



Universitat Autònoma de Barcelona

**Departamento de Biología Celular, Fisiología e Inmunología  
Programa de Doctorado de Inmunología  
Servicio de Neuroinmunología Clínica  
2014**

**Búsqueda de Biomarcadores  
asociados a la conversión a  
esclerosis múltiple en pacientes con  
síndromes clínicos aislados**

Director de la Tesis:

**Dr. Manuel Comabella López**

Director de la Tesis:

**Dr. Xavier Montalban Gairín**

Autora de la Tesis:

**Ester Cantó Puig**

Tutora de la Tesis:

**Dra. Dolores Jaraquemada Pérez  
de Guzmán**



*All of old. Nothing else ever. Ever tried. Ever failed. No matter. Try again. Fail again.  
Fail better.*

**Samuel Beckett, Worstward Ho (1983)**



# PRESENTACIÓN



El trabajo presentado en esta tesis doctoral se ha realizado en el laboratorio de Neuroinmunología del Centre d'Esclerosi Múltiple de Catalunya (Cemcat) situado en el Vall d'Hebron Institut de Recerca (VHIR), Hospital Universitari Vall d'Hebron. Esta tesis doctoral ha sido co-dirigida por el Dr. Manuel Comabella, responsable del laboratorio, y el Prof. Xavier Montalban, director del Cemcat.

El Cemcat se dedica a la asistencia clínica, la rehabilitación física y cognitiva y a la investigación clínico-básica en esclerosis múltiple (EM). Cuenta con un equipo multidisciplinar experimentado, formado por clínicos (neurólogos, neuropsicólogos, enfermeras, fisioterapeutas, logopeda, terapeuta ocupacional y arte-terapeuta además de monitores de deporte adaptado), investigadores básicos (neurólogos, biólogos, biotecnólogos, veterinario, bioquímico y farmacéutico), personal de soporte técnico (técnicos de laboratorio), de gestión de la asistencia y la investigación y, finalmente, de docencia (economista, contable y administrativos). De esta forma el Cemcat desarrolla una atención integral del paciente, lleva a cabo un control diario de la calidad asistencial mediante sesiones clínicas y realiza una investigación clínica y básica de gran calidad, además de impartir formación y docencia a nivel nacional e internacional lo que hace que sea el mayor centro de referencia de EM a nivel nacional y que esté entre los más destacados del panorama internacional. La investigación del grupo se puede dividir en investigación clínica e investigación básica y tiene como objetivo principal alcanzar el máximo nivel de calidad de vida, relacionado con la salud, del paciente con EM a través de profundizar en el conocimiento de los mecanismos patogénicos de la enfermedad así como en el desarrollo de nuevos abordajes terapéuticos, por lo que podemos considerar que la investigación del Cemcat tiene un marcado carácter translacional.

Este proyecto de investigación se engloba dentro de la línea de investigación "*Validación de marcadores biológicos asociados con la conversión a esclerosis múltiple en pacientes que presentan síndromes clínicos aislados*". Aproximadamente el 85% de los pacientes con EM inician la enfermedad con un síndrome clínico aislado (CIS), pero se ha descrito que entre un 30% y un 85% de éstos finalmente desarrollan EM clínicamente definida (EMCD). Actualmente se utilizan la presencia de alteraciones en la resonancia magnética (RM) y la detección de bandas oligoclonales en el líquido cefalorraquídeo (LCR) como marcadores pronósticos en los pacientes con CIS. A parte de estos factores, la evidencia sobre el posible papel de otros biomarcadores

## PRESENTACIÓN

moleculares ha sido controvertida por falta de validación de los resultados. Con este objetivo llevamos a cabo la presente tesis doctoral.

En primer lugar se llevó a cabo, mediante un abordaje de proteómica en *pooles* de líquido cefalorraquídeo (LCR) de pacientes con CIS que convertían a EMCD y pacientes que permanecían como CIS, la búsqueda de proteínas asociadas a la conversión a EM. En este estudio se encontraron niveles aumentados de ceruloplasmina, vitamin D binding protein, apolipoproteína AI, chitinase 3-like 1 (CHI3L1), plasminógeno, vitronectina y apolipoproteína AIV, y niveles disminuidos de semaforina 7A (sema 7A) y ala-beta-his-dipeptidasa (CNDP1) en el LCR de los pacientes con CIS que convertían a EMCD.

En segundo lugar se procedió a la validación de las proteínas que se encontraron expresadas de forma diferencial en muestras individuales mediante técnicas alternativas como el ELISA y el *selected reaction monitoring* (SRM). Únicamente se validaron como biomarcadores asociados a la conversión a EM la CHI3L1, sema 7A y CNDP1.

De las proteínas validadas se seleccionó la CHI3L1 para su validación en una cohorte numerosa de pacientes independiente. Además, se determinó su expresión en plasma en las diferentes formas clínicas de la enfermedad y se estudió la asociación entre un polimorfismo en el promotor del gen de la CHI3L1 y la EM. Por otro lado, se estudió la expresión de la CHI3L1 en tejido cerebral de pacientes con EM así como en las poblaciones celulares del LCR.

Finalmente, se realizó el modelo animal de la enfermedad, la encefalomiелitis autoinmune experimental (EAE) en ratones *knockout* (KO) y *wild-type* (WT) para la CHI3L1 y se realizaron estudios histopatológicos y ensayos de proliferación para determinar la función de la proteína en la respuesta inmune.

Los resultados presentados en esta tesis han dado lugar a cinco artículos. Tres de ellos aceptados en revistas internacionales, y dos en revisión y en preparación.

Cantó E, Tintoré M, Villar LM, Borrás E, Álvarez-Cermeño JC, Chiva C, Sabidó E, Rovira A, Montalban X, Comabella M. *Validation of semaphorin 7A and ala-beta-his-dipeptidase as biomarkers associated with the conversion from clinically isolated syndrome to multiple sclerosis.* Journal of Neuroinflammation (*en prensa*).



Cantó E, Reverter F, Morcillo-Suárez C, Matesanz F, Fernández O, Izquierdo G, Vandebroek K, Rodríguez-Antigüedad A, Urcelay E, Arroyo R, Otaegui D, Olascoaga J, Saiz A, Navarro A, Sanchez A, Domínguez C, Caminero A, Horga A, Tintoré M, Montalban X, Comabella M. *Chitinase 3-like 1 plasma levels are increased in patients with progressive forms of multiple sclerosis*. **Mult Scler**. 2012; 18(7)983-90.

Comabella M, Fernández M, Martín R, Rivera-Vallvé S, Borrás E, Chiva C, Julià E, Rovira A, Cantó E, Alvarez-Cermeño JC, Villar LM, Tintoré M, Montalban X. *Cerebrospinal fluid chitinase 3-like 1 levels are associated with conversion to multiple sclerosis*. **Brain**. 2010; 133 (Pt 4):1082-93.

*Este proyecto ha sido financiado por el Fondo de Investigación Sanitaria del Instituto de Salud Carlos III, Ministerio de Economía y Competitividad (PI09/00788). Ester Cantó Puig ha sido financiada por el programa PFIS del Fondo de Investigación Sanitaria del Instituto Carlos III, Ministerio de Economía y Competitividad (FI09/00705). El resto de la financiación ha provenido de fondos propios del Cemcat.*



CARLOS <sup>Carmen</sup> Jordi <sup>Mireia</sup> MONENSINA <sup>MARCEL</sup> Sergio  
<sup>MariaRosa</sup> Joseph <sup>ZOHAI</sup> Carmen <sup>Joaquín</sup> Miquel <sup>MARGA</sup>  
Elisenda <sup>Manolo</sup> CARMETIX <sup>Dunia</sup> Marc  
<sup>Angels</sup> ANDREA <sup>Clara</sup> Carmetix <sup>ANDREA</sup>  
Joana <sup>AGNES</sup> <sup>LAURA</sup> Blanca <sup>MariaRosa</sup> Pare <sup>CLARA</sup>  
Tam <sup>Anna</sup> NEUS <sup>Montse</sup> Angels <sup>Francesc</sup> Joel  
Xavi <sup>Anka</sup> Ingrid <sup>P.</sup> Pare <sup>Joel</sup>  
Monensina <sup>Angelina</sup> <sup>Ritxi</sup> Iliaria <sup>Rath</sup>  
<sup>Marc</sup> Marivi <sup>Rosa</sup> <sup>Ricard</sup> Lidia <sup>Malte</sup> Xavi <sup>Mara</sup>  
<sup>SILVIA</sup> <sup>JOEL</sup> MILA <sup>DANI</sup> Dalia <sup>ELI</sup> ELI <sup>Elisabet</sup>  
<sup>Vàxier</sup> <sup>Georgi</sup> <sup>Mar</sup> Xavi <sup>Pare</sup> <sup>Iliaria</sup> <sup>Sara</sup> Yoli <sup>Tikis</sup> <sup>ANICA</sup> <sup>JULIA</sup> <sup>Jordi</sup> <sup>YOLI</sup> <sup>Toni</sup> <sup>Miki</sup> <sup>MARE</sup> <sup>ELIDIA</sup> <sup>ROSA</sup>  
Nuria <sup>MARINA</sup> <sup>Rosalia</sup> <sup>JUAN</sup> <sup>DALIA</sup> <sup>SARA</sup>  
<sup>Ayesha</sup> <sup>Rosereta</sup> <sup>JOANA</sup> Lauti <sup>KIS</sup> <sup>Ritxi</sup> <sup>Javi</sup> <sup>LAIA</sup> YOLI <sup>Clara</sup> <sup>Santi</sup> <sup>GEORGI</sup> <sup>NICO</sup> <sup>Lau</sup> <sup>Tam</sup>  
<sup>Javi</sup> <sup>ELI</sup> Manolo <sup>Mila</sup> <sup>AGNES</sup> <sup>Francisco</sup> <sup>JOSE</sup>  
<sup>Elisenda</sup> Nico <sup>AMPARO</sup> <sup>Carlos</sup> Elisabet <sup>Jenn</sup>  
<sup>ISABEL</sup> <sup>Jaume</sup> <sup>JOSE</sup> <sup>JUAN</sup> <sup>Jenn</sup> <sup>Francisco</sup> <sup>Lourdes</sup> <sup>NEUS</sup> <sup>Dunia</sup>  
<sup>Marçal</sup> <sup>Angels</sup> <sup>Laia</sup> <sup>Georgi</sup>  
<sup>Miquel</sup> <sup>SANTI</sup> <sup>MARINA</sup> <sup>CARMEN</sup> <sup>NURIA</sup> <sup>Ingrid</sup> <sup>Mara</sup> <sup>Tikis</sup> <sup>Sergio</sup>  
<sup>Rami</sup> <sup>Maite</sup> <sup>CISCU</sup> <sup>Rosalia</sup>  
<sup>Yuki</sup> <sup>CARME</sup> <sup>ABEL</sup> <sup>Miquel</sup> <sup>TAQUEL</sup> <sup>NURIA</sup> <sup>MARCEL</sup>  
AGRAÏMENTS



Per començar vull agrair a tot el Cemcat la possibilitat que m'ha ofert per a fer la tesi, i en especial a en Xavier Montalban pel seu suport i entusiasme.

A l'Eva pels moments crítics compartits a l'arxiu, a la Georgina amb el METOMS: *¡¡Qué jaleo con la base de datos!!*, a la Ilaria que sempre m'ha ajudat a trobar el costat positiu de les coses, a la Joana per la seva habilitat en resoldre els problemes amb les beques: *sento tots els cops que m'he oblidat d'adjuntar-te la comanda!*, a la Mar i en Jaume, que fan sempre la sessió de dilluns més amena, a la Marta, la Sílvia, el Filipe i en Carlos per les estones de son superades a les classes d'anglès. I a tota la resta, no vull fer una llista perquè segur que m'acabo oblidant algú! Cadascun de vosaltres ha contribuït a la seva manera durant aquests anys, gràcies!

I molt especialment a la gent del lab, al Manuel Comabella, que m'ha guiat durant tota aquesta etapa i m'ha transmès la passió per la recerca: *Manolo, estoy convencida de que en algún momento conseguirás ese Nature*; a l'Ana (i els seus somnis) amb qui he compartit llargues tardes i m'ha ajudat en hores baixes, amb el seu humor i carinyo; a la Carme, pels cafès de bon matí, les xerrades on arreglàvem el món i els sempre bons consells sobre la vida; a la Carmen: *gracias por la dedicación i el soporte que siempre me has dado y por ayudarme a descubrir poco a poco el camino de la investigación (y de los nuevos sabores a combinar con el chocolate!)*; a l'Herena, que m'ha ajudat moltíssim amb la "citometria infernal"; a la Marta, que a part dels bons consells científics em va tornar al món de la música sense la qual ara no puc viure: *siempre te agradeceré ese día que me propusiste ir a "probar" el Trobada...* ; a la Mireia, que sempre ha estat disposada a donar-me un cop de mà (tot i que sempre recordaré el dia que vas "decidir" provar noves dosis d'anestèsic amb els meus ratolins...); a en Nico, que fins i tot a les hores baixes m'ha fet riure a la màquina del cafè; al Sunny, per la seva filosofia de vida de la que hauria d'intentar aprendre; a la Zoraida, que sempre té una estona per escoltar-me, a la Lau, per les converses sobre la vida, les cerveses, els mojitos de plàtan i els karaokes!; a la Laura, la Maite i la Clara, que ens han portat una nova dosi d'alegria i també als que han passat pel lab i ja no hi son: la Jenn, amb qui he compartit moments de "pena i glòria"; en Luis, que m'ha ajudat sempre a relativitzar les coses i la Monensina: *el teu optimisme i la teva manera de veure el món m'han fet millorar com a persona*. A tots vosaltres, gràcies!

També a la Sílvia: *quines baralles pel citòmetre, quantes decepcions (però també alegries!)... però què faríem sense aquests moments?* I al Sergio, que ha tingut una paciència infinita per aguantar les meves obsessions.

## AGRAÏMENTS

A la May i al Jose Carlos que em van acollir a Madrid i amb qui vaig aprendre molt.

A la Dàlia i la Marina, amb qui he superat crisis existencials entre birretes, i mica en mica hem anat fent el camí... per fi, ja em toca a mi!

A la Sara, la Lídia, la Laia i la Tam, per estar sempre allà i compartir moments importants.

A la gent del cor Trobada i de Voxalba, que m'han fet sentir la música com mai i on he crescut com a persona durant aquests anys.

A les meves "capsuletes", pels viatges, els sopars i les bones estones. Sou genials!

A la Yoli per la seva paciència infinita, i per saber trobar sempre la manera de donar-me ànims.

A l'Alba G, Alba O i la Vanesa pels moments compartits; i a la MJ: em vas acollir des del primer moment (ja saps que mai oblidaré el meu primer dia a la unitat...), i m'has seguit donant suport i "suportant" fins al final. Has estat una persona molt important durant tots aquests anys, gràcies!

I a la meva família, l'Àngels, en Ciscu, la Georgi i en Ritxi, i la Rosetera, i molt especialment als meus pares i a ma germana, que sempre han cregut en mi i m'han animat a seguir endavant; sense ells segurament no ho hagués aconseguit... Gràcies!

# ÍNDICE





ABREVIATURAS .....	21
1. INTRODUCCIÓN.....	25
La esclerosis múltiple .....	27
Etiología de la EM .....	27
Anatomía patológica .....	28
Patogenia de la EM .....	30
Células implicadas.....	30
Mecanismos patogénicos .....	33
Modelo animal: encefalomiелitis autoinmune experimental.....	37
Inducción de la enfermedad.....	37
Susceptibilidad.....	37
Antígenos.....	38
Curso clínico .....	38
Aplicaciones del modelo animal .....	38
Limitaciones del modelo .....	39
Formas clínicas de EM.....	40
Diagnóstico de la EM.....	42
Tratamientos.....	43
Biomarcadores en la EM .....	46
Fuentes biológicas de biomarcadores.....	46
Tipos de biomarcadores.....	48
Biomarcadores en pacientes con CIS .....	49
2. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS.....	53
3. MATERIAL Y MÉTODOS .....	42
3.1 Objetivos 1 y 2. Identificación de proteínas diferencialmente expresadas entre pacientes con CIS que convierten a EM y pacientes que no convierten: fase de screening y validación de proteínas identificadas .....	59
3.1.1 Determinaciones.....	59
3.1.2 Muestras.....	61
3.1.3 Pacientes .....	62
3.1.4 Determinaciones clínicas y radiológicas.....	69
3.1.5 Análisis estadístico.....	69
3.2 Objetivo 3. Validación de la CHI3L1 a gran escala.....	71
3.2.1 Determinaciones.....	71
3.2.2 Muestras.....	71

## INDICE

3.2.3 Pacientes .....	71
3.2.4 Determinaciones clínicas y radiológicas.....	73
3.2.6 Análisis estadístico.....	73
3.3 Objetivo 4A. Estudio de la CHI3L1 en la EM.....	75
3.3.1 Determinaciones.....	75
3.3.2 Muestras.....	77
3.3.3 Pacientes .....	78
3.3.4 Análisis estadístico.....	79
3.4 Objetivo 4B. Estudio de la función de la CHI3L1 en el modelo animal de EM ....	81
3.4.1 Animales.....	81
3.4.2 Muestras.....	82
3.4.3 Determinaciones.....	82
3.4.4 Análisis estadístico.....	86
4. RESULTADOS.....	87
Resultados relacionados con el objetivo 1: Identificación de biomarcadores pronósticos asociados con la conversión a EM y desarrollo de discapacidad en pacientes con CIS mediante un abordaje proteómico en muestras de líquido cefalorraquídeo .....	89
4.1.1 Estudio de proteómica: fase de <i>screening</i> .....	91
Resultados relacionados con el objetivo 2: Validación inicial de los principales biomarcadores pronósticos derivados del estudio proteómico en cohortes adicionales de pacientes con CIS mediante técnicas alternativas de detección .....	93
4.1.2 Validación de proteínas diferencialmente expresadas mediante técnicas alternativas .....	95
4.1.3 Asociación de los niveles de CHI3L1 con el tiempo de conversión .....	98
4.1.4 Correlación entre los niveles de CHI3L1 y semaforina 7A y los parámetros clínicos y radiológicos.....	98
4.1.5 Correlación entre los niveles de semaforina 7A y parámetros del LCR.....	100
4.1.6 Validación de la CHI3L1, semaforina 7A y CNDP1 como biomarcadores de conversión a EM en cohortes independientes de pacientes con CIS .....	100
Resultados relacionados con el objetivo 3: Validación de la CHI3L1 a gran escala	103
4.2.1 Correlación de los niveles de CHI3L1 en LCR y la edad .....	105
4.2.2 Niveles de CHI3L1 en LCR de pacientes con CIS.....	106
4.2.3 Estudio de los niveles de CHI3L1 en el LCR como biomarcador pronóstico para la conversión a EM y el desarrollo de discapacidad .....	107

4.2.4 Estudio de la asociación entre los niveles de CHI3L1 y el tiempo de conversión y desarrollo de discapacidad.....	110
4.2.5 Estudio de la asociación entre los niveles de CHI3L1 en LCR y los parámetros radiológicos a tiempo basal .....	110
4.2.6 Origen de la CHI3L1 en LCR .....	114
Resultados relacionados con el objetivo 4A: Estudio de la CHI3L1 en la EM .....	117
4.3.1 Niveles plasmáticos de CHI3L1 en pacientes con EM.....	119
4.3.2 Estudio de asociación del polimorfismo rs4950928 con la EM.....	121
4.3.3 Expresión de CHI3L1 en tejido cerebral .....	123
4.3.4 Estudio de la expresión de CHI3L1 en células del LCR.....	124
Resultados relacionados con el objetivo 4B: Estudio de la función de la CHI3L1 en el modelo animal de EM.....	129
4.4.1 Genotipado de los ratones.....	131
4.4.2 Regulación de la Brp-39 durante la EAE.....	131
4.4.3 Influencia del gen Brp-39 en el curso clínico de la EAE.....	132
4.4.4 Estudio histopatológico .....	133
4.4.5 Efecto del gen Brp-39 en la respuesta inmune.....	134
5. DISCUSIÓN .....	137
6. CONCLUSIONES .....	153
7. COMENTARIOS FINALES .....	157
8. BIBLIOGRAFÍA .....	161
9. ANEXOS .....	173
Tablas y figuras.....	175
Protocolos.....	183
Extracción de ADN .....	185
Extracción de ARN de tejido.....	187
Paraformaldehído 4%.....	188
Tinción de Hematoxilina-Eosina.....	189
Luxol fast blue – Klüver Barrera .....	190
Tinciones dobles por inmunohistoquímica.....	192
Publicaciones .....	195



# ABREVIATURAS



2D-DIGE	Electroforesis bidimensional diferencial
ADN	Ácido desoxirribonucleico
AG	Acetato de glatirámero
AMCase	<i>Acidic mammalian chitinase</i>
APC	Célula presentadora de antígeno
apo	Apolipoproteína
AQP-4	Aquaporina-4
ARN	Ácido ribonucleico
bFGF	Factor básico de crecimiento de fibroblastos
BHE	Barrera hematoencefálica
BOC	Bandas oligoclonales
BPF	Fracción de parénquima cerebral
Brp-39	<i>Breast regression protein 39</i>
BSA	Albúmina sérica bovina
CAM	Molécula de adhesión celular
cDNA	DNA copia
CHI3L1 / YKL-40	<i>Chitinase 3-like 1</i>
CIS	Síndrome clínico aislado
CIS→CIS	Pacientes con CIS no conversores
CIS→EMCD	Pacientes con CIS conversores
CNDP1	Ala-beta-his-dipeptidasa
cpm	Cuentas por minuto
CS	Control sano
Ct	Ciclo umbral ( <i>threshold cycle</i> )
CV	Coefficiente de variación
DC	Células dendríticas
DHODH	Dihidrorotato deshidrogenasa
DIS	Diseminación en el espacio
DIT	Diseminación en el tiempo
DMF	Dimetil fumarato
EAE	Encefalomiелitis autoinmune experimental
EDSS	Escala expandida del estado de discapacidad
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético
ELISA	<i>Enzyme-linked immunosorbent assay</i>
EM	Esclerosis múltiple
EMCD	Esclerosis múltiple clínicamente definida
EMPP	Esclerosis múltiple primariamente progresiva
EMPR	Esclerosis múltiple progresiva recurrente
EMRR	Esclerosis múltiple remitente recurrente
EMSP	Esclerosis múltiple secundariamente progresiva
FBS	Suero fetal bovino
Gd	Gadolinio
GDNF	Factor neurotrófico derivado de la glía
GFAP	Proteína ácida fibrilar glial
HE	Hematoxilina eosina

## ABREVIATURAS

HLA	<i>Human leukocyte antigen</i>
HR	<i>Hazard ratio</i>
IFN	Interferón
Ig	Inmunoglobulina
IL	Interleuquina
iTRAQ	<i>Isobaric tag for relative and absolute quantitation labelling</i>
KB	Kluver barrera
KO	<i>Knock-out</i>
LCR	Líquido cefalorraquídeo
LPS	Lipopolisacárido
MBP	Proteína básica de la mielina
MHC	Complejo mayor de histocompatibilidad
MOG	Proteína mielínica de los oligodendrocitos
NK	Células <i>natural killer</i>
NKT	Células T <i>natural killer</i>
OEN	Otras enfermedades neurológicas
OENI	Otras enfermedades neurológicas inflamatorias
OENNI	Otras enfermedades neurológicas no inflamatorias
p.i.	Post inmunización
pb	Pares de bases
PBS	Tampón fosfato salino
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
PHA	Fitohemaglutinina
PLP	Proteína proteolípídica
Q-alb	Cociente de albúmina
RM	Resonancia magnética
ROS	Especies reactivas de oxígeno
rpm	Revoluciones por minuto
RT-PCR	PCR a tiempo real
S1P	Esfingosina 1-fosfato
sema7A	Semaforina 7A
SF	Suero fisiológico
SNC	Sistema nervioso central
SNP	Polimorfismo de un sólo nucleótido
SRM	<i>Selected reaction monitoring</i>
tampón TBE	Tampón tris-borato-EDTA
Tampón TE	Tampón Tris EDTA
TCR	Receptor de células T
TGF	Factor de crecimiento transformante
Th	Célula T colaboradora ( <i>helper</i> )
TJ	Uniones estrechas ( <i>tight junctions</i> )
TNF	Factor de necrosis tumoral
Treg	Célula T reguladora
vitamin D BP	<i>Vitamin D binding protein</i>
VLA-4	<i>Very late antigen-4</i>
WT	<i>Wild type</i>





# 1. INTRODUCCIÓN



## ***La esclerosis múltiple***

La esclerosis múltiple (EM) es una enfermedad crónica inflamatoria del sistema nervioso central (SNC) y una de las causas más frecuentes de discapacidad neurológica en adultos jóvenes, con una mayor prevalencia en las mujeres, siendo la razón mujer:hombre de 2-3:1 <sup>1</sup>. La EM es una enfermedad extendida mundialmente, con una prevalencia que varía en función de la región. La prevalencia en España es de entre 75 y 91 casos por cada 100.000 habitantes <sup>2-4</sup>.

## ***Etiología de la EM***

La etiología de la EM permanece desconocida, aunque se sabe que tanto factores genéticos como ambientales juegan un papel en el desarrollo de la enfermedad <sup>5</sup>. La importancia de los factores genéticos en la susceptibilidad de la EM se observó inicialmente en estudios epidemiológicos <sup>6</sup>. Estudios clásicos en gemelos homocigotos o idénticos que comparten el 100% de los genes muestran que el riesgo de recurrencia (probabilidad de que de que otro familiar desarrolle EM si hay un miembro afectado) es del 25%, mientras que en gemelos dizigotos que comparten el 50% de los genes el riesgo de recurrencia es del 5%. A partir de aquí, el riesgo de recurrencia va disminuyendo del 5% al 0,5% según se trate de familiares de 1º, 2º o 3º grado <sup>7, 8</sup>. Numerosos estudios genéticos han encontrado más de 100 variantes genéticas asociadas con la EM <sup>9, 10</sup>, la mayoría relacionadas con genes del sistema inmunitario. Sin embargo, es importante destacar, que la principal contribución en el riesgo genético de la enfermedad corresponde al *Human Leukocyte Antigen* (HLA) de clase II, en particular el alelo con el HLADR-B1\*15:01, que es claramente más prevalente en pacientes con EM <sup>10</sup>.

En cuanto a los factores ambientales, se han estudiado en particular agentes infecciosos que pueden estar ligados a la EM. Varias infecciones como el sarampión la varicela y la hepatitis B entre otras se habían relacionado con el desarrollo de la enfermedad, pero el agente infeccioso de mayor peso hoy día como factor ambiental es el virus de Epstein Barr <sup>11, 12</sup>. Numerosos estudios han demostrado la existencia de un gradiente de la latitud relacionado con la prevalencia de la EM, hecho que puede estar relacionado con la población o con factores ambientales. Otro de los factores ambientales de mayor peso en la EM como agente etiológico es la vitamina D. La vitamina D es sintetizada por la piel cuando ésta se expone a la luz solar, y la baja

## INTRODUCCIÓN

exposición a la luz ultravioleta se ha asociado a EM <sup>13-15</sup>. Relacionado con esto, los niveles bajos de vitamina D se han asociado a un mayor riesgo de EM <sup>16</sup>. Finalmente, estudios recientes han demostrado una asociación entre el tabaquismo y un aumento en el riesgo de EM <sup>17, 18</sup>.

A modo de resumen, la EM se considera una enfermedad compleja, en la que un componente genético poligénico interacciona con factores ambientales para dar lugar al fenotipo de la enfermedad.

### ***Anatomía patológica***

Los principales hallazgos patológicos en el SNC de pacientes con EM son inflamación, desmielinización, gliosis reactiva, y pérdida axonal (Figura 1).

#### *Inflamación*

La inflamación está presente en todas las etapas de la EM. En los sitios de desmielinización activa, se encuentran infiltrados celulares compuestos básicamente por linfocitos B, macrófagos y linfocitos T CD4 y T CD8 activados <sup>19</sup> productores de citoquinas proinflamatorias.

#### *Desmielinización*

La desmielinización es el daño y pérdida de las vainas de mielina que recubren los axones de las neuronas debida principalmente al proceso inflamatorio. En la EM es típica la presencia de lesiones o placas de desmielinización principalmente localizadas en la sustancia blanca del SNC <sup>20</sup>, normalmente en la sustancia blanca subcortical o periventricular, en los nervios ópticos, en el tronco cerebral o en la médula espinal <sup>21</sup>, aunque también pueden aparecer en la sustancia gris <sup>22</sup>. Esta desmielinización dificulta la conducción de las señales nerviosas a través de los axones dañados, y es el proceso responsable de la pérdida funcional transitoria característica observada en los pacientes con EM remitente recurrente (EMRR) <sup>23, 24</sup>.

Las lesiones de EM se pueden clasificar en activas, crónicas activas o crónicas inactivas, en función de sus características histológicas. Una lesión se clasifica como activa cuando tiene un margen definido, hipercelularidad, infiltración perivascular intensa, desmielinización, presencia de macrófagos cargados de mielina, edema parenquimal, astrocitos hipertróficos y poca o ninguna formación de cicatriz glial <sup>5</sup>. Las placas de desmielinización crónicas se caracterizan por hipocelularidad, con pérdida de

mielina y formación de cicatriz glial <sup>25</sup>. Las lesiones crónicas se pueden dividir en crónicas activas o crónicas inactivas. Las lesiones crónicas activas presentan un borde hipercelular en el lugar de desmielinización, mientras que el centro de la lesión es hipocelular y contiene los axones "desnudos", astrocitos fibrilares y macrófagos cargados de lípidos <sup>5, 25</sup>. Por otro lado, las lesiones crónicas inactivas están desprovistas de inflamación y se caracterizan por la pérdida completa de oligodendrocitos y la formación de la cicatriz glial.

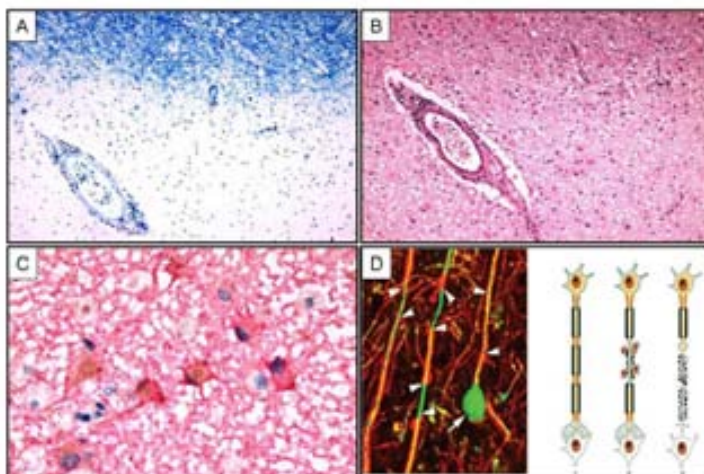
### *Glios*

La gliosis es un proceso de respuesta de las células gliales (astrocitos, oligodendrocitos y microglía) frente al daño en el SNC; normalmente en este proceso se produce la proliferación, cambios morfológicos (hipertrofia) y adaptación funcional de los diferentes tipos de células gliales, y en la EM es típica la presencia de astrocitos reactivos rodeando las lesiones demielinizadas. No es un proceso específico de la EM, pero en esta enfermedad la astrogliosis es mucho más intensa que en otras enfermedades del SNC.

### *Daño axonal*

El daño axonal se define como los cambios patológicos en la citoarquitectura de un axón que se producen antes de la muerte de éste <sup>26</sup>, y está relacionado con la progresión de la discapacidad en los pacientes con EM <sup>27</sup>.

Es un proceso temprano en el desarrollo de la EM y, aunque se observa principalmente en los axones desmielinizados localizados en las lesiones, es parcialmente independiente de la desmielinización <sup>28</sup>. Aunque el daño axonal aparece al inicio de la enfermedad, permanece de forma subclínica durante la fase remitente recurrente seguramente debido a que el SNC es capaz de compensar la pérdida neuronal a través de diversos mecanismos.



**Figura 1. Principales hallazgos patológicos en la EM.** (a) desmielinización, (b) inflamación, (c) gliosis y (d) daño axonal. Adaptado de Trapp y col. <sup>29</sup>.

### ***Patogenia de la EM***

#### **Células implicadas**

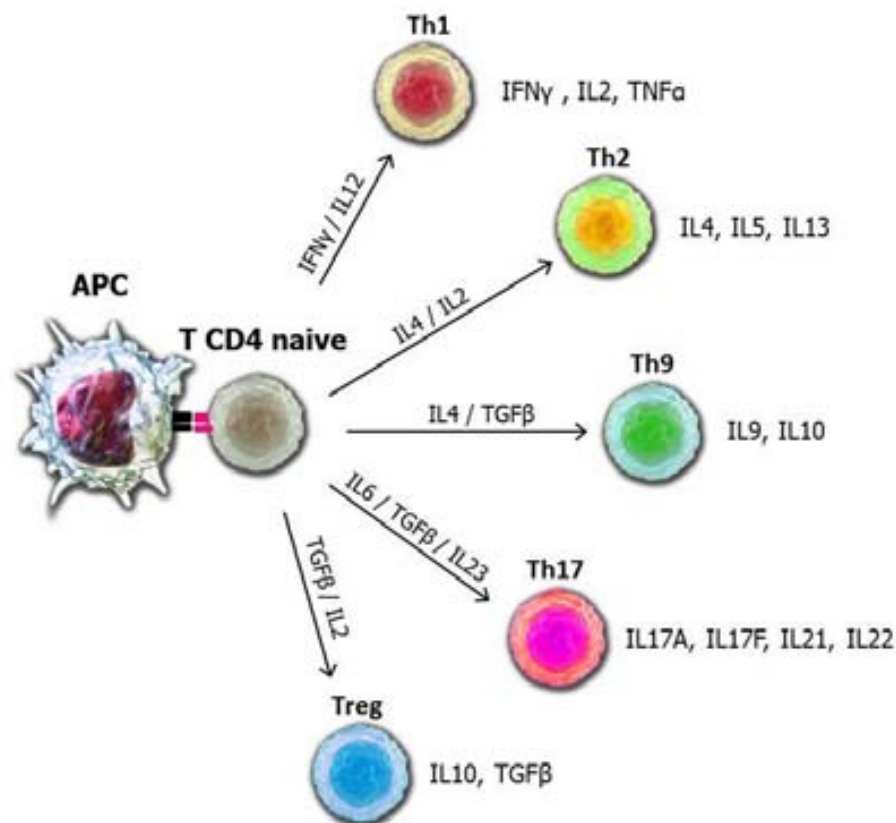
##### *Inmunidad celular o adaptativa*

En la EM, la inmunidad adaptativa juega un papel importante en la patogenia de la enfermedad. Esto se ha observado tanto en estudios histológicos, inmunológicos como moleculares.

##### ***Células T CD4+***

Se conoce desde hace tiempo que la EM es una enfermedad autoinmune mediada por células T, y concretamente las células T helper (Th) CD4+ se han considerado como las más implicadas y las "iniciadoras" de la enfermedad. Esta hipótesis se basa en el hecho de que los factores genéticos asociados a la EM residen en la región del MHC de clase II, que juega un papel importante en el desarrollo de la tolerancia central de las células T<sup>30, 31</sup>, y estudios en el modelo animal de la enfermedad, la encefalomiелitis autoinmune experimental (EAE), mostraron que animales *naive* a los que se les transferían células Th específicas contra la proteína mielínica de los oligodendrocitos (MOG) desarrollaban la enfermedad<sup>32, 33</sup>. Cuando las células T CD4+ *naive* reconocen un antígeno presentado en el contexto del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC) de clase II por las células presentadoras de antígeno, experimentan un proceso de proliferación y diferenciación a las distintas subpoblaciones de células Th. Existen diferentes subpoblaciones de células Th entre las que destacan las células Th1, Th2, Th9, Th17 y T reguladoras (Treg) con distintas funciones sobre la inmunidad y la inflamación, y la diferenciación de las células T CD4+ *naive* a una u otra subpoblación está determinada en gran medida por el ambiente de citoquinas creado por las células presentadoras de antígeno (APC) durante el proceso de diferenciación<sup>34</sup> (Figura 2). Las células Th1 producen citoquinas proinflamatorias como el interferón gamma (IFN- $\gamma$ ) que activa a los macrófagos encargados de la eliminación de patógenos intracelulares. Por otro lado, las células Th2 secretan citoquinas anti-inflamatorias como la interleuquina 4 (IL-4) y son importantes en la eliminación de patógenos extracelulares<sup>35</sup>. Las células Th17 producen entre otras citoquinas la IL-17, que inducen la secreción de factores granulopoiéticos y quimiocinas como el G-CSF, GM-CSF y diversas quimiocinas del tipo CXC<sup>36</sup>, que median la respuesta inmune frente a bacterias y hongos extracelulares a través del reclutamiento de neutrófilos a los sitios

de infección. Las células Th9 son una de las subpoblaciones de células T efectoras descritas más recientemente. Se ha observado su implicación en mecanismos de inflamación alérgica (reclutamiento de eosinófilos y mastocitos, inducción de quimiocinas, incremento de la producción de IgE), mecanismos de inflamación autoinmune (inflamación ocular, intestinal o del SNC, potencial regulador de células Treg), y mecanismos de inmunidad antitumoral (reclutamiento de células T CD8 y mastocitos, incremento en la capacidad de eliminar las células tumorales).



**Figura 2. Diferenciación de las células T *naive* a las distintas subpoblaciones de células T efectoras.** Tras activarse, las células T CD4+ *naive* se diferencian a distintas subpoblaciones de células T: Th1, Th2, Th9, Th17 y Treg bajo la influencia de citoquinas específicas. Estas células diferenciadas secretan citoquinas específicas que median sus funciones efectoras. Adaptado de *Comabella y col.*<sup>37</sup> y de *Broux y col.*<sup>38</sup>

Finalmente, las células Treg producen citoquinas antiinflamatorias como la IL-10 y su función es la de mantener la homeostasis inmune, prevenir la autoinmunidad y las respuestas alérgicas, así como controlar la magnitud de la respuesta inmune durante la respuesta inflamatoria. Un desequilibrio entre estas subpoblaciones de células T efectoras se ha relacionado con enfermedades autoinmunes, entre ellas la EM.

### ***Células T CD8+***

Además de las células T CD4+, otras células del sistema inmune se han visto implicadas en la patogenia de la EM. Se ha observado que las células T CD8+ juegan un papel importante en la EM, y de hecho estas células predominan sobre las células T CD4+ en las lesiones del SNC <sup>39, 40</sup>. Entre las funciones de estas células figuran la producción de citoquinas y quimiocinas, moléculas con efectos citolíticos como la perforina y la granzima para la lisis de las células diana a través del MHC de clase I. Existe una clara evidencia de una expansión clonal de células T CD8+ en los pacientes con EM <sup>41</sup> aunque los antígenos reconocidos por estas células se desconocen. Algunos antígenos candidatos son péptidos de la mielina y virus, entre otros. De hecho, la administración de células T CD8+ específicas contra la mielina en ratones, induce una EAE severa en estos animales <sup>42</sup>. En condiciones fisiológicas, prácticamente no se encuentran células T CD8+ en el SNC, y la expresión de moléculas de MHC de clase I únicamente se encuentran en células vasculares y meníngeas, pero en condiciones de inflamación, todas las células del SNC (astrocitos, oligodendrocitos y neuronas) incrementan la expresión de estas moléculas y pueden ser reconocidas y lisadas por las células T CD8+ citotóxicas <sup>43, 44</sup>.

Además, existen también distintas subpoblaciones de células T CD8+ reguladoras con capacidad supresora. En un estudio reciente, se observó que una subpoblación de células T CD8+ reguladora era capaz de eliminar células T CD4+ patogénicas, y que en los pacientes con EM esta subpoblación reguladora tendría la capacidad citolítica disminuida, favoreciendo la presencia de células T CD4+ autoreactivas <sup>45</sup>.

### ***Células B***

Las células B también juegan un papel importante en la EM, y entre sus funciones destacan la presentación de antígenos mediante el MHC de clase II, lo que produce la activación de las células T frente al antígeno, la producción de citoquinas pro-inflamatorias y anti-inflamatorias (células B reguladoras). Además, las células B se pueden diferenciar a células plasmáticas que tienen como función principal la secreción de anticuerpos, lo que da lugar a la presencia de bandas oligoclonales (BOC) de IgG en el LCR observadas en una gran proporción de pacientes con EM<sup>46</sup>. Aunque la presencia de las BOC es una de las características inmunológicas más comunes en los pacientes con EM, éstas no son específicas de esta enfermedad, y se desconocen sus reactividades antigénicas.



### *Inmunidad innata*

Aunque se cree que la EM es una enfermedad principalmente mediada por células T, estudios recientes sugieren que el sistema inmune innato también juega un papel tanto en el inicio como en la progresión de la enfermedad <sup>47</sup>.

### ***Células Dendríticas***

Las células dendríticas (DCs) son células presentadoras de antígeno que juegan un papel importante en la activación y diferenciación de las células T *naive* a las diferentes subpoblaciones de células T efectoras (Th1, Th2, Th9, Th17 o Treg) como se ha explicado anteriormente. En los pacientes con EM se ha observado que estas células presentan un fenotipo activado con un incremento de la expresión de citoquinas proinflamatorias, que se ha visto acompañado por una respuesta proinflamatoria de células T incrementada, definida por un aumento en la secreción de factor de necrosis tumoral alfa (TNF $\alpha$ ) e IFN- $\gamma$  <sup>48</sup>.

### ***Microglía y macrófagos***

La microglía constituye aproximadamente un 10-20% de las células gliales, y son las células inmunes más comunes en el SNC. Las células de la microglía se consideran macrófagos residentes en el SNC, y entre sus funciones destacan la fagocitosis, presentación antigénica y producción de citoquinas <sup>49</sup>. En las lesiones de pacientes con EM también se observa infiltración de monocitos <sup>50</sup> que después de migrar a través de la BHE se diferencian a macrófagos, y que juntamente con la microglía residente en el SNC están involucradas en la desmielinización y fagocitosis de la mielina <sup>51</sup>. Se ha visto que algunos de los macrófagos encontrados en las lesiones contienen mielina en su interior, aunque se desconoce si la fagocitosis de esta mielina resulta ser un proceso protector (fagocitosis de los restos de mielina) o bien patogénico (fagocitosis de la mielina intacta).

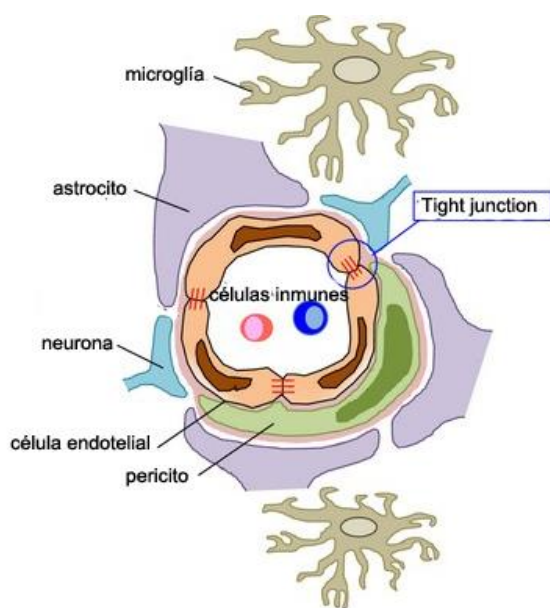
También se han relacionado con la EM otros tipos celulares como las células *natural killer* (NK), las células NKT, las células T $\gamma\delta$ , los mastocitos y los neutrófilos.

### **Mecanismos patogénicos**

La patogenia de la EM se desconoce, pero se considera una enfermedad autoinmune mediada por células T autoreactivas contra péptidos de la mielina que migran a través

## INTRODUCCIÓN

de la barrera hematoencefálica (BHE). La BHE en los vasos sanguíneos limita de forma muy estricta la entrada de sustancias tales como proteínas y células desde el torrente sanguíneo al SNC, manteniendo de esta forma la homeostasis para las neuronas y células gliales, además de proporcionar un ambiente *immunoprivilegiado* al SNC, hecho que no ocurre en la mayoría de órganos periféricos. La BHE está formada por células endoteliales sin fenestraciones cuyas membranas se unen mediante uniones estrechas o *tight junctions* (TJ), que son unas estructuras celulares formadas por proteínas (occludinas y claudinas) que impiden el libre flujo de sustancias entre células.



**Figura 3.** Neuroanatomía de la barrera hematoencefálica modificado de *Arima y col.*<sup>52</sup>.

En la BHE también colaboran los pericitos (que son células contráctiles que se sitúan alrededor de las células endoteliales), las células de la microglía, los macrófagos y los astrocitos (Figura 3)<sup>53, 54</sup>. En la EM se ha descrito una pérdida y/o redistribución de las *tight junctions*<sup>55, 56</sup> que tiene como resultado la disrupción de la BHE. Los astrocitos

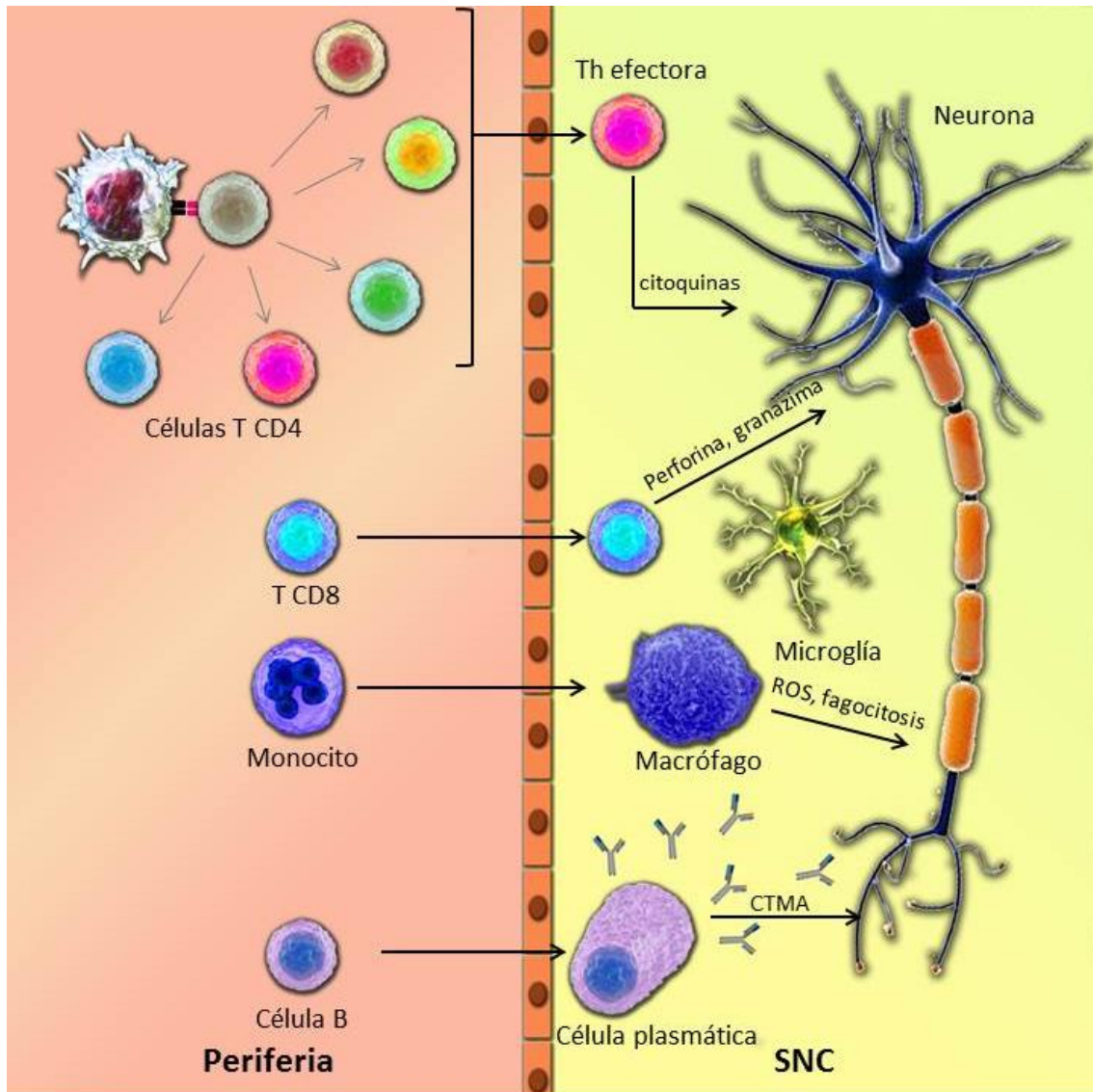
también ejercen un papel crítico en el mantenimiento de la BHE debido a su situación en la microvasculatura cerebral. Ayudan a mantener la integridad de la BHE y la quiescencia inmune a través de mecanismos dependientes de contacto así como mediante la secreción de factores solubles como el factor básico de crecimiento de fibroblastos (bFGF), el factor de crecimiento transformante beta (TGF- $\beta$ ), factor neurotrófico derivado de la glia (GDNF), angiotensinógeno, etc.<sup>53, 57, 58</sup>. Por otro lado, los astrocitos pueden secretar citoquinas proinflamatorias en condiciones neuropatológicas como la EM dando lugar a la activación de las células endoteliales, lo que conduce a la disrupción de la BHE<sup>53, 59</sup> y la migración de células inmunitarias. De hecho, se ha demostrado que citoquinas proinflamatorias como el TNF $\alpha$ , la IL1 $\beta$  y la IL17A<sup>60</sup> así como las metaloproteinasas de la matriz activadas<sup>56</sup> actúan sobre las TJ produciendo la permeabilización de la BHE y la consecuente entrada de células al SNC. Se sabe que en los tejidos linfoides secundarios las células T CD4+ *naive* se encuentran con las células presentadoras de antígeno (APC), que presentan un

antígeno (viral o de otro tipo) que tiene cierta similitud con algún autoantígeno del SNC, mecanismo que se conoce como *molecular mimicry*<sup>61</sup>. Este encuentro produce la activación de las células T y la consecuente proliferación y diferenciación a alguno de los subtipos de células T efectoras en función del ambiente de citoquinas creado por las células presentadoras de antígeno. Las células T efectoras (principalmente las células Th1 y Th17), una vez activadas, son capaces de producir citoquinas proinflamatorias como interleuquina 2 (IL-2), IFN- $\gamma$  y factor de necrosis tumoral (TNF) e inducen la producción de moléculas de adhesión como las selectinas o las integrinas  $\alpha$ -4 (como el  $\alpha$ L $\beta$ 2 (LFA-1) y el  $\alpha$ 4 $\beta$ 1 (VLA-4)) que mediante la interacción con las moléculas de adhesión celular (CAMs) expresadas en las células endoteliales (como el CAM-1 intracelular (ICAM-1) y el VCAM-1) facilitan la entrada de los leucocitos a través de la BHE (revisado por *Larochelle y col.*<sup>62</sup>).

Las células T activadas migran al SNC y una vez allí se encuentran con las células presentadoras de antígeno residentes en el SNC y son re-activadas, dando lugar a la producción de citoquinas proinflamatorias (como por ejemplo IFN- $\gamma$ , IL-17), que por sí solas pueden lesionar la mielina<sup>63</sup>. Por otro lado, estas citoquinas activan las células de la microglía, que a su vez producen otras citoquinas (IL-12, IL-23, osteopontina), especies reactivas de oxígeno (ROS) y productos intermedios del nitrógeno como el óxido nítrico<sup>64</sup> que contribuyen en el daño a las vainas de mielina dando lugar finalmente a alteraciones en la conducción eléctrica de los nervios. Además, las citoquinas producidas promueven la migración de otras células inmunes como las células B y los monocitos. Las células B, a diferencia de las células T, no son capaces de atravesar la BHE intacta, pero sí una vez que se ha iniciado el fenómeno inflamatorio<sup>63</sup>. Las células B activadas se pueden expandir clonalmente, y éstas pueden migrar hacia el parénquima cerebral y participar en el daño producido en el SNC mediante la producción de anticuerpos. Estos anticuerpos pueden causar desmielinización mediante la opsonización de la mielina por los fagocitos o bien vía activación del complemento. Además de la producción de anticuerpos, las células B tienen diversas funciones independientes de anticuerpos entre las cuales están la presentación antigénica, la activación de células T y la producción de citoquinas efectoras. Por otro lado, los monocitos que han migrado a través de la BHE se diferencian a macrófagos, que fagocitan la mielina que recubre los axones de las neuronas<sup>65</sup>. Finalmente, la activación de las células propias del SNC (astrocitos, oligodendrocitos y microglía) también puede dar lugar a la secreción de productos tóxicos. La consecuencia principal de toda esta cascada de procesos es la destrucción

## INTRODUCCIÓN

de la mielina, y aunque existen procesos de remielinización normalmente éstos nunca llegan a ser completos, lo que acaba dando lugar a la degeneración de los axones (Figura 4).



**Figura 4. Patogenia de la EM.** Las células inmunes activadas en la periferia atraviesan la barrera hematoencefálica previa unión a las células endoteliales a través de moléculas de adhesión entre las que destacan la integrina  $\alpha 4$ . Una vez en el SNC se reactivan y secretan citoquinas que dañan las neuronas. Una vez se ha producido la disrupción de la BHE el proceso inflamatorio promueve la entrada de otras células del sistema inmune. Las células B se diferencian a células plasmáticas que producen anticuerpos contra la mielina y además pueden interaccionar con el complemento y producir daño en los oligodendrocitos. La acumulación de todas estas células (linfocitos, microglía, macrófagos) acaban produciendo daños en la mielina, que resultan en la alteración de la conducción de los impulsos eléctricos a través de los axones. Adaptado de *Broux y col.*<sup>38</sup>

Dada la evidencia de que en la EM se genera una respuesta autoinmune frente a antígenos del SNC se han realizado estudios para determinar cuáles son estos autoantígenos. Los más estudiados son proteínas de la mielina, principalmente la

proteína básica de la mielina (MBP), la proteína mielínica de los oligodendrocitos (MOG) (revisado por *Reindl y col.* <sup>66</sup>) y la proteína proteolipídica (PLP). También se han descrito otros posibles autoantígenos no relacionados con la mielina como la neurofascina y la contactina-2 <sup>67</sup>, la proteína S100 <sup>68</sup>, la beta cristalina <sup>69</sup> y más recientemente el canal de potasio KIR4.1 <sup>70</sup>. De todas formas, aunque se han encontrado antígenos candidatos, ninguno de ellos se ha encontrado en todos los pacientes con EM, y no se ha demostrado que éstos sean la causa del desarrollo de la enfermedad.

### ***Modelo animal: encefalomiелitis autoinmune experimental***

Para estudiar las características patológicas de la EM, se utilizan básicamente tres modelos animales de la enfermedad: modelo inducido por tóxicos, modelos virales y finalmente modelos de encefalomiелitis autoinmune experimental (EAE). Este último ha sido el más estudiado, dada su mayor similitud con la EM tanto a nivel clínico, patogénico e histopatológico <sup>71</sup>.

### **Inducción de la enfermedad**

Para la inducción activa de la enfermedad, animales de cepas susceptibles son inmunizados tanto de forma activa o pasiva. En la inmunización activa, se realiza la administración de un péptido de la mielina (MOG, PLP, MBP) con adyuvantes que potencian la respuesta inmune (revisado por *Stromnes y col.* <sup>72</sup>). Esto provoca una respuesta básicamente de células T auto-reactivas contra la mielina, y la aparición de síntomas clínicos, que empiezan normalmente entre los días 9 y 14 post-inmunización. En la inmunización pasiva, se obtienen células T del bazo o de los nódulos linfáticos de ratones inmunizados contra péptidos del SNC. Estas células T encefalitogénicas se activan con citoquinas y en co-cultivo con células presentadoras de antígeno cargadas con péptidos de la mielina. Una vez activadas, estas células T se transfieren a otros ratones, lo que da lugar al desarrollo de la enfermedad <sup>73</sup>.

### **Susceptibilidad**

No todas las especies animales ni todas las cepas son susceptibles a la inducción de la EAE. Estas diferencias en la susceptibilidad suelen ser atribuidas a la dotación genética de la cepa, en el que ejercen una gran influencia los polimorfismos existentes en los antígenos del complejo de histocompatibilidad de clase I y del receptor de células T (TCR) <sup>33, 74, 75</sup>.

## INTRODUCCIÓN

### **Antígenos**

Los primeros modelos de EAE se indujeron mediante la inmunización con homogenados de SNC <sup>76</sup>. Con el avance en las técnicas de purificación de proteínas se empezaron a utilizar las proteínas o péptidos purificados, principalmente la MBP, la PLP y la MOG <sup>77</sup>, aunque también se ha descrito la inducción de la EAE con otras proteínas relacionadas con la mielina. El uso de péptidos para inducir la EAE ha permitido una mayor reproducibilidad de los distintos modelos de EAE.

### **Curso clínico**

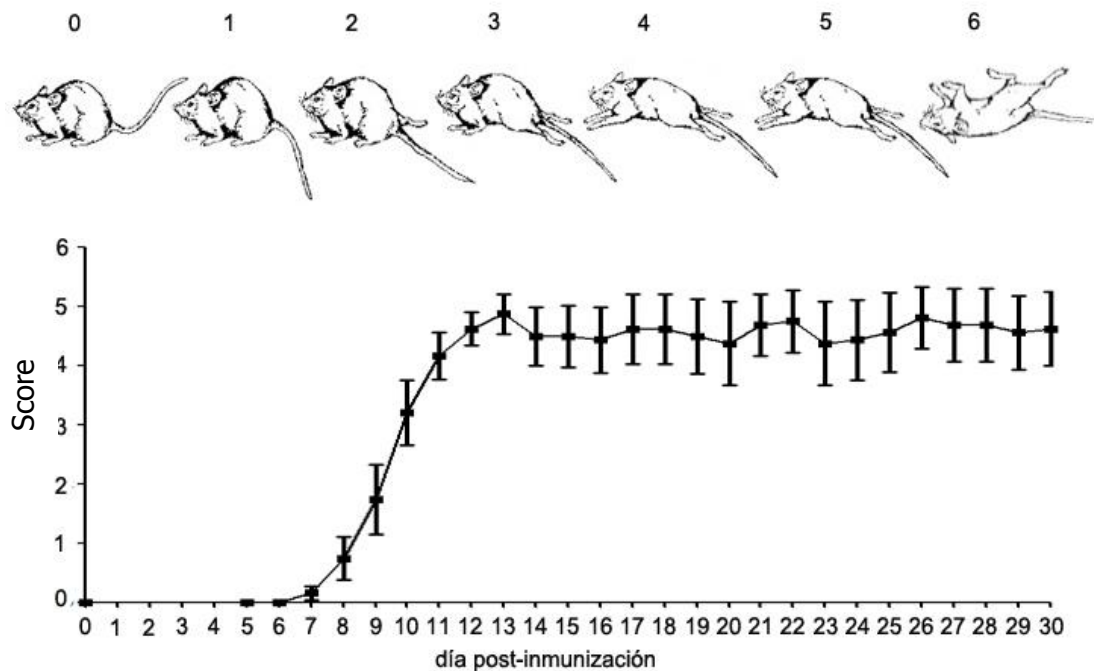
Después de la inmunización (tanto activa como pasiva), se desencadena una respuesta inmune frente al antígeno usado, lo que da lugar a la aparición de los síntomas clínicos. Éstos aparecen como una parálisis que empieza en la cola provocando una paresia parcial o total, y van ascendiendo hasta las extremidades anteriores, provocando la parálisis progresiva del animal pudiendo causar incluso su muerte (Figura 4). Estos síntomas son evaluados diariamente mediante una escala o *score* clínico, que permite la puntuación de los animales en función de la gravedad de la parálisis.

En función del antígeno usado para la inmunización y la cepa o especie de animal usada se desarrollan diferentes cursos clínicos, que pueden ser no remitentes, en el que se produce una parálisis progresiva del animal (Figura 5). Este modelo se obtiene con la inmunización de ratones con el haplotipo H-2b del complejo mayor de histocompatibilidad (normalmente ratones C57BL6) o en ratas inmunizados con la proteína MOG o péptidos derivados de ella <sup>78</sup> o bien en ratones con el haplotipo H-2<sup>u</sup> inmunizados con la proteína MBP <sup>79</sup>. La EAE remitente-recurrente cursa con la aparición de varios episodios clínicos que remiten. Este modelo se induce mediante la inmunización de ratones SJL con el péptido PLP (PLP<sub>139-151</sub>) <sup>80</sup>.

### **Aplicaciones del modelo animal**

El modelo de la EAE tiene distintas aplicaciones. Se puede usar para estudiar los mecanismos que median los procesos inflamatorios, la desmielinización y el daño axonal presentes en la EM. También aquellos mecanismos que controlan la migración de las células del sistema inmune a través de la BHE y los mecanismos reguladores que controlan el sistema inmune. Además, puede ser de gran utilidad para descubrir y

probar nuevos fármacos para la EM y de hecho todos los fármacos usados actualmente en el tratamiento de la EM se desarrollaron a partir de este modelo. De todos modos, aunque la EAE es un buen modelo de la enfermedad y presenta grandes ventajas, hay que tener en cuenta sus limitaciones.



**Figura 5. Patrón de los signos neurológicos de ratones C57BL/6J inmunizados con el péptido MOG<sub>35-55</sub>.** El gráfico representa el promedio diario de la puntuación clínica (score), que va desde la ausencia de signos (puntuación=0) pasando por la parálisis progresiva y hasta la muerte del animal causada por la enfermedad (puntuación=6).

### Limitaciones del modelo

Aunque la EAE comparte muchas de las características de la EM, no siempre mimetiza de forma exacta la enfermedad. Por ejemplo, no todos los fármacos efectivos en la EAE se han podido extrapolar a la clínica, bien por haber demostrado toxicidad o efectos adversos graves o por no presentar la misma eficacia. Por otro lado, la experimentación animal no tiene en cuenta la aparición de infecciones oportunistas. Un ejemplo de ello es la aparición de leucoencefalopatía multifocal progresiva asociada al tratamiento con natalizumab, debida a la infección del virus JC (revisado *por Steinman y col.*<sup>81</sup>).

Otro ejemplo de sus limitaciones es que en la EAE se suelen utilizar animales procedentes de la misma camada, lo que reduce la variabilidad genética que por otro lado existe en los pacientes con EM. Además, en muchos casos, como en el presente trabajo, se utilizan animales modificados genéticamente, que son de gran utilidad para

## INTRODUCCIÓN

el estudio de la función y/o implicación de genes concretos en la enfermedad, pero cuyos resultados no siempre son extrapolables a los humanos. Finalmente, la EAE típica no es un modelo espontáneo, sino que requiere la previa inmunización de los animales frente a un péptido de la mielina para que se desarrolle la enfermedad. En relación con este aspecto, en la EAE se conoce perfectamente el antígeno frente al que se está produciendo la respuesta inmune, mientras que no existe un único antígeno identificado en la EM.

