantes en la evolución de la EM (Adaptado de Martínez-Altarríba MC, 2015b)

1.4.2. Aumento de la discapacidad subyacente en EMRR: Eventos RAW y PIRA

Los pacientes con fenotipo recurrente-remitente presentan un inicio de la enfermedad en el que el empeoramiento neurológico se produce principalmente por el aumento de las recaídas, disminuyendo en los periodos entre brotes y el uso de los tratamientos actuales. Pero independientemente de estos factores, actualmente se ha determinado que el paciente puede experimentar un aumento de la discapacidad de la enfermedad que va incrementándose lentamente con el tiempo, lo que evidencia un deterioro neurológico inevitable y constante (Cree BA, 2019; Kappos L, 2018).

Los términos RAW y PIRA se asocian a este empeoramiento latente, que puede ser asociado a la recaída clínica (RAW, del inglés *Relapse-Associated Worsening*) o independiente de la actividad de la recaída (PIRA, del inglés *Progression Independent of Relapse Activity*) (Kappos L, 2020).

RAW: Empeoramiento asociado a brotes. Se habla de este término cuando hay un deterioro por parte del paciente debido a la recuperación incompleta de un brote. El papel de RAW (mayor o menor grado de discapacidad) es diferente en los distintos estadios de la enfermedad siendo de gran importancia en las fases iniciales (Chen B, 2022) se define como un aumento de la discapacidad, medido por EDSS de 3 o 6 meses, con un inicio dentro de los 90 días desde el inicio de una recaída registrada. Para que se considere que un paciente presenta RAW, los incrementos de EDSS por UN BROTE deben ser según EDSS basal:

-EDSS 0: $\geq 1,5p$.

-EDSS 1-5: $\geq 1p$.

-EDSS $\geq 5,5$: $\geq 0,5p$.

Siempre que sea por un brote dentro de 90 días desde la evaluación de la EDSS se debe confirmar el valor tras al menos 6 meses. Si tras 6 meses vuelve a mejorar, se sigue considerando un valor positivo (Lublin FD, 2022)

PIRA: Progresión independiente de la actividad de los brotes. Este concepto se encuentra cada vez más extendido y diferentes estudios avalan que la discapacidad global del paciente se produce independientemente de los brotes (Kappos L, 2020). Se considera PIRA incrementos de EDSS en ausencia de brote según EDSS basal:

-EDSS 0: $\geq 1,5p$.

-EDSS 1-5: $\geq 1p$.

-EDSS $\geq 5,5$: $\geq 0,5$ p.

Siempre que no haya un brote en los 90 días previos a la evaluación EDSS.

Se debe confirmar el valor tras al menos 6 meses. Si durante los 6 meses para confirmar el valor ocurre un brote (con/sin RAW), se debe reiniciar el conteaje con un nuevo empeoramiento sin brote de >90 días y confirmado tras otros 6 meses (Lublin FD, 2022).

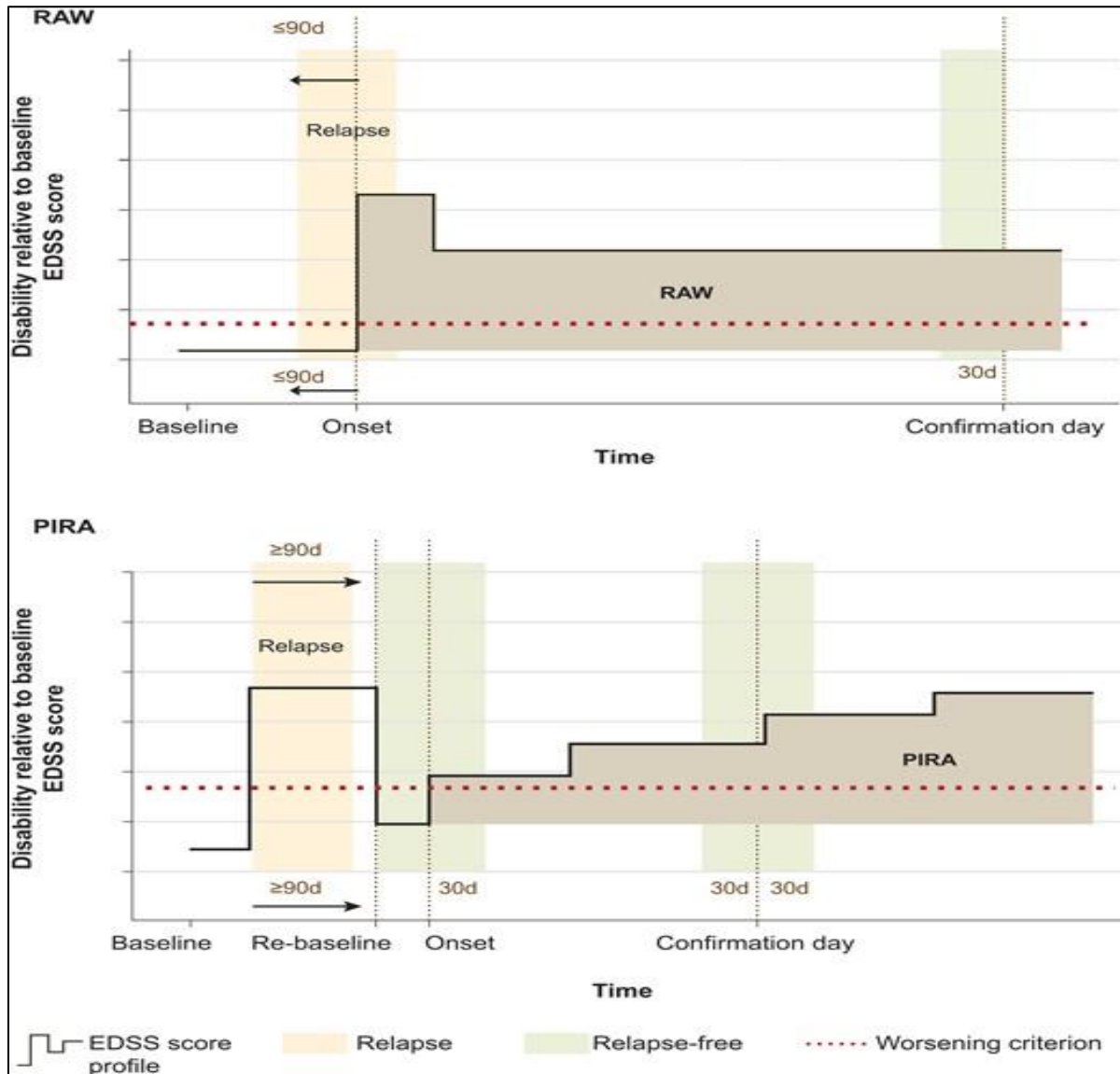


Figura 8: Definición de eventos RAW y PIRA. La línea roja de puntos indica el umbral de empeoramiento de EDSS. La discapacidad se define como el aumento clínicamente significativo de la EDSS por encima del umbral. El inicio de un evento RAW debe ocurrir ≤ 90 días desde la fecha de inicio de la recaída más reciente. Para eventos PIRA, el inicio debe ocurrir > 90 días desde el inicio de la recaída más reciente (Adaptado de Lublin FD, 2022).

1.4.3. Evolución y Pronóstico de la Enfermedad

Con la EM se han asociado múltiples factores y/o marcadores pronósticos, que pueden ser indicios de la evolución del paciente o posibles predictores de futuras exacerbaciones de la enfermedad. Entre estos factores se encuentra:

- Curso progresivo: Se asocia a un peor pronóstico de la enfermedad con respecto a las formas recurrentes (suele progresar de media 0,5 puntos en la escala EDSS por año). El curso recurrente puede desencadenar un curso progresivo secundario. El empeoramiento a largo plazo es frecuente en los pacientes con EMRR que tras años variables de enfermedad pasan a presentar este curso progresivo. Este empeoramiento puede ser en gran medida independiente de la actividad de las recaídas y se asocia a una atrofia cerebral acelerada, siendo definida como una “progresión silenciosa” en estos pacientes (Cree AC, 2019).
- Curso clínico y marcadores de RMN: La afectación de más de un sistema funcional en el primer brote se ha asociado con un mayor riesgo de progresión de la discapacidad. También se ha descrito que cuando el tiempo de recuperación del primer brote es en menor a un mes, indicaría un pronóstico más favorable (Povedano B, 2019).

En cuanto a los marcadores de RMN en pacientes con EM, el estudio ponderado en T1 con gadolinio evidencia lesiones agudas, y el ponderado en T2 evidencia preferentemente lesiones crónicas. Los principales marcadores de RMN de la actividad y patología de la EM son la carga lesional y la atrofia cerebral. Aunque no se evalúa habitualmente en la práctica clínica, la atrofia de la médula espinal también se asocia con discapacidad (Lukas C, 2015).

- Datos demográficos: La edad, el sexo y la etnia pueden asociarse a un mejor o peor pronóstico de la enfermedad. La aparición de EM a edades tempranas tiene un pronóstico favorable en comparación con la aparición a edades más avanzadas (a partir de 40 años). El sexo masculino se asocia con un peor pronóstico, una progresión más rápida, ya que suelen alcanzar una EDSS de 8 en menor tiempo y a una edad más temprana que las mujeres, y también a una mayor afectación cerebelosa, deterioro cognitivo, atrofia de la sustancia gris y lesiones (Ysrraelit MC, 2019). En cuanto a la etnia, se ha observado una mayor incidencia de la enfermedad en la raza caucásica (Cree AC, 2004).

- Marcadores bioquímicos: La presencia de bandas de IgM lípido-específicas es un factor de mal pronóstico de EM. Estas bandas están dirigidas contra los lípidos de la mielina. Se ha observado que los pacientes con presencia de bandas de IgM lípido-específicas sufrieron un

mayor número de recaídas, una mayor discapacidad y una segunda recaída antes que aquellos que pacientes que no presentaban dichas bandas (Villar LM, 2005).

Buen pronóstico	Mal pronóstico
Edad temprana de inicio	Edad tardía al inicio (por encima de los 40 años)
Sexo femenino	Sexo masculino
Inicio monosintomático	Inicio polisintomático
Presentación con NO o sintomatología sensitiva	Presentación motora, cerebelosa, esfinteriana
Recuperación completa tras el primer brote	Recuperación incompleta tras primer brote
Brote de corta duración	Brote con clínica prolongada
Largo intervalo de tiempo entre los dos primeros brotes	Corto intervalo de tiempo entre los dos primeros brotes
Pocos brotes en los 5 primeros años (especialmente durante los 2 primeros años)	Elevado número de brotes en los 5 primeros años (especialmente durante los 2 primeros años)
No alcanzar discapacidad moderada durante el primer año (según escala EDSS)	Alcanzar discapacidad moderada durante el primer año (EDSS 4)
Inicio como forma remitente recurrente	Inicio como forma primaria progresiva
EDSS: <i>expanded disability status scale</i> ; EM: <i>esclerosis múltiple</i> ; NO: <i>neuritis óptica</i> .	

Tabla 3: Resumen de los factores clínicos que influyen en el pronóstico de la EM (Adaptado de Povedano B, 2019).

Situaciones especiales

El Embarazo durante el curso de la enfermedad parece tener un efecto protector contra las recaídas de la EM, sobre todo en el tercer trimestre, pero existe un mayor riesgo de exacerbación de la enfermedad en el período posparto temprano (Confavreux C, 1998) (Hughes SE, 2014). La evidencia disponible sugiere que la EM materna se asocia con una tasa moderadamente mayor de parto por cesárea y menores pesos al nacer (Kelly VM, 2009). En cuanto a las técnicas de reproducción asistida, los resultados de un estudio indican un aumento significativo de la actividad de la enfermedad, tanto clínica como radiológica, durante los meses posteriores (Hellwig K, 2013; Bove R, 2020).

Otro factor interesante es la lactancia materna, porque en algunos estudios se ha visto su relación con una reducción del riesgo de recaídas de la EM después del parto (Langer-Gould A, 2017). Sin embargo, la consideración de ser un factor protector es controvertida, dada la necesidad de un inicio farmacológico con el fin de evitar recaídas (Vukusic S, 2004).

1.4.4. Escalas Clínicas de Valoración de la Discapacidad Neurológica

Para poder establecer una evolución objetiva de la enfermedad existen distintas escalas clínicas de valoración de la discapacidad neurológica. La más usada actualmente es la Escala Expandida del Estado de Discapacidad (*Expanded Disability Status Scale, EDSS*), desarrollada por Kurtzke (Kurtzke JF, 1983). La escala divide las manifestaciones clínicas en 8 sistemas funcionales: Función piramidal, función cerebelosa, función del tronco cerebral, función sensitiva, función visual, función intestinal y vesical, función cerebral (cognitiva) y otras funciones.

Esta escala puntúa la disfunción de 0 (exploración normal) a 10 (muerte por EM), con intervalos de 0,5 puntos a partir de 1. La puntuación se obtiene de la valoración cuantitativa de las alteraciones presentes en los diferentes sistemas funcionales neurológicos establecidos en la escala.

Escala ampliada del estado de discapacidad (EDSS)	
0	Exploración neurológica normal (todos los SF tienen grado 0; en las funciones mentales se acepta el grado 1)
1,0	Sin discapacidad. Signos mínimos en un SF (grado 1 en cualquier SF, exceptuando funciones mentales)
1,5	Sin discapacidad. Signos mínimos en más de un SF (más de un SF grado 1, exceptuando funciones mentales)
2,0	Discapacidad mínima en un SF (un SF grado 2, el resto con grado 0 o 1)
2,5	Discapacidad mínima en dos SF (dos SF grado 2, el resto con grado 0 o 1)
3,0	Paciente completamente ambulante. Discapacidad moderada en un SF (un SF grado 3, el resto con grado 0 o 1) o discapacidad leve en tres o cuatro SF (tres o cuatro SF grado 2, y grado 0 o 1 en el resto)
3,5	Paciente completamente ambulante, pero con discapacidad moderada. Un SF grado 3 y uno o dos SF grado 2, o dos SF grado 3, o cinco SF grado 2, con 0 o 1 en el resto
4,0	Completamente ambulante sin ayuda, independiente más de 12 horas al día a pesar de sufrir una discapacidad grave. Un SF grado 4 (con grado 0 o 1 en el resto), o combinaciones de grados menores que excedan los EDSS anteriores. Puede caminar sin ayuda o descanso unos 500 metros
4,5	Completamente ambulante sin ayuda y autosuficiente durante la mayor parte del día. Puede trabajar una jornada completa, aunque tiene alguna limitación o necesita una ayuda mínima. Discapacidad relativamente grave. Un SF grado 4 (con grado 0 o 1 en el resto), o combinaciones de grados menores que excedan los EDSS anteriores. Puede caminar sin ayuda o descanso 300 metros
5,0	Camina sin ayuda o descanso unos 200 metros. Discapacidad grave que dificulta el desarrollo de todas las actividades diarias. Grado 5 en un SF (con grado 0 o 1 en el resto), o combinaciones de grados menores que suelen superar las especificaciones del punto 4,0
5,5	Camina sin ayuda o descanso unos 100 metros. Discapacidad grave que imposibilita el desarrollo de todas las actividades diarias. Grado 5 en un SF (con grado 0 o 1 en el resto), o combinaciones de grados menores que suelen superar a los del punto 4,0
6,0	Necesita apoyo (bastón o muleta) intermitente o constante unilateral para caminar 100 metros con o sin descanso. La combinación de SF tiene más de dos SF grado 3
6,5	Necesita apoyo bilateral (bastones o muletas) constante para andar 20 metros sin descanso. La combinación de SF tiene más de dos SF grado 3
7,0	No puede andar más de 5 metros incluso con ayuda, está en silla de ruedas casi permanentemente. Utiliza una silla normal, es capaz de desplazarse el solo y de levantarse de ella. Suele estar en la silla más de 12 horas al día. Combinaciones de más de un grado 4 en los SF. Excepcionalmente es un grado 5 de la función piramidal únicamente
7,5	Está en silla de ruedas permanentemente, necesita ayuda para trasladarse a la silla. Capaz de desplazarse solo en la silla, pero no puede utilizar una silla normal durante todo el día; puede necesitar una silla con motor. Combinaciones de más de un grado 4 en los SF
8,0	Actividad limitada a la cama o sentado, puede usar una silla de ruedas para desplazarse. Puede estar fuera de la cama gran parte del día. Conserva en gran parte su cuidado personal. Generalmente mantiene la funcionalidad de sus brazos. Combinaciones de grado 4 en varios SF
8,5	Pasa la mayor parte del día en la cama. Conserva algunas funciones de cuidado personal. Generalmente mantiene parcialmente la funcionalidad de sus brazos. Combinaciones de grado 4 en varios sistemas
9,0	Paciente encamado. Es absolutamente dependiente. Puede comunicarse y comer. Combinaciones de grado 4 en la mayor parte de los SF
9,5	Paciente encamado. Es absolutamente dependiente. No puede comunicarse, comer ni tragar. Combinaciones de grado 4 en casi todos los SF
10	Muerte debida a EM

Tabla 4: Escala ampliada del estado de discapacidad (EDSS) (Adaptado de Povedano B, 2019).

Otra escala utilizada es la Escala Funcional Compuesta de EM (MSFC, del inglés *Múltiple Sclerosis Functional Composite Scale*) (Tiftikçioğlu Bİ, 2018). Las escalas clínicas tradicionales,

como la EDSS, son inadecuadas para evaluar de las dimensiones clínicas clave de la EM, como es la función cognitiva, y además presentan limitaciones psicométricas. Basado en análisis de datos agrupados de estudios de historia natural y de grupos de placebo en ensayos clínicos se propuso esta escala como una nueva medida de resultado clínico multidimensional. El MSFC comprende medidas funcionales cuantitativas de tres dimensiones clínicas clave de la EM: función de la pierna/deambulaci3n, funci3n del brazo/mano y funci3n cognitiva (Fischer JS, 1999).

La puntuaci3n en esta escala se calcula sumando las puntuaciones Z que el paciente obtiene en tres test estandarizados, que son:

1. Test T25W o tiempo para caminar 25 pasos (del ingl3s *Timed 25-foot walk*), mide el tiempo que tarda el paciente en recorrer 7,5 metros y constituye una medida simple y 3til de la motilidad.
2. 9HPT o test de los nueve palitos en su agujero (del ingl3s *Nine Hole Peg Test*) que mide el tiempo para introducir y retirar 9 palitos de una caja con 9 agujeros, midiendo la destreza manual y siendo por tanto una 3til medida cuantitativa de la funci3n de la extremidad superior.
3. PASAT-3 o test de 3 segundos de audici3n seriada en pasos (del ingl3s *Paced Auditory Serial Addition Test*) que consiste en una lista de n3meros estandarizada y presentada de forma seriada cada 3 segundos (Fischer JS, 1999). Con este test se eval3a la funci3n cognitiva en base a la velocidad y flexibilidad del procesamiento de la informaci3n auditiva, as3 como la capacidad de c3lculo del paciente.

Gracias a estas escalas, el cl3nico puede valorar el trascurso de la enfermedad y establecer el momento en el que la enfermedad cursa a una forma progresiva.

1.5. Diagnóstico de la EM

El diagnóstico de la EM es principalmente clínico. La evaluación de la EM comienza con una historia clínica detallada (anamnesis). Se debe sospechar en un paciente cuando el cuadro clínico es sugestivo de una desmielinización focal o multifocal del sistema nervioso central y mediante el examen clínico, el cual puede revelar hallazgos consistentes de eventos desmielinizantes previos o actuales en dicho sistema. Entre estos hallazgos o primeros cuadros clínicos se incluye, la neuritis óptica, anomalías del movimiento ocular, signos de neurona motora superior, ataxia, alteración de la marcha, pérdida hemisensorial o pérdida sensorial bilateral y/o parestesia en extremidades debido a una lesión de la médula espinal.

La presentación inicial de la EM varía según la ubicación de las lesiones y el tipo de inicio de los síntomas (Brownlee WJ, 2017). La forma de inicio (brote) es aguda, en horas o días, seguida de una recuperación gradual en semanas o meses que puede ser completa o parcial. Algunas características clínicas son típicas de EM, pero esta enfermedad es altamente variable y puede presentar formas atípicas, como las formas progresivas remitentes (Hernández J, 2019).

Si este brote es el primer episodio se considera un síndrome neurológico aislado, y aunque en un principio no cumpla los criterios diagnósticos, puede predisponer a una EM claramente definida. En cambio, cuando se manifiesta la EMPP, se observa un comienzo caracterizado por una progresión lenta de los síntomas, la mayoría de las veces una paraparesia asimétrica que evoluciona a lo largo de meses o años, o menos comúnmente, una hemiparesia progresiva o ataxia cerebelosa o un fallo visual o demencia (Brownlee WJ, 2017).

Las principales técnicas diagnósticas son:

- La RMN: Es la técnica más sensible para demostrar las lesiones desmielinizantes del SNC, pudiendo apoyar el diagnóstico de EM en un paciente con un primer brote clínico (SNA) si cumple los criterios específicos de RMN de McDonald de diseminación en tiempo y espacio 2017 (Thompson AJ, 2018).

Estas lesiones o placas en el SNC generalmente se encuentran en áreas específicas de la materia blanca, como las regiones periventricular y yuxtacortical, el cuerpo calloso, las regiones infratentoriales (particularmente la protuberancia y el cerebelo) y la médula espinal

(preferiblemente en el segmento cervical). Las placas suelen ser redondeadas u ovoides y son perpendiculares al cuerpo caloso (dedos de Dawson) en imágenes sagitales de RM cerebral (Polman CH, 2011; Horowitz AL, 1989). A nivel medular, las lesiones suelen ser focales, de un tamaño menor de 2 cuerpos vertebrales, ocupando parcialmente la médula en cortes transversales (Tartaglino LM, 1995). La captación de contraste con gadolinio es indicativa de inflamación activa. Las lesiones hipointensas en T1 (agujeros negros) expresan desmielinización y daño axonal (van Walderveen MA, 1999).

Las lesiones longitudinales extensas de la médula espinal, particularmente aquellas que exceden los tres segmentos de la columna vertebral y que involucran principalmente al cordón central en secciones de MRI axiales, son sugestivas de neuromielitis óptica (NMO) o enfermedad del espectro NMO (Fernández O, 2019). Por lo que la RMN sirve como diagnóstico de otras enfermedades neurológicas que también presentan lesiones cerebrales. Las lesiones agudas de la EM tienden a ser más grandes que las lesiones crónicas en la RM y tienen márgenes algo mal definidos. A medida que se resuelven, se vuelven más pequeños con márgenes más nítidos debido a la reducción del edema y la inflamación presentes en el momento de la formación aguda de la placa, dejando solo áreas residuales de desmielinización, gliosis y espacio extracelular agrandado con remisión (Guarnizo A, 2016).



Figura 9: Imágenes de la RM donde se aprecian áreas de desmielinización (Adaptado de (Martinez-Altarriba MC, 2015b).

Según los últimos criterios de McDonald 2017, la diseminación en el espacio requiere, como mínimo, una lesión de alta señal en secuencias ponderadas en T2, en al menos dos de las cuatro topografías características: la sustancia blanca periventricular, la sustancia blanca

yuxtacortical, el tejido nervioso infratentorial (tallo o cerebelo) y la médula espinal. Mientras que la diseminación en el tiempo puede diagnosticarse en una sola RMN que muestre lesiones sin reforzamiento y otras que realzan con gadolinio (Thompson AJ, 2018).

- Potenciales evocados: Son los impulsos eléctricos del SNC generados por la estimulación periférica de un órgano sensorial. Las tres pruebas de potencial evocado empleadas con mayor frecuencia son potenciales evocados somatosensoriales, respuestas evocadas visuales y potenciales evocados auditivos del tronco encefálico. Informan sobre el correcto funcionamiento de las vías sensoriales visual, auditiva y somatosensitiva, así como de las motoras. Su utilidad radica en descubrir lesiones subclínicas o silentes en el SNC que todavía no han provocado manifestación clínica (Hernández C., 2019).

- Tomografía de coherencia óptica: Se realiza a través de ondas de luz infrarroja que se reflejan en la microestructura interna de los tejidos biológicos para producir imágenes basadas en la reflectividad óptica diferencial. Es una forma no invasiva de obtener imágenes de la retina en alta resolución. Se puede usar para medir el grosor de la capa de fibra nerviosa de la retina, que se reduce en la mayoría de los pacientes con neuritis óptica (Kallenbach K, 2007).

1.5.1. Diagnóstico Diferencial

El abanico de enfermedades que deben excluirse para hacer un diagnóstico de EM es amplio. El diagnóstico diferencial de la EM incluye una serie de trastornos inflamatorios, vasculares, infecciosos, genéticos, granulomatosos y otros desmielinizantes. Si bien muchos de los trastornos potenciales que pueden simular la EM en la práctica clínica habitual son extremadamente raros o están asociados con características diagnósticas distintivas específicas, algunos trastornos desmielinizantes inflamatorios del SNC pueden ser particularmente difíciles de distinguir de la EM, especialmente durante la presentación inicial (Eckstein C, 2012).

Dentro de las claves para el diagnóstico diferencial en la EM, se encuentran los hallazgos por RMN cerebral y/o medular y el estudio del líquido cefalorraquídeo (Brownlee WJ, 2017).

Las principales patologías que se deben tener en cuenta como diagnóstico diferencial ante la sospecha de lesiones desmielinizantes del SNC son las siguientes (Hernández J, 2019; Aguilar-Juárez PA, 2019):

- Encefalomiелitis aguda diseminada (ADEM).
- La neuromielitis óptica.
- Enfermedades reumatológicas (Lupus eritematoso sistémico, síndrome de Sjögren, enfermedad de Behçet o síndrome de Susac).
- Enfermedades vasculares de pequeño vaso.
- Enfermedades infecciosas (neurosífilis, el virus de inmunodeficiencia humana (HIV), el virus linfotropo humano de células T tipo 1 (HTLV-1) o la leucoencefalopatía multifocal progresiva).
- Trastornos metabólicos (como la deficiencia de vitamina B12).
- Enfermedades neoplásicas.
- Enfermedades hereditarias (como encefalomiopatías mitocondriales como MELAS, MERRF, y el síndrome de Kearns Sayre, la enfermedad de Fabry y las leucodistrofias hereditarias) (Brownlee WJ, 2017).

Entre las patologías que pueden ser causa de mayor duda diagnóstica respecto a la EM está la neuromielitis óptica y su espectro de trastornos clínicos asociados (NMOSD, del inglés *Neuromyelitis optica spectrum disorder*). Sin embargo, este espectro de enfermedades presenta unas características clínicas, radiológicas e inmunológicas que permiten hacer un diagnóstico diferencial más claro. La NMOSD se asocia frecuentemente con anticuerpos que se dirigen a la acuaporina-4 (AQP4), el canal de agua más abundante en el SNC, ubicado en los procesos astrocíticos en la barrera hematoencefálica. Por otro lado, existe otro fenotipo con anticuerpos antiglicoproteína de mielina de oligodendrocitos o síndrome anti-MOG, que resultan del daño a la glicoproteína oligodendrocitaria de mielina (MOG), expresado en superficies de oligodendrocitos y vainas de mielina (Lana-Peixoto MA, 2019). La detección de estos anticuerpos y un resultado negativo en la determinación de las bandas oligoclonales de IgG confirmaría el diagnóstico de NMOSD o enfermedad por anti-MOG frente a EM (Meng H, 2017).

1.5.2. Criterios Diagnósticos

Los primeros criterios utilizados para el diagnóstico de EM fueron los criterios de Schumacher en 1965, los cuales estaban limitados a pacientes entre 10 a 50 años. Posteriormente le

sucedieron los criterios de Poser en 1983, gracias a la incorporación de nuevas técnicas diagnósticas de neuroimagen, neurofisiología y estudio de LCR (Poser CM, 1983). En estos criterios se recomendó que el diagnóstico de EM fuese realizado únicamente por un neurólogo competente y que debían considerarse otras enfermedades capaces de producir signos y síntomas de lesiones múltiples en el SNC. Una progresión lenta desde el comienzo sin evidencia de exacerbaciones o remisiones y sin evidencia paraclínica de una lesión en otra parte del SNC no debía clasificarse como EM, aún en presencia de BOC de IgG (BOCG) o aumento de IgG en el LCR.

Sin embargo, no todos los pacientes entraban en la clasificación de Poser puesto que los que debutan con clínica progresiva no se podían evaluar. No es hasta el año 2000 en que Thompson y colaboradores abordan los criterios de EM primaria progresiva estableciendo que la progresión clínica debe ser de al menos un año y estableciendo 3 niveles de certeza diagnóstica, basados en los hallazgos de LCR, RM y Potenciales evocados visuales.

Esclerosis múltiple clínicamente definida.	2 brotes y evidencia clínica de dos lesiones separadas
Esclerosis múltiple clínicamente definida con apoyo de laboratorio	2 brotes, evidencia clínica de una lesión y paraclínica de otra lesión separada (CT, Potenciales evocados).
Esclerosis múltiple clínicamente probable.	2 brotes y evidencia clínica de una lesión.
Esclerosis múltiple probable con apoyo de laboratorio.	

Tabla 5: Criterios diagnósticos de Poser (Adaptado de Poser CM, 1983).

Actualmente los criterios clínicos más utilizados son los criterios diagnósticos de McDonald. En 2001, Ian McDonald partió de las recomendaciones de Poser y las modificó, creando unos nuevos criterios (McDonald WI, 2001).

Los primeros criterios de McDonald del 2001 definían la diseminación de lesiones en el espacio, siempre que se cumplieran al menos tres de los cuatro criterios de Barkhof-Tintoré (BTC) o por la presencia de al menos dos lesiones en RM junto con la cuantificación de síntesis intratecal de inmunoglobulina G en el LCR del paciente (McDonald WI, 2001).

Los criterios de BTC incluyen los siguientes hallazgos (Barkhof F, 1997)(Tintoré M, 2001):

- Lesión que se realza con gadolinio (al menos 1 lesión) o lesiones en T2 (9 o más lesiones).
- Lesión en localización infratentorial (al menos 1 lesión).
- Lesión en localización yuxtacortical (al menos 1 lesión).
- Lesión en localización periventricular (al menos 3 lesiones).

Posteriormente estos criterios se han ido actualizando en 2005, 2010 y la última revisión fue realizada en 2017 (Polman CH, 2005; Polman CH, 2011; Thompson AJ, 2018).

En estos criterios se define un brote como un episodio de alteraciones neurológicas sugestivas de EM que dura más de 24 horas. Para definir un segundo brote tiene que pasar un mes o más desde el anterior (Martinez-Altarriba MC, 2015b). Las lesiones de la EM afectan la sustancia blanca periventricular predominantemente, pero también el cuerpo caloso, las fibras en U, los lóbulos temporales, el tallo cerebral, el cerebelo y la médula espinal. Estas lesiones suelen ser redondeadas o de forma ovoide y con sentido perpendicular al sistema ventricular (MAGNIMS) y las lesiones de la médula espinal son habitualmente laterales o posteriores, no abarcan más de dos cuerpos vertebrales y debe haber diseminación en tiempo y en espacio. Se habla de diseminación en espacio cuando se encuentran dos o más lesiones (síntomas o asintomáticas) en al menos dos de cuatro localizaciones del sistema nervioso central: yuxtacortical, periventricular, infratentorial y médula espinal. Con una sola RMN que muestre lesiones sin reforzamiento y otras que refuerzan al gadolinio puede diagnosticarse diseminación en tiempo (Aguilar-Juárez PA, 2019).

La revisión de los nuevos criterios diagnósticos de McDonald 2017 apoya el valor de incluir las bandas oligoclonales en el diagnóstico de EM en pacientes que cumplían criterios de diseminación en el espacio (Thompson AJ, 2018). Los criterios de RM MAGNIMS 2016 recomiendan para establecer diseminación en el espacio, el recuento de al menos tres lesiones periventriculares, la afectación del nervio óptico, y el recuento de las lesiones yuxtacorticales y corticales; son criterios fáciles de implementar y aumentan la capacidad diagnóstica si se tienen en cuenta las lesiones sintomáticas y asintomáticas. La inclusión de tres lesiones periventriculares frente a una sola lesión reduce la sensibilidad e incrementa la especificidad del diagnóstico de EM, aunque finalmente en los criterios diagnósticos de McDonald de 2017 se aceptó la diseminación en el espacio con una lesión periventricular, si existía otra cortical o yuxtacortical, infratentorial o espinal.

CRITERIOS DIAGNÓSTICOS DE EM SEGÚN McDonald 2017	
DISEMINACIÓN EN ESPACIO (DE)	
La DE se define como el desarrollo de nuevas lesiones en distintas localizaciones anatómicas dentro del SNC, indicando un proceso multifocal.	<p>Se cumplirán criterios de DE si presenta uno de los siguientes:</p> <ul style="list-style-type: none"> ➤ Una o más lesiones hiperintensas en T2 características de EM en RMN en al menos 2 de las 4 regiones cerebrales típicas de EM: periventricular, cortical o yuxtacortical o infratentorial o médula espinal. ➤ Un brote adicional característico de EM en un sitio diferente del SNC.
DISEMINACIÓN EN TIEMPO (DT)	
La DT requiere el desarrollo de nuevas lesiones en SNC en el tiempo.	<p>Los criterios DT se cumplirán si uno de los siguientes está presente en un paciente con SNA o un brote típico:</p> <ul style="list-style-type: none"> ➤ Desarrollo de un nuevo brote clínico adicional ➤ Presencia simultánea en RMN cerebral y/o medular de lesiones captantes y no captantes de gadolinio en cualquier momento ➤ Una nueva lesión hiperintensa T2 y/o lesión captante de gadolinio en nueva RMN control ➤ Demostración en LCR de bandas oligoclonales
EM CON INICIO PROGRESIVO (EMPP)	
Inicio de discapacidad progresiva durante al menos un año determinado de forma retrospectiva o prospectiva, independiente de recaídas clínicas	<p>Al menos dos de los siguientes criterios:</p> <ul style="list-style-type: none"> ➤ Presencia de una o más lesiones hiperintensas en T2 típicas de EM en una o más de las siguientes regiones cerebrales: periventricular, cortical o yuxtacortical o infratentorial. ➤ Dos o más lesiones hiperintensas en T2 en la médula espinal. ➤ Presencia de bandas oligoclonales en líquido cefalorraquídeo.
SÍNDROME NEUROLÓGICAMENTE AISLADO (SNA)	
<ul style="list-style-type: none"> ➤ DE: A través de una sola RMN obtenida en cualquier momento ➤ DT: Presencia simultánea de lesiones con realce o no al gadolinio o la presencia de bandas oligoclonales específicas en LCR. 	
SÍNDROME RADIOLÓGICAMENTE AISLADO (RIS)	
<ul style="list-style-type: none"> ➤ DE: Según criterios McDonald de DE. ➤ DT: Lesiones con realce al gadolinio y/o nuevas lesiones en T2. 	

Tabla 6: Protocolo diagnóstico según criterios McDonald 2017 (Adaptado de Hernández J, 2019).

EMPP: esclerosis múltiple primaria progresiva; EM: esclerosis múltiple; SNC: Sistema nervioso central;

SNA: síndrome neurológico aislado; EM: esclerosis múltiple; RMN: resonancia magnética nuclear.

1.6. Importancia del laboratorio en el diagnóstico de EM

El estudio del LCR ha cobrado relevancia en el diagnóstico de la EM en los últimos años gracias a los últimos criterios de McDonald del 2017, en los cuales la presencia de bandas oligoclonales en LCR pueden sustituir a los criterios de diseminación en el tiempo siempre que se cumplan criterios de diseminación en el espacio (Thompson AJ, 2018).

El análisis del LCR para la EM se basa en la detección de una respuesta inmune humoral intratecal, teniendo en cuenta la posible disfunción o no de la BHE. El LCR de los pacientes con EM presenta características macroscópicas similares al de los pacientes sanos, como aspecto transparente, incoloro y presión normal. El recuento de leucocitos se encuentra ligeramente elevado con respecto al rango de normalidad ($< 5/\mu\text{L}$) en un 34% de los casos de EM (Tourtellotte W, 1963), niveles por encima de 50 leucocitos/ μL son muy inusuales en EM. Las proteínas totales en LCR, cuya proteína mayoritaria es la albúmina, son normales o están ligeramente elevadas en aproximadamente el 40% de los casos de EM. Estas proteínas atraviesan la BHE por difusión pasiva, según tamaño molecular y carga eléctrica. Los niveles de albúmina en LCR también pueden estar aumentados en determinadas situaciones como: hemorragias subaracnoideas o en los ventrículos cerebrales, lesiones en los plexos coroideos, bloqueo en el flujo de LCR en el espacio subaracnoideo o en situaciones de daño de la BHE, en los que tanto la albúmina como otras proteínas séricas difundirían al LCR. Ante sospecha de EM, se evalúa la integridad y la función de la BHE, a través del cociente de albúmina ($Q_{\text{Alb}} = \text{Albúmina LCR} / \text{Albúmina suero en mg/L}$) (Andersson M, 1994).

Un hallazgo característico en pacientes con EM es la elevación de las inmunoglobulinas G con respecto a las demás proteínas. Gracias al cociente de albúmina se puede determinar si las inmunoglobulinas presentes en LCR se sintetizaron de forma intratecal o se difundieron a través de la BHE normal o anormal (Andersson M, 1994).

El incremento de IgG en el LCR de pacientes con EM es medido a través de la cuantificación de su síntesis intratecal o mediante el estudio cualitativo de BOCG. Las BOCG positivas para IgG están presentes en el LCR de más del 90% de los pacientes con EM y de éstos, aproximadamente el 70% tienen además una síntesis intratecal elevada (Buck D, 2013).

1.6.1. Detección de síntesis intratecal de inmunoglobulina G

- Métodos Cuantitativos: La cuantificación de la secreción intratecal de IgG se realiza mediante nefelometría y queda reflejada mediante distintas fórmulas. Estos índices o fórmulas discriminan la síntesis en LCR de las inmunoglobulinas locales en el SNC provenientes de la disfunción en la BHE. Se han descrito cerca de 20 fórmulas para evaluar la síntesis intratecal de inmunoglobulinas. Estas fórmulas pueden clasificarse en lineales o no lineales.

Las fórmulas lineales utilizan la comparación de las razones LCR/suero. Dentro de estas ecuaciones encontramos: la fórmula de Tourtellotte, los índices IgA, IgM, IgE y de CLL o el índice Tibbling-Link (o comúnmente llamado índice de IgG). El índice Kappa mide la relación de CLL en LCR en comparación al suero. Este índice Kappa está aumentado en el 70-90% de los pacientes con EM, presentando una serie de ventajas con respecto a la determinación de las BOC, como fácil manejo, reproducibilidad y automatización, entre otras.

La fórmula de Tourtellotte descrita en 1969, fue la primera en cuantificar los niveles de inmunoglobulina G sintetizados por el SNC en mg al día diferenciándola de la procedente por una disfunción en la BHE. El nivel de síntesis de inmunoglobulina G fue calculada por el método de intercambio de isótopos. Este método culminó con el índice de Tourtellotte en 1970 que permitía el cálculo de la síntesis de novo de inmunoglobulina G del SNC (Tourtellotte W, 1963).

$$\begin{aligned} & \text{Síntesis intratecal de IgG en mg/día =} \\ & = \left(\text{IgG}_{\text{LCR}} - \frac{\text{IgG}_{\text{suero}}}{369} \right) - \left(\text{Alb}_{\text{LCR}} - \frac{\text{Alb}_{\text{suero}}}{230} \right) \left(\frac{\text{IgG}_{\text{suero}}}{\text{Alb}_{\text{suero}}} \times 0,43 \right) \times 5 \end{aligned}$$

Figura 10: Índice de Tourtellotte (Adaptado de Tourtellotte W, 1963).

El índice IgG o de Tibbling-Link expresa la relación entre el cociente de IgG (Q IgG: IgG LCR / IgG suero) y el cociente de albúmina (Q Alb: Alb LCR / Alb suero); esta fórmula establece una corrección para eliminar la contribución o el efecto del paso de las inmunoglobulinas plasmáticas hacia el sistema nervioso central y constituye uno de los indicadores más utilizados (Link H, 1977). Se considera como valor normal un índice de Link por debajo de 0,5, no claramente patológico entre 0,5-0,7 (en este intervalo es más sensible el resultado de las BOC) y patológico $\geq 0,7$, el cual ya nos indica síntesis intratecal de inmunoglobulinas.

Con respecto a las fórmulas no lineales para la cuantificación de la síntesis intratecal de inmunoglobulinas destacan: el índice logarítmico de Thompson (Mclean BN, 1990), el índice de IgG ampliado o índice de Ohman (Öhman S, 1989) y el índice de Schuller (Schuller E, 1983). Aun así, la más utilizada en la actualidad es el índice de Tibbling-Link, ya que corrige los valores de la proteína mayoritaria del LCR, es decir la albúmina.

- Métodos Cualitativos: El *isoelectroenfoque* (IFE) en gel de agarosa seguido por inmunodetección es el método recomendado para la detección de BOC. Existen dos técnicas distintas para la inmunodetección: peroxidasa marcada con anticuerpo anti-IgG y fosfatasa alcalina marcada con anticuerpo anti-IgG. Esta última presenta mejores resultados en términos de sensibilidad y especificidad para el diagnóstico de EM (Villar LM, 2005) (Masjuan J, 2006).

Mediante IFE seguida de inmunodetección se obtienen 5 tipos de patrones, reconocidos actualmente, empleando muestras de LCR y suero pareado del paciente como se muestra en la figura 11.

*Tipo 1: patrón normal característico de una respuesta policlonal en suero y en LCR (patrón A en la figura 11).

*Tipo 2: respuesta típica oligoclonal donde se observan bandas discretas de IgG en LCR con una respuesta normal en suero (policlonal) (patrón B en la figura 11).

*Tipo 3: patrón “mayor que” en el que se observan más bandas en LCR que en suero (patrón C en la figura 11).

*Tipo 4: patrón en “espejo” donde se observan el mismo número de bandas en LCR que en suero (patrón D en la figura 11).

*Tipo 5: respuesta monoclonal típica de las paraproteínas donde se aprecian varias bandas espaciadas de forma regular y acumuladas en una única zona del gel (patrón E en la figura 11).

Se consideran positivos para la EM el patrón tipo 2, y el patrón tipo 3, en este caso, siempre y cuando el número de BOCG diferentes en el LCR respecto al suero sea ≥ 2 (Petzold A, 2013). En la Figura 11 se muestra estos patrones mencionados.

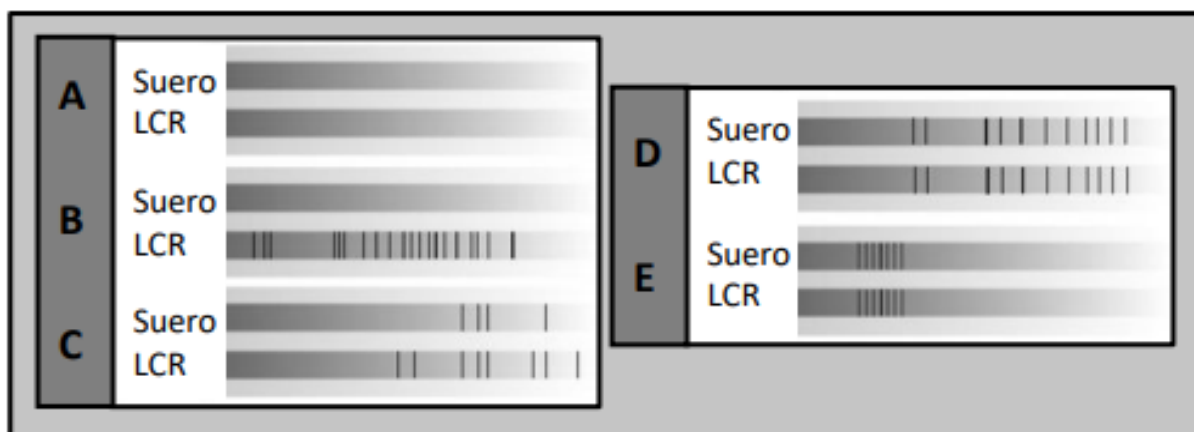


Figura 11: Patrones de bandas oligoclonales de IgG. Los patrones 2 y 3 positivos para EM corresponden a B y C, respectivamente (Adaptado de Petzold A, 2013).

Entre las posibles limitaciones de este método encontramos: la subjetividad en la interpretación de los resultados que depende de la experiencia del operador, el tiempo de procesamiento analítico (más de 3 horas) y su coste elevado. También hay que tener en cuenta que las BOC pueden observarse en pacientes afectados por otras enfermedades neurológicas (como la neurosarcoidosis, la encefalitis anti NMDA y en NMOSD entre otros) y pueden detectarse en alrededor del 8% de individuos normales (Forman SJ, 2003). Aunque como mencionamos en el diagnóstico diferencial, estas patologías presentan biomarcadores específicos que excluyen el diagnóstico de EM.

Una vez presentes, las BOCG en LCR persisten en el paciente independientemente del curso o tratamiento de la EM (Link H, 2006; Petzold A, 2013). Sólo en una minoría de estudios se ha podido observar una alteración en las bandas, como más bandas, menos bandas o cambios en la intensidad de las bandas durante el curso de la EM (Mattson DH, 1980; Thompson EJ, 1983; Von Glehn F, 2012).

Actualmente, los criterios de McDonald aceptan el hallazgo de bandas oligoclonales por isoelectroenfoque específicas de LCR como sustituto del criterio de diseminación en el tiempo. Entre las situaciones en las que más se recomienda su uso para apoyar un diagnóstico dudoso está: cuando las pruebas clínicas y de RMN son insuficientes para apoyar un diagnóstico de EM o en pacientes con RIS (De Stefano N, 2018).