Aun así, los modelos animales representan un soporte imprescindible para el desarrollo de nuevas aproximaciones terapéuticas ya que permiten profundizar en los mecanismos patogénicos de la enfermedad.

### ***Formas clínicas de EM***

En la mayoría de los casos, la EM cursa con brotes o exacerbaciones. Las zonas más comúnmente afectadas son el nervio óptico, la médula espinal y el tronco encefálico. Las definiciones de los distintos cursos clínicos de la enfermedad proceden de un consenso internacional de expertos<sup>82</sup> y han sido revisadas recientemente por *Lublin y col.*<sup>83</sup>. De forma general se pueden resumir en 4 formas clínicas principales (Figura 6):

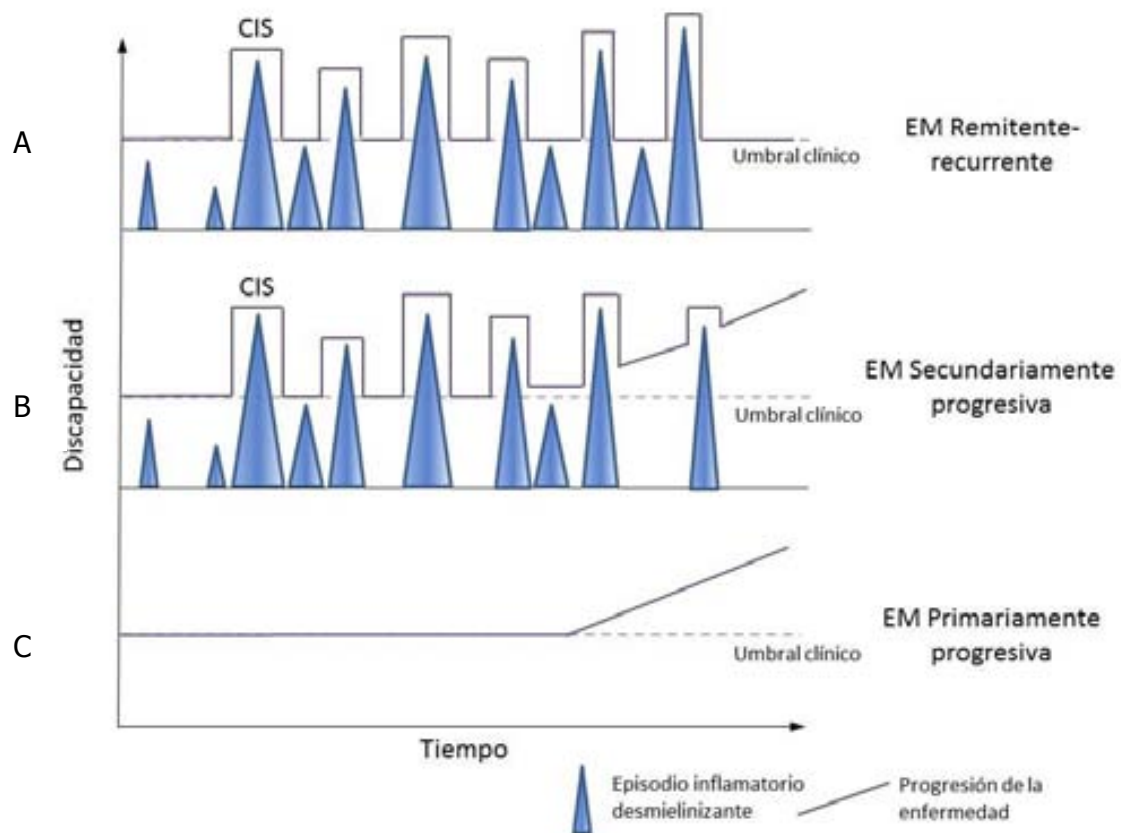
#### *Esclerosis múltiple remitente recurrente (EMRR)*

La mayoría de los pacientes diagnosticados con EM (aproximadamente el 85-90%), siguen un curso inicial remitente-recurrente, caracterizado por episodios o brotes seguidos por una recuperación total o parcial (Figura 6A). La EMRR parece estar dominada en gran medida por procesos inflamatorios. El primer episodio o brote sugestivo de enfermedad desmielinizante recibe el nombre de síndrome clínico aislado o CIS.

#### *Esclerosis múltiple secundariamente progresiva (EMSP)*

Existen diversos estudios de historia natural que indican que entre un 25 y un 40% de los pacientes con EMRR derivan a una forma secundaria progresiva después de unos 20 años de evolución, aunque este tiempo es variable<sup>84</sup> (Figura 6B). En esta fase progresiva de la enfermedad hay un predominio de los procesos neurodegenerativos respecto a los inflamatorios.





**Figura 6. Formas clínicas de esclerosis múltiple.** La esclerosis múltiple remitente recurrente (EMRR) se caracteriza por la presencia de brotes (A). La EMRR suele derivar a EM secundariamente progresiva, que se caracteriza por la progresión de la discapacidad con o sin brotes (B). La EM primariamente progresiva se caracteriza por una progresión de la discapacidad desde el inicio de la enfermedad y por la ausencia de brotes (C).

### *Esclerosis múltiple primariamente progresiva (EMPP)*

Aproximadamente entre un 10 y un 15% de los pacientes con EM presentan un curso progresivo desde el inicio de la enfermedad <sup>85</sup>. La EMPP se caracteriza por un inicio insidioso de los síntomas seguido de un deterioro gradual con el tiempo (Figura 6C). Del mismo modo que en los pacientes con EMSP, la EMPP se caracteriza por un predominio de los procesos neurodegenerativos.

### *Esclerosis múltiple progresiva recurrente (EMPR)*

Esta forma clínica se observa en una proporción muy pequeña de pacientes. En la EMPR se muestra una progresión de la enfermedad desde el inicio acompañada con brotes. De todos modos, existe debate en la literatura sobre si estos pacientes son realmente distintos a la EMPP <sup>86</sup> y de hecho el término "progresiva recurrente" ha sido eliminado en la revisión de *Lublin y col.* <sup>83</sup>.

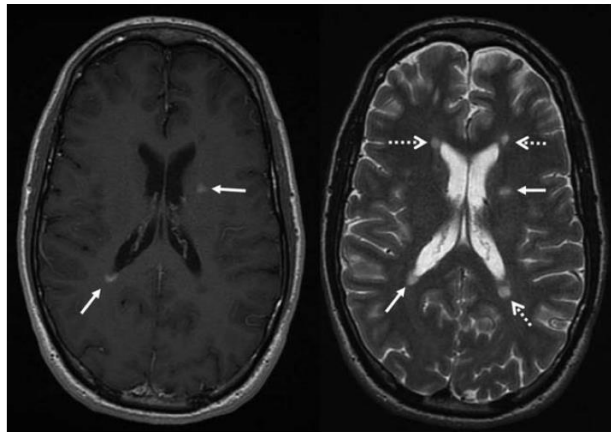
### ***Diagnóstico de la EM***

Como se ha comentado anteriormente, aproximadamente el 85% de los pacientes con EMRR inician la enfermedad con un síndrome clínico aislado o CIS<sup>87, 88</sup> que se define como un episodio en el cual el paciente presenta signos sugestivos de un desorden inflamatorio y desmielinizante del SNC<sup>89</sup>. Por otro lado, existen diferentes estudios en los que se ha descrito que entre un 30 y un 85% de los pacientes que presentan un síndrome clínico aislado finalmente desarrollan EM clínicamente definida (EMCD)<sup>90-96</sup>. Esta variabilidad en los porcentajes de conversión a EMCD se deben en parte a los criterios diagnósticos usados. Por otro lado, se ha observado que un inicio del tratamiento temprano con interferón beta (IFN- $\beta$ ) o con acetato de glatirámico, que son fármacos de primera línea para el tratamiento de la EM, retrasa el tiempo de conversión y disminuye el ratio de pacientes que desarrollan EMCD<sup>91, 94, 95, 97, 98</sup>.

El diagnóstico de la EM incluye tanto determinaciones clínicas como paraclínicas<sup>99, 100</sup> y aunque se puede realizar utilizando únicamente criterios clínicos, desde hace unos años se utiliza la resonancia magnética (RM) como herramienta importante para complementar el diagnóstico o incluso sustituir algunos criterios clínicos<sup>101-106</sup>.

Actualmente existen los criterios diagnósticos de McDonald 2010, que contemplan principalmente criterios de RM. Para el diagnóstico de EM se requieren criterios tanto de diseminación de las lesiones en el tiempo (DIT del inglés *Dissemination In Time*), es decir, la presencia de lesiones antiguas y la aparición de nuevas lesiones, y de diseminación de las lesiones en el espacio (DIS del inglés *Dissemination In Space*) es decir, la presencia de lesiones en diferentes regiones del SNC. Estos criterios se basan en el número de lesiones observadas en las imágenes potenciadas en T2, la actividad de estas lesiones (presencia de lesiones captantes de gadolinio observadas en las imágenes potenciadas en T1) (Figura 7) y la localización de las mismas. Existen cuatro localizaciones características de las lesiones en la EM: yuxtacortical, infratentorial, periventricular y medular. La aplicación de estos criterios permite un diagnóstico e inicio del tratamiento más tempranos<sup>107</sup>.

Aun así, hasta el momento no existe una única característica clínica y/o radiológica o test diagnóstico que permita predecir de una forma fiable la evolución que presentará un paciente con CIS en términos de conversión a EM o desarrollo de discapacidad neurológica. En este contexto, resulta necesaria la identificación de biomarcadores pronósticos en pacientes con CIS.



**Figura 7. Lesiones en la RM.** Imágenes potenciadas en T1 (izquierda) y T2 (derecha). Presencia de lesiones que realzan con gadolinio (flechas) y lesiones que no realzan con gadolinio (flechas punteadas). Modificado de *Vigevano y col.*<sup>108</sup>

### ***Tratamientos***

El objetivo principal de los tratamientos en la EM es la reducción del número de brotes y retrasar la progresión de la discapacidad en los pacientes<sup>109, 110</sup>. En los últimos años, las posibilidades terapéuticas del paciente con EM han crecido de forma importante. La EM es una enfermedad con dos fases, una fase inflamatoria que predomina en los estadios iniciales de la enfermedad, y una fase neurodegenerativa que sería más prominente en los estadios más avanzados de la enfermedad. La mayoría de los tratamientos tienen acciones sobre diferentes poblaciones del sistema inmunitario, y han demostrado eficacia en la reducción del componente inflamatorio de la enfermedad. En la Figura 8 están representados los mecanismos de acción de los principales fármacos usados en el tratamiento de la EM, que se resumen brevemente a continuación:

#### ***Interferones***

Los interferones (IFNs) son proteínas que pertenecen a la familia de las citoquinas y que están involucradas en la regulación de la respuesta inmune frente a patógenos<sup>111</sup>. El IFN- $\beta$  suprime la proliferación de las células T específicas para MBP, reduce la producción de citoquinas proinflamatorias, e induce la producción de citoquinas anti-inflamatorias como la IL-10<sup>112-114</sup>.

## INTRODUCCIÓN

### *Acetato de glatirámero*

El acetato de glatirámero (AG) es un polímero sintético compuesto por cuatro aminoácidos (L-glutamato, L-lisina, L-alanina y L-tirosina) que mimetizan la MBP, de forma que compite con los antígenos de la MBP para la unión al MHC de clase II. Este bloqueo produciría una disminución de la respuesta de células T frente a la mielina dando lugar a una posible neuroprotección <sup>115</sup>. El AG inhibe de forma preferencial la producción de IFN- $\gamma$ , induce la generación de poblaciones de células T reguladoras, e induce la secreción de citoquinas anti-inflamatorias que a su vez protegen la mielina <sup>116</sup>.

### *Natalizumab*

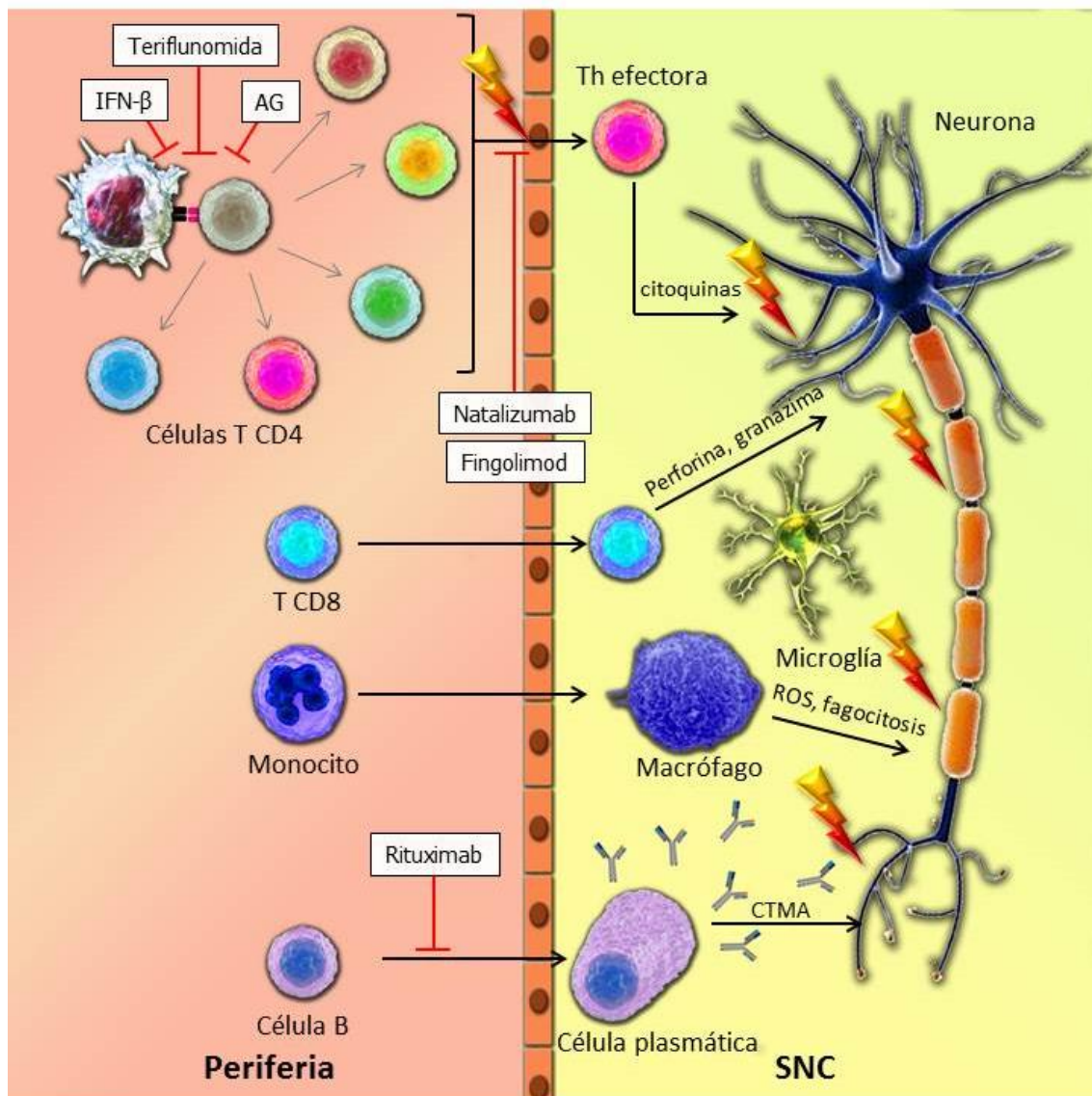
El natalizumab es un anticuerpo monoclonal humanizado dirigido contra el *very late antigen-4* (VLA-4), cuya diana son las células T y actúa inhibiendo la adhesión de éstas a las células endoteliales de la BHE a través de la integrina  $\alpha 4$  disminuyendo de esta forma su paso hacia el interior del SNC.

### *Anticuerpos anti-CD20*

Entre los anticuerpos monoclonales anti-CD20 se encuentra el rituximab, el ocrelizumab y el ofatumumab. Estos fármacos son anticuerpos monoclonales quiméricos o humanizados, que deplecionan las células B CD20+ circulantes. Los mecanismos implicados en su acción incluyen: i) toxicidad mediada por complemento; ii) citotoxicidad celular mediada por anticuerpos y iii) inducción de la apoptosis celular <sup>117, 118</sup>.

### *Dimetil fumarato*

El dimetil fumarato (DMF) es un metil éster del ácido fumárico que tiene efectos antioxidantes y antiinflamatorios a través de la reducción de la producción de citoquinas pro-inflamatorias y óxido nítrico además del incremento en la producción de enzimas antioxidantes. El DMF también inhibe la expresión de VCAM-1 y activa el factor nuclear Nrf2 que tiene propiedades antioxidantes <sup>119</sup>. Por lo tanto, el DMF preserva la integridad de la mielina a través de dos vías: la disminución del estrés oxidativo y el correspondiente daño celular, y por otro lado la inhibición de la producción de citoquinas pro-inflamatorias.



**Figura 8. Mecanismos de acción de los principales fármacos usados en el tratamiento de la EM.** Los fármacos usados para el tratamiento de la EM actúan sobre las distintas poblaciones celulares implicadas en la patología de la enfermedad. (Adaptado de *Broux y col.*<sup>38</sup>).

### *Teriflunomida*

La teriflunomida es el metabolito activo de la leflunomida, un compuesto químico con conocidas propiedades anti-inflamatorias, anti-proliferativas e inmunosupresoras<sup>120</sup>. La teriflunomida actúa principalmente mediante la interferencia del ciclo celular de los linfocitos disminuyendo la síntesis de DHODH (dihidroorotato deshidrogenasa) que es un enzima necesario para el ciclo celular<sup>121</sup>. Mediante el bloqueo de este enzima, la teriflunomida detiene la proliferación de los linfocitos, lo que protege a las neuronas

## INTRODUCCIÓN

del daño "autoinmune". Por otro lado, también actúa inhibiendo las tirosina-quinasa, lo que además de disminuir la proliferación de las células T produce un cambio en el perfil de citoquinas que previene la inflamación <sup>122</sup>.

### *Fingolimod*

La esfingosina 1-fosfato (S1P) es una molécula extracelular que regula el tráfico de células T y B de los nodos linfáticos al torrente sanguíneo <sup>123</sup>, de modo que un gradiente de concentración de S1P (bajo en el nodo linfático y alto en la circulación) induce la migración de los linfocitos de los nodos linfáticos al torrente <sup>124</sup>. El fingolimod es un análogo de la S1P, que actúa inicialmente como agonista, pero que posteriormente se convierte en un potente antagonista, ya que produce la internalización de los receptores de S1P en los linfocitos, lo que hace que éstos no respondan al gradiente de S1P y permanezcan secuestrados en los nodos linfáticos. Este secuestro disminuye la cantidad de células T disponibles que pueden atravesar la BHE y migrar hacia el SNC. Además, se ha sugerido que el fingolimod podría promover la remielinización de las neuronas en el SNC a través de la interacción directa con los oligodendrocitos <sup>125</sup>.

## ***Biomarcadores en la EM***

Un biomarcador se define como una *variable que puede medirse de forma objetiva, indicadora de un proceso biológico normal, de progresión de una enfermedad o de los efectos de una intervención terapéutica* <sup>126</sup>.

### **Fuentes biológicas de biomarcadores**

Existen diferentes fuentes biológicas en las que se pueden detectar biomarcadores asociados con procesos fisiológicos o patológicos. La elección de la fuente biológica adecuada es un paso crucial en la identificación de biomarcadores candidatos que puedan ser útiles para el uso clínico.

### *Sangre*

Se obtiene mediante punción venosa. Es de gran utilidad por su fácil obtención y en ella se reflejan procesos fisiológicos de interés. La principal dificultad es la determinación de las proteínas de baja abundancia puesto que la albúmina y las inmunoglobulinas (IgG) forman más del 75% del contenido proteico.

### *Orina*

Es la muestra de más fácil obtención, y se puede evitar el efecto de las fluctuaciones circadianas mediante su recolección durante 24 horas, pero las infecciones del tracto urinario pueden alterar las medidas obtenidas.

### *Saliva*

Aunque es una muestra de muy fácil obtención prácticamente no es utilizada, y por lo tanto hay poca información sobre marcadores estudiados en este tipo de muestra.

### *Lágrima*

Del mismo modo que la saliva, es un tipo de muestra poco utilizada para la búsqueda de biomarcadores, pero en los últimos años se han encontrado resultados muy similares en el porcentaje de detección de bandas oligoclonales en lágrimas y LCR <sup>127</sup>, aunque con resultados controvertidos.

### *Líquido cefalorraquídeo*

Se obtiene mediante punción lumbar y aunque es una muestra obtenida por una técnica invasiva y con ciertos riesgos, el líquido cefalorraquídeo (LCR) ha resultado ser una fuente muy valiosa en la búsqueda de biomarcadores, dada su cercanía al SNC. El SNC se puede dividir en 4 compartimentos: el espacio vascular, el espacio extracelular, el espacio intracelular y el compartimento del LCR <sup>128</sup>. La barrera hematoencefálica separa el espacio vascular del extracelular, mientras que la barrera hemato-LCR es la que separa el espacio vascular del compartimento del LCR. Estas barreras son las responsables de controlar la permeabilidad al SNC de forma que las moléculas derivadas de la sangre atraviesan estas barreras de forma controlada mediante difusión pasiva o por transporte activo como es el caso de la glucosa. Una de las medidas para comprobar la integridad de la barrera hematoencefálica es la determinación de la albúmina, que es una proteína producida exclusivamente en el hígado. El cociente de la concentración de albúmina LCR/suero o cociente de albúmina (Q-alb) representa una medida directa de la permeabilidad de la barrera hematoencefálica <sup>129</sup>. Hay que tener en cuenta, entonces, que la permeabilidad de la barrera hematoencefálica puede influenciar la concentración de determinadas proteínas en el LCR.

## INTRODUCCIÓN

El objetivo final de la identificación de biomarcadores en la EM es poder disponer de herramientas que ayuden a predecir quién está en riesgo de desarrollar la enfermedad (biomarcadores predictivos), poder diagnosticar la EM de una forma más temprana (biomarcadores diagnósticos), predecir el curso de la enfermedad una vez diagnosticada (biomarcadores pronósticos), determinar el mecanismo molecular implicado en la enfermedad (biomarcadores específicos de proceso), así como poder predecir la respuesta a los diferentes tratamientos (biomarcadores de respuesta al tratamiento).

### **Tipos de biomarcadores**

#### *Biomarcadores predictivos y diagnósticos*

Aunque no se conoce la causa de la enfermedad, se sabe que existe un componente genético importante en su desarrollo. Esta susceptibilidad genética es poligénica y multifactorial <sup>130</sup>. Hasta la fecha, el factor genético con más peso que determina el riesgo de EM es el HLA-DRB1\*15, mientras que el HLA-A\*2 tiene un efecto protector, aunque existe un gran número de estudios en los que se han encontrado otros genes relacionados con la enfermedad.

Por otro lado un diagnóstico preciso y temprano de la EM es de vital importancia, puesto que permitiría un inicio más temprano del tratamiento, reduciendo de esta forma la actividad de la enfermedad y mejorando el pronóstico del paciente <sup>131</sup>.

El diagnóstico de EM requiere de criterios clínicos, radiológicos y de laboratorio. En cuanto a las determinaciones de laboratorio, en la práctica clínica se utiliza la determinación de bandas oligoclonales (BOC) de inmunoglobulinas IgG en el líquido cefalorraquídeo de los pacientes con CIS como herramienta para el diagnóstico de la EM.

Un ejemplo de biomarcador diagnóstico es la presencia de auto-anticuerpos contra aquaporina-4 (AQP-4), que actualmente se utiliza como herramienta complementaria para el diagnóstico diferencial de la neuromielitis óptica, a fin de separar esta entidad clínica de la EM clásica <sup>132</sup>.

En un estudio reciente, se encontraron anticuerpos contra el canal de potasio KIR4.1 en el suero de aproximadamente el 50% de los pacientes con EM mientras que en los controles con otras enfermedades neurológicas o en los controles sanos se encontraron en menos de un 1% <sup>70</sup>. Sin embargo, estos resultados no se han podido



replicar en otro estudio reciente, donde se han encontrado anticuerpos contra KIR4.1 en aproximadamente un 1% de los pacientes con EM <sup>133</sup>.

#### *Biomarcadores de actividad de la enfermedad*

Estos marcadores pueden ayudar a distinguir entre pacientes con diferentes cursos clínicos de la enfermedad en función de la actividad clínica y/o radiológica de la enfermedad. Además, podrían ser útiles para identificar aquellos pacientes que están entrando en la fase progresiva de la enfermedad. Un ejemplo de estos biomarcadores serían los neurofilamentos, cuyos niveles en el LCR se han encontrado aumentados durante el momento del brote <sup>134, 135</sup>, y se han relacionado con la actividad radiológica <sup>134, 136</sup> y la discapacidad neurológica <sup>135, 137</sup> de los pacientes con EM.

#### *Biomarcadores de respuesta al tratamiento*

Actualmente existe una gran variedad de opciones terapéuticas para el tratamiento de la EM, que junto con el riesgo de un posible fracaso terapéutico y efectos adversos de estos tratamientos hacen que sea de vital importancia la identificación de biomarcadores asociados con la respuesta al tratamiento, y así poder administrar a cada paciente el tratamiento frente al cual va a responder y no presentará efectos adversos. Este es el campo de la farmacogenómica <sup>138</sup>. La respuesta a fármacos es muy variable entre pacientes y esto en parte es debido a factores genéticos. Los polimorfismos en algunos genes pueden determinar una expresión o actividad diferente de proteínas que regulan la farmacocinética o farmacodinámica de los fármacos <sup>139</sup>.

### **Biomarcadores en pacientes con CIS**

Varios estudios han perseguido como principal objetivo la identificación de biomarcadores pronósticos en pacientes con CIS. Actualmente la presencia de alteraciones en la RM y la detección de BOC en el LCR en el momento del CIS se asocian con un incremento del riesgo de desarrollar EM. Aparte de estos factores mencionados, la evidencia sobre el posible papel de otros biomarcadores moleculares pronósticos en LCR de pacientes con CIS ha sido controvertida o débil por falta de validación de los resultados. Aspectos como la variabilidad pre-analítica relacionada con la recogida, procesamiento, y conservación de las muestras, la falta de protocolos estandarizados de las tecnologías de identificación de biomarcadores, o la ausencia de una selección protocolizada de los grupos de pacientes han contribuido posiblemente a

## INTRODUCCIÓN

esta falta de reproducibilidad de los hallazgos <sup>140-144</sup>. En este sentido, los esfuerzos recientes realizados principalmente por el consorcio BioMSeu – *Consortium for CSF Biomarker Research* (<http://www.bioms.eu>) de establecer protocolos estandarizados para la recogida y conservación de las muestras, la definición de los grupos controles, así como la protocolización de la información mínima necesaria proporcionada en los estudios publicados posiblemente mejoren la reproducibilidad de los hallazgos en los futuros estudios de biomarcadores <sup>145-147</sup>.

Dada la presencia de componentes inflamatorios y neurodegenerativos en la enfermedad, es probable que el pronóstico del paciente con CIS no dependa de un único biomarcador, sino de varios y de diferente naturaleza, y que posiblemente la combinación de biomarcadores se asocie con una mayor exactitud en la predicción del curso clínico que presentará el paciente con CIS.

Uno de los biomarcadores diagnósticos más destacados y el único utilizado actualmente en la práctica clínica es la presencia de bandas oligoclonales (BOC) de IgG en pacientes con CIS, donde se ha observado que la presencia de BOC en el LCR de estos pacientes incrementa el riesgo de presentar un segundo episodio de forma independiente a la RM inicial <sup>148</sup>. De todos modos, las BOC no son específicas de la EM, ya que también se encuentran en pacientes con otras enfermedades neurológicas <sup>149</sup>. Existen estudios con resultados controvertidos respecto a la presencia de autoanticuerpos en suero contra proteínas de la mielina como por ejemplo MBP y MOG en pacientes con CIS y la relación de estos anticuerpos con la conversión a EM clínicamente definida <sup>150-153</sup>. Por otro lado, se ha descrito que la presencia de BOC de tipo IgM contra lípidos de la mielina en el paciente con CIS está asociada con una EM remitente recurrente más agresiva <sup>154</sup>.

La fetuin-A también se ha estudiado como posible biomarcador, pero existen resultados contradictorios respecto a esta proteína. Inicialmente en un estudio de *screening* mediante electroforesis bidimensional diferencial (2D-DIGE) se encontraron niveles disminuidos de fetuin-A en LCR en los pacientes con CIS que convertían a EM respecto a los que no convertían, y estos resultados se validaron mediante ELISA <sup>143</sup>, mientras que posteriormente se ha descrito un incremento de su expresión en pacientes con EM respecto a los controles con otras enfermedades del SNC, así como en pacientes con EM activa en comparación con aquellos con una EM inactiva <sup>155, 156</sup>.

Otro biomarcador pronóstico potencial son los neurofilamentos, cuyos niveles se han encontrado elevados en los pacientes con CIS y EMRR en comparación con los controles <sup>135, 157</sup>, y además se han relacionado con un curso más agresivo de la

enfermedad <sup>158</sup>, aunque es necesaria su validación en cohortes más numerosas de pacientes.

Recientemente *Kroksveen y col.* realizaron un estudio de proteómica con el objetivo de encontrar diferencias en los perfiles de expresión proteica entre pacientes con CIS, pacientes con EMRR que tenían un CIS en el momento de la punción lumbar, y controles con otras enfermedades neurológicas inflamatorias <sup>159</sup>. Mediante *isobaric tag for relative and absolute quantitation labelling* (iTRAQ) fueron capaces de encontrar diferencias significativas en la abundancia de algunas proteínas entre los pacientes EMRR y los controles, y estas diferencias se validaron mediante *selected reaction monitoring* (SRM) en alguno de los casos, mientras que no encontraron diferencias entre los pacientes con CIS y los pacientes con CIS que posteriormente convertían a EMRR.

A modo de resumen, la evidencia actual que existe en la literatura, la cual se ha resumido anteriormente, sugiere que la evolución de la enfermedad tras un primer episodio neurológico sugestivo de enfermedad desmielinizante o CIS es en cierta medida impredecible, y que más allá de las alteraciones radiológicas y la presencia de BOC, el neurólogo no dispone de otras herramientas que permitan predecir de una forma fiable la evolución del paciente con CIS. Esta limitación es la que se ha tomado como principal objetivo de la presente tesis doctoral, la identificación de biomarcadores moleculares pronósticos en LCR de pacientes con CIS que puedan incorporarse en la práctica clínica junto con la RM y las BOC.





## 2. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS



### **Hipótesis del trabajo:**

- Las tecnologías de tipo "ómicas", en particular las basadas en proteómica, permitirán la identificación de biomarcadores en LCR con implicaciones pronósticas en pacientes con CIS.
- Los pacientes con CIS que convierten a EMCD presentarán un perfil de expresión de proteínas en LCR distinto a aquellos pacientes que no convierten.

### **Objetivos:**

- 1. Identificación de biomarcadores pronósticos asociados con la conversión a EM y desarrollo de discapacidad en pacientes con CIS mediante un abordaje proteómico en muestras de LCR.
- 2. Validación inicial de los principales biomarcadores pronósticos derivados del estudio proteómico en cohortes adicionales de pacientes con CIS mediante técnicas alternativas de detección.
- 3. Validación a gran escala de la CHI3L1 como biomarcador pronóstico en pacientes con CIS.
- 4. Estudios adicionales de la función de la CHI3L1 en la EM y en el modelo animal de la enfermedad.







### 3. MATERIAL Y MÉTODOS



### ***3.1 Objetivos 1 y 2. Identificación de proteínas diferencialmente expresadas entre pacientes con CIS que convierten a EM y pacientes que no convierten: fase de screening y validación de proteínas identificadas***

#### **3.1.1 Determinaciones**

*3.1.1.1* Estudio de proteómica: *screening* mediante *isobaric tag for relative and absolute quantitation* (iTRAQ).

El estudio de proteómica se realizó con *pooles* de muestras de LCR (ver apartado pacientes). Se generó un total de 12 *pooles*, 6 por cada grupo, y cada *pool* contenía muestras de LCR de 5 pacientes diferentes.

Las muestras se descongelaron y se concentraron. A continuación se deplecionaron la albúmina y la IgG mediante el kit *ProteoPrep Immunoaffinity Albumin and IgG Depletion Kit* (Sigma-Aldrich, St Louis, Missouri, USA) siguiendo las recomendaciones del fabricante. Seguidamente, las muestras se precipitaron añadiendo 4 volúmenes de acetona enfriada con hielo *overnight*, se centrifugaron y el pellet de proteína obtenido se diluyó en agua. Finalmente, la concentración de proteína se determinó mediante el método de Bradford (Bio-Rad Protein Assay, Bio-Rad Laboratories GmbH, Munich, Germany).

Se realizaron tres experimentos independientes de 4-plex cada uno usando 2 *pooles* de cada grupo. Se transfirieron 50 µg de proteína a un tubo y se secaron en un speedvac. Después de re-disolver las muestras en *Sample Buffer-Plasma* siguiendo las instrucciones del fabricante (iTRAQ™ Reagents Application Kit-Plasma protocol, Applied Biosystems, Foster City, CA, USA), las muestras se redujeron, se alquilaron y se digirieron enzimáticamente con tripsina porcina (Promega, Madison, WI, USA). Los péptidos resultantes se marcaron con los reactivos para iTRAQ. Dada la complejidad de la muestra, se realizó una cromatografía de intercambio iónico. Los péptidos se eluyeron usando un gradiente de sales y finalmente se recogieron 7 fracciones usando un rango de KCl entre 25mM y 1M.

Para la cromatografía líquida y la espectrometría de masas en tándem las muestras se procesaron en un instrumento Q-Star Pulsar (Applied Biosystems) acoplado a una

fuelle nano-ESI, previo a la separación por cromatografía líquida en un instrumento Ultimate II System (LCPackings). Previo a la cromatografía líquida, las mezclas de péptidos se desalinizaron y concentraron en columnas C18 (Spec C18, Varian). La cromatografía de fase reversa se realizó en columnas Atlantis dC18 NanoEase Column, 75µm x 150mm (Waters), usando un gradiente lineal de 5-55% de acetonitrilo en agua con 0,1% de ácido fórmico durante 120 minutos.

### *3.1.1.2 Cuantificación de chitinase 3-like 1, ceruloplasmina, proteína de unión a vitamina D (vitamin D BP), apolipoproteína AI, apolipoproteína AIV, plasminógeno y vitronectina mediante ELISA*

Los niveles de estas proteínas se determinaron mediante kits de ELISA comerciales siguiendo las recomendaciones de los fabricantes. La descripción de los kits de ELISA, las diluciones de las muestras usadas para la cuantificación de las proteínas y los coeficientes de variación (CV) intra-ensayo e inter-ensayo están resumidos en la Tabla 1.

<b>Proteína</b>	<b>Casa comercial</b>	<b>Dilución LCR</b>	<b>Dilución suero</b>	<b>CV intra-ensayo (%)</b>	<b>CV inter-ensayo (%)</b>
<b>CHI3L1</b>	Quidel Corporation, San Diego, USA	SD	1:2	8,4	15,0
<b>Ceruloplasmina</b>	AssayPro, St Charles, USA	1:2	1:400	5,3	20,0
<b>Vitamin D BP</b>	Immunodiagnostik AG, Germany	1:100	1:40.000	12,2	22,7
<b>Apo AI</b>	Mabtech, Sweden	1:100	1:100.000	5,3	15,0
<b>Apo AIV</b>	Millipore Corporation, Villerica, MA, USA	SD	1:500	6,1	21,2
<b>Plasminógeno</b>	AssayPro, St Charles, MA, USA	1:100	1:20.000	2,8	15,2
<b>Vitronectina</b>	Dunn Labor Technik GmbH, Asbach, Germany	1:50	1:50.000	5,1	14,1

**Tabla 1. Kits de ELISA usados para la cuantificación de las proteínas en LCR y suero.** SD: muestra testada sin dilución previa. CV: coeficiente de variación.

### 3.1.1.3 Determinación de semaforina 7A (sema7A) y ala-beta-his-dipeptidasa (CNDP1) mediante SRM

Debido a la dificultad para cuantificar los niveles de sema7A y CNDP1 mediante ELISA comerciales, estas proteínas se determinaron mediante *selected reaction monitoring* (SRM), una técnica de espectrometría aceptada para la validación de biomarcadores<sup>160</sup>. Las muestras de LCR se precipitaron en acetona *overnight* a 4°C, se solubilizaron en urea 6 M en bicarbonato amónico 200 mM, se redujeron con una solución 100 mM de ditiotreitól, se alquilaron con 200 nM de iodoacetamida, se digirieron con endopeptidasa LysC (2 M Urea en 200 mM de bicarbonato amónico, a 37°C durante 16 horas) y tripsina (1 M Urea en 200 mM de bicarbonato amónico, a 27°C durante 16 horas). Después de la digestión, las muestras se acidificaron con una solución al 10% de ácido fórmico y se desalinizaron en columnas C18 (macro-spin columns, *The Nest Group Inc.*). Se añadieron cuatro péptidos marcados isotópicamente en la lisina C-terminal (<sup>13</sup>C<sub>6</sub>, <sup>15</sup>N<sub>2</sub>-Lys) o la arginina C-terminal (<sup>13</sup>C<sub>6</sub>, <sup>15</sup>N<sub>4</sub>-Arg) a las muestras digeridas, dos correspondientes a la sema7A (IFAVWK; VYLDFDFPEGK) y dos a la ala-beta-his-dipeptidasa (CNDP1) (ALEQDLPVNIK; HLEDVFSK). Los péptidos se separaron cromatográficamente con un nanoLC Eksigen acoplado a un espectrómetro de masas Q-Trap (5500 Q-Trap *AB Sciex*). Los péptidos se retuvieron en una pre-columna Acclaim PepMap 100 (C18, 15 µm, 100 Å, *Acclaim PepMap 100 Thermo Scientific*) y posteriormente se separaron mediante cromatografía en fase reversa mediante columnas C18 de 15 cm (75 µm, *Nikkyo Technos*) con un gradiente del 2 al 40% de solvente B en 35 minutos a una velocidad de flujo de 300 nL/min. Solvente B: acetonitrilo con 0,1% de ácido fórmico.

La adquisición se realizó usando un método dirigido programado con un tiempo de permanencia de 20 ms y un ciclo total de 1,4 segundos. Para cada péptido se monitorizaron entre 2 y 4 transiciones tanto para la forma endógena (light) como para la forma de referencia (heavy).

## 3.1.2 Muestras

### 3.1.2.1 Obtención de LCR y suero

Las muestras de LCR se obtuvieron a nivel basal mediante punción lumbar. Las muestras se centrifugaron durante 5 minutos a 1500 rpm para eliminar las células. Una fracción se usó para el diagnóstico de rutina que incluía la determinación de las bandas

oligoclonales de IgG mediante isoelectroenfoque en gel de agarosa seguido de inmunodetección con peroxidasa usando muestras de LCR y suero pareadas. El volumen sobrante se alicuotó y se conservó a -80°C hasta el momento de su uso. La sangre se obtuvo mediante punción venosa. Las muestras se dejaron coagular a temperatura ambiente durante 30 minutos y posteriormente se centrifugaron a 3000 rpm durante 10 minutos. El suero se alicuotó y se conservó a -80°C hasta el momento de su uso.

### 3.1.3 Pacientes

#### 3.1.3.1 Pacientes incluidos en la fase de screening

Se incluyeron 60 pacientes con CIS (cohorte 1) procedentes del Centre d'Esclerosi Múltiple de Catalunya (Cemcat) seleccionados según los siguientes criterios: **CIS→CIS** – no conversión a EMCD, ausencia de BOC y RM normal basal y a los 5 años de seguimiento (n=30); **CIS→EMCD** – conversión a EMCD, presencia de BOC y 3 o 4 criterios de Barkhof en la RM basal (n=30). El estudio se aprobó por el Comité Ético del Hospital Universitario Vall d'Hebrón. Las características de la cohorte de pacientes incluida en la fase del *screening* están resumidas en la Tabla 2.

Características	CIS→CIS	CIS→EMCD	p-valor
N	30	30	-
Edad (años) <sup>a</sup>	29,9 (8,9)	27,1 (6,6)	0,371
Mujer/Hombre (% mujer)	23/7 (76,7)	23,/7 (76,7)	1,0
Tiempo de seguimiento (años) <sup>a</sup>	6,0 (3,0)	5,5 (2,0)	0,294
Presentación clínica			0,073
Neuritis óptica	19 (63,3%)	9 (30,0%)	
Tronco	4 (13,3%)	8 (26,7%)	
Médula	4 (13,3%)	9 (30,0%)	
Otros	3 (10,0%)	4 (13,3%)	
Tiempo entre CIS y extracción de LCR <sup>a</sup>	51,0 (13,5-114,5)	47,0 (24,0-85,0)	0,877
Leucocitos (células/ $\mu$ l) <sup>b</sup>	2,0 (0-4,0)	2,0 (0-7,0)	0,367
Eritrocitos (células/ $\mu$ l) <sup>b</sup>	2,0 (0-12,5)	0 (0-23,0)	0,993
Conc. de proteína (g/L) <sup>b</sup>	0,310 (0,250-0,430)	0,250 (0,260-0,440)	0,166
Conc. de IgG (g/L) <sup>b</sup>	0,021 (0,016-9,030)	0,032 (0,023-0,060)	0,020

**Tabla 2. Características demográficas, clínicas y de LCR de los pacientes incluidos en la fase de screening.** CIS→CIS: pacientes con CIS que no convierten a EM clínicamente definida (EMCD); CIS→EMCD: pacientes con CIS que convierten a EMCD. <sup>a</sup>Datos expresados como media (desviación estándar). <sup>b</sup>Datos expresados como mediana (rango intercuartílico).

*3.1.3.2 Pacientes incluidos en la primera validación***a) Validación de la chitinase 3-like 1 (CHI3L1), ceruloplasmina y proteína de unión a vitamina D (vitamin D BP) mediante ELISA**

Se incluyeron 84 pacientes con CIS (cohorte 2) procedentes del Centre d'Esclerosi Múltiple de Catalunya (Cemcat). Los criterios de inclusión del grupo CIS→CIS (no conversores) y grupo CIS→EMCD (conversores) fueron los mismos que en los pacientes incluidos en la fase de screening. **CIS→CIS** - no conversión a EMCD, ausencia de BOC y RM normal basal y a los 5 años de seguimiento (n=36); **CIS→EMCD** - conversión a EM, presencia de BOC y 3 o 4 criterios de Barkhof en la RM basal (n=48). Además, se incluyó un grupo de pacientes con otras enfermedades neurológicas (OEN) como control (n=20). Las características de la cohorte de pacientes incluida en esta fase de validación están resumidas en la Tabla 3.

Características	CIS→CIS	CIS→EMCD	OEN
N	36	48	20
Muestras en la fase de screening (%)	18 (50,0%)	25 (52,1%)	-
Edad (años) <sup>a</sup>	28,7 (9,4)	26,8 (6,6)	36,5 (10,0)
Mujer/hombre (% mujer)	29/7 (80,6)	35/13 (72,9)	12/8 (60,0)
Tiempo de seguimiento <sup>a</sup>	4,1 (3,1)	5,5 (2,3)	-
Presentación clínica			
Neuritis óptica	22 (61,1%)	15 (31,3%)	
Tronco	4 (11,1%)	11 (22,9%)	diplopia (5), cefalea (4), vértigo (4), papilitis (4), dolor facial (1), cervicalgia (1), ↓ agudeza visual (1)
Médula	7 (19,4%)	15 (31,3)	
Otros	3 (8,3%)	7 (14,7%)	

**Tabla 3. Características demográficas y clínicas de los pacientes incluidos en la validación de la chitinase 3-like 1, ceruloplasmina y vitamin D BP.** CIS→CIS: pacientes con CIS que no convierten a EM clínicamente definida (EMCD); CIS→EMCD: pacientes con CIS que convierten a EMCD. OEN: controles con otras enfermedades neurológicas. Los números entre paréntesis corresponden al número de individuos. Datos expresados como media (desviación estándar). <sup>a</sup>Datos expresados como mediana (rango intercuartílico).

**b) Validación de la apolipoproteína AI, apolipoproteína AIV, plasminógeno y vitronectina mediante ELISA**

Se incluyeron 56 pacientes con CIS (cohorte 3) procedentes del Cemcat. Los criterios de inclusión de los grupos de pacientes con CIS conversores y no conversores fueron los siguientes: **CIS→CIS** - no conversión a EMCD, ausencia de BOC y RM normal basal (n=27); **CIS→EMCD** - conversión a EMCD, presencia de BOC y 2, 3 o 4 criterios de Barkhof en la RM basal (n=29). Además, se incluyó un grupo de pacientes con otras enfermedades neurológicas (OEN) como control (n=26). Las características de esta cohorte de pacientes se resumen en la Tabla 4.

Características	CIS→CIS	CIS→EMCD	OEN
N	27	29	26
Muestras en la fase de screening (%)	9 (33,3%)	11 (37,9%)	-
Edad (años) <sup>a</sup>	28,1 (9,6)	27,4 (6,3)	37,8 (14,2)
Mujer/Hombre (% mujer)	20/7 (74,1)	20/9 (69,0)	12/9 (57,0%)
Tiempo de seguimiento <sup>a</sup>	8,2 (4,2)	8,6 (3,3)	-
Presentación clínica			
Neuritis óptica	15 (55,6)	8 (27,6)	miopatía (2), ↓ agudeza visual (2),
Tronco	4 (14,8)	7 (24,1)	pseudotumor cerebri (3),
Médula	5 (18,5)	8 (27,6)	papilitis (4), hidrocefalia,
Otros	3 (11,1)	6 (20,7)	síncope (2), leucoencefalopatía,
Leucocitos (células/ $\mu$ l) <sup>b</sup>	0,5 (0-5,0)	2,0 (0-9,0)	cefalea (4), vértigo (1), SGB (1),
Conc. de proteína (g/L) <sup>b</sup>	0,33 (0,24-0,43)	0,37 (0,27-0,57)	cervicalgia (1), ictus (3), diplopia (1)

**Tabla 4. Características demográficas, clínicas y de LCR de los pacientes incluidos en la validación de la Apo AI, Apo AIV, plasminógeno y vitronectina.** <sup>a</sup>Datos expresados como media (desviación estándar). <sup>b</sup>Datos expresados como mediana (rango intercuartílico). CIS→CIS: pacientes con CIS que no convierten a EM clínicamente definida (EMCD); CIS→EMCD: pacientes con CIS que convierten a EMCD. OEN: controles con otras enfermedades neurológicas. Los números entre paréntesis corresponden al número de individuos. SGB: Síndrome de Guillain-Barré.



**c) Validación de la semaforina 7A y ala-beta-his-dipeptidasa (CNDP1) mediante SRM**

Se incluyeron 36 pacientes con CIS (cohorte 4) procedentes del Cemcat. Los criterios de inclusión fueron los siguientes: **CIS→CIS** - no conversión a EMCD, ausencia de BOC y RM normal basal (n=18); **CIS→EMCD** - conversión a EMCD, presencia de BOC y 2, 3 o 4 criterios de Barkhof en la RM basal (n=18). Además, se incluyó un grupo de pacientes con otras enfermedades neurológicas como control (n=20). Las características de esta cohorte de pacientes están representadas en la Tabla 5.

Características	CIS→CIS	CIS→EMCD	OEN
N	18	18	20
Muestras en la fase de screening (%)	4 (22,2%)	6 (33,3%)	-
Edad (años) <sup>a</sup>	31,7 (7,3)	30,2 (5,9)	41,6 (15,8)
Mujer/Hombre (%mujer)	13/5 (72,2)	13/5 (72,2)	9/11 (45,0)
Tiempo de seguimiento <sup>a</sup>	6,1 (3,6)	8,8 (2,7)	
Presentación clínica			
Neuritis óptica	9 (50,0)	3 (16,7)	Miopatía (1), ↓ agudeza visual (1), pseudotumor cerebri (4), hidrocefalia (1), síncope (2), papilitis (3), leucoencefalopatía (1), cefalea (2), vértigo (1), ictus (1), radiculopatía (1), neuropatía óptica (1)
Tronco	2 (11,1)	5 (27,8)	
Médula	3 (16,7)	6 (33,3)	
Otros	4 (22,2)	4 (22,2)	
Leucocitos (células/ $\mu$ l) <sup>b</sup>	0 (0,0-3,5)	4,0 (0-11,5)	
Conc. de proteína (g/L) <sup>b</sup>	0,32 (0,24-0,42)	0,29 (0,24-0,52)	

**Tabla 5. Características demográficas, clínicas y de LCR de los pacientes incluidos en la primera validación de la semaforina7A y la CNDP1.** <sup>a</sup>Datos expresados como media (desviación estándar). <sup>b</sup>Datos expresados como mediana (rango intercuartílico). CIS→CIS: pacientes con CIS que no convierten a EM clínicamente definida (EMCD); CIS→EMCD: pacientes con CIS que convierten a EMCD. OEN: controles con otras enfermedades neurológicas. Los números entre paréntesis corresponden al número de individuos.

*3.1.3.3 Pacientes incluidos en la segunda validación***a) Validación de la chitinase 3-like 1**

Se incluyó una cohorte de 52 pacientes con CIS (cohorte 5) procedentes del Hospital Ramón y Cajal de Madrid y totalmente independiente de los pacientes empleados en la fase de *screening* y validación inicial. Los criterios de inclusión fueron los siguientes: **CIS→CIS** – no conversión a EMCD, ausencia de BOC y 0, 1 o 2 criterios de Barkhof en la RM basal (n=26); **CIS→EMCD** – conversión a EMCD, presencia de BOC y 3 o 4 criterios de Barkhof (n=26). Además, se incluyó un grupo de pacientes con otras enfermedades neurológicas inflamatorias (OENI) como control (n=16). Dada la falta de concordancia entre los resultados del estudio de proteómica y la primera validación de estas proteínas, además de validar los resultados observados para la chitinase 3-like 1, se determinaron también los niveles en el LCR de ceruloplasmina y vitamin D BP, para confirmar los resultados obtenidos en la primera validación. Las características de los pacientes pertenecientes a esta cohorte están representadas en la Tabla 6.

Características	CIS→CIS	CIS→EMCD	OENI
N	26	26	16
Muestras en la fase de screening (%)	0	0	-
Edad (años) <sup>a</sup>	36,5 (11,1)	33,6 (8,9)	47,0 (14,7)
Mujer/hombre (%mujer)	18/8 (69,2)	19/7 (73,1)	11/5 (68,8)
Tiempo de seguimiento <sup>a</sup>	2,3 (1,5)	4,9 (3,0)	-
Presentación clínica			
Neuritis óptica <sup>b</sup>	8 (30,8%)	4 (15,4%)	enfermedades autoinmunes (7), SP (2), STH (2), neuritis óptica bilateral (2), ER (1), mielitis (1), neuritis óptica recurrente (1)
Tronco <sup>b</sup>	11 (42,2%)	6 (23,1%)	
Médula <sup>b</sup>	4 (15,4%)	10 (38,5%)	
Otros <sup>b</sup>	3 (11,5%)	6 (32,1%)	

**Tabla 6. Características demográficas y clínicas de los pacientes incluidos para la segunda validación de la chitinase 3-like 1.** <sup>a</sup>Datos expresados como media en años (desviación estándar). <sup>b</sup>Datos expresados como número (porcentaje). CIS→CIS: pacientes con CIS que no convierten a EM clínicamente definida (EMCD); CIS→EMCD: pacientes con CIS que convierten a EMCD. OEN: controles con otras enfermedades neurológicas. Los números entre paréntesis corresponden al número de individuos. SP: síndrome paraneoplásico; STH: síndrome de Tolosa-Hunt; ER: encefalitis de Rasmussen. Los pacientes con enfermedades autoinmunes incluyen el síndrome de Sjögren (2), vasculitis (2), lupus eritematoso sistémico (1), neurosarcoidosis (1), enfermedad de Behçet (1).

**b) Validación de la apolipoproteína AI**

Se incluyeron 74 pacientes con CIS (cohorte 6) de una cohorte totalmente independiente procedentes del Cemcat. Los criterios de inclusión fueron los mismos que los empleados para la validación de la CHI3L1: **CIS→CIS** – no conversión a EMCD, ausencia de BOC y 0, 1 o 2 criterios de Barkhof en la RM basal (n=27); **CIS→EMCD** – conversión a EMCD, presencia de BOC y 3 o 4 criterios de Barkhof (n=47). Además se incluyó un grupo de pacientes con otras enfermedades neurológicas (OEN) como control (n=50). Las características de esta cohorte de pacientes están representadas en la Tabla 7.

Características	CIS→CIS	CIS→EMCD	OEN
N	27	47	50
Muestras en la fase de screening (%)	0	0	-
Edad (años) <sup>a</sup>	30,5 (7,4)	31,1 (6,6)	42,9 (18,3)
Mujer/hombre (%mujer)	22/5 (81,5)	17/7 (70,8)	31/17 (64,6)
Tiempo de seguimiento <sup>a</sup>	4,2 (2,8)	10,7 (16,5)	-
Presentación clínica			
Neuritis óptica <sup>b</sup>	16 (59,3)	15 (31,9)	↓ agudeza visual (2), SAF (1), ataxia cerebelar (1), síndrome confusional (1), diplopía (3), encefalopatía (1), parálisis facial (1), fibromialgia (1), cefalea (2), cefalea y diplopía (1), hemiparesia (2), encefalitis herpética (1), meningitis (1), migraña (1), síndrome de Miller-Fisher (1), EMN (1), NMM (1), LMN (1), neuropatía óptica (5), paraparesia (3), parestesias (1), enfermedad de Parkinson (1), parálisis facial periférica (3), polineuropatía (1), neuritis óptica recurrente (1), alteración sensitiva (2), hemisíndrome sensitivo (1), paraparesia espástica (1), ictus (2), vasculitis (1), vértigo (1)
Tronco <sup>b</sup>	5 (18,5)	12 (25,5)	
Médula <sup>b</sup>	3 (11,1)	16 (34,0)	
Otros <sup>b</sup>	3 (11,1)	4 (8,5)	

**Tabla 7. Características demográficas, clínicas y de LCR de los pacientes incluidos para la segunda validación de la Apo AI.** <sup>a</sup>Datos expresados como media en años (desviación estándar). <sup>b</sup>Datos expresados como número (porcentaje). SAF: síndrome anti-fosfolípido; EMN: enfermedad de motoneurona; NMM: neuropatía motora multifocal, LMN: leucoencefalopatía multifocal necrotizante CIS→CIS: pacientes con CIS que no convierten a EM clínicamente definida (EMCD); CIS→EMCD: pacientes con CIS que convierten a EMCD. OEN: controles con otras enfermedades neurológicas. Los números entre paréntesis corresponden al número de individuos.

**c) Validación de la semaforina 7A y CNDP1**

Se incluyeron 49 pacientes con CIS de una cohorte totalmente independiente, procedentes del Hospital Ramón y Cajal de Madrid (cohorte 7). Los criterios de inclusión fueron los mismos que para la validación de la CHI3L1: **CIS→CIS** – no conversión a EMCD, ausencia de BOC y 0, 1 o 2 criterios de Barkhof en la RM basal (n=25); **CIS→EMCD** – conversión a EMCD, presencia de BOC y 3 o 4 criterios de Barkhof (n=24). Además se incluyó un grupo de pacientes con otras enfermedades neurológicas (OEN) como control (n=22) Las características de esta cohorte de pacientes están representadas en la Tabla 8.

Características	CIS→CIS	CIS→EMCD	OEN
N	25	24	22
Muestras en la fase de screening (%)	0	0	-
Edad (años) <sup>a</sup>	36,5 (12,4)	34,2 (9,3)	42,0 (12,3)
Mujer/hombre (%mujer)	16/9 (64,0)	17/7 (70,8)	12/11 (52)
Tiempo de seguimiento <sup>a</sup>	3,2 (1,3)	10,7 (16,5)	-
Presentación clínica			
Neuritis óptica <sup>b</sup>	8 (32,0)	3 (12,5)	CT (6), contractura postraumática (1), crisis convulsivas (1), cuadro confusional (1), edema de papila (1), ELA (1), ET (2), epilepsia (1), hidrocefalia (2), ictus (2), patología no neurológica (1),
Tronco <sup>b</sup>	4 (16,0)	6 (29,1)	polineuropatía diabética (2), pseudotumor cerebri (2)
Médula <sup>b</sup>	7 (28,0)	10 (41,6)	
Otros <sup>b</sup>	6 (24,0)	4 (16,6)	

**Tabla 8. características demográficas, clínicas y de LCR de los pacientes incluidos para la segunda validación de la sema7A y la CNDP1.** <sup>a</sup>Datos expresados como media en años (desviación estándar). <sup>b</sup>Datos expresados como número (porcentaje). CT: cefalea tensional, ELA: esclerosis lateral amiotrófica, ET: encefalopatía tóxica. CIS→CIS: pacientes con CIS que no convierten a EM clínicamente definida (EMCD); CIS→EMCD: pacientes con CIS que convierten a EMCD. OEN: controles con otras enfermedades neurológicas. Los números entre paréntesis corresponden al número de individuos.

### 3.1.4 Determinaciones clínicas y radiológicas

Las determinaciones clínicas y radiológicas se realizaron siguiendo los criterios descritos anteriormente <sup>161</sup>. De forma resumida, las RM se realizaron de forma basal y al cabo de 1 y 5 años de seguimiento. Se anotaron el número de criterios de Barkhof, el número de lesiones en T2, el número de lesiones captantes de gadolinio y el número de lesiones nuevas en T2. La discapacidad se evaluó mediante la Escala Expandida del Estado de Discapacidad (EDSS). La conversión a EMCD se diagnosticó cuando se produjo un segundo brote clínico. El tiempo de seguimiento se calculó como la diferencia entre la fecha de la última visita y la fecha del CIS.

### 3.1.5 Análisis estadístico

La identificación y cuantificación de proteínas en el estudio de proteómica a partir de los péptidos se realizó mediante el Algoritmo Paragon<sup>TM</sup> con un modo de búsqueda exhaustiva implementada por el software ProteinPilot<sup>TM</sup> 2.0. Las proteínas se identificaron buscando en las bases de datos de UniProt/Swiss-Prot o NCBI nr. Para el análisis, las comparaciones de 6 *pools* se realizaron de la siguiente forma: el *pool* 1 del grupo de pacientes CIS→CIS se comparó directamente con el *pool* 1 del grupo de pacientes CIS→EMCD, el *pool* 2 del grupo CIS→CIS se comparó con *pool* 2 del grupo CIS→EMCD y así sucesivamente. Para cada comparación de *pools*, las proteínas expresadas diferencialmente entre los grupos CIS→CIS y CIS→EMCD ( $p < 0,05$ ) se seleccionaron, y se contabilizó el número de comparaciones entre *pools* en las que se encontraron diferencialmente expresadas. Aquellas proteínas en las que el cambio de expresión fue en direcciones opuestas en las diferentes comparaciones entre *pools* (es decir, en unas comparaciones se habían encontrado con mayor expresión y en otras con menor expresión) no se tuvieron en cuenta para el análisis.

El análisis estadístico se llevó a cabo usando el paquete SPSS 15,0 (SPSS Inc, Chicago, USA). Se usó el test de Mann-Whitney para determinar diferencias significativas en los niveles de las proteínas seleccionadas para la validación tanto en el LCR como en el suero entre los pacientes CIS→CIS y CIS→EMCD como entre los pacientes CIS y los controles. Las correlaciones entre los niveles de proteína validados y los parámetros clínicos y radiológicos de los pacientes con CIS se evaluaron mediante el coeficiente de correlación de Spearman. El desarrollo de EMCD en función de los niveles basales de

## MATERIAL Y MÉTODOS. *Objetivos 1 y 2*

CHI3L1 en el LCR se evaluó mediante un análisis de supervivencia de Kaplan-Meier con la prueba de Log-Rank y con la regresión de riesgos proporcionales de Cox.

Los datos de SRM se procesaron mediante el software Skyline v1.4.0<sup>162</sup> y los picos de datos se evaluaron en base al tiempo de retención, el rango de intensidad de la transición y la co-elución del péptido endógeno y de referencia.

Las intensidades de los picos de los datos de SRM se normalizaron en base a los péptidos estándar marcados y se transformaron mediante el logaritmo en base 2, y la comparación de los niveles de proteína entre grupos se realizó mediante un modelo lineal de efectos mixtos aplicado por el software SRMstats<sup>163</sup>.

## **3.2 Objetivo 3. Validación de la CHI3L1 a gran escala**

### **3.2.1 Determinaciones**

#### *3.2.1.1 Cuantificación de CHI3L1 en LCR*

Se determinaron los niveles de CHI3L1 en las muestras de LCR de los pacientes con CIS y los controles con otras enfermedades neurológicas usando el mismo kit de ELISA comercial descrito en el capítulo anterior, siguiendo las recomendaciones del fabricante.

#### *3.2.1.2 Cálculo del cociente de albúmina (Q-alb)*

En un subgrupo de 59 pacientes con CIS (40 pacientes procedentes de la Universidad de Basilea (Suiza) y 19 procedentes de la Universidad de Ulm (Alemania)), se calculó el cociente de la concentración de albúmina entre el LCR/suero o cociente de albúmina (Q-alb).

### **3.2.2 Muestras**

#### *3.2.2.1 Obtención del LCR*

Las muestras de LCR y se obtuvieron a nivel basal mediante punción lumbar. Las muestras se centrifugaron durante 5 minutos a 1500 rpm para eliminar las células. Una fracción se usó para el diagnóstico de rutina que incluía la determinación de las bandas oligoclonales de IgG mediante isoelectroenfoque en gel de agarosa seguido de inmunodetección con peroxidasa usando muestras de LCR y suero pareadas. También se determinaron el número de células, la concentración de proteína y la determinación del índice de IgG. El volumen sobrante se alicuotó y se conservó a -80°C hasta el momento de su uso.

### **3.2.3 Pacientes**

#### *3.2.3.1 Pacientes con CIS incluidos en el estudio*

Se incluyeron 813 pacientes con CIS procedentes de 15 centros europeos de EM. Los criterios de inclusión fueron: un CIS sugestivo de desmielinización del SNC incluyendo el nervio óptico, tronco encefálico, médula espinal u otra topografía no atribuible a

otras enfermedades, e inicio de los síntomas neurológicos como máximo 3 meses antes de los exámenes clínicos y radiológicos. El estudio se aprobó por el Comité Ético local correspondiente. La Tabla 8 resume las características clínicas y demográficas de la cohorte global. Las características clínicas y demográficas de los pacientes con CIS y los controles desglosados por centros se describen en la Tabla 23 del Anexo.

### 3.2.3.2 Controles

Como controles se incluyeron un total de 559 pacientes con otras enfermedades neurológicas: 438 pacientes con enfermedades neurológicas no inflamatorias (OENNI) y 121 con otras enfermedades neurológicas inflamatorias (OENI). Las características demográficas de los controles están descritas en la Tabla 9.

Características	CIS→CIS	CIS→EMCD	OENNI	OENI
N	394	419	438	121
Edad (años) <sup>a</sup>	33,9 (9,7)	30,6 (8,1)	43,6 (16,6)	44,7 (18,3)
mujer/hombre (%mujer)	296/98 (75,1)	297/122 (70,9)	249/183 (57,6)	51/69 (42,5)
Tiempo seguimiento <sup>b</sup>	3,5 (2,0-5,6)	5,7 (3,2-9,4)	-	-
Presentación clínica			-	-
Neuritis óptica	163	132		
Tronco	84	97		
Médula	88	123		
Otros	59	65		
% pacientes tratados	20,60%	45,10%	-	-
BOC (%)	243/377 (64,4)	344/407 (84,5)	-	-
Leucocitos (células/ $\mu$ l) <sup>a</sup>	9,2 (19,7)	9,9 (15,2)	-	-
Concentración proteína				
(g/L) <sup>a</sup>	36,5 (13,8)	39,2 (18,6)	-	-
Índice de IgG <sup>a</sup>	0,8 (0,5)	1,0 (0,6)	-	-

**Tabla 9. Características demográficas, clínicas y de LCR de los pacientes y controles incluidos en la validación a gran escala de la chitinase 3-like 1.** <sup>a</sup>Datos expresados como media (DE). <sup>b</sup>Datos expresados como mediana (rango intercuartílico). CIS→CIS: pacientes con CIS que no convierten a EM clínicamente definida (EMCD); CIS→EMCD: pacientes con CIS que convierten a EMCD. OENNI: controles con otras enfermedades neurológicas no inflamatorias. OENI: controles con otras enfermedades neurológicas inflamatorias.



### 3.2.4 Determinaciones clínicas y radiológicas

La RM, determinaciones del LCR y exámenes clínicos se realizaron en cada centro como parte del proceso diagnóstico. Se anotaron el número de criterios de Barkhof, número de lesiones en T2, y el número de lesiones que realzan con gadolinio en la resonancia basal. La determinación de bandas oligoclonales de IgG se realizó mediante isoelectroenfoque en gel de agarosa seguido de inmunodetección con peroxidasa de muestras de suero y LCR pareadas. La discapacidad se evaluó mediante el EDSS y se anotó el tiempo hasta alcanzar un EDSS de 3. El tiempo de seguimiento se calculó como la diferencia entre la última visita y la fecha del CIS. El diagnóstico de conversión a EM según los criterios de Poser se determinó cuando aparecieron nuevos síntomas (segundo brote) después de un intervalo mínimo de un mes y únicamente cuando se excluyeron otros diagnósticos.

El diagnóstico de conversión a EM definido por los criterios de McDonald del 2005 se realizó cuando los pacientes cumplieron las definiciones de RM para diseminación en tiempo y espacio <sup>106</sup>; o cuando los pacientes presentaron un segundo brote <sup>106</sup>.

La fracción del parénquima cerebral (BPF, del inglés *brain parenchymal fraction*) se calculó como el cociente entre el volumen del parénquima cerebral y el volumen intracraneal total.

### 3.2.6 Análisis estadístico

El análisis estadístico se realizó usando el paquete SPSS 17,0 (SPSS Inc, Chicago, USA). Considerando que los niveles de CHI3L1 en el LCR no seguían una distribución normal y además se correlacionaban con la edad (coeficiente de correlación de Spearman: 0,333; p-valor=5,2x10<sup>-36</sup>) se usó un test de Mann-Whitney para comparar los niveles de CHI3L1 ajustados por edad entre los pacientes CIS y los controles con otras enfermedades neurológicas. Se usaron curvas ROC (*Receiver Operating Characteristic*) para determinar el mejor valor umbral (*cut-off*) basado en los niveles de CHI3L1 en el LCR. Se usaron modelos de regresión de Cox univariado y multivariado incluyendo el número de criterios de Barkhof en la RM basal, la presencia de bandas oligoclonales de IgG, tratamiento y edad en el momento del CIS como co-variables para determinar la asociación entre los niveles de CHI3L1 en el LCR y el tiempo a EM según los criterios de Poser o McDonald y el tiempo para alcanzar un EDSS de 3,0. Por

otro lado, el tiempo a EM según los criterios de Poser y McDonald, y el tiempo hasta alcanzar un EDSS de 3,0 en pacientes con niveles de CHI3L1 en el LCR clasificados como altos y bajos se evaluaron mediante un análisis de supervivencia de Kaplan-Meier con la prueba del Log-Rank. Se usó un test de Mann-Whitney para evaluar diferencias significativas en los niveles de CHI3L1 en el LCR ajustados por edad de los pacientes con diferentes categorías tanto de carga lesional en T2 como de número de lesiones inflamatorias. Se usaron correlaciones parciales ajustadas por edad para evaluar la relación entre los niveles de CHI3L1 en el LCR y (i) el cociente de albúmina; (ii) las características del LCR como número de células, concentración de proteína e índice de IgG; y (iii) el cambio en la fracción de parénquima cerebral (BPF) al año y a los 5 años de seguimiento.

### **3.3 Objetivo 4A. Estudio de la CHI3L1 en la EM**

#### **3.3.1 Determinaciones**

##### *3.3.1.1 Determinación de CHI3L1 en plasma*

Los niveles de chitinase 3-like 1 se determinaron mediante ELISA con el *METRA, EIA kit* (Quidel Corporation, San Diego, USA) en muestras de plasma sin diluir, siguiendo las instrucciones del fabricante. La variabilidad intra-ensayo fue del 2,1% y la variabilidad inter-ensayo del 11,9%.

##### *3.3.1.2 Genotipado de CHI3L1*

Se realizó el genotipado de un polimorfismo de un sólo nucleótido (SNP) en la región promotora del gen de la CHI3L1 (rs4950928) mediante dos técnicas. En las muestras de la cohorte de Barcelona/Cemcat, el genotipado se realizó mediante sondas TaqMan para la discriminación alélica siguiendo las instrucciones del fabricante. En las muestras de ADN del resto de cohortes el genotipado se llevó a cabo con la plataforma iPLEX™ Sequenom MassARRAY en el Centro Nacional de Genotipado (CEGEN, Santiago de Compostela).

##### *3.3.1.3 Tinción de Hematoxilina-Eosina y Klüver Barrera*

Se realizaron las tinciones de Hematoxilina-Eosina y de Klüver Barrera en las muestras de tejido cerebral para determinar el grado de actividad inflamatoria de las lesiones de los pacientes con EM. Se clasificaron como lesiones de alta actividad inflamatoria aquellas en las que existía un infiltrado inflamatorio perivascular importante y dónde se observaba desmielinización activa, es decir, la presencia de macrófagos fagocitando mielina. Por otro lado se clasificaron como lesiones de baja actividad inflamatoria aquellas en las que el infiltrado inflamatorio era menor y dónde no se observaba desmielinización activa. El protocolo detallado de las tinciones se encuentra en el apartado *Anexos*.

##### *3.3.1.4 Inmunohistoquímicas de CHI3L1*

Inicialmente se realizó la tinción de CHI3L1 simple usando el anticuerpo de conejo anti-YKL-40 (1:100, Quidel Corporation), y posteriormente se realizó la tinción por inmunohistoquímica doble mediante el kit comercial EnVision™G|2 Doublestain System,

Rabbit/Mouse (DAB+/Permanent Red; K5361, Dako). La tinción para CHI3L1 se realizó con el anticuerpo de conejo anti-YKL-40 (1:100, Quidel Corporation). Los astrocitos se marcaron con el anticuerpo de conejo anti-GFAP (1:900, Z0334, Dako, Dinamarca), los macrófagos y microglía se marcaron con el anticuerpo de ratón anti-CD68 (1:400, M0876, Dako) y los linfocitos T con el anticuerpo de conejo anti-CD3 (1:100, A0452, Dako). Las muestras se contrastaron con REAL Haematoxylin (S2020, Dako) durante 5 segundos y se realizaron lavados con agua destilada. Los portaobjetos se secaron y se montaron con Dako Glycerol Mounting Medium (C0563, Dako) y conservaron a 4°C hasta su análisis. Ver la sección del Anexo para el protocolo detallado de las tinciones.

### *3.3.1.5 Citometría de CHI3L1*

#### **a) Análisis de la especificidad del anticuerpo**

Dado que no existía ningún anticuerpo anti-CHI3L1 específico para citometría de flujo, inicialmente se realizaron experimentos para determinar la especificidad del anticuerpo. Para ello se realizaron experimentos de bloqueo incubando 1 µg del anticuerpo anti-CHI3L1 con 2 µg de la proteína CHI3L1 humana recombinante (TP303769, Origene) durante 30 minutos a 4°C antes de la tinción celular.

#### **b) Expresión de CHI3L1 en células del LCR**

La expresión de CHI3L1 se determinó en muestras de LCR frescas de 5 pacientes no tratados con EM consecutivos y 5 controles neurológicos no inflamatorios (neuropatía óptica, traumatismo craneal, quiste aracnoideo y dos controles con neuropatías). El estudio fue aprobado por el Comité Ético del Hospital Ramón y Cajal de Madrid.

Las muestras de LCR se centrifugaron a 500 g durante 15 minutos y los pellets celulares se resuspendieron en PBS. Se realizó la tinción de membrana con los siguientes anticuerpos: anti-CD45, anti-CD3, anti-CD14 y los correspondientes controles de isotipo (Becton Dickinson, Mountain View, CA) incubando durante 30 minutos a 4°C. Seguidamente se permeabilizaron las células con 200 µl de cytofix/cytoperm (Becton Dickinson) durante 20 minutos a 4°C y a continuación se lavaron con Perm/Wash y se realizó la tinción intracelular incubando las células durante 1 hora a 4°C con 1 µg de anti-CHI3L1 (Quidel Corporation) o el correspondiente control de isotipo previamente biotinados con sulfo-NHS-biotin (Pierce, Rockford, USA) siguiendo las instrucciones del fabricante. Finalmente, las células se incubaron con

estreptavidina-PE durante 45 minutos y se analizaron en un citómetro FACSCanto II (Becton Dickinson).

Para el análisis de las poblaciones se seleccionó una región alrededor de las células con una expresión media-alta de CD45 con un *side scatter* de bajo a medio (P1) y una segunda región en el *scatter dot plot* del *forward/side scatter* para excluir las células apoptóticas y los restos celulares (P2). Únicamente las células incluidas en P1 y P2 se analizaron. La población de monocitos se seleccionó haciendo un *gating* del *side scatter* frente a la expresión de CD14, con lo que se identificaron las subpoblaciones de CD14 low (CD14<sub>low</sub>) y CD14 high (CD14<sub>high</sub>). Por otro lado se identificaron las células T haciendo un *gating* del *side scatter* frente a la expresión de CD3. Se puede observar la estrategia de *gating* en la Figura 32 del Anexo.

### **3.3.2 Muestras**

#### *3.3.2.1 Obtención del plasma*

La sangre se obtuvo por punción venosa en tubos con EDTA y el plasma se separó mediante centrifugación a 1500 rpm durante 10 minutos a temperatura ambiente. El plasma se alicuotó y se congeló a -80°C hasta su uso.

#### *3.3.2.2 Extracción de ADN genómico*

El ADN se extrajo en cada centro siguiendo protocolos estándar. Las muestras de ADN de los pacientes de la cohorte Barcelona/Cemcat se extrajeron siguiendo el protocolo estándar detallado en el Anexo.

#### *3.3.2.3 Muestras de tejido cerebral*

Se estudiaron 15 muestras de tejido cerebral incluido en parafina de 15 pacientes con EMRR y 10 muestras de tejido cerebral de 10 controles no neurológicos cedidas por el *UK Multiple Sclerosis Tissue Bank*.

#### *3.3.2.4 Muestras de LCR*

Las muestras de LCR se obtuvieron mediante punción lumbar, se centrifugaron a 500 g durante 15 minutos y los pellets celulares obtenidos se resuspendieron en PBS.

**3.3.3 Pacientes****3.3.3.1 Pacientes incluidos para la determinación de los niveles plasmáticos de CHI3L1**

Para la determinación de los niveles de CHI3L1 en plasma se incluyeron un total de 220 pacientes con EM y 57 controles sanos. El grupo de pacientes con EM estaba compuesto por: 94 pacientes con EMRR en remisión, 30 pacientes con EMSP, 66 pacientes con EMPP. Estos pacientes no habían recibido tratamiento con IFN- $\beta$  o inmunomoduladores en los 3 meses anteriores a la extracción de la muestra. Se incluyó un grupo de pacientes con EMRR durante el brote (n=30) así como un grupo de pacientes EMRR tratados con IFN- $\beta$  durante un período medio de 8,7 meses (n=32). Las características clínicas y demográficas de los pacientes y controles incluidos están descritas en la Tabla 10.

Características	EMRR			EMSP	EMPP	CS
	remisión	brote	IFN- $\beta$			
N	94	30	32	30	66	57
Edad (años) <sup>a</sup>	37,0 (9,1)	31,4 (8,8)	30,7 (7,4)	49,2 (10,4)	49,2 (9,4)	37,1 (11,5)
Mujer/hombre (%mujer)	66/28 (70,2%)	21/9 (30,0%)	22/10 (68,7%)	20/10 (66,7%)	32/34 (48,5%)	40/17 (70,2%)
Duración enfermedad (años) <sup>a</sup>	6,2 (5,8)	5,4 (4,8)	6,4 (6,6)	14,6 (9,4)	11,3 (7,3)	-
EDSS <sup>b</sup>	2,0 (1,5-2,5)	3,0 (2,5-3,5)	2,0 (1,5-3,0)	4,5 (4,0-6,0)	6,0 (4,5-6,5)	-
Número de brotes en los dos años previos <sup>a</sup>	2,0 (1,2)	1,8 (1,9)	2,4 (1,2)	0,5 (0,7)	-	-

**Tabla 10. Características demográficas y clínicas de los pacientes incluidos en el estudio de la chitinase 3-like 1 en las diferentes formas clínicas de EM.** <sup>a</sup>Datos expresados como media (DE). <sup>b</sup>Datos expresados como mediana (rango intercuartílico). EMRR: esclerosis múltiple remitente-recurrente. EMSP: esclerosis múltiple secundariamente progresiva. EMPP: esclerosis múltiple primariamente progresiva. CS: control sano. EDSS: expanded disability status scale.

### 3.3.3.2 Pacientes incluidos para el estudio de un polimorfismo en el promotor del gen de la CHI3L1

Para el genotipado del polimorfismo en el promotor del gen de la CHI3L1 se incluyeron un total de 3274 pacientes con EM y 3483 controles sanos procedentes de cuatro regiones geográficas de España (Tabla 11).

Región	Cohorte	diagnóstico	n	Edad	Razón Mujer/Hombre	% EMPP
Este	BCN Cemcat	EM	803	40,4	1,7	12,2
		CS	814	38,7	1,1	-
	BCN Hospital Clínic	EM	204	45,5	1,9	5,4
		CS	213	ND	1,9	-
Sur	Andalucía	EM	1044	39,8	2,2	1,0
		CS	1216	35,5	2,5	-
Centro	Madrid	EM	497	45,0	1,9	13,0
		CS	534	ND	1,8	-
Norte	Bilbao	EM	514	40,7	2,6	10,7
		CS	459	ND	2,6	-
	San Sebastián	EM	212	42,9	1,5	3,3
		CS	213	50,7	1,4	-

**Tabla 11. Características de las cohortes de pacientes distribuidas por regiones de los pacientes y controles incluidos en el estudio del genotipado del polimorfismo del promotor del gen de la chitinase 3-like 1.** EM: esclerosis múltiple. CS: control sano. N: número de pacientes por grupo. Edad: edad media expresada en años. % EMPP: porcentaje de pacientes con EM primariamente progresiva. ND: datos no disponibles. BCN: Barcelona

### 3.3.4 Análisis estadístico

El análisis estadístico se realizó usando el paquete SPSS 17,0 (SPSS Inc, Chicago, USA). Se usó un análisis de la covarianza (ANCOVA) para comparar los niveles plasmáticos de CHI3L1 entre los controles sanos y el grupo de pacientes con EM, y entre los pacientes con diferentes formas clínicas de EM (pacientes con EMRR en remisión, pacientes con EMSP y pacientes con EMPP). Dado que en este estudio la edad media entre los pacientes con EM y los controles era significativamente diferente

(análisis de ANOVA,  $p$ -valor= $2,7 \times 10^{-18}$ ) y que los niveles de CHI3L1 se correlacionaban con la edad (coeficiente de correlación de Spearman: 0,368,  $p$ -valor= $4,5 \times 10^{-9}$ ), la edad se incluyó como co-variable en el modelo. Se usó un test de Mann-Whitney para determinar diferencias significativas en los niveles plasmáticos de CHI3L1 entre los pacientes con EMRR en el momento del brote y durante el período de remisión. Las comparaciones de los niveles de CHI3L1 antes y después del tratamiento con IFN- $\beta$  se realizaron con la prueba de los rangos con signo de Wilcoxon. Se usaron correlaciones parciales controladas por edad para evaluar la relación entre los niveles de CHI3L1 y variables clínicas y radiológicas. Se usó la corrección de Bonferroni para múltiples comparaciones. Para investigar asociaciones potenciales entre el SNP rs4950928 y la enfermedad, las frecuencias alélicas se compararon entre los controles sanos y la cohorte de pacientes con EM, así como entre las diferentes formas clínicas de la enfermedad teniendo en cuenta la posible estratificación debida a los diferentes orígenes de la población usando el test de Cochran-Mantel-Haenszel. El procesamiento de los datos, los datos *missing* y el análisis de Hardy-Weinberg se realizaron con SNPator (<http://www.snparator.org>)<sup>164</sup>. El test de Cochran-Mantel-Haenszel se realizó usando PLINK (<http://pngu.mgh.harvard.edu/~purcell/plink/>)<sup>165</sup>. Las diferencias entre los genotipos del SNP rs4905928 y los niveles plasmáticos de CHI3L1 y el tiempo de conversión a EMCD se evaluaron mediante un test de Mann-Whitney. Se usó un test de Mann-Whitney para evaluar las diferencias en la expresión de CHI3L1 por las células T CD3+ y los monocitos CD14+ entre los pacientes con EM y los controles. Dada la naturaleza descriptiva del estudio histopatológico no se realizó una cuantificación ni un análisis estadístico de las muestras.



### **3.4 Objetivo 4B. Estudio de la función de la CHI3L1 en el modelo animal de EM**

#### **3.4.1 Animales**

Se usaron ratones C57BL/6 machos y hembras de 8 a 12 semanas de edad, knock-out (KO) para el gen Brp-39 (nombre del gen chi3l1 en murinos; cedidos por JA Elias, Yale University School of Medicine, New Haven, <sup>166</sup>) y sus hermanos de camada de fenotipo común (*wild type*, WT). Los animales se mantuvieron en ciclos de 12 horas de luz con agua y comida *ad libitum*. Los experimentos se realizaron acorde con las regulaciones de la Unión Europea y fueron aprobados por el Comité Ético para Experimentación Animal de la institución.

##### *3.4.1.1 Inducción de la enfermedad*

Los ratones fueron anestesiados mediante la administración intraperitoneal de ketamina (37 mg/kg) – xilacina (5,5 mg/kg) e inmunizados con inyecciones subcutáneas de PBS con 50 µg de MOG<sub>35-55</sub> (Proteomics Section, Universitat Pompeu Fabra, Barcelona, España) en emulsión con una mezcla de adyuvante completo de Freund (CFA) (Sigma Chemical, Saint Louis, MO, USA) con 3 mg/ml de *Mycobacterium tuberculosis* H37RA (Difco Laboratories, Detroit, MI). En los días 0 y 2 post-inmunización (p.i.), los ratones recibieron 150 ng de toxina de *Bordetella pertusis* (Sigma Chemical) en 200 µl de PBS por vía intravenosa. Se incluyeron ratones control inmunizados con PBS sin el péptido. Todos los animales se pesaron y se examinaron diariamente para la detección de los signos neurológicos de acuerdo con los siguientes criterios:

Grado	Síntoma clínico
0	Sin signos clínicos
0,5	Paresia parcial de la cola
1	Paresia total de la cola
2	Paraparesia trasera leve
2,5	Paraparesia trasera severa o paraplegia
3	Tetraparesia leve
4	Tetraparesia
4,5	Tetraparesia severa
5	Tetraplegia, moribundo
6	Éxitus

**Escala de puntuación de los síntomas clínicos o "score"**

Los experimentos se realizaron en ciego.

### **3.4.2 Muestras**

#### *3.4.2.1 Extracción de ADN de tejido*

Se recogieron muestras de tejido de la oreja de los ratones para realizar el genotipado y establecer las colonias. De estas muestras se obtuvo el ADN mediante el kit comercial REExtract-N-Amp™ Tissue PCR Kit (XNAT, Sigma-Aldrich, St Luis, USA) siguiendo las instrucciones del fabricante.

#### *3.4.2.2 Obtención de cerebro y médula espinal*

En los días 12 y 31 post-inmunización se obtuvo el cerebro y la médula espinal de los ratones mediante la insuflación de PBS con una jeringa. El cerebro y la parte anterior de la médula se fijaron en una solución de paraformaldehído 4% en PBS, mientras que la parte posterior de la médula se congeló inmediatamente en criotubos con nitrógeno líquido y se conservó a -80°C hasta el momento de su uso.

#### *3.4.2.3 Extracción de ARN*

Las médulas espinales de los ratones se descongelaron sobre hielo y se extrajo el ARN mediante un protocolo estándar. Para los detalles del protocolo, ver el apartado de *Anexos*. El ARN obtenido se cuantificó con el NanoDrop® 1000 Spectrophotometer (Thermo Fisher Scientific).

### **3.4.3 Determinaciones**

#### *3.4.3.1 Genotipado de Brp-39*

Para el genotipado de cada muestra se prepararon dos reacciones de amplificación: una para los *primers* del gen Brp-39 y otra para los *primers* del gen de resistencia a la neomicina (Tabla 12).

Las reacciones de amplificación se desarrollaron en un termociclador siguiendo los siguientes ciclos: 3 minutos a 95°C, 35 ciclos de 45 segundos a 95°C, 45 segundos a 60°C, 1 minuto a 72°C y finalmente 10 minutos a 72°C. Los productos de PCR se corrieron en un gel de agarosa al 1% con 0,1% de bromuro de etidio.

Reactivo	Casa comercial	Referencia	Volumen (µl)
Go Taq colorless master mix	Promega	M7142	13,5
Primer Forward	Invitrogen	-	1
Primer Reverse	Invitrogen	-	1
ADN	-	-	1
H <sub>2</sub> O RNase free	-	-	8,5

**Tabla 12. Reactivos usados para cada reacción de PCR para el genotipado del gen Brp-39 o del gen de resistencia a neomicina.**

Primer	Secuencia
Primer Forward Brp-39	ACTCAGCCCCTGTGGTAATG
Primer Reverse Brp-39	GTGCACAGGAAAGGTTGGAT
Primer Forward <i>Neomicina</i>	TGCTCCTGCCGAGAAAGTAT
Primer Reverse <i>Neomicina</i>	AGCTGGCCCTTAATTTGGTT

**Tabla 13. Primers usados para el genotipado de Brp-39 o del gen de resistencia a la neomicina.**

### ***Preparación del gel de agarosa***

Se pesó la agarosa (Invitrogen, 16500) necesaria y se añadió el volumen de tampón TBE (Sigma, T4415) diluido (1x) correspondiente. La mezcla se calentó en el microondas y se agitó hasta su completa disolución. A continuación se enfrió, se le añadió bromuro de etidio (Sigma, E1510) (dilución 1:1.000) y se puso en la cubeta con un peine. Una vez polimerizado el gel se cargaron 20 µl de las muestras previamente mezcladas con 4 µl de tampón de carga *loading dye orange* (Biolabs, B70225). Se cargaron también 5 µl de del marcador de peso molecular 100 pb DNA ladder (Biolabs, N3231S) en el pocillo correspondiente. Se corrió el gel a 60-90V y se leyeron los resultados en el Molecular Imager® Gel Doc™ XR System (Bio-Rad).

### ***3.4.3.2 Expresión génica de Brp-39***

Un total de 1 µg del ARN obtenido de las médulas se retrotranscribió mediante el kit comercial *High Capacity cDNA Reverse Transcription* (Applied Biosystems) siguiendo

las instrucciones del fabricante. Con el ADN copia (cDNA) obtenido se determinó la expresión de Brp-39 mediante sondas Taqman (Applied Biosystems) usando el gen PPIB como control endógeno. Las amplificaciones se realizaron por triplicado y la lectura se realizó en un equipo 7900HT Fast-RT PCR (Applied Biosystems). El valor del *threshold cycle* (Ct) y la expresión relativa de la Brp-39 para cada muestra se calculó mediante el método del  $2^{-\Delta\Delta CT}$ .

#### *3.4.3.3 Ensayos de proliferación*

El día 16 post-inmunización, 5 animales de cada grupo se eutanasiaron con CO<sub>2</sub> (>70%) y se obtuvieron los bazos. Se prepararon las suspensiones de esplenocitos homogenizando los bazos con la parte trasera de una jeringa y haciéndolos pasar a través de un *cell strainer* con un poro de 40 µm (BD Biosciences, 352350) sobre una placa de petri con medio de cultivo. Tras la lisis de los eritrocitos las suspensiones de esplenocitos se contaron y se sembraron en placas de 96 pocillos a una concentración de  $2 \times 10^5$  células/pocillo en un volumen final de 200 µl de medio de proliferación. Los cultivos (5 réplicas) se estimularon con 5 µg/ml de MOG<sub>35-55</sub>, 5 µg/ml de PHA (Sigma Chemical) o 15 µg/ml de LPS (Sigma Chemical). Los estímulos se realizaron solos o con 50 ng/ml de CHI3L1 recombinante de ratón (R&D Systems, Minneapolis). Se usaron las células cultivadas sin ningún estímulo como controles basales. Los cultivos se incubaron en una atmósfera húmeda con un 5% de CO<sub>2</sub> y 37°C durante 48 horas. Tras la estimulación, se recogieron 50 µl de los sobrenadantes y se cultivaron las células durante 18 horas en presencia de 1 µCi de [3H]Timidina (Perkin Elmer) por pocillo. Las placas de cultivo se congelaron a -20°C hasta el momento de la lectura. Para la cuantificación de la radioactividad las placas se descongelaron a temperatura ambiente y a continuación las células se recogieron con un Harvester en filtros de fibra de vidrio y los niveles de radioactividad incorporada se determinaron mediante un contador de centelleo (Perkin Elmer, Waltham, MA). Los índices de estimulación se calcularon como el promedio de las cuentas por minuto (cpm) de las réplicas del estímulo dividido por el promedio de las cpm de los cultivos control (sin estímulo). Para el protocolo detallado del ensayo ver la sección Anexos.

***Medio de proliferación***

Se preparó el medio de proliferación siguiendo la siguiente fórmula (Tabla 14), al cual se añadieron los estímulos correspondientes especificados en el apartado anterior, o la [3H]Timidina.

Reactivo	Casa comercial	Referencia	Volumen (ml)
IMDM	PAA	E15-018	500
FBS Hyclone	Thermo Scientific	SH30080.03	62,5
Penicilina- Streptomycin	GIBCO	15140	6,25
L-Glutamina	GIBCO	25030	6,25
B-mercaptoetanol (80nM)	Sigma	M3148	1,25

**Tabla14. Reactivos usados para la preparación del medio de proliferación de los esplenocitos.**

***3.4.3.4 Histopatología***

El día 31 post-inmunización se sacrificaron con dióxido de carbono (>70%) cinco animales por grupo. Se obtuvieron los cerebros y médulas y se fijaron con paraformaldehído preparado al 4% y se incluyeron en parafina. Se realizaron cortes de los tejidos de 4 µm de grosor y se realizaron las tinciones de HE y de KB para determinar el grado de inflamación y desmielinización respectivamente. Para el protocolo detallado de las tinciones ver el apartado de Anexos.

***Evaluación de la histopatología:***

El grado de infiltración celular se evaluó mediante una tinción de HE de acuerdo con los siguientes criterios: 0 – sin lesión; 1 – infiltrado celular únicamente en las meninges; 2 – infiltrados discretos y superficiales en el parénquima; 3 – infiltrados moderados (menos del 25%) en la sustancia blanca; 4 – infiltración severa (menos del 50%) en la sustancia blanca; y 5 – infiltración muy severa (más del 50%) en la sustancia blanca.

La desmielinización se evaluó mediante la tinción de KB y se puntuó de la siguiente manera: 0 – sin desmielinización; 1 – leve desmielinización, únicamente alrededor de los infiltrados y constituyendo menos del 25% de la sustancia blanca; 2 –

desmielinización de menos del 50% de la sustancia blanca; y 3 – desmielinización difusa y generalizada constituyendo más del 50% de la sustancia blanca.

Las tinciones de HE y de KB se evaluaron en ciego.

#### **3.4.4 Análisis estadístico**

El análisis estadístico se realizó usando el paquete SPSS 17,0 (SPSS Inc, Chicago, USA). Se usó un test de Mann-Whitney para la comparación de (i) la expresión génica de Brp-39 a diferentes tiempos post-inmunización entre los ratones inmunizados con MOG y los inmunizados con SF; (ii) los scores medios acumulados; y (iii) los índices de proliferación entre ratones WT y KO. Los cocientes de mortalidad se calcularon mediante un test de chi-cuadrado. Las diferencias se consideraron estadísticamente significativas cuando los p-valores fueron  $< 0,05$ .



## 4. RESULTADOS





***Resultados relacionados con el objetivo 1: Identificación de biomarcadores pronósticos asociados con la conversión a EM y desarrollo de discapacidad en pacientes con CIS mediante un abordaje proteómico en muestras de líquido cefalorraquídeo***



#### 4.1.1 Estudio de proteómica: fase de *screening*

En una primera fase del trabajo se realizó un estudio de proteómica mediante iTRAQ acoplado a espectrometría de masas con *pooles* de muestras de LCR de pacientes con CIS que convertían a EMCD y muestras de pacientes que no convertían, con el objetivo de encontrar perfiles de expresión proteica que permitieran distinguir entre los dos grupos de pacientes.

Tras llevar a cabo el abordaje de proteómica, se encontraron proteínas diferencialmente expresadas en 3 o más *pooles* de LCR entre el grupo de pacientes con CIS que convirtieron a EMCD (CIS→EMCD) y los pacientes con CIS que no convirtieron durante el seguimiento (CIS→CIS) (Tabla 15).

Proteína	Número de acceso	Expresión <sup>a</sup>	Número de <i>pooles</i> <sup>b</sup>
Ceruloplasmina	P00450	↑	6
Vitamin D binding protein	P02774	↑	6
Apolipoproteína AI	P02647	↑	6
Chitinase 3-like 1	P36222	↑	5
Semaforina 7A	O75326	↓	4
Beta-Ala-His dipeptidase	Q96KN2	↓	4
Plasminógeno	P00747	↑	4
Vitronectina	P04004	↑	4
Apolipoproteína AIV	P06727	↑	4
Ig alpha-1 chain C region	P01876	↑	4
Ig kappa chain C region	P01834	↑	4
Ig mu chain C region	P01871	↑	4
Ig lambda chain C region	P01842	↑	4
Brevican core protein	Q96GW7	↓	3
Secretogranin II	P13521	↓	3
Proactivator polypeptide	P07602	↓	3
Thy-1 membrane glycoprotein	P04216	↓	3
Alpha-1-antichymotrypsin	P01011	↑	3
Serum paraoxonase/arylesterase 1	P27169	↑	3
Corticosteroide-binding globulin	P08185	↑	3
Haptoglobin	P00738	↑	3
Heparin cofactor 2	P05546	↑	3
Alpha-2-antiplasmin	P08697	↑	3

**Tabla 15. Proteínas expresadas de forma diferencial en la fase de *screening* mediante un abordaje proteómico en muestras de LCR de pacientes con CIS conversores y no conversores a EMCD.** <sup>a</sup>Se refiere a la dirección en la expresión de la proteína: ↑= mayor expresión en el grupo CIS→EMCD (conversores) que en el grupo CIS→CIS (no conversores); ↓= menor expresión en el grupo CIS→EMCD (conversores) que en el grupo CIS→CIS (no conversores). <sup>b</sup>Se refiere al número de comparaciones de *pooles* en los que la proteína se encontró diferencialmente expresada en la misma dirección entre los pacientes del grupo CIS→CIS y del grupo CIS→EMCD.

## RESULTADOS. *Objetivo 1*

Se identificaron 23 proteínas diferencialmente expresadas entre los dos grupos de pacientes, 17 de las cuales estaban más expresadas en los pacientes con CIS que convertían a EMCD respecto a los que no convertían, como es el caso de la ceruloplasmina, proteína de unión a la vitamina D, apolipoproteína AI, o chitinase 3-like 1, mientras que otras 6 se encontraron disminuidas en los pacientes con CIS que convertían a EM respecto a los que se mantenían como CIS, como por ejemplo la semaforina 7A y la ala-beta-his dipeptidasa.

***Resultados relacionados con el objetivo 2: Validación inicial de los principales biomarcadores pronósticos derivados del estudio proteómico en cohortes adicionales de pacientes con CIS mediante técnicas alternativas de detección***



#### 4.1.2 Validación de proteínas diferencialmente expresadas mediante técnicas alternativas

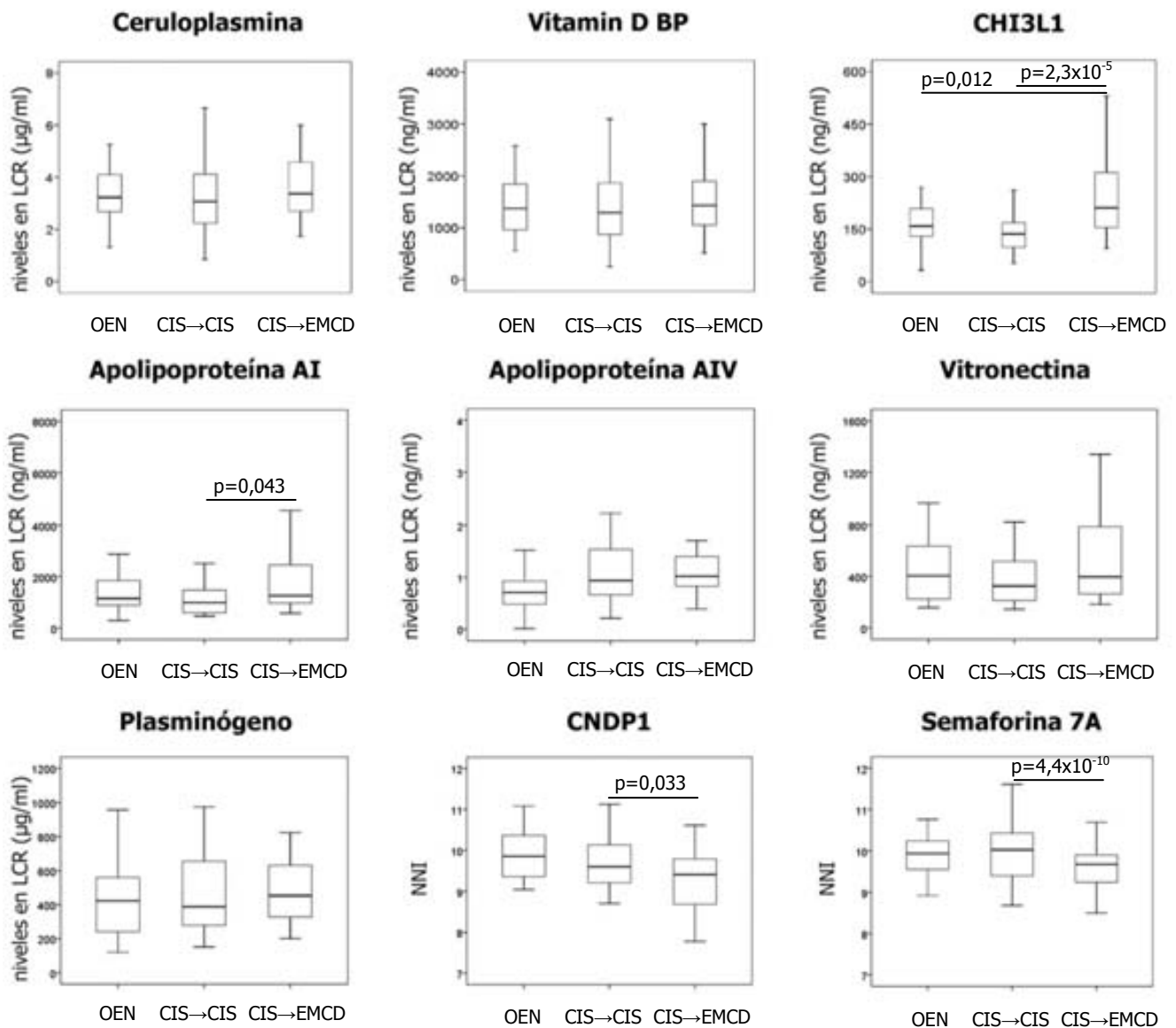
Dado que el abordaje de proteómica empleado es una técnica de *screening*, es importante la confirmación de los resultados obtenidos con iTRAQ mediante técnicas alternativas. También es importante determinar si las diferencias observadas en LCR para los diferentes biomarcadores se encuentran también presentes en otros fluidos corporales de más fácil obtención que el LCR. Teniendo en cuenta estos aspectos, se seleccionaron aquellas proteínas encontradas diferencialmente expresadas en 4 o más *pools* entre los pacientes CIS→CIS y los pacientes CIS→EMCD, y los niveles de ceruloplasmina, proteína de unión a la vitamina D (vitamin D BP), apolipoproteína AI, chitinase 3-like 1 (CHI3L1), plasminógeno, vitronectina y apolipoproteína AIV se cuantificaron mediante ELISA en muestras individuales tanto de LCR como de suero. Por otro lado, se determinaron tanto la semaforina 7A como la  $\alpha$ -beta-his dipeptidasa (CNDP1) mediante SRM en muestras de LCR. Posteriormente se analizaron correlaciones entre los niveles de las proteínas validadas y parámetros clínicos y radiológicos.

#### Validación inicial de proteínas en el LCR

Para la validación inicial se determinaron los niveles de las proteínas seleccionadas mediante ELISA o SRM en las cohortes parcialmente independientes de la cohorte inicial de pacientes utilizada para el estudio de *screening* (cohortes 2, 3 y 4).

Tal y como se muestra en la Figura 9, los niveles en LCR de CHI3L1 y de apolipoproteína AI se encontraron significativamente elevados en los pacientes del grupo de conversores comparado con los no conversores y con los controles neurológicos. Del mismo modo, los niveles en el LCR de semaforina 7A y de CNDP1 se encontraron disminuidos significativamente en los pacientes CIS→EMCD respecto a los CIS→CIS y también respecto a los controles (Figura 9).

Además, los niveles de semaforina 7A se encontraron significativamente disminuidos en los pacientes CIS→EMCD comparado con los del CIS→CIS y respecto a los controles. Además, también se encontraron niveles significativamente disminuidos de sema7A y CNDP1 en los pacientes CIS→EMCD respecto a los controles con OEN ( $p=3,3 \times 10^{-14}$  para la sema7A y  $p=3,6 \times 10^{-9}$  para la CNDP1).



**Figura 9. Validación de las proteínas seleccionadas del estudio de proteómica.** Niveles en LCR de las proteínas seleccionadas para la validación mediante métodos alternativos. Los niveles de ceruloplasmina, vitamin D BP, CHI3L1, apolipoproteína AI, apolipoproteína AIV, vitronectina y plasminógeno se determinaron en LCR mediante ELISA. Los niveles de CNDP1 y semaforina 7A se determinaron en LCR mediante SRM. OEN: controles con otras enfermedades neurológicas. CIS→CIS: pacientes con CIS no conversores; CIS→EMCD: pacientes con CIS conversores. NNI: niveles normalizados de intensidad.

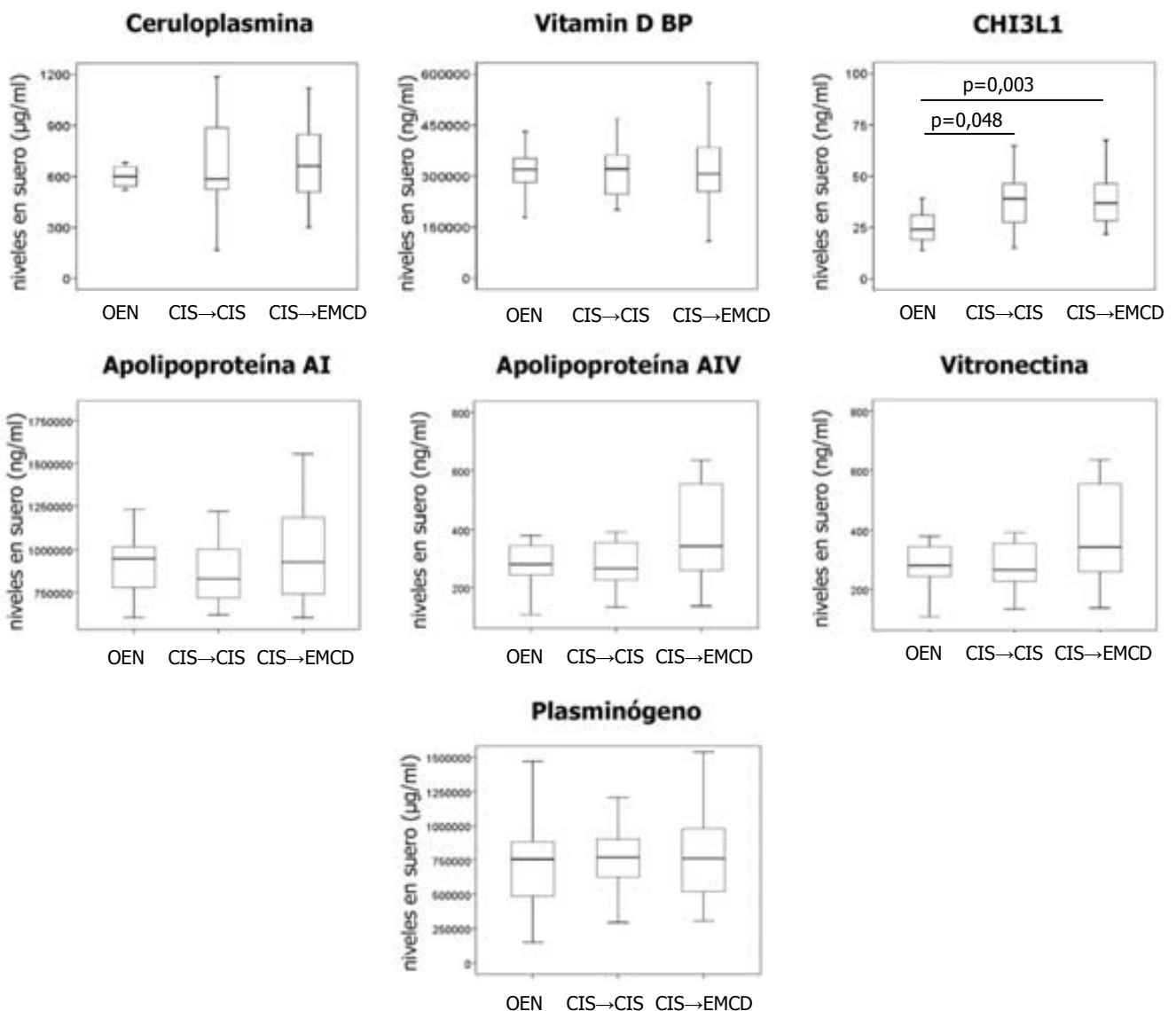
### Validación inicial de proteínas en suero

En este caso se determinaron los niveles de ceruloplasmina, vitamin D BP, CHI3L1, Apo AI, Apo AIV, vitronectina y plasminógeno mediante ELISA en muestras de suero de



pacientes de cohortes parcialmente independientes (cohortes 2 y 3), con el objetivo de validar estas proteínas en una muestra biológica de más fácil obtención que el LCR.

De forma interesante, aunque no se encontraron diferencias significativas en los niveles de CHI3L1 en el suero entre los pacientes CIS→CIS y CIS→EMCD, sí que se observaron niveles significativamente más altos en los pacientes con CIS que en los controles con OEN (Figura 10). No se encontraron diferencias significativas en los niveles del resto de proteínas entre los pacientes CIS→CIS y CIS→EMCD.

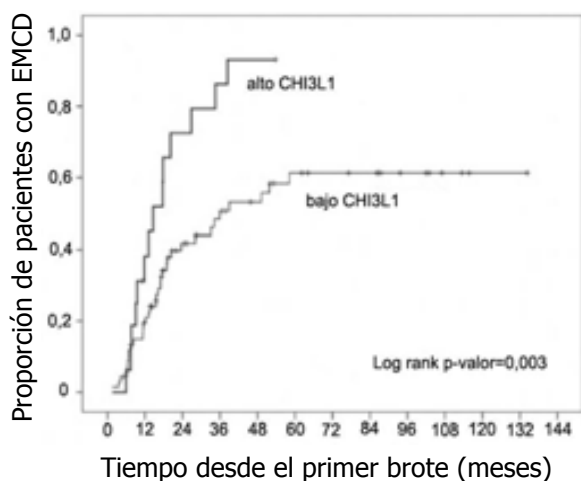


**Figura 10. Validación de las proteínas seleccionadas del estudio de proteómica.** Niveles en suero de las proteínas seleccionadas para la validación mediante métodos alternativos. Los niveles de ceruloplasmina, vitamin D BP, CHI3L1, apolipoproteína AI, apolipoproteína AIV, vitronectina y plasminógeno se determinaron en suero mediante ELISA. OEN: controles con otras enfermedades neurológicas. CIS→CIS: pacientes con CIS no conversores; CIS→EMCD: pacientes con CIS conversores.

#### 4.1.3 Asociación de los niveles de CHI3L1 con el tiempo de conversión

Los niveles de CHI3L1 en LCR se clasificaron en dos grupos (altos y bajos) basándose en un valor de corte o *cut-off* calculado como el promedio + 2 DE de los niveles obtenidos en el grupo de controles con OEN. Este valor fue de 287,9 ng/ml. Diecinueve pacientes con CIS (22,6%) presentaron valores de CHI3L1 por encima de este *cut-off* (grupo con niveles altos). Los 65 pacientes restantes (77,4%) tuvieron niveles de proteína por debajo de este *cut-off* (grupo con niveles bajos). El tiempo de conversión a EMCD en los pacientes con CIS y niveles altos de CHI3L1 fue significativamente menor comparado con aquellos pacientes con CIS y niveles bajos de proteína ( $p=0,003$ ; Figura 11).

Además, en un modelo de regresión de Cox univariado, los niveles altos de CHI3L1 en LCR se asociaron con un mayor riesgo de conversión a EMCD (razón de riesgo: 2,5; IC 95%: 1,3-4,7;  $p$ -valor=0,004).



Variable	Niveles altos	Niveles bajos
Tiempo medio (IC 95%)	17,6 meses (11,6-23,7)	34,2 meses (16,9-51,5)

**Figura 11. Curvas de supervivencia para el tiempo a EMCD según los niveles de CHI3L1.** Curvas de supervivencia de Kaplan-Meier para el tiempo a esclerosis múltiple clínicamente definida (EMCD) en función de los niveles basales de CHI3L1 en el LCR de los pacientes CIS. Los niveles se estratificaron en altos y bajos según un *cut-off* de 287,9 ng/ml. En la tabla se observa el tiempo medio de conversión en meses. IC 95%: intervalo de confianza del 95%.

#### 4.1.4 Correlación entre los niveles de CHI3L1 y semaforina 7A y los parámetros clínicos y radiológicos

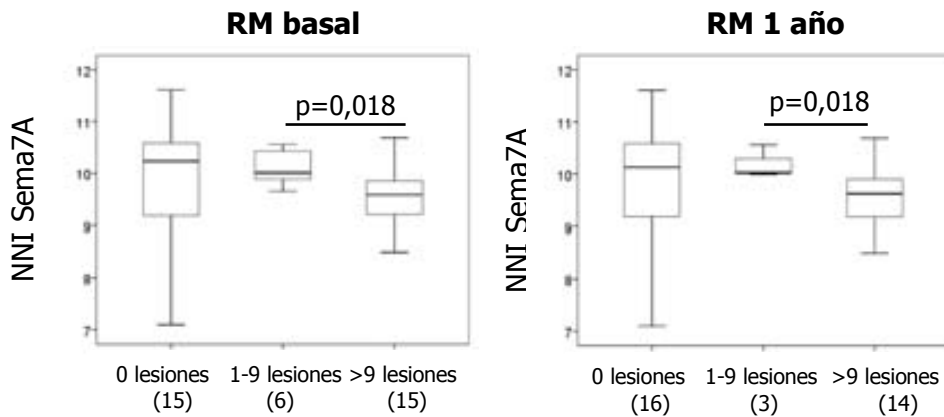
Los niveles de CHI3L1 en el LCR correlacionaron con el número de lesiones captantes de gadolinio así como con el número de lesiones en T2 en la RM basal (Figura 12A). Dicha asociación se perdió en las RM realizadas al año y 5 años de seguimiento, posiblemente debido al bajo número de pacientes con datos disponibles.

Respecto a la semaforina 7A, los niveles se encontraron disminuidos en aquellos pacientes con un mayor número de lesiones en T2 (Figura 12B), mientras que no se observaron diferencias significativas en los niveles de la proteína en LCR en función del número de lesiones captantes de contraste.

**A**

		Seguimiento RM					
		RM basal		1 año		5 años	
		NGD	NLT2	NGD	NLT2	NGD	NLT2
		(n=44)	(n=44)	(n=24)	(n=25)	(n=18)	(n=18)
<b>CHI3L1</b>	r	0,32	0,44	-0,23	0,07	0,12	-0,05
	(p)	<b>(0,037)</b>	<b>(0,003)</b>	(0,274)	(0,765)	(0,636)	(0,833)

**B**



**Figura 12. Correlaciones entre los niveles de CHI3L1 y semaforina 7A con parámetros de RM.** (A) En la tabla se muestran las correlaciones entre los niveles de CHI3L1 en el LCR y los parámetros radiológicos. N= número de pacientes disponibles para el análisis. NGD: número de lesiones captantes de gadolinio. NLT2: número de lesiones en T2. r=coeficiente de correlación de Spearman; p=p-valor. (B) En las gráficas se indica el número de lesiones en T2 a nivel basal y al año agrupados en tres categorías: 0 lesiones / entre 1 y 9 lesiones / más de 9 lesiones. Los diagramas de cajas muestran los niveles de semaforina 7A en las diferentes categorías de carga lesional. Entre paréntesis se indica el número de pacientes disponibles para el análisis.

Cuando los niveles en LCR de CHI3L1 y semaforina 7A se correlacionaron con el grado de discapacidad de los pacientes con CIS, se observó una asociación positiva significativa entre los niveles de CHI3L1 y el EDSS en los primeros 4 años de seguimiento. Dicha correlación con el EDSS no se observó para la semaforina 7A.

<b>Seguimiento</b>					
<b>Expanded Disability Status Scale</b>					
	Año 1	Año 2	Año 3	Año 4	Año 5
r	0,34	0,40	0,47	0,38	0,29
CHI3L1 (p)	<b>(0,025)</b>	<b>(0,012)</b>	<b>(0,002)</b>	<b>(0,022)</b>	(0,131)
N	44	39	41	37	29
r	-0,02	-	-0,203	-	-0,279
Sema7A (p)	(0,895)	-	(0,266)	-	(0,118)
N	35	-	33	-	31

**Tabla 16. Correlación entre los niveles de CHI3L1 y la discapacidad durante el seguimiento.** n: número de pacientes disponibles para el análisis. r= coeficiente de correlación de Spearman; p=p-valor.

#### 4.1.5 Correlación entre los niveles de semaforina 7A y parámetros del LCR

Cuando se analizaron las asociaciones entre los niveles de semaforina 7A y parámetros inflamatorios del LCR se observó una única correlación negativa entre los niveles de semaforina 7A en el LCR y el índice de IgG, pero no con otras variables (Tabla 17).

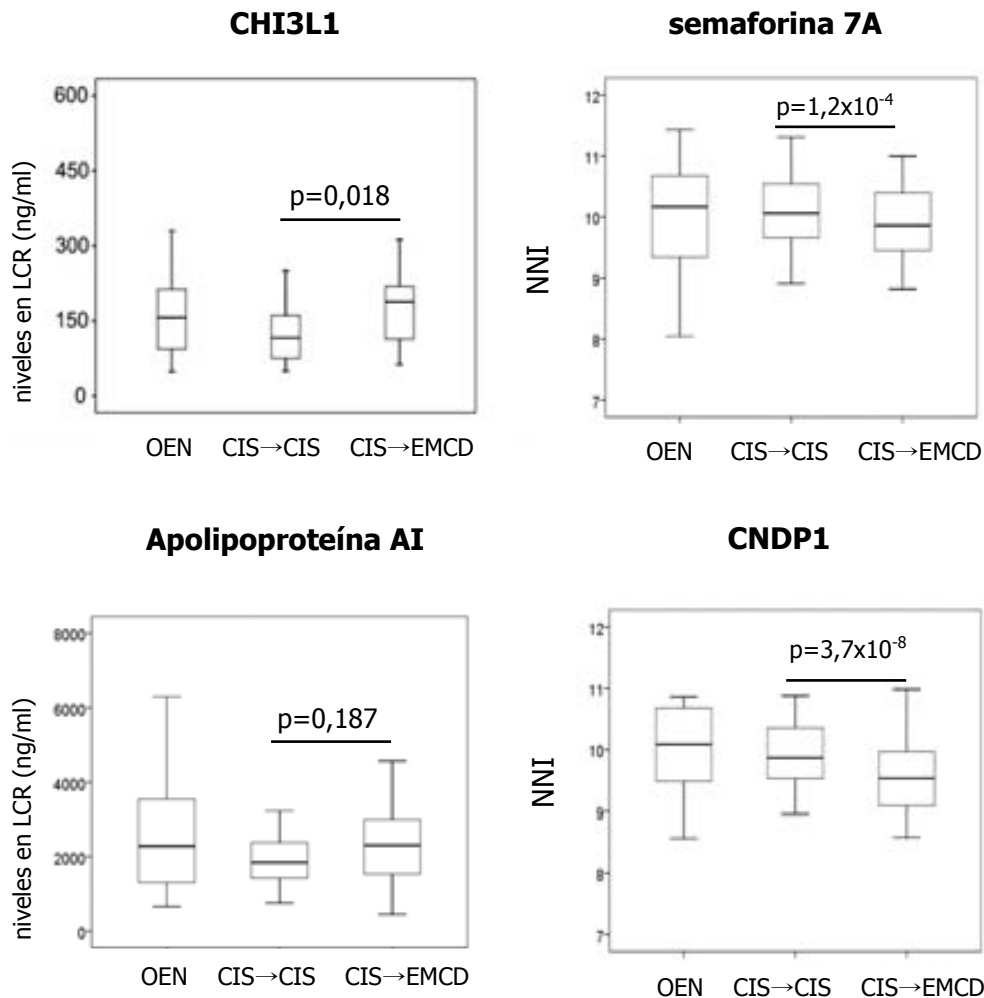
<b>Correlaciones</b>	<b>Células LCR (cél/μl)</b>	<b>Proteína LCR (g/L)</b>	<b>Índice IgG</b>
	<b>r (p)</b>	<b>r (p)</b>	<b>r (p)</b>
Sema7A	-0,14 (0,409)	-0,08 (0,680)	-0,44 (0,011)

**Tabla 17. Correlación entre los niveles de y semaforina 7A y parámetros del LCR.** Correlación entre los niveles de y de sema7A en el LCR y parámetros del LCR a nivel basal. R: coeficiente de correlación de Spearman; (p)=p-valor.

#### 4.1.6 Validación de la CHI3L1, semaforina 7A y CNDP1 como biomarcadores de conversión a EM en cohortes independientes de pacientes con CIS

Con el objetivo de confirmar los resultados obtenidos en la primera validación, se determinaron los niveles de ceruloplasmina, vitamin D BP, CHI3L1, apolipoproteína AI, semaforina 7A y CNDP1 en el LCR de cohortes de pacientes con CIS totalmente

independientes de la primera cohorte de validación, así como de la cohorte de pacientes con CIS usada en la fase de *screening* (cohortes 5, 6 y 7).



**Figura 13. Validación de la CHI3L1 y semaforina 7A en cohortes independientes.** Niveles de CHI3L1 y semaforina 7A en LCR de pacientes con CIS y controles incluidos en la validación en cohortes independientes de pacientes con CIS. Los niveles de CHI3L1 se determinaron mediante ELISA. Los niveles de semaforina 7A se determinaron mediante SRM. NNI: niveles normalizados de intensidad. OEN: controles con otras enfermedades neurológicas; CIS→CIS: pacientes con CIS no conversores; CIS→EMCD: paciente con CIS conversores; OEN: controles con otras enfermedades neurológicas.

Como se observa en la Figura 13 los niveles de CHI3L1 se encontraron elevados de forma significativa en los pacientes CIS→EMCD comparado con los pacientes CIS→CIS. Además, se encontraron niveles significativamente disminuidos de sema7A y de CNDP1 en los pacientes del CIS→EMCD respecto a los CIS→CIS, confirmándose los resultados anteriores. Por el contrario, los niveles aumentados de Apo AI que se habían encontrado en la validación inicial entre los pacientes conversores y los no conversores no se confirmaron en esta segunda cohorte de validación independiente. Por otro lado,

tampoco se encontraron diferencias en los niveles de ceruloplasmina y vitamin D BP entre los pacientes CIS→EMCD y los CIS→CIS, confirmando los resultados obtenidos en la primera validación ( $p > 0,05$ ). Estos resultados validan la CHI3L1, la sema7A y la CNDP1 como potenciales biomarcadores asociados a la conversión a EM en pacientes con CIS. El resumen del proceso de *screening* y validación se encuentra ilustrado de una forma esquemática en la siguiente figura:

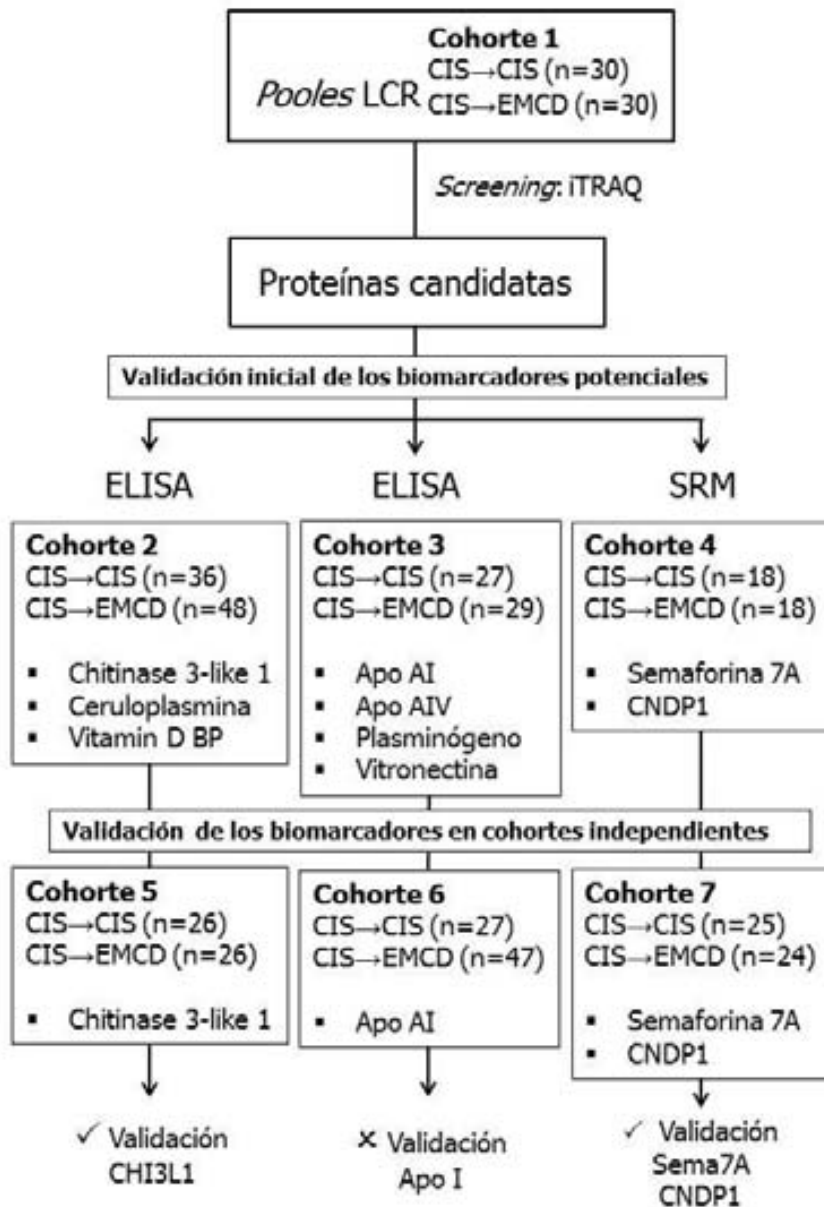


Figura 14. Esquema representativo del proceso de *screening* y validación de las proteínas expresadas de forma diferencial entre los pacientes con CIS conversores y no conversores

***Resultados relacionados con el objetivo 3: Validación de la CHI3L1 a gran escala***

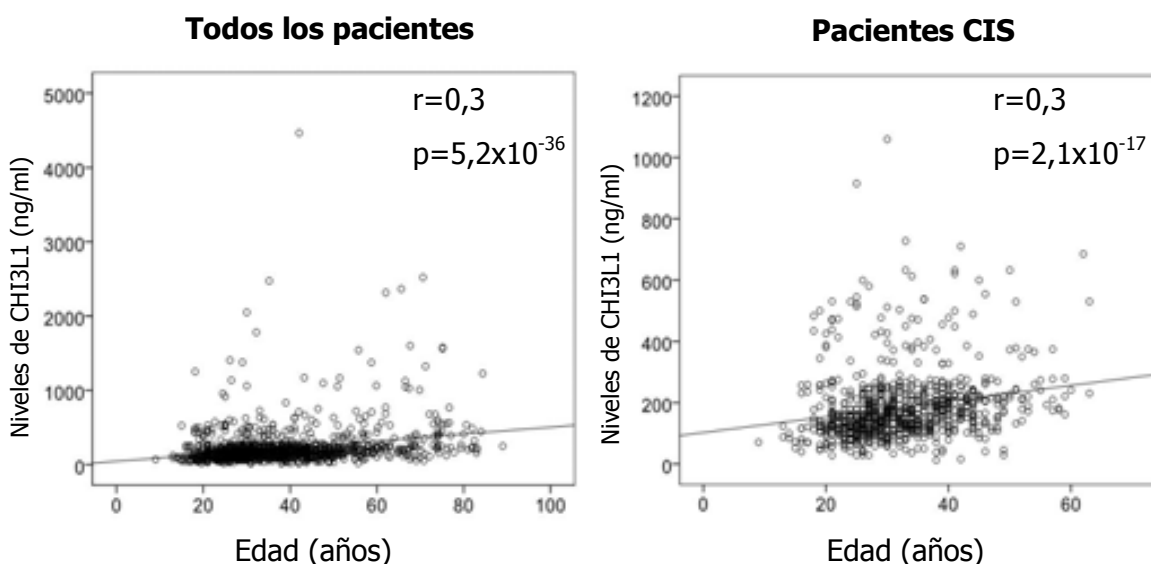




Los resultados de la validación de proteínas candidatas apuntan a la CHI3L1 como un potencial biomarcador pronóstico asociado al riesgo de conversión en pacientes con CIS. Aun así, la validación de este marcador se había realizado en cohortes de pacientes con CIS clasificados según unos criterios extremos, es decir, con características clínicas claramente diferenciadas entre los dos grupos. A continuación se llevó a cabo una validación de este biomarcador en una cohorte de pacientes más extensa y con un amplio espectro de pacientes con CIS. En esta cohorte de pacientes se estudiaron los niveles de la CHI3L1 en los distintos grupos de pacientes, así como la utilidad pronóstica de este marcador en los pacientes con CIS. También se analizó la correlación de los niveles de CHI3L1 en el LCR y variables tanto clínicas como radiológicas y parámetros inflamatorios del LCR, así como el origen de la CHI3L1 del LCR.