Las BOC de IgA e IgM también se observan en los pacientes con EM, aunque no de manera tan característica como las de IgG (Leary SM, 2000; Villar LM, 2003). Sobre la IgA, los resultados sugieren que estas inmunoglobulinas en el SNC pueden contribuir al daño axonal en la EM (Zhang Y, 2005; Muñoz U, 2022). En cuanto a las IgM, los estudios sugieren que la presencia de bandas de IgM en el LCR, especialmente las bandas de IgM lípido-específicas, pudiera estar asociada a un peor pronóstico de la enfermedad a largo plazo (Villar LM, 2003; Villar LM, 2005)

La detección de BOC de IgM es más compleja que la detección de BOCG, ya que esta inmunoglobulina está en menor concentración en LCR y debido a su estructura pentamérica presenta dificultades para su fijación. La técnica utiliza anticuerpos anti-IgM marcados con biotina utilizando posteriormente una solución de estreptavidina marcada con fosfatasa alcalina para su detección (Villar LM, 2001).

La síntesis intratecal de IgM se correlaciona con la síntesis intratecal del componente C3 del complemento, con la concentración de proteína básica de mielina en el LCR y con el índice de desmielinización en la EM (Villar LM, 2003).

Se ha prestado mucha atención al papel de la IgM total en el LCR, la cual está presente en alrededor del 40% de los pacientes con EMRR. Además, se han observado bandas oligoclonales de IgM en una pequeña proporción de pacientes con EMPP, que presentaron un curso clínico más agresivo con un alto grado de actividad inflamatoria focal de la enfermedad mostrado mediante RMN (Villar LM, 2014). Además aproximadamente el 70% de los pacientes que presentan BOC de IgM, muestran BOCM lípido-específico, que están dirigidos contra los lípidos de mielina (Beltrán E, 2012) y están más fuertemente relacionados con un curso agresivo de la enfermedad que aquellos que no son lípidos específica (Ribes S, 2021).

- Métodos Gráficos: Existen también métodos gráficos para analizar la síntesis intratecal. Q IgG y Q Alb son relacionados gráficamente en forma no lineal en el diagrama de Reiber o Reibergrama, donde se analiza de una manera integrada la funcionalidad de la barrera hematoencefálica y la síntesis intratecal de inmunoglobulina G (Reiber H, 2001).

Los reibergramas son útiles como herramientas para el diagnóstico de enfermedades donde se encuentre implicado el SNC, con la ventaja de que se puede emplear bajo cualquier condición de la barrera hematoencefálica.

El gráfico incluye: líneas verticales (para indicar los rangos de referencia para la razón de albúmina según la edad) y una línea hiperbólica discriminadora (esta separa el rango de referencia para la fracción de inmunoglobulina derivada de la sangre por debajo de la línea, de la fracción de IgG sintetizada intratecalmente por encima de esa línea).

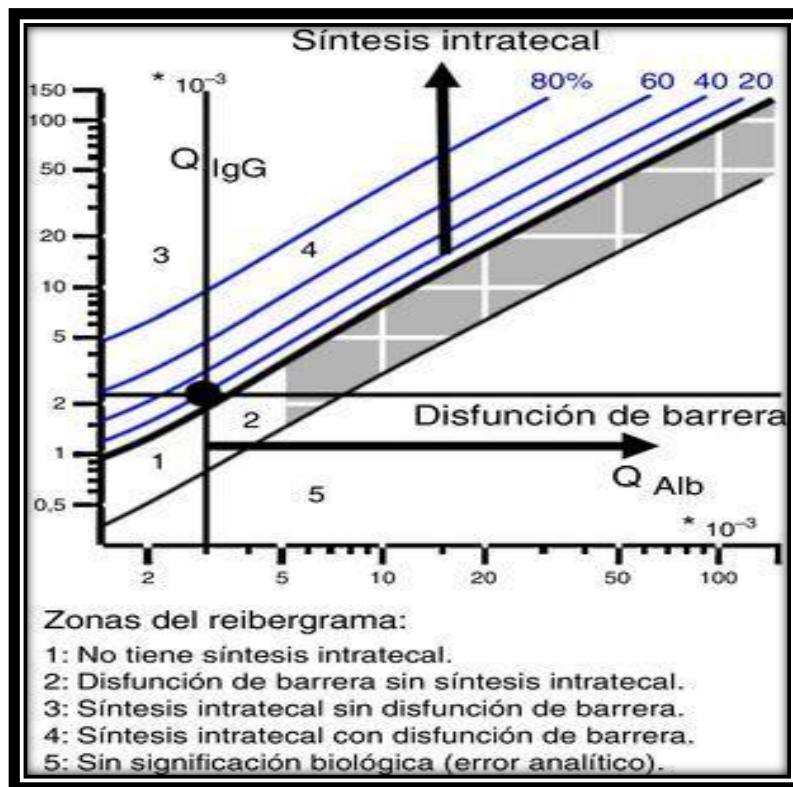


Figura 12: Reibergrama o gráfica de las razones de Reiber (Adaptado de Reiber H, 2001).

El reibergrama usa una escala logarítmica que cubre los rangos más frecuentes para las proteínas.

Para analizar las muestras en el reibergrama, se cuantifican en primer lugar los valores de IgG, IgA e IgM tanto en LCR como en suero, y se obtienen las razones LCR/suero (Q) para cada uno de ellos (Reiber H, 2001).

1.6.2. Cadenas ligeras libres

La determinación de las CLL de inmunoglobulinas en LCR presenta una sensibilidad y especificidad diagnóstica similares a las mostradas por las BOCG. Como comentamos anteriormente, las CLL se producen en exceso por los linfocitos B con respecto a las cadenas pesadas. Pequeñas cantidades de ellos se pueden encontrar en sangre periférica y en otros fluidos biológicos como líquido sinovial, LCR, orina y saliva. Las CLL son rápidamente filtradas por el glomérulo y más del 99% se reabsorben de las células del túbulo contorneado proximal, estando presentes en orina en cantidades mínimas. Actualmente se sabe que las CLL son moléculas muy activas, capaces de unirse tanto a antígenos como a la inmunoglobulina completa, ayudando a desarrollar la afinidad de los anticuerpos (Basile U, 2017). Los niveles fisiológicos de las CLL son bajos, pero en pacientes con enfermedades inflamatorias como la EM, estos niveles se encuentran alterados, siendo anormalmente altos.

Diferentes estudios han sugerido que niveles elevados de CLL κ en LCR en pacientes con SNA pueden predecir la conversión a EM (Villar LM, 2012).

En otro estudio publicado en 2014 por el Dr. Hassan-Smith y su equipo, se evidenció, que en pacientes con SNA, EMRR Y EMPP, niveles altos de CLL kappa en LCR presentan una mayor sensibilidad diagnóstica con respecto a las BOCG (Hassan-Smith G, 2014), aunque es necesario validar estos resultados con cohortes mayores. Otro estudio publicado en 2018, planteó la posibilidad de que la propagación del repertorio de anticuerpos, comenzando por la síntesis predominante de CLL κ y conduciendo a una mezcla de κ y λ , pueda estar involucrada en la progresión de la enfermedad, y que la proporción de CLL kappa/lambda determinadas en el momento de la punción lumbar pueden predecir el curso clínico de la EM pudiendo ser usado como marcador para la estratificación terapéutica a la hora de escoger un fármaco (Rathbone E, 2018).

Se han desarrollado diferentes métodos basados en el empleo de anticuerpos para su determinación (inmunolectroforesis, western blot, ensayo de hemoaglutinación, nefelometría y turbidimetría). Estos métodos no se pueden usar indistintamente para el seguimiento de pacientes porque las concentraciones de CLL κ y λ medidas pueden diferir significativamente, especialmente en niveles altos. Debido a que no se dispone de material de referencia internacional para la medición de CLL, no es posible establecer qué método es el

más preciso, siendo importante conocer el rendimiento diagnóstico de los ensayos empleados (Caponi L, 2020). La selección de anticuerpos frente a CLL kappa y lambda es un punto determinante para la eficacia de estos inmunoensayos. Estos pueden ser monoclonales y policlonales. Los anticuerpos policlonales reconocen un mayor número de epítomos, presentan una mejor linealidad, además de presentar un menor número de problemas debido al exceso de antígeno, mientras que los anticuerpos monoclonales son más específicos al reconocer un único epítomo, pero presentan peor linealidad y más problemas asociados al exceso de antígeno.

Actualmente, se utilizan la nefelometría y la turbidimetría como principales métodos de determinación de CLL. Ambos métodos se basan en la dispersión de partículas. La nefelometría mide la radiación dispersa por los inmunocomplejos generados, en cambio la turbidimetría mide la disminución en la intensidad de un haz al atravesar una suspensión de partículas. Entre las ventajas de estas técnicas nos encontramos que son cuantitativas y automatizables. Esto permite que puedan estandarizarse y emplearse de forma rutinaria en los laboratorios clínicos.

En los últimos años, hay una mayor presencia de estudios que incluyen el índice kappa como biomarcador de conversión a EM. Este índice considera la función de la BHE, mejorando la precisión en el análisis de las CLL y evitando falsos positivos debidos a la disfunción de la BHE.

Su fórmula es la siguiente:

$$\text{Índice kappa} = (\text{CLL kappa LCR} / \text{CLL kappa suero}) / (\text{Alb LCR} / \text{Alb suero})$$

En esta línea de investigación, el estudio realizado en este centro por la Dra. Menéndez mostró la correlación positiva entre el diagnóstico de EM y los valores elevados del índice kappa, además de un valor equiparable en sensibilidad y especificidad clínicas con respecto a las BOCG y el índice IgG (Menéndez-Valladares P, 2019).

En un estudio publicado en marzo del 2020 por Ferraro y su equipo, llegaron a la conclusión de que el índice kappa podría contribuir a la identificación de pacientes con BOC negativos con una alta probabilidad de diagnóstico de EM (Ferraro D, 2019).

1.6.3. Cuantificación de las Subclases de Inmunoglobulinas

En cuanto a las subclases de IgG, se compone de cuatro subtipos en función de las regiones constantes de cadena pesada: IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4. Como se comentó en el apartado de la fisiopatología de la EM, una molécula de IgG se compone de dos cadenas pesadas (H) idénticas y dos cadenas ligeras (L) idénticas, lo que generalmente da como resultado dos sitios de unión a antígenos idénticos en los brazos Fab (véase figura 13). Las diferencias funcionales entre las subclases surgen de la variación estructural tanto en las regiones constantes o fracción constante (Fc) como en las regiones de bisagra. La frecuencia de cada subclase en el torrente sanguíneo es 60-70% IgG1, 20-30% IgG2, 5-8% IgG3 y 1-3% para la IgG4. La IgG1, 2 y 4 son los que presentan una mayor vida media en suero. Entre sus principales funciones se encuentra la neutralización y la opsonización de partículas antigénicas para facilitar la fagocitosis, a través de los receptores para la región Fc (FcγR), la citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos y la activación del complemento. La región Fc de cada subclase de IgG tiene una afinidad distinta por los receptores Fc-gamma de la membrana de los fagocitos (Prieto A, 2013). La unión de las moléculas de IgG a los FcγR es importante para iniciar la fagocitosis. La IgG1 e IgG3 se unen a FcγRI, FcγRII y FcγRIII; IgG2 se une a FcγRII; e IgG4 se une a FcγRI y FcγRII. Uno de los mecanismos de activación del complemento es la mediada por las fracciones Fc de los anticuerpos IgG e IgM a través de las interacciones C1q-CH2. Las porciones Fc de las subclases IgG1 e IgG3 son las que presenta mayor afinidad para activar el complemento y, en menor medida la IgG2, mientras que la IgG4 no es capaz de activarlo (Prieto A, 2013). Sin embargo, los anticuerpos IgG4 tienen propiedades estructurales y funcionales únicas, lo que resulta en un intercambio de brazo Fab que da como resultado dos anticuerpos específicos de antígeno diferentes (Brito-Zerón P, 2014; Stone JH, 2015). Aunque carece de funciones efectoras, como la citotoxicidad mediada por anticuerpos y la dependiente del complemento, presenta un papel protector en las alergias al actuar como un anticuerpo bloqueante e inhibir la desgranulación de los mastocitos, pero un papel deletéreo en el melanoma maligno, al impedir la inmunidad tumoral mediada por IgG1 (Davies A, 2015).

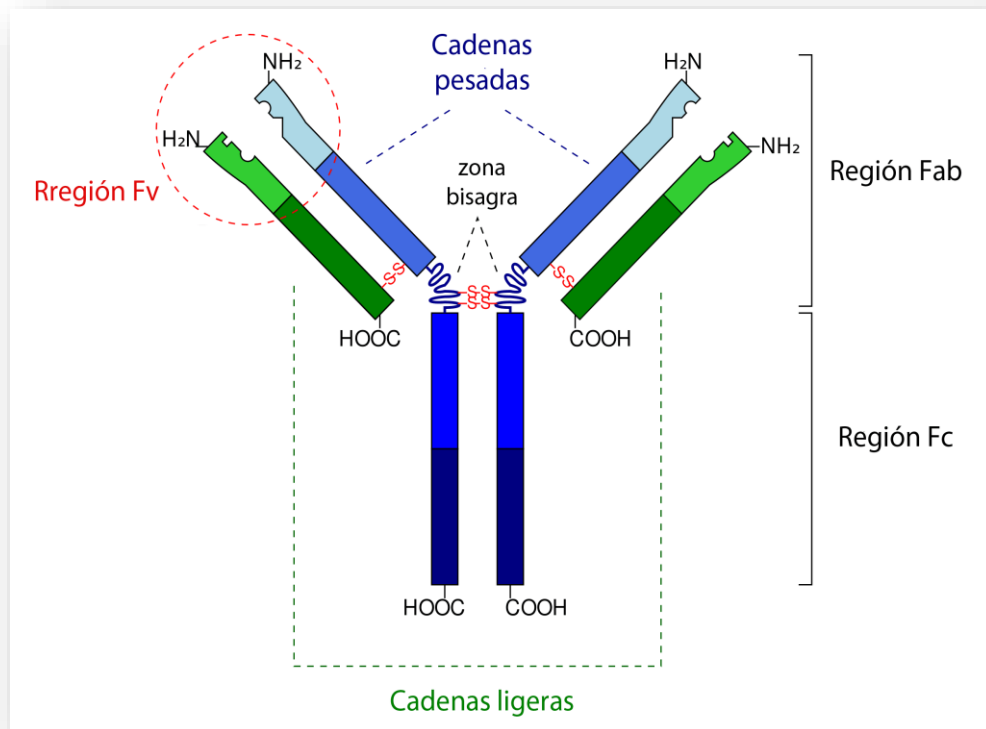


Figura 13: Esquema de una inmunoglobulina (Adaptado de Prieto Martín A, 2013).

Existen publicaciones que relacionan las distintas subclases con la EM. En un reciente estudio, la concentración de IgG3 y su porcentaje con el resto de subclase de IgG en el suero en el momento del diagnóstico de SNA se correlacionaron inversamente con el tiempo hasta la conversión a EM ($p = 0,018$ y $p < 0,001$, respectivamente), lo que sugiere que pueden ser marcadores pronósticos útiles de los individuos con SNA que convierten rápidamente a EM (Trend S, 2018).

1.6.4. Otros biomarcadores moleculares

Existen otros biomarcadores que se evalúan en EM. Algunos ejemplos son:

- *Anticuerpos contra los virus del sarampión, el virus de la rubéola y el virus de la varicela-zóster (VZV)* en el LCR ya que sugiere una respuesta de células B intratecal específica y en algunos estudios se ha demostrado que una reacción a estos virus es significativamente más detectable en pacientes con una conversión de síndrome neurológico aislado (SNA) a EM que en pacientes que no desarrollan EMCD (Brettschneider J, 2009).
- *Anticuerpos antiacuaporina-4:* La AQP-4 es una proteína del canal de agua expresada en el SNC por los astrocitos que desempeña un papel importante en la regulación de la homeostasis

del agua en el SNC. Se utiliza como marcador de diagnóstico diferencial ya que está elevado en aproximadamente el 75% de los pacientes con trastorno del espectro de neuromielitis óptica (NMOSD), pero no en pacientes con EM. Hay diferentes métodos de detección disponibles: inmunofluorescencia indirecta, ELISA, citometría de flujo y ensayos basados en células (Ziemssen T, 2019).

- *Anticuerpos anti-MOG*: MOG es una proteína de mielina expresada exclusivamente en la superficie de las vainas y membranas de mielina de los oligodendrocitos. Se usa como complemento para el diagnóstico diferencial de EM. Estos anticuerpos están presentes en un porcentaje de pacientes pediátricos con encefalomiелitis diseminada aguda (ADEM), pacientes con síntomas clínicos de NMOSD y pacientes con neuritis óptica bilateral.
- *Anticuerpos antinucleares*: para el diagnóstico diferencial de lupus eritematoso sistémico.
- *La proteína quitinasa-3-like-1*: Es una glucosidasa secretada por monocitos, microglía y astrocitos activados. Su distribución en las lesiones inflamatorias sugiere que podría ser un componente importante de la respuesta astrocítica para modular la inflamación del SNC.
- *Los neurofilamentos (NF)*: Son proteínas citoesqueléticas neuronales, están compuestos por 4 subunidades: un triplete de Nf de cadenas ligeras (NfL) (68 kDa), Nf de cadenas medias (150 kDa), Nf de cadenas pesadas (NfH) (190-210 kDa), y α -internexina en el SNC o periférica en el Sistema Nervioso Periférico. Se han observado niveles elevados de NfL y NfH en todos los estadios de EM, siendo estos niveles mayores durante las recaídas y ante un incremento de lesiones en las imágenes por RM. El incremento de Nf refleja el continuo deterioro axonal, responsable de la discapacidad que presentan los pacientes con EM. En estudios previos se ha observado que las mediciones de NfL podrían ser superiores a las de NfH para detectar los efectos del tratamiento en el LCR de los pacientes con EMRR (Kuhle J, 2013).
- *Anticuerpos neutralizantes contra interferón- β y contra natalizumab*: Se utilizan para monitorizar la respuesta al tratamiento.
- *Motivo CXC quimiocina-13 (CXCL13)*: Es responsable del reclutamiento de linfocitos B en el SNC en la EM. Se está evaluando como un biomarcador adecuado para la eficacia de las terapias contra la EM (Ziemssen T, 2019).
- *La osteopontina*: Esta citoquina proinflamatoria juega un papel importante en la inflamación al modular las respuestas T helper1 (Th1) y Th17 en el SNC. En un reciente estudio, su concentración aumentó en pacientes con EM recurrente-remitente que estaban en fase de remisión (Morteza J, 2019).

1.7. Tratamiento de la EM

La EM tiene un alto impacto personal, social, sanitario y económico, tanto por la discapacidad que produce en la población de jóvenes adultos como su repercusión negativa a nivel laboral y los costes asociados a los tratamientos y cuidados de los pacientes. Actualmente, no existe cura para la enfermedad, pero los tratamientos modificadores de la enfermedad mejoran la calidad de vida de los pacientes y su esperanza de vida. Todos los medicamentos han demostrado eficacia en las formas remitentes-recidivantes de EM; varios de ellos han sido eficaces en el síndrome clínico aislado demorando la aparición de un siguiente evento desmielinizante o de nuevas lesiones en la RM; otros han mostrado eficacia en formas secundariamente progresivas asociadas a brotes (García A, 2017). En cuanto a la forma primaria progresiva, recientemente se aprobó el primer medicamento destinado para este perfil.

Los tratamientos actuales para la EM se recogen en la tabla 7.

*El *Ocrelizumab* es el primer fármaco aprobado por La Administración de Drogas y Alimentos de los Estados Unidos (FDA) para el tratamiento de pacientes adultos con EM primaria progresiva (EMPP) en marzo de 2017. El ocrelizumab es un anticuerpo monoclonal humanizado que reduce selectivamente las células B que expresan CD20 mientras preserva la capacidad de reconstitución de las células B y la inmunidad humoral preexistente.

Las terapias de eliminación de células B mediadas por anticuerpos anti-CD20 han establecido una vía nueva y prometedora en el tratamiento de EMRR y EMPP. El último anti-CD20 en unirse ha sido el Ofatumumab, el cual, en agosto de 2020, la FDA lo aprobó como terapia para todas las formas de EM recurrente, la EM secundaria progresiva, la EMRR, así como en los Síndromes Neurológicos aislados, en forma de pluma autoinyectable. La EMA lo aprobó en marzo del 2021 (Florou D, 2020; Delgado SR, 2023).

TIPO DE TRATAMIENTO	FÁRMACOS	MECANISMO DE ACCIÓN	EFECTOS ADVERSOS
Tratamiento brotes	Glucocorticoides	Inducción apoptosis linfocitos T (Ayuso G, 2014).	Síntomas gastrointestinales, aumento de peso, edema, cambios de humor, disforia, ansiedad, insomnio, acné, entre otros. (Delgado F, 2019)
Tratamientos modificadores de la enfermedad (Martinez-Altarriba MC, 2015b)	Interferones (beta-1B, beta-1A y beta-1pegilado)	Influencia a nivel células T, células B y citoquinas (Kasper LH, 2014).	Síndrome pseudogripal y lesiones cutáneas en el lugar de la inyección. Posibles resistencias al tratamiento.
	Acetato de Glatiramero	Acción inmunomoduladora.	Reacciones transitorias de postinyección sistémicas como dolor en el pecho, enrojecimiento, disnea, palpitaciones y / o ansiedad. Hepatotoxicidad.
	Teriflunomida	Inhibición de la enzima dihidroorotato deshidrogenasa.	Linfopenia (monitorización) (Yusta A, 2019).
	Dimetilfumarato	Inducción apoptosis linfocitos T vía gen <i>Nrf2/Keap1</i> .	Dolor abdominal, sofocos, linfopenia.
	Natalizumab	Anticuerpo monoclonal recombinante contra subunidad alfa-4 de las moléculas de integrina.	Leucoencefalopatía multifocal progresiva (riesgo 4.1 de 1000) (Buc M, 2018).
	Fingolimod	Modulador del receptor de la esfingosina-1-fosfato.	Linfopenia ficticia, bradicardia, infecciones vías altas, edema macular y carcinomas basocelulares (Yusta A, 2019).
	Ocrelizumab*	Anticuerpo monoclonal humano anti-CD20 del linfocito B.	Muy seguro. Contraindicado en pacientes con hepatitis B activa.
	Alentuzumab	Agotamiento de células T, células B, células asesinas naturales y monocitos que expresan CD52.	Infecciones y trastornos autoinmunes, como trastornos tiroideos o púrpura trombótica autoinmune.
	Cladribina	Purina antimetabolito.	Infecciones tracto respiratorio superior, dolor de cabeza y linfocitopenia.
	Rituximab	Contra el antígeno CD20 en los linfocitos B.	
Siponimod	Modulador del receptor de 1-fosfato de esfingosina (similar a fingolimod).	Dolor de cabeza, hipertensión y aumento de transaminasas.	
Tratamiento de los síntomas (Yusta A, 2019)	Fatiga: Ácido acetilsalicílico, terbutalina o alfametilfenidato. Antidepresivos con efecto estimulante: Venlafaxina, bupropión o sertralina. Alteraciones cognitivas: Donepezilo y memantina. Dolor: Baclofeno y tizanidina. Alteraciones esfinterianas: Tolterodina, oxibutinina, bromuro de trospio, solifenicina.		

Tabla 7: Resumen de los principales fármacos utilizados en EM. Los fármacos modificadores de la enfermedad a su vez se clasifican en fármacos de primera línea, dónde encontramos los interferones, el acetato de glatiramero, la teriflunomida y el dimetilfumarato. Y fármacos de segunda línea, como natalizumab, fingolimod, ocrelizumab, alentuzumab, cladribina y rituximab.

Presentación clínica	Consideraciones	Opciones terapéuticas
Síndrome desmielinizante aislado		<ul style="list-style-type: none"> - Interferón beta 1 b - Interferón beta 1 a im - Interferón beta 1 a sc - Acetato de glatirámico
Esclerosis múltiple recidivante remitente	Terapia inicial o primera línea terapéutica	<ul style="list-style-type: none"> - Interferón beta 1 b - Interferón beta 1 a im - Interferón beta 1 a sc - Interferón beta 1 a pegilado - Acetato de glatirámico - Teriflunomida - Dimetilfumarato - Azatioprina
	Formas agresivas	<ul style="list-style-type: none"> - Natalizumab - Fingolimod - Alemtuzumab - Cladribina - Ocrelizumab
	Respuesta inadecuada a primera línea	Cambio entre medicamentos de primera línea o paso a segunda línea en función de las características de cada paciente
	Respuesta inadecuada a segunda línea	Considerar otros fármacos de segunda línea
	Fracaso de los anteriores	<p>Opciones no aprobadas:</p> <ul style="list-style-type: none"> - Rituximab - Ciclofosfamida - Autotrasplante
	Suspensión de natalizumab	Terapia alternativa entre 8 y 12 semanas de la suspensión
Progresión secundaria con brotes		<ul style="list-style-type: none"> - Interferón beta 1 b - Interferón beta 1 a sc - Mitoxantrona (raramente utilizada por toxicidad) - Ocrelizumab - Agonistas de receptores S1p
Esclerosis múltiple primaria progresiva		<ul style="list-style-type: none"> - Ocrelizumab

Tabla 8: Algoritmo terapéutico para la EM (Adaptado de la Sociedad Española de Neurología, García Merino A, 2017).

2. Hipótesis y Objetivos

2. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

La actividad de la EM está determinada por las recaídas con evidencia clínica (brotes) y la presencia de lesiones en RMN que aumentan el realce con gadolinio y/o la generación de nuevas lesiones en T2. La progresión de la enfermedad es un proceso que se cuantifica de varias formas: mediante el número de recaídas a través de la Tasa de Recaída anual (nº de brotes/año), el valor de la EDSS, o la valoración de escalas combinadas que evalúan la no evidencia de progresión (NEP) o la no evidencia de progresión o de enfermedad activa (NEPAD) (Bilbao MM, 2014; Cristiano E, 2021).

El diagnóstico temprano de las formas progresivas de la enfermedad es un tema de gran relevancia y que causa debate a día de hoy. Aportar conocimiento acerca de la detección precoz de la progresión al comienzo de la misma, en los casos de EMSP, o identificar de la forma más rápida posible un diagnóstico progresivo en EMPP, forma parte de las principales líneas de investigación en EM actuales. Idealmente, tener biomarcadores de diagnóstico de formas progresivas o de reconocimiento del comienzo de la misma a partir de una EMRR, permitiría acortar los tiempos de tratamiento, o en el caso de las secundarias progresivas prever con anterioridad en qué momento se puede dar este curso evolutivo. Para ello, sería indispensable disponer de un biomarcador fácilmente medible en los laboratorios, altamente específico y sensible a los cambios en la historia clínica del paciente. En nuestro caso, es el índice kappa el que presenta las características idóneas mencionadas.

Objetivo Principal

El objetivo principal de esta Tesis es evaluar la utilidad del índice kappa como indicador biológico de las formas progresivas de EM, EMPP y EMSP.

Objetivos secundarios

- Estratificar los distintos perfiles evolutivos de EM según el Índice Kappa estableciendo una relación entre los valores de dicho índice y las diferentes formas de EM. Se obtendrán y analizarán los puntos de corte resultantes para cada una de las diferentes formas de evolución.

- Establecer la correlación entre el índice kappa obtenido para las distintas formas evolutivas de EM y el índice de Tibbling-Link o índice de IgG, utilizado actualmente en el Hospital como prueba paraclínica de laboratorio de apoyo al diagnóstico de la EM.
- Estudiar la concordancia entre el índice kappa y los distintos patrones de BOCG obtenidos. Las BOCG son actualmente empleadas como prueba paraclínica de laboratorio de apoyo al diagnóstico de la EM.
- Correlacionar las variables índice Kappa, índice de IgG y BOCG con el pronóstico de los pacientes.
- Cuantificar los distintos niveles de las subclases de IgG (IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4) y evaluar la correlación con el índice kappa y con el estado inmunológico del paciente, estudiando si la presencia de uno o más trastornos asociados a la EM, como enfermedad primaria del paciente, se relaciona con la alteración de dichos niveles.
- Relacionar los valores del índice kappa con los parámetros clínicos habituales en el diagnóstico de la EM, como son principalmente los parámetros de discapacidad del paciente a lo largo de su historia natural (Escala de discapacidad de Kurtzke), y los parámetros de RMN.
- Estudiar los diferentes factores de riesgo asociados a EM y si presentan relación con la progresión de la enfermedad.
- Evaluar si el índice kappa es un biomarcador predictor de eventos de progresión de la enfermedad mediante la correlación con la tasa de recaídas y sucesos PIRA y RAW.
- Establecer un algoritmo pronóstico de progresión basado en las variables que manifiesten una mayor utilidad para la predicción de la misma.

3. Material y Métodos

3. MATERIAL Y MÉTODOS

3.1. Población de Estudio:

Para la realización de esta Tesis Doctoral, se recogieron los datos de laboratorio obtenidos como resultado del estudio asistencial del LCR y el suero mediante turbidimetría y nefelometría para el cálculo del índice Kappa, que se realiza en el laboratorio de Inmunología del HUVM, tras la realización de una punción lumbar. Los sujetos estudiados pertenecen al Área sanitaria Virgen Macarena (Sevilla) y las muestras utilizadas en el estudio son provenientes del estudio asistencial del LCR cuando existe una sospecha de posible enfermedad desmielinizante. Se estudiaron los sujetos según el valor del índice kappa que presentaron, de acuerdo a un punto de corte establecido en el Laboratorio de Inmunología del HUVM de 10.62. Este punto de corte procede de un estudio retrospectivo transversal que se ha llevado a cabo en el Laboratorio de Inmunología con gran repercusión en la práctica clínica (Menéndez-Valladares P, 2015).

Las muestras se han conservado siguiendo los protocolos actuales europeos para el mantenimiento de muestras de LCR y suero (Teunissen CE, 2011). Se han recogido y transformado en un tiempo inferior a 2 horas y se han preservado a -80°C hasta su uso.

Cálculo del tamaño muestral: Aceptando un riesgo alfa de 0.05 y un riesgo beta de 0.2 en un contraste bilateral, para detectar un riesgo relativo mínimo de 0.1 y si la tasa de enfermos en el grupo de pacientes con índice kappa inferior a 10.62 es del 0.1, se precisan:

- 105 sujetos en el grupo de pacientes con índice kappa superior a 10.62. De estos 105, teniendo en cuenta el porcentaje de pacientes que desarrollan formas remitentes-recurrentes (85%) y formas progresivas (alrededor del 15%), se necesitarían 89 pacientes con fenotipo EMRR al inicio del diagnóstico y 16 para EMPP.
- 315 en el grupo de pacientes con índice kappa inferior a 10.62.

Se ha estimado una tasa de pérdidas de seguimiento del 5%. Se ha utilizado la aproximación de Poisson, teniendo en cuenta que la EM general presenta una baja prevalencia en España, en torno a 120 por cada 100000 habitantes (Atlas of MS 2020 - Epidemiology report - MS International Federation, 2020) (Calculadora de GRANMO, versión 7.12 abril 2012).

El bajo tamaño muestral observado en nuestro estudio en alguno de los grupos, como es el caso del grupo con EMRR y el grupo control, se debe al bajo número de pacientes con sospecha de enfermedad desmielinizante que acuden a consulta en los últimos años unido a la crisis sanitaria ocasionada por el COVID-19, que ocasionó una disminución de la actividad asistencial.

3.2. Selección de muestras:

Criterios de inclusión

Para el estudio se seleccionaron aquellos pacientes con SNA, o diagnóstico de EMCD en sus distintos fenotipos, a los que se les realizó una punción lumbar (PL) por prescripción médica como prueba complementaria para su diagnóstico definitivo o en relación a su seguimiento. En esta tesis, el SNA es contemplado como 1 sólo brote.

Para los casos control se incluyeron sujetos con enfermedades neurológicas de características no desmielinizantes, que tenían PL realizada como prueba de descarte diagnóstico. Los controles nos permitieron establecer los valores basales de los diferentes puntos para el estudio de los distintos índices calculados, tanto de las inmunoglobulinas G y M, así como de las distintas subunidades de IgG.

Todos los sujetos procedían de la UGC de Neurología del área Hospitalaria Virgen Macarena, en particular de la Unidad de EM para el caso de los individuos que padecían EM.

Criterios exclusión:

- Pacientes con edades inferiores a 14 años. Estos casos pertenecen a pediatría y son casos atípicos de EM muy temprana. Se considera que estos pacientes deben de tratarse de forma particular tanto su estudio como los resultados que se obtienen de las distintas pruebas como consecuencia de la precocidad de la enfermedad.

- Pacientes que presentan comorbilidad de gammapatía monoclonal con la EM. En estos pacientes podrían verse afectados los niveles de CLL en circulación y por tanto puede dar lugar a una alteración de los resultados al aumentar el valor de los niveles de CLL, no por la EM sino por la patología concomitante.

3.3. Métodos Analíticos

El LCR se extrae mediante punción lumbar previo consentimiento firmado del paciente. Una vez separadas las células del LCR, mediante centrifugación a 600 g durante 10 minutos a temperatura ambiente, el sobrenadante se divide en alícuotas de 350 microlitros y se almacena a -80°C hasta su uso. De forma paralela, se toma una muestra de sangre del paciente para la obtención posterior del suero, separando las células del mismo, centrifugando a 2000 g durante 10 minutos a temperatura ambiente. El sobrenadante se divide en alícuotas de 500 microlitros y se almacena de igual manera que el LCR, en un equipo congelador a -80°C hasta su uso. En ambos casos, tanto para el LCR como para el procesamiento del suero, el tiempo estimado es inferior a dos horas desde la extracción de la muestra hasta su congelación a -80°C .

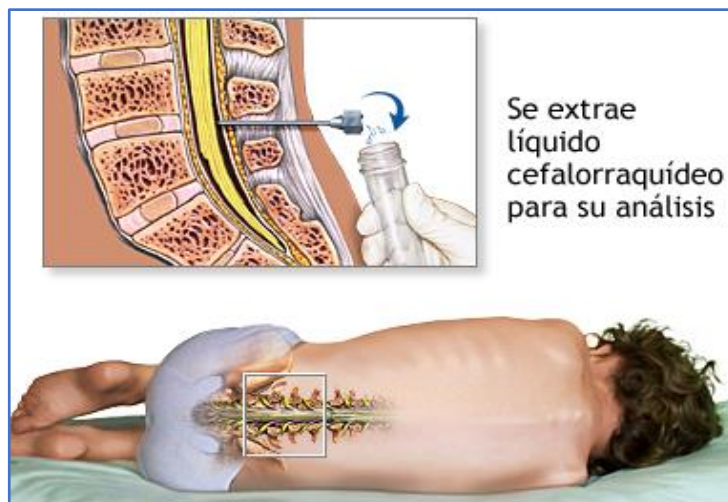


Figura 14: Representación de la extracción de LCR a través de punción lumbar
(Adaptado de *Punción Lumbar: MedlinePlus Enciclopedia Médica Ilustración*, n.d.)

Se referencia a continuación la metodología llevada a cabo para la obtención de los valores de cada una de las variables de estudio incluidas en esta tesis.

a) **Protocolo para la determinación de las bandas oligoclonales en LCR:**

La determinación de las BOCG en el LCR de los pacientes incluidos en el estudio se lleva a cabo en Hospital Universitario Virgen Macarena en Sevilla. El protocolo se basa en el método de mayor sensibilidad y especificidad descrito hasta el momento para este tipo de prueba. Se realiza un isoelectroenfoque (sistema HEALTHCARE) seguido de transferencia e inmunodetección mediante anticuerpos frente a IgG humana marcados con fosfatasa alcalina siguiendo el protocolo descrito según la Dra. Villar (Villar LM, 2005). Tras la incubación, la

membrana se revela observándose el resultado de la prueba mediante la precipitación de la fosfatasa alcalina con los reactivos correspondientes para el revelado.

b) Cuantificación de las CLL:

Los niveles de CLL serán cuantificados mediante técnica de Turbidimetría (Optilite de BindingSiteLtd), usando el kit para kappa libre humana Optilite (BindingSiteLtd).



Figura 15: Analizador Optilite (BindingSiteLtd.) (Extraído de <https://www.bindingsite.com/en/our-products/clinical-chemistry/optilite/overview>).

Esta técnica se basa en el precipitado que se obtiene cuando un antisuero específico y una muestra que contiene antígeno se mezclan con una solución amortiguadora de reacción. Debido a ello la solución se vuelve turbia. La turbidimetría mide la cantidad de luz que puede pasar a través de esta solución, que irá disminuyendo según aumenta la cantidad de precipitado. El kit utilizado está basado en antisueros policlonales y la reacción es potenciada con partículas de látex.



Figura 16: Mecanismo de acción del uso de antisueros policlonales. El ensayo basado en anticuerpos policlonales reconoce una gran variedad de epítopos de las CLL.

El control de calidad y los resultados de la muestra del paciente se correlacionan directamente en una curva de calibración representada automáticamente por el analizador.

Con respecto a los problemas de linealidad del ensayo turbidimétrico, éste puede presentar una tendencia a la no linealidad en determinadas circunstancias, como las relacionadas con las propiedades de una determinada cadena ligera libre o las causadas por una interferencia no específica del ensayo (por ejemplo, la presencia de lípidos). Como no linealidad entendemos cuando las muestras ofrecen valores diferentes con diluciones diferentes, pero no se produce exceso de antígeno.

- Reactivos:

Reactivo Látex: anticuerpo monoespecífico policlonal fijado a partículas de látex poliestireno. Y como conservantes 0,1% de ácido E-amino-n-caproico (EACA) y 0,01% de benzamidina, 0,05% ProClin.

Calibradores y controles: mezcla de sueros humanos, suministrados en forma líquida estable. Contienen un 0,099% de azida sódica, 0,1% de EACA y 0,01% de benzamidina como conservantes.

Reactivo adicional: conservante 0,099% de azida sódica.

Calibración: Previo a la determinación de las muestras, debemos garantizar la correcta calibración de la técnica para asegurar la precisión y exactitud de los resultados. Esta calibración se realiza cada cambio de lote de reactivo o en caso de resultado del control de calidad fuera de rango.

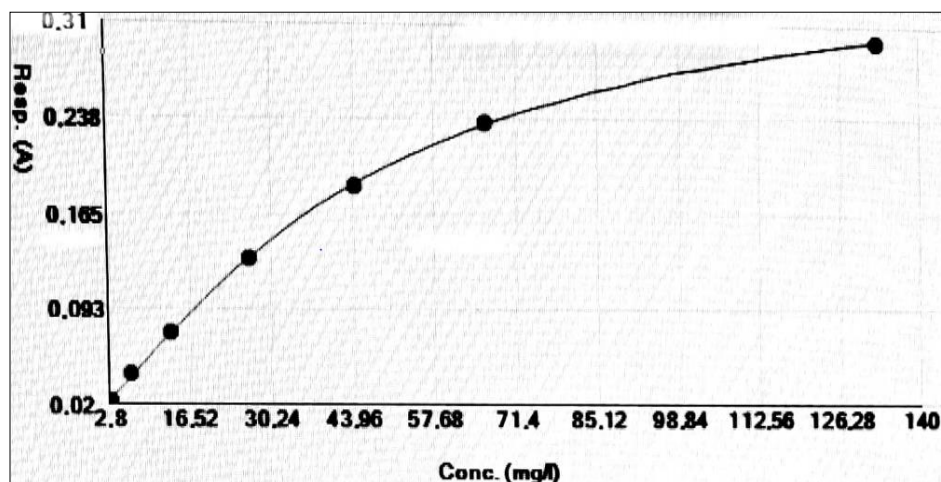


Figura 17: Representación gráfica de la curva de calibración para CLL. Curva obtenida para la determinación de los valores de CLL en el equipo Optilite de BindingSiteLtd.

Para la calibración se analizaron una serie de antígenos con concentración conocida y se realizó una curva de calibración de 6 puntos.

La concentración de los calibradores junto con los valores de absorbancia de la técnica con la que se realizó la curva de calibración se puede observar en la siguiente tabla:

Calibrador	Respuesta (A)	Concentración calculada	Concentración dada
Blanco	0,023	3,088	3,088
1	0,043	6,989	6,640
2	0,074	13,318	13,280
3	0,131	26,359	26,560
4	0,187	43,802	44,267
5	0,235	67,591	66,400
6	0,297	131,767	132,800

Tabla 9: Datos obtenidos para la calibración de las CLL. Realizado en el equipo Optilite de BindingSiteLtd (Adaptado de The Binding Site Ltd. Freelite® 2014).

- Controles de Calidad: El kit utilizado para realizar las CLL kappa presenta dos controles con concentraciones conocidas y proporcionadas por el fabricante, uno con una concentración baja y otra con concentración alta. Las concentraciones de los controles se recogen en media o valor asignado por el fabricante (mg/L), desviación estándar y rango de aceptación de los controles empleando la media calculada entre dos desviaciones estándar ($\pm 1,96 \cdot DS$). Estos se realizaron de forma previa al procesamiento de las muestras.

Control bajo (QC1): $13,99 \pm 1,399$, rango aceptado (11,19 - 16,79).

Control alto (QC2): $27,86 \pm 2,786$, rango aceptado (22,29 – 33,43).

- Rango de medición:

El rango de medición aproximado de la cadena kappa en suero y plasma en el ensayo se muestra en la siguiente tabla:

Optilite Analyser Dilution	Rango aproximado (mg/L)
1+0	0,33-12,7
1+1	0,6-25,3
1+9	2,9-127
1+99	29-1270
1+999	290-127000
1+9999	2900-127000

Tabla 10: Rangos de medición aproximado del ensayo en función de la dilución (Adaptado de The Binding Site Ltd. Freelite® 2014).

- Características técnicas: Las especificaciones técnicas para las CLL kappa y lambda dadas por el fabricante se recogen en la siguiente tabla:

Cadenas ligeras libres kappa en suero		
	Media (desviación estándar) (mg/l)	Coefficiente de variación (%)
Dentro del mismo lote	11,17 (1,09)	9,76
Según el lote	16,96 (1,21)	7,12
Según el lote	30,37 (1,75)	5,76

Tabla 11: Especificaciones técnicas CLL kappa y lambda (Adaptado de The Binding Site Ltd. Freelite® 2014).

El estudio de la precisión del ensayo de CLL kappa seguido por el fabricante sigue las guías CLSI (Clinical & Laboratory Standards Institute) Precision Performance of Clinical Chemistry Approved Guideline (EP5-A), para ello se procesaron las muestras durante 21 días, realizándose dos mediciones por día. Los resultados del ensayo se recogen abajo:

Precision Summary									
	Mean (mg/L)	Within run		Between run		Between day		Total	
		SD	CV %	SD	CV %	SD	CV %	SD	CV %
Level 1*	2.48	0.07	2.6	0.02	0.8	0.09	3.5	0.11	4.4
Level 2	4.87	0.13	2.6	0.14	2.9	0.32	6.6	0.38	7.7
Level 3	8.17	0.17	2.1	0.14	1.7	0.34	4.1	0.41	5.0
Level 4	13.74	0.23	1.7	0.14	1.0	0.55	4.0	0.61	4.5
Level 5	23.19	0.34	1.5	0.42	1.8	0.61	2.7	0.82	3.5
Level 6	71.79	2.35	3.3	1.27	1.8	2.13	3.0	3.42	4.8
Level 7	105.13	5.52	5.2	0.00	0.0	4.48	4.2	7.11	6.7
Level 8**	329.21	13.32	4.0	5.67	1.7	13.18	4.0	19.58	5.9

Tabla 12: Datos del ensayo de precisión aportados por el fabricante (Adaptado de Insert Code: INS016. M. Optilite, Versión: 26 de Julio 2019. The Binding Site Ltd. Freelite®).

c) Cuantificación de las subunidades de IgG:

Los niveles de IgG1, G2, G3 y G4 en suero se cuantificaron mediante técnica de Turbidimetría (Optilite de BindingSiteLtd).

- Reactivos:

El kit de reactivos utilizado para la medida de las IgGs es igual al empleado para la determinación de las CLL.

Los rangos de medición en suero y en plasma para cada subunidad son las siguientes:

IgG1: 150 - 144000 mg/l.

IgG2: 20 - 28000 mg/l.

IgG3: 5,5 - 2200 mg/l.

IgG4: 4,3 - 64800 mg/l.

- Calibración:

Para asegurar la precisión y exactitud de las determinaciones, se realizó una calibración (6 puntos) previa a las medidas con las muestras del estudio en el equipo Optilite de BindingSiteLtd. Esta calibración se realiza cada cambio de lote de reactivo o ante un resultado del control de calidad fuera de rango. En el eje de ordenadas se representa el resultado de la medición de la luz difundida en bits, y en el eje de abscisas se representa la concentración de cada subunidad en mg/dL para cada punto de la curva de calibración.

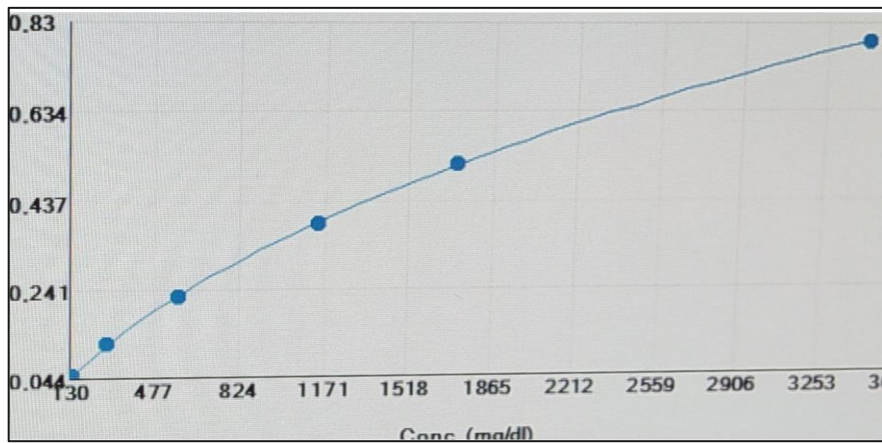


Figura 18: Curva calibración para subunidad IgG1.