#### 4.2.1 Correlación de los niveles de CHI3L1 en LCR y la edad

Existen otros estudios en los que se ha descrito una correlación entre los niveles de CHI3L1 y la edad <sup>167-170</sup>. Del mismo modo, en nuestro estudio encontramos que los niveles de CHI3L1 en el LCR se encontraron correlacionados de forma muy significativa con la edad tanto si se consideraban todos los pacientes (pacientes con CIS y controles) ( $r=0,3$ ;  $p=5,2 \times 10^{-36}$ ) como si se consideraban únicamente los pacientes con CIS ( $r=0,3$ ;  $p=2,1 \times 10^{-17}$ ) (Figura 15).

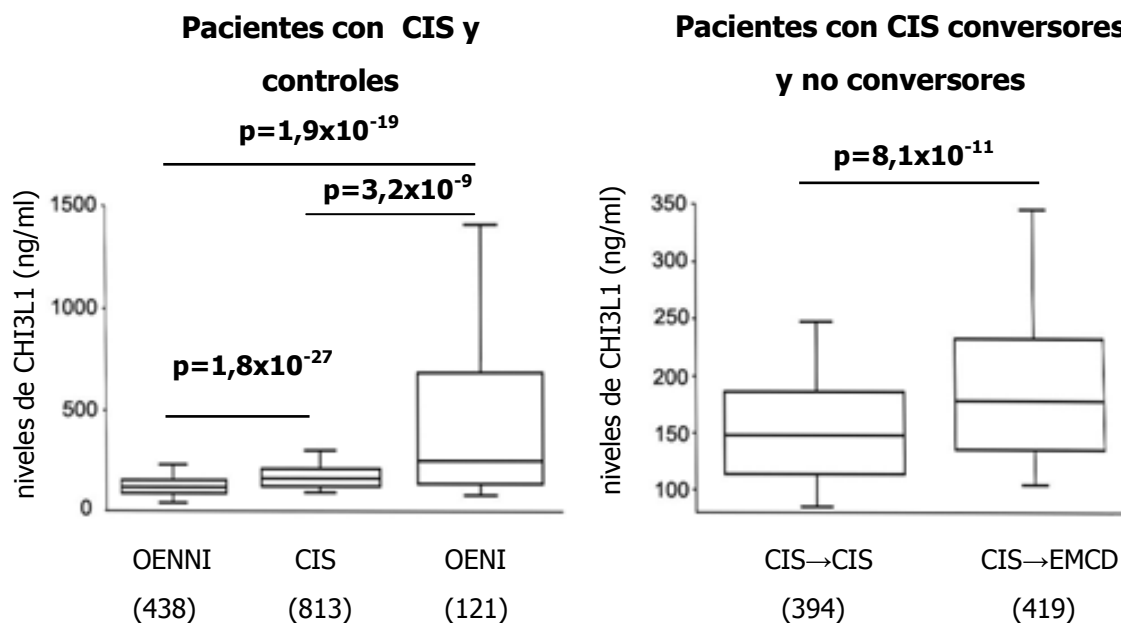


**Figura 15. Correlación entre los niveles de CHI3L1 en LCR y la edad.** Asociación entre los niveles de CHI3L1 en LCR y la edad para el grupo incluyendo todos los pacientes y para la cohorte de pacientes con CIS. El grupo de todos los pacientes incluye los pacientes CIS y los controles con otras enfermedades neurológicas inflamatorias y no inflamatorias. El grupo de pacientes CIS incluye conversores y no conversores a EM. r: coeficiente de correlación de Spearman.

Por esta razón, los análisis de comparación de los niveles de CHI3L1 entre pacientes con CIS que convierten a EM y los que se mantienen como CIS, así como entre los pacientes con CIS y controles con otras enfermedades neurológicas se ajustaron por edad.

#### 4.2.2 Niveles de CHI3L1 en LCR de pacientes con CIS

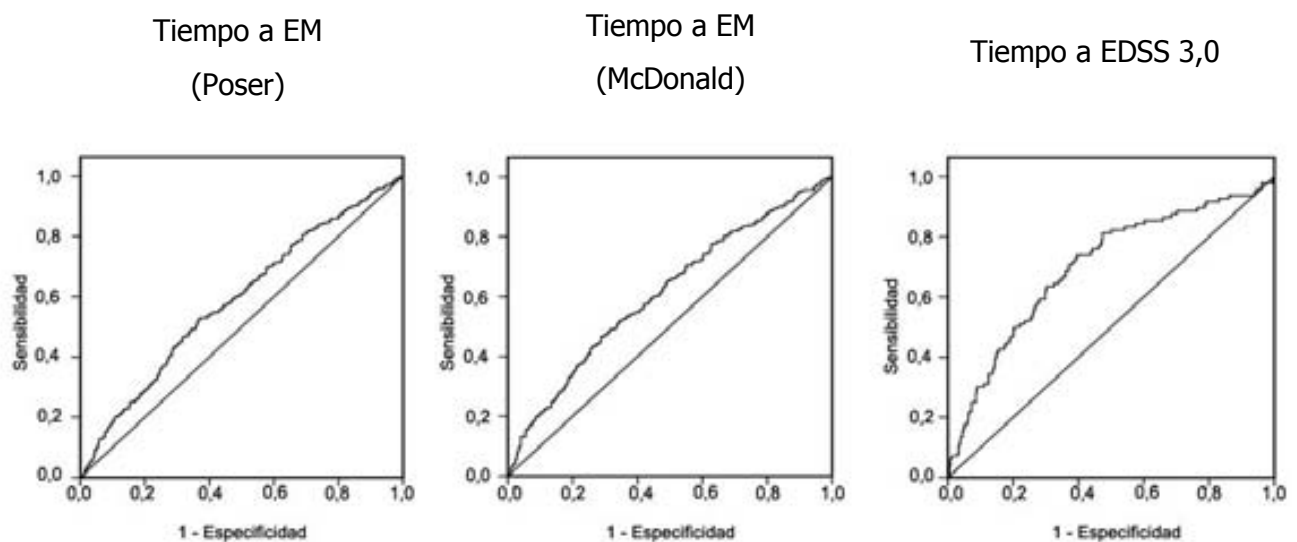
Inicialmente se compararon los niveles de CHI3L1 en el LCR de toda la cohorte de pacientes con CIS y los controles con otras enfermedades neurológicas. Como se observa en la Figura 16, los niveles de CHI3L1 se encontraron más elevados en los pacientes con CIS que en los controles neurológicos no inflamatorios ( $p=1,8 \times 10^{-27}$ ). Sin embargo, los niveles más altos de CHI3L1 correspondieron al grupo de controles con otras enfermedades neurológicas inflamatorias, siendo significativamente más altos que en los pacientes con CIS ( $p=3,2 \times 10^{-9}$ ) y que en los pacientes con otras enfermedades neurológicas no inflamatorias ( $p=1,9 \times 10^{-19}$ ). Cuando se estratificó la cohorte CIS, se observaron niveles de CHI3L1 significativamente más altos en aquellos pacientes con CIS que convirtieron a EMCD comparado con los pacientes que continuaron como CIS ( $p=8,1 \times 10^{-11}$ ).



**Figura 16. Niveles de CHI3L1 en los diferentes grupos de pacientes.** Los diagramas de cajas muestran los niveles de CHI3L1 ajustados por edad de los pacientes de la cohorte de pacientes CIS y de los controles neurológicos inflamatorios y no inflamatorios (izquierda) y en los pacientes CIS que convierten a EMCD y los pacientes que continúan como CIS (derecha). OENNI: controles con otras enfermedades neurológicas no inflamatorias. OENI: controles con otras enfermedades neurológicas inflamatorias. CIS→CIS: pacientes con CIS no conversores; CIS→EMCD: paciente con CIS conversores.

### 4.2.3 Estudio de los niveles de CHI3L1 en el LCR como biomarcador pronóstico para la conversión a EM y el desarrollo de discapacidad

En la Figura 17 se observan las curvas ROC de los niveles de CHI3L1 para el tiempo de conversión a EM según los criterios de Poser y de McDonald, así como para el tiempo en alcanzar un EDSS de 3,0. Los niveles de CHI3L1 en LCR se estratificaron en altos y bajos en función de un valor *cut-off* de 170ng/ml, que correspondió al valor de CHI3L1 que se asoció con los mejores índices de sensibilidad (S) y especificidad (E) para cada una de las variables evaluadas. Para este *cut-off*, la S y E fueron de un 51,8% (S) y 63,7% (E) para el tiempo a EM según los criterios de Poser; 51,2% (S) y 66,1% (E) para el tiempo a EM según los criterios de McDonald; 74,0% (S) y 60,0% (E) para el tiempo a un EDSS de 3,0.

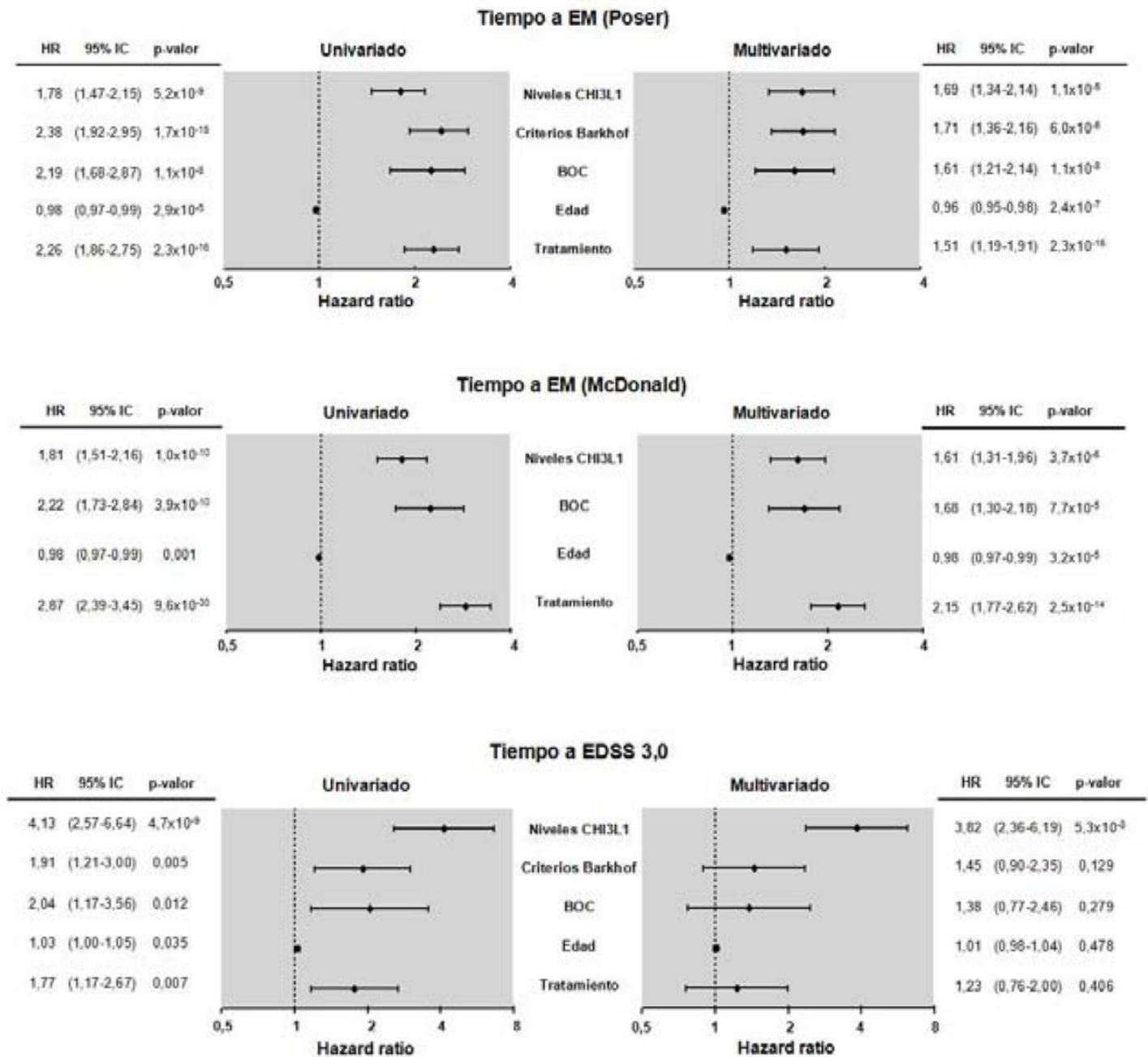


Variables	Numero de pacientes	AUC	IC 95%	p-valor
Conversión a EM (Poser)	419 vs 394	0,59	0,55-0,63	$1,4 \times 10^{-5}$
Conversión a EM (McDonald)	486 vs 327	0,61	0,57-0,65	$9,7 \times 10^{-8}$
Tiempo a EDSS 3,0	96 vs 513	0,70	0,64-0,76	$5,1 \times 10^{-10}$

**Figura 17. Curvas ROC para el tiempo a EM y tiempo a EDSS 3,0.** El número de pacientes se refiere al número de pacientes CIS que convirtieron a EM según los criterios de Poser o McDonald versus el número de pacientes que no convirtieron a EM, y el número de pacientes que alcanzaron un EDSS de 3,0 versus el número de pacientes que no lo alcanzaron. AUC: área bajo la curva (del inglés *area under the curve*). IC 95%: intervalo de confianza del 95%.

### RESULTADOS. *Objetivo 3*

Un total de 360 pacientes con CIS (44,3%) presentaron valores de proteína por encima de este *cut-off*. A continuación se investigó la asociación entre los niveles de CHI3L1 en LCR y el tiempo de conversión a EM así como el tiempo en alcanzar un EDSS de 3,0 en un modelo de regresión de Cox multivariado ajustado por el número de criterios de Barkhof en la RM basal, la presencia de bandas oligoclonales, el tratamiento y la edad en el momento del CIS. Como se muestra en la Figura 18, los niveles altos de CHI3L1 en LCR constituyeron un factor de riesgo independiente para la conversión a EM según los criterios de Poser (hazard ratio – HR=1,69;  $p=1,1 \times 10^{-5}$ ) o McDonald (HR=1,61;  $p=3,7 \times 10^{-6}$ ). Es importante destacar que los niveles de CHI3L1 en LCR fueron el único factor de riesgo independiente asociado con el desarrollo de discapacidad (HR=3,82;  $p=5,3 \times 10^{-8}$ ).



**Figura 18. Niveles de CHI3L1 como factor de riesgo de conversión a EM y de discapacidad.** Resultados del análisis de regresión de Cox univariado y multivariado para investigar la asociación entre los niveles de CHI3L1 en LCR y el tiempo de conversión a EM y el tiempo para alcanzar un EDSS de 3,0. Para la conversión a EM según los criterios de Poser y el tiempo a un EDSS de 3,0, el modelo multivariado de regresión de Cox se ajustó por el número de criterios de Barkhof en la RM basal, la presencia de bandas oligoclonales, la edad en el momento del CIS y el tratamiento. HR: hazard ratio. 95% IC: 95% intervalo de confianza. Niveles CHI3L1: niveles de CHI3L1 en el LCR estratificados según un valor *de cut-off* de 170 ng/ml. Criterios Barkhof: número de criterios de Barkhof recodificados en 2 categorías: 0, 1, 2 criterios de Barkhof y 3, 4 criterios de Barkhof. BOC: presencia o ausencia de bandas oligoclonales de IgG. Edad: edad en el momento del CIS. Tratamiento: se refiere a si los pacientes habían recibido tratamiento entre el momento del CIS y la fecha de conversión para los conversores y durante el período de seguimiento para los no conversores.

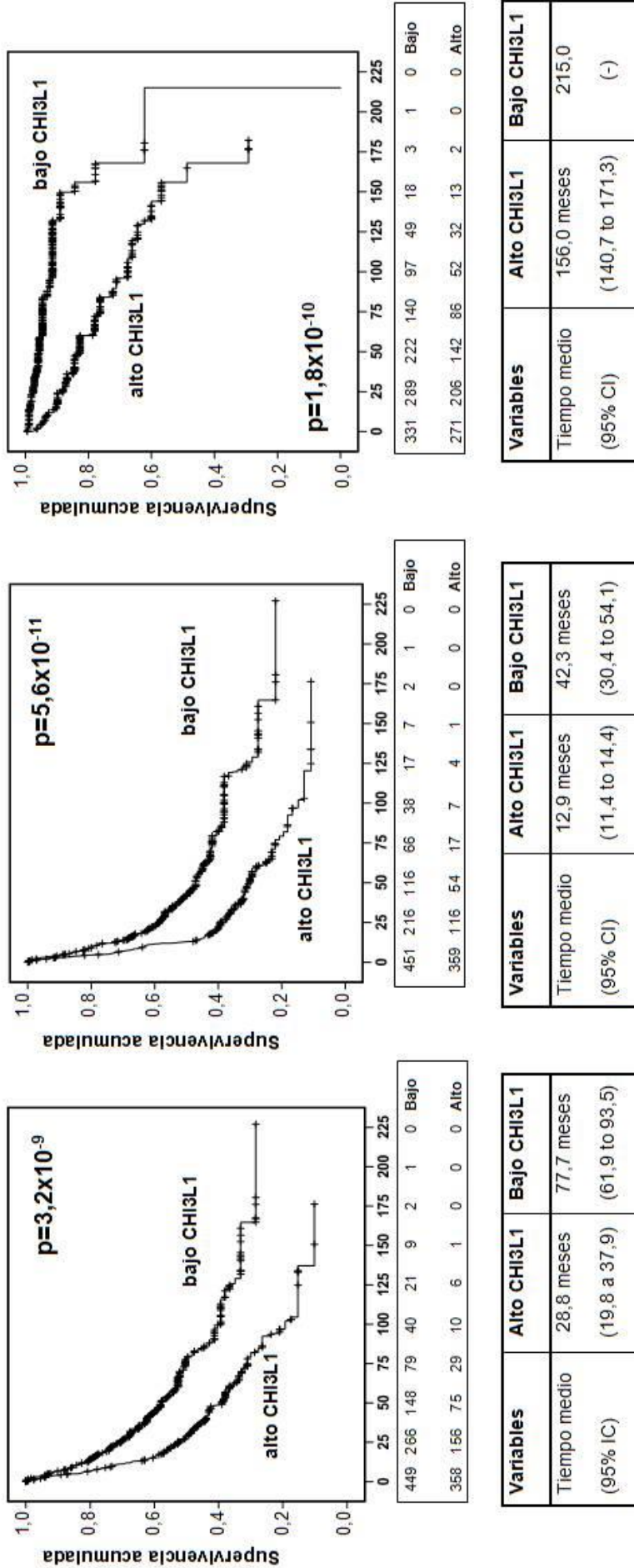
#### **4.2.4 Estudio de la asociación entre los niveles de CHI3L1 y el tiempo de conversión y desarrollo de discapacidad**

Como se observa en la Figura 19, niveles altos de CHI3L1 en LCR se asociaron con un menor tiempo de conversión a EM según los criterios de Poser (Log-Rank  $p=3,2 \times 10^{-9}$ ) o de McDonald (Log-Rank  $p=5,6 \times 10^{-11}$ ). De forma similar, cuando se evaluó el tiempo hasta alcanzar un EDSS de 3,0 los niveles altos de CHI3L1 se asociaron con un desarrollo de discapacidad más rápido (Log-Rank  $p=1,8 \times 10^{-10}$ ). Los niveles altos de CHI3L1 en el LCR también se asociaron con un peor pronóstico en los pacientes con CIS clasificados en función de la presencia o ausencia de BOC o de alteraciones en la RM (Figura 20).

#### **4.2.5 Estudio de la asociación entre los niveles de CHI3L1 en LCR y los parámetros radiológicos a tiempo basal**

Los niveles de CHI3L1 en LCR reflejaron el grado de inflamación cerebral y la carga lesional observada en la RM realizada en el momento del CIS. Como se muestra en la Figura 21, los niveles de CHI3L1 se encontraron más elevados de forma significativa en aquellos pacientes con lesiones captantes de gadolinio comparado con los pacientes sin lesiones captantes de gadolinio ( $p=1,4 \times 10^{-7}$ ), así como en aquellos pacientes con 9 o más lesiones en T2 comparado con los pacientes que presentaron 1-8 lesiones ( $p=3,4 \times 10^{-4}$ ) y los pacientes sin lesiones en T2 ( $p=2,5 \times 10^{-5}$ ).

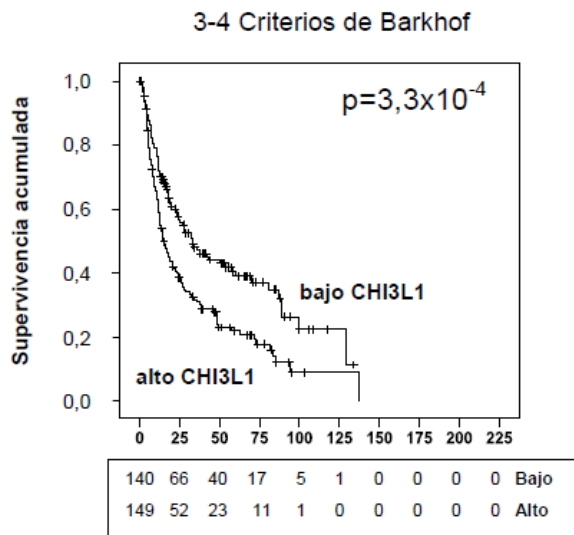
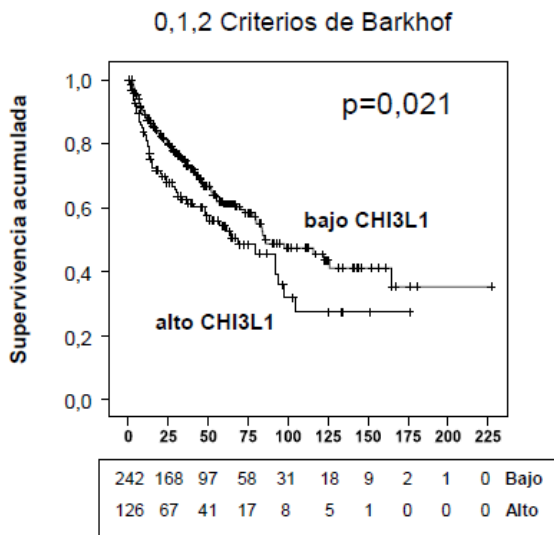
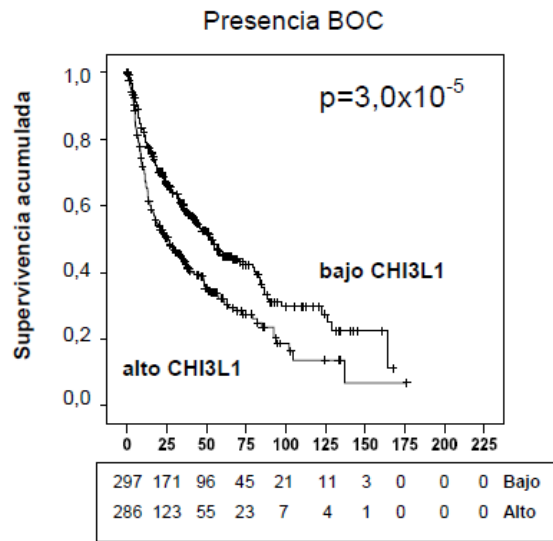
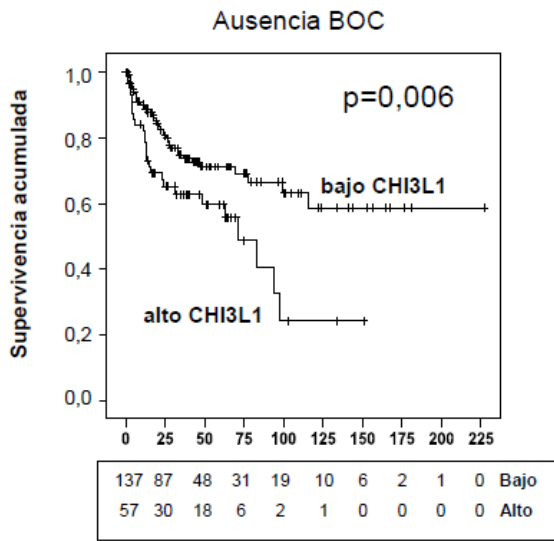
Es interesante destacar que, en un subgrupo de pacientes con CIS y datos sobre atrofia cerebral durante el período de seguimiento, los niveles de CHI3L1 en LCR correlacionaron de forma positiva y significativa con el cambio en el BPF tras uno y cinco años de seguimiento ( $p=0,04$  y  $p=0,002$  respectivamente) (Tabla 18).



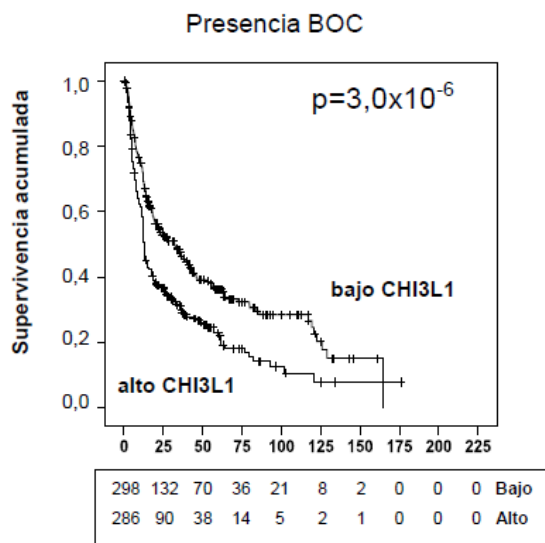
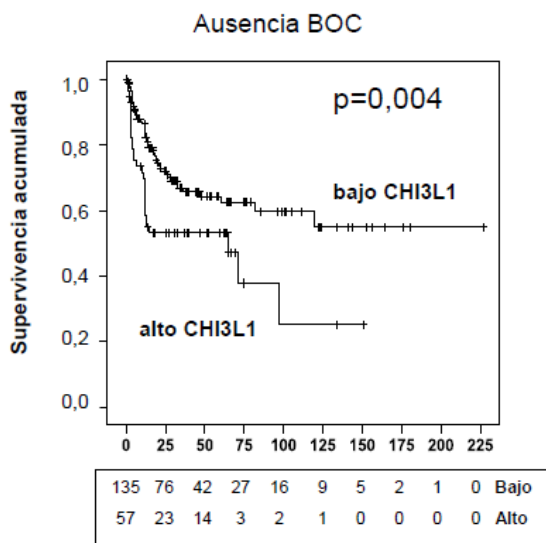
**Figura 19. Curvas de Kaplan-Meier para el tiempo a EM y el tiempo a un EDSS de 3,0 según los niveles basales de CHI3L1 clasificados en altos y bajos según un valor de cur-off de 170ng/ml.** Los gráficos muestran los p-valores obtenidos tras aplicar el Log-Rank test. Los números representan los pacientes en riesgo para los diferentes tiempos de seguimiento. Las tablas indican el tiempo medio (intervalos de confianza del 95%) a EM y a un EDSS de 3,0 en los pacientes con CIS y niveles altos y bajos de CHI3L1.

RESULTADOS. *Objetivo 3*

Tiempo a EM (Poser)

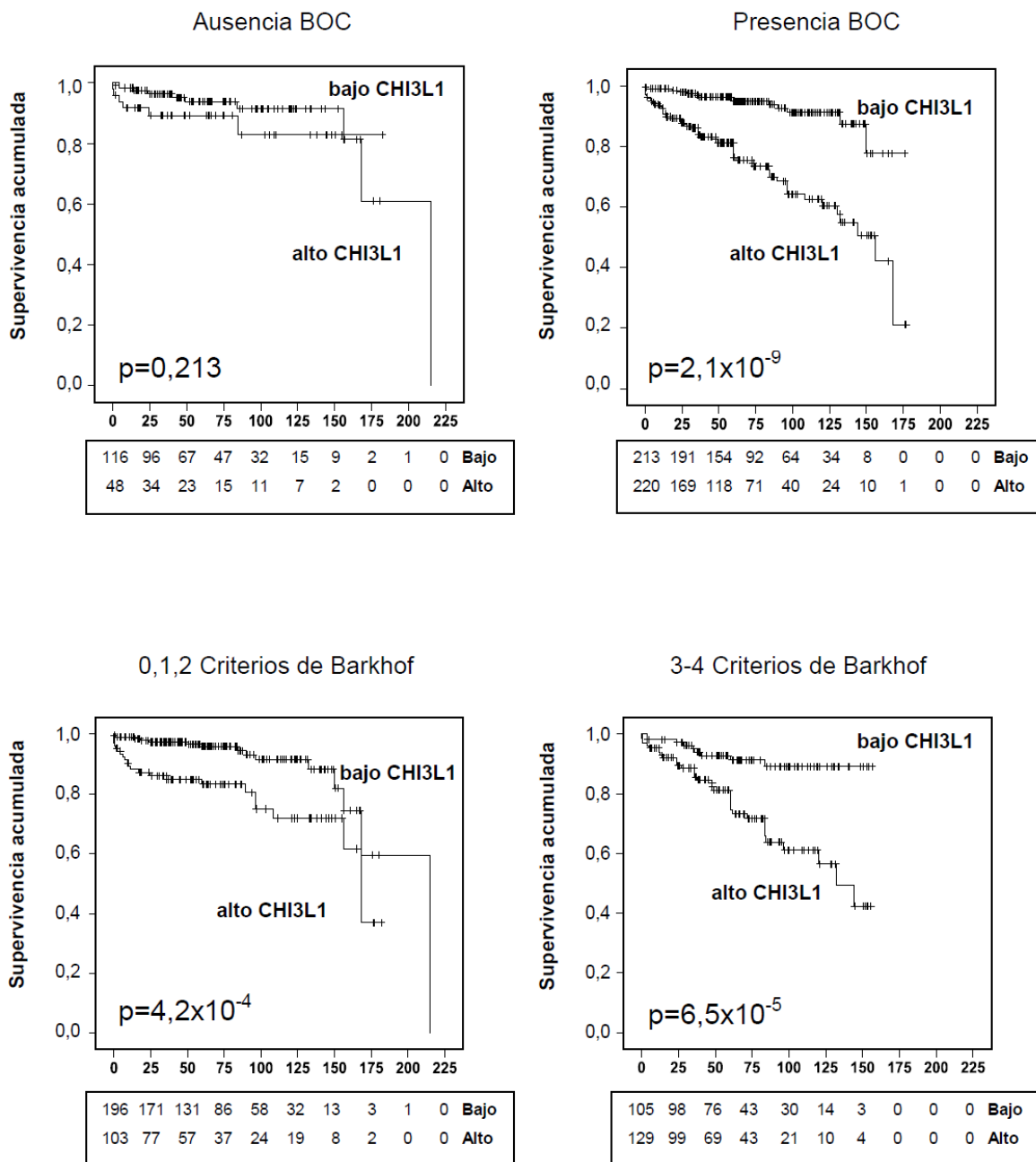


Tiempo a EM (McDonald)

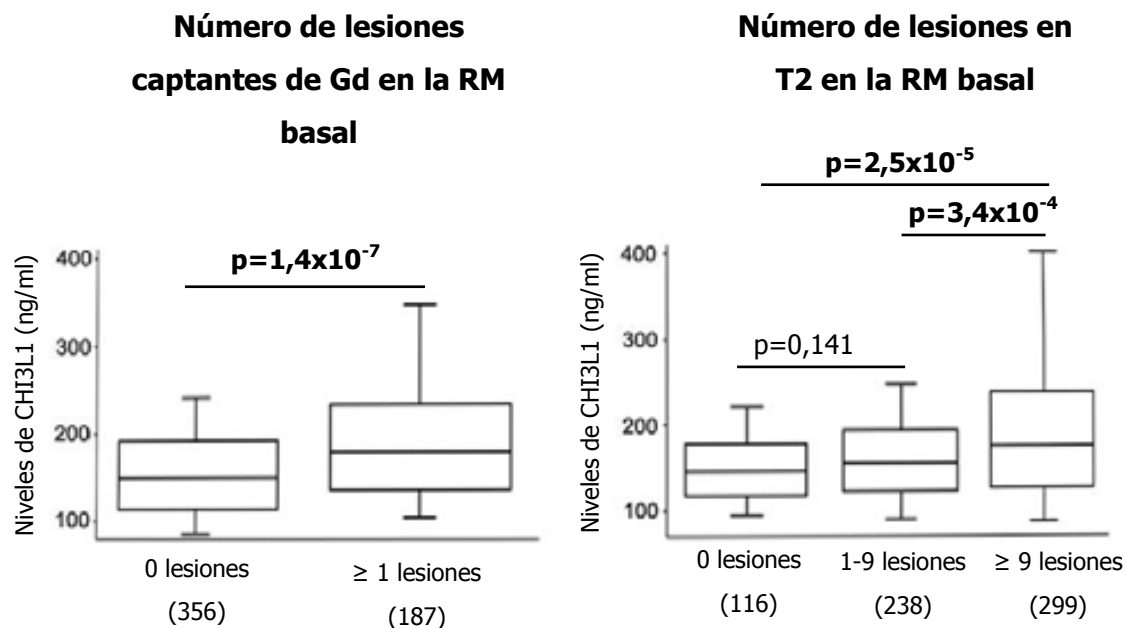




Tiempo a EDSS 3,0



**Figura20. Curvas Kaplan-Meier en los pacientes con CIS con niveles altos y bajos de CHI3L1 en el LCR basados en el valor de cut-off de 170 ng/ml y estratificados según la presencia o ausencia de bandas oligoclonales y presencia de 0, 1, 2 o 3, 4 criterios de Barkhof en la resonancia magnética basal.** Considerando que el número de criterios de Barkhof está incluido en los criterios de McDonald para la conversión a EM, el análisis de Kaplan-Meier no se realizó para el tiempo a EM basado en los criterios de McDonald. Los gráficos muestran los p-valores del Log-Rank. Los números indican los pacientes en riesgo para los distintos tiempos de seguimiento.



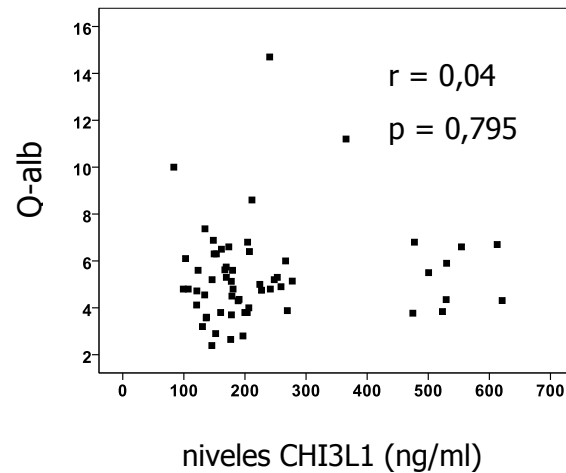
**Figura 21. Correlación entre los niveles de CHI3L1 y las alteraciones en la resonancia magnética (RM).** Asociación entre los niveles de CHI3L1 en LCR y las alteraciones en la RM a tiempo basal. Los diagramas de cajas muestran los niveles de CHI3L1 en el LCR ajustados por edad en los pacientes con CIS estratificados según las alteraciones de la RM: ausencia o presencia de lesiones captantes de gadolinio (Gd) (izquierda), y número de lesiones en T2 (derecha). Los números entre paréntesis indican el número de individuos disponibles para el análisis.

Correlaciones ajustadas por edad	$\Delta$ BPF 1º año r (p)	$\Delta$ BPF 5º año r (p)
CHI3L1	0,25 (0,04)	0,38 (0,002)

**Tabla 18. Atrofia cerebral durante el seguimiento.** Asociación entre los niveles de CHI3L1 en LCR y desarrollo de atrofia cerebral durante el seguimiento. En la tabla se muestran las correlaciones ajustadas por edad entre los niveles de CHI3L1 en LCR y el cambio en el BPF tras 1 año (n=149) y 5 años (n=65) de seguimiento.  $\Delta$  BPF: cambio en la fracción de parénquima cerebral entre el tiempo basal y las mediciones efectuadas tras 1 y 5 años de seguimiento. r: coeficiente de correlación parcial. p: p valor.

#### 4.2.6 Origen de la CHI3L1 en LCR

Para evaluar la relación entre los niveles de CHI3L1 en el LCR y la disfunción de la barrera hematoencefálica, se determinó el cociente de albúmina (Q-alb) en muestras de un subgrupo de pacientes. Como se ilustra en la Figura 22, los niveles de CHI3L1 en LCR no están influidos por el Q-alb, indicando que la CHI3L1 detectada en el LCR tiene un origen principalmente en el propio SNC.



**Figura 22. Correlación entre los niveles de CHI3L1 en LCR y el cociente de albúmina.** Relación entre el cociente de albúmina LCR/suero (Q-alb) y los niveles de CHI3L1 en LCR. r: coeficiente de correlación parcial. p: p-valor.

Finalmente, se observó que los niveles de CHI3L1 en LCR correlacionaron débilmente con parámetros inflamatorios del LCR como el número de células, la concentración de proteínas y el índice IgG (Tabla 19).

Correlaciones ajustadas por edad	Células (cels/ $\mu$ l) r (p)	Proteína (g/L) r (p)	Índice IgG r (p)
CHI3L1	0,11 (0,008)	0,13 (0,002)	0,20 ( $5,8 \times 10^{-6}$ )

**Tabla 19. Correlaciones entre los niveles de CHI3L1 y parámetros del LCR.** Correlaciones parciales ajustadas por edad entre los niveles de CHI3L1 en LCR y parámetros inflamatorios del LCR en la cohorte de pacientes con CIS. Cels/ $\mu$ l: células por  $\mu$ l de LCR. r: coeficiente de correlación. p: p valor.



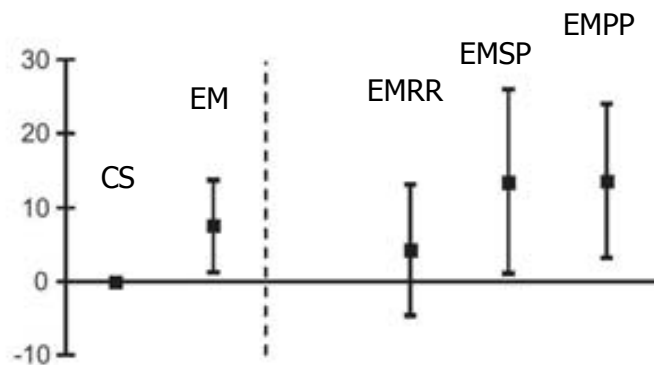
***Resultados relacionados con el objetivo 4A: Estudio de la CHI3L1 en la EM***



Los resultados obtenidos en la validación de la CHI3L1 indican que podría ser un buen factor pronóstico en los pacientes con CIS. A continuación se estudiaron los niveles de CHI3L1 en sangre periférica de pacientes con diferentes formas clínicas de EM, y se evaluó la posible asociación entre un polimorfismo en el promotor del gen de la CHI3L1 y la EM. Además, dada la procedencia local de la CHI3L1 observada en el LCR se estudió la expresión de la proteína en tejido cerebral humano de pacientes con EM y controles no neurológicos, y en las células del LCR de pacientes con EM y controles con otras enfermedades neurológicas.

#### 4.3.1 Niveles plasmáticos de CHI3L1 en pacientes con EM

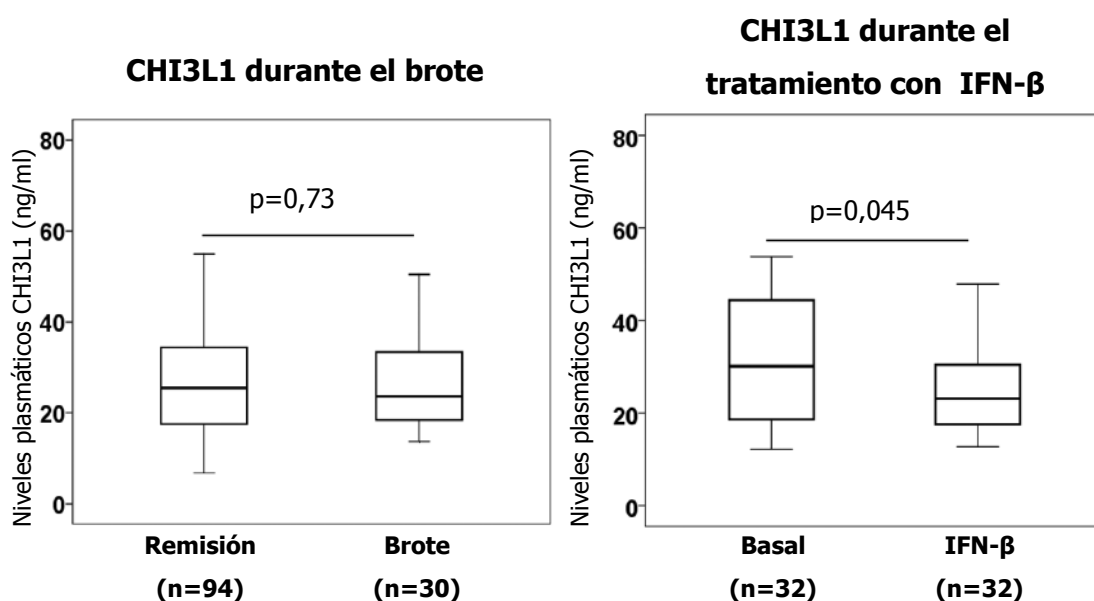
Cuando se compararon los niveles plasmáticos de CHI3L1 entre los pacientes con EM y los controles sanos se observaron niveles significativamente más elevados en los pacientes con EM (Figura 23). Cuando los pacientes con EM se estratificaron según las diferentes formas clínicas, los niveles plasmáticos de CHI3L1 se encontraron incrementados de forma significativa en los pacientes con EMPP y EMSP comparado con los controles sanos, y en los pacientes con EMPP respecto a los pacientes con EMRR. Por otro lado, no se encontraron diferencias significativas en los niveles plasmáticos de CHI3L1 entre los pacientes con EMRR y los controles sanos.



Grupo	Dif. medias (ng/ml)	IC 95% dif. (ng/ml)	p-valor
EM	7,465	1,2 a 13,7	0,019
EMRR	4,183	-4,7 a 13,0	1,000
EMSP	13,375	0,9 a 25,9	0,029
EMPP	13,523	3,0 a 24,0	0,004

**Figura 23. Niveles plasmáticos de CHI3L1 en las formas clínicas de esclerosis múltiple y controles sanos.** Diferencias de medias ajustadas por edad de los niveles plasmáticos de CHI3L1 e intervalo de confianza en los pacientes con EM, pacientes con EMRR, EMSP y EMPP respecto al grupo de controles sanos, tomado como referencia. Dif. medias (ng/ml): diferencia de medias en ng/ml; IC 95% dif. (ng/ml): intervalo de confianza del 95% de la diferencia en ng/ml; CS: controles sanos; EM: grupo total de pacientes con esclerosis múltiple; EMRR: esclerosis múltiple remitente-recurrente (en remisión); EMSP: esclerosis múltiple secundariamente progresiva; EMPP: esclerosis múltiple primariamente progresiva.

A continuación se determinó si los niveles plasmáticos de CHI3L1 estaban alterados en el momento del brote comparando los niveles de CHI3L1 entre pacientes con EMRR cuyas muestras se extrajeron en el momento del brote y en remisión. Tal y como se observa en la Figura 24, los niveles de CHI3L1 fueron similares entre ambos grupos de pacientes ( $p=0,735$ ). También se evaluó el posible efecto del tratamiento con IFN- $\beta$  sobre los niveles de CHI3L1 comparando los niveles plasmáticos de la proteína entre pacientes con EM antes de iniciar tratamiento con IFN- $\beta$  y tras varios meses de tratamiento. Tal y como muestra la Figura 24, el tratamiento con IFN- $\beta$  se asoció con una discreta disminución en los niveles plasmáticos de CHI3L1 ( $p=0,045$ ).



**Figura 24. Efecto del brote y del tratamiento con IFN- $\beta$  sobre los niveles plasmáticos de CHI3L1.** Comparación de los niveles plasmáticos de CHI3L1 entre pacientes con EMRR en remisión y pacientes EMRR durante el brote (izquierda), y entre pacientes EMRR antes y después del tratamiento con IFN- $\beta$  (derecha). Basal: indica los niveles de CHI3L1 plasmáticos antes de iniciar el tratamiento. IFN- $\beta$ : indica los niveles de CHI3L1 determinados en el mismo grupo de pacientes después del tratamiento con IFN- $\beta$ . Los diagramas de cajas representan los percentiles 75 y 25 divididos horizontalmente por la mediana.

También se investigaron correlaciones potenciales entre los niveles plasmáticos de CHI3L1 y variables clínicas y radiológicas como el número de lesiones en T1, lesiones en T2, número de brotes en los dos años previos al momento de la obtención de la muestra, EDSS en el momento de la obtención de la muestra, y duración de la enfermedad. En el grupo de pacientes con EM y en el grupo de pacientes con EMRR se encontró una tendencia hacia una correlación positiva entre los niveles de la proteína en plasma y el número de brotes en los dos años previos ( $r=0,24$ ;  $p=0,024$ ) y con el EDSS ( $r=0,19$ ;  $p=0,011$ ), aunque ninguna de estas asociaciones sobrevivió la



corrección de Bonferroni por comparaciones múltiples (Tabla 20). No se encontraron correlaciones significativas entre los niveles de proteína y el resto de variables.

Características	EM	EMRR	EMSP	EMPP
	r (p)	r (p)	r (p)	r (p)
Duración de la enfermedad	0,05 (0,480)	0,02 (0,838)	-0,18 (0,378)	0,04 (0,764)
Número de brotes	0,16 (0,081)	0,24 (0,024)	0,18 (0,386)	-
EDSS	0,19 (0,011)	0,06 (0,581)	0,01 (0,957)	0,10 (0,416)
Lesiones en T1 <sup>a</sup>	-	-	-	0,04 (0,773)
Lesiones en T2 <sup>a</sup>	-	-	-	0,05 (0,723)
BPF <sup>a</sup>	-	-	-	-0,03 (0,824)

**Tabla 20. Correlaciones parciales ajustadas por edad entre los niveles plasmáticos de CHI3L1 y parámetros clínicos y radiológicos.** Lesiones en T1 y T2: Cargas lesionales en T1 y T2 respectivamente; BPF: Fracción del parénquima cerebral. <sup>a</sup>Datos disponibles únicamente para un subgrupo de pacientes con EMPP.

#### 4.3.2 Estudio de asociación del polimorfismo rs4950928 con la EM

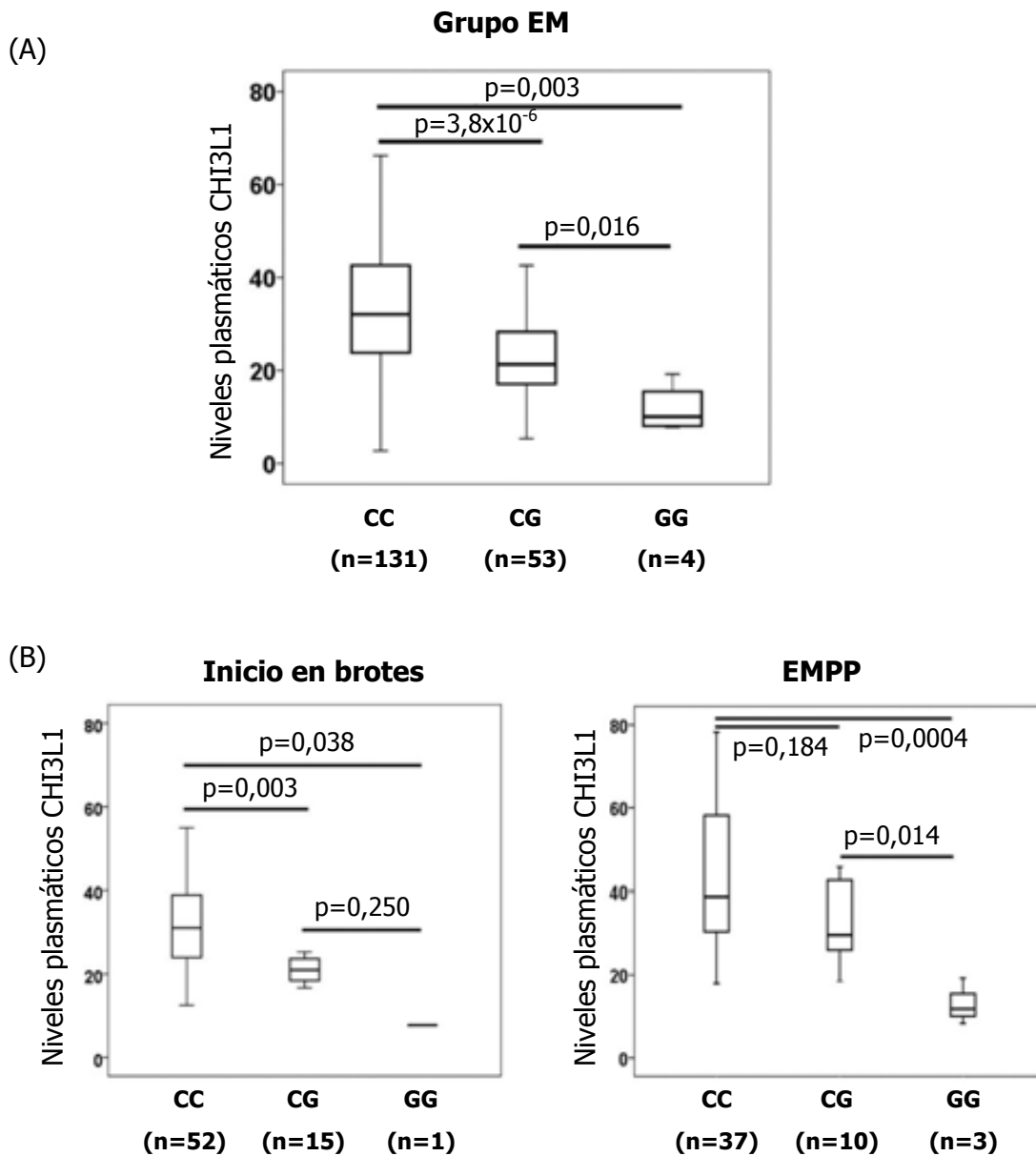
Dada la relación entre los niveles plasmáticos de CHI3L1 y la enfermedad se decidió investigar una posible asociación entre un SNP localizado en la región promotora del gen de la CHI3L1 con la EM. Este polimorfismo (rs4950928) se había asociado previamente con los niveles séricos de la proteína <sup>171, 172</sup>. La eficiencia del genotipado fue del 98,1%, y el SNP se encontraba en equilibrio de Hardy-Weinberg ( $p=0,61$ ). Como se puede observar en la Tabla 21, el análisis entre grupos mostró una asociación significativa del alelo C en los pacientes con EMPP comparado con los pacientes de EM con inicio de la enfermedad en brotes (pacientes con EMRR y EMSP) y comparado con los controles sanos. Por otro lado, las frecuencias alélicas fueron equivalentes entre pacientes con EM y controles sanos, así como entre los pacientes con inicio de la enfermedad en brotes y los controles sanos.

Comparación	Alelo de riesgo	Odds ratio	IC 95%	p-valor
EM vs CS	<i>C</i>	1,0	1,0-1,1	0,696
Inicio en brotes vs CS	<i>G</i>	1,0	0,9-1,1	0,973
EMPP vs CS	<i>C</i>	1,4	1,1-1,8	<b>0,018</b>
EMPP vs inicio en brotes	<i>C</i>	1,4	1,1-1,8	<b>0,018</b>

**Tabla 21. Asociación del SNP rs4950928 y la EM.** EM: esclerosis múltiple; CS: control sano; Inicio en brotes incluye pacientes con EM remitente-recurrente y EM secundariamente progresiva. EMPP: esclerosis múltiple primariamente progresiva.

Dada la correlación entre los niveles de CHI3L1 en LCR de pacientes con CIS y el tiempo de conversión a EM observada en análisis previos, se decidió investigar una posible asociación entre los distintos genotipos y el tiempo de conversión a EM en un subgrupo de 584 pacientes que desarrollaron EMRR tras el CIS (429 homocigotos *CC*, 142 heterocigotos *CG*, 13 homocigotos *GG*). No se encontraron diferencias en el tiempo de conversión entre los distintos genotipos ( $p > 0,05$ ), siendo los tiempos de conversión [expresados como media (desviación estándar)] para cada genotipo de: 3,0 años (3,8) para el genotipo *CC*; 3,1 años (4,5) para el genotipo *CG*; y 1,7 años (1,9) para el genotipo *GG*.

Por otro lado, se estudiaron los niveles plasmáticos de CHI3L1 según los distintos genotipos del SNP rs4950928. En la cohorte de pacientes de Barcelona (Cemcat), se determinó el genotipo y los niveles plasmáticos de CHI3L1 en un total de 50 controles sanos y de 138 pacientes con EM (57 pacientes con EMRR, 11 con EMSP, 50 con EMPP, y 20 EMRR durante el brote). Cuando se analizó todo el grupo formado por pacientes con EM y controles sanos, los niveles de CHI3L1 se encontraron elevados de forma significativa en los homocigotos *CC* comparado con los heterocigotos *CG* y los homocigotos *GG*, de la misma forma que se había descrito en otras enfermedades<sup>171, 172</sup> (Figura 25A). Se observaron resultados similares cuando los pacientes con EM se clasificaron según la forma de inicio (EM de inicio en brotes y EMPP) (Figura 25B).



**Figura 25. Niveles de CHI3L1 según el genotipo del SNP rs4950928.** Diagramas de cajas representativos de los niveles plasmáticos de CHI3L1 en los homocigotos CC, heterocigotos CG y homocigotos GG para el SNP rs4950928 en todos los individuos (A) y en los pacientes con EM estratificados según la forma clínica (B). Inicio en brotes incluye pacientes con esclerosis múltiple remitente recurrente y secundariamente progresiva. EMPP: esclerosis múltiple primariamente progresiva.

#### 4.3.3 Expresión de CHI3L1 en tejido cerebral

En un primer paso se clasificaron las lesiones de los pacientes con EM. Esto se realizó mediante las tinciones de HE (para determinar inflamación) y KB (para determinar desmielinización), lo que permitió clasificar las lesiones de EM en lesiones crónicas

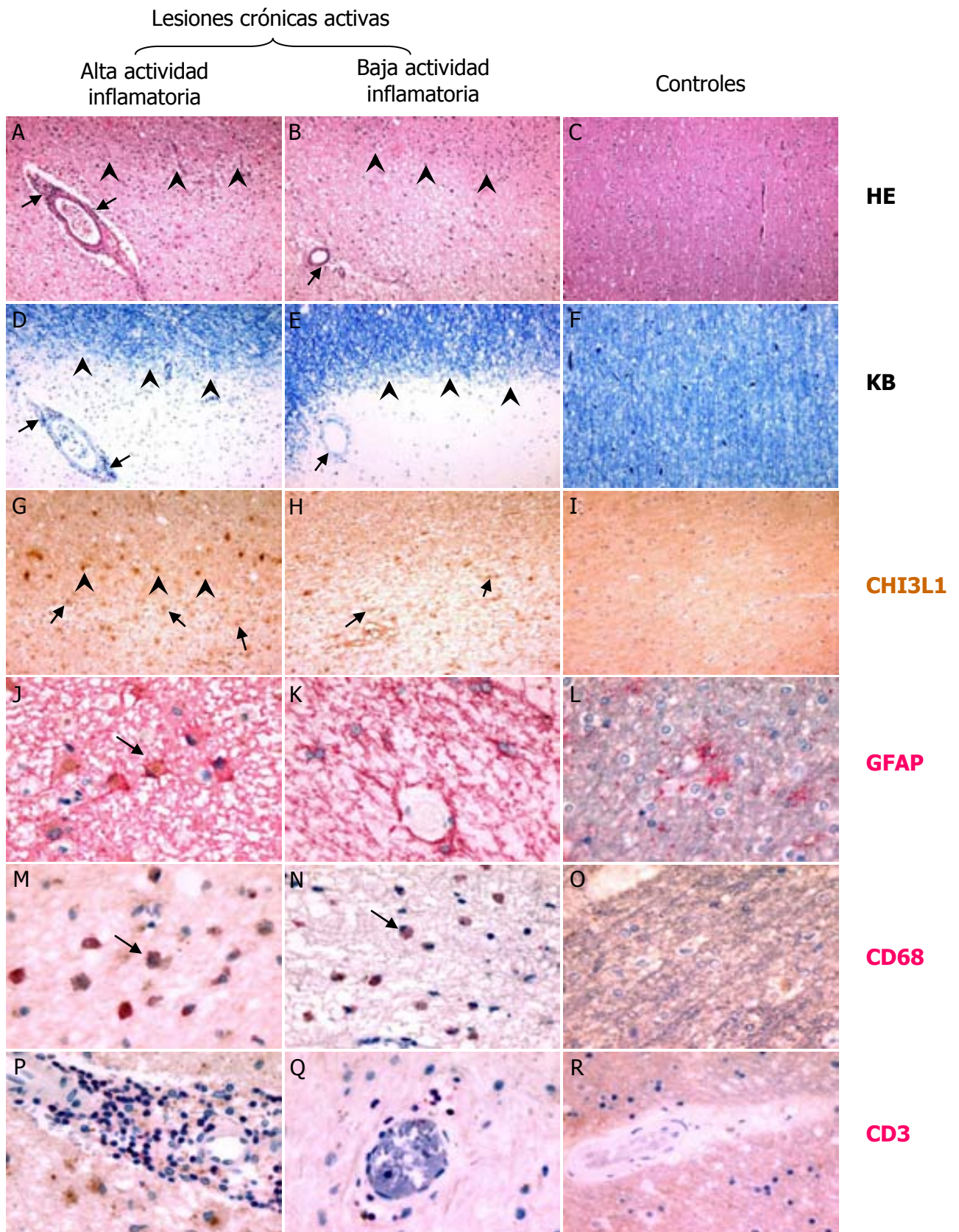
activas de alta (n=5) o baja (n=10) actividad inflamatoria (ver apartado de material y métodos para la descripción de la clasificación).

Cuando se estudió la expresión de CHI3L1 en tejido del SNC se observó que en las lesiones con mayor actividad inflamatoria la tinción era más intensa y estaba localizada en el margen de las lesiones (cabezas de flecha) y en el área desmielinizada (flechas) (Figura 26G), mientras que en las lesiones de menor actividad inflamatoria la expresión fue menos intensa y prácticamente restringida al área desmielinizada (Figura 26H). Por el contrario, no se observó tinción de CHI3L1 en el SNC de los controles no neurológicos (Figura 26I). Mediante inmunohistoquímicas dobles se localizó la expresión de CHI3L1 en el citoplasma de astrocitos reactivos (células GFAP+; Figura 26J) y macrófagos y microglía de las lesiones con alta actividad inflamatoria (células CD68+; Figura 26M), mientras que en las lesiones con baja actividad inflamatoria la expresión de CHI3L1 estaba restringida únicamente al citoplasma de algunos macrófagos y microglía (Figura 26N). En ningún caso se observó expresión de la proteína en linfocitos T (Figura 26P, Q, R).

#### **4.3.4 Estudio de la expresión de CHI3L1 en células del LCR**

##### *4.3.4.1 Especificidad del anticuerpo anti-CHI3L1*

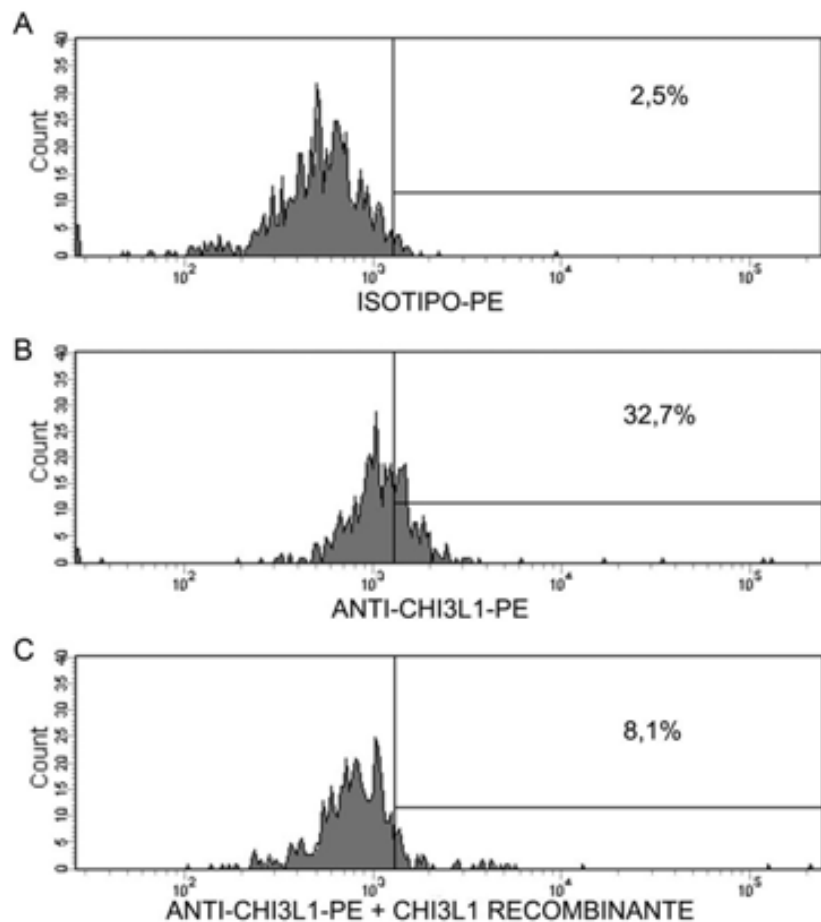
Inicialmente se realizaron experimentos de bloqueo con la proteína recombinante para determinar la especificidad del anticuerpo. Para ello se incubó el anticuerpo con la proteína recombinante previo al marcaje de las células. Como se puede observar en la Figura 27, el marcaje disminuyó de forma importante cuando el anticuerpo se bloqueó con la proteína recombinante, indicando que la tinción observada no era debida a la unión inespecífica del anticuerpo. Además, se usó un control de isotipo como control negativo de la tinción.