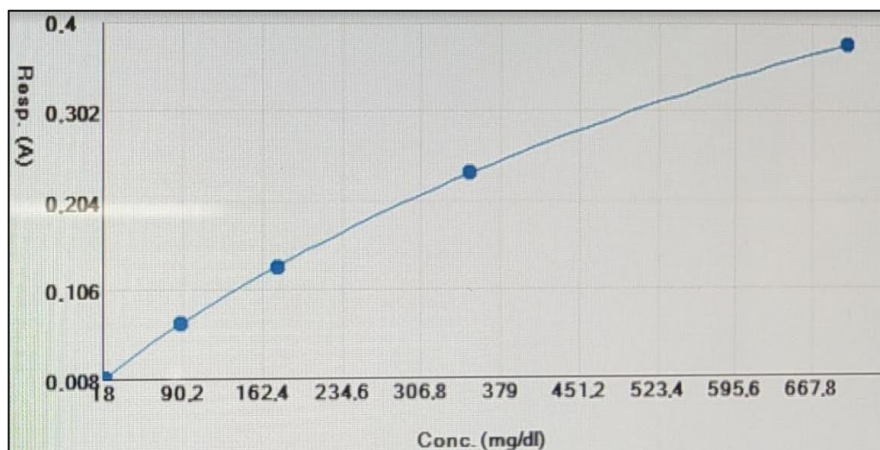


Figura 19: Curva calibración IgG2.

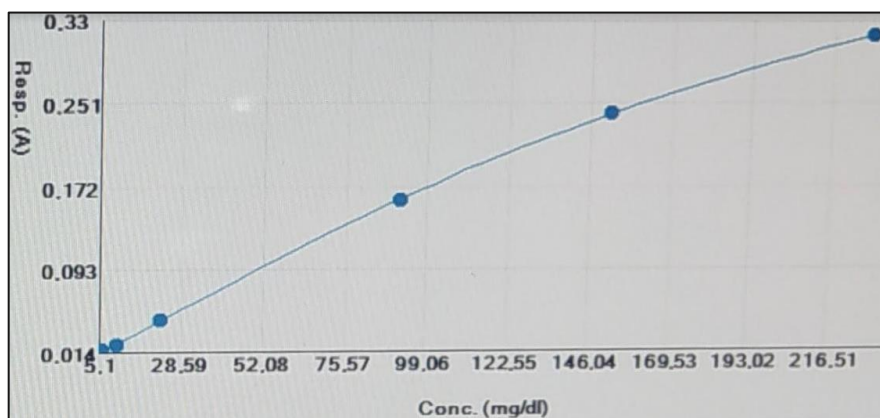


Figura 20: Curva calibración para subunidad IgG3.

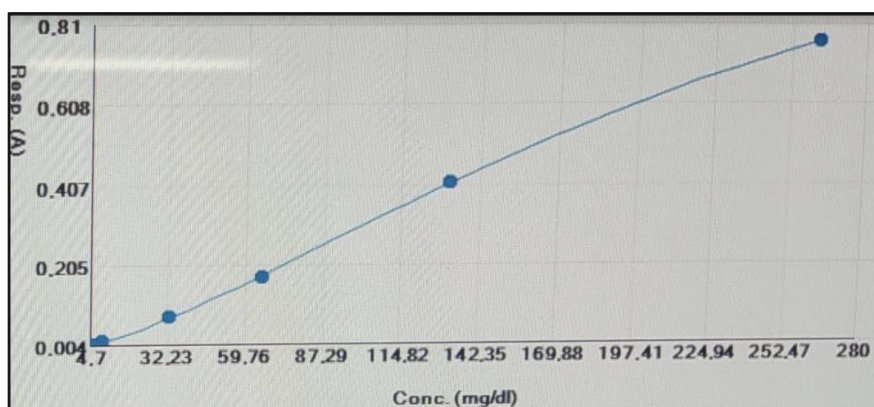


Figura 21: Curva calibración para subunidad IgG4.

- **Controles de calidad:** Los controles de calidad realizados, previos al análisis de las muestras presentan dos concentraciones distintas para IgG1 e IgG2 y tres concentraciones para IgG3 e IgG4, todas ellas conocidas y establecidas por el fabricante. Estos se realizaron de forma previa al procesamiento de las muestras.

El kit utilizado presenta las siguientes concentraciones:

	IgG1	IgG2	IgG3	IgG4
QC1	3674±275,6 (3123-4225)	2637,4±197,81 (2241,8-3033,0)	376,1±28,21 (319,7-432,5)	266,7±20,0 (226,7-306,7)
QC2	6721±504,1 (5713-7729)	4816,7±361,25 (4094,2-5539,2)	677,9±50,84 (576,2-779,6)	482,8±36,21 (410,4-555,2)
QC3	-	-	1510,0±113,25 (1283,5-1736,5)	1719,9±128,99 (1461,9-1977,9)

Tabla 13: Valores de los controles de calidad para las subclases de IgG. Media valor asignado por el fabricante (mg/L), desviación estándar e intervalo de aceptación de los controles empleando la media calculada $\pm 1,96 \cdot DS$. QC1 (control calidad nivel 1), QC2 (control calidad nivel 2) y QC3 (control calidad nivel 3) (Adaptado de BindingSiteLtd).

d) Determinación del Índice IgG (Índice de Tibbling-Link), IgM e IgA.

Para el cálculo de estos índices, se determinaron previamente los niveles de inmunoglobulinas y de albúmina, tanto en suero como en líquido cefalorraquídeo, mediante nefelometría. El equipo utilizado para la cuantificación es el BNII™ (Siemens Healthcare Diagnostics Inc.).



Figura 22: Imagen del equipo BNII™ Siemens Healthcare Diagnostics Inc. En este equipo se realizó la cuantificación de la albúmina y las inmunoglobulinas (Adaptado de Siemens Healthcare Diagnostics Inc.).

Esta técnica se basa en la dispersión de la luz por partículas en suspensión en el seno de una disolución, midiendo la potencia de la radiación dispersada en un ángulo diferente a la dirección del haz incidente, normalmente 90° . La nefelometría considera tres factores principales: la concentración (mayor número de partículas, mayor dispersión), el tamaño de partícula, y la longitud de onda. El nefelómetro BNII™ emplea partículas de látex con el anticuerpo específico fijado, más en concreto, partículas de látex poliestireno recubiertas con anticuerpo de oveja con el anticuerpo policlonal específico fijado en dichas partículas.

e) Determinación en suero de 25-hidroxivitamina D [25(OH)D]

Los niveles de 25(OH)D se cuantificaron mediante inmunoensayo competitivo por quimioluminiscencia (CLIA) en suero. Durante la primera incubación del ensayo, la 25 OH vitamina D se disocia de su proteína de unión y se une al anticuerpo específico en la fase sólida. Transcurridos 10 minutos, se agrega el trazador (vitamina D unida a un derivado de isoluminol). Después de una segunda incubación de 10 minutos, el material libre se elimina en un ciclo de lavado. Posteriormente se agregan los reactivos iniciadores para dar lugar a una reacción quimioluminiscente rápida. La señal luminosa se mide en unidades lumínicas

relativas con un fotomultiplicador y es inversamente proporcional a la concentración de 25 OH vitamina D presente en calibradores, controles o muestras.

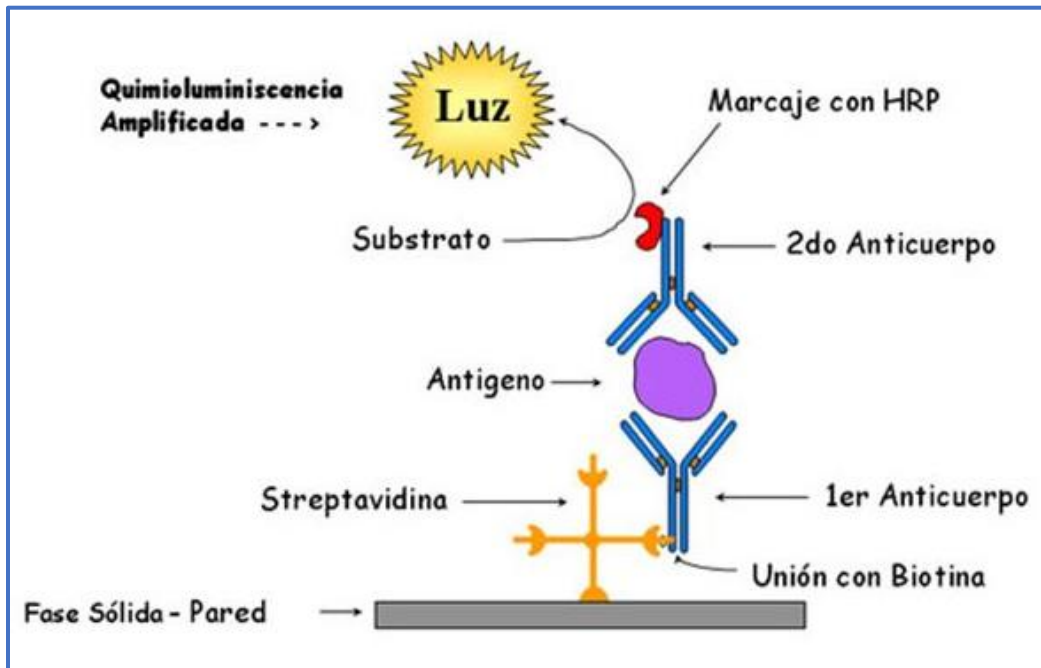


Figura 23: Representación gráfica del fundamento de la quimioluminiscencia empleada para la determinación de los niveles de vitamina D (Adaptado de Diasorin Lt).

En cuanto a los rangos de medida el equipo LIAISON® de DiaSorin mide entre 4 y 150 ng/mL. El mínimo valor presentable es 4 ng/ml, que se basa en una precisión interensayo próxima al 20% de Coeficiente de Variación (sensibilidad funcional). Los valores inferiores a 4 ng/mL deben presentarse como < 4 ng/mL. El máximo valor presentable sin dilución es 150 ng/mL.

3.4. Parámetros clínicos

Las variables incluidas en el estudio fueron demográficas como la edad y el sexo y clínicas. Como variables clínicas se estudiaron:

- Edad de diagnóstico de la enfermedad y edad en el momento de la punción lumbar.
- Valor de la discapacidad en el momento de la PL medida mediante la EDSS, la cual se definió como EDSS basal.
- Valor de la EDSS en un intervalo de 12 a 18 meses tras la PL y a los 5 años de seguimiento, este último en los pacientes con EMRR.
- El grado de empeoramiento:
 - A través de la EDSS en todos los pacientes con EM, definido como un aumento de la puntuación de la EDSS de 1,0 para los pacientes con una EDSS basal entre 0 y 5, y un aumento de 0,5 para los pacientes con una EDSS basal superior a 5.
 - También se estudió el grado de empeoramiento de la discapacidad asociado a la recaída o brotes (RAW, por sus siglas en inglés *Relapse-Associated Worsening*) o independiente de la actividad de los brotes (PIRA, por sus siglas en inglés *Progression Independent of Relapse Activity*) en los pacientes con EMRR, así como el número de recaídas anual durante 5 años de seguimiento.
- Presencia de comorbilidades como diabetes, hipertensión arterial, enfermedades autoinmunes previas, obesidad y dislipemia.
- Factores de riesgo: El tabaco y el estado inmunitario por VEB y citomegalovirus.
- La presencia de tratamiento modificador de la enfermedad.

3.5. Parámetros de Resonancia Magnética

Uno de los parámetros de más valor a considerar por el clínico ante una sospecha de EM es la RMN. En nuestro análisis se han obtenido los datos de las imágenes de la primera RMN de los sujetos incluidos con diagnóstico final de EMCD, la primera RMN que se realiza el paciente en el primer evento clínico con sospecha de enfermedad desmielinizante. Este dato se clasificó como RMN basal, para evaluar este parámetro se recogió si cumplían o no con los criterios de Barkhof-Tintoré en el momento del diagnóstico.

3.6. Análisis Estadístico

Para el análisis estadístico empleamos los programas informáticos SPSS Statistics versión 25 y R Commander 4.0.

Primero se aplicó el test de Kolmogorov-Smirnov para determinar si las variables cuantitativas seguían la normalidad. Para muestras con menos de 30 casos, se aplicó el test de Shapiro-Wilks para el estudio de la normalidad.

Para el estudio de variables cualitativas policotómicas y cuantitativas se emplearon test no paramétricos para comparar los grupos de estudio (variable independiente o predictora cualitativa policotómica), frente a las variables de estudio.

El test de Chi cuadrado o el test de la razón de verosimilitud (cuando más de 3 casillas en la tabla de contingencia, o un 30%, presenten una frecuencia menor de 5) fueron utilizados indistintamente en cada caso como prueba estadística para la comparación entre variables cualitativas.

La Prueba U de Mann-Whitney o la Prueba de Kruskal-Wallis fueron utilizadas para la comparación de datos no paramétricos entre grupos; mientras que el test de Jonckheere-Terpstra fue utilizado para comparar dos grupos independientes en los que la variable predictora era ordinal.

En todos los casos un valor de $p < 0,05$ fue considerado estadísticamente significativo.

Evaluación de las pruebas diagnósticas (Curvas ROC)

Mediante el análisis de curvas ROC (Receiver Operating Characteristic) se determinó la sensibilidad, especificidad, las razones de verosimilitud (o likelihood ratio) positivos y negativos de las variables, estableciéndose puntos de corte para las variables de estudio en los distintos perfiles evolutivos de la enfermedad: índice kappa, el índice de IgG y el índice de IgM.

Las curvas ROC son una representación gráfica de la especificidad y la sensibilidad obtenidos al considerar todos los posibles valores de corte de la prueba, proporcionando una representación global de la exactitud diagnóstica.

Las principales variables de estudio se agruparon y estudiaron como variables categóricas dicotómicas o con más de dos categorías según el punto de corte final según las curvas ROC.

Se realizaron curvas de supervivencia o de Kaplan- Meier donde se valoraron los tiempos de conversión a formas progresivas en los pacientes desde EMRR y los que ya eran EMSP en el momento del estudio. Las curvas de Kaplan-Meier representan el número de casos expuestos al riesgo en cada momento. Para ello se recogió el tiempo en años desde el diagnóstico de EM hasta la fecha del estudio, el número de sujetos que continúan siendo EMRR al finalizar el estudio y el número de casos que presentaron una evolución a EMSP.

A través de estas curvas se calcularon las medianas de supervivencia, y como test de para comparar las diferentes curvas se aplicó el test de log-rank. Para la cuantificación del efecto de las distintas variables se utilizó un modelo multivariante de Cox y se obtuvieron las Hazard Ratios o cocientes de riesgo.

En cuanto al algoritmo de clasificación de las formas progresivas respecto a las remitentes, se realizó un modelo de regresión logística para determinar el mejor modelo de asociación y para calcular los Odds Ratio (OR), es decir, el efecto en la patología, junto con los intervalos de confianza de la distribución del 95% y el valor "p". La regresión logística utiliza el test de máxima verosimilitud y el test de Wald, comparando el efecto de cada variable ajustado por el resto de los marcadores asociados en el análisis inicial. Para evaluar la validez del modelo, se estudió la calibración de este a través del test de Hosmer-Lemeshow y su poder discriminante, a través del área bajo la curva ROC.

4. Resultados

4. RESULTADOS

Para el desarrollo de esta tesis, la cohorte de estudio incluida finalmente fue de 278 casos de los cuales ninguno presentó comorbilidad con gammapatía monoclonal. Del grupo inicial de partida (293 sujetos) se excluyeron 6 casos menores de 14 años, así como pacientes mayores de 80 años del grupo control (9 casos en total) ya que las alteraciones neurológicas estaban relacionadas con la propia senescencia.

El cálculo de la potencia estadística del estudio se realizó con G*Power 3.1. ($p < 0,001$, tamaño del efecto 0,499). La potencia observada fue de 0,99 o 99,0%, con un porcentaje de pacientes con EM e índice Kappa $> 10,62$ del 85% (grupo de expuestos con enfermedad) y un porcentaje de pacientes en el grupo control (grupo expuesto sin enfermedad) con un índice kappa $> 10,62$ de 6,1%. Estos datos indican que el estudio presenta una alta potencia estadística, lo que respalda la confiabilidad de los resultados obtenidos. Se encuentra además una alta concordancia en las evaluaciones de diagnóstico en el grupo de pacientes con patología de EM, mientras que en el grupo de control (sin enfermedad) la concordancia fue significativamente menor, como era de esperar. Estos datos ya de por sí indican que el índice Kappa utilizado es útil para evaluar la concordancia en el diagnóstico de la enfermedad.

El grupo control estaba formado por pacientes que presentaban patologías neurológicas no desmielinizantes y fueron clasificados en tres grupos: enfermedades neurológicas no inflamatorias (ENNI: epilepsia, neuralgias y cefaleas y ataxias), enfermedades neurológicas inflamatorias distintas de la EM (EMI: incluyeron vasculitis, neuritis y encefalitis) y un grupo de miscelánea (hidrocefalia, hipertensión intracraneal, ictus, deterioro cognitivo y otros).

Se analizaron los distintos subgrupos control para ver si existían diferencias estadísticamente significativas con respecto al sexo, la edad en el momento de la punción lumbar diagnóstica y el índice kappa mediante test Chi cuadrado, test de Anova y test de Kruskal-Wallis respectivamente, no encontrándose diferencias entre ellos ($p > 0,05$). De este modo, se comprobó que los distintos subgrupos presentaban una distribución homogénea, lo que permitió un estudio del índice kappa en este grupo como un único conjunto de casos control.

En la siguiente tabla se definen las características demográficas sexo y edad en el momento de la punción lumbar diagnóstica de cada grupo de sujetos incluidos en el estudio:

		Pacientes	Edad media	Sexo	Índice kappa
		(n)	punción lumbar	Mujeres/Hombres (Razón)	
Grupo	Total	163	49,9±16,2	87/76 (1,14)	3,23 (3,50)
CONTROL	ENNI	77	46,6±15,2	42/35 (1,20)	2,88 (3,01)
	ENI	35	46,3±14,9	19/16 (1,19)	3,84 (5,48)
	Miscelánea	51	57,3±16,1	26/25 (1,04)	2,92 (3,38)
SNA		6	35,2±11,8	4/2 (2,0)	128,99 (206,9)
EMRR		58	37,8±10,3	35/23 (1,52)	83,11 (92,95)
EMSP		24	46,4±11,0	16/8 (2)	51,75 (116,87)
EMPP		27	51,4±8,0	17/10 (1,7)	33,58 (90,53)

Tabla 14: Características de cada grupo. En la tabla se describe la edad media en el momento de la punción lumbar, edad media en el momento del diagnóstico y el sexo. El grupo de estudio con EM fue dividido en SNA y los grupos correspondientes a los distintos fenotipos de EM, EMRR, EMSP y EMPP respectivamente. La edad de la punción lumbar está representada como media y desviación estándar, mientras que el índice Kappa está representado como mediana y rango intercuartílico, según test de normalidad (test de Shapiro-Wilk).

En el grupo de pacientes con EM se tuvo en cuenta si presentaban tratamiento modificador de la enfermedad en el momento de la punción lumbar, en este caso el 50% de los pacientes con EMSP, en las que el diagnóstico inicial fue de EMRR, contaban con tratamiento en el momento de la punción lumbar. Estos pacientes presentan una larga evolución de la enfermedad (de más de 10 años) que fue recogida en la base de datos del estudio.

Se estudió la normalidad de la variable edad en el momento de la punción lumbar a través de los test de Kolmogorov-Smirnov en el grupo control y Shapiro-Wilk en los grupos de casos. En todos ellos se obtuvieron una $p > 0,05$, asumiendo de este modo normalidad.

Como podemos observar en la tabla 14, la edad en el subtipo EMPP fue superior al resto de los casos (51,4±8,0), mientras que los pacientes con diagnóstico de SNA fueron los que presentaron una menor edad con respecto al resto (35,2±11,8).

En cuanto al sexo de los pacientes con EM, cabe destacar que en todos los fenotipos se observa un mayor número de mujeres que de hombres. La mayor prevalencia de esta

enfermedad en mujeres respecto a hombres está claramente demostrada, pero hay que resaltar que la ratio es superior en los casos en que la progresión de la enfermedad ha avanzado hasta EMSP.

Al estudiar las variables edad en el momento de la PL y el sexo entre los distintos fenotipos mediante las respectivas pruebas de contrastes T de Student y Chi-cuadrado, se obtuvieron los siguientes resultados:

	EDAD PL (valor p, test T-student)	SEXO (valor p, Chi ²)
Control-EMRR	0,000	0,841
Control-EMSP	0,191	0,222
Control-EMPP	0,655	0,354
EMRR-EMPP	0,000	0,053
EMRR-EMSP	0,003	0,289
EMPP-EMSP	0,084	0,076

Tabla 15: Resultados test de contraste para las variables edad en el momento de la punción lumbar (edad PL) y el sexo. Se comparan ambas variables en función del subtipo diagnóstico mediante las pruebas estadísticas T de Student, para la edad PL, y Chi-cuadrado para el sexo. Se considera estadísticamente significativo un valor de $p < 0,05$.

4.1. Estudio de los factores de Riesgo

Tanto en el grupo control como en los distintos fenotipos de EM se estudió la presencia de comorbilidades y otros posibles factores de riesgo previos relacionados con la EM que han sido descritos en la literatura. Entre ellos se encuentra, la diabetes mellitus (tanto tipo 1 como tipo 2), otras enfermedades autoinmunes concomitantes (tiroiditis autoinmune, celiaquía y enfermedades reumáticas autoinmunes sistémicas como lupus, síndrome de Sjogren, conectivopatías, enfermedad mixta del tejido conectivo, entre otras), la obesidad, los virus de Epstein-Barr y el citomegalovirus y el hábito tabáquico. Los resultados obtenidos tras la correlación y el test de contraste entre las variables indicadas se exponen en la tabla 16. Uno de nuestros objetivos secundarios era estudiar los diferentes factores de riesgo que se asocian a EM y establecer algún tipo de relación con la progresión de la enfermedad. En el caso de la presencia de anticuerpos frente al virus Epstein-Barr y citomegalovirus, no todos los pacientes estudiados presentaban serología para dichos virus, por lo que el tamaño de la muestra es inferior a la totalidad de los casos incluidos en el estudio (66 casos con serología para VEB y 101 casos para citomegalovirus).

Para el contraste de hipótesis se utilizó el test de la razón de verosimilitud, ya que el test de Chi cuadrado pierde fiabilidad cuando más de 3 casillas en las tablas de contingencia (aproximadamente un 30% de la tabla) presentan una frecuencia menor de 5. En nuestro caso, todas las variables estudiadas como factores de riesgo presentaban más de tres casillas con una frecuencia menor de 5. El test de la razón de verosimilitud se basa en el cociente entre las frecuencias observadas y esperadas.

El coeficiente V de Cramer ha sido el utilizado para ver la asociación de las variables cuando sus categorías son de dos o tres clases, funcionando como una medida de la fuerza de asociación entre dos o más variables, pero no indica el sentido o dirección de tal asociación o relación. Este coeficiente va de 0 a 1, resultados del coeficiente entre 0 y 0,2 indica que no hay asociación, un coeficiente de 0,2 indica una asociación débil, entre 0,2 y 0,6 indica una asociación moderada y un resultado del coeficiente entre 0,6 y 1 indica una asociación fuerte entre las variables.

FACTORES DE RIESGO		DIAGNOSTICO					Test contraste valor p	Test asociación (V de Cramer)
		Control	SNA	EMRR	EMSP	EMPP		
TABAQUISMO	EX	24	1	2	2	6	15,51* p=0,047	0,160(p=0,075)
	NO	82	4	39	18	15		
	SI	57	1	17	4	6		
DIABETES	NO	139	6	57	20	26	10,57* p=0,008	0,195 (p=0,032)
	SI	24	0	1	4	1		
OBESIDAD	NO	149	6	54	24	25	2,81* p=0,294	0,101 (p=0,590)
	SI	14	0	4	0	2		
VEB	NO	6	0	2	0	1	16,232* P=0,039	0,160 (p=0,078)
	SI	36	3	15	2	1		
CITOMEGALOVIRUS	NO	6	1	15	1	2	31,612* P=0,001	0,238 (0,000)
	SI	48	3	13	5	7		
ENFERMEDAD AUTOINMUNE PREVIA	NO	146	5	57	23	23	6,583 p=0,093	0,154 (p=0,160)
	SI	17	1	1	1	4		

Tabla 16: Características y recuento de las distintas comorbilidades y factores de riesgo en cada grupo diagnóstico. Se realiza el contraste de hipótesis con el test de razón de verosimilitud, que es más fiable en estos casos, ya que todas nuestras variables presentan más de tres casillas con un recuento menor de 5.

Las patologías autoinmunes concomitantes encontradas en nuestra cohorte fueron 12 casos de hipotiroidismo autoinmune, 3 casos de enfermedad de Graves, 3 casos de artritis reumatoide, 1 caso de enfermedad de Crohn, 1 caso de lupus eritematoso sistémico, 1 caso de enfermedad celíaca, 1 caso de artritis psoriásica, 1 caso de síndrome de Sjögren y 1 caso de trombocitopenia autoinmune.

Como se muestra en la tabla 16, sólo la diabetes, la presencia de anticuerpos frente a los virus Epstein-Barr y citomegalovirus presentaron diferencias estadísticamente significativas entre los grupos según el test de Chi cuadrado, pero al realizar el test V de Cramer, la fuerza de esta asociación entre las variables fue nula para VEB y débil para diabetes (resultados coeficiente inferiores a 0,2), a excepción del citomegalovirus que presenta una asociación moderada con un coeficiente ligeramente superior de 0,238.

Otro factor de riesgo estudiado es el nivel de Vitamina D. Se determinaron los niveles de vitamina D en el momento del diagnóstico (o en el momento del cambio a EMSP en estos casos) con una ventana de un mes aproximadamente. Sólo 135 pacientes presentaban valores de Vitamina D. La distribución en los distintos grupos no siguió normalidad (según test Shapiro-Wilk y Kolmogorov-Smirnov), por lo que los valores se evaluaron como mediana y rango intercuartílico (RIC). Los resultados se pueden observar en la siguiente tabla.

		N	Mediana ng/mL (RIC)	Test Shapiro-Wilk
Vitamina D	Control	56	18,30 (10,7)	0,002
	EMRR	42	21,55 (8,8)	0,0001
	EMSP	16	14,30(12,5)	0,009
	EMPP	21	16,30 (10,70)	0,014
Test Kruskal Wallis: p=0,022				
Test de Mann-Whitney por parejas			EMRR vs EMPP p= 0,024	
			EMRR vs EMSP p= 0,011	

Tabla 17: Resumen de los valores analíticos de vitamina D y su distribución en los distintos grupos, expresados en mediana y rango intercuartílico (RIC). El test de Shapiro-Wilk mostró que la distribución de la variable en los distintos grupos no presentaba normalidad ($p < 0,05$), con lo que se realizó prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis. En la tabla se muestran los resultados estadísticamente significativos en el test por parejas U de Mann-Whitney ($p < 0,05$).

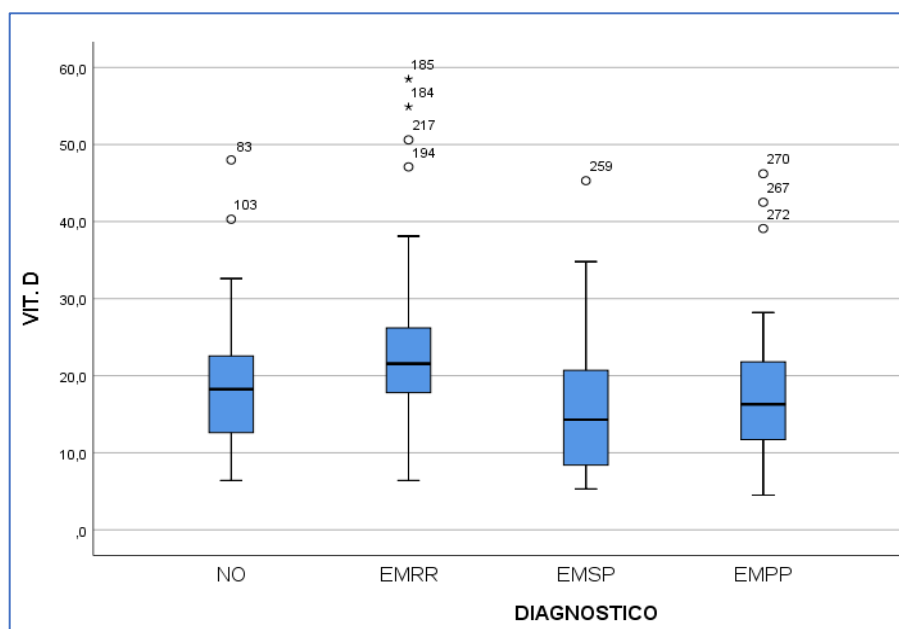


Figura 24: Niveles de vitamina D en función del diagnóstico. En el eje de ordenadas se representan los valores de vitamina D en ng/mL y en el eje de abscisa los distintos grupos diagnósticos. Se considera un rango normal de vitamina D por encima de 30 ng/mL (Varsavsky M, 2017).

En la figura 24 se puede observar como las formas progresivas presentan valores medios de vitamina D inferiores al resto de grupos.

Al estudiar los grupos de acuerdo con sus medianas con la prueba de Kruskal Wallis, encontramos diferencias estadísticamente significativas entre el grupo control y los distintos subtipos de EM ($p=0,022$). Al analizar los grupos por parejas (test de Mann-Whitney) y tras ajuste mediante la corrección de Bonferroni, se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre los grupos EMRR y EMSP y entre EMRR y EMPP ($p=0,011$ y $p=0,024$, respectivamente) (Tabla 17).

Como podemos observar todos los individuos de nuestro estudio presentan valores bajos de vitamina D, aunque en las formas progresivas, tanto secundarias como primarias, este déficit es más marcado con respecto al resto de los grupos. La mayoría de los datos que relacionan la vitamina D y la EM provienen de estudios realizados sobre pacientes con EMRR, pero los pocos datos existentes en pacientes con fenotipos progresivos sugieren que los niveles de vitamina D son más bajos en estos subtipos con respecto a la EMRR y que el déficit de vitamina D puede predecir la conversión a EMSP (Muris AH, 2016; Smolders J, 2008).

Los niveles bajos de vitamina D observados en el grupo control, podrían ser a consecuencia de la edad en este grupo, el cual es el segundo grupo con mayor edad media, detrás de los pacientes con EMPP, y también a un mayor número de patologías y comorbilidades previas, las cuales pueden asociarse a niveles bajos de vitamina D (Varsavsky M, 2017; Murdaca G, 2019).

4.2. Síntesis Intratecal de Inmunoglobulinas

Para la valoración de la síntesis intratecal de inmunoglobulinas se determinaron las CLL kappa en LCR, la concentración de las inmunoglobulinas G, A y M en suero y en LCR y la determinación de las BOC IgG en LCR. Además, se calculó el Índice de IgG o índice de Tibbling-Link, el Índice de IgM, el Índice de IgA y el Índice Kappa.

Dado que las variables estudiadas previamente mediante el test de Shapiro-Wilk y Kolmogorov-Smirnov, no siguen una distribución normal, se calcularon las medianas y los rangos intercuartílicos para cada grupo (Tabla 18).

		INDICE KAPPA (mediana y IQR)	CLL κ LCR (mg/L) (mediana y IQR)	INDICE IgG (mediana y IQR)	INDICE IgM (mediana y IQR)	INDICE IgA (mediana y IQR)	BOCG (+/-)	TRATAMIENTO (SÍ/NO)
CONTROL	163	3,23 (3,50)	0,30 (0,06)	0,48 (0,08)	0,06 (0,08)	0,29 (0,16)	12/145	-
SNA	6	128,99 (206,9)	3,52 (11,19)	0,91 (0,92)	0,07 (0,27)	0,25 (0,17)	5/1	-
EMRR	58	83,11 (92,95)	4,28 (7,09)	0,75 (0,69)	0,08 (0,13)	0,32 (0,10)	55/3	12/46
EMSP	24	51,75 (116,87)	2,86 (4,35)	0,63 (0,66)	0,09 (0,05)	0,28 (0,15)	24/0	12/12
EMPP	27	33,58 (90,53)	2,02 (6,37)	0,68 (0,23)	0,09 (0,10)	0,29 (0,09)	24/3	0/27
Test de Kruskal Wallis, p valor		0,000	0,000	0,000	0,005	0,230	-	-

Tabla 18: Resumen de las distintas variables asociadas a la síntesis intratecal de inmunoglobulinas en función de los distintos perfiles evolutivos y el grupo control. Se recogen las medianas y los IQR (diferencia entre el valor del primer cuartil y el tercer cuartil) de las CLL kappa en LCR, los distintos índices (IgG, IgM, IgA e índice Kappa) y el número de pacientes con BOCG positivas y negativas en función del diagnóstico. También se recogen los pacientes con EM con presencia o ausencia de tratamiento modificador de la enfermedad en el momento de la punción lumbar. Se recoge el valor de p del Test estadístico de Kruskal Wallis.

Como se muestra en la tabla 18, la mediana del grupo control para el índice kappa se estableció en 3,23 (IQR: 3,50), mucho menor que los presentados por los distintos grupos de EM, a su vez las formas progresivas presentan niveles más moderados de índice Kappa con respecto a los grupos EMRR y SNA.

Para el estudio comparativo sólo tuvimos en cuenta los casos con EM confirmada, excluyendo los 6 casos con SNA, ya que el número de casos no era lo suficientemente grande

estadísticamente para obtener resultados diferenciales. Los pacientes con SNA son los que presentaron una mediana de índice Kappa mayor con respecto al resto de los grupos con EMCD.

En primer lugar, se realizó el análisis de los pacientes con EM en función de si se encontraban en tratamiento en el momento de la punción lumbar, con el objetivo de descartar posibles sesgos en las variables estudiadas. Como podemos observar en la tabla 18, el 50% de los pacientes con EMSP presentaban tratamiento en el momento de la punción lumbar. En el caso concreto de los pacientes con EMPP, hasta el 2018 no hubo un tratamiento aprobado para estos pacientes, por lo que ningún paciente tenía tratamiento modificador de la enfermedad.

En el grupo con EMRR y EMSP, se analizaron las diferencias en las variables estudiadas (índices Kappa e índices IgG, IgM e IgA y CLL kappa en LCR) en función de la presencia de tratamiento previo o no en el momento de la punción lumbar, para ello se aplicó la prueba no paramétrica U de Mann-Whitney. Este test nos indicó que no existían diferencias estadísticamente significativas en las medianas de las distintas variables de estudio en el grupo con EMRR y EMSP en función de la presencia del tratamiento ($p > 0,05$), con lo cual se procedió a estudiar las distintas variables en su conjunto en ambos grupos.

Cuando estudiamos todos los grupos de acuerdo con las medianas de las CLL κ en LCR y los diferentes índices, encontramos globalmente diferencias estadísticamente significativas entre ellos aplicando la prueba de Kruskal-Wallis ($p < 0,05$), excepto en el índice IgA (Tabla 18).

A continuación, se realizó el análisis de los grupos por parejas, aplicando el test estadístico U de Mann-Whitney. Este análisis dio como resultado que todas las variables (índices Kappa e índices IgG e IgM y CLL kappa en LCR) en todos los fenotipos de EM presentaron diferencias estadísticamente significativas con el grupo control, excepto el índice de IgA, tal como se describe en la tabla 19. En el caso del índice IgM las diferencias fueron entre el grupo control y las formas progresivas (EMSP y EMPP). En cuanto al índice de IgA, sólo presentaron diferencias estadísticamente significativas entre el grupo control y el grupo EMRR (Tabla 19 y Figura 25, 26 y 27). En cuanto al análisis por parejas del índice kappa entre fenotipos EMRR y fenotipos progresivos, las diferencias entre EMPP y EMRR se quedaron en el límite de la significancia estadística ($p = 0,051$), mientras que el análisis por parejas entre el grupo EMRR y

el conjunto de casos con fenotipos progresivos mostraron diferencias estadísticamente significativas para el índice kappa ($p=0,027$) (Tabla 19).

		CLLx LCR	Índice kappa	Índice IgG	Índice IgM	Índice IgA
Test Kruskal Wallis p global		0,000	0,000	0,000	0,005	0,230
U Mann-Whitney p	Control-EMRR	0,000	0,000	0,000	0,047	0,046
	Control-EMSP	0,000	0,000	0,000	0,005	0,368
	Control-EMPP	0,000	0,000	0,000	0,013	0,545
	EMRR-EMPP	0,084	0,051	0,230	0,524	0,255
	EMRR-EMSP	0,522	0,258	0,187	0,335	0,447
	EMPP-EMSP	0,195	0,336	0,491	0,985	0,947
	EMRR-Formas progresivas (EMPP+EMSP)	0,133	0,027	0,119	0,325	0,236

Tabla 19: Resultados del test global de Kruskal Wallis y del test por parejas U Mann-Whitney de las distintas variables recogidas. También se recoge los valores p de todas las comparaciones de cada subtipo frente al control.

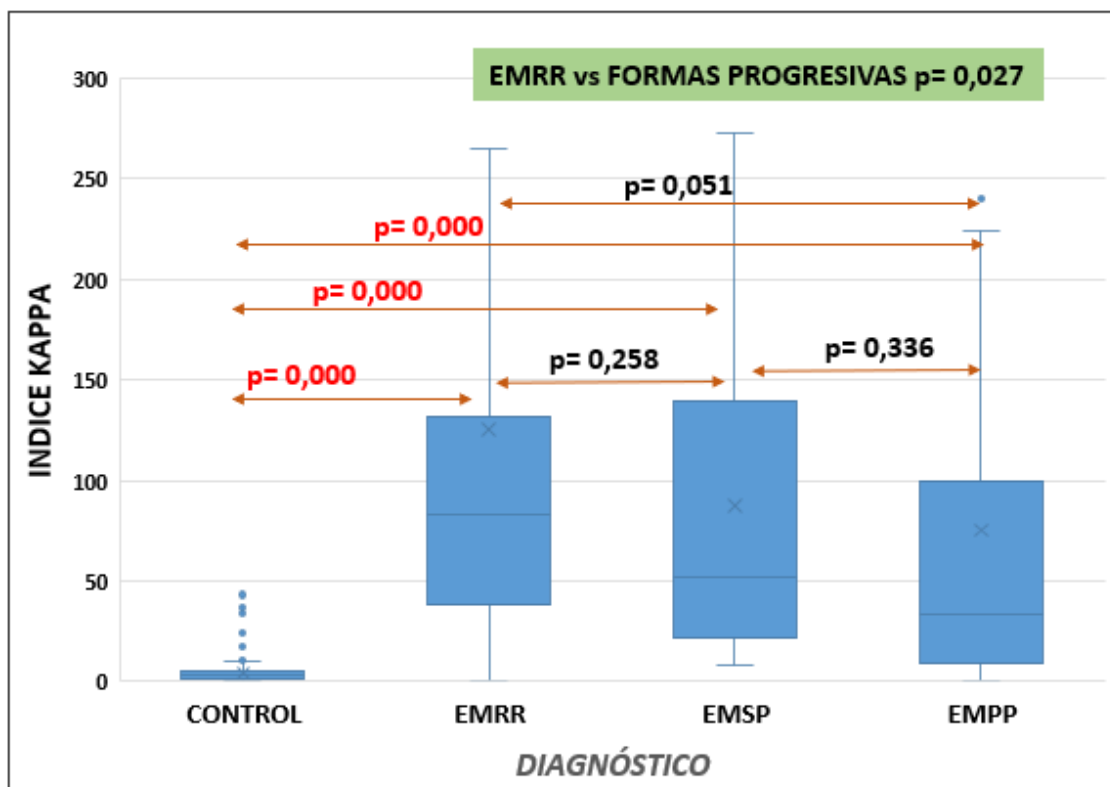


Figura 25: Representación mediante diagrama de cajas y bigotes del análisis por parejas mediante test U Mann-Whitney para el Índice Kappa entre los distintos fenotipos de EM y el grupo control. Se representan la mediana y los percentiles 25 y 75 (cajas coloreadas en azul); el mínimo y máximo

(barras de error); y los outliers (*). Se representan los valores p significativos entre los grupos (flechas). Los resultados del análisis por parejas muestran diferencias entre el grupo control y cada uno de los grupos patológicos y entre el grupo con EMRR y las formas progresivas (recuadro verde).

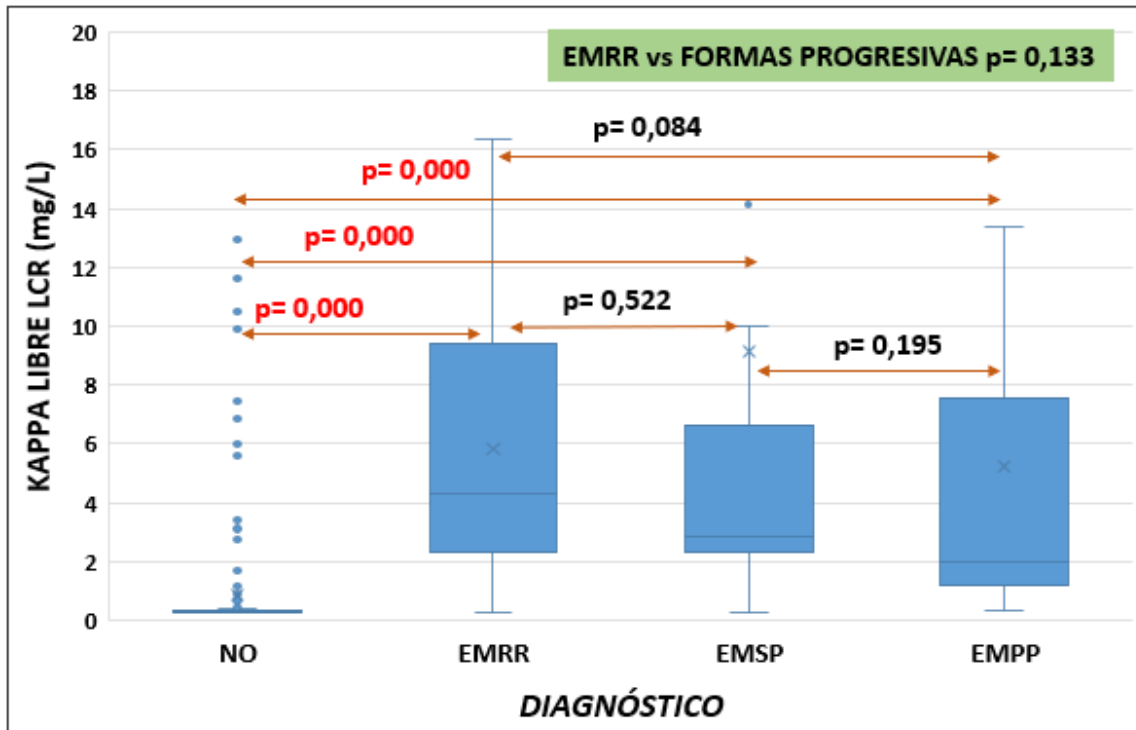


Figura 26: Representación mediante diagrama de cajas y bigotes del análisis por parejas mediante test U Mann-Whitney para CLL kappa en LCR entre los fenotipos de EM y el grupo control. Se representan la mediana y los percentiles 25 y 75 (cajas coloreadas en azul); el mínimo y máximo (barras de error); y los outliers (*). Se representan los valores p significativos entre los grupos (flechas). Los resultados del análisis por parejas sólo encontraron diferencias estadísticamente significativas entre el grupo control y cada uno de los fenotipos de EM, pero no se encontraron diferencias entre los fenotipos de EM entre sí.

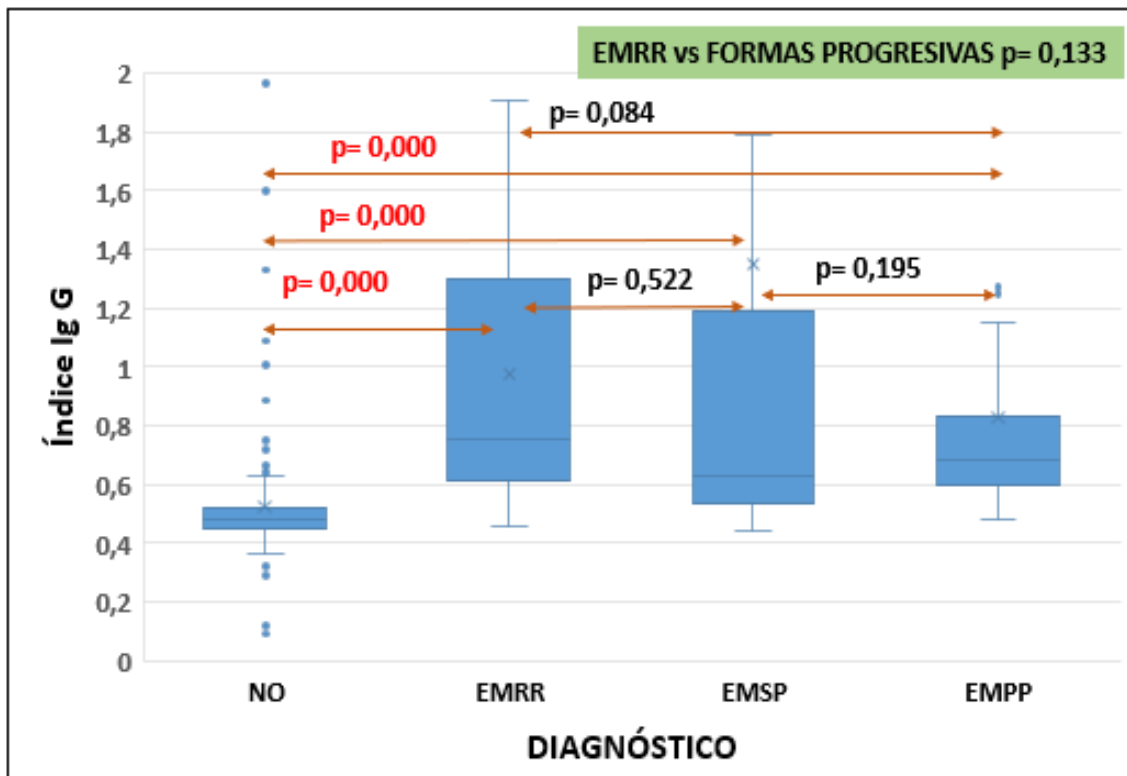


Figura 27: Representación mediante diagrama de cajas y bigotes del análisis por parejas mediante test U Mann-Whitney para los valores del Índice de IgG entre los distintos fenotipos de EM. Los resultados del análisis por parejas sólo encontraron diferencias estadísticamente significativas entre el grupo control y cada uno de los fenotipos de EM, pero no se encontraron diferencias entre los fenotipos de EM entre sí.

4.2.1. Estimación de puntos de corte para el Índice Kappa según perfil evolutivo de EM

Según los resultados del análisis comparativo de los distintos índices y la concentración de las CLL kappa en LCR en función del perfil de EM, encontramos diferencias estadísticamente significativas entre el grupo control y el resto de los fenotipos. Además, el índice Kappa presentó diferencias estadísticamente significativas entre los pacientes que se encontraban en la fase de EMRR y los que presentaban un fenotipo progresivo (EMPP y EMSP), con un valor de p de 0,027. Estos datos sugieren que el índice Kappa pudiera estar relacionado con la progresión de la enfermedad, lo cual ha sido objetivo de estudio en esta tesis. En primer lugar, se llevó a cabo la obtención de los puntos de corte del índice Kappa correspondientes a cada uno de los fenotipos de EM, con el fin de conocer si hay puntos de corte que puedan diferenciar si nos encontramos en una fase remitente recidivante o en un contexto progresivo de la enfermedad. En dicho cálculo, se incluyó también la determinación de los puntos de corte de los índices de IgG, al ser el índice actual empleado y relacionado directamente con el diagnóstico de los pacientes y, comprobar también si mantiene alguna capacidad discriminatoria de progresión o sólo es fiable desde el punto de vista diagnóstico. El cálculo se llevó a cabo mediante el análisis de las curvas ROC.

Los métodos estadísticos para la determinación del punto de corte se engloban en dos grandes categorías: los métodos orientados a datos, dentro de los cuales están los métodos gráficos y los basados en el cálculo de los cuantiles, y los métodos orientados a resultados, que proporcionan un valor de punto de corte en correspondencia con la relación más significativa con los resultados (Mandrekar JN, 2003).

➤ Métodos orientados a datos:

Dentro de este tipo de metodologías, encontramos la representación gráfica de la variable de estudio mediante gráfica de dispersión de puntos o de líneas. En este tipo de metodología el punto de corte estaría definido por el valor de la variable dónde se produciría un aumento o disminución significativo en el porcentaje de casos.

Otra metodología orientada a datos es mediante el cálculo de cuantiles, para el cual es necesario que la variable presente una distribución normal. Este método se basa en el modelo de distribución de la probabilidad en una curva Gaussiana.

Los principales inconvenientes de estos métodos para la obtención de puntos de corte es su poca precisión y su baja exactitud diagnóstica (Mazumdar M, 2000).

➤ Métodos orientados a resultados:

Entre estos métodos nos encontramos el Cálculo del Chi cuadrado y el OR en tablas de contingencia 2x2 y el índice de Youden mediante el uso de las coordenadas de la curva ROC, el cual fue finalmente la metodología empleada en nuestro estudio.

Las curvas ROC representan “sensibilidad” frente a la “1-especificidad” y se obtienen al considerar todos los posibles valores de corte en la escala de resultados de la prueba. La exactitud de la prueba aumenta a medida que la curva se desplaza desde la diagonal hacia el vértice superior izquierdo obteniendo así una mayor área bajo la curva (AUC). Se puede considerar como un índice de la exactitud global de la muestra. Esta área posee un valor comprendido entre 0,5 y 1, donde 1 representa un valor diagnóstico perfecto y 0,5 es una prueba sin capacidad discriminatoria diagnóstica (Zou KH, 2007).

Una vez obtenidas todas las coordenadas de la curva, se calculó el Índice de Youden (estadístico J) para cada una de ellas a través de la siguiente fórmula:

$$J = \text{Especificidad} + \text{sensibilidad} - 1$$

El índice de Youden es una prueba estadística que informa del rendimiento de una prueba de diagnóstico. Es utilizada conjuntamente con la curva ROC para el cálculo del punto de corte de una variable cuantitativa. El índice J está representado gráficamente como la altura por encima de la línea de posibilidad, y es también equivalente al AUC de un único punto operativo.

Aquel punto con un mayor Índice de Youden representa el punto de corte óptimo. Este tipo de metodología para la estimación del punto de corte se engloba dentro de los métodos orientados a resultados como más adelante detallaremos.

Se calcularon los distintos puntos de corte del índice kappa en función de los distintos subtipos de la enfermedad frente a los controles para las variables índice Kappa, índice de IgG e índice de IgM, ya que presentaron diferencias estadísticamente significativas entre los fenotipos y el grupo control, tal como indicamos anteriormente en la tabla 19.

Los resultados de cada grupo se muestran en la siguiente tabla:

		AUC (IC95%)	Punto de corte	Sensibilidad (IC95%)	Especificidad (IC95%)	VPP (IC95%)	VPN (IC 95%)
Índice KAPPA	Control vs EMRR	0,911 (0,847-0,976)	9,045	0,89 (0,82-0,97)	0,92 (0,88-0,96)	0,80 (0,70-0,90)	0,96 (0,93-0,99)
	Control vs EMSP	0,982 (0,967-0,998)	8,640	1,00 (1,00-1,00)	0,91 (0,87-0,96)	0,63 (0,48-0,78)	1,00 (1,00-1,00)
	Control vs EMPP	0,895 (0,809-0,981)	8,792	0,78 (0,62-0,93)	0,91 (0,87-0,96)	0,60 (0,44-0,76)	0,96 (0,93-0,99)
	Control vs EM progresivas	0,936 (0,882-0,796)	8,64	0,88 (0,79-0,97)	0,91 (0,87-0,96)	0,76 (0,65-0,87)	0,96 (0,93-0,99)
Índice IgG	Control vs EMRR	0,883 (0,834-0,932)	0,595	0,79 (0,69-0,90)	0,88 (0,83-0,93)	0,71 (0,60-0,82)	0,92 (0,88-0,96)
	Control vs EMSP	0,824 (0,737-0,911)	0,525	0,79 (0,63-0,95)	0,75 (0,68-0,82)	0,32 (0,20-0,43)	0,96 (0,93-0,99)
	Control vs EMPP	0,895 (0,844-0,946)	0,535	0,93 (0,83-1,02)	0,79 (0,72-0,85)	0,42 (0,29-0,54)	0,98 (0,96-1,00)
Índice IgM	Control vs EMRR	0,611 (0,526-0,697)	0,066	0,62 (0,50-0,75)	0,55 (0,48-0,63)	0,33 (0,24-0,42)	0,80 (0,73-0,88)
	Control vs EMSP	0,677 (0,585-0,770)	0,079	0,67 (0,48-0,86)	0,66 (0,58-0,73)	0,22 (0,13-0,32)	0,93 (0,88-0,98)
	Control vs EMPP	0,649 (0,540-0,758)	0,079	0,63 (0,45-0,81)	0,66 (0,58-0,73)	0,23 (0,14-0,33)	0,91 (0,86-0,97)

Tabla 20: Datos extraídos del análisis de las curvas ROC para las variables índice kappa, índice de IgG e índice de IgM entre los distintos subtipos de EM y el grupo control. Para el índice Kappa también se muestra el análisis de las curvas ROC entre el conjunto de fenotipos progresivos (EMPP y EMSP) vs grupo control (IC: intervalo de confianza, VPP: valor predictivo positivo, VPN: valor predictivo negativo y AUC: área bajo la curva).

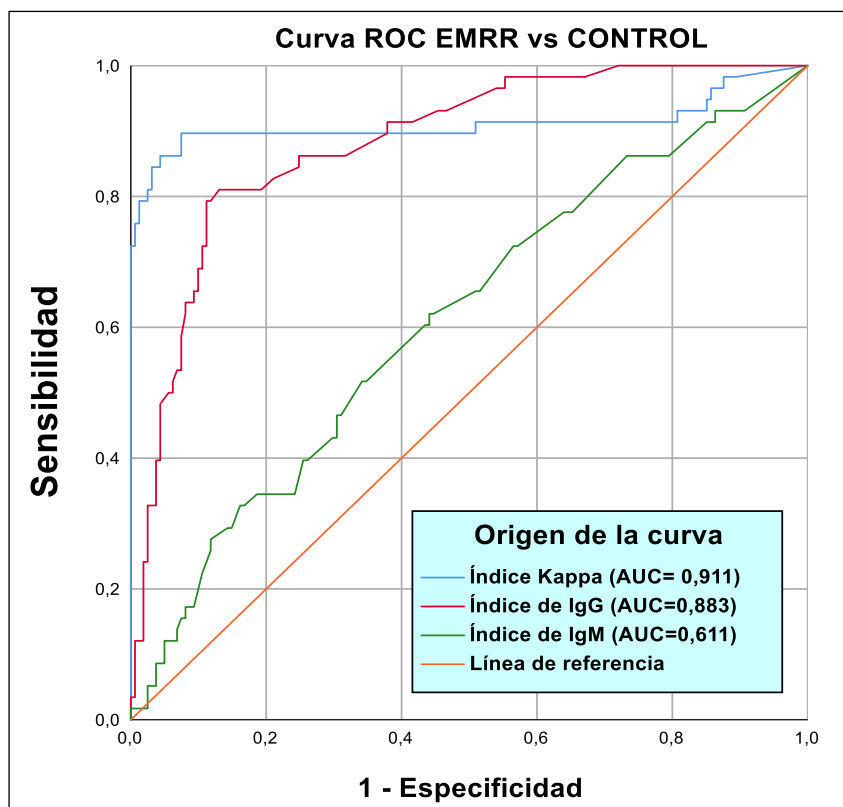


Figura 28: Curvas ROC (Receiver Operating Characteristic) de las variables índice Kappa, índice de IgG e índice de IgM entre los pacientes con EMRR frente al grupo control. Comparación de las curvas para el índice IgG (línea roja), índice kappa (línea azul) e índice IgM (línea verde). Cada punto de la curva ROC corresponde a un posible punto de corte del test diagnóstico, y nos informa de su sensibilidad (eje Y), y de 1-especificidad (eje x). Ambos ejes incluyen valores entre 0 y 1 (0%-100%). La línea trazada desde el punto con coordenadas 0.0, 0.0 al punto con coordenadas 1.0, 1.0 recibe el nombre de línea de referencia (línea naranja).

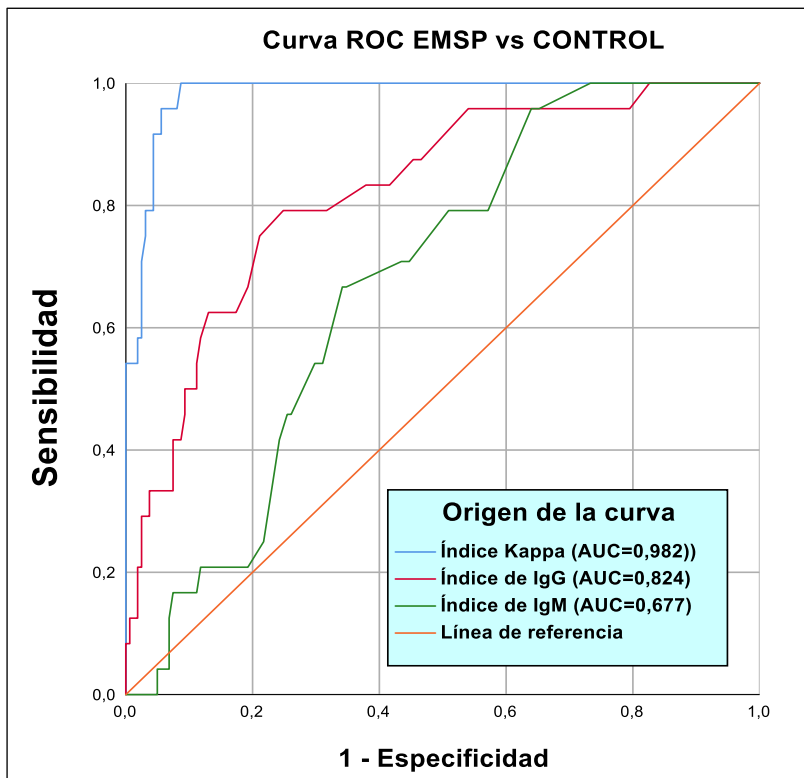


Figura 29: Curvas ROC de las variables índice Kappa, índice de IgG e índice de IgM entre los pacientes con EMSP frente al grupo control. Comparación de las curvas para el índice IgG (línea roja), índice kappa (línea azul) e índice IgM (línea verde).

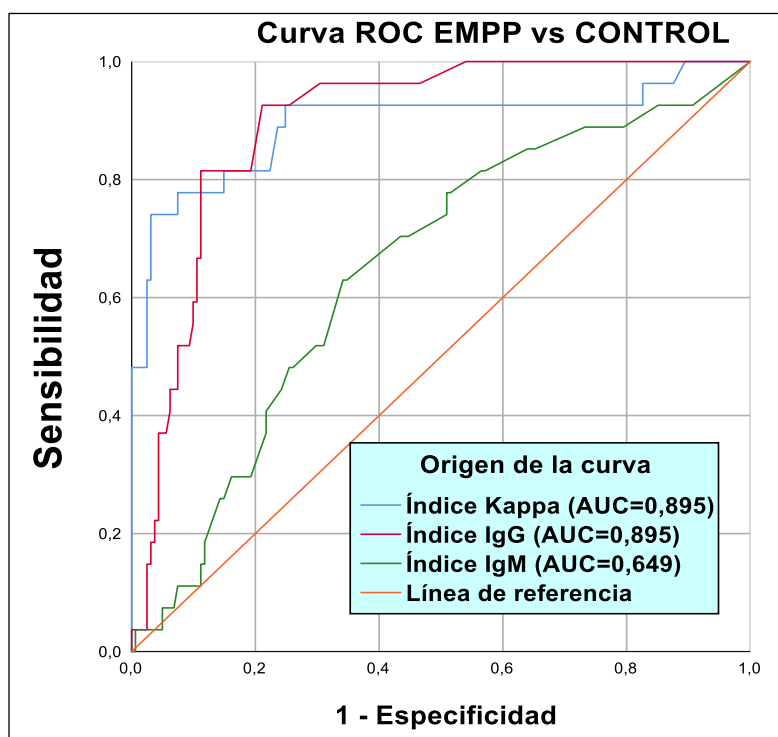


Figura 30: Curvas ROC de las variables índice Kappa, índice de IgG e índice de IgM entre los pacientes con EMPP frente al grupo control. Comparación de las curvas para el índice IgG (línea roja), índice kappa (línea azul) e índice IgM (línea verde).

Cabe destacar de la tabla 20, el buen rendimiento diagnóstico del índice Kappa para los distintos fenotipos de EM con respecto al índice de IgG o de Tibbling-Link, excepto para los pacientes con EMPP frente al grupo control, el cual el índice Kappa presentó una ligera disminución de la sensibilidad, pero un claro aumento de la especificidad con respecto al índice de IgG.

En cuanto al índice IgM, presenta una peor eficacia diagnóstica con respecto al resto de los índices, siendo mayor en los pacientes con fenotipos progresivos con respecto a los pacientes con EMRR. Al analizar el punto de corte obtenido para EMPP y para EMSP de 0,079 frente al resto de grupos (Tabla 21), observamos que un 62,9% de los pacientes con EMPP y un 66,7% de los pacientes con EMSP superan este valor umbral frente al 51,7% de los pacientes con EMRR.

		Control	EMRR	EMSP	EMPP
Índice IgM	<0,079	108 (70,1%)	28 (48,3%)	8 (33,3%)	10 (37,1%)
	>0,079	46 (29,9%)	30 (51,7%)	16 (66,7%)	17 (62,9%)
	Total	154 (100%)	58 (100%)	24 (100%)	27 (100%)

Tabla 21: Resumen del número de casos de cada subgrupo que superan o no el valor del punto de corte para el índice IgM de 0,079 calculado. 154 pacientes del grupo control presentaban datos de síntesis intratecal de IgM frente a 9 pacientes que no presentaban datos de la cohorte inicial.

Estos resultados nos sugieren que el índice kappa puede apoyar el diagnóstico de los fenotipos progresivos como prueba complementaria junto con otros parámetros para la clasificación de la enfermedad.

Después de analizar los distintos índices con respecto al grupo control, procedimos a representar de forma gráfica los valores del índice kappa en función del tipo de perfil evolutivo de la enfermedad, remitente-recurrente frente al subtipo progresivo, obteniendo el siguiente histograma.

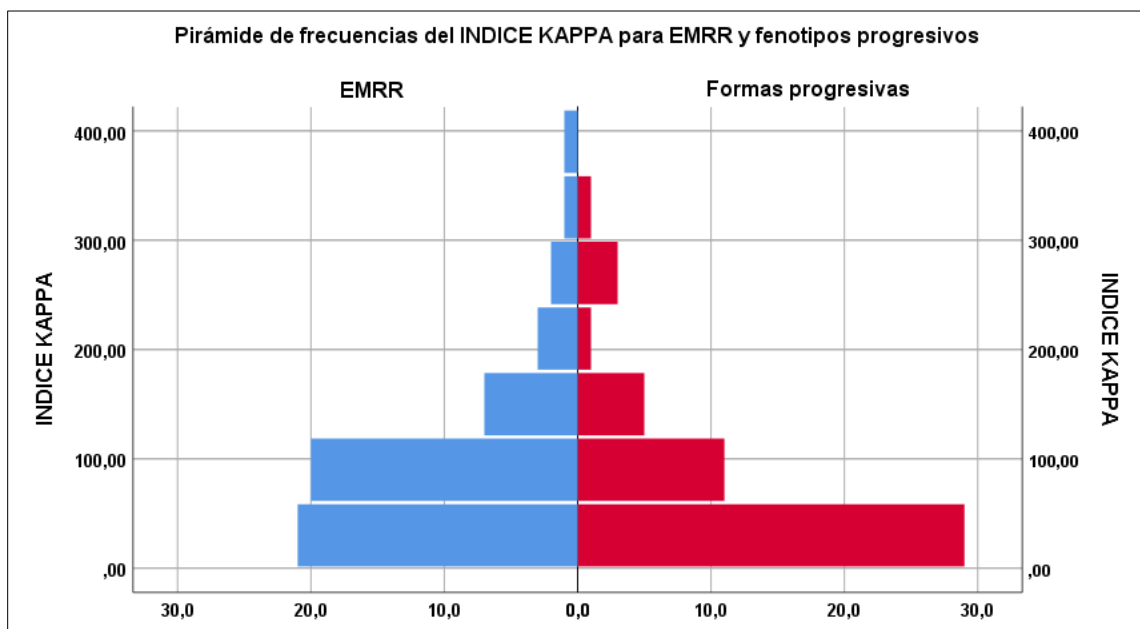


Figura 31: Pirámide de frecuencias de los valores del índice Kappa en función del tipo de fenotipo, EMRR y progresivo (EMSP más EMPP). En el eje de abscisa se representa el número de casos por fenotipo y en el eje de ordenadas se representa el índice Kappa. Las barras a la izquierda en color azul son las correspondientes al grupo con EMRR y las de la derecha en color rojo corresponden a los fenotipos progresivos.

Como podemos observar en este gráfico, hay un mayor número de pacientes con formas progresivas con niveles de índice Kappa por debajo de 100 con respecto a los pacientes con EMRR (recuento de 29 pacientes frente a 21, respectivamente), a medida que va aumentando los niveles de índice kappa hay un mayor número de pacientes con EMRR con respecto al

número de pacientes con formas progresivas, en concreto a partir de un nivel de índice Kappa entre 100 y 200 el número de pacientes con EMRR es de unos 28 frente a 15 pacientes con formas progresivas.

A continuación, se calculó el punto de corte entre los fenotipos EMRR y los fenotipos progresivos (EMPP y EMSP) mediante curvas ROC y el cálculo del índice de Youden. Según esta metodología, el punto de corte con mayor índice de Youden fue 35,37, el cual presentó una sensibilidad del 0,49, una especificidad de 0,78, un valor predictivo positivo de 0,66 y un valor predictivo negativo de 0,64, para la estratificación de las formas progresivas (EMPP y EMSP) frente al grupo EMRR. El AUC de la curva ROC realizada para el cálculo del índice de Youden fue de 0,608 (IC95% 0,500-0,715) (Figura 32).

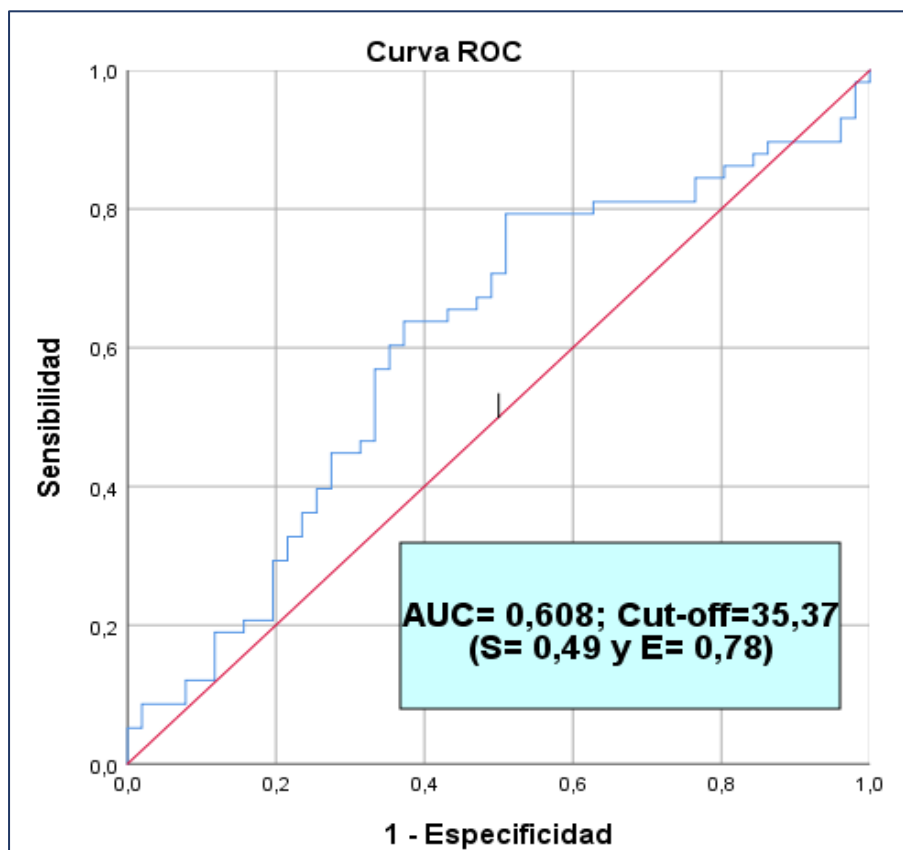


Figura 32: Curva ROC de la variable índice Kappa (línea azul) entre pacientes con formas progresivas y pacientes con EMRR. La línea trazada desde el punto con coordenadas 0,0, 0,0 al punto con coordenadas 1,0, 1,0 corresponde a la línea de referencia.

INDICE KAPPA <i>PUNTO DE CORTE=35,37</i>	OR	Sensibilidad (IC95%)	Especificidad (IC95%)	VPP (IC95%)	VPN (IC95%)
Formas progresivas vs EMRR	3,48	0,49 (0,35-0,63)	0,79 (0,69-0,90)	0,68 (0,52-0,83)	0,64 (0,53-0,75)
EMPP vs EMRR	4,12	0,52 (0,33-0,71)	0,79 (0,69-0,90)	0,54 (0,35-0,73)	0,78 (0,67-0,89)
EMSP vs EMRR	3,24	0,46 (0,26-0,66)	0,79 (0,69-0,90)	0,48 (0,27-0,68)	0,78 (0,67-0,89)

Tabla 22: Diferencias en el rendimiento diagnóstico del punto de corte de 35,37 extraído de la curva ROC para el índice Kappa entre EMRR y formas progresivas (EMPP y EMSP) (IC: intervalo de confianza, VPP: valor predictivo positivo, VPN: valor predictivo negativo y OR: odd ratio).

El rendimiento diagnóstico de este punto de corte mejora al aplicarse a los grupos EMPP y EMRR con un aumento de la sensibilidad de 0,52, la especificidad se mantiene igual en 0,79, y la OR aumenta (4,12 frente a 3,48).

4.2.2. Análisis de la eficacia diagnóstica de BOCG

Se analizó la eficacia diagnóstica de las BOCG en la totalidad de los pacientes con EM, ya que los patrones de BOC son característicos de cada individuo y tienden a permanecer sin cambios, a pesar de la posible intervención terapéutica (Olsson JE, 1973; Link H, 2006; Von Glehn F, 2012).

Para ello se emplearon tablas de contingencia para la variable BOCG frente a los distintos perfiles evolutivos de la enfermedad. Del total de pacientes, sólo 6 no presentaban la realización de BOC de IgG en el grupo control. Los resultados de las BOCG, su porcentaje de positividad y la tasa de falsos negativos de este parámetro se detallan en la siguiente tabla para todos los subgrupos de EM y el grupo control:

	BOCG		%Positividad	Tasa FN	EDSS basal	
	POSITIVAS	NEGATIVAS			BOCG+	BOCG-
Control	12	145	8,3%	-	No aplica	No aplica
EMRR	54	3	93,1%	5,17%	1,5	2
EMSP	24	0	100%	0%	6,5	-
EMPP	24	3	88,9%	11,1%	4,5	4,5

Tabla 23: Resumen de los resultados de BOCG en los distintos grupos de diagnóstico. Se recoge el porcentaje (%) de positividad en cada grupo, así como la tasa de falsos negativos en % y las medianas de EDSS basal en cada grupo en función del resultado de las BOCG.

Al analizar las tasas de falsos negativos en los pacientes con EM, observamos que en el total de los pacientes con EMRR el porcentaje de falsos negativos fue de un 5,17% frente al 11,1% en los pacientes con EMPP. En cuanto al porcentaje de positividad, observamos que el 100% de los pacientes con EMSP presentan BOCG positivas. Este dato podría estar concordancia con diferentes estudios que asocian la presencia de BOCG con un curso de la enfermedad más grave y con un mayor desarrollo de discapacidad (Rojas JL, 2012).

A continuación, se evaluó la eficacia diagnóstica de las BOCG para los distintos subgrupos, además de un análisis combinado con el índice Kappa para la clasificación entre los subtipos progresivos y el subtipo remitente-recurrente de EM. Para el análisis combinado de las BOCG y el índice Kappa según punto de corte calculado para fenotipos progresivos, se realizó un análisis de uso de pruebas en serie, para ello se aplica una prueba en primer lugar, en este caso

las BOCG, y después se indica la otra prueba, el índice Kappa, solo si el individuo resulta positivo de la anterior. Al final, se considera positivo al sujeto que haya tenido resultados positivos en todas las pruebas y negativos a todas las demás. Los resultados se recogen en la siguiente tabla:

	SENSIBILIDAD	ESPECIFICIDAD	VPP	VPN
Análisis eficacia diagnóstica BOCG				
EM vs control	0,94 (0,90-0,99)	0,92 (0,87-0,96)	0,89 (0,83-0,95)	0,96 (0,93-0,99)
EMRR vs control	0,95 (0,89-1,0)	0,92 (0,88-0,97)	0,82 (0,73-0,91)	0,98 (0,96-1,0)
EMPP vs control	0,89 (0,77-0,97)	0,92 (0,88-0,97)	0,67 (0,51-0,82)	0,98 (0,96-1,0)
EMSP vs control	1,00 (1,00-1,00)	0,92 (0,88-0,97)	0,67 (0,51-0,82)	1,0 (1,0-1,0)
EMRR vs EMSP	1,00 (1,00-1,00)	0,05 (0,00-0,11)	0,30 (0,20-0,41)	1,0 (1,0-1,0)
EMRR vs EMPP	0,89 (0,77-1,00)	0,05 (0,00-0,11)	0,30 (0,20-0,41)	0,50 (0,10-0,90)
Análisis eficacia diagnóstica combinada de BOCG & índice Kappa (punto de corte 35,37)				
EMRR vs EMSP	0,46 (0,26-0,66)	0,84 (0,75-0,94)	0,55 (0,33-0,77)	0,79 (0,69-0,89)
EMRR vs EMPP	0,44 (0,26-0,63)	0,84 (0,75-0,94)	0,57 (0,36-0,78)	0,77 (0,66-0,87)

Tabla 24: Resumen rendimiento diagnóstico de las BOCG para el diagnóstico de EM en función del subgrupo y sobre el total de pacientes con EM y eficacia diagnóstica del uso combinado en serie de las BOCG y el índice Kappa según punto de corte calculado (35,37) para la estratificación entre fenotipos progresivos y remitentes-recurrentes.

Según los resultados expuestos en la tabla 24, las BOCG presentan un excelente rendimiento diagnóstico, con una sensibilidad de 0,94 (IC95% 0,90-0,99) y una especificidad de 0,92 (IC95% 0,87-0,96), junto a un valor predictivo positivo de 0,89 (IC95% 0,83-0,95) y un valor predictivo negativo de 0,96 (IC95% 0,93-0,99). Al comparar estos resultados con el rendimiento aislado del índice Kappa (Tabla 20), ambos parámetros presentan un rendimiento diagnóstico similar. Para el caso concreto de los pacientes con EMPP con respecto al subtipo EMRR, las BOCG presentan una especificidad diagnóstica de 0,05, la cual es destacadamente muy inferior al índice kappa para el punto de corte calculado de 35,37, que fue de 0,79 (Tabla 22), mientras

que la sensibilidad diagnóstica de las BOCG es mayor que la del índice kappa, 0,89 frente a 0,52 (Tabla 22 y Tabla 24), pero en términos generales, el rendimiento diagnóstico global del índice kappa es mejor que las BOG para la estratificación entre fenotipos progresivos y remitentes-recurrentes.

Por último, el uso combinado de los dos parámetros produce una mejora de la especificidad de ambos con una pérdida de sensibilidad, siendo más marcado estos cambios en el rendimiento de las BOCG.

4.3. Estudio de las Subclases de IgG

Se determinaron en muestras de suero los niveles de las diferentes subclases de IgG para los distintos grupos en los que se clasificaron los casos incluidos en el estudio, a excepción de los SNA que no presentaban este análisis. También se calculó el porcentaje de cada una de las subclases en función de la IgG total para cada grupo.

Distintos trabajos han descrito que la producción intratecal de IgG en la EM es principalmente de tipo IgG1 e IgG3 y además ambas subclases son las que presentan mayor citotoxicidad dependiente de complemento, con lo que el estudio de la distribución de estas subclases en los distintos perfiles evolutivos es de interés teniendo en cuenta que las formas progresivas presenta un mayor componente inflamatorio (Di Pauli F, 2010).

Estas variables no siguieron normalidad según la prueba de Shapiro-Wilk, por lo que los datos se presentan en forma de mediana y rangos intercuartílicos (IQR). Las subclases se miden en mg/mL. Los resultados se recogen en la siguiente tabla (Tabla 25):

	n	IgG1		IgG2		IgG3		IgG4	
		Mediana (IQR)	%	Mediana (IQR)	%	Mediana (IQR)	%	Mediana (IQR)	%
Control	57	562,5 (267)	51,7%	400,5 (201,2)	37,1%	52,5 (63,8)	5,0%	30,0 (32,0)	2,7%
EMRR	31	490,0 (206)	51,1%	383,1 (223,0)	38,3%	52,7 (44,2)	5,4%	24,0 (16,4)	2,6%
EMPP	21	451,0 (225)	50,4%	472,0 (215,5)	42,7%	66,0 (29,6)	6,4%	19,0 (18,4)	1,9%
EMSP	24	541,5 (298)	52,4%	358,1 (222,4)	35,3%	68,8 (67,2)	6,6%	21,3 (44,8)	1,9%

Tabla 25: Resumen del análisis de las distintas subunidades de IgG. En la tabla se pueden observar los datos de la cuantificación de las subclases de IgG expresados en mediana en mg/mL y rango intercuartílico, además de su porcentaje sobre el total de IgG en función de los distintos grupos diagnósticos. Este análisis no se realizó en el conjunto completo de los casos.

Aunque en una primera observación se podrían sugerir diferencias en las medianas de IgG3 e IgG4 de los pacientes con EMPP y EMSP con respecto al resto de los grupos, en concreto, encontramos niveles ligeramente más bajos de subclase IgG4 y niveles más altos en la subclase IgG3 en estos pacientes, al realizar el test de Kruskal Wallis este sólo mostró diferencias estadísticamente significativas para IgG4 ($p=0,046$). Para el resto de las variables (IgG1, IgG2 e IgG3) el resultado del test de Kruskal Wallis fue $p=0,128$, $0,617$ y $0,389$, respectivamente (Tabla 26).

P valores		IgG1	%IgG1	IgG2	%IgG2	IgG3	%IgG3	IgG4	%IgG4
Test Kruskal Wallis p valor		0,128	0,556	0,617	0,160	0,389	0,396	0,046	0,088
U Mann- Whitney p valor	Control-EMRR	0,093	0,438	0,919	0,299	0,811	0,851	0,383	0,888
	Control-EMSP	0,847	0,795	0,754	0,519	0,121	0,123	0,665	0,500
	Control-EMPP	0,165	0,357	0,201	0,104	0,882	0,810	0,005	0,016
	EMRR-EMPP	0,984	0,776	0,234	0,536	0,765	0,883	0,049	0,022
	EMRR-EMSP	0,131	0,211	0,844	0,097	0,103	0,153	0,900	0,442
	EMPP-EMSP	0,215	0,219	0,339	0,065	0,241	0,237	0,130	0,211

Tabla 26: Resumen de los resultados de los test de contrastes Kruskal Wallis y U Mann-Whitney entre las subclases de IgG. Se recogen los valores de p, considerándose estadísticamente significativos $p < 0,05$.

Al analizar los grupos por pares aplicando el test estadístico U de Mann-Whitney, se encontraron diferencias entre el grupo EMPP con el grupo control y con el grupo EMRR (Tabla 26).

Con respecto a los porcentajes de las distintas subclases de IgG frente a la cantidad total de IgG, no se observaron diferencias estadísticamente significativas tras la aplicación del test de contraste de hipótesis (%IgG1, %G2, %G3 y %G4, $p=0,556$, $0,160$, $0,396$ y $0,088$ respectivamente) (Tabla 26).

4.4. Estudio de la EDSS en los distintos perfiles y su correlación con la progresión de la enfermedad

Para el estudio de la discapacidad en relación con los distintos perfiles evolutivos de la EM, se recogieron los valores de EDSS en el momento del diagnóstico del fenotipo, la cual definimos para nuestro estudio como EDSS basal, y aproximadamente al año desde el diagnóstico. El número de casos totales recogidos en la historia clínica con EDSS en el grupo de SNA fue de 5 (de los 6 pacientes del estudio), en el grupo de EMRR fue de 54 (de los 58 pacientes del estudio), en EMSP fue de 23 (de los 24 casos) y de EMPP fue de 26 (de los 27 casos).

Los datos de EDSS basal y al año de seguimiento se informaron como mediana y rango intercuartílico (RIC). Se estudió la presencia de un tratamiento modificador de la enfermedad previo a la punción en los distintos grupos de EM y su relación con la escala de discapacidad (EDSS). Como comentamos al principio el 50% de los pacientes con EMSP presentaban tratamiento, además de 12 pacientes con EMRR. El test de U Mann-Whitney no indicó diferencias estadísticamente significativas entre el nivel de EDSS basal y al año en los grupos con EMRR y EMSP en función de la presencia de tratamiento modificador de la enfermedad en el momento de la punción lumbar ($p > 0,05$).

		Sin tratamiento previo			Con tratamiento previo		TOTAL		Empeoramiento EDSS al año	
		EDSS basal	EDSS al año	n	EDSS basal	EDSS al año	EDSS basal	EDSS al año	N (%)	P valor
SNA	5	1,50(1,8)	1,0(1,6)	-	-	-	1,50 (1,8)	1,0 (1,6)	0	-
EMRR	42	1,50(1,0)	1,50(1,0)	12	1,50 (2,9)	1,50 (1,80)	1,50 (1,1)	1,50 (1,0)	4 (6,9%)	0,391
EMSP	11	7,0 (3,5)	7,0 (1,5)	12	6,0 (1,8)	6,50 (0,9)	6,50 (2,5)	6,50 (1,5)	9 (39,1%)	0,011
EMPP	26	4,50 (2,3)	4,50 (2,3)				4,50 (2,3)	4,50 (2,3)	5 (18,5%)	0,039

Tabla 27: Resultados del nivel de EDSS basal y al año de seguimiento en función del perfil de EM y la presencia o no de tratamiento. Los resultados se expresan en mediana y rango intercuartílico. Valor de p, como test de contraste de hipótesis se empleó el test para muestras pareadas W de Wilcoxon para comparar los valores de EDSS basal y al año.

En el test pareado W de Wilcoxon podemos comprobar que sólo los grupos con perfiles progresivos (EMPP y EMSP) presentan diferencias estadísticamente significativas en el seguimiento al año del diagnóstico, muy en concordancia con lo descrito en la bibliografía, además de una correlación directa entre estos fenotipos progresivos y valores altos en la escala de discapacidad (Tabla 27). Estos datos también se correlacionan con el grado de

empeoramiento en la EDSS, en el que las formas secundariamente progresivas son las que presentan un mayor porcentaje de pacientes con un empeoramiento al año de seguimiento de la enfermedad (39,1%).

Para el estudio de los valores de EDSS basal entre los distintos fenotipos de la enfermedad, se realizó el test no paramétrico de Kruskal-Wallis, no encontrándose diferencias estadísticamente significativas, pero el estudio por parejas para la EDSS basal mostró diferencias estadísticamente significativas entre todos los grupos, excepto para EMSP y EMPP ($p=0,743$) (Figura 33).

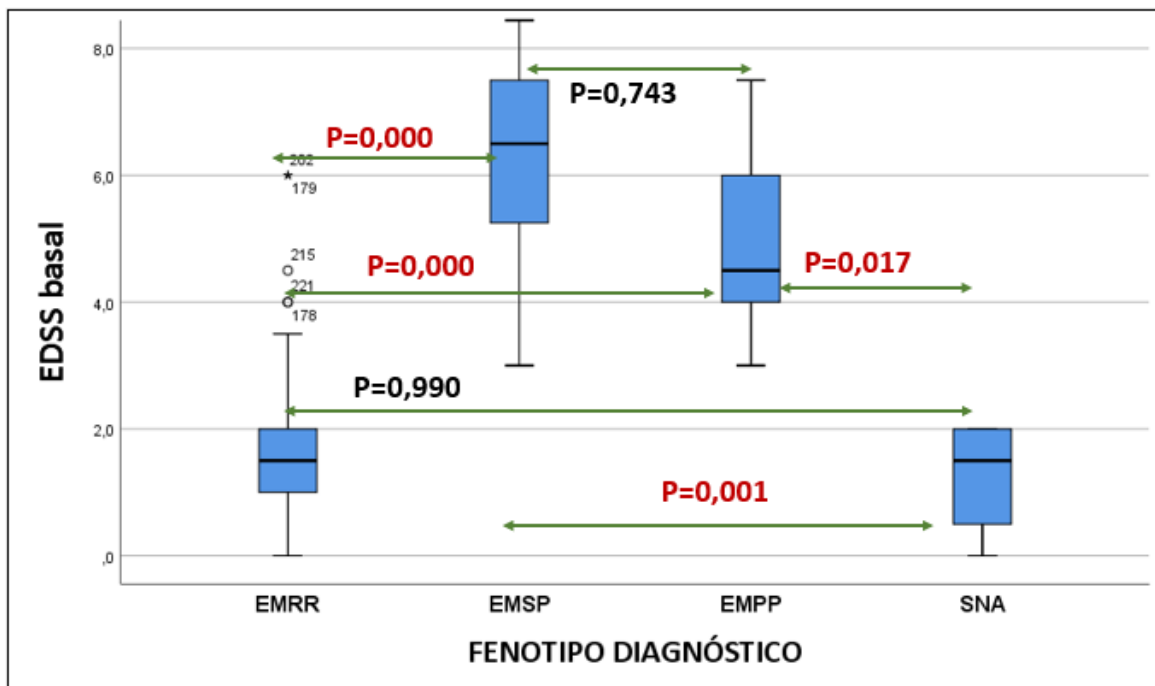


Figura 33: Representación gráfica mediante diagrama de cajas y bigotes de los valores de EDSS basal en función del fenotipo diagnóstico. Se representan la mediana y los percentiles 25 y 75 (cajas coloreadas en azul); el mínimo y máximo (barras de error); y los outliers (*). Se representan los valores p entre los grupos (flechas). El Estudio y contraste de hipótesis por parejas se realizó a través del Test U de Mann-Whitney. En la figura se pueden observar diferencias estadísticamente significativas entre los grupos EMRR-EMSP ($p=0,000$), EMRR-EMPP ($p=0,000$), SNA-EMSP ($0,001$) Y SNA-EMPP ($p=0,017$).

Al realizar el test de Kruskal-Wallis para la EDSS al año del seguimiento con respecto a la EDSS basal se obtuvieron los mismos resultados ($p=0,000$), al realizar el análisis por parejas a través del test U de Mann-Whitney, sólo existieron diferencias estadísticamente significativas entre los grupos EMRR-EMSP ($p=0,000$), EMRR-EMPP ($p=0,000$), SNA-EMSP ($0,000$) Y SNA-EMPP ($p=0,012$).

4.5. Estudio de la tasa de brotes anual y de la discapacidad asociada a eventos RAW o a PIRA en pacientes con EMRR

En este punto se analizaron varias variables relacionadas con el empeoramiento y la discapacidad de los pacientes respecto al valor del índice kappa, los cuales fueron la tasa de brotes anuales, el número de pacientes que alcanzaron valores de EDSS mayores o iguales a 3 y la discapacidad asociada a eventos PIRA (progresión independiente de la actividad de los brotes) y eventos RAW (progresión asociada a la actividad de los brotes) para los pacientes que presentaban EMRR. De los 58 pacientes estudiados, 29 presentaron diagnóstico confirmado por brote, 7 pacientes fueron diagnosticados por RMN y 22 pacientes se diagnosticaron mediante ambos marcadores, RMN y BOC.

La tasa de recaída anual se obtuvo en los primeros cinco años de seguimiento para aquellos casos de evolución larga. Para los casos de menor evolución, se calculó dicha tasa anual hasta el último año de seguimiento. De los 58 pacientes incluidos en este estudio, se recogieron los datos de las recaídas en 57 pacientes, 3 pacientes presentaron seguimiento durante sólo 2 años, 18 pacientes presentaron seguimiento durante 3 años, 6 pacientes durante 4 años y 30 pacientes tuvieron seguimiento durante 5 primeros años desde su diagnóstico.

La tasa de recaída anual media fue de 0,20 (IC95% 0,14-0,27). La tasa de recaída media por sexo fue de 0,22 (0,09-0,35) en hombres y 0,19 (0,11-0,26) en mujeres, sin observarse diferencias estadísticamente significativas entre ambos ($p=0,890$) (Tabla 28).

		Edad PL diagnóstico	Índice Kappa	EDSS final
Tasa de recaída	Coeficiente Spearman	-0,206	-0,111	0,199
	P valor	p=0,124	p=0,412	p=0,138

Tabla 28: Estudio de correlación de la tasa de recaída con el resto de las variables (Edad punción lumbar diagnóstica, índice kappa y EDSS al final del seguimiento). La EDSS final es la EDSS recogida al final del periodo de seguimiento de los pacientes, este periodo de seguimiento fue según los casos de 2, 3, 4 y 5 años.

Al analizar la tasa de recaídas en función de la edad de la punción lumbar diagnóstica observamos que no existe correlación entre ambas variables, no existiendo diferencias estadísticamente significativas entre ellas ($p=0,124$, coeficiente de Spearman $-0,206$).

Tampoco se observó correlación entre la tasa de recaída con el valor del índice Kappa ni con la EDSS al final medida en el último año de seguimiento en el estudio.

Al observar el número de pacientes que alcanzan una EDSS superior a 3 en algún momento del periodo de estudio, 16 pacientes presentaron una EDSS superior a 3 con una tasa anual de recaídas media de 0,4 (0,55) frente a los 41 pacientes que no llegaron a un valor de 3 en EDSS y presentaron una tasa de recaídas inferior de 0,0 (0,23). El test de contraste U de Mann-Whitney confirmó la existencia de diferencias estadísticamente significativas en la tasa media de recaídas anual entre los pacientes que llegan y los que no a un valor de 3 en la EDSS durante el seguimiento ($p=0,003$).

En el estudio del aumento de discapacidad asociado a RAW y a PIRA se observó que 5 de los pacientes presentaron empeoramiento asociado a los brotes (RAW), otros 5 pacientes presentaron aumento de discapacidad no asociado a las recaídas (PIRA) y 6 pacientes presentaron tanto eventos RAW como eventos PIRA. El estudio de estos pacientes se presenta en la tabla 29.

En los resultados recogidos en la tabla 29, se puede observar cómo los pacientes que mostraron un aumento de la discapacidad no asociada a las recaídas (PIRA), presentaron mayores índices Kappa con respecto a los que presentaron eventos RAW y ambos eventos RAW y PIRA. La tasa de recaída observada fue mayor en los pacientes con eventos RAW y con ambos eventos. Mientras que los pacientes con ambos eventos presentaron un índice kappa menor al resto de los grupos, estando en discordancia con lo esperado al resto de los grupos que presentaban eventos RAW y eventos PIRA. También en este último grupo la mediana de edad en el momento de la punción lumbar es inferior a la de los pacientes con eventos RAW y eventos PIRA, la cual fue de 37,5 años para los casos con ambos eventos frente a los 43 años para los casos con eventos PIRA y 40 años para los eventos RAW.