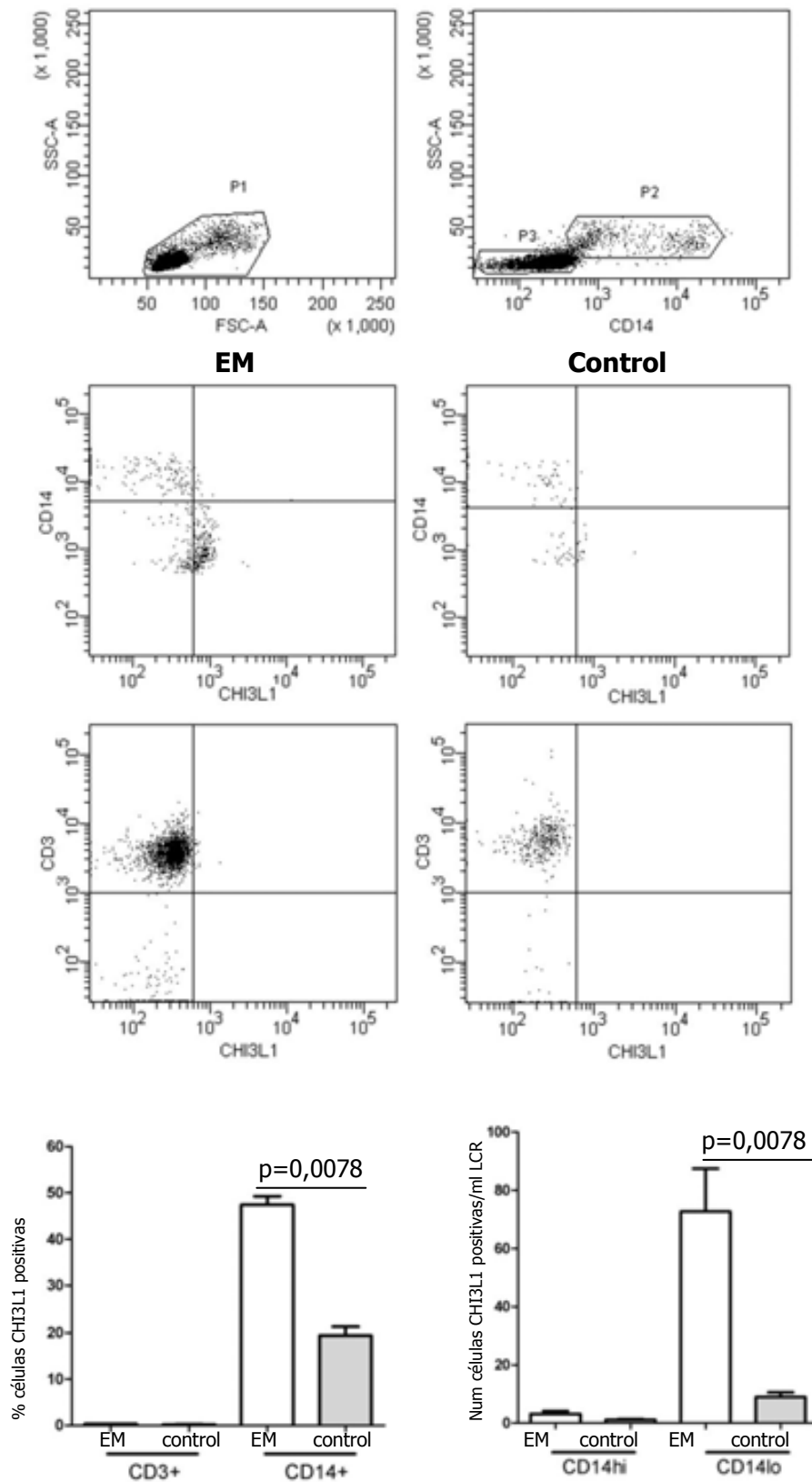
**Figura 26. Expresión de CHI3L1 en tejido cerebral.** Expresión de CHI3L1 en tejido cerebral de pacientes con EM y controles no neurológicos. Tinción con hematoxilina-eosina (A-C) y Kluver Barrera (D-F). Tinción de CHI3L1 (G-I) y tinciones dobles con GFAP (J-I), CD68 (M-O) y CD3 (P-R).

#### 4.3.4.2 Expresión de CHI3L1 en células de LCR

Finalmente, se investigó la expresión de CHI3L1 en células de LCR mediante citometría de flujo. Las células se seleccionaron mediante *forward scatter* (FSC) y *side scatter* (SSC) y por el marcador CD45, para descartar células muertas y debris (ver Figura 34 en el Anexo). La expresión de CHI3L1 se localizó en los monocitos (células CD14+) tanto de los pacientes con EM como de los controles neurológicos no inflamatorios (Figura 26), siendo más elevada en los pacientes con EM ( $p=0,008$ ). Por el contrario, no se observó expresión de la proteína en los linfocitos T (células CD3+). Es interesante comentar que la principal fuente de CHI3L1 correspondió a monocitos caracterizados por una baja expresión de CD14 ( $CD14_{low}$ ), especialmente en el grupo de pacientes con EM ( $p=0,008$  comparado con controles; Figura 28).



**Figura 27. Especificidad del anticuerpo anti-CHI3L1.** Marcaje mediante citometría de flujo del control de isotipo (A), del anticuerpo anti-CHI3L1 (b) y del anticuerpo anti-CHI3L1 bloqueado previamente con la proteína humana recombinante (C).



**Figura 28. Expresión de CHI3L1 en las células del LCR.** Expresión de CHI3L1 en las células del LCR de pacientes con EM y controles. Dot plots representativos de la expresión de CHI3L1 en monocitos (CD14+) y linfocitos (CD3) de LCR. Gráficos representativos del porcentaje de monocitos y células T expresando CHI3L1 (izquierda). Gráficos representativos del porcentaje de monocitos expresando CHI3L1 en función de su expresión de CD14: CD14 high (CD14<sub>high</sub>) y CD14 low (CD14<sub>low</sub>). EM: esclerosis múltiple.



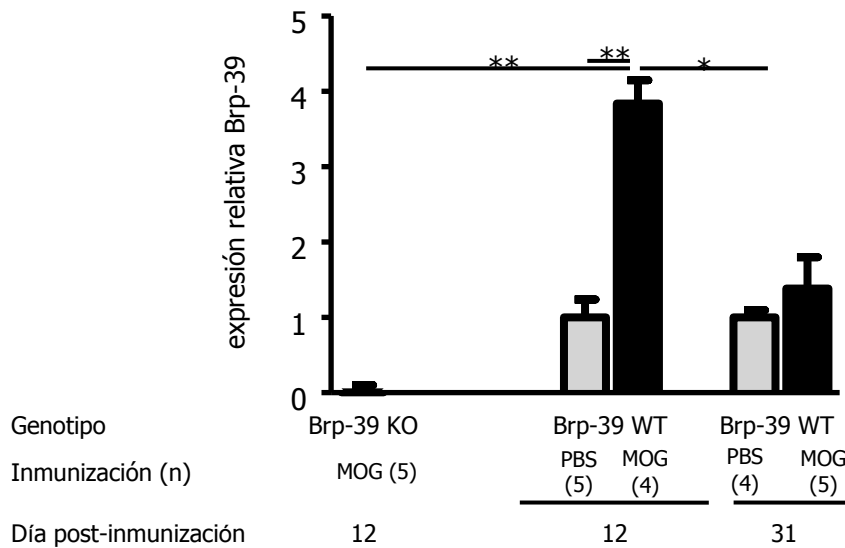


***Resultados relacionados con el objetivo 4B: Estudio de la función de la CHI3L1 en el modelo animal de EM***





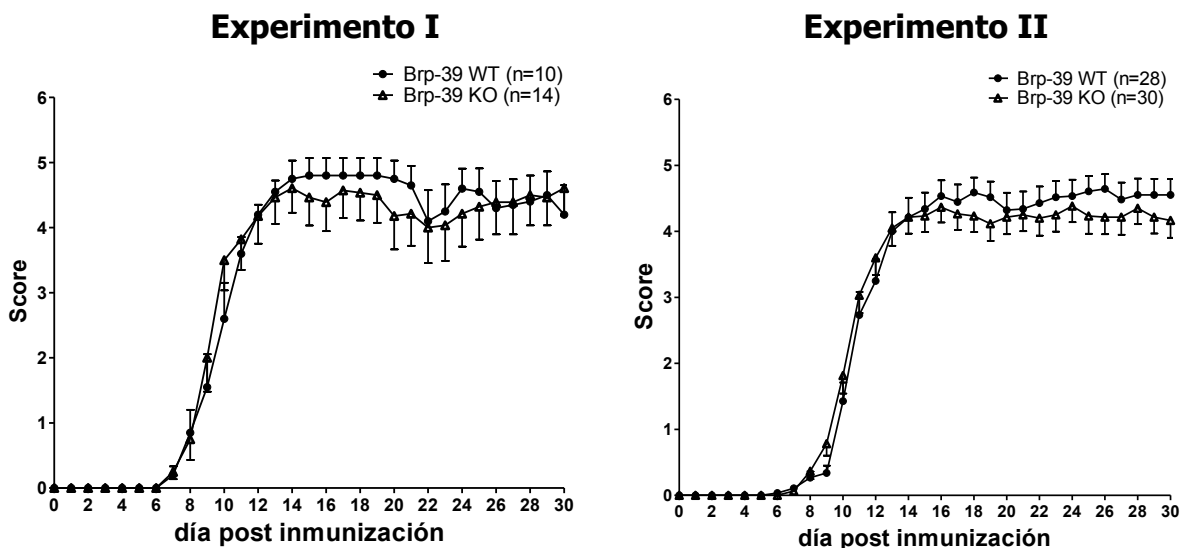
RESULTADOS. *Objetivo 4B*

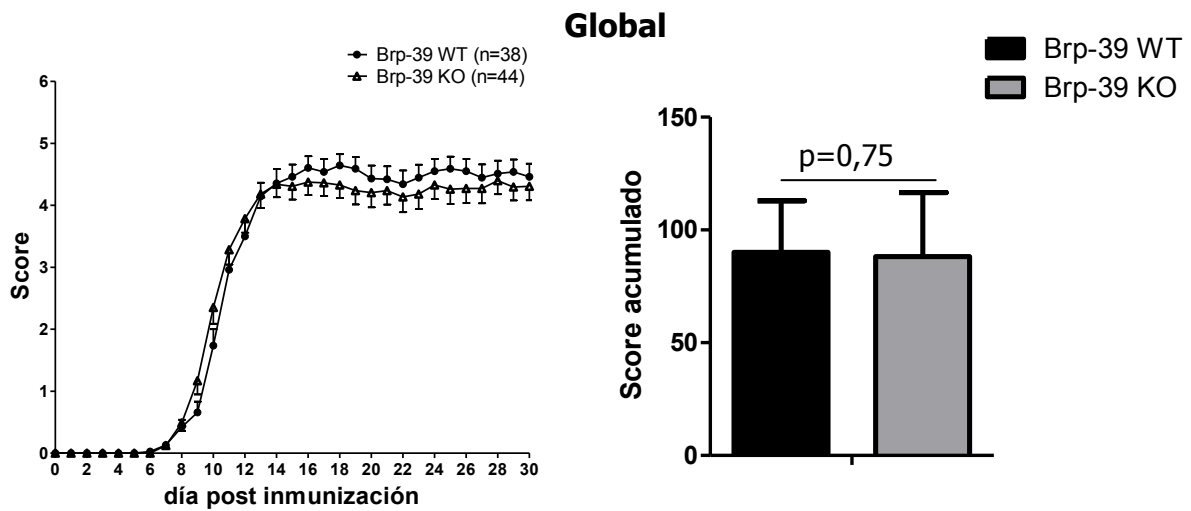


**Figura 30. Expresión de Brp-39 en el SNC durante la EAE**  
Expresión relativa de Brp-39 en ratones WT y KO inmunizados con MOG o con SF a días 12 y 31 p.i.

**4.4.3 Influencia del gen Brp-39 en el curso clínico de la EAE**

A continuación evaluamos si la inmunización con MOG<sub>35-55</sub> tenía un efecto diferente en el desarrollo de la EAE en los ratones Brp-39 WT y KO. Cuando se compararon los scores acumulados no se observaron diferencias significativas entre los dos grupos ( $p=0,54$ ; Figura 31). Cuando se analizaron los experimentos de forma global, tampoco se encontraron diferencias en el score acumulado ( $p=0,75$ ) o en el score máximo ( $p=0,91$ ) entre grupos. Tampoco se encontraron diferencias en el día de inicio de la enfermedad, o en la tasa de mortalidad entre los ratones WT y KO para la Brp-39 (Tabla 22). Cuando los ratones macho y hembra se analizaron por separado, no se encontraron diferencias significativas en el score acumulado entre ratones WT y KO ( $p=0,83$  y  $p=0,93$  respectivamente), ni en el porcentaje de mortalidad o día de inicio (Tabla 22).





**Figura 31. Score acumulado y seguimiento clínico de los ratones WT y KO.** Score acumulado y representación del seguimiento clínico diario comparando los ratones Brp-39 WT y KO de dos experimentos independientes y global.

Genotipo	N	Mortalidad (%)	p-valor	Día inicio	p-valor
WT	48	12 (25)	1,0	9,85	0,60
KO	54	13 (24)		9,70	
♀ WT	26	4 (15)	1,0	10,31	0,63
♀ KO	29	4 (14)		10,03	
♂ WT	22	8 (36)	1,0	9,32	0,88
♂ KO	25	9 (36)		9,32	
♀	55	8 (14)	0,019	10,16	0,10
♂	47	17 (36)		9,32	

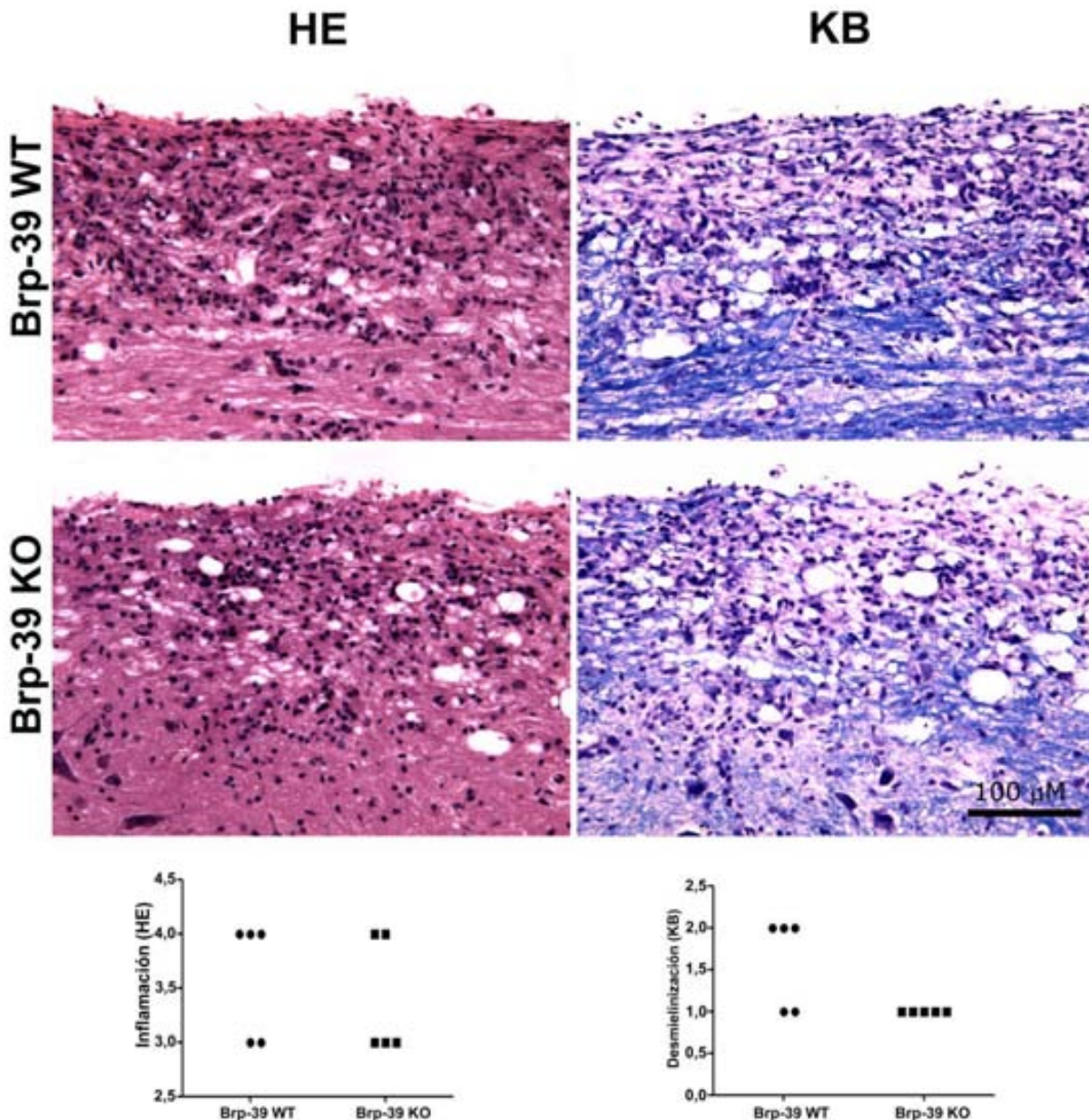
**Tabla 22: Resumen de las características clínicas de la EAE en los ratones WT y KO.** Datos de mortalidad expresados como número de ratones muertos durante el período de seguimiento (porcentaje).

#### 4.4.4 Estudio histopatológico

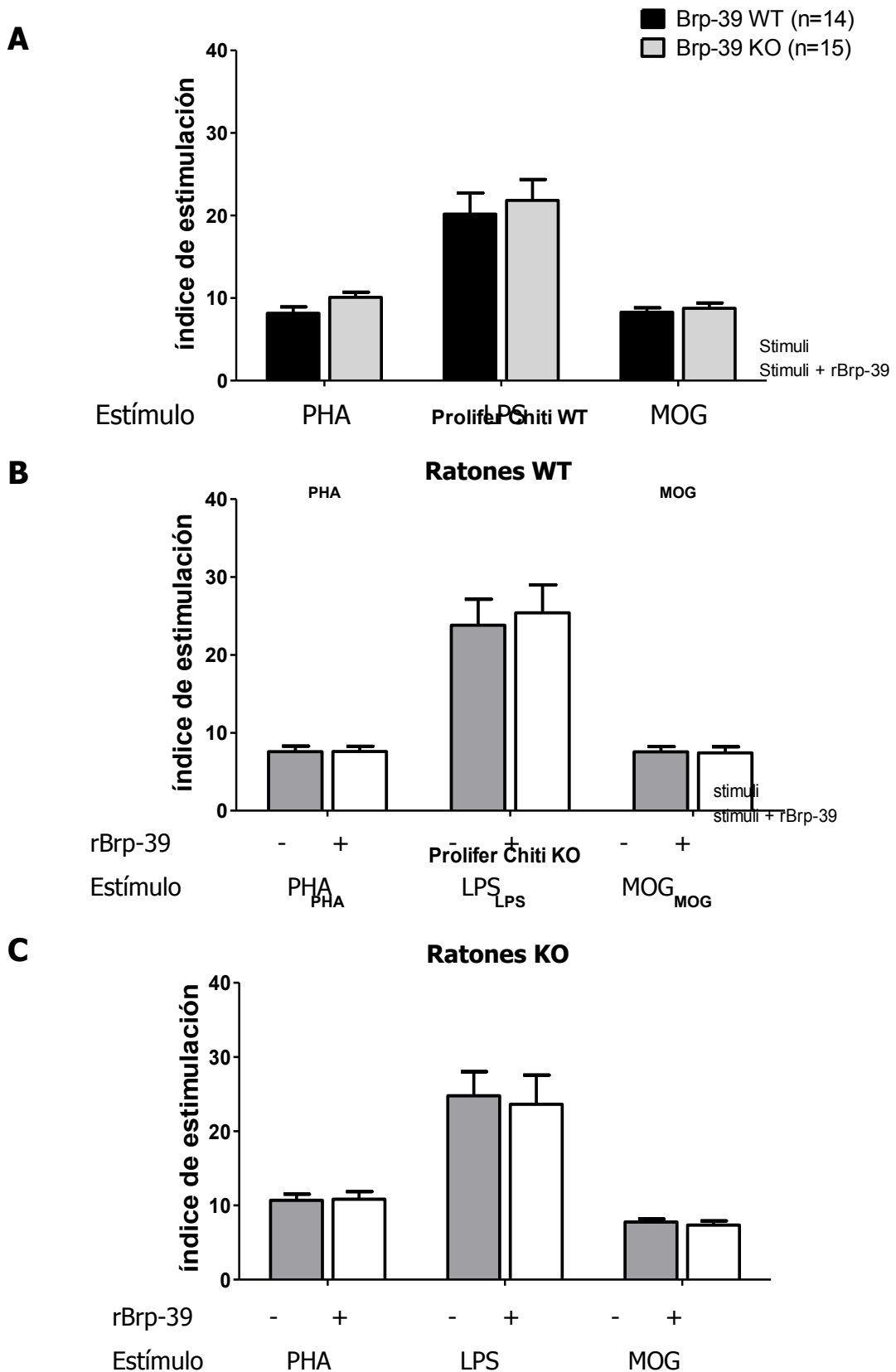
El estudio histopatológico de los ratones WT y KO para la Brp-39 en la fase crónica de la enfermedad (día 31 p.i.) mostró la presencia de infiltrados inflamatorios formados por linfocitos y macrófagos y localizados principalmente en la sustancia blanca de la médula espinal. Además, en el espacio subaracnoideo del cerebro prácticamente no se observaron infiltrados de linfocitos. Únicamente se observó desmielinización extensa en la sustancia blanca de la médula espinal. No se observaron diferencias en cuanto a la inflamación o desmielinización entre los ratones Brp-39 WT y KO (Figura 32).

#### 4.4.5 Efecto del gen Brp-39 en la respuesta inmune

Cuando se compararon los índices de proliferación de los esplenocitos entre los ratones Brp-39 WT y KO frente a estímulos no antígeno-específicos (PHA y LPS) o antígeno-específicos (MOG) no se observaron diferencias (Figura 33 A). Además, la adición de Brp-39 recombinante (rBrp-39) no produjo ningún efecto en la proliferación de los esplenocitos ni en las células de los ratones Brp-39 WT ni KO (Figura 33 B, C).



**Figura 32. Inflamación y desmielinización de la médula espinal durante la EAE en ratones Brp-39 WT y KO.** Las tinciones de HE y KB mostraron niveles similares de inflamación y desmielinización en los ratones Brp-39 WT y KO. Los gráficos representan las puntuaciones de inflamación y desmielinización en los dos grupos de animales.



**Figura 33. Respuesta inmune frente a PHA, LPS y MOG con o sin Brp-39 recombinante de ratón (rBrp-39).** Los gráficos de barras representan el índice de proliferación de los esplenocitos obtenidos a día 12 p.i. de los ratones de los diferentes grupos frente a los distintos estímulos (A). En los gráficos inferiores se observan los índices de estimulación de los esplenocitos de los ratones Brp-39 WT (B) y KO (C) frente a los diferentes estímulos con o sin la adición de Brp-39 recombinante.







## 5. DISCUSIÓN



Durante los últimos años se han realizado importantes esfuerzos en la identificación de biomarcadores pronósticos en pacientes con CIS, concretados en diferentes publicaciones científicas. A pesar de los estudios, en la actualidad no existen biomarcadores pronósticos fiables que puedan emplearse en la práctica clínica para predecir el curso clínico que presentarán los pacientes con CIS. Con este objetivo llevamos a cabo la presente tesis doctoral. De los diferentes abordajes posibles, el del iTRAQ LC-MS/MS fue el que consideramos más adecuado para identificar biomarcadores por su precisión, sensibilidad, rendimiento y automatización de la técnica <sup>173</sup>, aunque también hay que tener en cuenta sus limitaciones <sup>174, 175</sup>. El abordaje de proteómica mediante la aplicación del iTRAQ se ha usado ampliamente para el descubrimiento de biomarcadores en diferentes enfermedades como el Alzheimer <sup>176</sup>, la enfermedad de Parkinson <sup>177</sup> y en distintos tipos de cáncer <sup>178-180</sup>. El uso de esta técnica permite cuantificar diferencias en la concentración de proteínas en distintos estados fisiológicos o patológicos. En nuestro estudio hemos usado la metodología de iTRAQ para identificar proteínas asociadas con la conversión a EM en pacientes con CIS clasificados según unos criterios extremos. De forma interesante, mediante la aplicación de este abordaje de proteómica a los *pools* de muestras de LCR obtenidas en el momento del CIS, los pacientes que convertían a EMCD se podían distinguir de aquellos que se mantenían como CIS. Así pues, en este estudio de proteómica se identificaron una serie de proteínas diferencialmente expresadas entre los pacientes con CIS que convertían a EMCD y los pacientes que continuaban como CIS, entre las que figuraban: la ceruloplasmina, la vitamin D BP y la Apo AI, que fueron más abundantes en los pacientes CIS que convertían a EMCD en las 6 comparaciones de *pools* de LCR; la CHI3L1 estaba también aumentada en 5 de los 6 *pools*; y finalmente la sema7A y la CNDP1 fueron menos abundantes y el plasminógeno, vitronectina, y Apo AIV más abundantes en 4 de los 6 *pools* de muestras comparados. Todas estas proteínas fueron seleccionadas para una primera validación en muestras individuales de LCR usando una técnica analítica alternativa en una cohorte de pacientes parcialmente independiente. Dada la falta de disponibilidad de kits de ELISA comerciales para cuantificar la sema7A y la CNDP1, estas dos proteínas se midieron mediante *selected reaction monitoring* (SRM), que es una técnica de proteómica ampliamente usada para la validación de biomarcadores <sup>160</sup>. En esta primera validación entre un 48% y un 72% de las muestras usadas provinieron de nuevos pacientes con CIS no incluidos en los *pools* de LCR iniciales usados para el estudio de *screening*. Aunque la ceruloplasmina, vitamin D BP, plasminógeno, vitronectina y Apo AIV se

## DISCUSIÓN

habían encontrado diferencialmente expresadas en 4 *pools* o más en el estudio de *screening*, estas diferencias no se validaron cuando las proteínas se cuantificaron en muestras individuales de LCR mediante ELISA, y únicamente se validaron la CHI3L1, la Apo AI, la sema7A y la CNDP1 como biomarcadores asociados a la conversión a EM en los pacientes con CIS. Finalmente, en una segunda fase de validación de las proteínas candidatas en cohortes de pacientes totalmente independientes, únicamente se validaron la CHI3L1, la sema7A y la CNDP1. Es importante remarcar que el iTRAQ es una herramienta apropiada para el descubrimiento de biomarcadores, pero los resultados obtenidos mediante esta técnica siempre requieren de una validación por técnicas analíticas independientes y más sensibles para descartar posibles falsos positivos.

La ceruloplasmina es un antioxidante que se había identificado previamente en *pools* de LCR de pacientes con EM pero no en muestras de pacientes con otras enfermedades inflamatorias <sup>181</sup> y existen dos estudios recientes en los que se ha encontrado por un lado, niveles disminuidos de ceruloplasmina en el LCR de pacientes con EM respecto a controles con otras enfermedades neurológicas <sup>182</sup> y por otro lado niveles elevados de ceruloplasmina en el suero de pacientes con EM respecto a los controles <sup>183</sup>. En nuestro estudio, no se encontraron diferencias en los niveles de ceruloplasmina entre los pacientes con CIS que convertían a EMCD y los que no convertían, ni entre los pacientes CIS y los controles con otras enfermedades neurológicas.

En estudios de proteómica previos, la vitamin D BP se encontró disminuida en pacientes con EM y en pacientes con CIS respecto a individuos con otras enfermedades neurológicas <sup>182, 184, 185</sup>, mientras que en otro estudio los niveles de vitamin D BP se encontraron elevados en el LCR de pacientes con EMSP respecto a controles con otras enfermedades neurológicas <sup>186</sup>. En nuestro estudio, los niveles de vitamin D BP en LCR determinados mediante ELISA fueron similares entre los pacientes CIS que convertían a EMCD y los que permanecían como CIS, y también fueron comparables con los controles con otras enfermedades neurológicas, siendo estos resultados parecidos a un estudio reciente de *Smolders y col.* en el que no se encontraron diferencias en los niveles de la proteína entre pacientes con EM y controles, ni entre pacientes con EMRR durante el brote y en período de remisión <sup>187</sup>. Los resultados obtenidos en nuestro estudio, además, fueron confirmados en una segunda cohorte de pacientes independientes, reafirmando así los resultados.

El plasminógeno es un enzima precursor inactivo, que es activado por los enzimas uroquinasa, activador tisular del plasminógeno o el activador endotelial del plasminógeno transformándolo en plasmina. El sistema de activación del plasminógeno se ha encontrado alterado en los pacientes con EM <sup>188, 189</sup>, observándose una actividad 10 veces mayor del enzima activador tisular del plasminógeno en los pacientes con EM que en los controles. Por otro lado, en los pacientes con EMSP se han descrito niveles disminuidos de plasminógeno en el LCR respecto a los pacientes con EMPP y los controles <sup>155</sup>, mientras que en nuestro estudio no se encontraron diferencias entre los pacientes con CIS que convertían a EMCD y los que permanecían como CIS.

En cuanto a la Apo AIV, son conocidas sus propiedades anti-inflamatorias <sup>190</sup>. En un estudio de proteómica reciente se encontraron niveles disminuidos en el LCR de los pacientes con EM respecto a los controles <sup>182</sup>, mientras que en nuestro estudio no se observaron diferencias entre los pacientes con CIS conversores y no conversores, del mismo modo que en otro estudio de proteómica anterior <sup>191</sup>.

La falta de reproducibilidad entre los diferentes estudios existentes de biomarcadores en la EM puede ser debida a los distintos abordajes usados. Por ejemplo, en muchos de estos estudios únicamente se incluyen pacientes con EM, y no pacientes con CIS. Por otro lado, en los estudios en los que sí se han incluido pacientes con CIS no se ha tenido en cuenta aquéllos que iban a convertir a EM y los que iban a permanecer como CIS, sino que se han considerado como un único grupo de pacientes. Además, el grupo de controles usado en los diferentes estudios es muy heterogéneo, lo que puede dar lugar a resultados muy variables, según si estos pacientes tienen enfermedades más o menos inflamatorias, como se ha observado en nuestro estudio. Así pues, la existencia de una gran cantidad de trabajos con resultados contradictorios en los estudios de biomarcadores se puede deber principalmente a la falta de un protocolo estándar para la realización de éstos, así como en la selección de los grupos de pacientes, la recogida de muestras y el almacenaje de éstas. Para intentar solucionar este problema, se han realizado estudios de consenso sobre conceptos generales de biomarcadores, así como intentos de establecer unos protocolos estandarizados para la recogida y conservación de las muestras para estudios de biomarcadores <sup>145, 192-195</sup>. También en este sentido, el consorcio del BioMS (*Biomarkers in Multiple Sclerosis*) ha desarrollado un protocolo detallado de los grupos de estudio, centrándose en el tipo de pacientes usados como control, y unas guías de clasificación de éstos pacientes en diferentes grupos <sup>146</sup>. En nuestro estudio hemos seguido estas guías para clasificar los controles como controles neurológicos inflamatorios (OENI) y no inflamatorios (OENNI) <sup>146</sup>.

## DISCUSIÓN

En el estudio de *screening*, en los pacientes con CIS que convirtieron a EMCD la Apo AI se encontró sobreexpresada en 6 de los 6 *pooles* comparados, la CHI3L1 se encontró sobreexpresada en 5 de 6 comparaciones y la sema7A y la CNDP1 se encontraron menos expresadas en 4 de los 6 *pooles*. Estos resultados se validaron mediante técnicas alternativas en dos cohortes de validación, la segunda de las cuales era totalmente independiente tanto de la primera cohorte de validación como de la cohorte de pacientes usada para el estudio inicial de *screening*. Para la primera validación de las proteínas seleccionadas del estudio de *screening* los niveles de CHI3L1 y de Apo AI se midieron tanto en muestras de LCR como de suero, mientras que la sema7A y la CNDP1 únicamente se determinaron en muestras de LCR. El LCR representa mejor los eventos que ocurren de forma local en el cerebro dada su proximidad al SNC, pero su obtención requiere un procedimiento invasivo, mientras que el suero es una muestra más fácil de obtener, y por esta razón sería interesante descubrir un biomarcador cuyos niveles se pudieran detectar de forma diferencial también en el suero. Desafortunadamente, las diferencias en los niveles de CHI3L1 y de Apo AI entre los pacientes con CIS únicamente se observaron en las muestras de LCR, aunque es de destacar que los niveles de CHI3L1 en el suero se encontraron más elevados en el grupo de pacientes con CIS considerado de forma global comparado con los controles con otras enfermedades neurológicas, un hallazgo que aumenta, de algún modo, la especificidad de las diferencias observadas en los niveles de la proteína en el LCR entre los pacientes con CIS que convierten a EM y los que permanecen como CIS. En la segunda cohorte de validación, únicamente se confirmaron los resultados observados para la CHI3L1, la sema7A y la CNDP1, encontrándose niveles incrementados de CHI3L1 y niveles disminuidos de sema7A y CNDP1 en el LCR del grupo de pacientes con CIS que convertían a EMCD. Además, el hecho de que las dos cohortes de validación incluyeran unos criterios de inclusión menos estrictos de conversión a EM comparado con la cohorte original usada para el estudio de *screening* (por ejemplo, el número de criterios de Barkhof en la RM basal y los tiempos de seguimiento) indican que tanto los niveles de CHI3L1 como de sema7A y CNDP1 podrían ser aplicados a un amplio espectro de pacientes CIS con el objetivo de discriminar aquellos que posteriormente convertirán a EM y aquellos que seguirán como CIS.

La Apo AI es el componente proteico mayoritario del HDL (del inglés *high density lipoprotein*), y existen estudios que sugieren que podría ejercer efectos inmunomoduladores mediante la represión de la producción de citoquinas proinflamatorias como la IL-1b o el TNF $\alpha$  <sup>196</sup>, citoquinas implicadas en algunas

enfermedades inflamatorias y autoinmunes como la EM. En un estudio de proteómica reciente se observaron niveles disminuidos de Apo AI en pacientes con EM respecto a los controles con otras enfermedades neurológicas <sup>182</sup>, mientras que en otro estudio no se observaron diferencias significativas entre pacientes con EMRR, pacientes CIS y controles <sup>197</sup>. Como se ha comentado anteriormente, aunque en nuestro estudio la Apo AI se validó como biomarcador asociado a conversión a EM en la primera cohorte de validación, estos resultados no se validaron en una segunda cohorte de pacientes totalmente independiente, lo que parece indicar que esta proteína podría corresponder a un falso positivo de la técnica de *screening*.

La sema7A pertenece a una familia de proteínas de membrana y solubles con funciones en la guía axonal y con efectos inmunomoduladores <sup>198</sup>. Los niveles disminuidos de sema7A observados en los pacientes con CIS que convertían a EMCD comparado con los que no convertían podrían estar relacionados con su papel como regulador negativo de la activación de las células T <sup>199</sup>. En este contexto, se ha descrito que en ratones deficientes en sema7A, el curso clínico de la EAE es más severo y que las células T muestran una respuesta proliferativa aumentada frente al antígeno MOG <sup>199</sup>, aunque hay resultados contradictorios al respecto, ya que en otro estudio se ha descrito una EAE más leve en los ratones KO para la sema7A <sup>200</sup>.

Por otro lado, en el estudio de *Czopik y colaboradores* se observó una mayor inflamación y desmielinización en el SNC de los ratones KO para la sema7A comparado con los WT, hallazgo que está en línea con la correlación negativa que hemos encontrado entre los niveles de sema7A en el LCR y la carga lesional en la RM.

Por otro lado, la CNDP1 es una dipeptidasa expresada básicamente en el hígado y el cerebro que pertenece a la familia de metaloproteasas M20 <sup>201</sup>. La CNDP1 tiene como función hidrolizar la carnosina, que tiene efectos neuroprotectores conocidos. La carnosina ejerce su función neuroprotectora básicamente mediante su capacidad de disminuir el estrés oxidativo y la inflamación <sup>202-204</sup>. Se han descrito niveles disminuidos de CNDP1 en pacientes con EM comparado con controles con otras enfermedades neurológicas <sup>182</sup>, así como una disminución en la actividad enzimática en muestras de suero de pacientes con EM comparado con controles sanos <sup>205</sup>. Los niveles disminuidos de CNDP1 que hemos observado en el LCR de los pacientes con CIS que convertían a EMCD comparado con los que no convertían en nuestro estudio, podrían estar asociados a un incremento en los niveles de carnosina, hecho que se podría interpretar como un intento de proteger el cerebro frente al estrés oxidativo y la inflamación en los pacientes que convierten a EM. De todos modos, el papel de la CNDP1 en estos

## DISCUSIÓN

pacientes requiere de estudios adicionales, sobretodo dada la falta de asociación observada entre los niveles de CNDP1 en el LCR y las variables de RM como son el número de lesiones que captan contraste y el número de lesiones en T2, que reflejarían el grado de inflamación en el SNC.

Finalmente, la CHI3L1 fue una de las tres proteínas que se validó como marcador asociado a conversión tanto en la primera cohorte de validación como en la segunda cohorte de pacientes con CIS totalmente independiente. Los niveles de CHI3L1 se encontraron elevados en el grupo de pacientes con CIS que convertían a EMCD comparado con los pacientes que se mantenían como CIS. Además, los niveles de CHI3L1 se correlacionaron con un peor pronóstico, puesto que niveles elevados estaban asociados a un menor tiempo de conversión a EM. Finalmente, la CHI3L1 fue validada en una cohorte mucho mayor de pacientes con CIS procedentes de 15 centros europeos de EM. En este estudio se encontraron nuevamente niveles de CHI3L1 más elevados en el LCR de los pacientes con CIS que posteriormente convertían a EM respecto a los que se mantenían como CIS.

Cuando se estudió el papel de la CHI3L1 como biomarcador asociado a la conversión a EM en un modelo de regresión multivariado, los niveles de CHI3L1 resultaron ser un factor de riesgo para la conversión a EM independiente de otros factores predictivos de tanto peso como son las alteraciones en la RM y la presencia de bandas oligoclonales de IgG <sup>148, 161, 206</sup>.

Por otro lado, el largo tiempo de seguimiento de algunos de los pacientes con CIS incluidos en el estudio nos ha permitido explorar mejor el papel de la CHI3L1 en el desarrollo de discapacidad mediante el estudio del tiempo hasta alcanzar un EDSS de 3,0. En este sentido, los niveles de CHI3L1 en el LCR resultaron ser un fuerte predictor de la progresión de la discapacidad, y de hecho fueron el único factor de riesgo independiente asociado con el desarrollo de discapacidad en un modelo de regresión multivariado.

Además, más de un 40% de los pacientes con CIS resultaron tener niveles de CHI3L1 en el LCR por encima de 170 ng/ml, un valor de *cut-off* con una clara implicación pronóstica, dado que los pacientes con niveles por encima de ese valor de *cut-off* presentaron un tiempo de conversión más corto y una progresión más rápida de la discapacidad. Este valor de *cut-off* se podría aplicar en la práctica para identificar aquellos pacientes con CIS con un peor pronóstico de la enfermedad. El hecho de hallar niveles elevados de CHI3L1 en el LCR además de información de otras variables como la presencia de bandas oligoclonales de IgG y 3-4 criterios de Barkhof en la RM



basal podrían ayudar al neurólogo en la toma de decisiones en el momento de iniciar el tratamiento. Esto es particularmente importante cuando se analiza el tiempo hasta alcanzar un EDSS de 3,0 dado que hemos observado que los niveles de CHI3L1 en el LCR superiores a 170 ng/ml confieren, como único factor predictivo, un riesgo aproximadamente 4 veces mayor de desarrollo de discapacidad. Además, los niveles altos de CHI3L1 en el LCR están asociados con una progresión de la discapacidad más temprana (de unos 5 años antes en alcanzar un EDSS de 3,0 comparado con los que tienen niveles bajos de proteína) con una sensibilidad por encima del 70%. Basándonos en esto, los pacientes con CIS que presenten niveles altos de CHI3L1 en el LCR en el momento basal de la punción lumbar se podrían beneficiar de un inicio temprano del tratamiento, y de un tratamiento más agresivo, que ayude a retrasar el desarrollo de la enfermedad, y disminuya el grado de discapacidad a largo plazo.

La asociación entre los niveles de CHI3L1 en el LCR y las alteraciones en la RM y los parámetros del LCR en el momento del CIS apuntan hacia una estrecha relación entre los niveles de CHI3L1 y el grado de inflamación en el SNC de los pacientes con CIS. Esta relación probablemente explicaría las correlaciones observadas entre los niveles de CHI3L1 y la atrofia cerebral observada durante el seguimiento; aunque, debido al número relativamente pequeño de pacientes con datos de atrofia cerebral incluidos en el estudio, los resultados sobre el papel de la CHI3L1 en el desarrollo de atrofia cerebral tienen que ser confirmados en cohortes mayores de pacientes con CIS y con tiempos de seguimiento más largos.

Las asociaciones encontradas entre los niveles de CHI3L1 y la inflamación en el SNC podrían llevarnos a especular que los infiltrados inflamatorios en el SNC procedentes de la periferia podrían ser la mayor fuente de CHI3L1 en el LCR. Pero tanto el cociente de albúmina (Q-alb) determinado en un subgrupo de pacientes como los hallazgos por inmunohistoquímica están en contra de esta hipótesis y sugieren un origen básicamente local de los niveles de CHI3L1 en el LCR. En primer lugar, el comportamiento independiente de los niveles de CHI3L1 del Q-alb, que es una medida establecida de la disfunción de la barrera hematoencefálica <sup>207</sup>, es un indicador claro de que la CHI3L1 en el LCR procede principalmente de la producción en el cerebro. Esta hipótesis está respaldada por la observación de unos niveles de la proteína unas 6 veces mayor en el LCR que en el suero en el estudio inicial <sup>144</sup> y de aproximadamente 8 veces superior en un estudio reciente <sup>208</sup>. Como consecuencia de esto, los niveles de CHI3L1 en el LCR no requieren una corrección por concentración en la sangre o por el Q-alb, que sí que es necesaria para otras proteínas derivadas de la sangre como por

## DISCUSIÓN

ejemplo la IgG <sup>209</sup>. En segundo lugar, la expresión de CHI3L1 en las lesiones crónicas activas con alta actividad inflamatoria de los pacientes con EM se encontró principalmente en los astrocitos, un hallazgo descrito también en estudios previos en los que la expresión de CHI3L1 se había observado principalmente en los astrocitos tanto de simios como de humanos con encefalitis lentiviral <sup>210</sup> y en pacientes con infarto cerebral <sup>170</sup>. Aun así, la contribución de las células infiltradas en el SNC derivadas de la sangre a los niveles de CHI3L1 encontrados en el LCR no se puede descartar en base a nuestros hallazgos de expresión de CHI3L1 en los macrófagos y células gliales en tejido cerebral así como en los monocitos CD14<sup>+</sup> del LCR. De todos modos, el hecho de que la expresión de la proteína se observara principalmente en los monocitos del LCR con una expresión baja de CD14 (CD14<sub>low</sub>), una población celular que se ha descrito que tiene un potencial migratorio disminuido hacia los tejidos inflamados debido a la falta del receptor de quimiocinas CCR5 <sup>211-214</sup> sugiere que la expresión de CHI3L1 por los monocitos CD14<sub>low</sub> no está relacionada con el infiltrado inflamatorio de las células de la periferia al SNC sino que estas células estarían jugando un papel en el reemplazo de los macrófagos residentes <sup>211</sup>. Se puede hipotetizar entonces, que los macrófagos y microglía del cerebro y que los monocitos CD14<sub>low</sub> del LCR son los responsables de un nivel basal bajo de expresión de CHI3L1 en el SNC, y que esta expresión puede ser incrementada de forma proporcional al estímulo inflamatorio producido en el SNC con la contribución de células adicionales, principalmente astrocitos. En este caso, los niveles elevados de CHI3L1 estarían reflejando el grado de activación astrocitaria debida a la inflamación. Este hecho está respaldado con el hallazgo de la expresión de CHI3L1 por astrocitos reactivos en lesiones con alta actividad inflamatoria, y con las correlaciones observadas entre los niveles de CHI3L1 en el LCR y las alteraciones en la RM y los parámetros inflamatorios del LCR. El hecho de que los niveles elevados de CHI3L1 estén asociados a un peor pronóstico en los pacientes CIS sugiere de forma indirecta un papel perjudicial de la activación de los astrocitos en la patogenia de la EM.

La CHI3L1 (también conocida como YKL-40, human cartilage glycoprotein 39 – HC-gp39, breast regression protein 39 – Brp-39) es un miembro de la familia de las 18-glicosil-hidrolasas, que es capaz de unir la quitina. De todos modos, mientras que otras quitinasas de la familia como la quitotriosidasa y la *acidic mammalian chitinase* (AMCase) han demostrado actividad quitinolítica <sup>215, 216</sup> la CHI3L1 es capaz de unir la quitina pero carece de actividad quitinolítica <sup>217, 218</sup>. La CHI3L1 se expresa en diferentes

tipos celulares como condrocitos<sup>217</sup>, células vasculares del músculo liso<sup>219</sup>, neutrófilos<sup>220</sup>, macrófagos<sup>218</sup> y células epiteliales de las vías respiratorias<sup>221</sup>.

Los niveles de CHI3L1 se han encontrado elevados en una gran variedad de enfermedades caracterizadas principalmente por inflamación crónica como por ejemplo la artritis reumatoide<sup>222, 223</sup>, osteoartritis<sup>224</sup>, enfermedad inflamatoria intestinal<sup>225</sup>, sarcoidosis<sup>226</sup>, lupus eritematoso sistémico<sup>224</sup>, asma<sup>227</sup>, fibrosis hepática<sup>228</sup>, aterosclerosis<sup>229</sup>, diabetes de tipo 2<sup>230</sup> y obesidad<sup>231</sup>. Además, en muchas ocasiones los niveles de CHI3L1 se correlacionaban con la actividad y/o la severidad de la enfermedad<sup>222-228, 230, 231</sup>. Los niveles de CHI3L1 también se han encontrado elevados en una gran diversidad de cánceres en los que se incluyen cáncer de colon/recto<sup>232</sup>, mama<sup>233</sup>, ovario<sup>234</sup>, próstata<sup>235</sup>, estómago<sup>236</sup>, endometrio<sup>237</sup>, pulmón<sup>238</sup> y cerebro<sup>239</sup>, en los que los niveles de CHI3L1 se encontraron asociados a un peor pronóstico en los pacientes con cáncer.

En cuanto a los trastornos del SNC, los niveles séricos de CHI3L1 se encontraron aumentados en pacientes con accidente cerebrovascular y correlacionaron con el grado de recuperación funcional<sup>240</sup>; los niveles de CHI3L1 en plasma y LCR se han relacionado con el diagnóstico de pacientes en estadios iniciales de la enfermedad de Alzheimer<sup>168, 241, 242</sup>; en pacientes con EM, se han descrito niveles elevados en el LCR de pacientes con EMRR<sup>170, 243</sup>. Teniendo en cuenta todos estos hallazgos, es evidente que la CHI3L1 no es un marcador específico de EM, y de hecho en nuestro estudio los niveles de CHI3L1 más altos se encontraron en el LCR del grupo de controles con otras enfermedades neurológicas inflamatorias, hallazgo de algún modo predecible, considerando que una gran proporción de estos pacientes padecían enfermedades infecciosas del SNC tales como meningitis y encefalitis, las cuales se han asociado con niveles extremadamente elevados de CHI3L1 en el LCR<sup>210, 244</sup>.

A pesar de los numerosos estudios que muestran una implicación de la CHI3L1 en las diversas enfermedades, su mecanismo de acción permanece sin ser del todo conocido. Existen algunos estudios que sugieren una función de la CHI3L1 como factor de remodelación tisular<sup>245-247</sup> y como promotor de la angiogénesis<sup>248, 249</sup>. De todos modos, aunque no se conozca su actividad fisiológica, los estudios mencionados así como los hallazgos encontrados en nuestros estudios apuntan hacia un papel de la CHI3L1 como biomarcador pronóstico en una gran variedad de enfermedades.

Además, se ha visto que la expresión de CHI3L1 se induce por citoquinas pro-inflamatorias como la IL-1 y el TNF $\alpha$ <sup>250</sup>. Este hallazgo puede indicar que, en los pacientes con CIS, la CHI3L1 es secretada por macrófagos activados en el contexto de

## DISCUSIÓN

un fenómeno inflamatorio que está ocurriendo en el SNC. En nuestro estudio, los niveles de CHI3L1 en el LCR correlacionaron significativamente con el número de lesiones captantes de gadolinio y con el número de lesiones en T2. Además, la CHI3L1 se había propuesto en un estudio previo como auto-antígeno candidato en la artritis reumatoide, y en este estudio se mostraba que las respuestas inmunes mediadas por la CHI3L1 en estos pacientes cambiaban hacia un fenotipo pro-inflamatorio dominado por interferón gamma (IFN- $\gamma$ )<sup>251</sup>. Si en los pacientes con EM se estuviera produciendo una respuesta inmune similar, la CHI3L1 podría estar contribuyendo al fenotipo Th1 observado en la respuesta inmune de estos pacientes.

De forma interesante, la actividad enzimática de otros miembros de la familia de las quitinasas, la quitotriosidasa, está incrementada en pacientes con EM respecto a los controles sanos<sup>252, 253</sup>, lo que refuerza el papel importante de las proteínas de la familia de las quitinasas en la etiopatogenia de la EM.

A raíz de estos resultados decidimos investigar el papel de la CHI3L1 en el curso clínico de la EM. Para ello se midieron los niveles de proteína en muestras de plasma de una gran cohorte de pacientes con representación de las diferentes formas clínicas de la enfermedad. Debido a que en diversos estudios se había observado la influencia de la edad en los niveles de la proteína<sup>167-170</sup>, el análisis se ajustó por esta variable con el objetivo de controlar su efecto. Los pacientes con formas progresivas de la enfermedad, es decir, los pacientes con EMSP y EMPP, fueron aquéllos en los que se encontraron los niveles más elevados de CHI3L1 en el plasma comparado con los pacientes con EMRR y con los controles sanos, mientras que no se observaron diferencias en los niveles de la proteína entre estos dos últimos grupos. Teniendo en cuenta que la CHI3L1 está aumentada en patologías caracterizadas por inflamación crónica<sup>222-231</sup> el hallazgo de niveles elevados de CHI3L1 en los pacientes con formas progresivas y menos inflamatorias de la enfermedad fue de alguna forma sorprendente. Además, en un estudio reciente de *Correale y Fiol*<sup>243</sup> los niveles de CHI3L1 medidos en muestras de LCR se encontraron incrementados en los pacientes con EMRR respecto a los pacientes con EMSP, aunque estas diferencias entre grupos se perdían cuando la proteína se determinaba en muestras de suero. En este estudio de *Correale y Fiol*, la falta de inclusión de pacientes con EMPP no nos permitió una comparación directa de los niveles de CHI3L1 en LCR y suero entre los pacientes con EMPP y las otras formas clínicas de la enfermedad. Mientras que las discrepancias observadas entre los estudios pueden estar reflejando las diferentes muestras biológicas usadas para determinar los niveles de proteína, el hallazgo de niveles

elevados de CHI3L1 en el plasma de pacientes con formas progresivas de la enfermedad se ven reforzados por la asociación alélica observada entre el SNP rs4950928 y los pacientes con EMPP.

En nuestro estudio, la asociación genética estaba potenciada por el alelo mayor *C*. Dado que la EMSP es la evolución natural de la EMRR, las asociaciones genéticas potenciales restringidas a la forma clínica EMSP no se pudieron evaluar, y por lo tanto, las formas EMRR y EMSP se agruparon para análisis de asociación como EM de inicio en brotes. A pesar de la inclusión de los pacientes con EMSP dentro del grupo de pacientes con EM de inicio en brotes, las asociaciones alélicas resultaron estadísticamente significativas cuando los pacientes EMPP se compararon con los controles sanos y también con los pacientes con EM de inicio en brotes. Estos hallazgos genéticos están en concordancia con los resultados de la determinación de los niveles plasmáticos de la CHI3L1, mostrando niveles plasmáticos más elevados en los pacientes con EMPP comparado con los pacientes con EMRR y los controles sanos. El SNP rs4950928 es un polimorfismo funcional localizado en la región promotora del gen de la CHI3L1, y se había correlacionado previamente con los niveles séricos de la proteína<sup>171, 254, 255</sup>. Esta asociación entre el genotipo y el fenotipo también se observó en nuestro estudio, y la presencia del alelo *C* estaba claramente asociada con niveles más altos de la proteína en el plasma. Como ya se había reportado anteriormente para otras enfermedades<sup>172</sup> las diferencias relacionadas con el genotipo mencionadas anteriormente no se restringieron a la condición patológica y se observaron en los pacientes con EM independientemente de la forma clínica y en el grupo de controles sanos.

Los resultados de niveles de CHI3L1 plasmáticos similares entre pacientes con EM en el momento del brote o durante el período de remisión clínica no sugieren un papel de la CHI3L1 en la actividad aguda de la enfermedad. Mientras que en el estudio de proteómica habíamos observado que los niveles de CHI3L1 en el LCR determinados en el momento del primer brote eran más elevados en los pacientes que convertían a EM comparado con los que no convertían, las determinaciones de la proteína en el suero de los mismos pacientes no mostraron estas diferencias. De forma similar y como ya se ha comentado antes, en el estudio de *Correale y Fiol*<sup>243</sup> las diferencias observadas entre los pacientes EMRR y EMSP en los niveles de CHI3L1 estaban restringidas al LCR y no se detectaron en el suero.

Todos estos resultados sugieren que las variaciones en los niveles de CHI3L1 debidas a la inflamación podrían detectarse mejor en el LCR que en muestras de suero o plasma.

## DISCUSIÓN

Finalmente, nos propusimos investigar si los niveles de CHI3L1 en el plasma podían ser modulados por el tratamiento con IFN- $\beta$ , ya que se ha observado recientemente que otros tratamientos, como el natalizumab<sup>208, 256</sup> o la mitoxantrona<sup>208</sup> disminuyen los niveles de la proteína en el LCR, aunque este efecto no se observó en el suero de los mismos pacientes<sup>208</sup>. Para determinar el efecto del tratamiento con IFN- $\beta$ , se midieron los niveles de CHI3L1 en muestras de plasma de un subgrupo de pacientes antes y después de recibir tratamiento con IFN- $\beta$ . Aunque las diferencias no fueron estadísticamente significativas, el tratamiento con IFN- $\beta$  tendía a disminuir los niveles de la proteína después de un tiempo medio de tratamiento de 8 meses, hallazgo que sugiere que los efectos beneficiosos del INF- $\beta$  en la EM podrían estar mediados a través de cambios en los niveles plasmáticos de CHI3L1. En este contexto, sería interesante explorar si los niveles de CHI3L1 en el LCR también son modulados por el tratamiento con IFN- $\beta$ .

En resumen, estos resultados apuntan hacia un papel de la CHI3L1 plasmática en el curso clínico de la EM pero no en la actividad aguda de la enfermedad. En este aspecto, mientras que el LCR parece ser más adecuado para capturar cambios en los niveles de CHI3L1 debidos a la inflamación, los niveles plasmáticos nos permiten discriminar mejor entre pacientes con formas progresivas de la enfermedad y pacientes con EMRR y controles sanos. La asociación observada entre el polimorfismo funcional del gen de la CHI3L1 y el grupo de pacientes con EMPP está en línea con los niveles plasmáticos más elevados observados en este grupo de pacientes, y apunta hacia un papel de la CHI3L1 en este grupo particular de pacientes. De todos modos, aunque se observaron niveles elevados de CHI3L1 en los pacientes con formas progresivas de la enfermedad, los niveles de la proteína no se correlacionaron con variables clínicas como el EDSS o parámetros radiológicos como la fracción del parénquima cerebral. Relacionado con este último punto, el hecho de que la información neuro-radiológica únicamente estaba disponible para el grupo de pacientes con EMPP es una limitación importante del trabajo. Aunque son necesarios más estudios, estos hallazgos sugieren que los niveles plasmáticos de CHI3L1 podrían ser usados como biomarcador de las formas progresivas de EM.

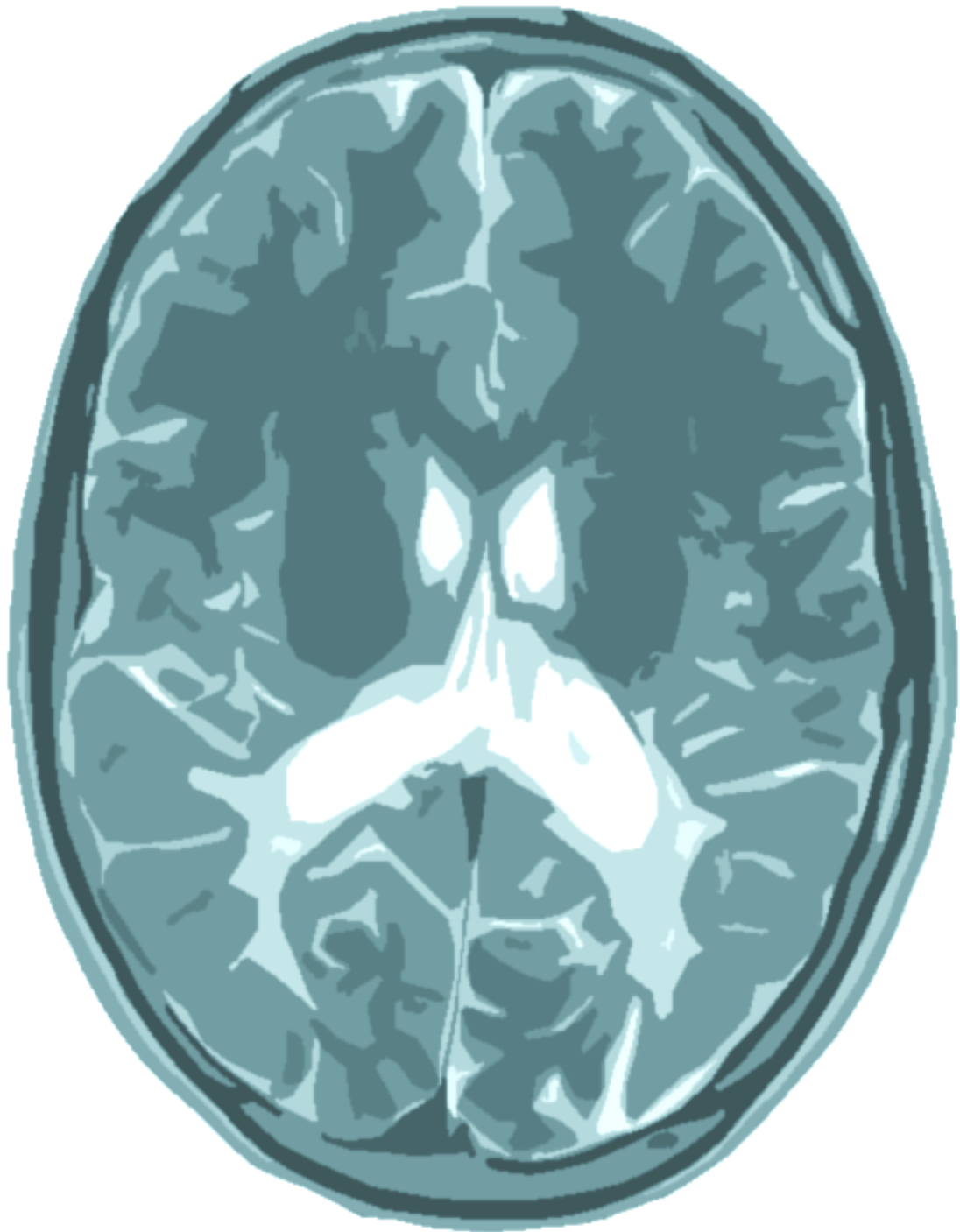
Finalmente, quisimos explorar el papel de la CHI3L1 en la EM a través de la EAE, que es un modelo animal ampliamente utilizado para estudiar la enfermedad, en ratones KO y WT para Brp-39 (el análogo murino de la CHI3L1). En estudios previos, ratones KO para Brp-39 habían mostrado una respuesta inflamatoria diferencial de los ratones WT. En un modelo de asma inducido por ovoalbúmina (OVA), la Brp-39 se inducía en

las células epiteliales de los pulmones, y los ratones KO para la proteína mostraban una respuesta inflamatoria menor a la inmunización por OVA que los ratones WT <sup>166</sup>. Por otro lado, en un modelo de lesión pulmonar aguda inducida por hiperoxia la expresión de Brp-39 en el pulmón resultó inhibida. En este estudio, los ratones KO para Brp-39 mostraron una mayor inflamación, oxidación y permeabilidad que los ratones WT <sup>257</sup>. En nuestro estudio observamos que la inmunización con MOG<sub>35-55</sub> indujo la expresión de Brp-39 en el SNC de los animales WT durante la fase aguda y de inflamación de la EAE, y que esta expresión disminuyó durante la fase crónica de la enfermedad hasta alcanzar los niveles de expresión de los ratones control inmunizados con suero fisiológico. Si bien hemos observado que en la EAE se induce la expresión de Brp-39, no se encontraron diferencias en el curso clínico entre los ratones KO y WT para la proteína. Sin embargo, existe un estudio reciente en el que se indujo EAE en ratones KO y WT para Brp-39 y se observó que los ratones KO para la Brp-39 presentaron un curso clínico más agresivo que los ratones WT <sup>258</sup>. Estos resultados no validan los hallazgos encontrados en el estudio inicial con muestras humanas, ya que la depleción de la Brp-39 no parece tener ningún efecto en el curso clínico de la EAE ni en la respuesta inmune de los ratones KO para la proteína frente a estímulos específicos como la MOG ni frente a estímulos generales (PHA y LPS). De todos modos, sí que se ha observado un aumento en la expresión génica de la Brp-39 en la fase aguda de la EAE, que estaría en línea con los resultados observados en el estudio inicial, lo cual parece indicar que la CHI3L1 (o Brp-39) es un marcador de activación, más que una molécula que esté jugando un papel en el desarrollo de la enfermedad. De forma global, los resultados obtenidos apuntan hacia un papel de la CHI3L1 como biomarcador pronóstico en la EM. Los niveles elevados de la proteína en LCR podrían ayudar a identificar aquellos pacientes con CIS que tendrán un peor pronóstico de la enfermedad en términos de una conversión más temprana a EM y un desarrollo más rápido de discapacidad. Estos pacientes podrían beneficiarse de un tratamiento más temprano y agresivo de su enfermedad. Por otro lado, la determinación de CHI3L1 en plasma podría ayudar a identificar pacientes con formas progresivas de la enfermedad. Con los resultados obtenidos en el modelo animal, no se puede confirmar un papel de la CHI3L1 en la patogenia de la enfermedad, aunque es importante mencionar que la no presencia de esta proteína en los ratones KO podría ser perfectamente reemplazada por otras proteínas de la misma familia con funciones similares. Sin embargo, la CHI3L1 sí parece jugar un papel importante como biomarcador pronóstico en los

## DISCUSIÓN

pacientes con CIS, reflejando sus niveles en LCR el grado de inflamación que está teniendo lugar en el SNC y, más importante, el grado de activación astrocitaria, factor que posiblemente condiciona de una manera más directa el mal pronóstico de estos pacientes con niveles altos de la proteína.