		NO RAW/ NO PIRA	RAW	PIRA	RAW&PIRA	P valor
Nº casos	Total casos	41	5	5	6	-
	Sin Tto PL	34	3	5	3	
	Con Tto PL	7	2	0	3	
Edad PL diagnostico (mediana y RIC)	Total casos	36,0(18,0)	40,0 (11,0)	43,0 (21,0)	37,5 (10,0)	P=0,317
	Sin Tto PL	35,5 (18)	40,0(-)		40,0 (-)	
	Con Tto PL	47,0 (22)	35,0(-)	-	35,0 (-)	
Índice Kappa (mediana y RIC)	Total casos	83,1(135,1)	79,47 (96,86)	123,17(208,14)	56,54 (50,65)	P=0,345
	Sin Tto PL	87,3 (159,1)	101,8 (-)	123,17(208,14)	40,2(-)	
	Con Tto PL	79,9 (71,3)	73,6 (-)	-	69,2 (-)	
Tasa recaída (mediana y RIC)	Total casos	0,0 (0,25)	0,52(0,36)	0,12(0,26)	0,45 (0,45)	P=0,02
	Sin Tto PL	0,0 (0,60)	0,2 (-)	0,12(0,26)	0,5 (-)	
	Con Tto PL	0,2 (0,20)	0,9 (-)	-	0,4 (-)	
EDSS inicial (mediana y RIC)	Total casos	1,5 (1,0)	1,5 (4,3)	1,5 (1,5)	2,0 (1,3)	P=0,717
	Sin Tto PL	1,5 (1,0)	0,0 (-)	1,5 (1,5)	1,0 (-)	
	Con Tto PL	1,5 (1,5)	4,0(-)	-	2,0 (-)	
EDSS final (mediana y RIC)	Total casos	1,5 (0,5)	2,0 (2,0)	3,0 (2,8)	4,0 (3,8)	P=0,000
	Sin Tto PL	1,5 (0,6)	1,5(-)	3,0 (2,8)	4,0 (-)	
	Con Tto PL	2,0 (0,5)	2,0 (-)	-	3,0 (-)	
EDSS ≥3 (Si/No)	Total casos	4/37	3/2	3/2	6/0	P=0,000
	Sin Tto PL	4/30	1/2	3/2	3/0	
	Con Tto PL	0/7	2/0	-	3/0	

Tabla 29: Descriptiva del número de casos por tipo de evento (pacientes sólo con eventos RAW, pacientes con sólo eventos PIRA, pacientes con ambos eventos RAW y PIRA o pacientes sin presencia de ningún tipo de evento) y su relación con las variables: índice Kappa, edad en el momento de la punción lumbar, tasa de recaída y EDSS inicial (recogida a los tres meses de tratamiento o primer brote) y EDSS al final del seguimiento y nº de pacientes que alcanzan EDSS≥3 en algún momento. Se clasificó en función de la presencia de tratamiento en el momento de la punción lumbar diagnóstica (Tto PL). Se recogió la mediana y el rango intercuartílico (RIC). El test de contraste de Kruskal-Wallis utilizado para la obtención de los datos estadísticos es el de Kruskal-Wallis, el cual analizó las diferencias estadísticamente significativas de cada variable en función de los tipos de evento.

Como comentamos anteriormente, sólo 12 pacientes con EMRR presentaron tratamiento previo en el momento de la punción lumbar diagnóstica, al analizarlo en función del tipo de evento, 3 de estos pacientes presentaron eventos PIRA y RAW, 2 pacientes presentaron eventos RAW y los 7 restantes no presentaron ni eventos PIRA ni eventos RAW.

Con respecto a los tratamientos recibidos en los pacientes sin tratamiento previo en el momento de la punción lumbar, un 34,5% de los pacientes han presentado interferón como primer tratamiento, seguido de un 20,7% dimetil fumarato, 12,1% cladribina, 10,3% teriflunomida y un 8,6% natalizumab. Sólo 4 pacientes, un 6,8%, no han presentado tratamiento. En cuanto a los tratamientos de los pacientes que presentaron tratamiento previo en el momento de la

punción lumbar fueron 7 casos con interferón, 2 casos con natalizumab, 2 casos con dimetilfumarato y un caso con azatioprina (Tabla 30). Los resultados descriptivos de los distintos tratamientos se recogen en la tabla 30.

TRATAMIENTOS		Sexo (M/H)	Edad inicio TTO	Índice Kappa	Tasa recaída	Nº Eventos RAW/PIRA/ RAW+PIRA	EDSS basal	EDSS final	EDSS ≥3 (Si/No)
Interferón (n=20)	Total (n=20)	13/7	32,0(15,0)	74,57(124,09)	0,20(0,2)	5/0/2	1,5(1,3)	2,0(1,4)	6/14
	TTO PL (n=7)	5/2	32,0(16)	69,24(60,48)	0,22(0,7)	2/0/1	2,0(2,8)	2,5(2,9)	3/4
	No TTO PL (n=13)	8/5	36,5(17)	96,84(162,63)	0,20(0,2)	3/0/1	1,0(1,5)	2,0(1,0)	3/10
Dimetilfumarato (n=12)	Total (n=12)	6/6	36,0(17,0)	63,94(109,76)	0,0 (0,0)	0/1/1	1,5(1,0)	2,0(0,9)	2/10
	TTO PL (n=2)	0/2	40,0(-)	52,96(-)	0,0(0,2)	0/0/0	1,0(-)	1,0(-)	0/2
	No TTO PL (n=10)	6/4	35,0(15)	89,07(152,37)	0,0(0)	0/1/1	1,5(1,0)	1,5(1,0)	2/8
Cladribina (n=7)		4/3	36,0(24,0)	123,41(180,1)	0,0 (0,2)	0/2/0	1,5(0,5)	2,0(2,5)	2/5
Teriflunomida (n=6)		5/1	40,5(15,0)	91,04(175,68)	0,0(0,15)	0/0/0	1,0(1,3)	1,5(1,5)	2/4
Natalizumab (n=5)	Total (n=5)	3/2	33,0(23,0)	74,77(104,72)	0,3(0,5)	0/0/2	1,5(2,0)	2,0(3,5)	2/3
	TTO PL (n=2)	2/0	39,0(-)	109,68(-)	0,3(-)	0/0/1	1,0(-)	2,5(-)	1/1
	No TTO PL (n=3)	1/2	33,0(-)	9,64(-)	0,33(-)	0/0/1	2,0(-)	2,0(-)	1/2
Sin tratamiento (n=4)		2/2	.	83,44(119,89)	0,0 (0,3)	0/1/0	0,5 (1,0)	1,0(0,9)	0/4

Tabla 30: Descriptiva de los diferentes tratamientos empleados según tipo de evento (PIRA, RAW o ambos). Se describió en función del sexo, nº pacientes con tratamiento en el momento de la punción lumbar (TTO PL), mediana del índice Kappa, tasa de recaída, nº de casos en función del tipo de evento (RAW, PIRA o ambos), EDSS basal a los tres meses de tratamiento o primer brote, EDSS al final del seguimiento y nº de pacientes que alcanzan EDSS≥3 en algún momento del seguimiento. Abreviaturas: TTO PL, tratamiento en el momento de la punción lumbar diagnóstica, No TTO PL, sin tratamiento en el momento de la punción lumbar diagnóstica. Las variables cuantitativas (edad inicio tratamiento, índice Kappa, tasa de recaída se recogieron y EDSS) se recogieron como mediana y rango intercuartílico (entre paréntesis).

Como se puede observar en la tabla 30, los 5 casos de eventos RAW registrados correspondían a pacientes en tratamiento con interferón, mientras que el tratamiento más frecuente a eventos PIRA fue la cladribina en un 40% de los casos registrados (con este tipo de evento (2 casos de los 5 casos de eventos PIRA).

El índice Kappa se analizó al inicio del tratamiento, a excepción de 12 casos en los que la punción lumbar fue posterior al inicio de la terapia. De estos 12 casos, 7 presentaban tratamiento previo con interferón, con un índice kappa medio de 49,79; mientras que el grupo de pacientes con tratamiento con interferón posterior a la punción lumbar presentó un índice kappa medio de 96,84. En cuanto a los 5 pacientes restantes con tratamiento en el momento de la punción, 2 presentaban tratamiento con natalizumab, 2 con dimetilfumarato y uno con azatioprina.

En el tratamiento con cladribina, los pacientes presentaban un mayor índice Kappa al inicio de la terapia con respecto al resto de los tratamientos y un valor mayor de EDSS al final del seguimiento.

Las mayores tasas de recaídas anuales se registraron con los tratamientos con interferón y con natalizumab, los cuales también presentaron una menor edad de inicio del tratamiento y un valor de EDSS mayor al final del seguimiento.

4.6. Correlación del índice Kappa con el resto de las variables en pacientes con formas progresivas

En este apartado analizamos la correlación del índice Kappa en pacientes con EMPP y EMSP con las variables bioquímicas consideradas a lo largo del estudio. Las variables comparadas fueron el índice IgG, IgM, las distintas subclases de IgG, los niveles de vitamina D y la EDSS basal y al año de seguimiento. Al no seguir una distribución normal ninguna de estas variables de estudio, se utilizó como medida estadística el coeficiente Rho de Spearman, el cual es la versión no paramétrica del coeficiente de correlación de Pearson. El valor de Rho de Spearman utiliza el rango de los datos de estudio en lugar de los valores reales, el cual resulta apropiado para datos ordinales o intervalos de datos que no satisfagan el supuesto de normalidad. Los valores del coeficiente van del -1 al 1, el signo nos indica la dirección de la relación y su valor absoluto indica la fuerza de la relación. Los resultados se muestran en la tabla 31.

Índice Kappa		Índ IgG	Índ IgM	IgG1	IgG2	IgG3	IgG4	Vit. D	EDSS basal	EDSS al año
EMSP	Rho de Spearman	0,886	-0,123	0,414	0,048	-0,265	0,171	0,740	-0,271	-0,244
	P valor	0,000	0,567	0,044	0,823	0,211	0,425	0,001	0,212	0,263
EMPP	Rho de Spearman	0,870	0,119	0,375	-0,134	-0,126	0,148	0,364	-0,367	-0,280
	P valor	0,000	0,553	0,094	0,563	0,586	0,522	0,105	0,065	0,175
EMRR	Rho de Spearman	0,704	-0,074	-0,096	-0,291	-0,248	-0,281	-0,197	-0,047	-0,131
	P valor	0,000	0,583	0,620	0,126	0,179	0,140	0,212	0,735	0,344

Tabla 31: Resultados del estudio de correlación Rho de Spearman según los distintos fenotipos de EM. Se comparó el índice kappa en función del índice de IgG (Índ IgG), índice de IgM (Índ IgM), índice de IgA (Índ IgA), las distintas subclases de IgG, la vitamina D (Vit. D) y los valores de EDSS basales (EDSS en el momento de la punción lumbar) y la EDSS al año de seguimiento del estudio. Se representó los valores del coeficiente de correlación de Spearman, que toma valores del -1 al 1 y los valores de p.

Como se puede observar en la tabla 31, tanto el índice de IgG como los niveles de la subclase IgG1 y de la vitamina D presentan una correlación estadísticamente significativa con el índice Kappa en pacientes con EMSP. Esta correlación toma un valor con signo positivo en

todas ellas, siendo más fuerte entre el índice Kappa y el índice IgG (rho de Spearman 0,812, $p=0,000$). Con respecto a la vitamina D, se observa que los pacientes con formas progresivas presentan concentraciones más bajas de esta vitamina, en concreto en los pacientes con EMSP la mediana de los valores de vitamina D fue de 14,3 ng/mL (Tabla 17), además de medianas más bajas de índice Kappa (Tabla 18) con respecto a los pacientes con EMRR, presentando un coeficiente de correlación de Spearman de 0,740 y $p=0,001$ respecto a -0,197 y un valor de p de 0,212 como se puede apreciar en la tabla 31.

Al comparar estos datos con la correlación de estas variables en pacientes con EMRR y EMPP obtenemos que sólo el índice de IgG presenta una correlación estadísticamente significativa con el índice Kappa (rho de Spearman 0,709, $p=0,000$ y 0,870, $p=0,000$, respectivamente). El resto de las variables no presentaban una correlación estadísticamente significativa con el índice Kappa.

Al analizar los valores de la escala EDSS basal (en el momento de la punción lumbar) y durante el seguimiento de un año frente al índice kappa, obtuvimos un coeficiente de correlación rho de Spearman de -0,271 para EMSP y -0,0367 para EMPP para EDSS basal, y -0,244 y -0,280 para EMSP y EMPP, respectivamente. Estos resultados nos indican que no existe una correlación entre los valores de índice kappa y los valores de EDSS en pacientes con EMPP Y EMSP, es decir, índices Kappa elevados no implican valores superiores en la EDSS en estos pacientes.

En el grupo de pacientes con EMRR tampoco existió una correlación significativa entre el grado de discapacidad medida en EDSS frente al índice kappa, incluso se obtuvieron coeficientes inferiores a los obtenidos en pacientes con formas progresivas (coeficiente rho de Spearman con EDDS al inicio -0,048, $p=0,735$; al año -0,131, $p=0,344$).

4.7. Estudio de probabilidad de conversión a EMSP

Para estudiar la probabilidad de conversión a EMSP de pacientes con EMRR, empleamos el análisis de las curvas de Kaplan-Meier, tanto la de supervivencia como de riesgo acumulado. Estos pacientes están recogidos de forma retrospectiva. Los pacientes con formas progresivas de nuestro estudio presentan una larga evolución de la enfermedad. Para el estudio de supervivencia se analizó el tiempo de seguimiento en cada uno de los pacientes, en el caso de los pacientes con formas progresivas se considera el tiempo hasta que se produce el evento (conversión a EMSP) mientras que en los pacientes con EMRR que no convierten, es el tiempo de seguimiento desde su diagnóstico al momento actual.

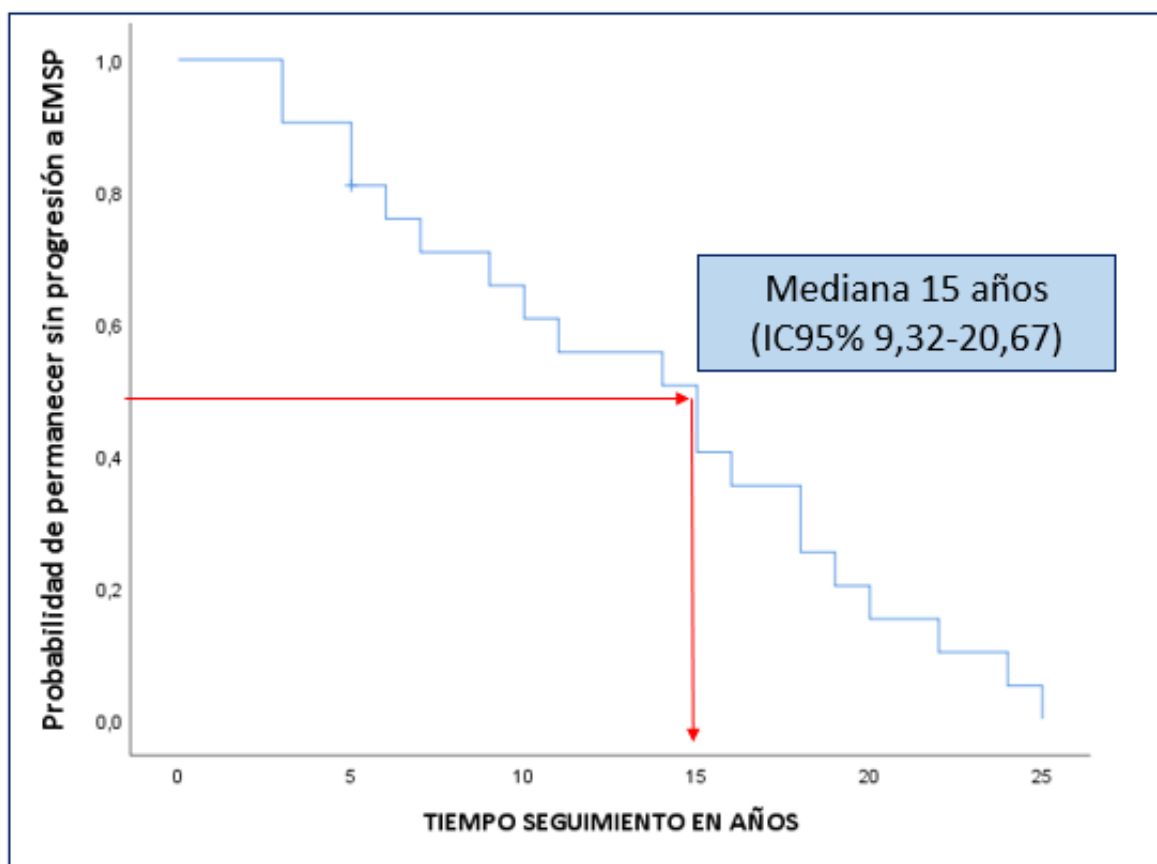


Figura 34: Representación de la curva de supervivencia mediante el análisis Kaplan-Meier de los pacientes con formas remitente-recurrente (EMRR) y secundaria progresiva (EMSP). En abscisa se representa el tiempo en años desde el diagnóstico hasta su conversión a fenotipo progresivo y en ordenadas la probabilidad de permanecer sin progresión a secundaria progresiva. La probabilidad de permanecer sin progresión va desde 1,0 (ningún paciente sin conversión a secundaria progresiva) a 0,0 (todos los pacientes con conversión a secundaria progresiva).

La mediana en una curva de Kaplan-Meier es el tiempo correspondiente a una probabilidad de supervivencia acumulada del 50%. La mediana del tiempo de conversión de nuestro estudio fue de 15 años (IC95% 9,32-20,67), lo que indica que el 50% de los pacientes del estudio no han convertido o avanzado a un fenotipo progresivo transcurridos 15 años desde el fenotipo EMRR (Figura 34).

Posteriormente se estudiaron las diferentes variables que han presentado diferencias entre fenotipos remitentes-recurrentes y progresivos a lo largo de este estudio y su efecto en la función de supervivencia en estos pacientes, es decir, si los distintos parámetros evaluados pueden influir en el riesgo de conversión EMSP de los pacientes con EMRR.

Previamente al estudio de las curvas de supervivencia, las variables edad en el momento de la punción lumbar y la EDSS, se agruparon en conjuntos acotados para mejorar su manejo estadístico. En el caso de la edad se crearon tres grupos: un primer grupo hasta los 30 años, un segundo grupo de 30 a 45 años y un tercer grupo que corresponde a casos de más de 45 años (Figura 35). En cuanto a la EDSS en el momento del diagnóstico del fenotipo, también se clasificó en tres grupos: un primer grupo con valores de EDSS comprendidos entre 0,0 a 2,0 (sin discapacidad o discapacidad mínima); un segundo grupo con valores de EDSS comprendidos de 2,0 a 4,5 (con discapacidad moderada) y un tercer grupo con valores de EDSS a partir de 4,5 (con discapacidad grave) (Figura 36).

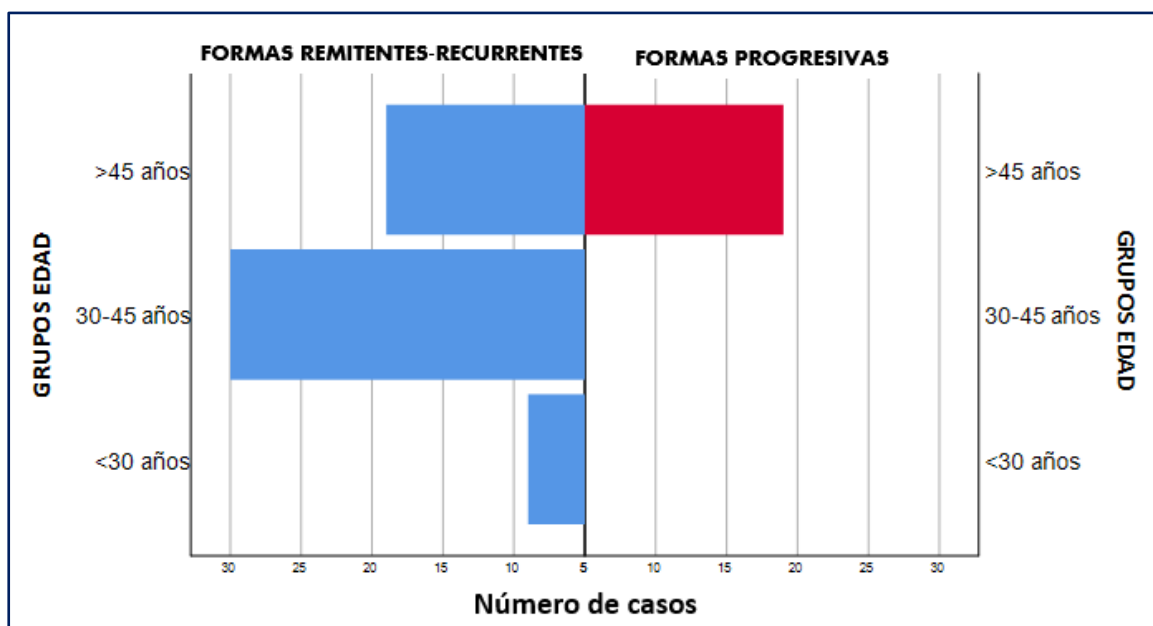


Figura 35: Diagrama de barras en el que se representa la edad agrupada en función de los casos con progresión o sin progresión a secundaria progresiva. En abscisa se representa el número de casos y en

el eje de ordenadas los grupos de edad creados (primer grupo hasta los 30 años, segundo grupo de 30 a 45 años y un tercer grupo de más de 45 años). Las barras azules representan los casos que se mantienen con fenotipo EMRR y las rojas representan los casos que han progresado a EMSP.

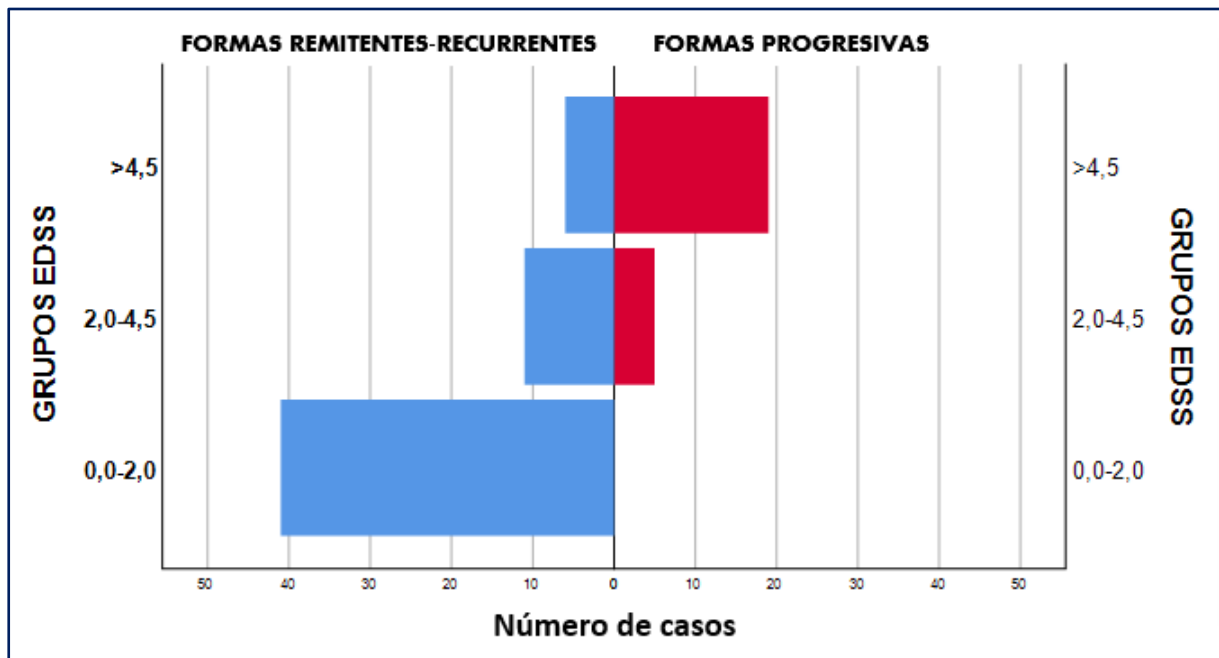


Figura 36: Diagrama de barras en el que se representa la EDSS agrupada en función de los casos con progresión o sin progresión a secundaria progresiva. En abscisa se representa el número de casos y en el eje de ordenadas los grupos de EDSS basal creados (primer grupo con valores de EDSS comprendidos entre 0,0 a 2,0, segundo grupo con valores de EDSS comprendidos de 2,0 a 4,5 y un tercer grupo con valores de EDSS a partir de 4,5). Las barras azules representan los casos que se mantienen con fenotipo EMRR y las rojas representan los casos que han progresado a EMSP.

A continuación, se evaluó el efecto de las variables índice Kappa e índice de IgM, el sexo y la presencia de otros factores de riesgo como diabetes, tabaquismo y niveles de vitamina D, las cuales mostraron a lo largo de este estudio diferencias entre pacientes con EMSP y pacientes con EMRR.

Para el estudio del impacto de estas variables, se realizó el test estadístico de log-Rank con el fin de comparar las distintas curvas de Kaplan-Meier. Se consideró estadísticamente significativo un valor de $p < 0,05$ (Tabla 32).

El índice Kappa y el índice de IgM se analizó según los puntos de corte calculados para fenotipos progresivos (Tabla 20 y Tabla 22), y para la vitamina D se consideró como punto de corte un valor por debajo de 20 ng/mL (rango de déficit de vitamina D) (Díez JJ, 2022).

	Mediana supervivencia (IC95%)	Test de contraste de curvas
		Log rank (valor de p)
Sexo	Hombre: 11,0 (0,0-23,8)	0,458
	Mujer: 15,0 (9,3-20,7)	
Grupos de edad	1: ND	0,017
	2: 18,0 (15,1-20,9)	
	3: 9,0 (4,2-13,7)	
Tabaquismo	NO: 10,0 (0,8-19,6)	0,555
	EX: 15,0 (0-29,4)	
	SI: 18,0 (14,4-21,6)	
Diabetes	NO: 14,0 (4,4-23,5)	0,612
	SI: 15,0 (10,1-19,9)	
Déficit vitamina D Punto de corte 20 ng/mL	>20: 16,0 (8,4-23,5)	0,185
	<20: 9,0,0 (9,3-20,7)	
Índice Kappa Punto de corte 35,37	>35,37: 15,0 (3,2-26,8)	0,564
	<35,37: 14,0 (7,8-20,2)	
Índice IgM Punto de corte 0,079	<0,079: 11,0,0 (8,4-13,5)	0,657
	>0,079: 15,0 (8,1-21,8)	
Grupos EDSS	1: ND	0,977
	2: 15,0 (0,0-38,5)	
	3: 14,0 (7,6-20,3)	

Tabla 32: Resultados del análisis de comparación de curvas de supervivencia. Se representa los valores de p del test estadístico Log rank realizado para comparar la existencia de diferencias en las curvas de progresión a EMSP de los pacientes con EMRR, en función de las variables edad punción lumbar agrupada en rangos (grupo 1: hasta 30 años; grupo 2: de 30 a 45 y grupo 3: más de 45 años), sexo, EDSS en grupos (grupo 1: EDSS de 0,0 a 2,0; grupo 2: de 2,0 a 4,5; y grupo 3: más de 4,5 de EDSS), déficit de vitamina D (por debajo de 20 ng/mL), tabaquismo, diabetes y los puntos de corte calculados de índice Kappa (35,37) e índice IgM (0,079) para las formas progresivas. Se considera estadísticamente significativo valores de $p < 0,05$.

Se presentaron las curvas de supervivencia mediante el análisis Kaplan-Meier que muestra la probabilidad de permanecer como EMRR y no progresión a EMSP de acuerdo con el punto de corte para el índice Kappa de 35,37 y en función de los rangos de edad en el momento de la punción lumbar, ya que esta variable fue la única que presentó diferencias estadísticamente significativas (Figuras 37 y 38).

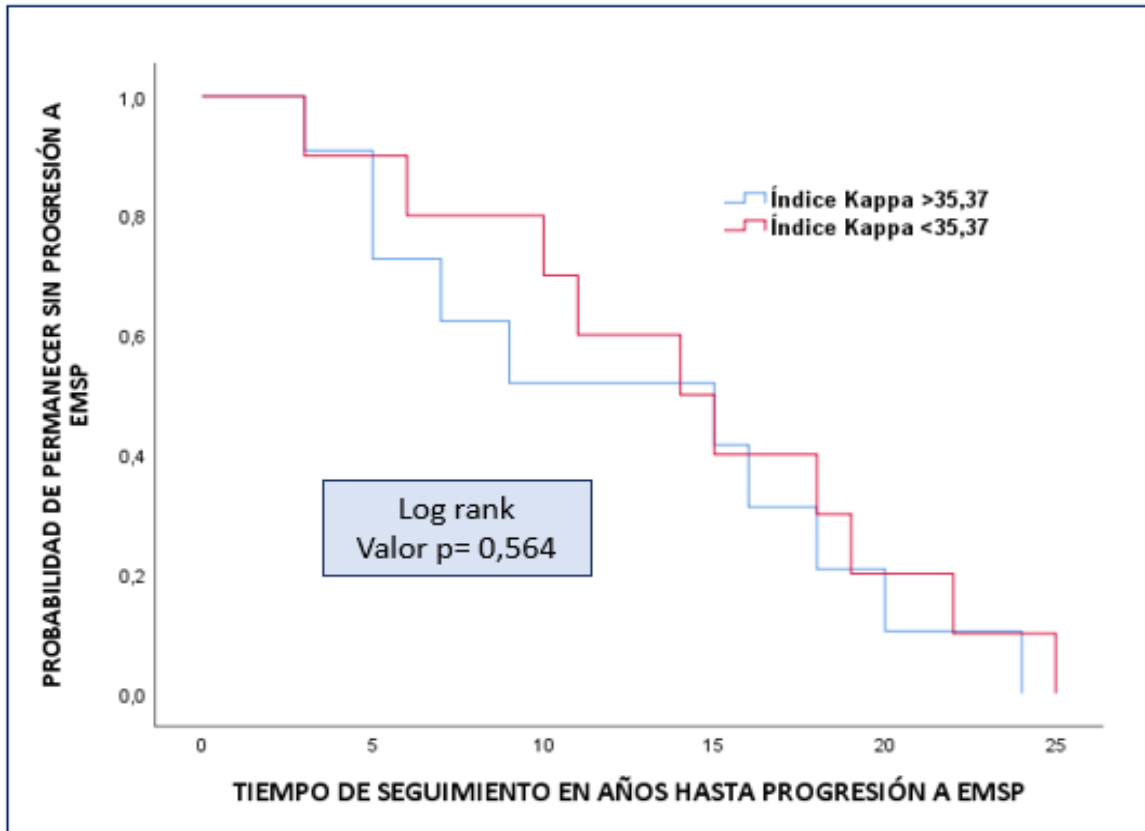


Figura 37: Curva de supervivencia mediante el análisis Kaplan-Meier de los pacientes con EMRR, en la que se muestra la probabilidad de no progresión a EMSP. En la curva se muestra la probabilidad de permanecer como EMRR o evolucionar a EMSP de acuerdo con el punto de corte para el índice kappa de 35,37: valores por encima de 35,37 (línea azul), valores inferiores a 35,37 (línea roja). El test de contraste log-rank no mostró diferencias estadísticamente significativas entre las curvas en función del punto de corte de 35,37 para el índice kappa ($p=0,564$).

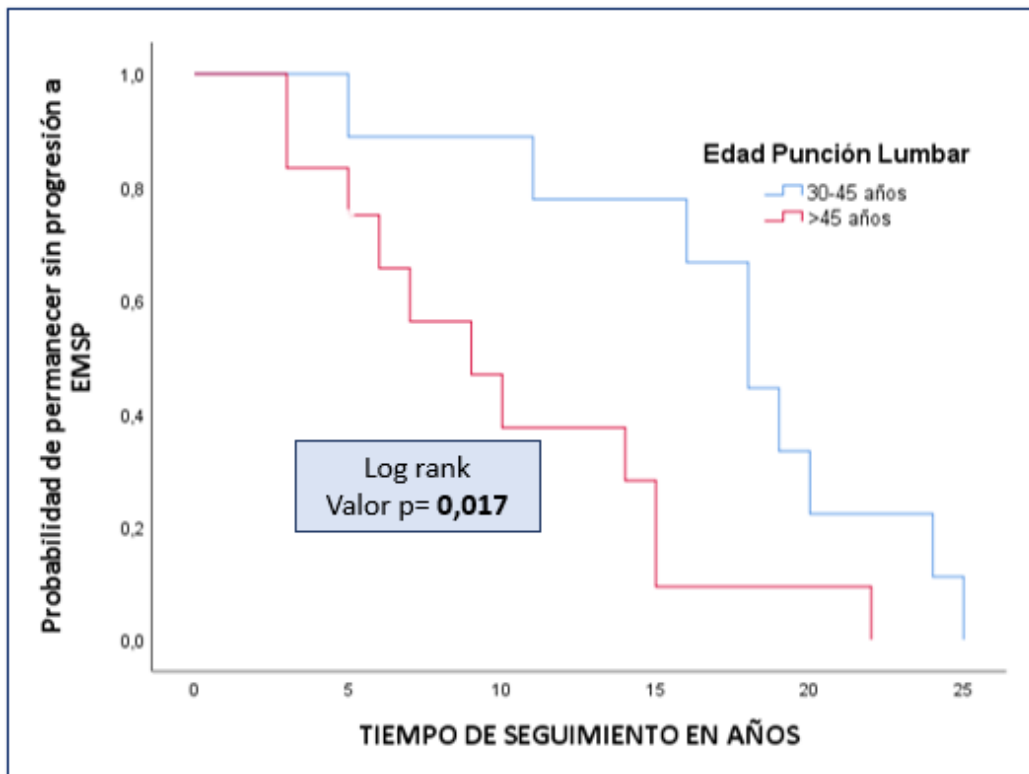


Figura 38: Curva de supervivencia mediante el análisis Kaplan-Meier de los pacientes con EMRR, en la que se muestra la probabilidad de no progresión a EMSP. En el eje de ordenadas de la curva se muestra la probabilidad de permanecer como EMRR o evolucionar a EMSP de acuerdo con los rangos de edad de la punción lumbar; y en abscisa el tiempo de seguimiento en años. Los rangos de edad representados son: de 30 a 45 años (línea azul) y de más de 45 años (línea roja). El test de contraste log-rank mostró diferencias estadísticamente significativas entre las curvas ($p=0,017$).

Los resultados del test de contraste sólo encontraron diferencias estadísticamente significativas en las curvas de supervivencia en función de los rangos de edad en el momento de la punción lumbar (Figura 38), en las que podemos observar como aquellos pacientes con una edad por encima de 45 años en el momento de la punción lumbar presentaron una mediana de tiempo de conversión a formas progresivas de 9 años frente a los 18 años en el grupo de pacientes comprendidos entre 30 a 45 años. Esto nos indica que la velocidad media a la que se produce la progresión a EMSP en este grupo de pacientes de más edad es mayor.

En cuanto a las curvas de supervivencia de acuerdo con el punto de corte de 35,37, no se encontraron diferencias estadísticamente significativas en los test de contrastes, tal como se observa en la tabla 32 y la figura 37. En los pacientes con un índice kappa por debajo del punto de corte se observa un tiempo de conversión a secundaria progresiva menor con respecto a

los pacientes con índice kappa por encima de 35,37 (mediana: 14 años frente a 15 años) (Tabla 32).

El estudio del resto de variables no indicó diferencias estadísticamente significativas en los test de contrastes. En el caso concreto de la vitamina D, hay que destacar que los pacientes con déficit de vitamina D en nuestro estudio progresaban a secundaria progresiva en promedio antes que los que no presentaban déficit de dicha vitamina (9 años frente a 16 años), tal como se puede observar en la tabla 32.

Por último, se realizó el análisis multivariante mediante la regresión de Cox, para ello se incluyó el índice kappa junto con otras variables como el índice de IgG, índice de IgM, la EDSS basal y la edad en el momento de la punción lumbar. La edad en el momento de la punción lumbar se estudió agrupada en los rangos anteriormente mencionados, el resto se estudió como variables cuantitativas sin categorizar según puntos de corte ni rangos.

Los resultados de la regresión de Cox se indican en la siguiente tabla:

	p	HR	IC95%
EDSS basal	0,032	2,20	1,07-4,54
Edad PL rangos	0,006	5,84	1,67-20,42
Índice Kappa	0,008	1,02	1,01-1,03
Índice IgG	0,837	0,981	0,82-1,17
Índice IgM	0,031	0,001	0,00-0,42

Tabla 33: Resumen del análisis multivariante de Cox. Sólo la variable EDSS es estadísticamente significativa en el modelo de regresión. PL: punción lumbar; HR: Hazard ratio o riesgo; IC95%: intervalo de confianza al 95%. A través de este modelo buscamos aquellas variables que expliquen la progresión desde un EMRR a EMSP. Los rangos de edad en el momento de la punción lumbar analizados en el modelo de Cox fueron: de 30 a 45 años y de más de 45 años.

En el análisis multivariante de Cox, sólo el índice IgG no fue estadísticamente significativo en el modelo (p=0,837). La edad en el momento de la punción lumbar fue la que presentó un

mayor Hazard ratio (HR), el cual fue de 5,84 (IC del 95%: 1,67- 20,42), menor que para el índice kappa que fue de 1,02. Esto significa que los pacientes que aumenten de rango de edad tendrán una probabilidad 5,84 veces mayor de progresión que los pacientes con un rango de edad inferior. La EDSS basal fue la siguiente variable que presentó un mayor HR, la cual fue de 2,20 (Tabla 33).

Con respecto al índice de IgM, el HR estuvo por debajo de 1, lo cual nos indica que los pacientes que presenten un aumento en el valor del índice de IgM tendrán una disminución de la probabilidad de progresar a EMSP, dato que difiere con los resultados obtenidos anteriormente, en el que los pacientes con EMSP presentaban valores de índice de IgM más elevados con respecto a los pacientes con EMRR (Tabla 18).

4.8. Algoritmo de clasificación de las formas progresivas de las remitentes

A lo largo de este trabajo de Tesis, se han evaluado los valores del índice Kappa y de las distintas variables de interés en la patología y su relación como marcador de progresión de la enfermedad, con la finalidad de desarrollar un posible algoritmo de clasificación de los subtipos progresivos con el objetivo de que sea de utilidad en la práctica clínica. Con este algoritmo, se ha pretendido orientar al clínico acerca del pronóstico del paciente a fin de establecer y definir un tratamiento modificador de la enfermedad de forma temprana y el más adecuado a la situación de cada individuo afecto, con el propósito de minimizar la acumulación de daño neurológico y de discapacidad en estos pacientes a lo largo de la historia de su enfermedad, ya que es uno de los principales factores que menguan la calidad de vida de estos pacientes.

En la siguiente lista gráfica se resumen los resultados obtenidos a lo largo de este trabajo de las principales variables en las que se han observado diferencias entre fenotipos EMRR y EMPP y las referencias de las tablas dónde están recogidos estos datos.

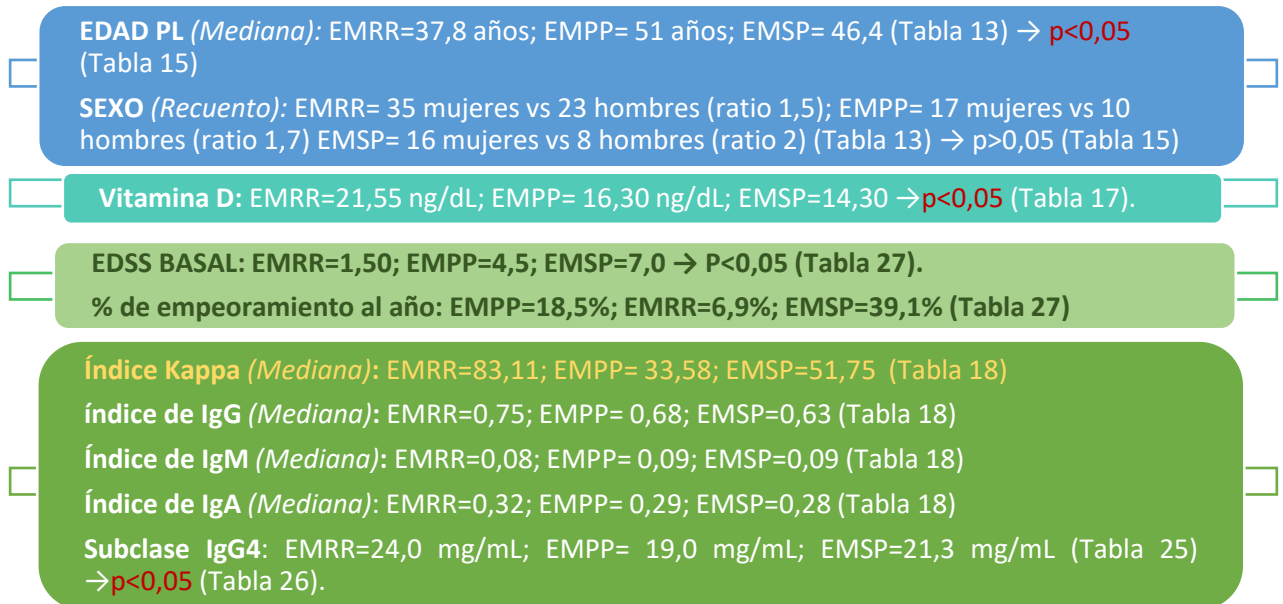


Figura 39: Resumen de los principales resultados obtenidos durante el estudio entre pacientes con EMRR y EMPP. Las variables incluidas han mostrado diferencias entre ambos fenotipos. Se muestra el recuento de casos en función del sexo y los datos en medianas para la edad en el momento de la punción lumbar (PL), la EDSS basal, la vitamina D, índice kappa, índices de IgG, de IgM y de IgA y la

subclase IgG4. También se indica la referencia de la tabla donde están recogidos esos resultados y los valores de p.

Para la elaboración de un algoritmo de clasificación entre subtipos progresivos (EMPP y EMSP) y remitentes-recurrentes, se empleó un modelo de regresión logística multivariante, el cual incluyó las variables que habían presentado diferencias estadísticamente significativas entre ambos fenotipos a lo largo de este trabajo. Estas variables incluidas para la realización del modelo fueron: la edad en el momento de la punción lumbar diagnóstica, la EDSS basal, los niveles de vitamina D, la concentración de la subclase de IgG4 y el índice Kappa según el punto de corte calculado para fenotipos progresivos de 35,37 (Figura 32 y 39). El índice de IgG, el índice de IgA, el índice de IgM y el sexo, aunque a la vista mostraban diferencias en sus valores medios entre ambos subtipos, estas diferencias no fueron estadísticamente significativas y, por ello no se incluyeron en la realización del modelo de regresión.

El modelo de regresión logística sigue la siguiente ecuación:

$$\ln \frac{P}{1-P} = \beta_0 + \beta_1 * X_1 + \beta_2 * X_2 + \dots$$

En primer lugar, se analizó la presencia de valores atípicos a través de la prueba estadística de Tukey, el cual toma de referencia el rango intercuartílico (RIC). Un valor atípico extremo es aquel que está a 3 veces la distancia de RIC. Con ello obtuvimos 4 valores atípicos que no fueron excluidos para el modelo de regresión ya que, tras comprobación de estos valores, no se trataban de un error analítico y, aunque podían distorsionar ligeramente el resultado, daban mayor valor al estudio.

Otro punto importante que tuvimos en cuenta es que, debido al tamaño de la cohorte de casos (pacientes con EMPP y EMSP), tuvimos que ajustar el número de variables del modelo para evitar problemas de sobreajuste. Según el criterio de Feinstein este debe ser igual o superior 20 casos por variable (Peduzzi P, 1996), aunque en otros estudios es válido un número mayor de 10 casos por variable. En principio para nuestro modelo, lo ideal es un máximo de 4 variables.

La construcción de la ecuación del modelo logístico se realizó paso a paso mediante eliminación regresiva bajo el criterio de elección del test estadístico de contraste, los cuales fueron el test de Wald y el test de la razón de verosimilitud. Ambas pruebas permiten

establecer qué variables introducidas son importantes para explicar la probabilidad de que un paciente presente un fenotipo remitente-recurrente o un fenotipo progresivo.

Según los resultados de la regresión logística, sólo la vitamina D no fue estadísticamente significativa y no aparece en el modelo de regresión final. En nuestro modelo observamos que por cada año de incremento de la edad en el momento de la punción lumbar diagnóstica, la probabilidad de desarrollo de un fenotipo progresivo se incrementa en 0,130. En cuanto a la EDSS basal, cada aumento en un punto en la escala de discapacidad incrementa la probabilidad de que el paciente presente EMPP en 2,067 en el modelo de regresión (Tabla 34). Mientras que el índice Kappa según el punto de corte de 35,37 y los niveles de IgG4 presentan un efecto protector para el desarrollo de un fenotipo progresivo con odds ratio menores de 1. En concreto, los pacientes que presentan un índice Kappa superior a 35,37 presentan una disminución de la probabilidad de desarrollar un fenotipo progresivo de 2,632.

La ecuación del modelo resultante fue la siguiente:

$$\ln P/1-P = -9,582 + 0,130 * \text{Edad PL} + 2,067 * \text{EDSS basal} - 0,045 * \text{IgG4} - 2,632 * (\text{Índice Kappa} < 35,37)$$

Para la elaboración del modelo logístico, se calcularon los coeficientes de determinación R de Nagelkerke y R de Cox y Snell para poder estimar en qué grado las variables independientes del modelo podían explicar la varianza de la variable dependiente. El R² de Cox y Snell es un coeficiente de determinación generalizado que se utiliza para estimar la proporción de varianza de la variable dependiente explicada por las variables predictoras. Su valor fluctúa entre 0 y 1, pero en la práctica no llega a 1. El R² de Nagelkerke es una transformación del R² de Cox y Snell que corrige la escala del estadístico para cubrir el rango completo de 0 a 1 (Hair J, 2010). En nuestro modelo, el R cuadrado de Cox y Snell es de 0,634, lo que significa que las variables empleadas explican el 63,4% de la varianza de la variable independiente que es la progresión de la enfermedad (Tabla 34).