## 6. CONCLUSIONES



Con los resultados obtenidos podemos concluir que:

1. El abordaje de proteómica mediante iTRAQ acoplado a espectrometría de masas en muestras de LCR de pacientes con CIS ha permitido la identificación de proteínas asociadas con la conversión a EMCD.
2. La CHI3L1, sema7A y CNDP1 se han validado como biomarcadores asociados con la conversión a EMCD mediante técnicas analíticas alternativas en cohortes independientes de pacientes con CIS.
3. Los niveles de CHI3L1 en LCR tienen además claras implicaciones pronósticas en los pacientes con CIS, y niveles altos se asocian con un tiempo más corto de conversión a EM definida tanto por criterios clínicos como radiológicos, y con una progresión más rápida de la discapacidad neurológica.
4. Un *cut-off* de 170 ng/ml en los niveles de CHI3L1 en LCR podría utilizarse en la práctica clínica para identificar los pacientes con CIS que presentarán un mayor riesgo de desarrollo de discapacidad, quienes podrían beneficiarse de un tratamiento más temprano de su enfermedad.
5. A diferencia del LCR, los niveles de CHI3L1 en plasma no parecen reflejar el grado de inflamación que tiene lugar en el SNC de los pacientes con EM, y se asocian más con las formas progresivas de la enfermedad.
6. Estudios en el modelo animal de EM no sugieren un papel inmunoregulador de la CHI3L1, en cuanto a que la eliminación del gen Brp-39 en ratones no se asoció con cambios en el curso clínico de la EAE, cambios histopatológicos, o alteraciones en las respuestas inmunitarias.
7. Los niveles de CHI3L1 en el LCR de los pacientes con EM tienen un origen mayoritariamente local en el SNC, y reflejan el grado de activación de los astrocitos como consecuencia de la inflamación. Dicha activación astrocitaria es posiblemente la relacionada con un peor pronóstico de los pacientes con CIS que tienen niveles altos de CHI3L1 en LCR.



## **7. COMENTARIOS FINALES**



Con los resultados obtenidos en este trabajo se han redactado cinco artículos, tres de los cuales están ya publicados en revistas internacionales, uno se encuentra en revisión en revistas científicas, y otro está en fase de redacción.

Los artículos correspondientes son:

- Comabella M, Fernández M, Martín R, Rivera-Vallvé S, Borrás E, Chiva C, Julià E, Rovira A, Cantó E, Álvarez-Cermeño JC, Villar LM, Tintoré M, Montalban X. **Cerebrospinal fluid chitinase 3-like 1 levels are associated with conversion to multiple sclerosis.** *Brain.* 2010; 133 (Pt 4):1082-93.

- Cantó E, Reverter F, Morcillo-Suárez C, Matesanz F, Fernández O, Izquierdo G, Vandebroek K, Rodríguez-Antigüedad A, Urcelay E, Arroyo R, Otaegui D, Olascoaga J, Saiz A, Navarro A, Sanchez A, Domínguez C, Caminero A, Horga A, Tintoré M, Montalban X, Comabella M. **Chitinase 3-like 1 plasma levels are increased in patients with progressive forms of multiple sclerosis.** *Mult Scler.* 2012; 18(7)983-90.

- Cantó E, Tintoré M, Villar LM, Borrás E, Álvarez-Cermeño JC, Chiva C, Sabidó E, Rovira A, Montalban X, Comabella M. **Validation of semaphorin 7A and and alpha-beta-his-dipeptidase as biomarkers associated with the conversion from clinically isolated syndrome to multiple sclerosis.** *Journal of Neuroinflammation* (en prensa)

- Cantó E, Tintoré M, Villar LM, Costa C, Nurtdinov R, Álvarez-Cermeño JC, Arrambide G, Reverter F, Deisenhammer F, Hegen H, Khademi M, Olsson T, Tumani H, Rodríguez-Martín L, Piehl F, Bartos A, Zimova D, Kotoucova J, Kuhle J, Kappos L, García-Merino JA, Sánchez AJ, Saiz A, Blanco Y, Hintzen R, Jafari N, Brassat D, Lauda F, Roesler R, Rejdak K, Papuc E, de Andrés C, Rauch S, Khalil M, Enzinger C, Galimberti D, Scarpini E, Teunissen C, Sánchez A, Rovira A, Montalban X, Comabella M. **Chitinase 3-like 1: prognostic biomarker in clinically isolated syndromes.** *En revisión*

- Cantó E *et al.* **Breast regression protein 39 (Brp-39) is not required for experimental autoimmune encephalitis induction.** *Manuscrito en preparación.*





## **8. BIBLIOGRAFÍA**



1. Koch-Henriksen N, Sorensen PS. The changing demographic pattern of multiple sclerosis epidemiology. *Lancet Neurol* 2010;9(5):520-32.
2. Otero-Romero S, Roura P, Sola J, et al. Increase in the prevalence of multiple sclerosis over a 17-year period in Osona, Catalonia, Spain. *Mult Scler* 2013;19(2):245-8.
3. Modrego PJ, Pina MA. Trends in prevalence and incidence of multiple sclerosis in Bajo Aragon, Spain. *J Neurol Sci* 2003;216(1):89-93.
4. Aladro Y, Alemany MJ, Perez-Vieitez MC, et al. Prevalence and incidence of multiple sclerosis in Las Palmas, Canary Islands, Spain. *Neuroepidemiology* 2005;24(1-2):70-5.
5. Frohman EM, Racke MK, Raine CS. Multiple sclerosis--the plaque and its pathogenesis. *N Engl J Med* 2006;354(9):942-55.
6. Dymment DA, Ebers GC, Sadovnick AD. Genetics of multiple sclerosis. *Lancet Neurol* 2004;3(2):104-10.
7. Hansen T, Skytthe A, Stenager E, Petersen HC, Kyvik KO, Bronnum-Hansen H. Risk for multiple sclerosis in dizygotic and monozygotic twins. *Mult Scler* 2005;11(5):500-3.
8. Westerlind H, Ramanujam R, Uvehag D, et al. Modest familial risks for multiple sclerosis: a registry-based study of the population of Sweden. *Brain* 2014;137(Pt 3):770-8.
9. Beecham AH, Patsopoulos NA, Xifara DK, et al. Analysis of immune-related loci identifies 48 new susceptibility variants for multiple sclerosis. *Nat Genet* 2013;45(11):1353-60.
10. Sawcer S, Hellenthal G, Pirinen M, et al. Genetic risk and a primary role for cell-mediated immune mechanisms in multiple sclerosis. *Nature* 2011;476(7359):214-9.
11. Almohmeed YH, Avenell A, Aucott L, Vickers MA. Systematic review and meta-analysis of the sero-epidemiological association between Epstein Barr virus and multiple sclerosis. *PLoS One* 2013;8(4):e61110.
12. Ramagopalan SV, Valdar W, Dymment DA, et al. Association of infectious mononucleosis with multiple sclerosis. A population-based study. *Neuroepidemiology* 2009;32(4):257-62.
13. Acheson ED, Bachrach CA, Wright FM. Some comments on the relationship of the distribution of multiple sclerosis to latitude, solar radiation, and other variables. *Acta Psychiatr Scand Suppl* 1960;35(147):132-47.
14. Orton SM, Wald L, Confavreux C, et al. Association of UV radiation with multiple sclerosis prevalence and sex ratio in France. *Neurology* 2011;76(5):425-31.
15. Ramagopalan SV, Handel AE, Giovannoni G, Rutherford Siegel S, Ebers GC, Chaplin G. Relationship of UV exposure to prevalence of multiple sclerosis in England. *Neurology* 2011;76(16):1410-4.
16. Munger KL, Levin LI, Hollis BW, Howard NS, Ascherio A. Serum 25-hydroxyvitamin D levels and risk of multiple sclerosis. *Jama* 2006;296(23):2832-8.
17. Handel AE, Williamson AJ, Disanto G, Dobson R, Giovannoni G, Ramagopalan SV. Smoking and multiple sclerosis: an updated meta-analysis. *PLoS One* 2011;6(1):e16149.
18. Hawkes CH. Smoking is a risk factor for multiple sclerosis: a metanalysis. *Mult Scler* 2007;13(5):610-5.
19. Popescu BF, Lucchinetti CF. Pathology of demyelinating diseases. *Annu Rev Pathol* 2012;7:185-217.
20. Raine CS, Scheinberg LC. On the immunopathology of plaque development and repair in multiple sclerosis. *J Neuroimmunol* 1988;20(2-3):189-201.
21. Lassmann H, Bruck W, Lucchinetti CF. The immunopathology of multiple sclerosis: an overview. *Brain Pathol* 2007;17(2):210-8.
22. Bo L. The histopathology of grey matter demyelination in multiple sclerosis. *Acta Neurol Scand Suppl* 2009(189):51-7.
23. Compston A, Coles A. Multiple sclerosis. *Lancet* 2008;372(9648):1502-17.
24. Gold R, Lington C, Lassmann H. Understanding pathogenesis and therapy of multiple sclerosis via animal models: 70 years of merits and culprits in experimental autoimmune encephalomyelitis research. *Brain* 2006;129(Pt 8):1953-71.
25. Wu GF, Alvarez E. The immunopathophysiology of multiple sclerosis. *Neurol Clin* 2011;29(2):257-78.
26. Gentleman SM, Nash MJ, Sweeting CJ, Graham DI, Roberts GW. Beta-amyloid precursor protein (beta APP) as a marker for axonal injury after head injury. *Neurosci Lett* 1993;160(2):139-44.
27. Bjartmar C, Wujek JR, Trapp BD. Axonal loss in the pathology of MS: consequences for understanding the progressive phase of the disease. *J Neurol Sci* 2003;206(2):165-71.
28. Bitsch A, Schuchardt J, Bunkowski S, Kuhlmann T, Bruck W. Acute axonal injury in multiple sclerosis. Correlation with demyelination and inflammation. *Brain* 2000;123 ( Pt 6):1174-83.
29. Trapp BD, Nave KA. Multiple sclerosis: an immune or neurodegenerative disorder? *Annu Rev Neurosci* 2008;31:247-69.
30. Ramagopalan SV, Ebers GC. Multiple sclerosis: major histocompatibility complexity and antigen presentation. *Genome Med* 2009;1(11):105.

## BIBLIOGRAFIA

31. Klein L, Hinterberger M, Wirnsberger G, Kyewski B. Antigen presentation in the thymus for positive selection and central tolerance induction. *Nat Rev Immunol* 2009;9(12):833-44.
32. Pettinelli CB, McFarlin DE. Adoptive transfer of experimental allergic encephalomyelitis in SJL/J mice after in vitro activation of lymph node cells by myelin basic protein: requirement for Lyt 1+ 2- T lymphocytes. *J Immunol* 1981;127(4):1420-3.
33. Zamvil SS, Steinman L. The T lymphocyte in experimental allergic encephalomyelitis. *Annu Rev Immunol* 1990;8:579-621.
34. Zhu J, Yamane H, Paul WE. Differentiation of effector CD4 T cell populations (\*). *Annu Rev Immunol* 2010;28:445-89.
35. Mosmann TR, Cherwinski H, Bond MW, Giedlin MA, Coffman RL. Two types of murine helper T cell clone. I. Definition according to profiles of lymphokine activities and secreted proteins. *J Immunol* 1986;136(7):2348-57.
36. Ouyang W, Kolls JK, Zheng Y. The biological functions of T helper 17 cell effector cytokines in inflammation. *Immunity* 2008;28(4):454-67.
37. Comabella M, Khoury SJ. Immunopathogenesis of multiple sclerosis. *Clin Immunol* 2012;142(1):2-8.
38. Broux B, Stinissen P, Hellings N. Which immune cells matter? The immunopathogenesis of multiple sclerosis. *Crit Rev Immunol* 2013;33(4):283-306.
39. Cabarocas J, Bauer J, Piaggio E, Liblau R, Lassmann H. Effective and selective immune surveillance of the brain by MHC class I-restricted cytotoxic T lymphocytes. *Eur J Immunol* 2003;33(5):1174-82.
40. Booss J, Esiri MM, Tourtellotte WW, Mason DY. Immunohistological analysis of T lymphocyte subsets in the central nervous system in chronic progressive multiple sclerosis. *J Neurol Sci* 1983;62(1-3):219-32.
41. Monteiro J, Hingorani R, Pergolizzi R, Apatoff B, Gregersen PK. Clonal dominance of CD8+ T-cell in multiple sclerosis. *Ann N Y Acad Sci* 1995;756:310-2.
42. Huseby ES, Liggitt D, Brabb T, Schnabel B, Ohlen C, Goverman J. A pathogenic role for myelin-specific CD8(+) T cells in a model for multiple sclerosis. *J Exp Med* 2001;194(5):669-76.
43. Hoftberger R, Aboul-Enein F, Brueck W, et al. Expression of major histocompatibility complex class I molecules on the different cell types in multiple sclerosis lesions. *Brain Pathol* 2004;14(1):43-50.
44. Neumann H, Cavalie A, Jenne DE, Wekerle H. Induction of MHC class I genes in neurons. *Science* 1995;269(5223):549-52.
45. Correale J, Villa A. Isolation and characterization of CD8+ regulatory T cells in multiple sclerosis. *J Neuroimmunol* 2008;195(1-2):121-34.
46. Freedman MS, Thompson EJ, Deisenhammer F, et al. Recommended standard of cerebrospinal fluid analysis in the diagnosis of multiple sclerosis: a consensus statement. *Arch Neurol* 2005;62(6):865-70.
47. Weiner HL. A shift from adaptive to innate immunity: a potential mechanism of disease progression in multiple sclerosis. *J Neurol* 2008;255 Suppl 1:3-11.
48. Karni A, Abraham M, Monsonego A, et al. Innate immunity in multiple sclerosis: myeloid dendritic cells in secondary progressive multiple sclerosis are activated and drive a proinflammatory immune response. *J Immunol* 2006;177(6):4196-202.
49. Benveniste EN. Cytokines: influence on glial cell gene expression and function. *Chem Immunol* 1997;69:31-75.
50. Prineas JW, Raine CS. Electron microscopy and immunoperoxidase studies of early multiple sclerosis lesions. *Neurology* 1976;26(6 PT 2):29-32.
51. Bauer J, Sminia T, Wouterlood FG, Dijkstra CD. Phagocytic activity of macrophages and microglial cells during the course of acute and chronic relapsing experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Neurosci Res* 1994;38(4):365-75.
52. Arima Y, Kamimura D, Sabharwal L, et al. Regulation of immune cell infiltration into the CNS by regional neural inputs explained by the gate theory. *Mediators Inflamm* 2013;2013:898165.
53. Abbott NJ, Ronnback L, Hansson E. Astrocyte-endothelial interactions at the blood-brain barrier. *Nat Rev Neurosci* 2006;7(1):41-53.
54. Steed E, Balda MS, Matter K. Dynamics and functions of tight junctions. *Trends Cell Biol* 2010;20(3):142-9.
55. Errede M, Girolamo F, Ferrara G, et al. Blood-brain barrier alterations in the cerebral cortex in experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Neuropathol Exp Neurol* 2012;71(10):840-54.
56. Forster C, Kahles T, Kietz S, Drenckhahn D. Dexamethasone induces the expression of metalloproteinase inhibitor TIMP-1 in the murine cerebral vascular endothelial cell line cEND. *J Physiol* 2007;580(Pt.3):937-49.
57. Alvarez JI, Cayrol R, Prat A. Disruption of central nervous system barriers in multiple sclerosis. *Biochim Biophys Acta* 2011;1812(2):252-64.

58. Wosik K, Cayrol R, Dodelet-Devillers A, et al. Angiotensin II controls occludin function and is required for blood brain barrier maintenance: relevance to multiple sclerosis. *J Neurosci* 2007;27(34):9032-42.
59. Miljkovic D, Timotijevic G, Mostarica Stojkovic M. Astrocytes in the tempest of multiple sclerosis. *FEBS Lett* 2011;585(23):3781-8.
60. Steinman L. Inflammatory cytokines at the summits of pathological signal cascades in brain diseases. *Sci Signal* 2013;6(258):pe3.
61. Sospedra M, Martin R. Immunology of multiple sclerosis. *Annu Rev Immunol* 2005;23:683-747.
62. Larochelle C, Alvarez JI, Prat A. How do immune cells overcome the blood-brain barrier in multiple sclerosis? *FEBS Lett* 2011;585(23):3770-80.
63. Okada H, Khoury SJ. Type17 T-cells in central nervous system autoimmunity and tumors. *J Clin Immunol* 2012;32(4):802-8.
64. Smith KJ, Lassmann H. The role of nitric oxide in multiple sclerosis. *Lancet Neurol* 2002;1(4):232-41.
65. Barnett MH, Henderson AP, Prineas JW. The macrophage in MS: just a scavenger after all? Pathology and pathogenesis of the acute MS lesion. *Mult Scler* 2006;12(2):121-32.
66. Reindl M, Di Pauli F, Rostasy K, Berger T. The spectrum of MOG autoantibody-associated demyelinating diseases. *Nat Rev Neurol* 2013;9(8):455-61.
67. Derfuss T, Linington C, Hohlfeld R, Meinl E. Axo-glia antigens as targets in multiple sclerosis: implications for axonal and grey matter injury. *J Mol Med (Berl)* 2010;88(8):753-61.
68. Kojima K, Berger T, Lassmann H, et al. Experimental autoimmune panencephalitis and uveoretinitis transferred to the Lewis rat by T lymphocytes specific for the S100 beta molecule, a calcium binding protein of astroglia. *J Exp Med* 1994;180(3):817-29.
69. Thoua NM, van Noort JM, Baker D, et al. Encephalitogenic and immunogenic potential of the stress protein alphaB-crystallin in Biozzi ABH (H-2A(g7)) mice. *J Neuroimmunol* 2000;104(1):47-57.
70. Srivastava R, Aslam M, Kalluri SR, et al. Potassium channel KIR4.1 as an immune target in multiple sclerosis. *N Engl J Med* 2012;367(2):115-23.
71. Lassmann H, Wisniewski HM. Chronic relapsing experimental allergic encephalomyelitis: clinicopathological comparison with multiple sclerosis. *Arch Neurol* 1979;36(8):490-7.
72. Stromnes IM, Goverman JM. Active induction of experimental allergic encephalomyelitis. *Nat Protoc* 2006;1(4):1810-9.
73. Hart BA, Gran B, Weissert R. EAE: imperfect but useful models of multiple sclerosis. *Trends Mol Med* 2011;17(3):119-25.
74. Levine S, Sowinski R. Experimental allergic encephalomyelitis in inbred and outbred mice. *J Immunol* 1973;110(1):139-43.
75. Baker D, O'Neill JK, Gschmeissner SE, Wilcox CE, Butter C, Turk JL. Induction of chronic relapsing experimental allergic encephalomyelitis in Biozzi mice. *J Neuroimmunol* 1990;28(3):261-70.
76. Kabat EA, Wolf A, Bezer AE. Rapid Production of Acute Disseminated Encephalomyelitis in Rhesus Monkeys by Injection of Brain Tissue With Adjuvants. *Science* 1946;104(2703):362-3.
77. Gardinier MV, Amiguet P, Linington C, Matthieu JM. Myelin/oligodendrocyte glycoprotein is a unique member of the immunoglobulin superfamily. *J Neurosci Res* 1992;33(1):177-87.
78. Mendel I, Kerlero de Rosbo N, Ben-Nun A. A myelin oligodendrocyte glycoprotein peptide induces typical chronic experimental autoimmune encephalomyelitis in H-2b mice: fine specificity and T cell receptor V beta expression of encephalitogenic T cells. *Eur J Immunol* 1995;25(7):1951-9.
79. Acha-Orbea H, Mitchell DJ, Timmermann L, et al. Limited heterogeneity of T cell receptors from lymphocytes mediating autoimmune encephalomyelitis allows specific immune intervention. *Cell* 1988;54(2):263-73.
80. Tuohy VK, Lu Z, Sobel RA, Laursen RA, Lees MB. Identification of an encephalitogenic determinant of myelin proteolipid protein for SJL mice. *J Immunol* 1989;142(5):1523-7.
81. Steinman L, Zamvil SS. Virtues and pitfalls of EAE for the development of therapies for multiple sclerosis. *Trends Immunol* 2005;26(11):565-71.
82. Lublin FD, Reingold SC. Defining the clinical course of multiple sclerosis: results of an international survey. National Multiple Sclerosis Society (USA) Advisory Committee on Clinical Trials of New Agents in Multiple Sclerosis. *Neurology* 1996;46(4):907-11.
83. Lublin FD, Reingold SC, Cohen JA, et al. Defining the clinical course of multiple sclerosis: The 2013 revisions. *Neurology* 2014;83(3):278-86.
84. Rovaris M, Confavreux C, Furlan R, Kappos L, Comi G, Filippi M. Secondary progressive multiple sclerosis: current knowledge and future challenges. *Lancet Neurol* 2006;5(4):343-54.
85. Miller DH, Leary SM. Primary-progressive multiple sclerosis. *Lancet Neurol* 2007;6(10):903-12.
86. Tullman MJ, Oshinsky RJ, Lublin FD, Cutter GR. Clinical characteristics of progressive relapsing multiple sclerosis. *Mult Scler* 2004;10(4):451-4.
87. Scalfari A, Neuhaus A, Degenhardt A, et al. The natural history of multiple sclerosis: a geographically based study 10: relapses and long-term disability. *Brain* 2010;133(Pt 7):1914-29.

## BIBLIOGRAFIA

88. Confavreux C, Vukusic S. Natural history of multiple sclerosis: a unifying concept. *Brain* 2006;129(Pt 3):606-16.
89. Miller DH, Weinshenker BG, Filippi M, et al. Differential diagnosis of suspected multiple sclerosis: a consensus approach. *Mult Scler* 2008;14(9):1157-74.
90. D'Alessandro R, Vignatelli L, Lugaresi A, et al. Risk of multiple sclerosis following clinically isolated syndrome: a 4-year prospective study. *J Neurol* 2013;260(6):1583-93.
91. Beck RW, Chandler DL, Cole SR, et al. Interferon beta-1a for early multiple sclerosis: CHAMPS trial subgroup analyses. *Ann Neurol* 2002;51(4):481-90.
92. Paolino E, Fainardi E, Ruppi P, et al. A prospective study on the predictive value of CSF oligoclonal bands and MRI in acute isolated neurological syndromes for subsequent progression to multiple sclerosis. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 1996;60(5):572-5.
93. Morrissey SP, Miller DH, Kendall BE, et al. The significance of brain magnetic resonance imaging abnormalities at presentation with clinically isolated syndromes suggestive of multiple sclerosis. A 5-year follow-up study. *Brain* 1993;116 ( Pt 1):135-46.
94. Comi G, Filippi M, Barkhof F, et al. Effect of early interferon treatment on conversion to definite multiple sclerosis: a randomised study. *Lancet* 2001;357(9268):1576-82.
95. Comi G, De Stefano N, Freedman MS, et al. Comparison of two dosing frequencies of subcutaneous interferon beta-1a in patients with a first clinical demyelinating event suggestive of multiple sclerosis (REFLEX): a phase 3 randomised controlled trial. *Lancet Neurol* 2012;11(1):33-41.
96. Kappos L, Polman CH, Freedman MS, et al. Treatment with interferon beta-1b delays conversion to clinically definite and McDonald MS in patients with clinically isolated syndromes. *Neurology* 2006;67(7):1242-9.
97. Randomised double-blind placebo-controlled study of interferon beta-1a in relapsing/remitting multiple sclerosis. PRISMS (Prevention of Relapses and Disability by Interferon beta-1a Subcutaneously in Multiple Sclerosis) Study Group. *Lancet* 1998;352(9139):1498-504.
98. Comi G, Martinelli V, Rodegher M, et al. Effect of glatiramer acetate on conversion to clinically definite multiple sclerosis in patients with clinically isolated syndrome (PreCISe study): a randomised, double-blind, placebo-controlled trial. *Lancet* 2009;374(9700):1503-11.
99. Schumacker GA, Beebe G, Kibler RF, et al. Problems of Experimental Trials of Therapy in Multiple Sclerosis: Report by the Panel on the Evaluation of Experimental Trials of Therapy in Multiple Sclerosis. *Ann N Y Acad Sci* 1965;122:552-68.
100. Poser CM, Paty DW, Scheinberg L, et al. New diagnostic criteria for multiple sclerosis: guidelines for research protocols. *Ann Neurol* 1983;13(3):227-31.
101. Paty DW, Oger JJ, Kastrukoff LF, et al. MRI in the diagnosis of MS: a prospective study with comparison of clinical evaluation, evoked potentials, oligoclonal banding, and CT. *Neurology* 1988;38(2):180-5.
102. Barkhof F, Filippi M, Miller DH, et al. Comparison of MRI criteria at first presentation to predict conversion to clinically definite multiple sclerosis. *Brain* 1997;120 ( Pt 11):2059-69.
103. Tintore M, Rovira A, Martinez MJ, et al. Isolated demyelinating syndromes: comparison of different MR imaging criteria to predict conversion to clinically definite multiple sclerosis. *AJNR Am J Neuroradiol* 2000;21(4):702-6.
104. Thompson AJ, Montalban X, Barkhof F, et al. Diagnostic criteria for primary progressive multiple sclerosis: a position paper. *Ann Neurol* 2000;47(6):831-5.
105. McDonald WI, Compston A, Edan G, et al. Recommended diagnostic criteria for multiple sclerosis: guidelines from the International Panel on the diagnosis of multiple sclerosis. *Ann Neurol* 2001;50(1):121-7.
106. Polman CH, Reingold SC, Edan G, et al. Diagnostic criteria for multiple sclerosis: 2005 revisions to the "McDonald Criteria". *Ann Neurol* 2005;58(6):840-6.
107. Polman CH, Reingold SC, Banwell B, et al. Diagnostic criteria for multiple sclerosis: 2010 revisions to the McDonald criteria. *Ann Neurol* 2011;69(2):292-302.
108. Vigeveno RM, Wiebenga OT, Wattjes MP, Geurts JJ, Barkhof F. Shifting imaging targets in multiple sclerosis: from inflammation to neurodegeneration. *J Magn Reson Imaging* 2012;36(1):1-19.
109. Freedman MS, Selchen D, Arnold DL, et al. Treatment optimization in MS: Canadian MS Working Group updated recommendations. *Can J Neurol Sci* 2013;40(3):307-23.
110. Kieseier BC, Wiendl H, Hemmer B, Hartung HP. Treatment and treatment trials in multiple sclerosis. *Curr Opin Neurol* 2007;20(3):286-93.
111. Weinstock-Guttman B, Ransohoff RM, Kinkel RP, Rudick RA. The interferons: biological effects, mechanisms of action, and use in multiple sclerosis. *Ann Neurol* 1995;37(1):7-15.
112. Weber F, Janovskaja J, Polak T, Poser S, Rieckmann P. Effect of interferon beta on human myelin basic protein-specific T-cell lines: comparison of IFNbeta-1a and IFNbeta-1b. *Neurology* 1999;52(5):1069-71.
113. Yong VW, Chabot S, Stuve O, Williams G. Interferon beta in the treatment of multiple sclerosis: mechanisms of action. *Neurology* 1998;51(3):682-9.

114. Kieseier BC. The mechanism of action of interferon-beta in relapsing multiple sclerosis. *CNS Drugs* 2011;25(6):491-502.
115. Wolinsky JS. Copolymer 1: a most reasonable alternative therapy for early relapsing-remitting multiple sclerosis with mild disability. *Neurology* 1995;45(7):1245-7.
116. Gran B, Tranquill LR, Chen M, et al. Mechanisms of immunomodulation by glatiramer acetate. *Neurology* 2000;55(11):1704-14.
117. Reff ME, Carner K, Chambers KS, et al. Depletion of B cells in vivo by a chimeric mouse human monoclonal antibody to CD20. *Blood* 1994;83(2):435-45.
118. Deans JP, Li H, Polyak MJ. CD20-mediated apoptosis: signalling through lipid rafts. *Immunology* 2002;107(2):176-82.
119. Vandermeeren M, Janssens S, Borgers M, Geysen J. Dimethylfumarate is an inhibitor of cytokine-induced E-selectin, VCAM-1, and ICAM-1 expression in human endothelial cells. *Biochem Biophys Res Commun* 1997;234(1):19-23.
120. Zeyda M, Poglitsch M, Geyeregger R, et al. Disruption of the interaction of T cells with antigen-presenting cells by the active leflunomide metabolite teriflunomide: involvement of impaired integrin activation and immunologic synapse formation. *Arthritis Rheum* 2005;52(9):2730-9.
121. Fox RI, Herrmann ML, Frangou CG, et al. Mechanism of action for leflunomide in rheumatoid arthritis. *Clin Immunol* 1999;93(3):198-208.
122. Oh J, O'Connor PW. Teriflunomide for the treatment of multiple sclerosis. *Semin Neurol* 2013;33(1):45-55.
123. Mandala S, Hajdu R, Bergstrom J, et al. Alteration of lymphocyte trafficking by sphingosine-1-phosphate receptor agonists. *Science* 2002;296(5566):346-9.
124. Pelletier D, Hafler DA. Fingolimod for multiple sclerosis. *N Engl J Med* 2012;366(4):339-47.
125. Miron VE, Ludwin SK, Darlington PJ, et al. Fingolimod (FTY720) enhances remyelination following demyelination of organotypic cerebellar slices. *Am J Pathol* 2010;176(6):2682-94.
126. Lesko LJ, Atkinson AJ, Jr. Use of biomarkers and surrogate endpoints in drug development and regulatory decision making: criteria, validation, strategies. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 2001;41:347-66.
127. Calais G, Forzy G, Crinquette C, et al. Tear analysis in clinically isolated syndrome as new multiple sclerosis criterion. *Mult Scler* 2010;16(1):87-92.
128. Zettl UK, Tumani H. *Multiple Sclerosis & Cerebrospinal Fluid*; 2005.
129. Felgenhauer K, Schliep G, Rapic N. Evaluation of the blood-CSF barrier by protein gradients and the humoral immune response within the central nervous system. *J Neurol Sci* 1976;30(1):113-28.
130. Oksenberg JR, Baranzini SE. Multiple sclerosis genetics--is the glass half full, or half empty? *Nat Rev Neurol* 2010;6(8):429-37.
131. Berger T. Current therapeutic recommendations in multiple sclerosis. *J Neurol Sci* 2009;287 Suppl 1:S37-45.
132. Cree B. Neuromyelitis optica: diagnosis, pathogenesis, and treatment. *Curr Neurol Neurosci Rep* 2008;8(5):427-33.
133. Brickshawana A, Hinson SR, Romero MF, et al. Investigation of the KIR4.1 potassium channel as a putative antigen in patients with multiple sclerosis: a comparative study. *Lancet Neurol* 2014;13(8):795-806.
134. Teunissen CE, Iacobaeus E, Khademi M, et al. Combination of CSF N-acetylaspartate and neurofilaments in multiple sclerosis. *Neurology* 2009;72(15):1322-9.
135. Kuhle J, Leppert D, Petzold A, et al. Neurofilament heavy chain in CSF correlates with relapses and disability in multiple sclerosis. *Neurology* 2011;76(14):1206-13.
136. Lim ET, Sellebjerg F, Jensen CV, et al. Acute axonal damage predicts clinical outcome in patients with multiple sclerosis. *Mult Scler* 2005;11(5):532-6.
137. Norgren N, Sundstrom P, Svenningsson A, Rosengren L, Stigbrand T, Gunnarsson M. Neurofilament and glial fibrillary acidic protein in multiple sclerosis. *Neurology* 2004;63(9):1586-90.
138. Pappas DJ, Oksenberg JR. Multiple sclerosis pharmacogenomics: maximizing efficacy of therapy. *Neurology* 2010;74 Suppl 1:S62-9.
139. Massaro AR. Are there indicators of remyelination in blood or CSF of multiple sclerosis patients? *Mult Scler* 1998;4(3):228-31.
140. Irani DN, Anderson C, Gundry R, et al. Cleavage of cystatin C in the cerebrospinal fluid of patients with multiple sclerosis. *Ann Neurol* 2006;59(2):237-47.
141. Hammack BN, Fung KY, Hunsucker SW, et al. Proteomic analysis of multiple sclerosis cerebrospinal fluid. *Mult Scler* 2004;10(3):245-60.
142. Chiasserini D, Di Filippo M, Candelieri A, et al. CSF proteome analysis in multiple sclerosis patients by two-dimensional electrophoresis. *Eur J Neurol* 2008;15(9):998-1001.
143. Tumani H, Lehmsiek V, Rau D, et al. CSF proteome analysis in clinically isolated syndrome (CIS): candidate markers for conversion to definite multiple sclerosis. *Neurosci Lett* 2009;452(2):214-7.
144. Comabella M, Fernandez M, Martin R, et al. Cerebrospinal fluid chitinase 3-like 1 levels are associated with conversion to multiple sclerosis. *Brain* 2010;133(Pt 4):1082-93.

## BIBLIOGRAFIA

145. Teunissen CE, Petzold A, Bennett JL, et al. A consensus protocol for the standardization of cerebrospinal fluid collection and biobanking. *Neurology* 2009;73(22):1914-22.
146. Teunissen C, Menge T, Altintas A, et al. Consensus definitions and application guidelines for control groups in cerebrospinal fluid biomarker studies in multiple sclerosis. *Mult Scler* 2013;19(13):1802-9.
147. Gnanapavan S, Hegen H, Khalil M, et al. Guidelines for uniform reporting of body fluid biomarker studies in neurologic disorders. *Neurology* 2014;83(13):1210-6.
148. Tintore M, Rovira A, Rio J, et al. Do oligoclonal bands add information to MRI in first attacks of multiple sclerosis? *Neurology* 2008;70(13 Pt 2):1079-83.
149. Ticozzi N, Tiloca C, Mencacci NE, et al. Oligoclonal bands in the cerebrospinal fluid of amyotrophic lateral sclerosis patients with disease-associated mutations. *J Neurol* 2013;260(1):85-92.
150. Rauer S, Euler B, Reindl M, Berger T. Antimyelin antibodies and the risk of relapse in patients with a primary demyelinating event. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 2006;77(6):739-42.
151. Kuhle J, Pohl C, Mehling M, et al. Lack of association between antimyelin antibodies and progression to multiple sclerosis. *N Engl J Med* 2007;356(4):371-8.
152. Lim ET, Berger T, Reindl M, et al. Anti-myelin antibodies do not allow earlier diagnosis of multiple sclerosis. *Mult Scler* 2005;11(4):492-4.
153. Pelayo R, Tintore M, Montalban X, et al. Antimyelin antibodies with no progression to multiple sclerosis. *N Engl J Med* 2007;356(4):426-8.
154. Villar LM, Masterman T, Casanova B, et al. CSF oligoclonal band patterns reveal disease heterogeneity in multiple sclerosis. *J Neuroimmunol* 2009;211(1-2):101-4.
155. Harris VK, Diamanduros A, Good P, Zakin E, Chalivendra V, Sadiq SA. Bri2-23 is a potential cerebrospinal fluid biomarker in multiple sclerosis. *Neurobiol Dis* 2010;40(1):331-9.
156. Harris VK, Donelan N, Yan QJ, et al. Cerebrospinal fluid fetuin-A is a biomarker of active multiple sclerosis. *Mult Scler* 2013;19(11):1462-72.
157. Fialova L, Bartos A, Svarcova J, Zimova D, Kotoucova J, Malbohan I. Serum and cerebrospinal fluid light neurofilaments and antibodies against them in clinically isolated syndrome and multiple sclerosis. *J Neuroimmunol* 2013;262(1-2):113-20.
158. Salzer J, Svenningsson A, Sundstrom P. Neurofilament light as a prognostic marker in multiple sclerosis. *Mult Scler* 2010;16(3):287-92.
159. Kroksveen AC, Aasebo E, Vethe H, et al. Discovery and initial verification of differentially abundant proteins between multiple sclerosis patients and controls using iTRAQ and SID-SRM. *J Proteomics* 2013;78:312-25.
160. Lemoine J, Fortin T, Salvador A, Jaffuel A, Charrier JP, Choquet-Kastylevsky G. The current status of clinical proteomics and the use of MRM and MRM(3) for biomarker validation. *Expert Rev Mol Diagn* 2012;12(4):333-42.
161. Tintore M, Rovira A, Rio J, et al. Baseline MRI predicts future attacks and disability in clinically isolated syndromes. *Neurology* 2006;67(6):968-72.
162. MacLean B, Tomazela DM, Shulman N, et al. Skyline: an open source document editor for creating and analyzing targeted proteomics experiments. *Bioinformatics* 2010;26(7):966-8.
163. Chang CY, Picotti P, Huttenhain R, et al. Protein significance analysis in selected reaction monitoring (SRM) measurements. *Mol Cell Proteomics* 2012;11(4):M111 014662.
164. Morcillo-Suarez C, Alegre J, Sangros R, et al. SNP analysis to results (SNPator): a web-based environment oriented to statistical genomics analyses upon SNP data. *Bioinformatics* 2008;24(14):1643-4.
165. Purcell S, Neale B, Todd-Brown K, et al. PLINK: a tool set for whole-genome association and population-based linkage analyses. *Am J Hum Genet* 2007;81(3):559-75.
166. Lee CG, Hartl D, Lee GR, et al. Role of breast regression protein 39 (BRP-39)/chitinase 3-like-1 in Th2 and IL-13-induced tissue responses and apoptosis. *J Exp Med* 2009;206(5):1149-66.
167. Johansen JS, Pedersen AN, Schroll M, Jorgensen T, Pedersen BK, Bruunsgaard H. High serum YKL-40 level in a cohort of octogenarians is associated with increased risk of all-cause mortality. *Clin Exp Immunol* 2008;151(2):260-6.
168. Craig-Schapiro R, Perrin RJ, Roe CM, et al. YKL-40: a novel prognostic fluid biomarker for preclinical Alzheimer's disease. *Biol Psychiatry* 2010;68(10):903-12.
169. Conrozier T, Carlier MC, Mathieu P, et al. Serum levels of YKL-40 and C reactive protein in patients with hip osteoarthritis and healthy subjects: a cross sectional study. *Ann Rheum Dis* 2000;59(10):828-31.
170. Bonne-Barkay D, Wang G, Starkey A, Hamilton RL, Wiley CA. In vivo CHI3L1 (YKL-40) expression in astrocytes in acute and chronic neurological diseases. *J Neuroinflammation* 2010;7:34.
171. Ober C, Tan Z, Sun Y, et al. Effect of variation in CHI3L1 on serum YKL-40 level, risk of asthma, and lung function. *N Engl J Med* 2008;358(16):1682-91.
172. Nielsen KR, Steffensen R, Boegsted M, et al. Promoter polymorphisms in the chitinase 3-like 1 gene influence the serum concentration of YKL-40 in Danish patients with rheumatoid arthritis and in healthy subjects. *Arthritis Res Ther* 2011;13(3):R109.



173. Boehm AM, Putz S, Altenhofer D, Sickmann A, Falk M. Precise protein quantification based on peptide quantification using iTRAQ. *BMC Bioinformatics* 2007;8:214.
174. DeSouza L, Diehl G, Rodrigues MJ, et al. Search for cancer markers from endometrial tissues using differentially labeled tags iTRAQ and cICAT with multidimensional liquid chromatography and tandem mass spectrometry. *J Proteome Res* 2005;4(2):377-86.
175. Wu WW, Wang G, Baek SJ, Shen RF. Comparative study of three proteomic quantitative methods, DIGE, cICAT, and iTRAQ, using 2D gel- or LC-MALDI TOF/TOF. *J Proteome Res* 2006;5(3):651-8.
176. Abdi F, Quinn JF, Jankovic J, et al. Detection of biomarkers with a multiplex quantitative proteomic platform in cerebrospinal fluid of patients with neurodegenerative disorders. *J Alzheimers Dis* 2006;9(3):293-348.
177. Zhang X, Yin X, Yu H, et al. Quantitative proteomic analysis of serum proteins in patients with Parkinson's disease using an isobaric tag for relative and absolute quantification labeling, two-dimensional liquid chromatography, and tandem mass spectrometry. *Analyst* 2012;137(2):490-5.
178. Zeng GQ, Zhang PF, Deng X, et al. Identification of candidate biomarkers for early detection of human lung squamous cell cancer by quantitative proteomics. *Mol Cell Proteomics* 2012;11(6):M111013946.
179. Deng L, Su T, Leng A, et al. Upregulation of soluble resistance-related calcium-binding protein (sorcin) in gastric cancer. *Med Oncol* 2010;27(4):1102-8.
180. Bouchal P, Roumeliotis T, Hrstka R, Nenutil R, Vojtesek B, Garbis SD. Biomarker discovery in low-grade breast cancer using isobaric stable isotope tags and two-dimensional liquid chromatography-tandem mass spectrometry (iTRAQ-2DLC-MS/MS) based quantitative proteomic analysis. *J Proteome Res* 2009;8(1):362-73.
181. Hammack BN, Owens GP, Burgoon MP, Gilden DH. Improved resolution of human cerebrospinal fluid proteins on two-dimensional gels. *Mult Scler* 2003;9(5):472-5.
182. Kroksveen AC, Guldbrandsen A, Vedeler C, Myhr KM, Opsahl JA, Berven FS. Cerebrospinal fluid proteome comparison between multiple sclerosis patients and controls. *Acta Neurol Scand Suppl* 2012(195):90-6.
183. Fiorini A, Koudriavtseva T, Bucaj E, et al. Involvement of oxidative stress in occurrence of relapses in multiple sclerosis: the spectrum of oxidatively modified serum proteins detected by proteomics and redox proteomics analysis. *PLoS One* 2013;8(6):e65184.
184. Lehmsiek V, Sussmuth SD, Tauscher G, et al. Cerebrospinal fluid proteome profile in multiple sclerosis. *Mult Scler* 2007;13(7):840-9.
185. Qin Z, Qin Y, Liu S. Alteration of DBP levels in CSF of patients with MS by proteomics analysis. *Cell Mol Neurobiol* 2009;29(2):203-10.
186. Yang M, Qin Z, Zhu Y, et al. Vitamin D-binding protein in cerebrospinal fluid is associated with multiple sclerosis progression. *Mol Neurobiol* 2013;47(3):946-56.
187. Smolders J, Peelen E, Thewissen M, Menheere P, Damoiseaux J, Hupperts R. Circulating vitamin D binding protein levels are not associated with relapses or with vitamin D status in multiple sclerosis. *Mult Scler* 2012.
188. Akenami FO, Siren V, Koskiniemi M, Siimes MA, Teravainen H, Vaheri A. Cerebrospinal fluid activity of tissue plasminogen activator in patients with neurological diseases. *J Clin Pathol* 1996;49(7):577-80.
189. Akenami FO, Koskiniemi M, Farkkila M, Vaheri A. Cerebrospinal fluid plasminogen activator inhibitor-1 in patients with neurological disease. *J Clin Pathol* 1997;50(2):157-60.
190. Recalde D, Ostos MA, Badell E, et al. Human apolipoprotein A-IV reduces secretion of proinflammatory cytokines and atherosclerotic effects of a chronic infection mimicked by lipopolysaccharide. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2004;24(4):756-61.
191. D'Aguzzo S, Barassi A, Lupisella S, et al. Differential cerebro spinal fluid proteome investigation of Leber hereditary optic neuropathy (LHON) and multiple sclerosis. *J Neuroimmunol* 2008;193(1-2):156-60.
192. Bielekova B, Martin R. Development of biomarkers in multiple sclerosis. *Brain* 2004;127(Pt 7):1463-78.
193. Giovannoni G. Multiple sclerosis cerebrospinal fluid biomarkers. *Dis Markers* 2006;22(4):187-96.
194. O'Connor KC, Roy SM, Becker CH, Hafler DA, Kantor AB. Comprehensive phenotyping in multiple sclerosis: discovery based proteomics and the current understanding of putative biomarkers. *Dis Markers* 2006;22(4):213-25.
195. Berger T, Reindl M. Multiple sclerosis: disease biomarkers as indicated by pathophysiology. *J Neurol Sci* 2007;259(1-2):21-6.
196. Hyka N, Dayer JM, Modoux C, et al. Apolipoprotein A-I inhibits the production of interleukin-1beta and tumor necrosis factor-alpha by blocking contact-mediated activation of monocytes by T lymphocytes. *Blood* 2001;97(8):2381-9.

## BIBLIOGRAFIA

197. Sladkova V, Mares J, Lubenova B, et al. Degenerative and inflammatory markers in the cerebrospinal fluid of multiple sclerosis patients with relapsing-remitting course of disease and after clinical isolated syndrome. *Neurol Res* 2011;33(4):415-20.
198. Eixarch H, Gutierrez-Franco A, Montalban X, Espejo C. Semaphorins 3A and 7A: potential immune and neuroregenerative targets in multiple sclerosis. *Trends Mol Med* 2013;19(3):157-64.
199. Czopik AK, Bynoe MS, Palm N, Raine CS, Medzhitov R. Semaphorin 7A is a negative regulator of T cell responses. *Immunity* 2006;24(5):591-600.
200. Suzuki K, Okuno T, Yamamoto M, et al. Semaphorin 7A initiates T-cell-mediated inflammatory responses through alpha1beta1 integrin. *Nature* 2007;446(7136):680-4.
201. Teufel M, Saudek V, Ledig JP, et al. Sequence identification and characterization of human carnosinase and a closely related non-specific dipeptidase. *J Biol Chem* 2003;278(8):6521-31.
202. Di Paola R, Impellizzeri D, Salinaro AT, et al. Administration of carnosine in the treatment of acute spinal cord injury. *Biochem Pharmacol* 2011;82(10):1478-89.
203. Guiotto A, Calderan A, Ruzza P, Borin G. Carnosine and carnosine-related antioxidants: a review. *Curr Med Chem* 2005;12(20):2293-315.
204. Kohen R, Yamamoto Y, Cundy KC, Ames BN. Antioxidant activity of carnosine, homocarnosine, and anserine present in muscle and brain. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1988;85(9):3175-9.
205. Wassif WS, Sherwood RA, Amir A, et al. Serum carnosinase activities in central nervous system disorders. *Clin Chim Acta* 1994;225(1):57-64.
206. Fisniku LK, Brex PA, Altmann DR, et al. Disability and T2 MRI lesions: a 20-year follow-up of patients with relapse onset of multiple sclerosis. *Brain* 2008;131(Pt 3):808-17.
207. Brettschneider J, Claus A, Kassubek J, Tumani H. Isolated blood-cerebrospinal fluid barrier dysfunction: prevalence and associated diseases. *J Neurol* 2005;252(9):1067-73.
208. Malmstrom C, Axelsson M, Lycke J, Zetterberg H, Blennow K, Olsson B. CSF levels of YKL-40 are increased in MS and reduces with immunosuppressive treatment. *J Neuroimmunol* 2014;269(1-2):87-9.
209. Link H, Tibbling G. Principles of albumin and IgG analyses in neurological disorders. III. Evaluation of IgG synthesis within the central nervous system in multiple sclerosis. *Scand J Clin Lab Invest* 1977;37(5):397-401.
210. Bonne-Barkay D, Bissel SJ, Wang G, et al. YKL-40, a marker of simian immunodeficiency virus encephalitis, modulates the biological activity of basic fibroblast growth factor. *Am J Pathol* 2008;173(1):130-43.
211. Geissmann F, Jung S, Littman DR. Blood monocytes consist of two principal subsets with distinct migratory properties. *Immunity* 2003;19(1):71-82.
212. Sunderkotter C, Nikolic T, Dillon MJ, et al. Subpopulations of mouse blood monocytes differ in maturation stage and inflammatory response. *J Immunol* 2004;172(7):4410-7.
213. Louboutin JP, Chekmasova A, Marusich E, Agrawal L, Strayer DS. Role of CCR5 and its ligands in the control of vascular inflammation and leukocyte recruitment required for acute excitotoxic seizure induction and neural damage. *Faseb J* 2011;25(2):737-53.
214. Rossol M, Kraus S, Pierer M, Baerwald C, Wagner U. The CD14(bright) CD16+ monocyte subset is expanded in rheumatoid arthritis and promotes expansion of the Th17 cell population. *Arthritis Rheum* 2012;64(3):671-7.
215. Renkema GH, Boot RG, Muijsers AO, Donker-Koopman WE, Aerts JM. Purification and characterization of human chitotriosidase, a novel member of the chitinase family of proteins. *J Biol Chem* 1995;270(5):2198-202.
216. Boot RG, Blommaert EF, Swart E, et al. Identification of a novel acidic mammalian chitinase distinct from chitotriosidase. *J Biol Chem* 2001;276(9):6770-8.
217. Hakala BE, White C, Recklies AD. Human cartilage gp-39, a major secretory product of articular chondrocytes and synovial cells, is a mammalian member of a chitinase protein family. *J Biol Chem* 1993;268(34):25803-10.
218. Renkema GH, Boot RG, Au FL, et al. Chitotriosidase, a chitinase, and the 39-kDa human cartilage glycoprotein, a chitin-binding lectin, are homologues of family 18 glycosyl hydrolases secreted by human macrophages. *Eur J Biochem* 1998;251(1-2):504-9.
219. Shackelton LM, Mann DM, Millis AJ. Identification of a 38-kDa heparin-binding glycoprotein (gp38k) in differentiating vascular smooth muscle cells as a member of a group of proteins associated with tissue remodeling. *J Biol Chem* 1995;270(22):13076-83.
220. Volck B, Price PA, Johansen JS, et al. YKL-40, a mammalian member of the chitinase family, is a matrix protein of specific granules in human neutrophils. *Proc Assoc Am Physicians* 1998;110(4):351-60.
221. Park JA, Drazen JM, Tschumperlin DJ. The chitinase-like protein YKL-40 is secreted by airway epithelial cells at base line and in response to compressive mechanical stress. *J Biol Chem* 2010;285(39):29817-25.
222. Johansen JS, Stoltenberg M, Hansen M, et al. Serum YKL-40 concentrations in patients with rheumatoid arthritis: relation to disease activity. *Rheumatology (Oxford)* 1999;38(7):618-26.

223. Peltomaa R, Paimela L, Harvey S, Helve T, Leirisalo-Repo M. Increased level of YKL-40 in sera from patients with early rheumatoid arthritis: a new marker for disease activity. *Rheumatol Int* 2001;20(5):192-6.
224. Vos K, Steenbakkens P, Miltenburg AM, et al. Raised human cartilage glycoprotein-39 plasma levels in patients with rheumatoid arthritis and other inflammatory conditions. *Ann Rheum Dis* 2000;59(7):544-8.
225. Vind I, Johansen JS, Price PA, Munkholm P. Serum YKL-40, a potential new marker of disease activity in patients with inflammatory bowel disease. *Scand J Gastroenterol* 2003;38(6):599-605.
226. Johansen JS, Milman N, Hansen M, Garbarsch C, Price PA, Graudal N. Increased serum YKL-40 in patients with pulmonary sarcoidosis--a potential marker of disease activity? *Respir Med* 2005;99(4):396-402.
227. Chupp GL, Lee CG, Jarjour N, et al. A chitinase-like protein in the lung and circulation of patients with severe asthma. *N Engl J Med* 2007;357(20):2016-27.
228. Johansen JS, Christoffersen P, Moller S, et al. Serum YKL-40 is increased in patients with hepatic fibrosis. *J Hepatol* 2000;32(6):911-20.
229. Michelsen AE, Rathcke CN, Skjelland M, et al. Increased YKL-40 expression in patients with carotid atherosclerosis. *Atherosclerosis* 2010;211(2):589-95.
230. Persson F, Rathcke CN, Gall MA, Parving HH, Vestergaard H, Rossing P. High YKL-40 levels predict mortality in patients with type 2 diabetes. *Diabetes Res Clin Pract* 2012;96(1):84-9.
231. Hempen M, Kopp HP, Elhenicky M, et al. YKL-40 is elevated in morbidly obese patients and declines after weight loss. *Obes Surg* 2009;19(11):1557-63.
232. Cintin C, Johansen JS, Christensen IJ, Price PA, Sorensen S, Nielsen HJ. Serum YKL-40 and colorectal cancer. *Br J Cancer* 1999;79(9-10):1494-9.
233. Jensen BV, Johansen JS, Price PA. High levels of serum HER-2/neu and YKL-40 independently reflect aggressiveness of metastatic breast cancer. *Clin Cancer Res* 2003;9(12):4423-34.
234. Dupont J, Tanwar MK, Thaler HT, et al. Early detection and prognosis of ovarian cancer using serum YKL-40. *J Clin Oncol* 2004;22(16):3330-9.
235. Brasso K, Christensen IJ, Johansen JS, et al. Prognostic value of PINP, bone alkaline phosphatase, CTX-I, and YKL-40 in patients with metastatic prostate carcinoma. *Prostate* 2006;66(5):503-13.
236. Bi J, Lau SH, Lv ZL, et al. Overexpression of YKL-40 is an independent prognostic marker in gastric cancer. *Hum Pathol* 2009;40(12):1790-7.
237. Peng C, Peng J, Jiang L, You Q, Zheng J, Ning X. YKL-40 protein levels and clinical outcome of human endometrial cancer. *J Int Med Res* 2010;38(4):1448-57.
238. Thom I, Andritzky B, Schuch G, et al. Elevated pretreatment serum concentration of YKL-40-An independent prognostic biomarker for poor survival in patients with metastatic nonsmall cell lung cancer. *Cancer* 2010;116(17):4114-21.
239. Iwamoto FM, Hottinger AF, Karimi S, et al. Serum YKL-40 is a marker of prognosis and disease status in high-grade gliomas. *Neuro Oncol* 2011;13(11):1244-51.
240. Park HY, Jun CD, Jeon SJ, et al. Serum YKL-40 levels correlate with infarct volume, stroke severity, and functional outcome in acute ischemic stroke patients. *PLoS One* 2012;7(12):e51722.
241. Choi J, Lee HW, Suk K. Plasma level of chitinase 3-like 1 protein increases in patients with early Alzheimer's disease. *J Neurol* 2011;258(12):2181-5.
242. Perrin RJ, Craig-Schapiro R, Malone JP, et al. Identification and validation of novel cerebrospinal fluid biomarkers for staging early Alzheimer's disease. *PLoS One* 2011;6(1):e16032.
243. Correale J, Fiol M. Chitinase effects on immune cell response in neuromyelitis optica and multiple sclerosis. *Mult Scler* 2010;17(5):521-31.
244. Ostergaard C, Johansen JS, Benfield T, Price PA, Lundgren JD. YKL-40 is elevated in cerebrospinal fluid from patients with purulent meningitis. *Clin Diagn Lab Immunol* 2002;9(3):598-604.
245. Rehli M, Krause SW, Andreesen R. Molecular characterization of the gene for human cartilage gp-39 (CHI3L1), a member of the chitinase protein family and marker for late stages of macrophage differentiation. *Genomics* 1997;43(2):221-5.
246. Badariotti F, Kyriotou M, Lelong C, et al. The phylogenetically conserved molluscan chitinase-like protein 1 (Cg-Clp1), homologue of human HC-gp39, stimulates proliferation and regulates synthesis of extracellular matrix components of mammalian chondrocytes. *J Biol Chem* 2006;281(40):29583-96.
247. Bigg HF, Wait R, Rowan AD, Cawston TE. The mammalian chitinase-like lectin, YKL-40, binds specifically to type I collagen and modulates the rate of type I collagen fibril formation. *J Biol Chem* 2006;281(30):21082-95.
248. Shao R, Hamel K, Petersen L, et al. YKL-40, a secreted glycoprotein, promotes tumor angiogenesis. *Oncogene* 2009;28(50):4456-68.
249. Kawada M, Seno H, Kanda K, et al. Chitinase 3-like 1 promotes macrophage recruitment and angiogenesis in colorectal cancer. *Oncogene* 2012;31(26):3111-23.

## BIBLIOGRAFIA

250. Recklies AD, Ling H, White C, Bernier SM. Inflammatory cytokines induce production of CHI3L1 by articular chondrocytes. *J Biol Chem* 2005;280(50):41213-21.
251. van Bilsen JH, van Dongen H, Lard LR, et al. Functional regulatory immune responses against human cartilage glycoprotein-39 in health vs. proinflammatory responses in rheumatoid arthritis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2004;101(49):17180-5.
252. Sotgiu S, Barone R, Arru G, et al. Intrathecal chitotriosidase and the outcome of multiple sclerosis. *Mult Scler* 2006;12(5):551-7.
253. Comabella M, Dominguez C, Rio J, et al. Plasma chitotriosidase activity in multiple sclerosis. *Clin Immunol* 2009;131(2):216-22.
254. Kruit A, Grutters JC, Ruven HJ, van Moorsel CC, van den Bosch JM. A CHI3L1 gene polymorphism is associated with serum levels of YKL-40, a novel sarcoidosis marker. *Respir Med* 2007;101(7):1563-71.
255. Zhao X, Tang R, Gao B, et al. Functional variants in the promoter region of Chitinase 3-like 1 (CHI3L1) and susceptibility to schizophrenia. *Am J Hum Genet* 2007;80(1):12-8.
256. Stoop MP, Singh V, Stingl C, et al. Effects of natalizumab treatment on the cerebrospinal fluid proteome of multiple sclerosis patients. *J Proteome Res* 2013;12(3):1101-7.
257. Sohn MH, Kang MJ, Matsuura H, et al. The chitinase-like proteins breast regression protein-39 and YKL-40 regulate hyperoxia-induced acute lung injury. *Am J Respir Crit Care Med* 2010;182(7):918-28.
258. Bonne-Barkay D, Wang G, Laframboise WA, Wiley CA, Bissel SJ. Exacerbation of experimental autoimmune encephalomyelitis in the absence of breast regression protein 39/chitinase 3-like 1. *J Neuropathol Exp Neurol* 2012;71(11):948-58.