Los resultados de la regresión logística se resumen en la siguiente tabla:

VARIABLES	Coeficiente Beta	OR (IC95%)
Edad PL	0,130	1,139 (0,984-1,318)
EDSS basal	1,982	7,904 (2,413-25,896)
IgG4	-0,040	0,956 (0,916-0,998)
Índice Kappa <35,37	-2,632	0,072 (0,002-2,282)
R2 Nagelkerke= 0,859; R2 Cox y Snell=0,634		
Test Hosmer-Lemeshow p=0,291		
Sensibilidad=0,95 (IC95 0,89-1,0); Especificidad= 0,96 (0,89-1,00)		

Tabla 34: Resumen modelo regresión logística para la clasificación entre EMRR y EMPP. Las variables explicativas que presentaron diferencias estadísticamente significativas (valor $p < 0,05$) fueron la edad en el momento de la punción lumbar (PL) y el valor de EDSS basal. El coeficiente beta es el coeficiente de regresión, el cual nos indica el número de unidades que aumentará o disminuirá la probabilidad de clasificar a los pacientes con EMPP. La OR (odd ratio) corresponde al valor exponencial de beta y cuando su valor es mayor de 1 nos indica que un aumento de la variable explicativa aumenta la probabilidad de que ocurra el evento (en nuestro caso, la presencia del fenotipo EMPP). El R^2 de Nagelkerke y el R^2 Cox y Snell corresponden a los coeficientes de determinación. El test de Hosmer-Lemeshow nos indica si nuestro modelo está calibrado, es decir, que se ajusta la probabilidad predicha con la observada ($p > 0,05$).

El ajuste del modelo o calibración se realizó con la prueba de Hosmer-Lemeshow. La calibración se refiere al grado en que la probabilidad predicha coincide con la observada, para ello, la prueba de Hosmer-Lemeshow debe presentar un valor de $p > 0,05$. El otro aspecto para valorar es la capacidad de discriminación del modelo, que es el grado en que el modelo distingue entre individuos en los que ocurre el evento y en los que no ocurre, la cual se determina mediante el área bajo la curva ROC. Nuestro modelo presenta una buena discriminación y calibración, obteniendo un AUC de 0,979 y una significancia estadística en el test de Hosmer-Lemeshow $p = 0,291$ (Tabla 34 y figura 40).

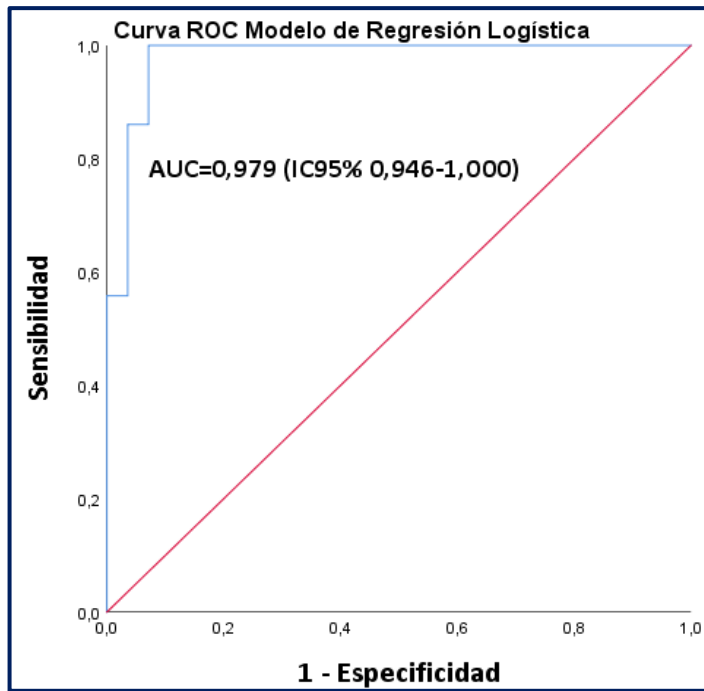


Figura 40: Curva ROC de los valores predichos por el modelo para la clasificación de pacientes con EMPP y pacientes con EMRR. La línea trazada desde el punto con coordenadas 0,0, 0,0 al punto con coordenadas 1,0, 1,0 corresponde a la línea de referencia.

5. Discusión

5. DISCUSIÓN

El curso de la EM es variable teniendo diferentes fases, las cuales se clasifican en función de las recaídas, en las que los pacientes suelen experimentar posteriormente una recuperación parcial o completa, y de una progresión de la disfunción irreversible del sistema nervioso central (Wolinsky JS, 2003).

Actualmente son dos los fenotipos de formas progresivas de EM, la forma primaria progresiva, que comienza sin recaídas previas, afectando aproximadamente entre el 10 al 15% de los pacientes con EM, y la EMSP, que comienza con un curso de enfermedad recurrente-remitente evolucionando hacia un fenotipo progresivo en el transcurso de los 10-15 años desde el inicio de la enfermedad.

En general, los subtipos de EM se caracterizan por una acumulación gradual de discapacidad neurológica, que es independiente de las recaídas en el caso de las secundarias progresivas, y que queda verificada después de la evidencia en un año de la existencia de progresión clínica documentada mediante la medida de EDSS, tanto determinada de forma retrospectiva como prospectiva (Thompson AJ, 2018). En ambos casos, las formas progresivas, tanto EMPP como EMSP, suelen manifestarse a edades más avanzadas, en torno a los 40 años.

El diagnóstico de estos fenotipos generalmente se retrasa ya que es compleja su determinación debido a los síntomas poco claros con los que a veces se manifiestan (Kingwell E, 2010). Muchos factores clínicos y radiológicos se han relacionado con la progresión y el pronóstico de la EM, como la discapacidad, la tasa de recaídas anual y los parámetros de RMN (las lesiones T1 hipointensas y la atrofia cerebral medida como pérdida de volumen) (Wattjes MP, 2015). Junto a estos, muchos biomarcadores en LCR se han propuesto para el diagnóstico de estos perfiles, en particular la presencia de bandas oligoclonales de IgG (BOCG), las cuales se han introducido en los últimos criterios diagnósticos para EM de McDonald de 2017, como un biomarcador que puede equipararse en importancia a la diseminación en el tiempo, en los casos en los que no exista evidencia de ella en RMN. Por otra parte, la presencia de bandas oligoclonales de IgM lípido-específicas en el momento del diagnóstico, se ha relacionado con una peor evolución de la enfermedad (Villar LM, 2005). Sin embargo, esta técnica presenta varias limitaciones analíticas, como son el tiempo de duración de la técnica, la especialización del personal técnico y la subjetividad en la interpretación de los patrones.

Esto ha llevado a analizar otros posibles biomarcadores específicos y sensibles, que ayuden no sólo al diagnóstico clínico de la EM, sino también que ayude a un enfoque terapéutico adecuado, con el objetivo de disminuir o minimizar la progresión de la enfermedad.

En este contexto, la cuantificación de las CLL kappa (CLL_k) en LCR se ha propuesto como un biomarcador prometedor para el diagnóstico de esta enfermedad. Además, este interés creciente se ha apoyado principalmente en la disponibilidad de ensayos viables y automatizables con un coste más asequible y menos dependiente del observador, como son la turbidimetría y la nefelometría. Artículos de reciente publicación proponen, el uso clínico del índice Kappa en lugar de la determinación de CLL_k de forma aislada, como un marcador que presenta una mayor precisión diagnóstica, con una menor tasa de resultados falsos positivos y además contempla la integridad de la barrera hematoencefálica (Ramsden DB, 2017).

Si bien hay numerosos estudios que avalan que las BOC de IgM lípido específicas están asociadas con un peor pronóstico de la EM, aún existen pocos estudios que evalúen el valor del índice kappa como posible marcador de la progresión de la enfermedad. Algunos trabajos como el de Rathbone (Rathbone E, 2018), han evaluado la utilidad de las de CLL kappa en LCR en el momento de la punción lumbar como predictor de la progresión de la enfermedad a los 5 años del diagnóstico, en una cohorte de 50 pacientes con EMRR y 20 con EMPP. De los escasos estudios encontrados en los que se evalúa el índice kappa en cohortes con fenotipos progresivos, encontramos el trabajo de Vecchio (Vecchio D, 2019) y el de Rosenstein (Rosenstein I, 2021). El estudio de Vecchio sugiere que el índice kappa puede presentar utilidad como un marcador cuantitativo para predecir la discapacidad temprana en la EM tras un estudio en el que se incluyeron 5 casos con EMPP (Vecchio D, 2019).

En esta línea nuestro interés en esta tesis ha sido evaluar la utilidad del índice Kappa como predictor en las formas progresivas de EM, estableciendo distintos valores de corte que nos permitan llegar a una estratificación de los distintos fenotipos en base a los puntos obtenidos. También se han estudiado la intervención de diferentes factores demográficos, clínicos y paraclínicos como posibles factores de riesgo para el desarrollo de estas formas progresivas, como son la edad avanzada, el sexo, los niveles bajos de vitamina D, la obesidad, la presencia de otras comorbilidades y el tabaco.

Debido a las características de estos pacientes, la principal limitación de nuestro estudio es el bajo tamaño muestral por varios motivos:

- Estos fenotipos de la enfermedad son más infrecuentes (en particular hablamos de la EMPP).
- Requieren tener variables durante largos periodos de seguimiento.
- El LCR en estos fenotipos (sobre todo la EMSP) se suele recolectar en el momento del diagnóstico de la enfermedad y no cuando han evolucionado.
- El impacto de las terapias modificadoras de la enfermedad, las cuales pueden retrasar la evolución a formas secundariamente progresivas.

5.1. Características de la cohorte de pacientes

Analizamos un total de 278 pacientes, divididos en grupo control con 163 pacientes y un grupo de casos con 6 pacientes con SNA y 109 pacientes con EMCD, que a su vez está subdividida en un subgrupo con EMRR, con 58 casos, un subgrupo con EMSP, con 24 casos, y un subgrupo con EMPP, con 27 casos.

Los casos con formas progresivas (grupo EMSP y grupo EMPP) representan una media de edad mayor en el momento de la PL diagnóstica (46,4 años para EMSP y 51,4 años para EMPP) respecto a las formas de EMRR (37,8 años). Estos resultados están en consonancia con los hallazgos recientes, en los que se observa que la transición de la fase remitente-recurrente a la fase progresiva en la EM suele ocurrir en torno a la quinta década de la vida (Zeydan B, 2020) y, en pacientes con EMPP, en el que se ha descrito una edad de comienzo en torno a 40 años (Povedano B, 2019; Rice CM, 2013). En la EM, la reserva estructural del sistema nervioso central disminuye tanto por el envejecimiento propio del paciente como por los propios mecanismos asociados a la enfermedad, lo que confluente en un efecto sinérgico de senescencia celular. Por lo tanto, el envejecimiento es también factor clave en el empeoramiento de la discapacidad (Zeydan B, 2020).

En nuestra cohorte patológica de estudio, se observó una mayor frecuencia de mujeres con respecto a hombres, siendo la relación de mujeres/hombres de 1,5 para EMRR y 2 y 1,7 para los grupos EMSP y EMPP, respectivamente. Este dato respecto a EMPP no está en concordancia con los estudios publicados hasta la fecha, en los que la evidencia indica que la EMPP ocurre de manera más homogénea tanto en hombres como en mujeres. En nuestro caso, es probable que el bajo número de casos con EMPP en el estudio no refleje los datos actuales confirmados por distintos estudios. En el caso concreto de las formas secundarias

progresivas, en algunos estudios se ha visto una proporción ligeramente más alta en el sexo masculino, asociándose este sexo con un desarrollo más rápido a este tipo de perfil evolutivo (Scalfari A, 2013; Koch M, 2010)(Fambiatos A, 2020). En nuestro estudio encontramos el doble de pacientes de sexo femenino que masculino y, además las mujeres presentan una edad media mayor en el momento de la punción con respecto a los hombres (47,7 años frente a 43,8 años, respectivamente). Se ha observado que el sexo femenino es más propenso a recaídas que el masculino y es posible que esta mayor actividad de recaídas retrase el diagnóstico de EMSP en mujeres (Kalincik T, 2013).

El grupo control está formado por 163 pacientes, con una media de edad de 49,9 años y una proporción de mujeres/hombres similar al resto de los grupos con EM. Tras el estudio de la presencia de comorbilidades, se ha observado que este grupo control presenta una mayor frecuencia de comorbilidad, como son un mayor número de pacientes con diabetes con respecto a los demás grupos.

El número de pacientes en el grupo EMRR fue superior con respecto al resto de los grupos con EM, con un total de 58 pacientes que representaron el 50,9% de los casos. Esta cifra es ligeramente inferior a la frecuencia media de este fenotipo en la población, el cual ronda el 85% de los enfermos con EM. Esto se debe a que la inclusión de los casos no fue aleatoria sino escogida de forma que pudiéramos tener cohortes equiparables en la medida de lo posible en cada uno de los grupos de estudio. Este hecho enriqueció nuestra cohorte de pacientes con EMPP y EMSP, que representaron un 23,7% y un 21,05% respectivamente, del total de pacientes con EM. Los individuos con SNA fueron mínimos (6 pacientes), dato que se ajusta al nuevo concepto establecido para estos pacientes en los nuevos criterios de McDonald 2017, en los que la inclusión de las BOCG, pueden sustituir el requisito de la diseminación en el tiempo y con ello se realiza el diagnóstico clínicamente definido de EM siempre que se cumpla los criterios de diseminación en el espacio (Thompson AJ, 2018).

5.2. Estudio de los factores de riesgo

Se han estudiado diversos factores ambientales que están asociados con el riesgo de desarrollar EM. Entre los que presentan mayor evidencia están el virus Epstein-Barr, la deficiencia de vitamina D, la obesidad y el tabaquismo. En esta tesis, hemos incluido estos factores de riesgo y la presencia de diversas comorbilidades como la diabetes y las

enfermedades autoinmunes previas como variables de riesgo para el estudio de los fenotipos progresivos de la EM. De todas las variables estudiadas en nuestra cohorte, sólo el déficit de vitamina D ha mostrado diferencias estadísticamente significativas en los grupos con formas progresivas, siendo esta diferencia más acentuada entre los pacientes con EMRR y los pacientes con EMSP, teniendo siempre en cuenta que España es un país con una alta prevalencia de deficiencia en vitamina D (Navarro C, 2014). El papel inmunomodulador de la vitamina D se ha documentado abundantemente en los últimos años, involucrando a las diferentes categorías de linfocitos B y T y varias citocinas, además de funciones a nivel del SNC (Rolf L, 2014; Sandberg L, 2016; Pierrot-Deseilligny C, 2017) y es a través de estos mecanismos por los que interviene en el desarrollo de EM. Lo expuesto en el estudio de Sandberg, muestra una asociación entre las concentraciones bajas de vitamina D y un mayor daño axonal a nivel del SNC (Sandberg L, 2016), siendo compatible esta mayor carga de lesión axonal con la presente en los fenotipos progresivos. No obstante, los resultados pueden presentar ciertos sesgos de selección al no poder excluirse otras causas de niveles bajos de vitamina D.

Con respecto al tabaco, aunque los resultados no fueron concluyentes, sí que se observó un mayor número de ex fumadores de lo esperado en los pacientes con EMPP. Diferentes estudios observacionales han asociado el consumo de tabaco como un factor de riesgo de desarrollo de EM, pero el papel del tabaco como factor de progresión es más controvertido, los resultados publicados son contradictorios y presentan gran variabilidad, lo que ha dificultado establecer una conclusión firme al respecto (Arruti M, 2015). También se ha incluido como factor de riesgo el tabaquismo pasivo (Nourbakhsh B, 2019). Un reciente estudio llegó a la conclusión de que la irritación pulmonar por inhalación del humo de los cigarrillos es el mediador de la asociación entre el tabaquismo y el riesgo de EM, hecho similar a otras enfermedades autoinmunes como la artritis reumatoide, en las que la irritación pulmonar puede desencadenar respuestas inflamatorias y autoinmunidad (Brownlee WJ, 2017). Siguiendo con este dato, la presencia de fumadores en función de la presencia de enfermedades autoinmunes previas en nuestra cohorte fue de 9 fumadores y dos ex fumadores del total de pacientes con enfermedades autoinmunes previas (24 casos). De estos 24, 8 presentaban EM y de estos, un 50% eran EMPP, con diagnóstico concomitante de enfermedad de Graves, trombocitopenia autoinmune, artritis reumatoide y síndrome de Sjogren (Tabla 16). Aunque las pruebas estadísticas no reflejaron ningún tipo de asociación

debido al bajo número de pacientes.

Con el resto de las comorbilidades, encontramos diferencias estadísticamente significativas con la presencia de diabetes y la presencia de anticuerpos séricos frente al VEB y al Citomegalovirus. Un reciente estudio longitudinal publicado este último año, mostró una fuerte y clara evidencia entre la seroconversión por el virus de Epstein-Barr y el desarrollo de EM en una amplia cohorte de sujetos jóvenes, en la que 955 sujetos desarrollaron EM en un periodo de estudio de 20 años (Bjornevik K, 2022). La reproducibilidad de estos resultados no se observa en nuestra cohorte ya que en su mayoría son pacientes de muchos años de evolución y, por tanto, en el momento de su diagnóstico la determinación de este virus no era un marcador que se precisase como ahora. Por tanto, no contamos con todos los análisis de estos casos.

5.3. Evaluación de la síntesis intratecal en pacientes con formas progresivas

Como podemos observar en la tabla 18, todos los fenotipos de EM presentan valores de la mediana de CLL kappa, índice Kappa y resto de índices significativamente más elevados con respecto al grupo control. También presentan positividad de las BOCG con respecto al grupo control, existiendo diferencias estadísticamente significativas entre los casos con EM y el grupo control, a excepción del índice de IgA que sólo presentó diferencias entre el grupo EMRR y el grupo control. Este último dato coincide con un estudio publicado en los últimos años, en el que se halló un mayor porcentaje de pacientes con EM que presentaban síntesis de IgA intratecal, especialmente pacientes con SNA que desarrollaron posteriormente EMRR (Muñoz U, 2022).

Al estudiar los valores de las CLL kappa, el índice Kappa, índice de IgG e índice de IgM en la cohorte de paciente con EM, observamos valores más bajos de la mediana en las formas progresivas y valores ligeramente más altos de índice IgM en estos fenotipos.

Estos niveles más bajos de CLL kappa e índice kappa observados en pacientes con formas progresivas con respecto a los pacientes con EMRR y SNA, coinciden con lo publicado por la Dra. Rosenstein y su equipo en el año 2021. En este artículo, se analizó el índice kappa en una cohorte de 161 pacientes con EMRR, 19 pacientes con EMPP Y 23 con EMSP, a las que se

realizó la determinación de las CLL kappa. Los pacientes con EMPP presentaron una mediana de índice Kappa de 33,2, muy similar al obtenido en nuestra cohorte de 33,58, aunque los pacientes con EMSP presentaron una mediana de 25,5 muy inferior a la obtenida en nuestros pacientes, la cual fue de 51,75 (Rosenstein I, 2021).

Entre los distintos fenotipos, no encontramos diferencias estadísticamente significativas en el índice Kappa entre el conjunto de las formas progresivas (EMSP y EMPP) con el grupo de EMRR ($p=0,053$). A simple vista, las diferencias en los niveles de CLL kappa y los diferentes índices en función del fenotipo podría implicar que inicialmente hay una producción acentuada de inmunoglobulinas a nivel intratecal, sobre todo en las formas remitentes-recurrentes y que esta producción es menor en las formas progresivas. Estos niveles de CLL más moderados en estos pacientes podrían estar relacionados con un menor número de lesiones cerebrales activas, siendo más frecuente las placas latentes o inactivas en EM progresiva, según se desprende de algunos estudios (Frischer JM, 2015). Al analizar las distintas variables en los fenotipos progresivos, observamos que las formas EMPP presentan en general una menor dispersión de los datos con menor amplitud en el rango intercuartílico, principalmente en el índice Kappa e índice IgG; mientras que en el caso de las formas secundarias progresivas existe una mayor dispersión en el índice Kappa, que nos muestra que hay pacientes con valores más elevados a diferencia de las formas primarias progresivas.

En nuestro estudio, la producción de CLL en todos los subtipos sería predominantemente de tipo IgG, aunque las IgA e IgM también contribuirían a la concentración total de CLL en LCR, tanto de CLL kappa como lambda, las cuales estas últimas no están incluidas en el estudio. En el estudio de Rathbone y su equipo, encontraron que una baja proporción entre CLL Kappa/Lambda en LCR en el momento de la punción lumbar diagnóstica se ha relacionado con mayores puntajes en la EDSS. Los datos de este estudio planteaban la posibilidad de que la propagación del repertorio de anticuerpos comenzaba por el uso predominante de CLL κ , conduciendo posteriormente a una mezcla de κ y λ , el cual estaría involucrada en la progresión de la enfermedad (Rathbone E, 2018).

A medida que avanza la progresión y se produce una mezcla de ambas CLL, se produciría a su vez síntesis de IgG e IgM (Ayoglu B, 2013; Rathbone E, 2018), hecho que nos sugiere ese incremento de IgM y la mayor tasa de positividad de las BOCG en nuestra cohorte de pacientes con formas progresivas, además de una disminución en las concentraciones de CLL kappa.

Según la bibliografía, las CLL retroalimentarían este proceso, ya que son capaces de unirse a los antígenos y a la inmunoglobulina completa, produciendo un aumento de su afinidad específica, lo que se conoce como fenómeno de hipermutación somática, siendo conocido este efecto como una parte activa de los mecanismos patogénicos de las enfermedades inflamatorias crónicas (Basile U, 2017).

En nuestro análisis también hemos observado en la formas remitentes-recurrentes una mediana ligeramente más alta de índice IgA con respecto a las formas progresivas, mientras que en las formas progresivas existe un incremento del índice IgM como hemos mencionado anteriormente. En distintos artículos ya se ha relacionado la presencia de BOC de IgM con una progresión más rápida de la enfermedad y con puntuaciones altas en la Escala Ampliada del Estado de Discapacidad (Mandrioli J, 2008; Villar LM, 2001; Villar LM, 2005), que podría explicar dichos niveles más altos de índice IgM en nuestra cohorte de pacientes con fenotipos progresivos, los cuales también presentan puntajes más altos en la EDSS.

En el caso concreto del grupo con SNA, nos encontramos con un grupo minoritario de pacientes que no se puede clasificar como EMCD con los criterios actuales y que presentan rangos de valores de índice Kappa y CLL kappa muy amplios y dispersos, como ya se observa por sus respectivos rangos intercuartílicos. Al analizar la presencia de BOCG en estos seis pacientes, sólo cinco presentaban bandas oligoclonales positivas. Coincide que estos cinco pacientes con BOC positivas muestran niveles más altos de CLL kappa e índice Kappa con una mediana de 7,93 y 155,65, respectivamente; frente a niveles de 0,28 y 3,54 en el caso con BOC negativas, lo que nos sugiere que estos 5 pacientes presentan un riesgo más elevado de conversión a EMCD según los datos obtenidos previamente en nuestro laboratorio (Índice Kappa > 10,62). Es necesario llevar a cabo en un seguimiento de estos individuos para poder iniciar un tratamiento temprano y prevenir el daño neurológico al inicio de la enfermedad.

Análisis de los puntos de Corte

El punto de corte obtenido para el índice Kappa mediante curvas ROC para el diagnóstico de EMRR fue de 9,045, ligeramente más bajo al empleado en el laboratorio de 10,62, el cual fue publicado y validado por la Dra. Menéndez (Menéndez-Valladares P, 2019). El punto de corte calculado para EMPP fue de 8,792, el cual difiere ligeramente al punto de corte de los pacientes con EMRR (Tabla 20). Estas diferencias podrían ser debidas al propio valor promedio del índice Kappa en los pacientes con EMPP, ya que presenta un valor de la mediana inferior al grupo de pacientes con EMRR, el cual fue de 33,58 frente a 83,11 (Tabla 18). Además, como podemos observar en la figura 31, la mayor parte de los pacientes con EMPP están concentrados en valores de índice kappa por debajo de 100, mientras que los pacientes con EMRR presenta un mayor número de pacientes con valores de índice kappa igual o superior a 100. Esto puede sugerir que en los estadios iniciales de la enfermedad hay un importante aumento de las CLL que son las principales responsables de las lesiones y el proceso fisiopatológico subyacente de la enfermedad. Mientras que en fenotipos progresivos desde el principio (EMPP) o desarrollados a posteriori (EMSP) hay una clara disminución del componente monoclonal expresado por el descenso de las CLL kappa y un aumento de la IgM que podría guardar relación con el aumento del componente inflamatorio característico de estas entidades, debido a una acumulación lenta de células T y B en el tejido conectivo cerebral (Lassmann H, 2019).

Hay que destacar que en la literatura hemos encontrado escasas publicaciones que realicen estudios del índice kappa en cohortes con fenotipos progresivos y ninguna que estime un punto de corte óptimo entre los pacientes con EM que ayude a orientar al clínico sobre la progresión de la enfermedad.

El artículo de la Dra. Rosenstein, mencionado anteriormente, incluyó pacientes con fenotipos progresivos, obtuvo un punto de corte diagnóstico para el índice kappa de 4,6 con una sensibilidad de 0,96 y una especificidad de 0,87, excluyendo a los pacientes con SNA (Rosenstein I, 2021). Un punto de corte inferior al calculado para EMRR de 9,045, el cual también presentó un excelente rendimiento diagnóstico con una sensibilidad algo inferior de 0,89 y una especificidad superior de 0,92.

En cuanto a los artículos que analizan el índice Kappa mediante el uso de la turbidimetría para las CLL kappa, siendo la misma técnica empleada en este estudio, encontramos varios

puntos de corte para el diagnóstico de EM, pero ninguno que incluya fenotipos progresivos. Entre estos estudios, los valores de corte propuestos por la Dra. Sanz de 3,045 o el de la Dra. Gudowska de 9,4, presentaron sensibilidades de 97,78% y 96% y una especificidad de 86,29% y 68%, respectivamente (Sanz CT, 2021; Gudowska M, 2020). En comparación con estos trabajos, nuestros puntos de corte en función de los distintos fenotipos presentan muy buenos rendimientos diagnósticos en términos generales.

En cuanto al valor de corte óptimo del índice Kappa estimado para la diferenciación entre las formas progresivas y las formas con EMRR, el cual fue de 35,37, presentó un peor rendimiento diagnóstico con respecto al calculado para el diagnóstico de EM, con una sensibilidad del 49% y una especificidad del 79%. Esta eficacia diagnóstica mejora significativamente con el uso combinado de las BOCG, como podemos observar en los resultados. Este menor rendimiento diagnóstico es debido a la propia distribución del índice kappa entre los pacientes con ambos cursos evolutivos, en los que se observa cierto solapamiento de casos a niveles de índice kappa bajos y medios como hemos mencionado anteriormente (Figura 31).

Al aplicar este punto de corte para la caracterización de los pacientes con EMPP, obtenemos una ligera mejora de la sensibilidad del 52% y un empeoramiento de la especificidad del 79%, con una OR de 4,12; es decir, la probabilidad de que un paciente con EM presente un fenotipo de primaria progresiva es 4,12 veces superior si presenta un nivel de índice Kappa inferior a 35,37 (Tabla 22). Con estos resultados llegamos a la conclusión de que el uso del índice kappa como prueba para la estratificación de los perfiles evolutivos es útil, siendo adecuado su inclusión en algoritmos de decisión junto con otros marcadores para apoyar el diagnóstico de estos fenotipos.

Con respecto al índice IgG, el punto de corte fue de 0,575, con una sensibilidad y especificidad del 77% y 86%, una exactitud diagnóstica aunque bastante aceptable fue inferior al obtenido por el índice kappa (sensibilidad de 0,88 y especificidad superior de 0,91), dato que ya se ha ido corroborando en diferentes publicaciones (Senel M, 2019; Vecchio D, 2020).

El punto de corte para el índice IgM también se calculó para las formas progresivas, aunque la eficacia diagnóstica no fue tan buena como las anteriores, con una sensibilidad de 65% y una especificidad del 60%. A pesar de este menor rendimiento, tanto el grupo con EMSP como con EMPP fueron los que presentaron un mayor porcentaje de pacientes con valores de índice

de IgM superiores a 0,079. En un estudio donde se relacionó el índice IgM con la progresión de la EM, encontraron que la mayoría de los sujetos con índices de IgM superiores a 0,2 presentaban principalmente curso de EMSP y EDSS mayor de 6,0, además en los pacientes con índice IgM aumentados tenían más lesiones espinales y el tiempo de conversión a EMSP se correlacionó con los valores del índice IgM (Ozakbas S, 2017).

Otro punto a tener en cuenta es que, en nuestro estudio y en otros mencionados como el de Rosenstein, no se observaron diferencias de estas variables en función de la presencia de tratamiento previo. Es plausible pensar que este hecho en los pacientes con EMSP puede modificar de algún modo la síntesis intratecal de CLL al llevar largos periodos de evolución con distintos tratamientos. Lo que sí que sacamos en conclusión es que es necesario poder clasificar al inicio entre ambos cursos de la enfermedad y, que el índice Kappa se presenta para ello como un marcador más específico y ligeramente más sensible que el índice IgG o de Tibbling-Link.

Análisis de la eficacia diagnóstica de BOCG en las formas progresivas

Como se ha descrito en el epígrafe de los resultados, las BOC de IgG en líneas generales presentaron una eficacia diagnóstica similar al índice Kappa en los distintos fenotipos.

Se ha estudiado el papel de las BOC en la progresión de la enfermedad, aunque los resultados han sido controvertidos. Estudios como el de Avasarala y Cross encontraron que los pacientes que presentaban menores valores en la EDSS presentaban un bajo número de bandas oligoclonales de IgG, respecto a los que tenían valores altos en la EDSS (Avasarala JR, 2001), aunque en nuestro caso el número de BOC no fue recogido. En nuestro estudio, la mediana en la EDSS fue de 3 en los pacientes con BOCG positivas frente a un puntaje medio de 2 en la EDSS en los pacientes con BOCG negativas. Además, el subtipo EMSP fue el que presentó menores tasas de negatividad, el 100% de los pacientes con este fenotipo presentaron BOC IgG positivas, además de un mayor porcentaje de pacientes con un empeoramiento al año de seguimiento.

La presencia de BOC en LCR indica una actividad inflamatoria crónica dentro del SNC, que persiste a lo largo de la evolución de la enfermedad y es una característica diagnóstica de la misma (Franciotta D, 2008). Según la bibliografía, las BOC son positivas en alrededor del 87.7% de pacientes con EM y en el 68% de pacientes con SNA (Dobson R, 2013). Según nuestra

cohorte, este porcentaje de positividad en general para EM fue del 93,57%. Estudios también asocian las BOC con un aumento de los niveles de actividad de la enfermedad y discapacidad (Avasarala JR, 2001; Joseph FG, 2009), un mayor riesgo de segundo ataque y una mayor probabilidad de conversión de un SNA a una EMCD, es decir con el diagnóstico (Zipoli V, 2009). La ausencia de BOC se ha relacionado con un mejor pronóstico de la enfermedad (Fransen N, 2021), aunque también otros estudios no llegan a las mismas conclusiones (Lourenco P, 2013), aun así no se ha demostrado esta tendencia debido a que existen diferencias en la distribución de células B en la EM, responsables de la producción de inmunoglobulinas de las BOC (Bashford-Rogers RJM, 2018).

En un estudio realizado por la Dra. Villar, que incluyó 39 pacientes con EMPP y 25 con EMSP, todos mostraron un patrón positivo de BOCG en LCR. En el caso de las formas primarias progresivas, encontraron bandas oligoclonales de IgG tanto en LCR como en suero, compatible con una respuesta de IgG sistémica. La presencia de BOC de IgM anti-lípido específica no estuvo presente en ningún paciente con EMPP, pero si en el 60% de los pacientes con EMSP (Villar LM, 2009).

En esta tesis no se incluyó la determinación de BOC de IgM por limitaciones técnicas, pero como hemos ido comentando, la síntesis de IgM intratecal calculada como índice IgM se ha relacionado con un curso más agresivo de EM.

Hay que tener en cuenta de que todos los cálculos para la determinación de síntesis de IgM en LCR parecen tener una sensibilidad bastante más baja pero presentan una especificidad mayor en comparación con la detección de BOC de IgM, la cual se considera la técnica estándar por su mayor sensibilidad (Zeman D, 2020).

El uso combinado de las BOCG y el índice Kappa para la estratificación entre pacientes con EMRR y pacientes con fenotipos progresivos no mejoró la sensibilidad de cada una de las técnicas en contraste a su empleo de forma aislada, aunque se apreció una ligera mejora de la especificidad para el índice kappa y un aumento significativo de la especificidad para las BOCG, ambas empleadas de forma aislada. Existen en la literatura algunos algoritmos propuestos que combinan el uso del índice kappa y las BOCG, como el Valencia-Vera y su equipo, el cual con un punto de corte para el índice Kappa de 2,91 obtuvo una sensibilidad de 89,19% y una especificidad del 84,71% (Valencia-Vera E, 2018), rendimientos muy buenos y

similares a los nuestros, con una ligera pérdida de especificidad y un aumento de la sensibilidad del índice Kappa al emplearlo de forma combinada, que lo hace un biomarcador eficaz y válido para el cribado de esta enfermedad.

5.4. Estudio de las Subclases de IgG

El estudio de las subclases de inmunoglobulina G concluyó con diferencias relevantes en los valores de la subclase IgG4 tal como recogen los resultados estadísticos (Tabla 26), el cual presentó diferencias estadísticamente significativas entre las formas primarias progresivas y el grupo control y el grupo EMRR. Al analizar detenidamente las medianas, nos encontramos niveles medios más bajos de IgG4 y más altos de la subclase IgG3 en las formas progresivas con respecto a la remitente-recurrente. En el caso concreto del fenotipo EMPP, este presentó a su vez niveles medios más altos de IgG2 y más bajos de IgG1 con respecto al resto de los fenotipos. Como sabemos, la citotoxicidad dependiente del complemento es mediada principalmente por las subclases IgG1 e IgG3, y en menor medida por la IgG2. Esto nos sugiere que la progresión puede ser un mecanismo mediado hasta un cierto grado por el complemento, tal como apunta algunos artículos como el de Tatomir y su equipo (Tatomir A, 2017). En su estudio encontraron niveles altos de C3 del complemento en LCR en pacientes con EMPP, además de una correlación significativa entre el aumento de los niveles de factor H (factor inhibidor de c3b) y C3 con la progresión de la enfermedad en pacientes con EMRR a EMSP (Tatomir A, 2017).

Según distintos trabajos, la producción intratecal de IgG en EM es principalmente de tipo IgG1 e IgG3 y se relaciona con la presencia de células B maduras y blastos plasmáticos (Kaschka W, 1979; Di Pauli F, 2010), en nuestro caso debemos tener en cuenta que nuestras medidas fueron realizadas en suero y no en LCR como los estudios citados, ya que tras varios intentos por parte de la casa comercial Binding Site de disminuir el límite de detección de la técnica para hacerlo apto para LCR, al final no fue posible cuantificar los niveles en este tipo de muestra. Los pacientes con EM presentaron concentraciones medias más bajas de IgG1 y más altas de IgG3 en comparación con el grupo control en nuestra cohorte de estudio, no sabemos con certeza si estas relaciones son reproducibles a nivel intratecal. Un reciente estudio publicado en 2022, ha estudiado el papel de la IgG3 en la patogénesis de la EM, ya que describe que la síntesis de IgG intratecal en la EM se asocia con un aumento de polimorfismos de un solo nucleótido en el gen de la cadena pesada de IgG3 (Kennedy PGE, 2022).

Lo más relevante son los bajos niveles de IgG4 en suero en las formas progresivas y más aún en EMPP. Curiosamente, las moléculas IgG4 son propensas a la disociación de sus

cadenas pesada y ligera, esto hace pensar que la IgG4 pueda competir con otras subclases por la unión al antígeno, bloquear la activación del complemento y ser un mecanismo que contrarreste la respuesta inmune humoral (van der Zee J, 1986; Rispens T, 2009; Valenzuela NM, 2018). Lo que nos sugiere que esta disminución de IgG4 en estos fenotipos unido a lo comentado anteriormente haga que se potencie la actividad del complemento y la correspondiente respuesta inflamatoria.

Se conoce que las distintas subclases muestran diferencias sustanciales en su capacidad de mediar las respuestas efectoras, lo que contribuye a la actividad variable de los anticuerpos a los distintos antígenos en función de su interacción a los receptores Fc. Tenemos interés en un futuro de estudiar la asociación entre la progresión de la EM con los niveles de inmunoglobulinas IgG4 y su relación con el sistema del complemento.

5.5. Estudio de la EDSS en los distintos perfiles evolutivos

La medición de la progresión de la discapacidad es una tarea difícil ya que ocurre lentamente, varía significativamente entre pacientes, cambia la frecuencia en el tiempo y abarca varios tipos diferentes de funciones neurológicas. El empeoramiento de la puntuación de la EDSS debe sostenerse durante un tiempo determinado de 3 a 6 meses (Rudick RA, 2010). En nuestro estudio, realizamos un seguimiento al año. En un estudio realizado en 2015, se mostró que un empeoramiento sostenido durante periodos más largos, entre 12 a 24 meses mejoró la precisión de la medición de la progresión y que un empeoramiento sostenido en menos tiempo (de 3 a 6 meses) probablemente sobreestime la acumulación de discapacidad permanente hasta en un 30% (Kalincik T, 2015).

Las formas progresivas, tanto de EMPP como de EMSP, se caracterizan por puntuaciones más altas en la EDSS, a diferencia de las formas EMRR y SNA, como podemos comprobar en nuestros resultados (Tabla 27). Una vez que comienza la fase progresiva, la acumulación de discapacidad basada en las recaídas en la forma de inicio remitente-recurrente, da a la forma secundaria progresiva un punto de partida más alto de discapacidad con respecto a la forma primaria progresiva (Paz MM, 2015). Este hecho se observa en los resultado de nuestro estudio (Tabla 27), en el que el fenotipo EMSP presenta una mediana en la EDSS más alta al inicio (6,50), que la forma EMPP (4,50).

Al comparar los puntajes en función de la presencia de tratamiento modificador de la enfermedad, no hubo diferencias estadísticamente significativas entre los pacientes. En teoría, las terapias que modifican la enfermedad pueden tener un impacto positivo en la discapacidad, previniendo recaídas sintomáticas y actividad subclínica asintomática (Kantarci OH, 2019) y con ello una mejora en la EDSS, pero no lo vemos reflejado en nuestro estudio (Tabla 27).

En un metaanálisis de 2017, se describe como la eficacia de las terapias modificadoras era menor en pacientes mayores en comparación con pacientes jóvenes, lo que probablemente refleje la disminución de las recaídas en los jóvenes y el aumento de la EM progresiva con la edad (Weideman AM, 2017). También debemos tener en cuenta que ningún paciente con

fenotipo EMPP presentaba tratamiento en ese momento, ya que el primer tratamiento efectivo para este perfil fue el ocrelizumab, aprobado por la FDA en 2017.

En cuanto al análisis pareado entre los valores de la EDSS basal y los valores de EDSS al año, sólo los fenotipos progresivos presentaron diferencias estadísticamente significativas al año aproximadamente de seguimiento, lo cual se correlaciona con el hecho de que una vez alcanzada la fase progresiva de la enfermedad, se produce un deterioro continuo debido a la desmielinización, la pérdida de oligodendrocitos, el daño axonal, la gliosis astrocítica, la lesión oxidativa crónica y la acumulación de hierro dependiente de la edad. El envejecimiento del sistema nervioso por la edad media de estos pacientes es un factor clave para esta cascada de procesos (Lassmann H, 2011; Mahad DH, 2015).

Estos resultados también concuerdan con un mayor número de pacientes con formas progresivas que presentan un empeoramiento en la EDSS durante el seguimiento. Algunos estudios como el Gasperi, han analizado la asociación entre el empeoramiento de la discapacidad en la EM con la síntesis de IgG intratecal en pacientes de nuevo diagnóstico de EMRR y SNA, encontrando un mayor riesgo de empeoramiento de la EDSS a los 4 años con una mayor producción de IgG en LCR (Gasperi C, 2019). En otro artículo publicado en 2021, refuerza el valor pronóstico de las BOC en LCR y su asociación con medianas más alta en la EDSS (Ben Noon G, 2021).

5.6. Estudio de la tasa de brotes anual y de la discapacidad asociada a eventos RAW o a PIRA en pacientes con EMRR

Nuestros resultados mostraron una tasa anual de recaídas ligeramente más alta en hombres que en mujeres (0,22 frente 0,19), aunque esta ligera diferencia no fue estadísticamente significativa, como evidencian varias publicaciones en las que se ha asociado el sexo femenino con una mayor frecuencia de recaídas o brotes y con ello a un retraso en la progresión a EMSP (Kalincik T, 2013; Iaffaldano P, 2021). En nuestro caso, la EDSS al final del seguimiento no se correlacionó con el número de recaídas, pero sí se observó que esta tasa era mayor en un alto porcentaje de pacientes que alcanzaron una EDSS mayor de 3 en algún momento del seguimiento. Algunos estudios no encontraron hallazgos del impacto de las recaídas en la progresión de la discapacidad a largo plazo (Cree BA, 2019), pero otros estudios sí han mostrado que altas tasas de recaídas, particularmente durante el tratamiento, es un indicador de mal pronóstico a largo plazo (Jokubaitis VG, 2016).

Nuestros datos mostraron que en pacientes con EMRR, PIRA es el que contribuye en mayor medida a la acumulación de discapacidad, como podemos observar en un mayor nivel de EDSS final con respecto a RAW, aunque este empeoramiento también se debe significativamente a las recaídas clínicas en los casos en los que se producen ambos eventos, obteniendo en conjunto un mayor número de pacientes que alcanzan una EDSS final mayor de 3. Estos resultados están en línea con estudios previos en los que se sugiere que RAW solo contribuye parcialmente en lugar de contribuir por completo a la acumulación de discapacidad irreversible en pacientes con este fenotipo (Chen B, 2022). También debemos tener en cuenta la edad de los pacientes en el momento del diagnóstico, ya que como podemos observar en nuestros resultados, los pacientes con eventos PIRA presentaban una edad de inicio mayor que los que presentaron eventos RAW. En estudios previos se ha demostrado que los pacientes con una edad de inicio mayor son más vulnerables a la acumulación de discapacidad después de varias recaídas, mientras que los que presentan una edad menor presentan una mejor recuperación tras los brotes con un déficit neurológico menor (D'Amico E, 2018; Guillemin F, 2017).

Los pacientes con PIRA presentaron niveles más altos de índice kappa con respecto a los RAW y los que presentaron ambos eventos (RAW/PIRA). Este resultado coincide con un reciente estudio publicado en 2023, en el que el índice Kappa fue significativamente mayor en pacientes con eventos PIRA, con una mediana de 148,5, frente a la obtenida en este trabajo que fue de 123,17 (Rosenstein I, 2023). Este valor más elevado de índice Kappa coincidió con una menor tasa de recaídas y con una mayor edad en el momento que se confirmó el diagnóstico (36 años PIRA frente a 24 años RAW). Al realizar la correlación de Spearman entre la tasa de recaída con las variables índice Kappa y edad de diagnóstico, se evidenció una relación inversa en ambas correlaciones (coeficientes de Spearman: tasa recaída vs. índice kappa de -0,111 y tasa de recaída vs. edad diagnóstico de -0,206), aunque no se encontraron diferencias estadísticamente significativas, posiblemente debido al bajo tamaño muestral y al efecto de los diferentes tratamientos previos en estos pacientes.

Esta relación inversa entre el índice Kappa y la tasa de recaídas es llamativa y resulta discordante ya que las recaídas corresponden a una inflamación activa en el SNC que están asociadas a la disfunción de los linfocitos T o B a nivel periférico y el índice Kappa es un indicador de la síntesis intratecal de inmunoglobulinas por parte de los linfocitos B. Muchos autores sugieren que el desarrollo de neurodegeneración crónica va más allá de los brotes y que existen otros mecanismos que pueden ser la base del acumulo de discapacidad. La disfunción de la inmunidad innata en el SNC, por los astrocitos y microglía/macrófagos, puede tener un papel esencial en el inicio del deterioro neurológico (Reich DS, 2018), pudiendo desembocar en eventos PIRA. Mientras que la contribución de los linfocitos B y T a nivel periférico va disminuyendo y limitándose al SNC, lo que conduce al inicio de la fase progresiva. En esta misma línea, el estudio realizado por Gasperi et al, observó una asociación entre la síntesis de IgG intratecal y un mayor riesgo y un tiempo más corto de empeoramiento de la discapacidad en pacientes con EMRR (Gasperi C, 2019).

Al analizar los tratamientos previos al inicio de la enfermedad, observamos que el interferón fue el fármaco más empleado (34,5%) y el que presentó una mayor tasa de recaídas al igual que el Natalizumab, pero este último fue empleado en menor proporción, en sólo un 8,6% de los pacientes. En ambos tratamientos, los pacientes presentaron una edad de inicio en el tratamiento menor al resto de pacientes con otros tratamientos. Al analizar más detenidamente los pacientes que presentaron tratamiento con natalizumab, nos

encontramos que dos de los tres pacientes registrados presentaban tratamiento en el momento de la punción lumbar, con un nivel medio de índice kappa de 109,68 y una edad de 39 años, frente a los que no presentaron tratamiento en dicho momento cuyo índice kappa fue de 9,64 y una edad media de 33 años.

Los interferones también se asociaron a los eventos RAW registrados y 2 de los 6 eventos RAW/PIRA. Estos resultados no concuerdan con algunos ensayos, en los cuales se ha observado que el tratamiento con natalizumab redujo significativamente la tasa anualizada de recaídas y la actividad de RMN durante 2 años en ensayos de fase III cuando se administró como monoterapia o en combinación con interferón β -1a (IFN β) (Bates D, 2012). En otro ensayo además, natalizumab mostró una reducción del riesgo de progresión sostenida (Polman CH, 2006). En un estudio retrospectivo, donde se comparó la eficacia del natalizumab frente al interferón beta1a durante 12 meses de tratamiento, se observó una tasa de recaída anual con natalizumab de 0,24 frente a 0,55 que presentó el interferón beta, mostrando una reducción de EDSS más significativa en los pacientes con natalizumab con respecto al interferón (Lanzillo R, 2012). Nuestros resultados difieren con lo expuesto, exhibiendo una tasa de recaída con interferón de 0,2 y de 0,3 para natalizumab, con niveles más altos de EDSS final.