## **9. ANEXOS**



*Tablas y figuras*





Pacientes* / Controles	N	Edad (años)	Mujer/hombre (% mujer)	Seguimiento (años)	Tipo CIS <sup>a</sup> NO/TR/MD/O	% pacientes tratados <sup>b</sup>	BOC n/N (% positivos) <sup>c</sup>	Células LCR (células/ $\mu$ l)	Proteína LCR (g/L)	Índice IgG
<b>HC - Barcelona</b>										
NC	7	33,7 (7,3)	3/4 (42,8)	6,1 (4,3-6,5)	1/2/3/1	42,9%	6/7 (85,7)	13,3 (19,7)	41,3 (12,9)	0,7 (0,2)
C	23	27,8 (5,4)	18/5 (78,3)	6,2 (4,6-8,8)	4/8/10/1	13,0%	17/23 (73,9)	6,8 (7,8)	35,9 (9,1)	0,9 (0,7)
OENNI	26	67,5 (15,6)	15/11 (57,7)	-	-	-	-	-	-	-
OENI	0	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<b>HRC - Madrid</b>										
NC	20	34,3 (12,5)	15/5 (75,0)	3,8 (2,8-5,4)	7/6/2/5	10,0%	11/20 (55,0)	3,7 (3,8)	ND	0,7 (0,3)
C	21	32,8 (6,3)	18/3 (85,7)	5,3 (3,0-7,5)	6/3/10/2	4,8%	20/21 (95,2)	6,0 (7,4)	ND	1,0 (0,6)
OENNI	24	48,1 (14,3)	12/12 (50,0)	-	-	-	-	-	-	-
OENI	13	42,4 (15,3)	8/5 (61,5)	-	-	-	-	-	-	-
<b>UULM - Ulm</b>										
NC	12	38,9 (11,0)	8/4 (66,6)	1,6 (0,4-4,0)	8/1/2/1	0%	10/12 (83,3)	4,7 (5,5)	44,9 (21,3)	0,7 (0,2)
C	17	29,9 (12,5)	11/6 (64,7)	1,9 (0,8-3,8)	7/5/3/2	0%	17/17 (100)	9,7 (7,4)	41,5 (13,5)	0,9 (0,3)
OENNI	14	51,6 (13,5)	6/8 (42,8)	-	-	-	-	-	-	-
OENI	0	-	-	-	-	-	-	-	-	-

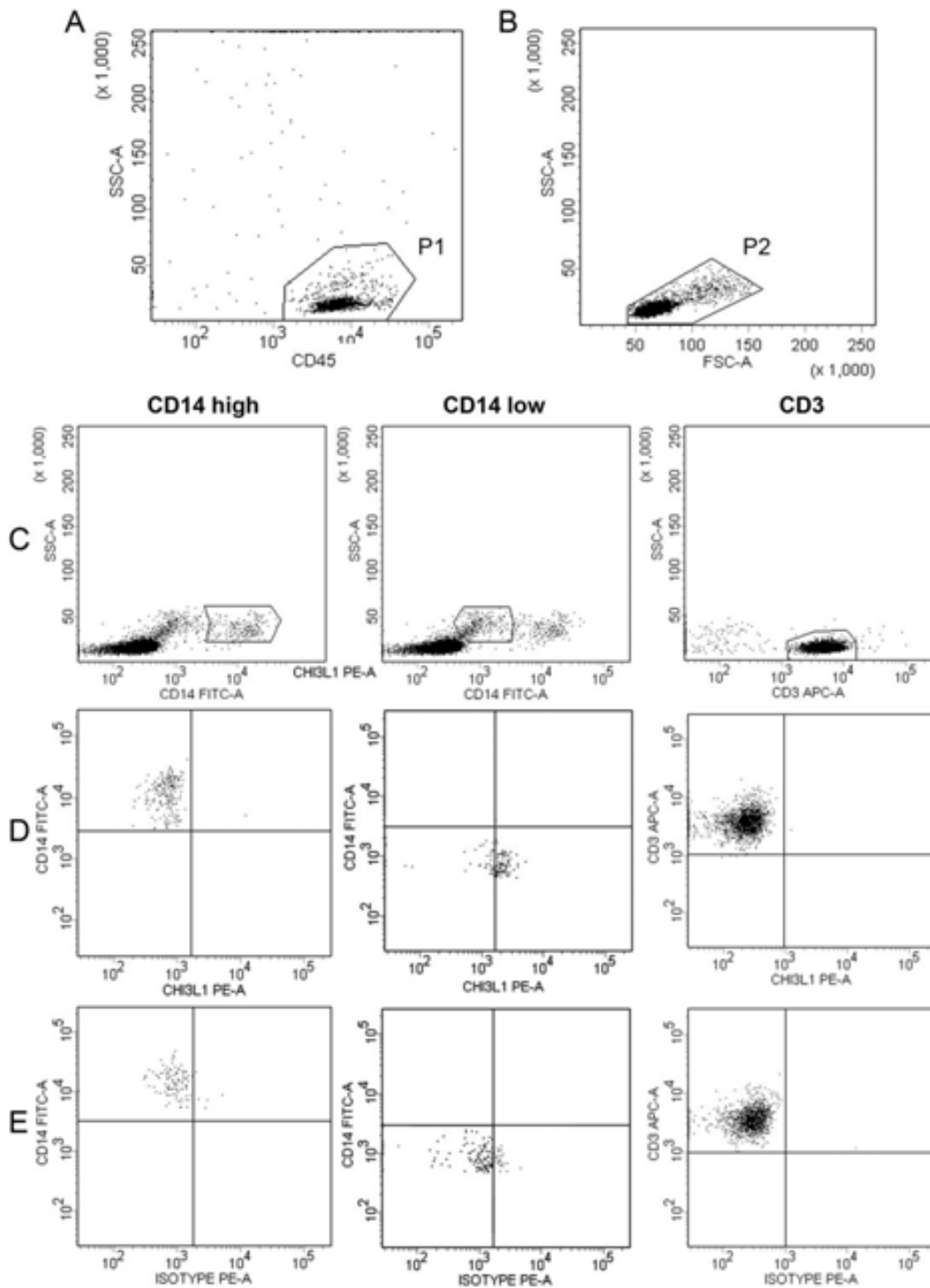
Pacientes* / Controles	N	Edad (años)	Mujer/hombre (% mujer)	Seguimiento (años)	Tipo CIS <sup>a</sup> NO/TR/MD/O	% pacientes tratados <sup>b</sup>	BOC n/N (% positivos) <sup>c</sup>	Células LCR (cells/ $\mu$ l)	Proteína LCR (g/L)	Índice IgG
<b>EUMC - Rotterdam</b>										
NC	16	32,9 (7,0)	12/4 (75,0)	3,7 (2,5-4,9)	8/4/4/0	6,3%	8/16 (50,0)	7,5 (8,5)	32,1 (11,0)	1,0 (0,8)
C	13	32,5 (6,9)	11/2 (84,6)	5,3 (3,2-8,7)	7/3/1/2	61,5%	12/13 (92,3)	14,0 (16,1)	35,6 (12,7)	1,1 (0,9)
OENNI	29	49,5 (17,1)	15/14 (51,7)	-	-	-	-	-	-	-
OENI	1	28,0	1/0 (100)	-	-	-	-	-	-	-
<b>GM - Madrid</b>										
NC	13	34,5 (7,3)	12/1 (92,3)	2,7 (1,5-4,8)	6/2/4/1	0%	NA	5,2 (7,4)	26,8 (8,3)	0,8 (0,3)
C	9	34,1 (6,6)	7/2 (77,8)	2,9 (1,3-4,9)	2/2/2/3	55,6%	NA	6,0 (4,4)	26,9 (4,0)	0,8 (0,3)
OENNI	13	31,8 (9,0)	9/4 (69,2)	-	-	-	-	-	-	-
OENI	0	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<b>PH - Madrid</b>										
NC	18	33,4 (7,0)	12/6 (66,7)	4,7 (3,9-5,6)	3/7/8/-	27,8%	15/17 (88,2)	3,8 (3,1)	40,1 (8,7)	0,7 (0,3)
C	15	33,9 (9,1)	11/4 (73,3)	5,4 (3,5-6,3)	2/7/4/2	13,3%	12/13 (92,3)	6,7 (6,7)	36,7 (12,8)	1,0 (0,5)
OENNI	23	43,0 (17,0)	8/15 (34,8)	-	-	-	-	-	-	-
OENI	5	50,0 (13,8)	1/4 (20,0)	-	-	-	-	-	-	-
<b>HP - Toulouse</b>										
NC	19	35,6 (11,9)	15/4 (78,9)	0,8 (0,5-2,8)	5/3/9/2	100%**	17/19 (89,5)	6,1 (6,8)	38,4 (16,8)	0,9 (0,5)

Pacientes* / Controles	N	Edad (años)	Mujer/hombre (% mujer)	Seguimiento (años)	Tipo CIS <sup>a</sup> NO/TR/MD/O	% pacientes tratados <sup>b</sup>	BOC n/N (% positivos) <sup>c</sup>	Células LCR (cells/ $\mu$ l)	Proteína LCR (g/L)	Índice IgG
<b>HP - Toulouse</b>										
C	19	23,9 (7,8)	15/4 (78,9)	3,1 (2,9-5,0)	7/6/5/1	100%	18/19 (94,7)	6,6 (6,7)	41,2 (10,2)	0,8 (0,3)
OENNI	14	41,9 (11,5)	10/4 (71,4)	-	-	-	-	-	-	-
OENI	1	57,0	1/0 (100)	-	-	-	-	-	-	-
<b>OP - Milan</b>										
NC	2	36,5 (3,5)	1/1 (50,0)	5,3 (3,7-6,8)	1/-/1	0%	2/2 (100)	4,3 (2,1)	27,0 (17,0)	0,6 (0,2)
C	9	31,4 (6,8)	3/6 (33,3)	5,4 (1,0-6,2)	2/1/1/3***	0%	7/8 (87,5)	6,9 (6,5)	33,6 (8,2)	1,1 (0,4)
OENNI	2	52,0 (33,9)	2/0 (100)	-	-	-	-	-	-	-
OENI	5	33,0 (4,0)	2/3 (40,0)	-	-	-	-	-	-	-
<b>USB - Basel</b>										
NC	16	38,4 (13,1)	14/2 (87,5)	2,5 (1,3-5,5)	8/2/2/4	43,8%	11/16 (68,7)	4,6 (6,1)	34,1 (8,3)	0,8 (0,3)
C	24	33,8 (8,7)	18/6 (69,2)	6,6 (2,4-9,2)	6/4/8/6	20,8%	22/24 (91,7)	10,8 (9,3)	44,0 (13,7)	1,1 (0,6)
OENNI	25	38,6 (11,4)	14/11 (56,0)	-	-	-	-	-	-	-
OENI	25	51,2 (17,6)	11/14 (44,0)	-	-	-	-	-	-	-
<b>MUL - Lublin</b>										
NC	1	62,0	1/0 (100)	2,5	-/1/-	0%	0/1 (0,0)	1,0	28,0	NA
C	22	33,8 (8,5)	10/12 (45,4)	3,1 (2,2-4,3)	7/2/4/9	0%	14/22 (63,6)	7,8 (11,3)	53,8 (44,6)	1,3 (0,2)

Pacientes* / Controles	N	Edad (años)	Mujer/hombre (% mujer)	Seguimiento (años)	Tipo CIS <sup>a</sup> NO/TR/MD/O	% pacientes tratados <sup>b</sup>	BOC n/N (% positivos) <sup>c</sup>	Células LCR (cells/ $\mu$ l)	Proteína LCR (g/L)	Índice IgG
<b>MUL - Lublin</b>										
OENNI	20	35,7 (12,0)	3/17 (15,0)	-	-	-	-	-	-	-
OENI	3	43,7 (22,0)	0/3 (0,0)	-	-	-	-	-	-	-
<b>CU - Prague</b>										
NC	44	32,2 (9,7)	33/11 (75,0)	3,2 (2,4-4,1)	23/3/9/9	45,5%	39/44 (88,6)	28,8 (30,3)	30,8 (11,7)	0,8 (0,5)
C	21	31,7 (10,4)	16/5 (76,2)	3,1 (2,8-4,2)	7/4/3/7	85,7%	21/21 (100)	38,1 (41,1)	32,2 (9,6)	1,1 (0,7)
OENNI	35	31,9 (9,1)	25/10 (71,4)	-	-	-	-	-	-	-
OENI	9	33,5 (7,8)	5/4 (55,5)	-	-	-	-	-	-	-
<b>MU - Graz</b>										
NC	6	35,0 (9,9)	4/2 (66,7)	2,1 (1,2-2,2)	3/-/2/1	66,7%	6/6 (100)	9,5 (5,0)	39,0 (12,5)	0,8 (0,3)
C	4	33,7 (13,2)	2/2 (50,0)	2,4 (2,3-2,9)	1/2/1/-	25,0%	4/4 (100)	16,3 (20,0)	38,5 (11,0)	1,8 (0,8)
OENNI	15	28,9 (8,0)	8/7 (53,3)	-	-	-	-	-	-	-
OENI	5	32,0 (16,1)	1/4 (20,0)	-	-	-	-	-	-	-
<b>CEMCAAT - Barcelona</b>										
NC	166	32,3 (8,4)	127/39 (76,5)	5,1 (2,9-8,1)	75/43/26/22	12,0%	76/164 (46,3)	5,9 (23,1)	37,9 (14,5)	0,7 (0,5)
C	166	28,8 (7,3)	114/52 (68,7)	9,6 (7,0-11,5)	59/38/54/15	75,3%	127/165 (76,9)	7,3 (10,9)	37,9 (17,0)	1,0 (0,6)
OENNI	93	41,5 (17,0)	53/34 (60,9)	-	-	-	-	-	-	-

Pacientes* / Controles	N	Edad (años)	Mujer/hombre (% mujer)	Seguimiento (años)	Tipo CIS <sup>a</sup> NO/TR/MD/O	% pacientes tratados <sup>b</sup>	BOC n/N (% positivos) <sup>c</sup>	Células LCR (cells/ $\mu$ l)	Proteína LCR (g/L)	Índice IgG
<b>CEMCAT - Barcelona</b>										
OENI	6	33,3 (11,0)	4/1 (80,0)	-	-	-	-	-	-	-
<b>IMU - Innsbruck</b>										
NC	28	34,6 (10,1)	19/9 (67,8)	2,1 (1,7-2,8)	8/6/9/5	17,9%	28/28 (100)	14,0 (14,8)	40,4 (13,0)	1,2 (0,7)
C	19	29,6 (7,5)	14/5 (73,7)	3,4 (2,7-4,3)	4/7/6/2	10,5%	19/19 (100)	12,5 (11,3)	42,2 (13,3)	1,1 (0,7)
OENNI	58	50,1 (15,0)	38/20 (65,5)	-	-	-	-	-	-	-
OENI	48	47,0 (20,7)	17/31 (35,4)	-	-	-	-	-	-	-
<b>KUH - Solna</b>										
NC	26	39,3 (10,9)	20/6 (76,9)	2,3 (0,8-3,4)	7/5/7/7	0%	14/26 (53,8)	4,7 (6,0)	ND	0,6 (0,2)
C	37	33,0 (8,3)	29/8 (78,4)	4,7 (3,4-6,7)	11/5/11/10	0%	33/37 (89,2)	8,4 (6,4)	ND	0,9 (0,4)
OENNI	47	41,1 (13,1)	31/16 (65,9)	-	-	-	-	-	-	-
OENI	0	-	-	-	-	-	-	-	-	-

**Tabla 23 .Características clínicas y demográficas de los pacientes con CIS y los controles con otras enfermedades neurológicas incluidos en el estudio.** Datos expresados como media (desviación estándar). Tiempo de seguimiento expresado como mediana (rango intercuartílico). <sup>a</sup>Se refiere a la presentación clínica y los datos indican el número de pacientes para cada topografía de CIS: NO – neuritis óptica / TR – tronco encefálico / MD – médula espinal / O – otras topografías. <sup>b</sup>Se refiere al porcentaje de pacientes que recibieron tratamiento inmunomodulador entre el momento del CIS y la última visita. <sup>c</sup>BOC: bandas oligoclonales; n – número de pacientes con BOC positivas / N – número total de pacientes en los que se determinaron las BOC (porcentaje de pacientes positivos). Abreviación de los centros: HC – Barcelona: Hospital Clínic, Barcelona. HRC – Madrid: Hospital Ramón y Cajal, Madrid. UULM – Ulm: University of Ulm, Ulm. EUMC – Rotterdam: Erasmus University Medical Center, Rotterdam. GM – Madrid: Hospital Gregorio Marañón, Madrid. PH – Madrid: Hospital Puerta de Hierro, Madrid. HP – Toulouse: HôpitalPurpan, Toulouse. OP – Milan: OspedalePoliclinico, Milan. USB – Basel: University Hospital, University of Basel, Basel. MUL – Lublin: Medical University of Lublin, Lublin. CU – Prague: Charles University, Prague. MU – Graz: Medical University of Graz, Graz. CEMCAT – Barcelona: Centre d'Esclerosi Múltiple de Catalunya, Barcelona. IMU – Innsbruck: Innsbruck Medical University, Innsbruck. KUH – Solna: Karolinska University Hospital, Solna. NC: pacientes no conversores. C: pacientes conversores. LCR: líquido cefalorraquídeo. ND: datos no disponibles. OENNI: controles con otras enfermedades neurológicas no inflamatorias. OENI: controles con otras enfermedades neurológicas inflamatorias.



**Figura 34. Dot plots representativos de la estrategia de *gating* usada para la determinación de la expresión de CHI3L1 en las células del LCR.** (A) Región inicial alrededor de las células que tienen una expresión media-alta de CD45 con un *side scatter* de bajo a medio (P1). (B) Se realizó una segunda *gate* en el dot plot de *side scatter* para excluir restos celulares y las células apoptóticas (P2). Únicamente las células incluidas en P1 y P2 se consideraron para el análisis. (C) *Gating* de las células CD14<sub>high</sub>, CD14<sub>low</sub> y CD3<sup>+</sup> en un caso representativo de un paciente con EM. La tinción de CHI3L1 (D) y del isotipo correspondiente (E) en los tres subtipos celulares muestra que la expresión de CHI3L1 está restringida a los monocitos CD14<sub>low</sub>.

*Protocolos*





## **Extracción de ADN**

### *Protocolo:*

#### Día 1:

- 1- Centrifugar los tubos de sangre con EDTA a 2000 rpm durante 10 minutos a T ambiente (18-20°C).
- 2- Tras la centrifugación descartamos el plasma de los tubos y recogemos la parte superior del sedimento donde están las células blancas y los eritrocitos y lo ponemos en un tubo tipo Falcon.
- 3- Añadir los mililitros necesarios de RBC lisis buffer hasta 50 ml.
- 4- Poner los tubos a agitar en el mobil-tube durante 20 minutos.
- 5- Centrifugar 20 minutos a 3250 rpm a Temp. Ambiente.
- 6- Decantar el sobrenadante y volver a añadir RBC lisis buffer.
- 7- Agitar en el mobil-tube durante 5 minutos.
- 8- Centrifugar 20 minutos a 3250 rpm a temperatura ambiente.
- 9- Extraer el sobrenadante y añadir 9 ml del Nuclei lisis y 1 ml de proteinasa K.
- 10- Incubar los tubos 3 horas a 50 °C o toda la noche a 37°C .

#### Día 2:

- 11- Poner 3,5 ml de acetato de amonio 7,5 M en cada muestra y dejar 15 minutos a 4°C para que precipite.
- 12- Centrifugar 20 minutos a 3250 rpm a Temp. ambiente.
- 13- Recoger la fase superior y a ésta se la añaden 25 ml de etanol y se vortea.
- 14- Centrifugar 10 minutos a 3250 rpm.
- 15- Decantar el sobrenadante y añadir 10 ml de etanol. Agitar en el mobil-tube durante 10 minutos.
- 16- Centrifugar 10 minutos a 3250 rpm.
- 17- Decantar el etanol y secar el tubo Falcon para eliminar el etanol restante.
- 18- Añadir 3 ml de tampón TE (Tris EDTA) e incubar en el baño durante 3 horas a 50°C o *overnight* a 37°C hasta la completa disolución del ADN.

### *Reactivos:*

- NH<sub>4</sub>Cl (Sigma, A-9434)
- NaHCO<sub>3</sub> (Sigma, S-5761)
- Na<sub>2</sub>-EDTA (Sigma, S-5134)

ANEXO. *Protocolos*

- NaCl (Prolabo, 27800.360)
- Tris-HCl (Sigma, T-3253)
- SDS (Sigma, L-3771)

***NH<sub>4</sub>Cl 2M***

- NH<sub>4</sub>Cl .....106,98 g
- Agua destilada.....1000 ml

***NaHCO<sub>3</sub> 25 mM***

- NaHCO<sub>3</sub> .....1,05 g
- Agua destilada.....500 ml

***Na<sub>2</sub>EDTA 25 mM a pH=8***

- Na<sub>2</sub>EDTA.....9,3 g
- Agua destilada.....1000 ml

***NaCl 3M***

- NaCl.....87,66 g
- Agua destilada.....500 ml

***Tris 0,5M pH=8,2***

- Tris HCl.....39,4 g
- Agua destilada.....500 ml

Ajustar el pH con HCl.

***SDS al 20%***

- SDS..... 10 g
- Agua destilada.....50 ml

***RBC lysis buffer: (1L)***

- NH<sub>4</sub>Cl 2M.....72 ml
- NaHCO<sub>3</sub> 25 mM.....40 ml
- Na<sub>2</sub>EDTA 25 mM pH =8,2.....80 ml
- Agua destilada.....808 ml

***Nucley lysis buffer: (500 ml)***

- NaCl 3 M.....67 ml
- Tris-HCl 500 mM ph=8.2.....10 ml
- Na<sub>2</sub>EDTA 25 mM ph=8.2.....40 ml
- SDS al 20%.....5 ml
- Agua destilada.....378 ml

***Proteinasa K***

- Reconstituirla a una concentración de 10mg/ml y alicuotarla. Conservarla a -20°C hasta su uso.

***Solución de Acetato de amonio:***

- Acetato de amonio.....578,1 g
- Agua destilada.....1000 ml

**Extracción de ARN de tejido**

*Protocolo:*

Extracción de ARN a partir de tejido congelado (-80°C)

1. Poner el tejido sobre una placa de Petri y descongelar lo suficiente para poder cortar el tejido en fragmentos más pequeños con un bisturí.
2. Añadir el volumen de TRI reagent necesario ( $\pm$  1ml de TRI reagent por 150 mg de tejido) y homogenar el tejido con la parte trasera de una jeringa.
3. Traspasar el homogenado a un eppendorf RNase free y centrifugar a 16.000 g 5 minutos a 4°C.
4. Recoger el sobrenadante y pasarlo a un nuevo eppendorf. Añadir 200  $\mu$ l de cloroformo por cada ml de TRI reagent usado y vortear durante 15 segundos.
5. Dejar durante 3 minutos a temperatura ambiente y a continuación centrifugar a 12.000 g durante 15 minutos a 4°C.
6. Recoger la fase superior (transparente) que es la que contiene el RNA y pasarla a un nuevo eppendorf.
7. Añadir 500  $\mu$ l de 2-propanol por cada ml de TRI reagent usado y vortear.
8. Dejar 7 minutos a temperatura ambiente y centrifugar a 12.000 g durante 10 minutos a 4°C.

## ANEXO. *Protocolos*

9. Eliminar el sobrenadante por decantación y añadir 1 ml de etanol al 70% (preparado con agua RNase free) y vortear.
10. Centrifugar a 12.000 g durante 5 minutos a 4°C.
11. Eliminar el sobrenadante y dejar secar el pellet. Una vez seco resuspender con 10-15 µl de agua RNase free e incubar en el baño a 55°C durante 5 minutos.

### *Reactivos:*

TRI reagent (Sigma, 93289)  
Cloroformo (Sigma, C2432)  
2-propanol (Sigma, I9516)  
Etanol absoluto (Panreac, 121086.1211)  
Agua RNase free

### **Paraformaldehído 4%**

#### *Solución de paraformaldehído madre*

Paraformaldehído.....40 g

H<sub>2</sub>O destilada.....500 ml

Calentar la mezcla anterior hasta 60°C en agitación. Añadir hidróxido de sodio 8 M (Fluke, 3255) hasta la completa disolución del paraformaldehído.

#### *PBS 2x*

PBS 10x.....100 ml

H<sub>2</sub>O destilada.....400 ml

#### *PBS 10x*

KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>.....2,722 g

Na<sub>2</sub>HPO.....11,312 g

NaCl.....90 g

H<sub>2</sub>O destilada.....1 L

Mezclar 500 ml de la solución madre de paraformaldehído con 500 ml de PBS 2x y ajustar el pH a 7,2 – 7,4.

## **Tinción de Hematoxilina-Eosina**

### *Protocolo:*

- 1- Desparafinar/hidratar:
  - Xilol I 5 min
  - Xilol II 5 min
  - Etanol 100° 5 min
  - Etanol 96° 5 min
  - Etanol 70° 5 min
  - Etanol 50° 5 min
  - Agua destilada 5 min
- 2- Hematoxilina de Mayer 10 minutos
- 3- Lavado con agua destilada 1 minuto
- 4- Diferenciar con etanol 70° + HCl 0,05% 10 segundos
- 5- Lavado con agua destilada 30 segundos
- 6- Solución de trabajo de Eosina 30 segundos
- 7- Lavado con agua destilada 1minuto
- 8- Deshidratar:
  - Etanol 96° 1 min
  - Etanol 96° 5 min
  - Etanol 100 5 min
  - Etanol 100 5 min
  - Xilol I 10 min
  - Xilol II 10 min

### *Reactivos:*

- Xilol (Prolabo, 28973.328)
- Etanol absoluto (Panreac, 121086.1211)
- Hematoxilina de Mayer (Merck 1.09249.2500)
- Floxina B (Merck, 15926)
- Eosina Y (yellowish) (Merck, 1015935.0100)
- Ácido acético glacial 100% (Merck, 1.00066.0250)
- DPX (Panreac, 255254.1610)

***Soluciones para la eosina:***

***Solución madre de eosina:***

- Eosina.....5 g
- Agua destilada.....250 ml

***Solución madre de floxina:***

- Floxina.....5 g
- Agua destilada.....250 ml

***Solución de trabajo (500ml):***

- Solución madre de eosina.....56 ml
- Solución madre de floxina.....6 ml
- Etanol 96°.....436 ml
- Ácido acético glacial.....2,5 ml

**Luxol fast blue – Klüver Barrera**

*Protocolo:*

1- Desparafinar/hidratar:

- Xilol I 5 min
- Xilol II 5 min
- Etanol 100° 5 min
- Etanol 95° 5 min

2- Solución de Luxol Fast Blue *overnight* a 60°

3- Lavado con alcohol de 80° hasta la pérdida del exceso de color

4- Lavado con agua destilada

5- Diferenciar con carbonato de litio, hasta que se diferencien bien la sustancia gris y la blanca

6- Diferenciar en alcohol de 60°

7- Lavado con agua destilada

8- Solución de violeta de cresilo a 37° durante 20 minutos

9- Diferenciar con dos cambios de alcohol de 95°

10- Deshidratar:

- Etanol 96° 1 min
- Etanol 96° 5 min
- Etanol 100 5 min
- Etanol 100 5 min
- Xilol I 10 min
- Xilol II 10 min

11- Montar con D.P.X.

*Reactivos:*

- Xilol (Prolabo, 28973.328)
- Etanol absoluto (Panreac, 121086.1211)
- Solvent Blue 38 (Sigma, S-3382)
- Ácido acético glacial 100% (Merck, 1.00066.0250)
- Violeta de cresilo (Sigma, C-5042)
- Carbonato de litio (Sigma, L-4283)
- DPX (Panreac, 255254.1610)

Soluciones

Luxol fast blue:

- Luxol Fast Blue.....0,1 g
- Etanol 95° .....100 ml
- Ácido Acético glacial 10% .....0,5 ml

**a) Violeta de cresilo al 0,1%**

- Violeta de cresilo .....0,1 g
- Agua destilada .....100 ml
- Ácido acético glacial al 10%: añadir 15 gotas antes de su utilización (una vez ya calentado).

Carbonato de litio 0,05% :

- Carbonato de litio .....0,05 g
- Agua destilada.....100 ml

## **Tinciones dobles por inmunohistoquímica**

### *Protocolo:*

1- Desparafinar/hidratar:

- Xilol I 5 min
- Xilol II 5 min
- Etanol 100° 5 min
- Etanol 100° 5 min
- Etanol 95° 5 min
- Etanol 95° 5 min
- PBS 5 min

2- Lavar con PBS 5 minutos (2x)

3- Desenmascaramiento de antígeno con tampón TE pH=9, en 3 series de 3 minutos en el microondas a máxima potencia

4- Dejar enfriar durante 1h 30 minutos

5- Lavar con PBS 5 minutos (3x)

6- Bloquear con *dual endogenous enzyme block\** durante 5 minutos

7- Lavado con PBS 5 minutos

8- Incubación del anticuerpo primario (YKL-40) durante 10 minutos

9- Lavado con PBS 5 minutos

10- Incubación con *Polymer HPR\** durante 10 minutos

11- Lavado con PBS 5 minutos (2x)

12- Revelado con *DAB working solution\** durante 3 minutos

13- Lavado con agua destilada 1 minuto

14- Lavado con PBS 5 minutos

15- Incubación con *Double Staining Block\** durante 3 minutos

16- Lavado con PBS 5 minutos.

17- Incubación con el segundo anticuerpo (GFAP, CD68 o CD3) en solución de bloqueo durante 10 minutos.

18- Lavado con PBS 5 minutos.

19- Incubación con *Rabbit/Mouse LINK\** durante 10 minutos

20- Lavado con PBS 5 minutos (2x)

21- Incubación con *Polymer/AP\** durante 10 minutos

22- Lavado con PBS 5 minutos (2x)



- 23- Revelar con *Permanent Red Working solution*\* durante el tiempo necesario<sup>a</sup>  
 24- Lavado con agua destilada 1 minutos  
 25- Lavado con agua destilada 5 minutos  
 26- Tinción con Dako REAL Hematoxilina durante 30 segundos  
 27- Lavado con agua destilada hasta la eliminación del exceso de hematoxilina  
 28- Montar los portas con *Dako glycerol mounting medium* y conservar a 4°C

\* Todos los productos están subministrados dentro del kit comercial EnVision™G|2 Doublestain System, Rabbit/Mouse (DAB+/Permanent Red; K5361, Dako)

<sup>a</sup> GFAP t= 1 minuto y 30 segundos; CD68 t= 5 minutos; CD3 t=3 minutos

*Reactivos:*

- Xilol (Prolabo, 28973.328)
- Etanol absoluto (Panreac, 121086.1211)
- Trizma Base (Sigma, T8524)
- Ácido Etilendiaminotetraacético (EDTA) (Merck, 1.08418.0100)
- Albúmina sérica bovina (BSA) (Merck, 1.08418.0100)
- Tween 20 (Sigma, P-1379)
- Fosfato potásico (H<sub>2</sub>KPO<sub>4</sub>) (Sigma, P-5655)
- Fosfato sódico dibásico (Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>) (Sigma, S-S5136)
- Cloruro sódico (NaCl) (Prolabo, 27800.360)
- Dako REAL Haematoxylin (Dako, S2020)
- Glycerol Mounting medium (Dako, C0563)

*Tabla de anticuerpos:*

Marcador	Casa comercial	Referencia	Dilución
CHI3L1	Quidel Corporation, San Diego	4815	1:100
GFAP	Dako, Dinamarca	Z0334	1:900
CD68	Dako, Dinamarca	M0876	1:400
CD3	Dako, Dinamarca	A0452	1:100

**PBS 10X**

- Fosfato potásico.....2,722 g
- Fosfato sódico dibásico.....11,312 g
- NaCl.....90 g
- Agua destilada.....1 L

**Tampón TE pH=9**

- Trizma base.....0,6057 g
- EDTA.....0,186 g
- Agua destilada.....500 ml

**Solución de bloqueo**

- BSA.....0,2%
- Tween 20.....0,05%
- PBS.....*volumen necesario*

*Publicaciones*



***Cerebrospinal fluid chitinase 3-like 1 levels are associated with conversion to multiple sclerosis.***

Comabella M, Fernández M, Martín R, Rivera-Vallvé S, Borrás E, Chiva C, Julià E, Rovira A, Cantó E, Alvarez-Cermeño JC, Villar LM, Tintoré M, Montalban X.

**Brain. 2020 Apr;133(Pt 4):1082-93**



# Cerebrospinal fluid chitinase 3-like 1 levels are associated with conversion to multiple sclerosis

Manuel Comabella,<sup>1</sup> Marta Fernández,<sup>1</sup> Roland Martin,<sup>2</sup> Stephanie Rivera-Vallvé,<sup>3</sup> Eva Borrás,<sup>3</sup> Cristina Chiva,<sup>3</sup> Eva Julià,<sup>1</sup> Alex Rovira,<sup>4</sup> Ester Cantó,<sup>1</sup> Jose Carlos Alvarez-Cermeño,<sup>5,6</sup> Luisa María Villar,<sup>5,6</sup> Mar Tintoré<sup>1</sup> and Xavier Montalban<sup>1</sup>

- 1 Centre d'Esclerosi Múltiple de Catalunya, CEM-Cat, Unitat de Neuroimmunologia Clínica, Hospital Universitari Vall d'Hebron (HUVH), Barcelona, Spain
- 2 Institute for Neuroimmunology and Clinical MULTIPLE SCLEROSIS Research, Centre for Molecular Neurobiology Hamburg (ZMNH), University Medical Center Eppendorf, Hamburg, Germany
- 3 Servei de Proteòmica (member of ProteoRed network), Universitat Pompeu Fabra, Barcelona, Spain
- 4 Magnetic Resonance Unit (IDI), Hospital Universitari Vall d'Hebron (HUVH), Barcelona, Spain
- 5 Department of Neurology, Hospital Ramón y Cajal, Madrid, Spain
- 6 Department of Immunology, Hospital Ramón y Cajal, Madrid, Spain

Correspondence to: Manuel Comabella,  
Centre d'Esclerosi Múltiple de Catalunya,  
CEM-Cat, Unitat de Neuroimmunologia Clínica,  
Hospital Universitari Vall d'Hebron (HUVH),  
Barcelona 08035,  
Spain  
E-mail: mcomabel@ir.vhebron.net

In most patients with multiple sclerosis, the disease initiates with a first attack or clinically isolated syndrome. At this phase, magnetic resonance imaging is an important predictor of conversion to multiple sclerosis. With the exception of oligoclonal bands, the role of other biomarkers in patients with clinically isolated syndrome is controversial. In the present study, we aimed to identify proteins associated with conversion to multiple sclerosis in patients with clinically isolated syndrome. We applied a mass spectrometry-based proteomic approach (isobaric labelling) to previously collected pooled cerebrospinal fluid samples from patients with clinically isolated syndrome, who subsequently converted to clinically definite multiple sclerosis ( $n=30$ ) and patients who remained as having clinically isolated syndrome ( $n=30$ ). Next, three of the most represented differentially expressed proteins, i.e. ceruloplasmin, vitamin D-binding protein and chitinase 3-like 1 were selected for validation in individual cerebrospinal fluid samples by enzyme-linked immunosorbent assay. Only chitinase 3-like 1 was validated and cerebrospinal fluid levels were increased in patients who converted to clinically definite multiple sclerosis compared with patients who continued as clinically isolated syndrome ( $P=0.00002$ ) and controls ( $P=0.012$ ). High cerebrospinal fluid levels of chitinase 3-like 1 significantly correlated with the number of gadolinium enhancing lesions and the number of  $T_2$  lesions observed in brain magnetic resonance imaging scans performed at baseline, and were associated with disability progression during follow-up and shorter time to clinically definite multiple sclerosis (log-rank  $P$ -value=0.003). Cerebrospinal fluid chitinase 3-like 1 levels were also measured in a second validation clinically isolated syndrome cohort and found to be increased in patients who converted to multiple sclerosis compared with patients who remained as having clinically isolated syndrome ( $P=0.018$ ). Our results indicate that patients who will convert to clinically

definite multiple sclerosis could be distinguished from those patients who will remain as clinically isolated syndrome by proteomic analysis of cerebrospinal fluid samples. Although protein levels are also increased in other disorders characterized by chronic inflammation, chitinase 3-like 1 may serve as a prognostic biomarker for conversion to multiple sclerosis and development of disability which may help to improve the understanding of the aetiopathogenesis in the early stages of multiple sclerosis.

**Keywords:** clinically isolated syndrome; multiple sclerosis; proteomics; chitinase 3-like 1; cerebrospinal fluid

**Abbreviations:** CHI3L1 = chitinase 3-like 1; CIS = clinically isolated syndrome; ELISA = enzyme-linked immunosorbent assay; iTRAQ = isobaric tag for relative and absolute quantitation

## Introduction

In most patients who later develop multiple sclerosis, the disease usually initiates with an acute or subacute episode of neurological disturbance known as a clinically isolated syndrome (CIS). At this stage, MRI is an important tool, both to predict conversion to clinically definite multiple sclerosis and development of disability (Brex *et al.*, 2002; Tintoré *et al.*, 2006; Fisniku *et al.*, 2008). In addition, the presence of oligoclonal bands was found to be a risk factor for conversion to multiple sclerosis independently of baseline MRI findings (Tintoré *et al.*, 2008). With the exception of oligoclonal bands, the role of other biomarkers in CIS patients is controversial (Berger *et al.*, 2003; Kuhle *et al.*, 2007; Pelayo *et al.*, 2007). Biomarker discovery in CIS patients at the time of disease onset may be useful (i) to differentiate CIS patients who will convert to multiple sclerosis from patients in whom CIS is due to a separate disorder; (ii) to develop prognostic factors for disease progression and development of disability; and (iii) to understand the pathogenesis underlying the early stages of the disease better.

Proteomics is well suited for biomarker discovery, and mass spectrometry-based approaches have been widely applied for protein identification. Proteomic studies in patients with multiple sclerosis are rapidly emerging and have helped to identify proteins that may be potential disease-specific markers (Hammack *et al.*, 2003; Dumont *et al.*, 2004; Noben *et al.*, 2005; Irani *et al.*, 2006; Lehmsiek *et al.*, 2007; Chiasserini *et al.*, 2008; D'Aguanno *et al.*, 2008; Stoop *et al.*, 2008; Qin *et al.*, 2009; Tumani *et al.*, 2009). These studies have analysed the proteome profile present in CSF samples from patients with multiple sclerosis as well as other inflammatory and non-inflammatory neurological disorders. Its proximity to inflammatory lesions in the CNS makes CSF ideal for the identification of biomarkers related to the underlying disease.

In a first phase of the study, we applied a mass spectrometry-based approach to identify proteins associated with conversion to clinically definite multiple sclerosis in pooled CSF samples from patients with CIS who converted to clinically definite multiple sclerosis and patients who remained as CIS during the follow-up period. In a second phase of the study, selected proteins were validated by an independent technique in individual CSF samples. Our data show that the CSF proteome profile is different between CIS patients who will convert to multiple sclerosis and CIS patients who will not convert, and propose a candidate marker

associated with conversion to clinically definite multiple sclerosis in CIS patients.

## Materials and methods

### Patients

#### Screening phase

For the screening phase, 60 patients with CIS recruited at the Centre d'Esclerosi Múltiple de Catalunya from 1995 onwards were selected based on the following criteria: Group 1—no conversion to clinically definite multiple sclerosis, IgG oligoclonal band negative and normal brain MRI after 5 years of follow-up ( $n=30$ ); and Group 2—conversion to clinically definite multiple sclerosis, presence of oligoclonal bands and 3 or 4 Barkhof criteria at baseline brain MRI ( $n=30$ ). The study was approved by the Ethics Committee of Vall d'Hebron University Hospital. Clinical and MRI assessments have been previously described elsewhere (Tintoré *et al.*, 2006). Briefly, brain MRI scans were performed at baseline and after 1 and 5 years of follow-up on a 1.0 or 1.5 T magnet with a standard head coil. MRI included the following sequences: transverse proton-density and T<sub>2</sub>-weighted conventional spin echo, and contrast-enhanced T<sub>1</sub>-weighted spin-echo. The number of Barkhof criteria (Barkhof *et al.*, 1997; Tintoré *et al.*, 2008), number of T<sub>2</sub> lesions, number of gadolinium enhancing lesions and number of new T<sub>2</sub> lesions were scored. Disability was evaluated according to the Expanded Disability Status Scale score in each visit and only Expanded Disability Status Scale performed during stability periods were considered. Clinically definite multiple sclerosis was diagnosed when there was a second attack with a new neurological abnormality that was confirmed by examination (Poser *et al.*, 1983). Time of follow-up was computed as the difference between the date of the last visit and the date of the CIS event. A summary of demographic and clinical characteristics of patients with CIS included in the screening phase is depicted in Table 1.

#### First validation phase

Totally 84 patients with CIS recruited at the Centre d'Esclerosi Múltiple de Catalunya were selected for a first validation phase. Forty-eight patients fulfilled Group 2 criteria, and 20 patients strictly satisfied Group 1 criteria. An additional group of 16 patients with less stringent Group 1 criteria, namely no conversion to clinically definite multiple sclerosis, negative oligoclonal bands and normal brain MRI after 1 year follow-up was also included. Clinical and MRI assessments in these 84 patients were comparable to those described in the screening phase. Additionally, a control group of 20 individuals with other



**Table 1** Clinical information and CSF characteristics of CIS patients included in the screening phase

Characteristics	Group 1 No conversion	Group 2 Conversion to multiple sclerosis	P-values
<i>n</i>	30	30	–
Age (years) <sup>a</sup>	29.9 (8.9)	27.1 (6.6)	0.371
Female/male (% female)	23/7 (76.7)	23/7 (76.7)	1.0
Follow-up time (years) <sup>a</sup>	6.0 (3.0)	5.5 (2.0)	0.294
Clinical presentation			
Optic neuritis	19 (63.3%)	9 (30.0%)	0.073
Brainstem	4 (13.3%)	8 (26.7%)	
Spinal	4 (13.3%)	9 (30.0%)	
Others	3 (10.0%)	4 (13.3%)	
Time between CIS and CSF extraction <sup>b</sup>	51.0 (13.5–114.5)	47.0 (24.0–85.0)	0.877
Leukocytes <sup>b</sup>	2.0 (0–4.0)	2.0 (0–7.0)	0.367
Red cells <sup>b</sup>	2.0 (0–12.5)	0 (0–23.0)	0.993
Protein concentration (g/l) <sup>b</sup>	0.310 (0.250–0.430)	0.350 (0.260–0.440)	0.166
Albumin concentration (g/l) <sup>b</sup>	0.169 (0.135–0.231)	0.186 (0.139–0.244)	0.522
IgG concentration (g/l) <sup>b</sup>	0.021 (0.016–0.030)	0.032 (0.023–0.060)	0.020

a Data are expressed as mean (SD).

b Data are expressed as median (interquartile range). P-values were obtained following comparisons between Groups 1 and 2 by means of chi-square test (gender and clinical presentation) and Mann–Whitney's U-test (remaining variables).

neurological disorders was included in the study. Demographic and clinical characteristics of CIS patients and controls are shown in Table 2. Eighteen patients (50.0%) from Group 1 and 25 patients (52.1%) from Group 2 were also included in the screening phase of the study (Table 2).

## Second validation phase

A second independent cohort comprised of 52 new CIS patients recruited at the Hospital Ramón y Cajal (Madrid, Spain) was used for validation of candidate proteins. Group 1 included 26 CIS patients who remained as CIS during the follow-up, with negative oligoclonal bands and 0 (11 patients; 42.3%), 1 (11 patients; 42.3%), or 2 (four patients; 15.4%) Barkhof criteria at baseline brain MRI. Group 2 included 26 CIS patients who converted to multiple sclerosis (by the Poser criteria in 24 patients and McDonald criteria in two patients; McDonald *et al.*, 2001), with positive oligoclonal bands and 3 or 4 Barkhof criteria at baseline brain MRI. The median time (interquartile range) between the CIS event and CSF extraction was 36.5 days (9.5–111.3 days) in patients from Group 1 and 26.0 days (10.0–78.8 days) in patients from Group 2. Sixteen individuals with inflammatory neurological disorders were used as controls. Table 2 describes demographic and clinical characteristics of CIS patients and controls included in the second validation cohort.

## CSF sampling and pooling strategy

CSF samples were collected at baseline by lumbar puncture and centrifuged for 5 min at 1500 rpm to remove cells. Samples were subsequently used for routine CSF diagnostics that included biochemistry and determination of IgG oligoclonal bands by agarose isoelectric focusing combined with immunoblotting and immunoperoxidase staining. The remaining volume of the samples was aliquoted and conserved at –80°C until used. CSF characteristics of patients included in Groups 1 and 2 are shown in Table 1.

A CSF pooling strategy was designed in the screening phase to identify proteins differentially expressed between patients belonging to Groups 1 and 2. Twelve CSF pools were created, six per group,

each pool containing CSF from five different patients, and each patient contributing with 300 µl to a final volume of 1.5 ml. Pools between groups were sex- and age-matched, and patients between pools were different. An illustration of the pooling design is depicted in Supplementary Fig. S1.

## Proteomic analysis

Supplementary Fig. S2 exemplifies the workflow followed for proteomic analysis, which comprised the following steps.

### Sample depletion and preparation

After thawing, CSF samples were first concentrated and then albumin and IgG depleted with the ProteoPrep Immunoaffinity Albumin and IgG Depletion Kit (Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA) following the manufacturer's recommendations. Subsequently, samples were precipitated by adding four volumes of ice-cold acetone overnight, centrifuged and the protein pellet diluted in water. Finally, protein concentration was determined using the Bradford's protein quantification method (Bio-Rad Protein Assay, Bio-Rad Laboratories GmbH, Munich, Germany).

### Isobaric tag for relative and absolute quantitation labelling

CSF pools were analysed by isobaric tag for relative and absolute quantitation (iTRAQ) as follows. Three independent 4-plex experiments were performed, and each experiment contained two pools from each group. Fifty micrograms of protein were transferred to a sample tube and dried in a speedvac. After re-dissolving samples in the Sample Buffer-Plasma following the manufacturer's recommendations (iTRAQ™ Reagents Application Kit-Plasma Protocol, Applied Biosystems, Foster City, CA, USA), samples were reduced, alkylated and enzymatically digested with porcine trypsin (Promega, Madison, WI, USA) as per the manufacturer's protocol. The resulting peptides were then labelled with the iTRAQ™ reagents and pooled following the manufacturer's protocol. Due to the complexity of the peptide mixture, a strong cation exchange chromatography was carried out.

Peptides were eluted using salt steps and seven fractions finally collected using a KCl range from 25 mM to 1M.

### Nanoflow liquid chromatography and tandem mass spectrometry analysis

Samples were run on a Q-Star Pulsar i (Applied Biosystems) instrument fitted with a nano-ESI source, previous nano-liquid chromatography separation in an Ultimate II system (LCPackings). Prior to liquid chromatography-mass spectrometry analysis, tryptic peptide mixtures were desalted and concentrated on reverse phase-C18 columns (Spec C18, Varian). The reverse phase chromatography was performed in an Atlantis dC18 NanoEase Column, 75 µm × 150mm (Waters), using a linear gradient of 5–55% acetonitrile in water 0.1% formic acid over 120 min. A data dependent analysis was performed using software Analyst QS 1.1 (Applied Biosystems).

### Data processing and selection of differentially expressed proteins

Protein identification and quantification was performed by the Paragon™ Algorithm in thorough search mode implemented in the ProteinPilot™ Software 2.0. Proteins were identified by searching in the UniProt/Swiss-Prot or NCBI nr databases.

For the analysis, six-pool comparisons were performed as follows: Pool 1 from Group 1 was directly compared with Pool 1 from Group 2, Pool 2 from Group 1 was compared with Pool 2 from Group 2, and so forth. From each pool comparison, differentially expressed proteins between Groups 1 and 2 ( $P < 0.05$ ) were selected, and the number of pool comparisons in which a selected protein was differentially expressed was counted. Proteins with changing directions in their expression, i.e. up-regulated and down-regulated in different pool comparisons, were not considered in the analysis.

### Enzyme-linked immunosorbent assay

In the validation phase, baseline levels of selected proteins were determined in CSF and serum samples using commercially available enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) kits according to the manufacturers' recommendations. CSF samples were collected as described before, and serum was obtained after centrifugation of the clotted blood and stored frozen at -80°C until used. Levels of chitinase 3-like 1 (CHI3L1) were measured with the METRA, EIA kit (Quidel Corporation, San Diego, USA) in undiluted CSF and serum following a 1:2 dilution factor. Levels of ceruloplasmin were measured by quantitative competitive sandwich ELISA (AssayPro, St Charles, USA) in diluted CSF (1:2) and serum (1:400) samples. Levels of vitamin D-binding protein were detected using a sandwich ELISA (Immunodiagnostik AG, Germany) following CSF (1:100) and serum (1:40 000) dilutions. All samples were measured in duplicate. The intra-assay variability was 8.4% for CHI3L1, 5.3% for vitamin D-binding protein and 12.2% for ceruloplasmin. The inter-assay variability was 15.0% for CHI3L1, 20.0% for vitamin D-binding protein and 22.7% for ceruloplasmin.

### Statistical analysis

Statistical analysis was performed by using the Statistical Package for the Social Sciences 15.0 package (SPSS Inc, Chicago, IL) for MS-Windows. A Mann-Whitney's test was used to test for significant differences in CSF and serum levels of selected proteins between Group 1 and Group 2 CIS patients, and between CIS patients and

Table 2 Clinical information of CIS patients and controls included in the validation phase

Characteristics	Second validation phase			
	First validation phase		Group 2	
	Group 1	Group 2	Group 1	Group 2
<i>n</i>	36	20	26	16
Percentage in screening phase <sup>a</sup>	18 (50.0)	25 (52.1%)	—	—
Age (years)	28.7 (9.4)	35.3 (10.0)	36.5 (11.1)	47.0 (14.7)
Female/male (% female)	29/7 (80.6)	12/8 (60.0)	18/8 (69.2)	11/5 (68.8)
Follow-up time (years)	4.1 (3.1)	—	2.3 (1.5)	—
Clinical presentation	22 (61.1%) ON 4 (11.1%) brainstem 7 (19.4%) spinal 3 (8.3%) others	15 (31.3%) ON 11 (22.9%) brainstem 15 (31.3%) spinal 7 (14.7%) others	8 (30.8%) ON 11 (42.3%) brainstem 4 (15.4%) spinal 3 (11.5%) others	4 (15.4%) ON 6 (23.1%) brainstem 10 (38.5%) spinal 6 (23.1%) others
		5 diplopia, 4 headache, 4 vertigo, 4 papillitis, 1 facial pain, 1 neck pain, 1 ↓ visual acuity		7 systemic autoimmune disorders, 2 PS, 2 THS, 2 bilateral ON, 1 RE, 1 myelitis, 1 recurrent ON

ON = optic neuritis; PS = paraneoplastic syndrome; THS = Tolosa-Hunt syndrome; RE = Rasmussen's encephalitis. Patients with systemic autoimmune disorders included Sjögren's syndrome ( $n = 2$ ), vasculitis ( $n = 2$ ), systemic lupus erythematosus ( $n = 1$ ), neurosarcoidosis ( $n = 1$ ) and Behçet's disease ( $n = 1$ ).

<sup>a</sup> Refers to number and percentage of patients that were also part of the screening phase.

<sup>b</sup> As described in the 'Materials and methods' section, in two patients conversion to multiple sclerosis was defined by the McDonald criteria. Data are expressed as mean (SD) unless otherwise stated.

control individuals. Correlations between CHI3L1 levels and radiological and clinical variables in CIS patients were assessed by the Spearman rank correlation coefficient. Development of clinically definite multiple sclerosis according to baseline CSF levels of CHI3L1 was assessed by Kaplan–Meier survival analysis with Log Rank test and Cox proportional hazard regression.

## Results

### Screening phase: clinical information and CSF characteristics

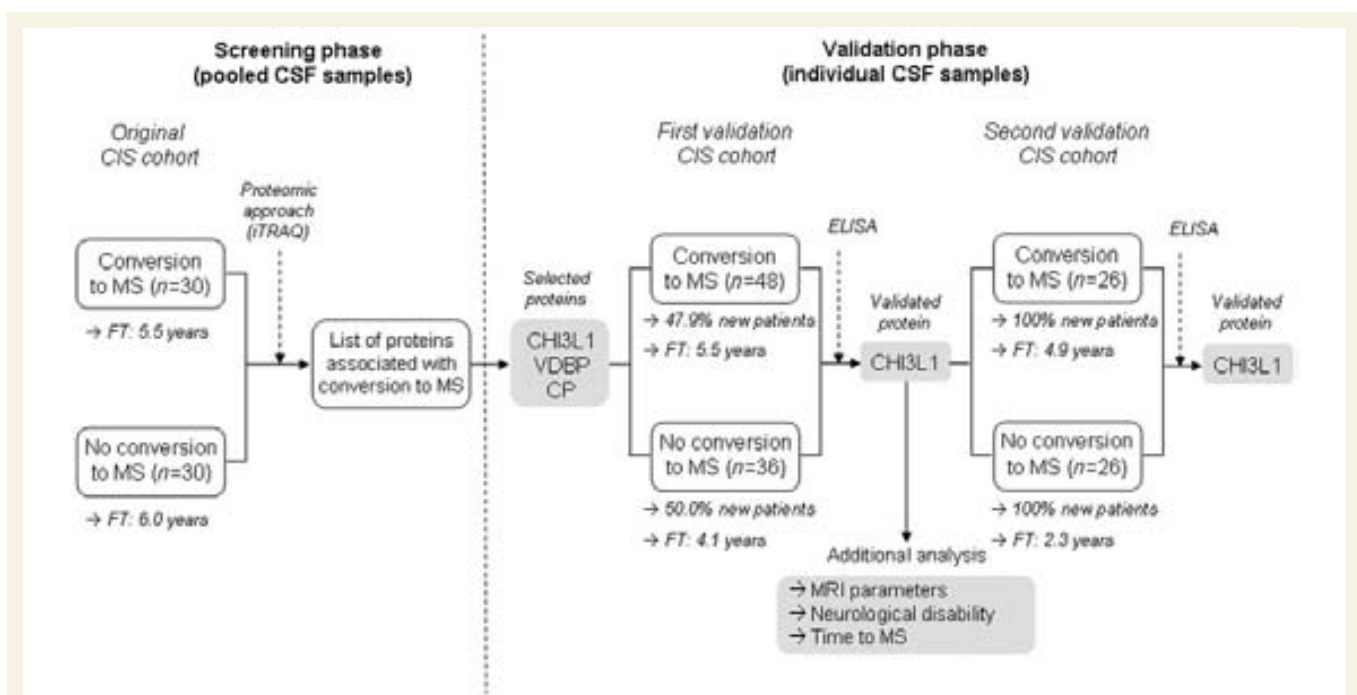
A schematic flow chart summarizing the main steps performed in study design is represented in Fig. 1. At baseline, demographic and clinical characteristics were comparable between CIS patients who did not convert to clinically definite multiple sclerosis (Group 1) and CIS patients who converted to clinically definite multiple sclerosis (Group 2) (Table 1). A higher number of CIS patients presenting with optic neuritis was observed in Group 1 compared with Group 2, although overall differences in clinical presentation were not statistically significant. As shown in Table 1, the median time between the CIS event and CSF collection was similar

between Groups 1 and 2 (51.0 and 47.0 days, respectively). Comparisons of CSF characteristics between groups only revealed a statistically significantly higher IgG concentration in Group 2 patients, which is associated with the IgG oligoclonal bands that are present in these patients.

### Screening phase: proteins associated with conversion to multiple sclerosis

In order to identify proteins associated with conversion to clinically definite multiple sclerosis, pooled CSF samples from 30 CIS patients fulfilling Group 1 criteria and 30 CIS patients satisfying Group 2 criteria were compared using the iTRAQ proteomic technique, as described in the 'Materials and methods' section. Only 4 proteins out of 267 identified (1.5%) showed up-regulation or down-regulation in different pool comparisons: alpha-1 antitrypsin precursor, which is a contaminant from the trypsin enzymatic digestion of proteins, and serum albumin precursor, serotransferrin precursor and plasma retinol-binding precursor, which all are common blood contaminants of CSF.

Table 3 displays the 23 proteins that were found to be differentially expressed between Groups 1 and 2 in three or more pool comparisons. Seventeen proteins (73.9%) were up-regulated and



**Figure 1** Flow chart summarizing the different steps undertaken in the study design. In a first phase of the study (screening phase), a mass spectrometry-based proteomic approach (iTRAQ) was applied to pooled CSF samples from 30 patients who converted to multiple sclerosis and 30 patients who remained as CIS (original CIS cohort) in order to identify proteins associated with conversion to multiple sclerosis. In a second phase of the study (validation phase), three proteins, CHI3L1, vitamin D-binding protein (VDBP) and ceruloplasmin (CP) were selected for validation in individual CSF samples by means of ELISA. CSF levels for these proteins were measured in a partially overlapping CIS cohort comprised of 48 patients who converted to multiple sclerosis and 36 patients who continued as CIS (first validation cohort). Only CHI3L1 was validated and an additional analysis was performed in order to evaluate the association between CSF levels of CHI3L1 and MRI parameters, Expanded Disability Status Scale and time to multiple sclerosis. Finally, CSF CHI3L1 levels were determined in a totally independent CIS cohort comprised of 26 patients who converted to multiple sclerosis and 26 patients who remained as CIS (second validation cohort). CHI3L1 was also validated in this new CIS cohort. The follow-up time (FT) and the percentage of new patients included in the different CIS cohorts are indicated. MS = multiple sclerosis.

**Table 3** Differentially expressed proteins identified in the screening phase in 3 or more CSF pool comparisons between Group 1 and 2 patients

Protein	Accession number	Expression <sup>a</sup>	Number of pools <sup>b</sup>
Ceruloplasmin	P00450	up	6
Vitamin D-binding protein	P02774	up	6
Apolipoprotein A-I	P02647	up	6
Chitinase-3-like protein 1	P36222	up	5
Semaphorin-7 A	O75326	down	4
Beta-Ala-His dipeptidase	Q96KN2	down	4
Plasminogen	P00747	up	4
Vitronectin	P04004	up	4
Apolipoprotein A-IV	P06727	up	4
Ig alpha-1 chain C region	P01876	up	4
Ig kappa chain C region	P01834	up	4
Ig mu chain C region	P01871	up	4
Ig lambda chain C regions	P01842	up	4
Brevican core protein	Q96GW7	down	3
Secretogranin II	P13521	down	3
Proactivator polypeptide	P07602	down	3
Thy-1 membrane glycoprotein (CD90 antigen)	P04216	down	3
Alpha-1-antichymotrypsin	P01011	up	3
Serum paraoxonase/arylesterase 1	P27169	up	3
Corticosteroid-binding globulin	P08185	up	3
Haptoglobin	P00738	up	3
Heparin cofactor 2	P05546	up	3
Alpha-2-antiplasmin	P08697	up	3

a Refers to the direction in protein expression: up = up-regulated in Group 2 (conversion to clinically definite multiple sclerosis) versus Group 1 (no conversion to clinically definite multiple sclerosis); down = down-regulated in Group 2 versus Group 1.

b Refers to the number of pool comparisons in which a protein was found to be differentially expressed in the same direction (up or down).

6 (26.1%) proteins down-regulated in Group 2 compared with Group 1. These results indicate that patients who converted to clinically definite multiple sclerosis could be distinguished from those patients who remained as CIS by proteomic analysis of CSF samples collected at the time of a CIS event.

## First validation phase: CSF CHI3L1 levels are increased in patients who converted to clinically definite multiple sclerosis

To rule out the presence of false positive results associated with the pooling methodology and proteomic technique, three of the most represented differentially expressed proteins were selected for validation in individual CSF samples using an independent analytical method. Ceruloplasmin and vitamin D-binding protein were selected among the three proteins found differentially expressed in all the pool comparisons, and CHI3L1 was selected as the unique protein identified in five-pool comparisons. CSF and serum levels of selected proteins were determined by ELISA in a first validation cohort comprised of 36 CIS patients who remained as CIS (Group 1) and 48 CIS patients who converted to clinically definite multiple sclerosis (Group 2). CSF and serum levels for these proteins were also determined in 20 individuals with other neurological diseases. As shown in Fig. 2, only CHI3L1 was validated. CSF CHI3L1 levels were significantly higher in CIS patients who converted to clinically definite multiple sclerosis compared with

patients who did not convert ( $P=2.3 \times 10^{-5}$ ) and controls with other neurological disorders ( $P=0.012$ ). This finding was restricted to CSF samples, as CHI3L1 serum levels were similar between Groups 1 and 2. However, CHI3L1 serum levels were higher in CIS patients than in controls (Group 1 versus controls,  $P=0.048$ ; Group 2 versus controls,  $P=0.003$ ). CSF and serum levels of ceruloplasmin and vitamin D-binding protein were similar between patients who converted to clinically definite multiple sclerosis and patients who did not convert and comparable to the levels found in controls ( $P>0.05$  for all the comparisons).

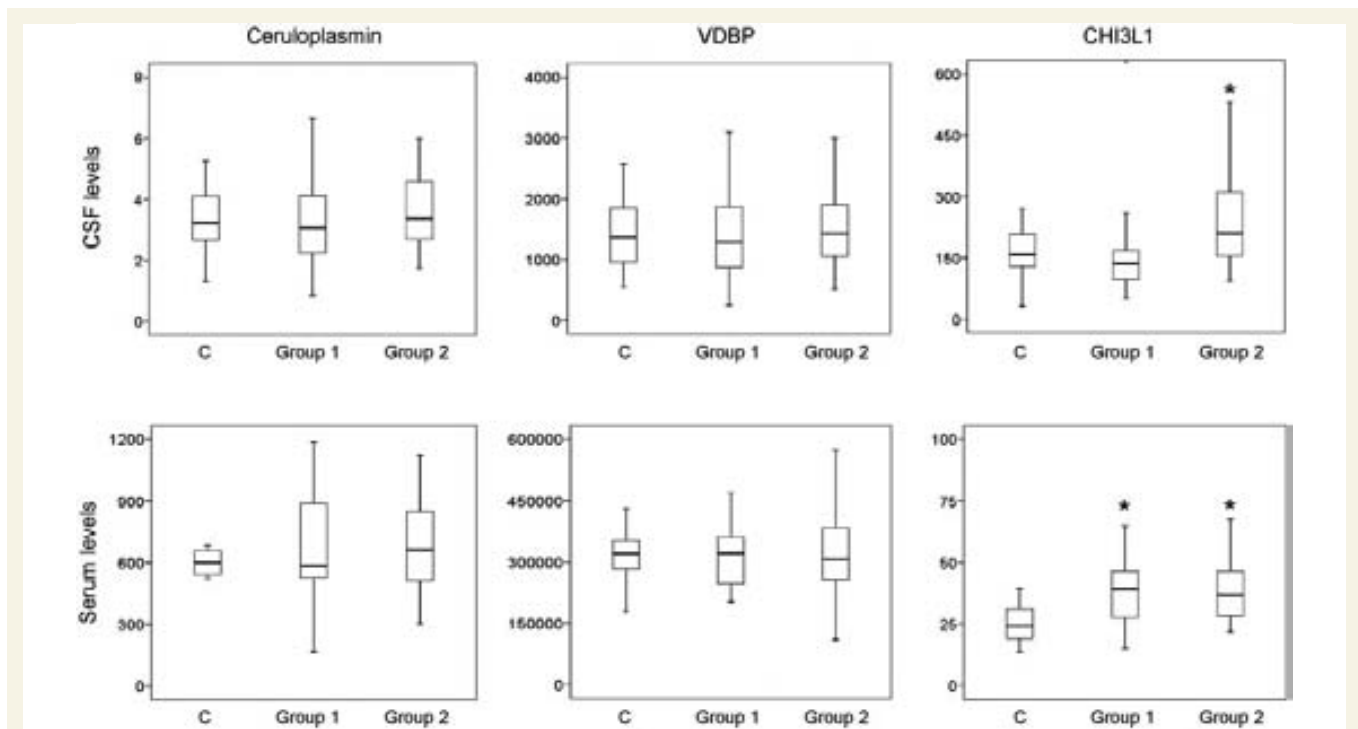
These results point to CHI3L1 as the CSF biomarker that more reliably and best discriminated between patients who converted to clinically definite multiple sclerosis and those who continued as CIS.

## CSF CHI3L1 levels are associated with brain MRI abnormalities at baseline and disability progression during follow-up

We next investigated whether levels of CHI3L1 in CSF correlated with brain MRI-derived metrics in patients with CIS at the time of disease onset. As shown in Table 4, baseline CSF CHI3L1 levels significantly correlated with the number of gadolinium enhancing lesions and the number of  $T_2$  lesions observed in brain MRI scans performed at baseline.

To determine whether baseline CSF CHI3L1 levels are associated with MRI abnormalities and disability progression during





**Figure 2** CSF and serum levels of selected proteins in CIS patients and controls included in the first validation phase of the study. Levels of ceruloplasmin ( $\mu\text{g/ml}$ ), vitamin D-binding protein (VDBP;  $\text{ng/ml}$ ) and CHI3L1 ( $\text{ng/ml}$ ) were determined by ELISA in CSF and serum samples from CIS patients who did not convert to clinically definite multiple sclerosis (Group 1,  $n=36$ ), CIS patients who converted to clinically definite multiple sclerosis (Group 2,  $n=48$ ), and individuals with other neurological disorders (C; Controls,  $n=20$ ). CSF CHI3L1 levels were significantly higher in Group 2 compared with Group 1 and controls ( $*P=2.3 \times 10^{-5}$  and  $P=0.012$ , respectively, Mann–Whitney U test). Serum CHI3L1 levels were higher in CIS patients compared with controls (Group 1 versus controls,  $*P=0.048$ ; Group 2 versus controls,  $*P=0.003$ ). Boxes represent the 75th and 25th percentiles divided horizontally by the median. Whiskers are drawn to the nearest value not beyond a standard span ( $1.5$  and  $3 \times$  the interquartile range) from the 75th and 25th percentiles. VDBP: vitamin D binding protein; CHI3L1: chitinase 3-like 1.