En cuanto a la relación del tratamiento con el índice Kappa, los valores más altos de índice Kappa se encontraron en pacientes en tratamiento con cladribina (123,41), en los que 2 de los 7 pacientes con este tratamiento presentaron eventos PIRA, y en los pacientes con tratamiento con teriflunomida (índice Kappa de 91,04). Estos pacientes presentaron además edades al inicio del tratamiento ligeramente mayores con respecto al resto y también menores tasas de recaídas. El índice Kappa en estos pacientes fue medido de forma previa al inicio del tratamiento. Actualmente, la cladribina se recomienda para los casos de EMRR muy activa definida mediante características clínicas o de imagen (Mavenclad® ficha técnica), lo que nos sugiere que estas formas de EMRR más activas pueden ser compatibles con un aumento de la síntesis intratecal de inmunoglobulinas en estos pacientes y, por consiguiente, con un mayor índice kappa. A pesar de nuestro bajo número de pacientes, nuestros datos (tabla 30) concuerdan con diversos estudios y ensayos, los cuales han confirmado los efectos beneficiosos del tratamiento con cladribina a largo plazo sobre la tasa de recaída (Giovannoni G, 2021; Pfeuffer S, 2022).

5.7. Correlación del índice Kappa con el resto de las variables en pacientes con formas progresivas

Como ya hemos indicado en los resultados, sólo encontramos correlaciones estadísticamente significativas entre el índice Kappa con el índice IgG, niveles de subclase IgG1 y niveles de vitamina D en pacientes con EMSP. Todas estas correlaciones fueron directas y positivas. La correlación más fuerte se produjo entre el índice Kappa y el índice IgG, lo cual está en concordancia con el aumento de la producción local de IgG generado por plasmablastos y células plasmáticas en LCR (Puthenparampil M, 2018) y las altas tasas de positividad de BOCG encontradas en las formas progresivas, sobre todo en EMSP que fue del 100%. Esta producción de inmunoglobulina G, sería directamente proporcional a la subclase IgG1, la cual es la mayoritaria en EM junto con la IgG3 y se relaciona con la presencia de células B maduras y blastos plasmáticos como mencionamos anteriormente (Di Pauli F, 2010).

Con respecto a la correlación positiva y significativa del índice kappa con los niveles de vitamina D en las formas progresivas, el déficit de vitamina D se asocia con un mayor riesgo de EM y, en nuestros resultados las formas progresivas presentaban niveles medios más bajos con respecto al resto de los grupos (Tabla 17), a su vez el índice Kappa presentaba niveles medios más bajos a moderados en los fenotipos progresivos con respecto al resto de fenotipos. En esta misma línea, la posibilidad de utilizar la vitamina D3 activa como parte del tratamiento en estos pacientes podría tener una repercusión positiva en su evolución, ya que numerosos estudios han descrito hallazgos significativos en la terapia con vitamina D y un mejor control de la EM, debido al efecto neuroprotector e inmunomodulador de la misma (Deluca GC, 2013; de Oliveira LRC, 2020).

En cuanto a la falta de correlación del índice Kappa con la EDSS basal, algunos estudios como el de Nazarov concuerdan con nuestros hallazgos al no encontrar una correlación estadísticamente significativa entre la síntesis CLL kappa y la EDSS, pero si se correlacionó negativamente con el grado de atrofia cerebral y, esta a su vez también presentó una correlación significativa con la EDSS (Nazarov V, 2018). Otro estudio si observó una correlación estadísticamente significativa entre la EDSS y los niveles de CLL kappa en pacientes con SNA en el momento de la punción lumbar y una correlación menor en pacientes con EM ya diagnosticada (Makshakov GS, 2017). Aun así no encontramos estudios en la literatura que

estudien esta correlación en cohortes con EMPP y EMSP para poder comparar nuestros resultados.

5.8. Estudio de probabilidad de conversión a EMSP

En nuestra cohorte obtuvimos una mediana de conversión a EMSP de 16 años de evolución con un aumento exponencial importante a partir de los 15 años de evolución, tiempo que corresponde con los datos obtenidos de la bibliografía existente, la cual describe que esta transición de fase remitente-recurrente a secundaria progresiva ocurre según el curso natural de la enfermedad aproximadamente a los 15 años, entre los 11 a los 19 años después del inicio del tratamiento (Amato MP, 2000; Confavreux C, 2000; Confavreux C, 2003; Cree BA, 2016).

Al estudiar las distintas variables y su efecto en las curvas de supervivencia, sólo encontramos diferencias estadísticamente significativas en la edad en el momento de la punción lumbar diagnóstica, ya que los pacientes con rangos de edad por encima de 45 años presentaron tiempos de conversión menores con respecto a los que presentaban rangos de edad entre 30 a 45 años, 9 años frente a 18 años. En el modelo de riesgos proporcionales de Cox la edad presentó un HR de 5,84, lo que significa que la probabilidad de conversión fue 5,84 veces superior en los pacientes con edades superiores a 45 años. La EDSS basal mostró un HR de 2,20. En algunos estudios previos, la EDSS inicial estuvo presente en el modelo final de Cox como una variable importante para explicar el aumento del riesgo de conversión, junto con otras variables como son la edad de inicio, el sexo y el número de recaídas previas (Fambiatos A, 2020; Iaffaldano P, 2021). En ambas publicaciones, la puntuación en la EDSS presentó un HR de 1,30 y 1,50 respectivamente, mientras que en nuestros resultados el HR fue superior, con un valor de 2,20.

En cuanto a la edad, varios estudios la consideran uno de los mejores indicadores de conversión a EMSP y, junto con la duración de la enfermedad, se ha ido confirmando que la aparición de EMSP es una función del tiempo (Skoog B, 2014; Scalfari A, 2016). Estos resultados muestran que el envejecimiento presenta un papel crucial para explicar los mecanismos fisiopatológicos subyacentes que conducen al inicio de la progresión en la EM (Kantarci OH, 2019).

La curva de supervivencia en función del sexo masculino no presentó diferencias estadísticamente significativas en el test de contraste, por lo que no se incluyó en la regresión de Cox. Existen otros estudios que si encuentran diferencias y las incluyen como factores de riesgo de progresión. Aun así, observamos una mediana de progresión en el sexo masculino menor que en el sexo femenino, 11 años frente 15 años, respectivamente. Como mencionamos al principio, se ha relacionado el sexo femenino con una mayor frecuencia de recaídas y que esto podría conllevar un retraso en la progresión a EMSP, aunque distintos estudios han relacionado un mayor número de recaídas previas durante la fase remitente-recurrente como un factor de riesgo de progresión (Hughes J, 2018; Iaffaldano P, 2021), otros estudios sin embargo, no han encontrado tal asociación entre las recaídas y el riesgo a EMSP (Scalfari A, 2010; Manouchehrinia A, 2019). Debido a que los pacientes con EMSP de nuestro estudio presentaban una larga evolución de años, sólo obtuvimos información de la tasa de recaídas recogida en la historia clínica en los pacientes con EMRR. En los casos de EMRR no encontramos relación entre la tasa de recaídas anual y el empeoramiento en la EDSS, ni tampoco se halló diferencias estadísticamente significativas entre el número de recaídas y el sexo. Lo que sí que evidenciamos y anteriormente hemos comentado, es el efecto de la edad en el aumento de la discapacidad independientemente de las recaídas, ya que en los pacientes con EMRR y con eventos PIRA la edad de diagnóstico fue mayor con respecto a los pacientes con eventos RAW en los que la tasa de recaída fue mayor.

Con respecto al marcadores bioquímicos analizados, tanto el índice kappa como el índice de IgM presentaron significancia estadística en el modelo de Cox. En el caso del índice de IgM, su HR fue inferior a 1, indicando que un aumento en el índice de IgM disminuiría la probabilidad de progresión a EMSP. Debemos tener en cuenta que los distintos índices fueron obtenidos en el momento en el que se encontraban en dicho fenotipo y no al comienzo de la enfermedad como punto de partida. En la bibliografía, no encontramos a día de hoy ningún estudio que incluyera estos parámetros para poder comparar nuestros resultados y sacar conclusiones.

Las comorbilidades estudiadas en las curvas de supervivencia no mostraron diferencias estadísticamente significativas. En un estudio realizado por Misicka, la cual incluyó las comorbilidades estudiadas en nuestro trabajo más otras como el cáncer o los trastornos neurológicos, encontraron que el cáncer fue el factor pronóstico más fuerte y la falta de

asociación del resto de patologías coincidieron con nuestros resultados, aun así se evaluaron la presencia de las mismas al inicio de la EM y no a lo largo de la vida como si hicimos en nuestra cohorte (Misicka E, 2020).

Recientemente, Lorscheider y colaboradores propusieron una definición objetiva de EMSP basada en la aplicación de un algoritmo a las evaluaciones de puntuación EDSS registradas longitudinalmente en una plataforma de bases de datos (Lorscheider J, 2016), aunque la mayoría de los estudios encontrados se basaron en cohortes clínicas en las que la definición de EMSP se basó en el juicio subjetivo de los neurólogos, como es en nuestro caso. Aun así nuestro estudio permite estimar asociaciones entre determinados predictores y el riesgo de progresión que está en concordancia con la literatura hallada.

5.9. Algoritmo de clasificación de las formas progresivas de las remitentes

El algoritmo desarrollado en esta tesis pretende, que una vez realizado el diagnóstico según las recomendaciones y protocolos clínicos, ser una herramienta de apoyo para las formas progresivas, permitiendo detectarlas y, sobre todo prever que pacientes son progresivos desde el inicio (EMPP) y cuales alcanzarán la progresión en menos tiempo desde EMRR con el fin de proponer tratamientos más eficaces desde el principio en función de la evolución pronóstica del paciente a través del algoritmo. Por lo tanto, este modelo de predicción que planteamos representa una herramienta de utilidad para el clínico en la práctica diaria.

Tras estudiar las distintas variables y su relación con las formas progresivas, tanto en EMPP como EMSP, el modelo final de regresión incluyó como factores de predicción el puntaje en la EDSS basal, el índice Kappa según el punto de corte calculado para fenotipos progresivos de 35,37, la edad en el momento de la punción lumbar y, en menor medida, la subclase IgG4. Como hemos ido observando en nuestros resultados, la mayoría de los estudios encontrados coinciden en que, tanto la edad como la EDSS, son factores pronósticos para el desarrollo de un fenotipo progresivo. La edad tiene un papel crucial para explicar los mecanismos subyacentes de estos fenotipos. El envejecimiento presenta un impacto en la respuesta del sistema inmunológico a nivel del SNC, lo que conlleva a una recuperación limitada y a una neurodegeneración independiente del número de recaídas clínicas, como hemos mencionado previamente (Hickman S, 2018; Kantarci OH, 2019; Chen B, 2022). Este aumento de la edad de

inicio se ve reflejado en un aumento de las puntuaciones EDSS. Ambas variables son relevantes, formando parte del modelo diagnóstico propuesto.

En cuanto a la subclase IgG4 en el modelo y su efecto como factor protector (OR 0,96) para el desarrollo de un curso progresivo como podemos observar en la tabla 34, es necesario más estudios que evidencien tal efecto y su relación con el sistema del complemento en estos fenotipos.

El índice kappa también presentó un efecto protector para el desarrollo de fenotipos progresivos en niveles por encima del punto de corte estimado de 35,37. A lo largo de este trabajo, hemos observado el potencial de este biomarcador en el diagnóstico de los distintos fenotipos de EM, siendo un reflejo del estado de la síntesis intratecal de anticuerpos en el SNC de estos pacientes. Es necesario más estudios que evalúen este parámetro y su utilidad en los fenotipos progresivos.

El modelo presentó una buena eficacia diagnóstica, con una sensibilidad de 0,95, una especificidad de 0,96 y un AUC de la curva ROC de 0,979. Aunque el número de casos con EMPP no es muy elevado debido al bajo porcentaje de pacientes que desarrollan este fenotipo (en torno al 10-15% de los pacientes con EM) sumado a la baja incidencia de la enfermedad en sí, hay que tener en consideración que obtener muestras de pacientes en diversos estadios de la enfermedad no es usual, pero es lo que da valor a este estudio. Los resultados obtenidos, utilizando el algoritmo desarrollado, deben ser validados con cohortes de mayor tamaño y /o nuevas que reproduzcan la capacidad predictiva observada y aumente la potencia estadística de este tipo de modelos con la posible incorporación de más biomarcadores con el fin de trasladarlo a la práctica clínica diaria.

CONSIDERACIONES FINALES

Como hemos ido estudiando a través de esta tesis, las diferentes respuestas autoinmunes pueden resultar con el tiempo en un mecanismo general de neurodegeneración y una falta de mecanismos contra reguladores dependientes de la edad. Los procesos patológicos subyacentes a la EM progresiva son más complejos e incluyen una variedad de vías diferentes. Varias de estas vías están presentes, tanto en la EM recidivante como en la progresiva, y las diferencias entre ambos fenotipos son más relativas que absolutas.

Las células B contribuyen de manera importante a los procesos inflamatorios crónicos en la patogénesis de la EM. Las bandas oligoclonales de inmunoglobulina G se encuentran en el LCR de más del 90% de los pacientes con EM, lo que apunta a una producción de anticuerpos intratecal. Esta síntesis local de anticuerpos muestra heterogeneidad a lo largo del curso de la EM, como hemos ido corroborando a lo largo de nuestro estudio. Nuestros resultados sugieren un aumento inicial del repertorio de anticuerpos con CLL tipo kappa a expensas de inmunoglobulina G y que a medida que avanza la progresión se produce una mezcla de CLL kappa y lambda con síntesis de IgG e IgM. Lo cual vemos reflejado en los distintos índices, principalmente en el índice Kappa, y las distintas subclases de IgG que hemos ido estudiando.

Esta tesis nos ha dejado varias líneas por investigar y que sería de interés incluirlas en futuros estudios, como son los niveles bajos de la subclase IgG4 y su relación en la regulación del complemento en pacientes con EMPP, y también esta misma asociación con la presencia de síntesis intratecal de IgM, Esto apunta a la evidencia de un mecanismo inflamatorio compartimentado en la EM progresiva, tal como sugiere distintos estudios y que sería importante indagar (Serafini B, 2004; Choi SR, 2012).

Otra línea de investigación que nos ha ido conduciendo esta tesis es el efecto de los eventos PIRA y RAW en la progresión de los pacientes con EMRR y su relación con el índice Kappa. Esta nueva perspectiva de la progresión nos abre la puerta a un cambio y una mayor comprensión de estos fenotipos.

CONCLUSIONES

Las siguientes conclusiones se han desarrollado en base a los resultados del estudio:

- 1) Los pacientes con fenotipos progresivos presentan una mayor edad media con respecto a los pacientes con fenotipos remitentes-recurrentes, el porcentaje de mujeres en las formas progresivas es mayor a lo encontrado en la literatura, con valores de índice IgG, CLL kappa e índice kappa más moderados con respecto al grupo EMRR, y valores altos en la escala de discapacidad (EDSS).
- 2) Los pacientes con formas progresivas (EMPP y EMSP) presentaron concentraciones más bajas de 25-hidroxivitamina D con respecto al resto de grupos, dato que podría asociarse con una peor evolución de la enfermedad. La vitamina D se ha relacionado inversamente con el riesgo e inicio de la enfermedad, el grado de modulación de la actividad y la prevalencia de EM. El resto de las comorbilidades estudiadas no se relacionaron con el riesgo de EM ni de EM de tipo progresivo.
- 3) El índice kappa y el índice de Tibbling-Link (índice IgG) presentan una correlación positiva, en la que se evidencia una mayor eficacia diagnóstica del índice kappa y las BOCG en la predicción de los distintos perfiles evolutivos. El índice kappa y las BOCG presentan una sensibilidad y especificidad ligeramente similares entre ellas.
- 4) El índice IgM presentó diferencias estadísticamente significativas entre el grupo control y las formas progresivas. Esto concuerda con diferentes estudios, que asocian la síntesis de IgM intratecal a un peor pronóstico a largo plazo y a una mayor discapacidad.
- 5) En cuanto a las subclases de IgG, nuestro estudio mostró una mayor concentración de IgG3 en las formas progresivas con respecto al resto de los grupos. El índice Kappa sólo se correlacionó positivamente con la IgG1 en pacientes con EMSP. Esta subclase de inmunoglobulina G se relaciona positivamente en algunos estudios con el aumento en la frecuencia de plasmablastos en sangre periférica y a una mayor respuesta inmunitaria proinflamatoria sistémica.
- 6) La edad de inicio es un factor clave para el acumulo de discapacidad independientemente de la tasa de recaídas. Se han observado una mayor tasa de recaídas en pacientes con edades inferiores y valores menores en la EDSS en pacientes

con EMRR. Existe un mecanismo subyacente de progresión de la enfermedad que está ligado al envejecimiento de los pacientes.

- 7) Se observó una menor concentración de IgG4 en los pacientes con EMPP y EMSP que fue estadísticamente significativa con respecto al resto, esta subclase no activa al complemento y es dependiente de células T colaboradoras.
- 8) Los eventos PIRA se han relacionado con mayores niveles de índice Kappa y con una mayor edad en el momento del diagnóstico. Mientras que los casos con eventos RAW presentaban una menor edad y niveles más bajos de índice Kappa que coincidían con una mayor tasa de recaída anual.
- 9) La EDSS basal, la edad diagnóstica, el índice kappa y el índice de IgM presentaron diferencias estadísticamente significativas en el modelo de Cox. La edad avanzada, fue la variable con mayor HR (5,84).
- 10) El modelo de regresión logística para la caracterización de los fenotipos progresivos incluyó la edad, la EDSS al inicio, el índice Kappa según punto de corte de 35,37 y la subclase IgG4 como variables predictoras, siendo la EDSS la que presentaba un mayor OR.
- 11) El índice kappa presenta una potencial utilidad como marcador para las formas progresivas de EM, que debe ser tomado en consideración y ser evaluado en futuros estudios.

REFERENCIAS

A

Aguilar-Juárez PA, Castillo-Lara RA, Ceballos-Godina M, Colorado-Ochoa HJ, Espinosa-Zacarías JP, Flores-Ramírez FG, García S, García-Huerta LG, González-Cruz M, de la Inmaculada Granados-Aguilar M, León-Jiménez C, Llamas-López L, Martínez-Gurrola MA, Núñez-Orozco L, Quiñones-Aguilar S, Sauri-Suárez S, Solórzano-Gómez E, Vega-Gaxiola SB. Consensus for the diagnosis and treatment of multiple sclerosis in ISSSTE patients. *Med Interna Mex.* 2019;35:732–71.

Aladro Y, Alemany MJ, Pérez-Vieitez MC, Amela R, Conde M, Reyes MP, Álamo F, Angel-Moreno A. Prevalence and incidence of multiple sclerosis in Las Palmas, Canary Islands, Spain. *Neuroepidemiology.* 2005;24:70–5.

Alcina A, Fedetz M, Vidal-Cobo I, Andres-Leon E, Garcia-Sanchez MI, Barroso-Del-Jesus A, Eichau S, Gil-Varea E, Villar LM, Saiz A, Leyva L, Vandenbroeck K, Otaegui D, Izquierdo G, Comabella M, Urcelay E, Matesanz F. Identification of the genetic mechanism that associates L3MBTL3 to multiple sclerosis. *Hum Mol Genet.* 2022;31:2155–63.

Alfredsson L, Olsson T. Lifestyle and Environmental Factors in Multiple Sclerosis. *Cold Spring Harb Perspect Med.* 2019;9.

Alonso-Magdalena L, Zia E, Carmona i Codina O, Pessah-Rasmussen H, Sundström P. Incidence and Prevalence of Multiple Sclerosis in Malmö, Southern Sweden. *Mult Scler Int.* 2022;2022:1–7.

Álvarez-Cermeño JC, Muñoz-Negrete FJ, Costa-Frossard L, De La Maza SS, Villar LM, Rebolleda G. Intrathecal lipid-specific oligoclonal IgM synthesis associates with retinal axonal loss in multiple sclerosis. *J Neurol Sci.* 2016;360:41–4.

Amato MP, Ponziani G. A prospective study on the prognosis of multiple sclerosis. *Neurol Sci.* 2000;21.

Andersson M, Alvarez-Cermeño J, Bernardi G, Cogato I, Fredman P, Frederiksen J, Fredrikson S, Gallo P, Grimaldi LM, Grønning M, Keir G, Lamers K, Link H, Magalhães A, Massaro AR, Öhman S, Reiber H, Rönnbäck L, Schlupe M, Schuller E, Sindic CJM, Thompson EJ, Trojano M,

Wurster U. Cerebrospinal fluid in the diagnosis of multiple sclerosis: a consensus report. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. 1994;57:897–902.

Aristimuño C, Teijeiro R, Valor L, Alonso B, Tejera-Alhambra M, De Andrés C, Miñarro DO, López-Lazareno N, Faure F, Sánchez-Ramón S. Sex-hormone receptors pattern on regulatory T-cells: clinical implications for multiple sclerosis. *Clin Exp Med*. 2012;12:247–55.

Arruti González M, Castillo Triviño T, Egüés Olazabal N, Olascoaga Urtaza J. Tabaco y esclerosis múltiple. *Rev Neurol*. 2015;60:169.

Atlas of MS 2020 - Epidemiology report - MS International Federation. n.d.

Avasarala JR, Cross AH, Trotter JL. Oligoclonal band number as a marker for prognosis in multiple sclerosis. *Arch Neurol*. 2001;58:2044–5.

Avila M, Bansal A, Culberson J, Peiris AN. The Role of Sex Hormones in Multiple Sclerosis. *Eur Neurol*. 2018;80:93–9.

Ayoglu B, Häggmark A, Khademi M, Olsson T, Uhlén M, Schwenk JM, Nilsson P. Autoantibody profiling in multiple sclerosis using arrays of human protein fragments. *Mol Cell Proteomics*. 2013;12:2657–72.

B

Ayuso GI. Esclerosis múltiple: impacto socioeconómico y en la calidad de vida de los pacientes. *Med Clin (Barc)*. 2014;143:7–12.

Baecher-Allan C, Kaskow BJ, Weiner HL. Multiple Sclerosis: Mechanisms and Immunotherapy. *Neuron*. 2018;97:742–68.

Barkhof F, Filippi M, Miller DH, Scheltens P, Campi A, Polman CH, Comi G, Adèr HJ, Losseff N, Valk J. Comparison of MRI criteria at first presentation to predict conversion to clinically definite multiple sclerosis. *Brain*. 1997;120:2059–69.

Bashford-Rogers RJM, Smith KGC, Thomas DC. Antibody repertoire analysis in polygenic autoimmune diseases. *Immunology*. 2018;155:3–17.

Basile U, Gulli F, Gragnani L, Napodano C, Pocino K, Rapaccini GL, Mussap M, Zignego AL. Free light chains: Eclectic multipurpose biomarker. *J Immunol Methods*. 2017;451:11–9.

Basnyat P, Sumelahti ML, Lehtimäki T, Elovaara I, Hagman S. Gene expression profiles of TNF-like cytokine 1A (TL1A) and its receptors death receptor 3 (DR3) and decoy receptor 3 (DcR3) in multiple sclerosis. *J Neuroimmunol*. 2019;335:577020.

Bates D, Bartholomé E. Treatment effect of natalizumab on relapse outcomes in multiple sclerosis patients despite ongoing MRI activity. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. 2012;83:55–60.

Beltrán E, Hernández A, Lafuente EM, Coret F, Simó-Castelló M, Boscá I, Pérez-Miralles FC, Burgal M, Casanova B. Neuronal antigens recognized by cerebrospinal fluid IgM in multiple sclerosis. *J Neuroimmunol*. 2012;247:63–9.

Bilbao MM, Guevara CO, Fernández Fernández Ó, Gairin XM, Rodríguez De Antigüedad A. Alfredo Rodríguez de Antigüedad Presidente de la SEN EDITORES Ester Moral Torres Coordinadora del Grupo de Enfermedades Desmielinizantes de la SEN Vicepresidente 2.º y Responsable del Área de Relaciones Institucionales 2014.

Bjornevik K, Cortese M, Healy BC, Kuhle J, Mina MJ, Leng Y, Elledge SJ, Niebuhr DW, Scher AI, Munger KL, Ascherio A. Longitudinal analysis reveals high prevalence of Epstein-Barr virus associated with multiple sclerosis. *Science*. 2022;375:296–301.

Bove R, Rankin K, Lin C, Zhao C, Correale J, Hellwig K, Michel L, Laplaud DA, Chitnis T. Effect of assisted reproductive technology on multiple sclerosis relapses: Case series and meta-analysis. *Mult Scler*. 2020;26:1410–9.

Brettschneider J, Tumani H, Kiechle U, Mücke R, Richards G, Lehmsiek V, Ludolph AC, Otto M. IgG antibodies against measles, rubella, and varicella zoster virus predict conversion to multiple sclerosis in clinically isolated syndrome. *PLoS One*. 2009;4:e7638.

Brito-Zerón P, Ramos-Casals M, Bosch X, Stone JH. The clinical spectrum of IgG4-related disease. *Autoimmun Rev*. 2014;13:1203–10.

Brownlee WJ, Hardy TA, Fazekas F, Miller DH. Diagnosis of multiple sclerosis: progress and challenges. *Lancet*. 2017;389:1336–46.

Buc M. New biological agents in the treatment of multiple sclerosis. *Bratisl Lek Listy*. 2018;119:191–7.

Buck D, Albrecht E, Aslam M, Goris A, Hauenstein N, Jochim A, Cepok S, Grummel V, Dubois B, Berthele A, Lichtner P, Gieger C, Winkelmann J, Hemmer B. Genetic variants in the immunoglobulin heavy chain locus are associated with the IgG index in multiple sclerosis. *Ann Neurol*. 2013;73:86–94.

Burgoon MP, Gilden DH, Owens GP. B cells in multiple sclerosis. *Front Biosci*. 2004;9:786–96.

C

Calabrese M, Marastoni D, Crescenzo F, Scalfari A. Early multiple sclerosis: diagnostic challenges in clinically and radiologically isolated syndrome patients. *Curr Opin Neurol*. 2021;34:277–85.

Camargo Rojas AP, Gómez López AM, Hernández LF, Palacios Sánchez E. Síntomas presentes en la Esclerosis Múltiple: serie de casos. *Acta Neurológica Colomb*. 2018;34:108–14.

Candelieri-Merlicco A, Valero-Delgado F, Martínez-Vidal S, Lastres-Arias MDC, Aparicio-Castro E, Toledo-Romero F, Villaverde-González R. Prevalence of multiple sclerosis in Health District III, Murcia, Spain. *Mult Scler Relat Disord*. 2016;9:31–5.

Caponi L, Romiti N, Koni E, Fiore A Di, Paolicchi A, Franzini M. Inter-assay variability in automated serum free light chain assays and their use in the clinical laboratory. *Crit Rev Clin Lab Sci*. 2020;57:73–85.

Carswell R. *Pathological anatomy: illustrations of the elementary forms of disease*. London: Orme, Brown, Green & Longman. 1838.

Cencioni MT, Mattoscio M, Magliozzi R, Bar-Or A, Muraro PA. B cells in multiple sclerosis - from targeted depletion to immune reconstitution therapies. *Nat Rev Neurol*. 2021;17:399–414.

Charcot J. Histologie de la sclerose en plaque. *Gaz Hop*. 1868;41:554–66.

Chen B, Ji SQ, Shen F, Tian DS, Bu BT. Contribution of relapse-associated worsening to overall disability accrual in patients with relapsing-onset multiple sclerosis: A mediation analysis. *Mult Scler Relat Disord*. 2022;59.

Chiaravalloti ND, DeLuca J. Cognitive impairment in multiple sclerosis. *Lancet Neurol*. 2008;7:1139–51.

Choi SR, Howell OW, Carassiti D, Magliozzi R, Gveric D, Muraro PA, Nicholas R, Roncaroli F, Reynolds R. Meningeal inflammation plays a role in the pathology of primary progressive multiple sclerosis. *Brain*. 2012;135:2925–37.

Codarri L, Gyölvész G, Tosevski V, Hesske L, Fontana A, Magnenat L, Suter T, Becher B. ROR γ t drives production of the cytokine GM-CSF in helper T cells, which is essential for the effector phase of autoimmune neuroinflammation. *Nat Immunol*. 2011;12:560–7.

Compston A, Coles A. Multiple sclerosis. *Lancet (London, England)*. 2008;372:1502–17.

Confavreux C, Hutchinson M, Hours MM, Cortinovis-Tourniaire P, Moreau T. Rate of pregnancy-related relapse in multiple sclerosis. Pregnancy in Multiple Sclerosis Group. *N Engl J Med*. 1998;339:285–91.

Confavreux C, Vukusic S, Adeleine P. Early clinical predictors and progression of irreversible disability in multiple sclerosis: an amnesic process. *Brain*. 2003;126:770–82.

Confavreux C, Vukusic S, Moreau T, Adeleine P. Relapses and progression of disability in multiple sclerosis. *N Engl J Med*. 2000;343:1430–8.

Covo P. Introducción a la historia de la esclerosis múltiple. *Acta Neurológica Colomb*. 2015;31:119–24.

Cree BAC, Arnold DL, Fox RJ, Gold R, Vermersch P, Benedict RHB, Bar-Or A, Piani-Meier D, Rouyre N, Ritter S, Kilaru A, Karlsson G, Giovannoni G, Kappos L. Long-term efficacy and safety of siponimod in patients with secondary progressive multiple sclerosis: Analysis of EXPAND core and extension data up to >5 years. *Mult Scler*. 2022;28:1591–605.

Cree BAC, Gourraud PA, Oksenberg JR, Bevan C, Crabtree-Hartman E, Gelfand JM, Goodin DS, Graves J, Green AJ, Mowry E, Okuda DT, Pelletier D, von Büdingen HC, Zamvil SS, Agrawal A, Caillier S, Ciocca C, Gomez R, Kanner R, Lincoln R, Lizee A, Qualley P, Santaniello A, Suleiman L, Bucci M, Panara V, Papinutto N, Stern WA, Zhu AH, Cutter GR, Baranzini S, Henry RG, Hauser SL. Long-term evolution of multiple sclerosis disability in the treatment era. *Ann Neurol*. 2016;80:499–510.

Cree BAC, Hollenbach JA, Bove R, Kirkish G, Sacco S, Caverzasi E, Bischof A, Gundel T, Zhu AH, Papinutto N, Stern WA, Bevan C, Romeo A, Goodin DS, Gelfand JM, Graves J, Green AJ,

Wilson MR, Zamvil SS, Zhao C, Gomez R, Ragan NR, Rush GQ, Barba P, Santaniello A, Baranzini SE, Oksenberg JR, Henry RG, Hauser SL. Silent progression in disease activity-free relapsing multiple sclerosis. *Ann Neurol*. 2019;85:653–66.

Cree BAC, Khan O, Bourdette D, Goodin DS, Cohen JA, Marrie RA, Glidden D, Weinstock-Guttman B, Reich D, Patterson N, Haines JL, Pericak-Vance M, DeLa C, Oksenberg JR, Hauser SL. Clinical characteristics of African Americans vs Caucasian Americans with multiple sclerosis. *Neurology*. 2004;63:2039–45.

Cristiano E, Patrucco L, Ysraelit MC, Alonso R, Balbuena ME, Ballario C, Barboza AG, Bestoso S, Burgos M, Caceres FJ, Carra A, Carnero-Contentti E, Deri N, Fernandez-Liguori N, Garcea O, Hryb JP, Jacobo M, Kohler E, Luetic GG, Mainella C, Menichini ML, Miguez J, Nofal PG, Piedrabuena R, Rugilo C, Saladino ML, Silva BA, Silva E, Sinay V, Tavolini D, Tkachuk VA, Villa A, Vrech C, Rojas JI. Argentinean consensus guidelines on the identification and clinical care of secondary progressive multiple sclerosis. *Rev Neurol*. 2021;72:23–32.

Cristóbal JH, Monteiro GC, Margarit BP, Herán IS, Celi YMC, Bravo GÁ. Diagnostic protocol for patients with suspected demyelinating disease. *Med*. 2019;12:4634–8.

Cruveilhier J. Anatomie pathologique du corps humain; descriptions avec figures lithographiées et coloriées; des diverses alterations morbides dont le corps humain est susceptible. Paris JB Baillière. 1841.

Cuevas-García C. Esclerosis múltiple: aspectos inmunológicos actuales. *Rev Alerg México*. 2017;64:76.

D

D’Amico E, Patti F, Zanghì A, Chisari CG, Lo Fermo S, Zappia M. Late-onset and young-onset relapsing-remitting multiple sclerosis: evidence from a retrospective long-term follow-up study. *Eur J Neurol*. 2018;25:1425–31.

Davies AM, Sutton BJ. Human IgG4: a structural perspective. *Immunol Rev*. 2015;268:139–59.

Delgado FR, Margarit BP, Monteiro GC, Izquierdo AY. Diagnostic and therapeutic protocol for multiple sclerosis flare-ups. *Med*. 2019;12:4630–3.

Delgado SR, Faissner S, Linker RA, Rammohan K. Key characteristics of anti-CD20 monoclonal antibodies and clinical implications for multiple sclerosis treatment. *J Neurol*. 2023.

Deluca GC, Kimball SM, Kolasinski J, Ramagopalan S V., Ebers GC. Review: the role of vitamin D in nervous system health and disease. *Neuropathol Appl Neurobiol*. 2013;39:458–84.

Díez JJ. El sistema endocrino de la vitamina D: fisiología e implicaciones clínicas. *Rev Española Cardiol*. 2022;22:1–7.

Dobson R, Giovannoni G. Multiple sclerosis - a review. *Eur J Neurol*. 2019;26:27–40.

Dobson R, Ramagopalan S, Davis A, Giovannoni G. Cerebrospinal fluid oligoclonal bands in multiple sclerosis and clinically isolated syndromes: a meta-analysis of prevalence, prognosis and effect of latitude. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. 2013;84:909–14.

Dunn SE, Gunde E, Lee H. Sex-Based Differences in Multiple Sclerosis (MS): Part II: Rising Incidence of Multiple Sclerosis in Women and the Vulnerability of Men to Progression of this Disease. *Curr Top Behav Neurosci*. 2015;26:57–86.

E

Eckstein C, Saidha S, Levy M. A differential diagnosis of central nervous system demyelination: beyond multiple sclerosis. *J Neurol*. 2012;259:801–16.

Erazo DG, Fernanda L, Jaramillo J, Andrea P, Gil L, Rúa- DFL, Díaz SM, Mónica M, Beltrán P, Victoria C, Rubiano T, Jackeline J, Girón NR. Y LA CALIDAD DE VIDA Reporte de Caso 2016;28:9–21.

F

Fambiatos A, Jokubaitis V, Horakova D, Kubala Havrdova E, Trojano M, Prat A, Girard M, Duquette P, Kalincik T, et al. Risk of secondary progressive multiple sclerosis: A longitudinal study. *Mult Scler*. 2020;26:79–90.

Fernández Fernández Ó, Tintoré M, Saiz A, Calles-Hernández MC, Comabella M, Ramió-Torrentà L, Oterino A, Izquierdo G, Téllez N, Merino JAG, Brieva L, Arnal-García C, Aladro Y, del mar Mendibe-Bilbao MM, Meca-Lallana JE, Romero-Pinel L, Martínez-Ginés ML, Arroyo R, Oreja-Guevara C, Costa-Frossard L, Carrascal P, Rodríguez-Antigüedad A. Review of the novelties presented at the 2018 ectrims congress: 11th post-ectrims meeting (I). *Rev Neurol*.

2019;68:431–41.

Fernández O, Fernández VE, Guerrero M. Esclerosis múltiple. *Med.* 2015;11:4610–21.

Ferraro D, Trovati A, Bedin R, Natali P, Franciotta D, Santangelo M, Camera V, Vitetta F, Varani M, Trenti T, Gastaldi M, De Biasi S, Nasi M, Pinti M, Meletti S, Sola P. Cerebrospinal fluid free light kappa and lambda chains in oligoclonal band-negative patients with suspected Multiple Sclerosis. *Eur J Neurol.* 2019:1–7.

Fischer JS, Rudick RA, Cutter GR, Reingold SC. The Multiple Sclerosis Functional Composite Measure (MSFC): an integrated approach to MS clinical outcome assessment. National MS Society Clinical Outcomes Assessment Task Force. *Mult Scler.* 1999;5:244–50.

Florou D, Katsara M, Feehan J, Dardiotis E, Apostolopoulos V. Anti-CD20 Agents for Multiple Sclerosis: Spotlight on Ocrelizumab and Ofatumumab. *Brain Sci.* 2020;10:1–13.

Foley PL, Vesterinen HM, Laird BJ, Sena ES, Colvin LA, Chandran S, MacLeod MR, Fallon MT. Prevalence and natural history of pain in adults with multiple sclerosis: Systematic review and meta-analysis. *Pain.* 2013;154:632–42.

Forman, MD SJ, Slovak ML, Arber, MD DA, Stein, MD AS, Forman SJ, Slovak ML, Carter, MS NH, Slovak ML, Slovak ML, Slovak ML, Ikle, PhD D, Slovak ML. Cerebrospinal fluid oligoclonal bands in the diagnosis of multiple sclerosis. Isoelectric focusing with IgG immunoblotting compared with high-resolution agarose gel electrophoresis and cerebrospinal fluid IgG index. *Am J Clin Pathol.* 2003;120:672–80.

Franciotta D, Salvetti M, Lolli F, Serafini B, Aloisi F. B cells and multiple sclerosis. *Lancet Neurol.* 2008;7:852–8.

Fransen NL, de Jong BA, Heß K, Kuhlmann T, Vincenten MCJ, Hamann J, Huitinga I, Smolders J. Absence of B Cells in Brainstem and White Matter Lesions Associates With Less Severe Disease and Absence of Oligoclonal Bands in MS. *Neurol - Neuroimmunol Neuroinflammation.* 2021;8.

Frau J, Coghe G, Loreface L, Fenu G, Cocco E. The Role of Microorganisms in the Etiopathogenesis of Demyelinating Diseases. *Life.* 2023;13.

Frischer JM, Weigand SD, Guo Y, Kale N, Parisi JE, Pirko I, Mandrekar J, Bramow S, Metz I,

Brück W, Lassmann H, Lucchinetti CF. Clinical and pathological insights into the dynamic nature of the white matter multiple sclerosis plaque. *Ann Neurol*. 2015;78:710–21.

G

García Merino A, Ramón Ara Callizo J, Fernández Fernández O, Landete Pascual L, Moral Torres E, Rodríguez-Antigüedad Zarrantz A. Consenso para el tratamiento de la esclerosis múltiple 2016. Sociedad Española de Neurología. *Neurologia*. 2017;32:113–9.

Gasperi C, Salmen A, Antony G, Bayas A, Heesen C, Kümpfel T, Linker RA, Paul F, Stangel M, Tackenberg B, Bergh FT, Warnke C, Weber F, Wiendl H, Wildemann B, Zettl UK, Ziemann U, Zipp F, Tumani H, Gold R, Hemmer B. Association of Intrathecal Immunoglobulin G Synthesis With Disability Worsening in Multiple Sclerosis. *JAMA Neurol*. 2019;76:841–9.

Gil-Varea E, Fedetz M, Eixarch H, Spataro N, Villar LM, Urcelay E, Saiz A, Fernández Ó, Leyva L, Ramió-Torrentà L, Vandebroek K, Otaegui D, Castillo-Triviño T, Izquierdo G, Malhotra S, Bosch E, Navarro A, Alcina A, Montalban X, Matesanz F, Comabella M. A New Risk Variant for Multiple Sclerosis at 11q23.3 Locus Is Associated with Expansion of CXCR5+ Circulating Regulatory T Cells. *J Clin Med*. 2020;9.

Giovannoni G, Comi G, Rammohan K, Rieckmann P, Dangond F, Keller B, Jack D, Vermersch P. Long-Term Disease Stability Assessed by the Expanded Disability Status Scale in Patients Treated with Cladribine Tablets 3.5 mg/kg for Relapsing Multiple Sclerosis: An Exploratory Post Hoc Analysis of the CLARITY and CLARITY Extension Studies. *Adv Ther*. 2021;38:4975–85.

Von Glehn F, Farias AS, De Oliveira ACP, Damasceno A, Longhini ALF, Oliveira EC, Damasceno BP, Santos LMB, Brandão CO. Disappearance of cerebrospinal fluid oligoclonal bands after natalizumab treatment of multiple sclerosis patients. *Mult Scler*. 2012;18:1038–41.

Goodin DS, Khankhanian P, Gourraud PA, Vince N. Highly conserved extended haplotypes of the major histocompatibility complex and their relationship to multiple sclerosis susceptibility. *PLoS One*. 2018;13.

Gordon BA. Neurofilaments in disease: what do we know? *Curr Opin Neurobiol*. 2020;61:105–15.

Grytten N, Torkildsen, Myhr KM. Time trends in the incidence and prevalence of multiple sclerosis in Norway during eight decades. *Acta Neurol Scand.* 2015;132:29–36.

Guarnizo A, Bermudez S, Torres O, Nassar A TC. Diagnóstico y evaluación de la esclerosis múltiple: lo que el radiólogo debe conocer e informar. *Conceptos actuales. Rev Colomb Radiol.* 2016;27:4543–55.

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

Guillemin F, Baumann C, Epstein J, Kerschen P, Garot T, Mathey G, Debouverie M. Older Age at Multiple Sclerosis Onset Is an Independent Factor of Poor Prognosis: A Population-Based Cohort Study. *Neuroepidemiology.* 2017;48:179–87.

H

Hagman S, Kolasa M, Basnyat P, Helminen M, Kähönen M, Dastidar P, Lehtimäki T, Elovaara I. Analysis of apoptosis-related genes in patients with clinically isolated syndrome and their association with conversion to multiple sclerosis. *J Neuroimmunol.* 2015;280:43–8.

Hair J, Anderson R, Babin B, Black W. *Multivariate Data Analysis.pdf.* Aust Cengage. 2010;7 edition:758.

Hassan-Smith G, Durant L, Tsentemidou A, Assi LK, Faint JM, Kalra S, Douglas MR, Curnow SJ. High sensitivity and specificity of elevated cerebrospinal fluid kappa free light chains in suspected multiple sclerosis. *J Neuroimmunol.* 2014;276:175–9.

Healy BC, Ali EN, Guttmann CRG, Chitnis T, Glanz BI, Buckle G, Houtchens M, Stazzone L, Moodie J, Berger AM, Duan Y, Bakshi R, Khoury S, Weiner H, Ascherio A. Smoking and disease progression in multiple sclerosis. *Arch Neurol.* 2009;66:858–64.

Hellwig K, Correale J. Artificial reproductive techniques in multiple sclerosis. *Clin Immunol.* 2013;149:219–24.

Hickman S, Izzy S, Sen P, Morsett L, El Khoury J. Microglia in neurodegeneration. *Nat Neurosci.* 2018;21:1359–69.

Hollman A. The paintings of pathological anatomy by Sir Robert Carswell (1793-1857). *Br*

Heart J. 1995;74:566–70.

Horowitz AL, Kaplan RD, Grewe G, White RT, Salberg LM. The ovoid lesion: a new MR observation in patients with multiple sclerosis. *AJNR Am J Neuroradiol.* 1989;10:303.

Hughes J, Jokubaitis V, Lugaresi A, Hupperts R, Izquierdo G, Prat A, Girard M, Duquette P, Grand'Maison F, Grammond P, Sola P, Ferraro D, Ramo-Tello C, Trojano M, Slee M, Shaygannejad V, Boz C, Lechner-Scott J, Van Pesch V, Pucci E, Solaro C, Verheul F, Terzi M, Granella F, Spitaleri D, Alroughani R, Jun JK, Fambiatos A, Van Der Walt A, Butzkueven H, Kalincik T. Association of Inflammation and Disability Accrual in Patients With Progressive-Onset Multiple Sclerosis. *JAMA Neurol.* 2018;75:1407–15.

Hughes SE, Spelman T, Gray OM, Boz C, Trojano M, Lugaresi A, Izquierdo G, Duquette P, Girard M, Grand'Maison F, Grammond P, Oreja-Guevara C, Hupperts R, Bergamaschi R, Giuliani G, Lechner-Scott J, Barnett M, Edite Rio M, Van Pesch V, Amato MP, Iuliano G, Slee M, Verheul F, Cristiano E, Fernández-Bolaños R, Poehlau D, Saladino ML, Deri N, Cabrera-Gomez J, Vella N, Herbert J, Skromne E, Savino A, Shaw C, Moore F, Vucic S, Petkovska-Boskova T, McDonnell G, Hawkins S, Kee F, Butzkueven H. Predictors and dynamics of postpartum relapses in women with multiple sclerosis. *Mult Scler.* 2014;20:739–46.

I

Iaffaldano P, Lucisano G, Patti F, Brescia Morra V, De Luca G, Lugaresi A, Zaffaroni M, Inglese M, Salemi G, Cocco E, Conte A, Ferraro D, Galgani S, Bergamaschi R, Pozzilli C, Salvetti M, Lus G, Rovaris M, Maniscalco GT, Logullo FO, Paolicelli D, Achille M, Marrazzo G, Lovato V, Comi G, Filippi M, Amato MP, Trojano M. Transition to secondary progression in relapsing-onset multiple sclerosis: Definitions and risk factors. *Mult Scler.* 2021;27:430–8.

Iridoy Zulet M, Pulido Fontes L, Ayuso Blanco T, Lacruz Bescos F, Mendioroz Iriarte M. Epigenetic changes in neurology: DNA methylation in multiple sclerosis. *Neurologia.* 2017;32:463–8.

Izquierdo AY, Palomo MJS, Herán IS, Monteiro GC. Treatment of multiple sclerosis. *Med.* 2019;12:4598–605.

Izquierdo G, Venegas A, Sanabria C, Navarro G. Long-term epidemiology of multiple sclerosis in the Northern Seville District. *Acta Neurol Scand.* 2015;132:111–7.

J

J. Lhermitte, J. Bollack MN. Les douleurs à type de décharge électrique consécutives à la flexion céphalique dans la sclérose en plaques: un cas de forme sensitive de la sclérose multiple. *Rev Neurol.* 1924;2:56–62.

Jafarinia M, Sadeghi E, Alsahebfosoul F, Etemadifar M, Jahanbani-Ardakani H. Evaluation of plasma Osteopontin level in relapsing- remitting multiple sclerosis patients compared to healthy subjects in Isfahan Province. *Int J Neurosci.* 2019.

Jog NR, McClain MT, Heinlen LD, Gross T, Towner R, Guthridge JM, Axtell RC, Pardo G, Harley JB, James JA. Epstein Barr virus nuclear antigen 1 (EBNA-1) peptides recognized by adult multiple sclerosis patient sera induce neurologic symptoms in a murine model. *J Autoimmun.* 2020;106.

Jokubaitis VG, Spelman T, Kalincik T, Lorscheider J, Havrdova E, Horakova D, Duquette P, Girard M, Prat A, Izquierdo G, Grammond P, Van Pesch V, Pucci E, Grand'Maison F, Hupperts R, Granella F, Sola P, Bergamaschi R, Iuliano G, Spitaleri D, Boz C, Hodgkinson S, Olascoaga J, Verheul F, McCombe P, Petersen T, Rozsa C, Lechner-Scott J, Saladino ML, Farina D, Iaffaldano P, Paolicelli D, Butzkueven H, Lugaresi A, Trojano M. Predictors of long-term disability accrual in relapse-onset multiple sclerosis. *Ann Neurol.* 2016;80:89–100.

Joseph FG, Hirst CL, Pickersgill TP, Ben-Shlomo Y, Robertson NP, Scolding NJ. CSF oligoclonal band status informs prognosis in multiple sclerosis: a case control study of 100 patients. *J Neurol Neurosurg Psychiatry.* 2009;80:292–6.

K

KABAT EA, FREEDMAN DA. A study of the crystalline albumin, gamma globulin and total protein in the cerebrospinal fluid of 100 cases of multiple sclerosis and in other diseases. *Am J Med Sci.* 1950;219:55–64.

Kalincik T, Cutter G, Spelman T, Jokubaitis V, Havrdova E, Horakova D, Trojano M, Izquierdo G, Girard M, Duquette P, Prat A, Lugaresi A, Grand'Maison F, Grammond P, Hupperts R, Oreja-Guevara C, Boz C, Pucci E, Bergamaschi R, Lechner-Scott J, Alroughani R, Van Pesch V, Iuliano G, Fernandez-Bolaños R, Ramo C, Terzi M, Slee M, Spitaleri D, Verheul F, Cristiano E, Sánchez-Menoyo JL, Fiol M, Gray O, Cabrera-Gomez JA, Barnett M, Butzkueven H. Defining

reliable disability outcomes in multiple sclerosis. *Brain*. 2015;138:3287–98.

Kalincik T, Vivek V, Jokubaitis V, Lechner-Scott J, Trojano M, Izquierdo G, Lugaresi A, Grand'Maison F, Vetere S, et al. Sex as a determinant of relapse incidence and progressive course of multiple sclerosis. *Brain*. 2013;136:3609–17.

Kallenbach K, Frederiksen J. Optical coherence tomography in optic neuritis and multiple sclerosis: a review. *Eur J Neurol*. 2007;14:841–9.

Kamm CP, Uitdehaag BM, Polman CH. Multiple sclerosis: current knowledge and future outlook. *Eur Neurol*. 2014;72:132–41.

Kantarci OH. Phases and phenotypes of multiple sclerosis. *Contin Lifelong Learn Neurol*. 2019;25:636–54.

Kappos L, Butzkueven H, Wiendl H, Spelman T, Pellegrini F, Chen Y, Dong Q, Koendgen H, Belachew S, Trojano M. Greater sensitivity to multiple sclerosis disability worsening and progression events using a roving versus a fixed reference value in a prospective cohort study. *Mult Scler*. 2018;24:963–73.

Kappos L, Wolinsky JS, Giovannoni G, Arnold DL, Wang Q, Bernasconi C, Model F, Koendgen H, Manfrini M, Belachew S, Hauser SL. Contribution of Relapse-Independent Progression vs Relapse-Associated Worsening to Overall Confirmed Disability Accumulation in Typical Relapsing Multiple Sclerosis in a Pooled Analysis of 2 Randomized Clinical Trials. *JAMA Neurol*. 2020;77:1132–40.

Kaschka WP, Theilkaes L, Eickhoff K, Skvaril F. Disproportionate elevation of the immunoglobulin G1 concentration in cerebrospinal fluids of patients with multiple sclerosis. *Infect Immun*. 1979;26:933–41.

Kasper LH, Reder AT. Immunomodulatory activity of interferon-beta. *Ann Clin Transl Neurol*. 2014;1:622–31.

Kelly VM, Nelson LM, Chakravarty EF. Obstetric outcomes in women with multiple sclerosis and epilepsy. *Neurology*. 2009;73:1831–6.

Kennedy PGE, Graner MW, Fringuello A, Zhou W, Pointon T, Alquatli K, Bisel S, Langford D, Yu X. Higher Levels of IgG3 Antibodies in Serum, But Not in CSF, Distinguish Multiple

Sclerosis From Other Neurological Disorders. *J Neuroimmune Pharmacol.* 2022;17:526–37.

Kesimpta | Agencia Europea de Medicamentos. n.d.

Kingwell E, Leung AL, Roger E, Duquette P, Rieckmann P, Tremlett H. Factors associated with delay to medical recognition in two Canadian multiple sclerosis cohorts. *J Neurol Sci.* 2010;292:57–62.

Klineova S, Lublin FD. Clinical Course of Multiple Sclerosis. *Cold Spring Harb Perspect Med.* 2018;8.

Koch-Henriksen N, Sørensen PS. The changing demographic pattern of multiple sclerosis epidemiology. *Lancet Neurol.* 2010;9:520–32.

Koch-Henriksen N, Thygesen LC, Sørensen PS, Magyari M. Worsening of disability caused by relapses in multiple sclerosis: A different approach. *Mult Scler Relat Disord.* 2019;32:1–8.

Koch-Henriksen N, Thygesen LC, Stenager E, Laursen B, Magyari M. Incidence of MS has increased markedly over six decades in Denmark particularly with late onset and in women. *Neurology.* 2018;90:e1954–63.

Koch M, Kingwell E, Rieckmann P, Tremlett H. The natural history of secondary progressive multiple sclerosis. *J Neurol Neurosurg Psychiatry.* 2010;81:1039–43.

Koch M, Kingwell E, Rieckmann P, Tremlett H. The natural history of primary progressive multiple sclerosis. *Neurology.* 2009;73:1996–2002.

Kuhle J, Malmeström C, Axelsson M, Plattner K, Yaldizli Ö, Derfuss T, Giovannoni G, Kappos L, Lycke J. Neurofilament light and heavy subunits compared as therapeutic biomarkers in multiple sclerosis. *Acta Neurol Scand.* 2013;128.

Kular L, Jagodic M. Epigenetic insights into multiple sclerosis disease progression. *J Intern Med.* 2020;288:82–102.

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

Kurtzke JF. A new scale for evaluating disability in multiple sclerosis. *Neurology.* 1955;5:580–3.

Kurtzke JF, Berlin L. Isoniazid in treatment of multiple sclerosis. *J Am Med Assoc.* 1957;163:172–4.

L

Lana-Peixoto MA, Talim N. Neuromyelitis Optica Spectrum Disorder and Anti-MOG Syndromes. *Biomedicines.* 2019;7:42.

van Langelaar J, Rijvers L, Smolders J, van Luijn MM. B and T Cells Driving Multiple Sclerosis: Identity, Mechanisms and Potential Triggers. *Front Immunol.* 2020;11.

Langer-Gould A, Qian L, Tartof SY, Brara SM, Jacobsen SJ, Beaber BE, Sy LS, Chao C, Hechter R, Tseng HF. Vaccines and the risk of multiple sclerosis and other central nervous system demyelinating diseases. *JAMA Neurol.* 2014;71:1506–13.

Langer-Gould A, Smith JB, Hellwig K, Gonzales E, Haraszti S, Koebnick C, Xiang A. Breastfeeding, ovulatory years, and risk of multiple sclerosis. *Neurology.* 2017;89:563–9.

Lanzillo R, Quarantelli M, Bonavita S, Ventrella G, Lus G, Vacca G, Prinster A, Orefice G, Tedeschi G, Brescia Morra V. Natalizumab vs interferon beta 1a in relapsing-remitting multiple sclerosis: a head-to-head retrospective study. *Acta Neurol Scand.* 2012;126:306–14.

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

Lassmann H, Van Horssen J. The molecular basis of neurodegeneration in multiple sclerosis. *FEBS Lett.* 2011;585:3715–23.

Leary SM, McLean BN, Thompson EJ. Local synthesis of IgA in the cerebrospinal fluid of patients with neurological diseases. *J Neurol.* 2000;247:609–15.

Lemus HN, Warrington AE, Rodriguez M. Multiple Sclerosis: Mechanisms of Disease and Strategies for Myelin and Axonal Repair. *Neurol Clin.* 2018;36:1–11.

Lew-Starowicz M, Gianotten WL. Sexual dysfunction in patients with multiple sclerosis. *Handb. Clin. Neurol., vol. 130, Elsevier B.V.; 2015, p. 357–70.*

Link H, Huang YM. Oligoclonal bands in multiple sclerosis cerebrospinal fluid: an update on methodology and clinical usefulness. *J Neuroimmunol.* 2006;180:17–28.

Link H, Tibbling G. Principles of albumin and IgG analyses in neurological disorders. II. Relation of the concentration of the proteins in serum and cerebrospinal fluid. *Scand J Clin Lab Invest.* 1977;37:391–6.

Lodde V, Murgia G, Simula ER, Steri M, Floris M, Idda ML. Long Noncoding RNAs and Circular RNAs in Autoimmune Diseases. *Biomolecules.* 2020;10:1–22.

López-Corral L, García-Sanz R, San Miguel JF. [Value of serum free light chains assay in plasma cell disorders]. *Med Clin (Barc).* 2010;135:368–74.

López-Gómez J, Sacristán-Enciso B, Caro-Miró MA. Clinically isolated syndrome: diagnosis and risk of developing clinically definite multiple sclerosis. *Neurologia.* 2021.

Lorscheider J, Buzzard K, Jokubaitis V, Spelman T, Havrdova E, Horakova D, Trojano M, Izquierdo G, Girard M, Duquette P, Prat A, Lugaresi A, Grand'maison F, Grammond P, Hupperts R, Alroughani R, Sola P, Boz C, Pucci E, Lechner-Scott J, Bergamaschi R, Oreja-Guevara C, Iuliano G, Van Pesch V, Granella F, Ramo-Tello C, Spitaleri D, Petersen T, Slee M, Verheul F, Ampapa R, Amato MP, Mccombe P, Vucic S, Sánchez Menoyo JL, Cristiano E, Barnett MH, Hodgkinson S, Olascoaga J, Saladino ML, Gray O, Shaw C, Moore F, Butzkueven H, Kalincik T. Defining secondary progressive multiple sclerosis. *Brain.* 2016;139:2395–405.

Losy J, Mehta PD, Wisniewski HM. Identification of IgG subclasses' oligoclonal bands in multiple sclerosis CSF. *Acta Neurol Scand.* 1990;82:4–8.

Lourenco P, Shirani A, Saeedi J, Oger J, Schreiber WE, Tremlett H. Oligoclonal bands and cerebrospinal fluid markers in multiple sclerosis: associations with disease course and progression. *Mult Scler.* 2013;19:577–84.

Lublin FD, Häring DA, Ganjgahi H, Ocampo A, Hatami F, Čuklina J, Aarden P, Dahlke F, Arnold DL, Wiendl H, Chitnis T, Nichols TE, Kieseier BC, Bermel RA. How patients with multiple sclerosis acquire disability. *Brain.* 2022;145:3147–61.

Lublin FD, Reingold SC, Cohen JA, Cutter GR, Sørensen PS, Thompson AJ, Wolinsky JS, Balcer LJ, Banwell B, Barkhof F, Bebo B, Calabresi PA, Clanet M, Comi G, Fox RJ, Freedman MS, Goodman AD, Inglese M, Kappos L, Kieseier BC, Lincoln JA, Lubetzki C, Miller AE, Montalban X, O'Connor PW, Petkau J, Pozzilli C, Rudick RA, Sormani MP, Stüve O, Waubant E, Polman CH. Defining the clinical course of multiple sclerosis: The 2013 revisions. *Neurology.*

2014;83:278–86.

Lukas C, Knol DL, Sombekke MH, Bellenberg B, Hahn HK, Popescu V, Weier K, Radue EW, Gass A, Kappos L, Naegelin Y, Uitdehaag BMJ, Geurts JJG, Barkhof F, Vrenken H. Cervical spinal cord volume loss is related to clinical disability progression in multiple sclerosis. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. 2015;86:410–8.

M

Machado-Santos J, Saji E, Tröscher AR, Paunovic M, Liblau R, Gabriely G, Bien CG, Bauer J, Lassmann H. The compartmentalized inflammatory response in the multiple sclerosis brain is composed of tissue-resident CD8+ T lymphocytes and B cells. *Brain*. 2018;141:2066–82.

Mackenzie IS, Morant S V., Bloomfield GA, MacDonald TM, O’Riordan J. Incidence and prevalence of multiple sclerosis in the UK 1990-2010: a descriptive study in the General Practice Research Database. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. 2014;85:79–84.

Mahad DH, Trapp BD, Lassmann H. Pathological mechanisms in progressive multiple sclerosis. *Lancet Neurol*. 2015;14:183–93.

Makshakov GS, Nazarov VD, Totolyan NA, Lapin S V., Mazing A V., Emanuel VL, Krasnov VS, Shumilina M V., Skoromets AA, Evdoshenko EP. [The association of intrathecal production of immunoglobulin free light chains and progression of multiple sclerosis]. *Zhurnal Nevrol i Psikiatrii Im SS Korsakova*. 2017;117:4–10.

Mandrekar J. Cutpoint Determination Methods in Survival Analysis using SAS[®]. *Proc 28th SAS Users Gr Int Conf*. 2003:261–28.

Mandrioli J, Sola P, Bedin R, Gambini M, Merelli E. A multifactorial prognostic index in multiple sclerosis. Cerebrospinal fluid IgM oligoclonal bands and clinical features to predict the evolution of the disease. *J Neurol*. 2008;255:1023–31.

Manouchehrinia A, Huang J, Hillert J, Alfredsson L, Olsson T, Kockum I, Constantinescu CS. Smoking Attributable Risk in Multiple Sclerosis. *Front Immunol*. 2022;13.

Manouchehrinia A, Zhu F, Piani-Meier D, Lange M, Silva DG, Carruthers R, Glaser A, Kingwell E, Tremlett H, Hillert J. Predicting risk of secondary progression in multiple sclerosis: A nomogram. *Mult Scler*. 2019;25:1102–12.

Marie P. La sclerose en plaques et maladies infectieuses. *La Prog Medicale*. 1884;12:287–9.

Martinez-Altarriba MC, Ramos-Campoy O, Luna-Calcaño IM, Arrieta-Antón E. Revisión de la esclerosis múltiple (1). A propósito de un caso. *Semergen*. 2015a;41:261–5.

Martinez-Altarriba MC, Ramos-Campoy O, Luna-Calcaño IM, Arrieta-Antón E. Revisión de la esclerosis múltiple (2). Diagnóstico y tratamiento. *Semergen*. 2015b;41:324–8.

Masjuan J, Álvarez-Cermeño JC, García-Barragán N, Díaz-Sánchez M, Espiño M, Sádaba MC, González-Porqué P, Martínez San Millán J, Villar LM. Clinically isolated syndromes: a new oligoclonal band test accurately predicts conversion to MS. *Neurology*. 2006;66:576–8.

Matías-Guío J, Oreja-Guevara C, Matias-Guiu JA, Gomez-Pinedo U. Vitamin D and remyelination in multiple sclerosis. *Neurologia*. 2018;33:177–86.

Mattson DH, Roos RP, Arnason BGW. Isoelectric focusing of IgG eluted from multiple sclerosis and subacute sclerosing panencephalitis brains. *Nature*. 1980;287:335–7.

Mavenclad. ANEXO I FICHA TÉCNICA O RESUMEN DE LAS CARACTERÍSTICAS DEL PRODUCTO n.d.

Mazumdar M, Glassman JR. Categorizing a prognostic variable: review of methods, code for easy implementation and applications to decision-making about cancer treatments. *Stat Med*. 2000;19:113–32.

McDonald WI, Compston A, Edan G, Goodkin D, Hartung HP, Lublin FD, McFarland HF, Paty DW, Polman CH, Reingold SC, Sandberg-Wollheim M, Sibley W, Thompson A, Van Den Noort S, Weinshenker BY, Wolinsky JS. Recommended diagnostic criteria for multiple sclerosis: guidelines from the International Panel on the diagnosis of multiple sclerosis. *Ann Neurol*. 2001;50:121–7.

McClean BN, Luxton RW, Thompson EJ. A study of immunoglobulin G in the cerebrospinal fluid of 1007 patients with suspected neurological disease using isoelectric focusing and the Log IgG-Index. A comparison and diagnostic applications. *Brain*. 1990;113 (Pt 5):1269–89.

Menéndez-Valladares P, García-Sánchez MI, Adorna Martínez M, García De Veas Silva JL, Bermudo Guitarte C, Izquierdo Ayuso G. Validation and meta-analysis of kappa index biomarker in multiple sclerosis diagnosis. *Autoimmun Rev*. 2019;18:43–9.

Menéndez-Valladares P, García-Sánchez MI, Cuadri Benítez P, Lucas M, Adorna Martínez M, Carranco Galán V, García De Veas Silva JL, Bermudo Guitarte C, Izquierdo Ayuso G. Free kappa light chains in cerebrospinal fluid as a biomarker to assess risk conversion to multiple sclerosis. *Mult Scler J - Exp Transl Clin.* 2015;1:1–9.

Meng H, Xu J, Pan C, Cheng J, Hu Y, Hong Y, Shen Y, Dai H. Cognitive dysfunction in adult patients with neuromyelitis optica: a systematic review and meta-analysis. *J Neurol.* 2017;264:1549–58.

Misicka E, Sept C, Briggs FBS. Predicting onset of secondary-progressive multiple sclerosis using genetic and non-genetic factors. *J Neurol.* 2020;267:2328–39.

Mohamed MS, Nahrery EMAE, Shalaby N, Hussein M, Aal RA El, Mohamed MM. Micro-RNA 18b and interleukin 17A profiles in relapsing remitting multiple sclerosis. *Mult Scler Relat Disord.* 2019;28:226–9.

Moreira MA, Tilbery CP, Lana-Peixoto MA, Mendes M, Kaimen-Maciel DR, Callegaro D. Historical aspects of multiple sclerosis. *Rev Neurol.* 2002;34:378–83.

Msif. Atlas of MS 2013: Mapping Multiple Sclerosis Around the World. *Mult Scler Int Fed.* 2013:1–28.

Muñoz Ú, Sebal C, Escudero E, García Sánchez MI, Urcelay E, Jayo A, Arroyo R, García-Martínez MA, Álvarez-Lafuente R, Sádaba MC. High prevalence of intrathecal IgA synthesis in multiple sclerosis patients. *Sci Rep.* 2022;12:1–10.

Murdaca G, Tonacci A, Negrini S, Greco M, Borro M, Puppo F, Gangemi S. Emerging role of vitamin D in autoimmune diseases: An update on evidence and therapeutic implications. *Autoimmun Rev.* 2019;18.

Muris AH, Rolf L, Broen K, Hupperts R, Damoiseaux J, Smolders J. A low vitamin D status at diagnosis is associated with an early conversion to secondary progressive multiple sclerosis. *J Steroid Biochem Mol Biol.* 2016;164:254–7.

Mycko MP, Baranzini SE. microRNA and exosome profiling in multiple sclerosis. *Mult Scler.* 2020;26:599–604.

N

Nasi M, Bianchini E, De Biasi S, Gibellini L, Neroni A, Mattioli M, Pinti M, Iannone A, Mattioli AV, Simone AM, Ferraro D, Vitetta F, Sola P, Cossarizza A. Increased plasma levels of mitochondrial DNA and pro-inflammatory cytokines in patients with progressive multiple sclerosis. *J Neuroimmunol.* 2020;338:577107.

Navarro Valverde C, Quesada Gómez JM. Vitamin D deficiency in Spain. Reality or myth? *Rev Osteoporos Metab Min.* 2014;6:5–10.

Nazarov V, Makshakov G, Kalinin I, Lapin S, Surkova E, Mikhailova L, Gilburd B, Skoromets A, Evdoshenko E. Concentrations of immunoglobulin free light chains in cerebrospinal fluid predict increased level of brain atrophy in multiple sclerosis. *Immunol Res.* 2018;66:761–7.

Ben Noon G, Vigiser I, Shiner T, Kolb H, Karni A, Regev K. Reinforcing the evidence of oligoclonal bands as a prognostic factor in patients with Multiple sclerosis. *Mult Scler Relat Disord.* 2021;56.

Nourbakhsh B, Mowry EM. Multiple Sclerosis Risk Factors and Pathogenesis. *Continuum (Minneapolis Minn).* 2019;25:596–610.

O

Öhman S, Forsberg P, Nelson N, Vrethem M. An improved formula for the judgement of intrathecally produced IgG in the presence of blood brain barrier damage. *Clin Chim Acta.* 1989;181:265–72.

de Oliveira LRC, Mimura LAN, Fraga-Silva TF de C, Ishikawa LLW, Fernandes AAH, Zorzella-Pezavento SFG, Sartori A. Calcitriol Prevents Neuroinflammation and Reduces Blood-Brain Barrier Disruption and Local Macrophage/Microglia Activation. *Front Pharmacol.* 2020;11.

Olson JK, Miller SD. Microglia initiate central nervous system innate and adaptive immune responses through multiple TLRs. *J Immunol.* 2004;173:3916–24.

Olsson JE, Link H. Immunoglobulin abnormalities in multiple sclerosis. Relation to clinical parameters: exacerbations and remissions. *Arch Neurol.* 1973;28:392–9.

Orton SM, Herrera BM, Yee IM, Valdar W, Ramagopalan S V., Sadovnick AD, Ebers GC. Sex ratio of multiple sclerosis in Canada: a longitudinal study. *Lancet Neurol.* 2006.

Ozakbas S, Cinar BP, Özcelik P, Baser H, Kosehasanoğullari G. Intrathecal IgM index

correlates with a severe disease course in multiple sclerosis: Clinical and MRI results. *Clin Neurol Neurosurg.* 2017;160:27–9.

P

Di Pauli F, Gredler V, Kuenz B, Lutterotti A, Ehling R, Gneiss C, Schocke M, Deisenhammer F, Reindl M, Berger T. Features of intrathecal immunoglobulins in patients with multiple sclerosis. *J Neurol Sci.* 2010;288:147–50.

Peduzzi P, Concato J, Kemper E, Holford TR, Feinstein AR. A simulation study of the number of events per variable in logistic regression analysis. *J Clin Epidemiol.* 1996;49:1373–9.

Pérez-Carmona N, Fernández-Jover E, Sempere AP. Epidemiology of multiple sclerosis in Spain. *Rev Neurol.* 2019;69:32–8.

Perez-Carmona N, Gimenez-Martinez J, Borrego-Honrubia C, Sempere AP. Multiple sclerosis prevalence and incidence in San Vicente del Raspeig, Spain. *Mult Scler Relat Disord.* 2019;33:78–81.

Petzold A. Intrathecal oligoclonal IgG synthesis in multiple sclerosis. *J Neuroimmunol.* 2013;262:1–10.

Pfeuffer S, Rolfes L, Hackert J, Kleinschnitz K, Ruck T, Wiendl H, Klotz L, Kleinschnitz C, Meuth SG, Pul R. Effectiveness and safety of cladribine in MS: Real-world experience from two tertiary centres. *Mult Scler.* 2022;28:257–68.

Pierrot-Deseilligny C, Souberbielle JC. Vitamin D and multiple sclerosis: An update. *Mult Scler Relat Disord.* 2017;14:35–45.

Polman CH, O'Connor PW, Havrdova E, Hutchinson M, Kappos L, Miller DH, Phillips JT, Lublin FD, Giovannoni G, Wajgt A, Toal M, Lynn F, Panzara MA, Sandrock AW. A randomized, placebo-controlled trial of natalizumab for relapsing multiple sclerosis. *N Engl J Med.* 2006;354:899–910.

Polman CH, Reingold SC, Banwell B, Clanet M, Cohen JA, Filippi M, Fujihara K, Havrdova E, Hutchinson M, Kappos L, Lublin FD, Montalban X, O'Connor P, Sandberg-Wollheim M, Thompson AJ, Waubant E, Weinshenker B, Wolinsky JS. Diagnostic criteria for multiple sclerosis: 2010 Revisions to the McDonald criteria. *Ann Neurol.* 2011;69:292.

Polman CH, Reingold SC, Edan G, Filippi M, Hartung HP, Kappos L, Lublin FD, Metz LM, McFarland HF, O'Connor PW, Sandberg-Wollheim M, Thompson AJ, Weinshenker BG, Wolinsky JS. Diagnostic criteria for multiple sclerosis: 2005 revisions to the "McDonald Criteria." *Ann Neurol*. 2005;58:840–6.

Poser CM, Paty DW, Scheinberg L, McDonald WI, Davis FA, Ebers GC, Johnson KP, Sibley WA, Silberberg DH, Tourtellotte WW. New diagnostic criteria for multiple sclerosis: guidelines for research protocols. *Ann Neurol*. 1983;13:227–31.

Povedano Margarit B, Carvalho Monteiro G, Sánchez Herán I, Romero Delgado F, Yusta Izquierdo A. Esclerosis múltiple. vol. 12. 2019.

Prieto Martín A, Barbarroja Escudero J, Barcenilla Rodríguez H, Díaz Martín D. Funciones de los linfocitos B. *Med*. 2013;11:1752–9.

Punción lumbar (punción espinal): MedlinePlus enciclopedia médica ilustración. n.d.

Puthenparampil M, Altinier S, Stropparo E, Zywicki S, Poggiali D, Cazzola C, Toffanin E, Ruggiero S, Grassivaro F, Zaninotto M, Plebani M, Gallo P. Intrathecal K free light chain synthesis in multiple sclerosis at clinical onset associates with local IgG production and improves the diagnostic value of cerebrospinal fluid examination. *Mult Scler Relat Disord*. 2018;25:241–5.

Putnam TJ, Chiavacci L V., Hoff H, Weitzen HG. Results of treatment of multiple sclerosis with dicoumarin. *Arch Neurol Psychiatry*. 1947;57:1–13.

R

Ramsden DB. Multiple sclerosis: assay of free immunoglobulin light chains. *Ann Clin Biochem*. 2017;54:5–13.

Ransohoff RM, Engelhardt B. The anatomical and cellular basis of immune surveillance in the central nervous system. *Nat Rev Immunol*. 2012;12:623–35.

Rathbone E, Durant L, Kinsella J, Parker AR, Hassan-Smith G, Douglas MR, John Curnow S. Cerebrospinal fluid immunoglobulin light chain ratios predict disease progression in multiple sclerosis. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. 2018;89:1044–9.

Reiber H, Peter JB. Cerebrospinal fluid analysis: Disease-related data patterns and evaluation

programs. *J Neurol Sci.* 2001;184:101–22.

Reich DS, Lucchinetti CF, Calabresi PA. Multiple sclerosis. *N Engl J Med.* 2018;378:169–80.

Ribes García S, Casanova Estruch B, Gómez Pajares F, Juan Blanco MA. Prognostic utility of the IgM oligoclonal bands against myelin lipids in multiple sclerosis. *J Neuroimmunol.* 2021;359.

Rice CM, Cottrell D, Wilkins A, Scolding NJ. Primary progressive multiple sclerosis: Progress and challenges. *J Neurol Neurosurg Psychiatry.* 2013;84:1100–6.

Río J, Montalbán X. Descripción actual de la esclerosis múltiple. *Med Clin (Barc).* 2014;143:3–6.

Rispens T, Ooievaar-De Heer P, Vermeulen E, Schuurman J, van der Neut Kolfschoten M, Aalberse RC. Human IgG4 binds to IgG4 and conformationally altered IgG1 via Fc-Fc interactions. *J Immunol.* 2009;182:4275–81.

RL S, IA W. Antibody Structure. *Microbiol Spectr.* 2014;2:1–7.

Rojas JI, Patrucco L, Besada C, Bengolea L, Cristiano E. Brain atrophy at onset and physical disability in multiple sclerosis. *Arq Neuropsiquiatr.* 2012;70:765–8.

Rolf L, Muris AH, Hupperts R, Damoiseaux J. Vitamin D effects on B cell function in autoimmunity. *Ann N Y Acad Sci.* 2014;1317:84–91.

Rosenstein I, Axelsson M, Novakova L, Malmeström C, Blennow K, Zetterberg H, Lycke J. Intrathecal kappa free light chain synthesis is associated with worse prognosis in relapsing–remitting multiple sclerosis. *J Neurol.* 2023;270:4800.

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

Rudick RA, Kappos L. Measuring disability in relapsing–remitting MS. *Neurology.* 2010;75:296–7.

S

Safari-Alighiarloo N, Taghizadeh M, Mohammad Tabatabaei S, Namaki S, Rezaei-Tavirani M.

Identification of common key genes and pathways between type 1 diabetes and multiple sclerosis using transcriptome and interactome analysis. *Endocrine*. 2020;68:81–92.

Sandberg L, Biström M, Salzer J, Vågberg M, Svenningsson A, Sundström P. Vitamin D and axonal injury in multiple sclerosis. *Mult Scler*. 2016;22:1027–31.

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

Sawcer S, Franklin RJM, Ban M. Multiple sclerosis genetics. *Lancet Neurol*. 2014;13:700–9.

Scalfari A, Knappertz V, Cutter G, Goodin DS, Ashton R, Ebers GC. Mortality in patients with multiple sclerosis. *Neurology*. 2013;81:184–92.

Scalfari A, Lederer C, Daumer M, Nicholas R, Ebers GC, Muraro PA. The relationship of age with the clinical phenotype in multiple sclerosis. *Mult Scler*. 2016;22:1750–8.

Scalfari A, Neuhaus A, Degenhardt A, Rice GP, Muraro PA, Daumer M, Ebers GC. The natural history of multiple sclerosis: a geographically based study 10: relapses and long-term disability. *Brain*. 2010;133:1914–29.

Schroeder HW, Cavacini L. Structure and function of immunoglobulins. *J Allergy Clin Immunol*. 2010;125.

Schuller E, Sagar HJ. Central nervous system IgG synthesis in multiple sclerosis. Application of a new formula. *Acta Neurol Scand*. 1983;67:365–71.

Schumacher GA, Beebe G, Kibler RF, Kurland LT, Kurtzke JF, McDowell F, Nagler B, Sibley WA, Tourtellotte WW, Willmon TL. PROBLEMS OF EXPERIMENTAL TRIALS OF THERAPY IN MULTIPLE SCLEROSIS: REPORT BY THE PANEL ON THE EVALUATION OF EXPERIMENTAL TRIALS OF THERAPY IN MULTIPLE SCLEROSIS. *Ann N Y Acad Sci*. 1965;122:552–68.

Senel M, Mojib-Yezdani F, Braisch U, Bachhuber F, Lewerenz J, Ludolph AC, Otto M, Tumani H. CSF Free Light Chains as a Marker of Intrathecal Immunoglobulin Synthesis in Multiple Sclerosis: A Blood-CSF Barrier Related Evaluation in a Large Cohort. *Front Immunol*. 2019;10.

Serafini B, Rosicarelli B, Magliozzi R, Stigliano E, Aloisi F. Detection of ectopic B-cell follicles with germinal centers in the meninges of patients with secondary progressive multiple

sclerosis. *Brain Pathol.* 2004a;14:164–74.

Serafini B, Rosicarelli B, Magliozzi R, Stigliano E, Aloisi F. Detection of ectopic B-cell follicles with germinal centers in the meninges of patients with secondary progressive multiple sclerosis. *Brain Pathol.* 2004b;14:164–74.

Singh S, Metz I, Amor S, Van Der Valk P, Stadelmann C, Brück W. Microglial nodules in early multiple sclerosis white matter are associated with degenerating axons. *Acta Neuropathol.* 2013;125:595–608.

Skoog B, Tedeholm H, Runmarker B, Odén A, Andersen O. Continuous prediction of secondary progression in the individual course of multiple sclerosis. *Mult Scler Relat Disord.* 2014;3:584–92.

Smolders J, Menheere P, Kessels A, Damoiseaux J, Hupperts R. Association of vitamin D metabolite levels with relapse rate and disability in multiple sclerosis. <http://dx.doi.org/10.1177/1352458508094399>. 2008;14:1220–4.

Sofroniew M V., Vinters H V. Astrocytes: biology and pathology. *Acta Neuropathol.* 2010;119:7–35.

Soldán MMP, Novotna M, Zeid NA, Kale N, Tutuncu M, Crusan DJ, Atkinson EJ, Siva A, Keegan BM, Pirko I, Pittock SJ, Lucchinetti CF, Weinshenker BG, Rodriguez M, Kantarci OH. Relapses and disability accumulation in progressive multiple sclerosis. *Neurology.* 2015;84:81–8.

Sospedra M, Martin R. Immunology of multiple sclerosis. *Annu Rev Immunol.* 2005;23:683–747.

De Stefano N, Giorgio A, Tintoré M, Pia Amato M, Kappos L, Palace J, Yousry T, Rocca MA, Ciccarelli O, Enzinger C, Frederiksen J, Filippi M, Vrenken H, Rovira À, MAGNIMS study group. Radiologically isolated syndrome or subclinical multiple sclerosis: MAGNIMS consensus recommendations. *Mult Scler.* 2018;24:214–21.

Stellmann JP, Neuhaus A, Lederer C, Daumer M, Heesen C. Validating predictors of disease progression in a large cohort of primary-progressive multiple sclerosis based on a systematic literature review. *PLoS One.* 2014;9.

Stojić-Vukanić Z, Hadžibegović S, Nicole O, Nacka-Aleksić M, Leštarević S, Lepasavić G. CD8+

T Cell-Mediated Mechanisms Contribute to the Progression of Neurocognitive Impairment in Both Multiple Sclerosis and Alzheimer's Disease? *Front Immunol.* 2020;11.

Stone JH, Brito-Zerón P, Bosch X, Ramos-Casals M. Diagnostic Approach to the Complexity of IgG4-Related Disease. *Mayo Clin Proc.* 2015;90:927–39.

Von Storch TJC, Lawyer T, Harris AH. Colloidal gold reaction in multiple sclerosis. *AMA Arch Neurol Psychiatry.* 1950;64:668–75.

T

Tarlinton RE, Khaibullin T, Granatov E, Martynova E, Rizvanov A, Khaiboullina S. The Interaction between Viral and Environmental Risk Factors in the Pathogenesis of Multiple Sclerosis. *Int J Mol Sci.* 2019;20.

Tartaglino LM, Friedman DP, Flanders AE, Lublin FD, Knobler RL, Liem M. Multiple sclerosis in the spinal cord: MR appearance and correlation with clinical parameters. *Radiology.* 1995;195:725–32.

Tatomir A, Talpos-Caia A, Anselmo F, Kruszewski AM, Boodhoo D, Rus V, Rus H. The complement system as a biomarker of disease activity and response to treatment in multiple sclerosis. *Immunol Res.* 2017;65:1103–9.

Tengvall K, Huang J, Hellström C, Kammer P, Biström M, Ayoglu B, Bomfim IL, Stridh P, Butt J, Brenner N, Michel A, Lundberg K, Padyukov L, Lundberg IE, Svenungsson E, Ernberg I, Olafsson S, Dilthey AT, Hillert J, Alfredsson L, Sundström P, Nilsson P, Waterboer T, Olsson T, Kockum I. Molecular mimicry between Anoctamin 2 and Epstein-Barr virus nuclear antigen 1 associates with multiple sclerosis risk. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2019;116:16955–60.

Teunissen CE, Tumani H, Bennett JL, Berven FS, Brundin L, Comabella M, Franciotta D, Federiksen JL, Fleming JO, Furlan R, Hintzen RQ, Hughes SG, Jimenez CR, Johnson MH, Killestein J, Krasulova E, Kuhle J, Magnone M-C, Petzold A, Rajda C, Rejdak K, Schmidt HK, van Pesch V, Waubant E, Wolf C, Deisenhammer F, Giovannoni G, Hemmer B. Consensus Guidelines for CSF and Blood Biobanking for CNS Biomarker Studies. *Mult Scler Int.* 2011;2011:1–9.

Thompson AJ, Banwell BL, Barkhof F, Carroll WM, Coetzee T, Comi G, Correale J, Fazekas F,

Filippi M, Freedman MS, Fujihara K, Galetta SL, Hartung HP, Kappos L, Lublin FD, Marrie RA, Miller AE, Miller DH, Montalban X, Mowry EM, Sorensen PS, Tintoré M, Traboulsee AL, Trojano M, Uitdehaag BMJ, Vukusic S, Waubant E, Weinshenker BG, Reingold SC, Cohen JA. Diagnosis of multiple sclerosis: 2017 revisions of the McDonald criteria. *Lancet Neurol*. 2018;17:162–73.

Thompson EJ, Kaufmann P, Rudge P. Sequential changes in oligoclonal patterns during the course of multiple sclerosis. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. 1983;46:547–50.

Tiftikçioğlu Bİ. Multiple Sclerosis Functional Composite (MSFC): Scoring Instructions. *Noro Psikiyatr Ars*. 2018;55:S46–8.

Tintoré M, Rovira A, Brieva L, Grivé E, Jardí R, Borrás C, Montalban X. Isolated demyelinating syndromes: comparison of CSF oligoclonal bands and different MR imaging criteria to predict conversion to CDMS. *Mult Scler J*. 2001;7:359–63.

TOURTELLOTTE WW. MULTIPLE SCLEROSIS AND CEREBROSPINAL FLUID. *Med Clin North Am*. 1963;47:1619–28.

Trend S, Jones AP, Cha L, Byrne SN, Geldenhuys S, Fabis-Pedrini MJ, Carroll WM, Cole JM, Booth DR, Lucas RM, Kermode AG, French MA, Hart PH. Higher serum immunoglobulin G3 levels may predict the development of multiple sclerosis in individuals with clinically isolated syndrome. *Front Immunol*. 2018;9:1–13.

Treviño-Frenk RI, Flores J, Vidaltamayo R. Síntomas transitorios en esclerosis múltiple
Transient symptoms in multiple sclerosis 2015;16:26–38.

Triviño M, Solanes F, Salgado C. Neuritis óptica atípica en un adulto joven: un desafío diagnóstico
Atypical optic neuritis in a young adult: a diagnostic challenge. *Rev Chil Neuro-Psiquiat*. 2014;52:81–8.

V

Valencia-Vera E, Martínez-Escribano García-Ripoll A, Enguix A, Abalos-García C, Segovia-Cuevas MJ. Application of κ free light chains in cerebrospinal fluid as a biomarker in multiple sclerosis diagnosis: development of a diagnosis algorithm. *Clin Chem Lab Med*. 2018;56:609–13.

Valenzuela NM, Schaub S. The biology of IgG subclasses and their clinical relevance to transplantation. *Transplantation*. 2018;102:S7–13.

Varsavsky M, Rozas Moreno P, Becerra Fernández A, Luque Fernández I, Quesada Gómez JM, Ávila Rubio V, García Martín A, Cortés Berdonces M, Naf Cortés S, Romero Muñoz M, Reyes García R, Jódar Gimeno E, Muñoz Torres M. Recomendaciones de vitamina D para la población general. *Endocrinol Diabetes y Nutr*. 2017;64:7–14.

Vecchio D, Bellomo G, Serino R, Virgilio E, Lamonaca M, Dianzani U, Cantello R, Comi C, Crespi I. Intrathecal kappa free light chains as markers for multiple sclerosis. *Sci Rep*. 2020;10.

Vecchio D, Crespi I, Virgilio E, Naldi P, Campisi MP, Serino R, Dianzani U, Bellomo G, Cantello R, Comi C. Kappa free light chains could predict early disease course in multiple sclerosis. *Mult Scler Relat Disord*. 2019;30:81–4.

Villar LM, Casanova B, Ouamara N, Comabella M, Jalili F, Leppert D, De Andrés C, Izquierdo G, Arroyo R, Avşar T, Lapin S V., Johnson T, Montalbán X, Fernández O, Álvarez-Lafuente R, Masterman D, García-Sánchez MI, Coret F, Siva A, Evdoshenko E, Álvarez-Cermeño JC, Bar-Or A. Immunoglobulin M oligoclonal bands: Biomarker of targetable inflammation in primary progressive multiple sclerosis. *Ann Neurol*. 2014;76:231–40.

Villar LM, Espiño M, Costa-Frossard L, Muriel A, Jiménez J, Álvarez-Cermeño JC. High levels of cerebrospinal fluid free kappa chains predict conversion to multiple sclerosis. *Clin Chim Acta*. 2012;413:1813–6.

Villar LM, García-Barragán N, Espiño M, Roldán E, Sádaba M, Gómez-Rial J, González-Porqué P, Álvarez-Cermeño JC. Influence of oligoclonal IgM specificity in multiple sclerosis disease course. *Mult Scler*. 2008;14:183–7.

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

Villar LM, Masjuan J, González-Porqué P, Plaza J, Sádaba MC, Roldán E, Bootello A, Alvarez-Cermeño JC. Intrathecal IgM synthesis is a prognostic factor in multiple sclerosis. *Ann Neurol*. 2003;53:222–6.

Villar LM, Masjuan J, González-Porqué P, Plaza J, Sádaba MC, Roldán E, Bootello A, Alvarez-Cermeño JC. Intrathecal IgM synthesis predicts the onset of new relapses and a worse disease course in MS. *Neurology*. 2002;59:555–9.

Villar Luisa M., Masjuan J, Sádaba MC, Gonzalez-Porqué P, Plaza J, Bootello A, Álvarez-Cermeño JC. Early differential diagnosis of multiple sclerosis using a new oligoclonal band test. *Arch Neurol*. 2005;62:574–7.

Villar LM, Masterman T, Casanova B, Gómez-Rial J, Espiño M, Sádaba MC, González-Porqué P, Coret F, Álvarez-Cermeño JC. CSF oligoclonal band patterns reveal disease heterogeneity in multiple sclerosis. *J Neuroimmunol*. 2009;211:101–4.

Villar Luisa María, Sádaba MC, Roldán E, Masjuan J, González-Porqué P, Villarrubia N, Espiño M, García-Trujillo JA, Bootello A, Álvarez-Cermeño JC. Intrathecal synthesis of oligoclonal IgM against myelin lipids predicts an aggressive disease course in MS. *J Clin Invest*. 2005;115:187–94.

Vukusic S, Hutchinson M, Hours M, Moreau T, Cortinovis-Tourniaire P, Adeleine P, Confavreux C. Pregnancy and multiple sclerosis (the PRIMS study): clinical predictors of post-partum relapse. *Brain*. 2004;127:1353–60.

Vulpian E. Note sur la sclérose en plaques de la moelle épinière. *Un Med Prat Fr*. 1866;30:459–65.

W

van Walderveen MA, Barkhof F, Pouwels PJ, van Schijndel RA, Polman CH CJ. Neuronal damage in T1-hypointense multiple sclerosis lesions demonstrated in vivo using proton magnetic resonance spectroscopy. *Ann Neurol*. 1999;Jul;46(1):79–87.

Wattjes MP, Steenwijk MD, Stangel M. MRI in the Diagnosis and Monitoring of Multiple Sclerosis: An Update. *Clin Neuroradiol*. 2015;25 Suppl 2:157–65.

Weideman AM, Tapia-Maltos MA, Johnson K, Greenwood M, Bielekova B. Meta-analysis of the Age-Dependent Efficacy of Multiple Sclerosis Treatments. *Front Neurol*. 2017;8.

Wolinsky JS. The diagnosis of primary progressive multiple sclerosis. *J Neurol Sci*. 2003;206:145–52.

World Health Organization. Neurological disorders : public health challenges. World Health Organization; 2006.

Wu GF, Alvarez E. The Immunopathophysiology of Multiple Sclerosis. *Neurol Clin.* 2011;29:257–78.

Y

Yang CC. Bladder management in multiple sclerosis. *Phys Med Rehabil Clin N Am.* 2013;24:673–86.

Ysrraelit MC, Correale J. Impact of sex hormones on immune function and multiple sclerosis development. *Immunology.* 2019;156:9–22.

Yu X, Graner M, Kennedy PGE, Liu Y. The Role of Antibodies in the Pathogenesis of Multiple Sclerosis. *Front Neurol.* 2020;11:533388.

Z

van der Zee JS, van Swieten P, Aalberse RC. Inhibition of complement activation by IgG4 antibodies. *Clin Exp Immunol.* 1986;64:415–22.

Zeman D, Kušnierová P, Všíanský F, Reguliová K, Škutová M, Woznicová I, Zapletalová O, Hradílek P. Cerebrospinal fluid oligoclonal IgM test in routine practice: Comparison with quantitative assessment of intrathecal IgM synthesis. *Clin Chim Acta.* 2020;508:137–45.

Zeydan B, Kantarci OH. Impact of Age on Multiple Sclerosis Disease Activity and Progression. *Curr Neurol Neurosci Rep.* 2020;20.

Zhang Y, Da RR, Hilgenberg LG, Tourtellotte WW, Sobel RA, Smith MA, Olek M, Nagra R, Sudhir G, Van Den Noort S, Qin Y. Clonal expansion of IgA-positive plasma cells and axon-reactive antibodies in MS lesions. *J Neuroimmunol.* 2005;167:120–30.

Ziemssen T, Akgün K, Brück W. Molecular biomarkers in multiple sclerosis. *J Neuroinflammation.* 2019;16:1–11.

Zipoli V, Hakiki B, Portaccio E, Lolli F, Siracusa G, Giannini M, Pantoni L, Pescini F, Sorbi S, Amato MP. The contribution of cerebrospinal fluid oligoclonal bands to the early diagnosis of multiple sclerosis. *Mult Scler.* 2009;15:472–8.

Zou KH, O'Malley AJ, Mauri L. Receiver-operating characteristic analysis for evaluating diagnostic tests and predictive models. *Circulation*. 2007;115:654–7.