**Table 4** Correlations between CHI3L1 CSF levels and clinical and radiological parameters at baseline and during follow-up

	Baseline MRI		Follow-up MRI				Follow-up Expanded Disability Status Scale				
	NGD ( $n=44$ )	NT2L ( $n=44$ )	1 year		5 years		1 year ( $n=44$ )	2 years ( $n=39$ )	3 years ( $n=41$ )	4 years ( $n=37$ )	5 years ( $n=29$ )
			NGD ( $n=24$ )	NT2L ( $n=25$ )	NGD ( $n=18$ )	NT2L ( $n=18$ )					
CHI3L1	<b>0.32</b> (0.037)	<b>0.44</b> (0.003)	-0.23 (0.274)	0.07 (0.756)	0.12 (0.636)	-0.05 (0.833)	<b>0.34</b> (0.025)	<b>0.40</b> (0.012)	<b>0.47</b> (0.002)	<b>0.38</b> (0.022)	0.29 (0.131)

Data are expressed as Spearman correlation coefficient ( $P$ -value). Number of patients available for each comparison is shown in parenthesis. NGD = number of gadolinium enhancing lesions; NT2L = number of  $T_2$  lesions. Statistically significant correlations are shown in bold.

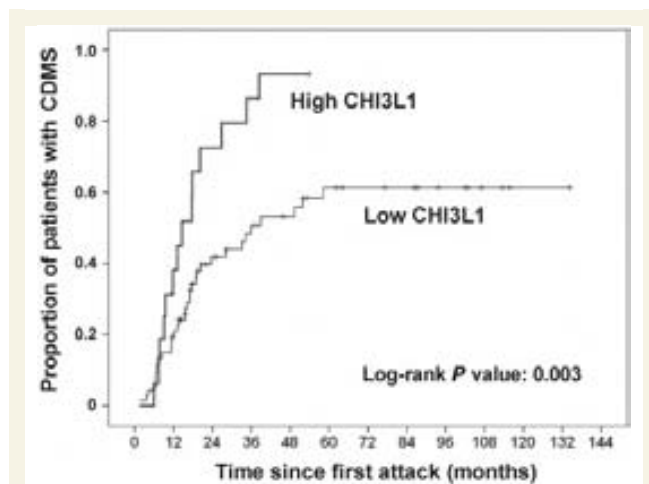
follow-up, analysis was restricted to those patients who will convert to multiple sclerosis (Group 2). As shown in Table 4, significant correlations between baseline CSF CHI3L1 levels and brain MRI findings were lost at 1- and 5-year follow-up, most likely reflecting the small number of patients from whom MRI data were available. Of note, baseline CSF CHI3L1 levels were associated with disability progression at follow-up, as reflected by the statistically significant correlations observed between CSF CHI3L1 levels and Expanded Disability Status Scale during Years 1 through 4 (Table 4).

These results indicate that CSF levels of CHI3L1 at the time of a CIS event are associated with the amount of CNS inflammation and  $T_2$

lesion burden, and more interestingly, that CHI3L1 may be used as a prognostic marker for disability progression in patients who will later convert to clinically definite multiple sclerosis.

### Baseline high CSF levels of CHI3L1 in patients with CIS are associated with shorter time to clinically definite multiple sclerosis

In order to evaluate the association between baseline levels of CHI3L1 in CSF and time to clinically definite multiple sclerosis,



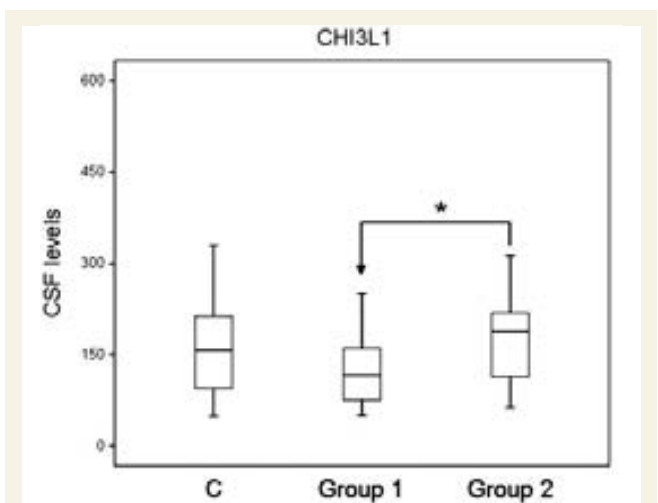
**Figure 3** Kaplan-Meier curves for time to clinically definite multiple sclerosis according to baseline CSF levels of CHI3L1 in patients with CIS. Levels of CHI3L1 were categorized into low and high as described in the 'Results' section. CIS patients with high CHI3L1 levels had a significantly shorter time to clinically definite multiple sclerosis (CDMS) compared with patients with low CHI3L1 (log-rank  $P$ -value = 0.003). Median survival time (95% CI) in patients with high and low levels of CHI3L1 in CSF is 17.6 months (11.6–23.7) and 34.2 months (16.9–51.5), respectively.

patients were classified into two groups (high/low) based on a cut-off value in the CSF CHI3L1 levels of 287.9 mg/ml. This cut-off value was calculated from the mean CSF CHI3L1 levels + 2 SDs obtained in the group of patients with other neurological disorders. Nineteen (22.6%) CIS patients with CHI3L1 levels in CSF above the cut-off value comprised the 'high' group, and the remaining 65 (77.4%) patients comprised the 'low' group. Interestingly, the time to clinically definite multiple sclerosis was significantly shorter in patients with high levels of CHI3L1 in CSF at baseline compared with patients with low protein levels (log-rank  $P$  = 0.003) (Fig. 3). The median survival times (95% confidence interval) between the CIS event and the second relapse in patients with high and low CSF CHI3L1 levels were 17.6 months (11.6–23.7) and 34.2 months (16.9–51.5), respectively. When the CSF CHI3L1 levels were incorporated into a univariate Cox regression model, the presence of high baseline CHI3L1 levels were associated with an increased risk of conversion to clinically definite multiple sclerosis (hazard ratio: 2.5; 95% confidence interval: 1.3–4.7;  $P$  = 0.004).

These results indicate that high baseline CSF levels of CHI3L1 may be used as a prognostic marker for conversion to clinically definite multiple sclerosis.

## Determination of CSF CHI3L1 levels in a second validation cohort of patients with CIS

Finally, in a second validation phase, CSF levels of CHI3L1 were also determined by ELISA in a totally independent validation cohort comprised of 52 new CIS patients classified based on



**Figure 4** CSF levels of CHI3L1 in CIS patients and controls included in the second validation phase of the study. Levels of CHI3L1 (ng/ml) were measured by ELISA in CSF samples from a second independent validation cohort comprised of CIS patients who did not convert to multiple sclerosis (Group 1,  $n$  = 26), CIS patients who converted to multiple sclerosis (Group 2,  $n$  = 26), and controls with inflammatory neurological disorders (C; Controls,  $n$  = 16). CSF CHI3L1 levels were significantly increased in Group 2 compared with Group 1 ( $*P$  = 0.018, Mann-Whitney  $U$ -test).

conversion to multiple sclerosis, as described in the 'Materials and methods' section. Sixteen individuals with inflammatory neurological disorders were also included as a control group. Similar to the findings observed in the first validation cohort, CSF CHI3L1 levels were found to be significantly increased in CIS patients who later converted to multiple sclerosis compared with patients who remained as CIS ( $P$  = 0.018; Fig. 4). Although CSF levels of CHI3L1 were also higher in patients who converted to multiple sclerosis compared with controls with other inflammatory neurological disorders, the difference did not reach statistical significance ( $P$  = 0.351). These results reinforce the potential of CHI3L1 to discriminate between CIS patients who convert to multiple sclerosis and patients who remain as CIS.

Given the contradictory results observed between the iTRAQ and ELISA techniques for proteins that were differentially expressed in all pool comparisons using the proteomic approach, CSF levels of vitamin D-binding protein were also measured by ELISA in the second validation cohort. Mean values of vitamin D-binding protein were similar between groups ( $P$  = 0.752 for comparison between Group 2 and Group 1;  $P$  = 0.711 for comparison between Group 2 and controls; Mann-Whitney  $U$ -test) (data not shown). These results confirm the lack of association between CSF vitamin D-binding protein levels and conversion to multiple sclerosis observed in the first validation cohort, and point to a false positive result of the iTRAQ technique for this protein.

## Discussion

Mass spectrometry has been widely applied in proteomics for protein identification. Recently, new strategies based on 2D liquid

chromatography with tandem mass spectrometry have been developed in order to quantify differences between distinct physiological or pathological stages. The advantages of mass spectrometry-based protein quantification are precision, sensitivity, throughput and convenient automation (Boehm *et al.*, 2007). Stable isotopic-labelling approaches rely on the covalent attachment of stable isotope tags to specific amino acid residues of proteins or peptides. iTRAQ is one of the chemical-labelling techniques that has received more attention (Zieske, 2006; Wiese *et al.*, 2007) and the performance and limitations of this technique have been described elsewhere (DeSouza *et al.*, 2005; Wu *et al.*, 2006). In this approach, peptides are labelled at the N-terminus and the lysine side chains. MS/MS fragmentation produces signature ions (114, 115, 116 and 117 for four states) that are used to determine relative amounts of each protein in each sample. The quantization of proteins is based on the ratio observed in tryptic peptides identified for each protein. Then, in order to quantify one protein, at least three peptides from this protein should be quantified with good *P*-values (statistically significant); in consequence, not all proteins identified can be confidently quantified.

We took advantage of the iTRAQ methodology to identify proteins associated with conversion to multiple sclerosis in CIS patients classified based on stringent criteria. Interestingly, by applying this proteomic approach to CSF samples collected at the time of a CIS event, patients who converted to clinically definite multiple sclerosis could be distinguished from those who remained as CIS. In this methodology, relative quantitation of proteins in the CSF relies on the assumption that the expression levels for most proteins do not change in response to disease.

Three of the most represented proteins that were differentially expressed in the pool comparisons were selected for a first validation phase in individual CSF samples using a different analytical approach. To give more strength to the validation process, approximately 50% of the CSF samples used for validation came from new CIS patients not included in the initial CSF pools. Although vitamin D-binding protein and ceruloplasmin were differentially expressed in all pool comparisons, differences were not validated by ELISA. It is important to remark that iTRAQ is an appropriate tool for biomarker discovery, but results always need to be validated by more sensitive and independent analytical approaches. Vitamin D-binding protein is an immunomodulatory factor that binds vitamin D and monomeric actin (Niino *et al.*, 2002). In two previous proteomic studies, vitamin D-binding protein was decreased in patients with multiple sclerosis and CIS compared with individuals with other neurological disorders (Lehmensiek *et al.*, 2007; Qin *et al.*, 2009). Ceruloplasmin is an antioxidant protein that was previously identified in pooled CSF from multiple sclerosis patients but not in samples from patients with other inflammatory disorders (Hammack *et al.*, 2003). In our study, CSF levels of vitamin D-binding protein and ceruloplasmin determined by ELISA were similar between CIS patients who converted to multiple sclerosis and patients who continued as CIS, and comparable to individuals with other neurological disorders. Furthermore, the lack of association between CSF levels of vitamin D-binding protein and conversion to multiple sclerosis was also confirmed in a second validation cohort. Differences in the study design may explain the lack of reproducibility

between studies. For instance, in previous studies CIS patients were analysed as a whole without drawing a distinction between patients who will convert to multiple sclerosis and patients who will remain as CIS.

In five out of six-pool comparisons, CHI3L1 was overexpressed in CIS patients who converted to clinically definite multiple sclerosis. Interestingly, proteomic results were confirmed by ELISA in two independent validation cohorts, and CSF CHI3L1 levels were increased in this group of patients. The fact that both validation cohorts included less stringent classification criteria of conversion to multiple sclerosis compared with the original cohort used in the screening phase, i.e. number of Barkhof criteria at baseline MRI and follow-up times, indicates that CHI3L1 can be applied to a broad spectrum of CIS patients to discriminate between patients who will later convert to multiple sclerosis and patients who will continue as CIS. CHI3L1, also known as YKL40, is a member of the glycoside hydrolase 18 chitinase family that binds chitin of different lengths but lacks chitinase activity (Renkema *et al.*, 1998). It is mainly secreted by activated macrophages, chondrocytes, neutrophils, vascular smooth muscle cells and some tumour cells. CHI3L1 has been found to be up-regulated in several human cancers, in which increased serum levels have been associated with disease severity, poorer prognosis and shorter survival (Jensen *et al.*, 2003; Johansen *et al.*, 2004; Diefenbach *et al.*, 2007; Kucur *et al.*, 2008; Mitsuhashi *et al.*, 2009). In addition, increased serum levels of CHI3L1 have been found in non-neoplastic disorders characterized by chronic inflammation and tissue remodelling, such as rheumatoid arthritis, osteoarthritis, inflammatory bowel disease and sarcoidosis; and protein levels again correlated with disease severity (Vos *et al.*, 2000; Koutroubakis *et al.*, 2003; Johansen *et al.*, 2005; Erzin *et al.*, 2008). Hence, CHI3L1 was not expected to be specific for multiple sclerosis and, in fact, differences of CSF CHI3L1 levels between CIS patients who converted to multiple sclerosis and individuals with inflammatory disorders were not statistically significant. In our study, increased CSF CHI3L1 levels correlated with baseline brain MRI findings that reflect the degree of brain inflammation and lesion burden, and with development of disability progression at follow-up. Interestingly, high baseline CSF protein levels paralleled poorer prognosis, as they were associated with shorter time to clinically definite multiple sclerosis.

For the first validation phase, CHI3L1 levels were measured in both CSF and serum samples. CSF represents better the local events occurring in the brain but is invasive, whereas serum is simpler to collect. However, differences in CHI3L1 levels between CIS patients were only observed in CSF samples. Of note, CHI3L1 serum levels were increased overall in CIS patients compared with individuals with other neurological disorders, a finding that increases the specificity of the differences observed in the CSF protein levels between patients who converted to multiple sclerosis and patients who continued as CIS. Although its precise physiological role is unclear and the identity of its ligand remains unknown, our data point to CHI3L1 not only as a reliable protein associated with conversion to multiple sclerosis but also as an attractive prognostic marker for the disease. CHI3L1 expression has been shown to be induced by strongly proinflammatory cytokines such as interleukin-1 $\beta$  and tumour necrosis factor- $\alpha$

(Recklies *et al.*, 2005). This finding may indicate that, in CIS patients, CHI3L1 is secreted by activated macrophages in the context of the inflammatory environment that is taking place in the CNS. In our study, CSF levels of CHI3L1 significantly correlated with the number of gadolinium enhancing lesions and the number of T<sub>2</sub> lesions. Furthermore, CHI3L1 is proposed as a candidate autoantigen in rheumatoid arthritis, and CHI3L1-mediated immune responses in these patients are shifted toward an interferon-gamma- $\gamma$ -dominated proinflammatory phenotype (van Bilsen *et al.*, 2004). If similar responses are operating in patients with multiple sclerosis, CHI3L1 might contribute to the Th1 type immune responses observed in these patients.

Interestingly, enzyme activity of another member of the chitinase family, the chitotriosidase, was increased in patients with multiple sclerosis compared with controls (Sotgiu *et al.*, 2006; Comabella *et al.*, 2009), which further reinforces an important role of the chitinase family in the aetiopathogenesis of multiple sclerosis.

Although they need to be validated, the remaining proteins identified in our study represent potential candidates associated with conversion to multiple sclerosis. Apolipoprotein A-I was up-regulated in all pool CSF comparisons. Apolipoprotein A-I has been shown to block the T cell-dependent contact-mediated activation of monocytes (Bresnihan *et al.*, 2004), and it was up-regulated in a previous study in CIS and multiple sclerosis patients compared with controls (Lehmensiek *et al.*, 2007). However, given its presence in blood contaminated CSF samples (You *et al.*, 2005), apolipoprotein A-I was not considered for validation in the present study.

Of note, among the proteins that were differentially expressed in four pool CSF comparisons, semaphorin-7A and beta-Ala-His dipeptidase were down-regulated in patients who later converted to clinically definite multiple sclerosis. Semaphorin-7A is a membrane-anchored member of the semaphorin family that is involved in immune responses and plays an important role in axon growth and guidance (Pasterkamp *et al.*, 2003). Beta-Ala-His dipeptidase, also known as carnosinase, is an enzyme with diverse biological functions such as intracellular buffer, metal-chelator (particularly copper), antioxidant and free radical scavenger. Interestingly, serum carnosinase activity was decreased in patients with multiple sclerosis compared with control individuals (Wassif *et al.*, 1994).

The remaining proteins identified in four-pool comparisons were up-regulated in patients who developed multiple sclerosis. Plasminogen is a circulating zymogen that is converted to the active enzyme plasmin, the main function of which is to dissolve fibrin clots. Interestingly, tissue plasminogen activators have been implicated in multiple sclerosis pathogenesis (Gveric *et al.*, 2003). Vitronectin is a plasma and extracellular matrix glycoprotein involved in pleiotropic functions such as cell adhesion, coagulation and phagocytosis. Of note, in the animal model of multiple sclerosis, experimental autoimmune encephalomyelitis, vitronectin deposition in brain tissue directly promoted microglial activation and matrix metalloproteinase-9 expression (Milner *et al.*, 2007). Apolipoprotein A-IV is a major circulating apolipoprotein with

physiological functions that are not completely understood. It was previously identified in CSF from multiple sclerosis patients but not from controls (Hammack *et al.*, 2003). In a recent study (Tumani *et al.*, 2009), apolipoprotein A-IV was overexpressed in CSF samples from CIS patients who remained as CIS compared with patients who converted to multiple sclerosis. Differences in the methodology, CSF characteristics and criteria to classify CIS patients may account for the discrepancies observed between the two studies.

Finally, the overexpressed IgG heavy and light chains are most likely associated with intrathecal immunoglobulin synthesis (Fischer *et al.*, 2004), and related to one of the classification criteria applied to patients who converted to multiple sclerosis (presence of IgG oligoclonal bands).

In summary, the iTRAQ proteomic approach carried out in the present study facilitated identification of CSF proteins associated with conversion to clinically definite multiple sclerosis that may help to understand the aetiopathogenesis of early stages of multiple sclerosis better. In particular, CHI3L1 is proposed as an attractive and strong prognostic biomarker for disease conversion and development of disability in a patient with CIS.

## Acknowledgements

The authors would like to thank the Fundació Esclerosi Múltiple (FEM).

## Funding

'Fondo de Investigación Sanitaria' (FIS – PI050588), Ministry of Science and Innovation, Spain; 'Red Española de Esclerosis Múltiple (REEM)' sponsored by the FIS, and the 'Ajuts per donar Suport als Grups de Recerca de Catalunya (SGR 2005-1081)', sponsored by the 'Agència de Gestió d'Ajuts Universitaris i de Recerca' (AGAUR), Generalitat de Catalunya, Spain.

## Supplementary material

Supplementary material is available at *Brain* online.

## References

- Barkhof F, Filippi M, Miller DH, Scheltens P, Campi A, Polman CH, *et al.* Comparison of MRI criteria at first presentation to predict conversion to clinically definite multiple sclerosis. *Brain* 1997; 120: 2059–69.
- Berger T, Rubner P, Schautzer F, Egg R, Ulmer H, Mayringer I, *et al.* Antimyelin antibodies as a predictor of clinically definite multiple sclerosis after a first demyelinating event. *N Engl J Med* 2003; 349: 139–45.
- Boehm AM, Pütz S, Altenhöfer D, Sickmann A, Falk M. Precise protein quantification based on peptide quantification using iTRAQ™. *BMC Bioinformatics* 2007; 8: 214.
- Bresnihan B, Gogarty M, FitzGerald O, Dayer JM, Burger D. Apolipoprotein A-I infiltration in rheumatoid arthritis synovial



- tissue: a control mechanism of cytokine production? *Arthritis Res Ther* 2004; 6: R563–6.
- Brex PA, Ciccarelli O, O’Riordan JI, Sailer M, Thompson AJ, Miller DH. A longitudinal study of abnormalities on MRI and disability from multiple sclerosis. *N Engl J Med* 2002; 346: 158–64.
- Chiasserini D, Di Filippo M, Candelieri A, Susta F, Orvietani PL, Calabresi P, et al. CSF proteome analysis in multiple sclerosis patients by two-dimensional electrophoresis. *Eur J Neurol* 2008; 15: 998–1001.
- Comabella M, Domínguez C, Río J, Martín-Gallán P, Vilches A, Vilarrasa N, et al. Plasma chitotriosidase activity in multiple sclerosis. *Clin Immunol* 2009; 131: 216–22.
- D’Aguanno S, Barassi A, Lupisella S, d’eril GM, Del Boccio P, Pieragostino D, et al. Differential cerebro spinal fluid proteome investigation of Leber hereditary optic neuropathy (LHON) and multiple sclerosis. *J Neuroimmunol* 2008; 193: 156–60.
- DeSouza L, Diehl G, Rodrigues MJ, Guo J, Romaschin AD, Colgan TJ, et al. Search for cancer markers from endometrial tissues using differentially labeled tags iTRAQ and cICAT with multidimensional liquid chromatography and tandem mass spectrometry. *J Proteome Res* 2005; 4: 377–86.
- Diefenbach CS, Shah Z, Iasonos A, Barakat RR, Levine DA, Aghajanian C, et al. Preoperative serum YKL-40 is a marker for detection and prognosis of endometrial cancer. *Gynecol Oncol* 2007; 104: 435–42.
- Dumont D, Noben JP, Raus J, Stinissen P, Robben J. Proteomic analysis of cerebrospinal fluid from multiple sclerosis patients. *Proteomics* 2004; 4: 2117–24.
- Erzin Y, Uzun H, Karatas A, Celik AF. Serum YKL-40 as a marker of disease activity and stricture formation in patients with Crohn’s disease. *J Gastroenterol Hepatol* 2008; 23: e357–62.
- Fischer C, Arneith B, Koehler J, Lotz J, Lackner KJ. Kappa free light chains in cerebrospinal fluid as markers of intrathecal immunoglobulin synthesis. *Clin Chem* 2004; 50: 1809–13.
- Fisniku LK, Brex PA, Altmann DR, Miszkil KA, Benton CE, Lanyon R, et al. Disability and T2 MRI lesions: a 20-year follow-up of patients with relapse onset of multiple sclerosis. *Brain* 2008; 131: 808–17.
- Gveric D, Herrera B, Petzold A, Lawrence DA, Cuzner ML. Impaired fibrinolysis in multiple sclerosis: a role for tissue plasminogen activator inhibitors. *Brain* 2003; 126: 1590–8.
- Hammack BN, Owens GP, Burgoon MP, Gilden DH. Improved resolution of human cerebrospinal fluid proteins on two-dimensional gels. *Mult Scler* 2003; 9: 472–5.
- Irani DN, Anderson C, Gundry R, Cotter R, Moore S, Kerr DA, et al. Cleavage of cystatin C in the cerebrospinal fluid of patients with multiple sclerosis. *Ann Neurol* 2006; 59: 237–47.
- Jensen BV, Johansen JS, Price PA. High levels of serum HER-2/neu and YKL-40 independently reflect aggressiveness of metastatic breast cancer. *Clin Cancer Res* 2003; 9: 501–12.
- Johansen JS, Stoltenberg M, Hansen M, Florescu A, Hørslev-Petersen K, Lorenzen I, et al. Serum YKL-40 concentrations in patients with rheumatoid arthritis: relation to disease activity. *Rheumatology* 1999; 38: 618–26.
- Johansen JS, Drivsholm L, Price PA, Christensen IJ. High serum YKL-40 level in patients with small cell lung cancer is related to early death. *Lung Cancer* 2004; 46: 333–40.
- Johansen JS, Milman N, Hansen M, Garbarsch C, Price PA, Graudal N. Increased serum YKL-40 in patients with pulmonary sarcoidosis—a potential marker of disease activity? *Respir Med* 2005; 99: 396–402.
- Koutroubakis IE, Petinaki E, Dimoulis P, Vardas E, Roussoumoustakaki M, Maniatis AN, et al. Increased serum levels of YKL-40 in patients with inflammatory bowel disease. *Int J Colorectal Dis* 2003; 18: 254–9.
- Kucur M, Isman FK, Balci C, Onal B, Hacibekiroglu M, Ozkan F, et al. Serum YKL-40 levels and chitotriosidase activity as potential biomarkers in primary prostate cancer and benign prostatic hyperplasia. *Urol Oncol* 2008; 26: 47–52.
- Kuhle J, Pohl C, Mehling M, Edan G, Freedman MS, Hartung HP, et al. Lack of association between antimyelin antibodies and progression to multiple sclerosis. *N Engl J Med* 2007; 356: 371–8.
- Lehmensiek V, Süßmuth SD, Tauscher G, Brettschneider J, Felk S, Gillardon F, et al. Cerebrospinal fluid proteome profile in multiple sclerosis. *Mult Scler* 2007; 13: 840–9.
- McDonald WI, Compston A, Edan G, Goodkin D, Hartung HP, Lublin FD, et al. Recommended diagnostic criteria for multiple sclerosis: guidelines from the International Panel on the diagnosis of multiple sclerosis. *Ann Neurol* 2001; 50: 121–7.
- Milner R, Crocker SJ, Hung S, Wang X, Frausto RF, del Zoppo GJ. Fibronectin- and vitronectin-induced microglial activation and matrix metalloproteinase-9 expression is mediated by integrins alpha5beta1 and alphavbeta5. *J Immunol* 2007; 178: 8158–67.
- Mitsuhashi A, Matsui H, Usui H, Nagai Y, Tate S, Unno Y, et al. Serum YKL-40 as a marker for cervical adenocarcinoma. *Ann Oncol* 2009; 20: 71–7.
- Niino M, Kikuchi S, Fukazawa T, Yabe I, Tashiro K. No association of vitamin D-binding protein gene polymorphisms in Japanese patients with MULTIPLE SCLEROSIS. *J Neuroimmunol* 2002; 127: 177–9.
- Noben JP, Dumont D, Kwasnikowska N, Verhaert P, Somers V, Hupperts R, et al. Lumbar cerebrospinal fluid proteome in multiple sclerosis: characterization by ultrafiltration, liquid chromatography, and mass spectrometry. *J Proteome Res* 2005; 5: 1647–57.
- Pasterkamp RJ, Peschon JJ, Spriggs MK, Kolodkin AL. Semaphorin 7A promotes axon outgrowth through integrins and MAPKs. *Nature* 2003; 424: 398–405.
- Pelayo R, Tintoré M, Montalban X, Rovira A, Espejo C, Reindl M, et al. Antimyelin antibodies with no progression to multiple sclerosis. *N Engl J Med* 2007; 356: 426–8.
- Poser CM, Paty DW, Scheinberg L, McDonald WI, Davis FA, Ebers GC, et al. New diagnostic criteria for multiple sclerosis: guidelines for research protocols. *Ann Neurol* 1983; 13: 227–31.
- Qin Z, Qin Y, Liu S. Alteration of DBP levels in CSF of patients with MULTIPLE SCLEROSIS by proteomics analysis. *Cell Mol Neurobiol* 2009; 29: 203–10.
- Recklies AD, Ling H, White C, Bernier SM. Inflammatory cytokines induce production of CHI3L1 by articular chondrocytes. *J Biol Chem* 2005; 280: 41213–21.
- Renkema GH, Boot RG, Au FL, Donker-Koopman WE, Strijland A, Muijsers AO, et al. Chitotriosidase, a chitinase, and the 39-kDa human cartilage glycoprotein, a chitin-binding lectin, are homologues of family 18 glycosyl hydrolases secreted by human macrophages. *Eur J Biochem* 1998; 251: 504–9.
- Sotgiu S, Barone R, Arru G, Fois ML, Pugliatti M, Sanna A, et al. Intrathecal chitotriosidase and the outcome of multiple sclerosis. *Mult Scler* 2006; 12: 551–7.
- Stoop MP, Dekker LJ, Titulaer MK, Burgers PC, Sillevius Smitt PA, Luijckx TM, et al. Multiple sclerosis-related proteins identified in cerebrospinal fluid by advanced mass spectrometry. *Proteomics* 2008; 8: 1576–85.
- Tintoré M, Rovira A, Río J, Nos C, Grivé E, Téllez N, et al. Baseline MRI predicts future attacks and disability in clinically isolated syndromes. *Neurology* 2006; 67: 968–72.
- Tintoré M, Rovira A, Río J, Tur C, Pelayo R, Nos C, et al. Do oligoclonal bands add information to MRI in first attacks of multiple sclerosis? *Neurology* 2008; 70: 1079–83.
- Tumani H, Lehmensiek V, Rau D, Guttmann I, Tauscher G, Mogel H, et al. CSF proteome analysis in clinically isolated syndrome (CIS): candidate markers for conversion to definite multiple sclerosis. *Neurosci Lett* 2009; 452: 214–17.
- van Bilsen JH, van Dongen H, Lard LR, van der Voort EI, Elferink DG, Bakker AM, et al. Functional regulatory immune responses against human cartilage glycoprotein-39 in health vs. proinflammatory responses in rheumatoid arthritis. *Proc Natl Acad Sci USA* 2004; 101: 17180–5.

- Vos K, Steenbakkens P, Miltenburg AM, Bos E, van Den Heuvel MW, van Hogezaand RA, et al. Raised human cartilage glycoprotein-39 plasma levels in patients with rheumatoid arthritis and other inflammatory conditions. *Ann Rheum Dis* 2000; 59: 544–8.
- Wassif WS, Sherwood RA, Amir A, Idowu B, Summers B, Leigh N, et al. Serum carnosinase activities in central nervous system disorders. *Clin Chim Acta* 1994; 225: 57–64.
- Wiese S, Reidegeld KA, Meyer HE, Warscheid B. Protein labelling by iTRAQ: A new tool for quantitative mass spectrometry in proteome research. *Proteomics* 2007; 7: 340–50.
- Wu WW, Wang G, Baek SJ, Shen RF. Comparative study of three proteomic quantitative methods, DIGE, cICAT, and iTRAQ, using 2D Gel- or LC-MALDI TOF/TOF. *J Proteome Res* 2006; 5: 651–8.
- You JS, Gelfanova V, Knierman MD, Witzmann FA, Wang M, Hale JE. The impact of blood contamination on the proteome of cerebrospinal fluid. *Proteomics* 2005; 5: 290–6.
- Zieske LR. A perspective on the use of iTRAQ™ reagent technology for protein complex and profiling studies. *J Exp Bot* 2006; 57: 1501–8.

***Chitinase 3-like 1 plasma levels are increased in patients with progressive forms of multiple sclerosis***

Cantó E, Reverter F, Morcillo-Suárez C, Matesanz F, Fernández O, Izquierdo G, Vandebroek K, Rodríguez-Antigüedad A, Urcelay E, Arroyo R, Otaegui D, Olascoaga J, Saiz A, Navarro A, Sanchez A, Domínguez C, Caminero A, Horga A, Tintoré M, Montalban X, Comabella M.

**Mult Scler. 2012 Jul;18(7):983-90.**



# Chitinase 3-like I plasma levels are increased in patients with progressive forms of multiple sclerosis

Multiple Sclerosis Journal  
18(7) 983–990  
© The Author(s) 2012  
Reprints and permissions:  
sagepub.co.uk/journalsPermissions.nav  
DOI: 10.1177/1352458511433063  
msj.sagepub.com  


E Cantó<sup>1</sup>, F Reverter<sup>2</sup>, C Morcillo-Suárez<sup>3,4</sup>, F Matesanz<sup>5</sup>,  
O Fernández<sup>6</sup>, G Izquierdo<sup>7</sup>, K Vandebroek<sup>8,9</sup>,  
A Rodríguez-Antigüedad<sup>10</sup>, E Urcelay<sup>11</sup>, R Arroyo<sup>12</sup>, D Otaegui<sup>13</sup>,  
J Olascoaga<sup>13</sup>, A Saiz<sup>14</sup>, A Navarro<sup>4,15</sup>, A Sanchez<sup>16</sup>,  
C Domínguez<sup>17,18</sup>, A Caminero<sup>1</sup>, A Horga<sup>1</sup>, M Tintoré<sup>1</sup>,  
X Montalban<sup>1</sup> and M Comabella<sup>1</sup>

## Abstract

**Background:** Chitinase 3-like I (CHI3LI) is upregulated in a wide variety of inflammatory conditions. Recent studies have pointed to a role of CHI3LI in multiple sclerosis (MS) pathogenesis.

**Objective:** The objective of this study was to investigate the role of plasma CHI3LI in MS clinical course and disease activity and to evaluate the effect of interferon-beta (IFN $\beta$ ) treatment on protein levels.

**Methods:** Plasma CHI3LI levels were determined by ELISA in 57 healthy controls (HC), 220 untreated MS patients [66 primary progressive MS patients (PPMS), 30 secondary progressive MS patients (SPMS), and 124 relapsing–remitting MS patients (RRMS), 94 during clinical remission and 30 during relapse], and 32 MS patients receiving IFN $\beta$  treatment. A polymorphism of the *CHI3LI* gene, rs4950928, was genotyped in 3274 MS patients and 3483 HC.

**Results:** Plasma CHI3LI levels were significantly increased in patients with progressive forms of MS compared with RRMS patients and HC. CHI3LI levels were similar between RRMS patients in relapse and remission. A trend towards decreased CHI3LI levels was observed in IFN $\beta$ -treated patients. Allele C of rs4950928 was significantly associated with PPMS patients and with higher plasma CHI3LI levels.

**Conclusions:** These findings point to a role of CHI3LI in patients with progressive forms of MS, particularly in those with PPMS.

## Keywords

chitinase 3-like I, multiple sclerosis, polymorphisms

Date received: 7th October 2011; revised: 14th November 2011; accepted: 22nd November 2011

<sup>1</sup>Centre d'Esclerosi Múltiple de Catalunya, CEM-Cat, Unitat de Neuroimmunologia Clínica, Hospital Universitari Vall d'Hebron (HUVH), Universitat Autònoma de Barcelona, Barcelona, Spain.

<sup>2</sup>Departament d'Estadística, Facultat de Biologia, Universitat de Barcelona, Barcelona, Spain.

<sup>3</sup>Institute of Evolutionary Biology (UPF-CSIC), PRBB, Barcelona, Spain.

<sup>4</sup>National Institute for Bioinformatics, Universitat Pompeu Fabra, Barcelona, Spain.

<sup>5</sup>Instituto de Parasitología y Biomedicina López Neyra, Consejo Superior de Investigaciones Científicas, Granada, Spain.

<sup>6</sup>Servicio de Neurología, Instituto de Neurociencias Clínicas, Hospital Regional Universitario Carlos Haya, Málaga, Spain.

<sup>7</sup>Unidad de Esclerosis Múltiple, Hospital Virgen Macarena, Sevilla, Spain.

<sup>8</sup>Neurogenomik Group, Universidad del País Vasco (UPV/EHU), Leioa, Spain.

<sup>9</sup>IKERBASQUE, Basque Foundation for Science, Bilbao, Spain.

<sup>10</sup>Servicio de Neurología, Hospital de Basurto, Bilbao, Spain.

<sup>11</sup>Servicio de Inmunología, Hospital Clínico San Carlos, Instituto de Investigación Sanitaria San Carlos (IdISSC), Madrid, Spain.

<sup>12</sup>Unidad de Esclerosis Múltiple, Servicio de Neurología, Hospital Clínico San Carlos, Instituto de Investigación Sanitaria San Carlos (IdISSC), Madrid, Spain.

<sup>13</sup>Multiple Sclerosis Unit, Biodonostia Institute, San Sebastián, Spain.

<sup>14</sup>Service of Neurology, Hospital Clinic and Institut d'Investigació Biomèdica August Pi i Sunyer (IDIBAPS), Universitat de Barcelona, Spain.

<sup>15</sup>Institució Catalana de Recerca i Estudis Avançats (ICREA), Barcelona, Spain.

<sup>16</sup>Unitat d'Estadística i Bioinformàtica, Institut de Recerca, HUVH, Barcelona, Spain.

<sup>17</sup>Molecular Biology and Biochemistry Research Center for Nanomedicine, Hospital Universitari Vall d'Hebron (HUVH), Barcelona, Spain.

<sup>18</sup>Centre for Biomedical Research on Rare Diseases (CIBERER), Instituto de Salud Carlos III, Barcelona, Spain.

## Corresponding author:

Manuel Comabella; Unitat de Neuroimmunologia Clínica, CEM-Cat. Edif. EU1 2ª planta, Hospital Universitari Vall d'Hebron. Pg. Vall d'Hebron 119-129, 08035 Barcelona, Spain.  
Email: manuel.comabella@vhir.org

## Introduction

The 18 glycosyl hydrolase family of chitinases is a gene family that codes for chitinases and chitinase-like proteins and include the acidic mammalian chitinase AMCase and chitotriosidase, which possess enzymatic activity, and chitinase 3-like 1 (CHI3L1), YKL-39, oviductin and stabilin-1-interacting chitinase-like protein, which lack enzymatic activity.<sup>1</sup>

CHI3L1, also known as YKL-40, is produced by a broad spectrum of cells including macrophages, neutrophils, chondrocytes, synovial cells, osteoblasts and vascular smooth muscle cells,<sup>2-4</sup> but its physiological role remains unclear and the identity of its ligand is not known yet. CHI3L1 is a normal component of human serum that is upregulated in several human cancers and non-neoplastic disorders characterized by chronic inflammation such as rheumatoid arthritis and sarcoidosis, where serum CHI3L1 levels have been found to influence prognosis and disease severity.<sup>5-8</sup> CHI3L1 has also been implicated in the pathogenesis of multiple sclerosis (MS). In a previous study by our group,<sup>9</sup> cerebrospinal fluid (CSF) CHI3L1 levels were found to be associated with conversion to MS in patients presenting with a clinically isolated syndrome (CIS). In these patients, increased CSF levels of CHI3L1 correlated with shorter time to clinically definite MS and higher degree of brain inflammation and lesion burden measured by MRI.<sup>9</sup> In a more recent study,<sup>10</sup> CSF CHI3L1 levels were reported to be higher in patients with relapsing–remitting MS (RRMS) compared with patients with secondary progressive MS (SPMS) and controls, suggesting that CHI3L1 levels may differ between MS clinical forms.

Based on these findings, we aimed to expand our knowledge of the role of CHI3L1 in MS pathogenesis by measuring plasma CHI3L1 levels in a large cohort of MS patients with representation of several clinical forms and activity phases of the disease, and also including patients receiving treatment with interferon-beta (IFN $\beta$ ).

## Materials and methods

### Patients

Fifty-seven healthy controls and 220 patients with clinically definite MS who had not received treatment with corticosteroids in the 3 months before blood drawing were included in the study. The study was approved by the Ethics Committee of Vall d'Hebron University Hospital and subjects involved in the study gave written informed consent.

### Plasma CHI3L1 levels and MS clinical course

In order to evaluate plasma levels of CHI3L1 in patients with different clinical phases of MS, disease course of individual patients was labelled as RRMS ( $n = 94$ ), SPMS

( $n = 30$ ), or primary progressive (PPMS;  $n = 66$ ) according to the Lublin and Reingold classification.<sup>11</sup> None of these patients received previous treatment with IFN $\beta$  or immunosuppressive therapies.

### CHI3L1 levels in plasma during clinical exacerbations

To investigate whether plasma CHI3L1 levels are modified during acute relapses, plasma CHI3L1 levels were measured in patients whose blood was collected during clinical remission ( $n = 94$ ) and at the time of a clinical exacerbation ( $n = 30$ ), defined by the appearance of new neurological symptoms or worsening of pre-existing neurological symptoms attributable to MS which persisted for over 24 hours.

Table 1 summarizes the main demographic and baseline clinical characteristics of MS patients and healthy controls included in the study.

### Effect of treatment with IFN $\beta$ in plasma levels of CHI3L1

Plasma CHI3L1 levels were measured in 32 RRMS patients that had been treated with IFN $\beta$  for a median time of 8.7 months (range: 5–10 months). Nineteen patients were treated with subcutaneous IFN $\beta$ -1b, 7 patients with intramuscular IFN $\beta$ -1a, and 6 patients with subcutaneous IFN $\beta$ -1a.

### Plasma CHI3L1 levels and clinical and radiological variables

Levels of plasma CHI3L1 were correlated with clinical variables including disease duration, number of relapses in the previous two years, and the Expanded Disability Status Scale (EDSS) at the time of blood sampling. In a subgroup of PPMS patients ( $N = 50$ ), CHI3L1 levels were also correlated with radiological variables such as T2-weighted lesion load (T2LL), T1-weighted lesion load (T1LL), and brain parenchymal fraction (BPF).

### Determination of CHI3L1 levels in plasma

Peripheral blood was collected by standard venipuncture into vacuum tubes with EDTA and plasma was subsequently isolated by centrifugation and stored frozen at  $-80^{\circ}\text{C}$  until used. Plasma CHI3L1 levels were determined using a commercially available enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) kit (METRA YKL-40 ELISA kit, Quidel Corporation, San Diego, CA, USA) according to the manufacturers' recommendations. Undiluted plasma samples were measured in duplicate and the intra-assay and inter-assay coefficients of variation were 2.1% and 11.9%, respectively.

**Table 1.** Summary of demographic and clinical characteristics of MS patients and HC included in the study.

Characteristics	RRMS			SPMS	PPMS	HC
	in remission	in relapse I	FN-treated			
<i>n</i>	94	30	32	30	66	57
Female/male (% women)	66/28 (70.2)	21/9 (30.0)	22/10 (68.7)	20/10 (66.7)	32/34 (48.5)	40/17 (70.2)
Age (years) <sup>a</sup>	37.0 (9.1)	31.4 (8.8)	30.7 (7.4)	49.2 (10.4)	49.2 (9.4)	37.1 (11.5)
Duration of disease (years) <sup>a</sup>	6.2 (5.8)	5.4 (4.8)	6.4 (6.6)	14.6 (9.4)	11.3 (7.3)	–
EDSS <sup>b</sup>	2.0 (1.5–2.5)	3.0 (2.5–3.5)	2.0 (1.5–3.0)	4.5 (4.0–6.0)	6.0 (4.5–6.5)	–
Number of relapses in the 2 previous years <sup>a</sup>	2.0 (1.2)	1.8 (1.9)	2.4 (1.2)	0.5 (0.7)	–	–

<sup>a</sup>Data are expressed as mean (SD).

<sup>b</sup>Data are expressed as median (interquartile range).

EDSS, Expanded Disability Status Scale; RRMS, relapsing–remitting multiple sclerosis; SPMS, secondary progressive multiple sclerosis; PPMS, primary progressive multiple sclerosis; IFN, interferon; HC, healthy controls; MS, multiple sclerosis.

### CHI3L1 genotyping

Genomic DNA was extracted from whole blood using standard methods and rs4950928 was genotyped in a Spanish cohort comprising 3274 MS patients and 3483 healthy controls. DNA samples from cases and controls were collected from four geographical regions of Spain: East [Barcelona/CEM-Cat cohort, comprising 814 controls (mean age: 38.7 years; female/male ratio: 1.1) and 803 cases (mean age: 40.4 years; female/male ratio: 1.7; % PPMS: 12.2); and Barcelona/Clinic cohort, comprising 213 controls (mean age: not available; female/male ratio: 1.9) and 204 cases (mean age: 45.5 years; female/male ratio: 1.9; % PPMS: 5.4)]; South [Andalucía cohort, comprising 1216 controls (mean age: 35.5 years; female/male ratio: 2.5) and 1044 cases (mean age: 39.8; female/male ratio: 2.2; % PPMS: 1)]; Center [Madrid cohort, comprising 534 controls (mean age: not available; female/male ratio: 1.8) and 497 cases (mean age: 45.0 years; female/male ratio: 1.9; % PPMS: 13)]; North [Bilbao cohort, comprising 459 controls (mean age: not available; female/male ratio: 2.6) and 514 cases (mean age: 40.7 years; female/male ratio: 2.6; % PPMS: 10.7)]; and San Sebastian cohort, comprising 213 controls (mean age: 50.7 years; female/male ratio: 1.4) and 212 cases (mean age: 42.9 years; female/male ratio: 1.5; % PPMS: 3.3)].

Except for the Barcelona/CEM-Cat cohort, rs4950928 genotyping was performed using the iPLEX™ Sequenom MassARRAY platform in the Spanish National Genotyping Center (CEGEN, Santiago de Compostela, <http://www.cegen.com>). Two CEPH trios were genotyped as part of the quality control. Genotypes from these samples confirmed the absence of Mendelian inconsistencies and corresponded with those deposited in HapMap. On the other hand, a random 10% of samples were subjected to re-genotyping. Final data were concordant with an average accuracy of 99.9%.

The Barcelona/CEM-Cat cohort was genotyped by means of the 5' nuclease assay technology for allelic discrimination using fluorogenic TaqMan® probes.

### Statistical analysis

Statistical analysis of plasma CHI3L1 levels was performed by using the SPSS 17.0 package (SPSS Inc, Chicago, IL) for Microsoft Windows. A one-way analysis of covariance (ANCOVA) was used to compare CHI3L1 levels between healthy controls and the whole MS group, and between patients with different clinical forms of MS (RRMS patients in clinical remission, SPMS patients, and PPMS patients). Given that in our study mean age was significantly different between healthy controls and MS patients (analysis of variance [ANOVA]  $p$ -value =  $2.7 \times 10^{-18}$ ) and age correlated with CHI3L1 levels (Spearman rank correlation coefficient: 0.368,  $p$ -value =  $4.5 \times 10^{-9}$ ), this variable was included in the model as a covariate. A Mann–Whitney U-test was used to test for significant differences in CHI3L1 levels between RRMS patients during clinical exacerbations and during remission. Comparisons of CHI3L1 levels before and after IFN $\beta$  treatment were assessed by a Wilcoxon signed ranks test. Partial correlations controlling for age were used to assess the relationship between CHI3L1 levels and clinical and radiological variables. Bonferroni correction was used to correct the alpha level for multiple comparisons.

To investigate potential associations between single nucleotide polymorphism (SNP) rs4950928 and the disease, allele frequencies were compared between healthy controls and the whole MS group, and between different clinical forms of the disease taking into account possible stratification due to different population origin using the Cochran–Mantel–Haenszel test. Data processing, missingness and Hardy–Weinberg analysis were performed with SNPator (<http://www.snpator.org>).<sup>12</sup> A Cochran–Mantel–Haenszel test was performed using plink (<http://pnu.gmgh.harvard.edu/~purcell/plink/>).<sup>13</sup> Differences between rs4950928 genotypes and CHI3L1 levels and time to conversion to clinically definite MS were assessed by a Mann–Whitney U-test.



## Results

### Plasma CHI3L1 levels are increased in patients with progressive forms of the disease

When plasma protein levels were compared between healthy controls and the whole MS group, mean CHI3L1 levels were significantly higher in MS patients than in healthy controls ( $p = 0.019$ ; Figure 1). When MS patients were further classified based on the clinical form, plasma CHI3L1 levels were significantly increased in PPMS patients compared with RRMS patients ( $p = 0.040$ ) and healthy controls ( $p = 0.004$ ), and in SPMS patients when compared with the control group ( $p = 0.029$ ) (Figure 1). No significant differences in the mean plasma CHI3L1 levels were observed between RRMS patients and healthy controls ( $p = 1.000$ ; Figure 1).

### Plasma CHI3L1 levels are not altered during relapses and are modulated by treatment with IFN $\beta$

We next investigated whether CHI3L1 levels were modified at the time of acute disease exacerbations by comparing protein levels in patients during relapses and patients during clinical remission. As shown in Figure 2A, plasma CHI3L1 levels were similar between both groups of patients ( $p = 0.735$ ). When the effect of IFN $\beta$  treatment was evaluated by comparing plasma CHI3L1 levels in MS patients before and after treatment, a trend towards decreased protein levels was observed during treatment ( $p = 0.045$ ) (Figure 2B).

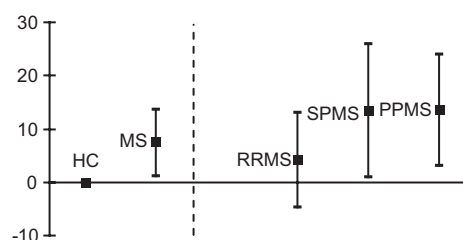
### CHI3L1 gene is associated with the disease in patients with PPMS

Inasmuch as plasma CHI3L1 levels were found to be significantly increased in MS patients compared with controls,

A

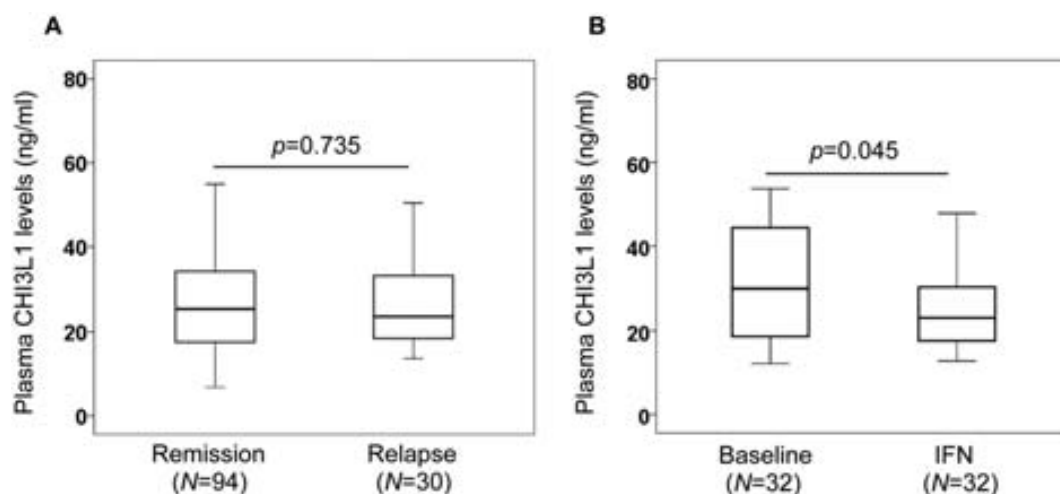
Group	Dif. mean (ng/ml)	95% CI dif. (ng/ml)	p-values*
MS	7.465	1.2 to 13.7	$p = 0.019$
RRMS in clinical remission	4.183	-4.7 to 13.0	$p = 1.000$
SPMS	13.375	0.9 to 25.9	$p = 0.029$
PPMS	13.523	3.0 to 24.0	$p = 0.004$

B



**Figure 1.** Differences of the mean plasma CHI3L1 levels and 95% confidence intervals of the difference in the whole MS group, RRMS patients in clinical remission, SPMS patients, and PPMS patients relative to healthy controls. (A) Table containing the difference values. (B) Illustrative graph representing the difference values in the whole MS group, MS subtypes, and healthy controls. The y-axis shows differences of mean plasma CHI3L1 levels in ng/ml.

Dif. mean: adjusted differences of the mean in (ng/ml). 95% CI dif.: 95% confidence intervals of the differences in ng/ml. MS: whole MS group. RRMS: relapsing–remitting multiple sclerosis. SPMS: secondary progressive multiple sclerosis. PPMS: primary progressive multiple sclerosis. \*Corrected p-values after Bonferroni correction.



**Figure 2.** Comparisons of plasma CHI3L1 levels between RRMS patients in clinical remission and RRMS patients during relapse (A), and between untreated and IFN $\beta$ -treated MS patients (B). Baseline: indicates CHI3L1 levels determined before treatment. IFN: indicates CHI3L1 levels determined in the same group of patients after 8 months of treatment with IFN $\beta$ . Boxes represent the 75th and 25th percentiles divided horizontally by the median. Whiskers are drawn to the nearest value not beyond a standard span (1.5 $\times$  and 3 $\times$  the interquartile range) from the 75th and 25th percentiles.



we investigated whether rs4950928, a functional polymorphism located in the promoter region of the *CHI3L1* gene, was associated with the disease. As part of a multicentric collaborative study, SNP rs4950928 was genotyped in a large cohort of Spanish MS patients and healthy controls, as described in the Methods section. The overall genotype success was 98.1% and SNP rs4950928 was in Hardy–Weinberg equilibrium ( $p = 0.61$ ). Interestingly, combined analysis of the study cohorts revealed a statistically significant association of allele C with PPMS patients when compared with relapse-onset patients [odds ratio (OR) 1.4 (95% CI 1.1–1.8),  $p$ -value = 0.0181] and healthy controls [OR 1.4 (95% CI 1.1–1.8),  $p$ -value = 0.0182] (Table 2). Allele frequencies were similarly distributed between the whole MS group and the healthy control group ( $p = 0.6962$ ), and between relapse-onset MS patients and healthy controls ( $p = 0.9727$ ) (Table 2).

### Plasma *CHI3L1* levels are increased in allele C carriers for SNP rs4950928

In the Barcelona/CEM-Cat cohort, both plasma *CHI3L1* levels and SNP genotyping were available for 50 healthy controls and 138 MS patients (57 RRMS patients in clinical remission, 11 SPMS patients, 50 PPMS patients, and 20 MS patients during relapses). To evaluate whether *CHI3L1* genotypes were associated with changes in plasma protein levels, *CHI3L1* levels were compared between CC homozygotes, CG heterozygotes, and GG homozygotes for rs4950928 in the whole group of individuals with available samples. As shown in Figure 3A, the presence of allele C was associated with increased *CHI3L1* levels, and differences reached statistical significance for CC homozygotes when compared with CG heterozygotes ( $p = 3.8 \times 10^{-6}$ ) and GG homozygotes ( $p = 0.003$ ), and also for CG heterozygotes when compared with GG homozygotes ( $p = 0.016$ ). Further stratification of patients into different clinical forms resulted in similar trends (Figure 3B).

### Association between *CHI3L1* and clinical and radiological variables

As shown in Table 3, in SPMS and PPMS patients no statistically significant correlations were observed between

plasma *CHI3L1* levels and clinical variables such as disease duration, number of relapses in the previous 2 years, and EDSS score at the time of blood collection. In the whole MS group and in RRMS patients, trends towards significant positive correlations were found between plasma *CHI3L1* levels and EDSS scores ( $r = 0.19$ ;  $p = 0.011$ ) and number of relapses in the previous 2 years ( $r = 0.24$ ,  $p = 0.024$ ), respectively, although these associations did not reach the threshold for statistical significance after Bonferroni correction (Table 3). In the PPMS group, no significant linear associations were observed between plasma *CHI3L1* levels and radiological variables such as T1 and T2 lesion loads, and BPF (Table 3).

Insomuch as in a previous study<sup>9</sup> *CHI3L1* levels measured in the cerebrospinal fluid were found to correlate with the time to conversion to clinically definite MS in CIS patients, we also investigated potential associations between rs4950928 genotypes and time to a second relapse after a CIS in a subgroup of 584 patients with relapse-onset MS (429 CC homozygotes / 142 CG heterozygotes / 13 GG homozygotes). Time to conversion to clinically definite MS [mean values (standard deviation)] was 3.0 years (3.8) in CC homozygotes, 3.1 years (4.5) in CG heterozygotes, and 1.7 years (1.9) in GG homozygotes, and differences were not statistically significant ( $p > 0.05$  for all comparisons between genotypes).

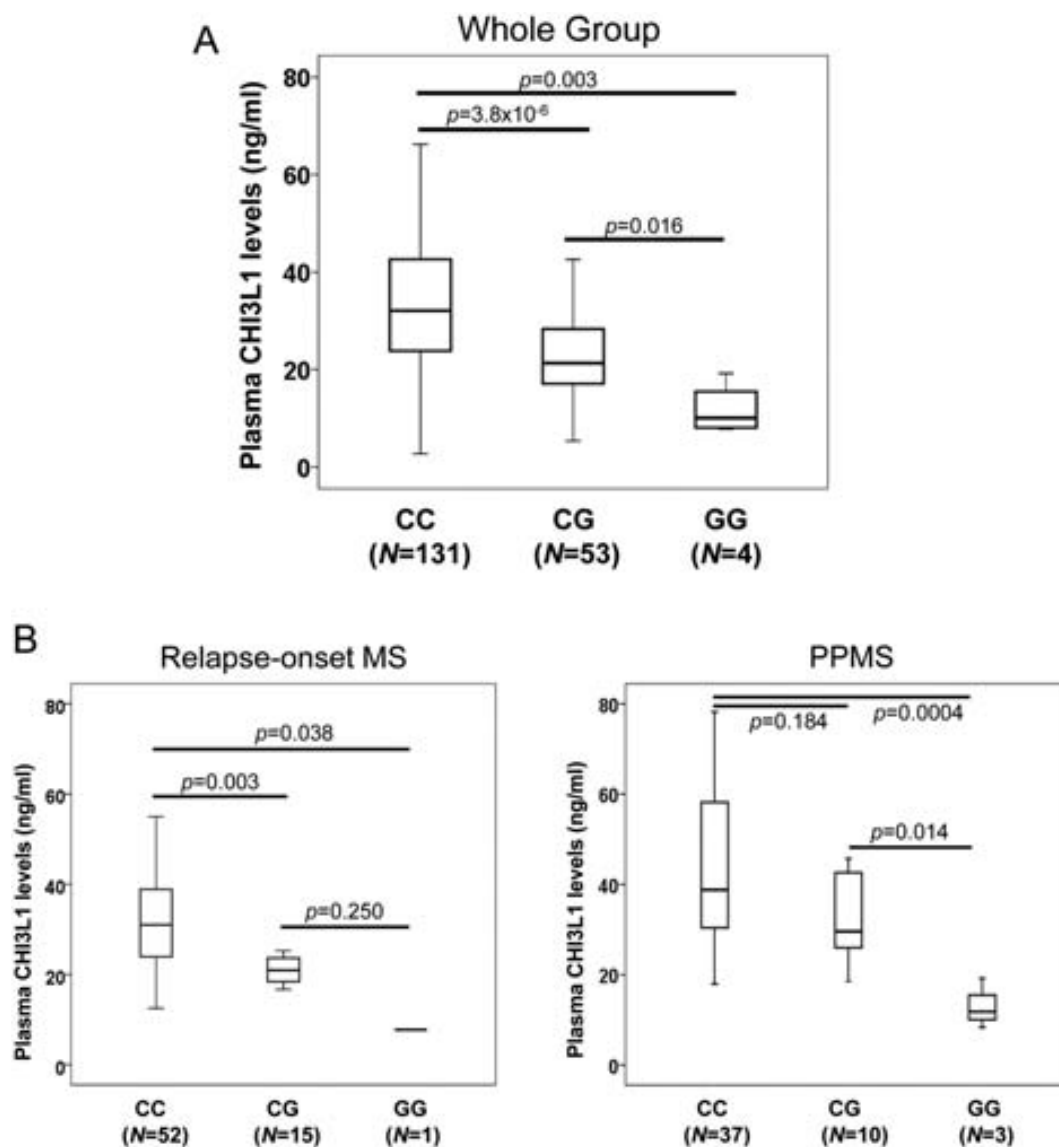
## Discussion

In order to investigate the role of *CHI3L1* in MS clinical course, we measured protein levels in plasma samples from a large cohort of MS patients with representation of different clinical forms of the disease. Given the influence of age in plasma *CHI3L1* levels, the analysis was adjusted for this variable in order to control its confounding effect. Patients with progressive forms of MS, i.e. SPMS and PPMS, were found to have the highest plasma levels of *CHI3L1* compared with RRMS patients and HC, whereas no differences were observed between the latter two groups. Considering that *CHI3L1* is upregulated in disorders characterized by chronic inflammation,<sup>5,7</sup> our findings of higher *CHI3L1* levels in patients with progressive and less inflammatory clinical forms of the disease are somewhat unexpected. Furthermore, in a recent study by Correale and Fiol,<sup>10</sup>

**Table 2.** Results of the association analysis between single nucleotide polymorphism rs4950928 and MS.

Group comparisons	Risk allele	$p$ -value	Odds ratio	95% CI
MS versus HC	C	0.6962	1.0	1.0–1.1
Relapse-onset versus HC	G	0.9727	1.0	0.9–1.1
PPMS versus HC	C	<b>0.0182</b>	1.4	1.1–1.8
PPMS versus relapse-onset	C	<b>0.0181</b>	1.4	1.1–1.8

Relapse-onset includes patients with both relapsing–remitting and secondary progressive MS. Significant  $p$ -values are shown in bold. MS, multiple sclerosis; PPMS, primary progressive multiple sclerosis; HC, healthy controls; 95% CI, 95% confidence intervals.



**Figure 3.** Boxplots representing plasma CHI3L1 levels among CC homozygotes, CG heterozygotes, and GG homozygotes for SNP rs4950928 located in the promoter region of the *CHI3L1* gene, in all individuals (A) and in MS patients stratified by the clinical form (B). Whole group: refers to healthy controls and all untreated MS patients. Relapse-onset MS: includes patients with both relapsing–remitting and secondary progressive MS. PPMS: primary progressive multiple sclerosis.

**Table 3.** Partial correlations between plasma levels of CHI3L1 and clinical and radiological parameters.

Characteristics*	MS <i>r</i> ( <i>p</i> )	RRMS <i>r</i> ( <i>p</i> )	SPMS <i>r</i> ( <i>p</i> )	PPMS <i>r</i> ( <i>p</i> )
Duration of disease	0.05 (0.480)	0.02 (0.838)	−0.18 (0.378)	0.04 (0.764)
Number of relapses <sup>a</sup>	0.16 (0.081)	0.24 (0.024)	0.18 (0.386)	–
EDSS	0.19 (0.011)	0.06 (0.581)	0.01 (0.957)	0.10 (0.416)
T2LL <sup>b</sup>	–	–	–	0.04 (0.773)
T1LL <sup>b</sup>	–	–	–	0.05 (0.723)
BPF <sup>b</sup>	–	–	–	−0.03 (0.824)

\*Analysis was restricted to the Barcelona/CEM-Cat cohort.

<sup>a</sup>Number of relapses in the two previous years.

<sup>b</sup>Data were available in a subgroup of 50 PPMS patients.

MS, the whole multiple sclerosis group; RRMS, relapsing–remitting multiple sclerosis in remission; SPMS, secondary progressive multiple sclerosis; PPMS, primary progressive multiple sclerosis; T2LL, T2-weighted lesion load; T1LL, T1-weighted lesion load; BPF, brain parenchymal fraction; *r*, partial correlation coefficient; *p*, *p*-value.

CHI3L1 levels measured in CSF samples were increased in RRMS patients compared with SPMS, although differences between these two groups were lost when protein levels were measured in serum samples. In the Correale and Fiol study,<sup>10</sup> the lack of inclusion of patients with PPMS did not allow for direct comparisons in the CSF and serum CHI3L1 levels between PPMS and other clinical forms of the disease. Whereas the discrepancies observed between the studies may well reflect the type of biological sample used to measure protein levels, the findings of increased plasma CHI3L1 levels in patients with progressive forms of the disease is further supported by the allelic association observed between SNP rs4950928 and PPMS patients.

In our study, genetic association was driven by the major allele C. Given that SPMS is the natural evolution of RRMS, potential genetic associations restricted to the SPMS clinical form cannot be evaluated, and hence RRMS and SPMS are usually grouped together for association purposes as relapse-onset MS. Despite the inclusion of SPMS patients, allelic associations became statistically significant when PPMS patients were compared not only with HC but also with relapse-onset MS patients. Genetic findings are in agreement with the ELISA results showing higher plasma CHI3L1 levels in the PPMS group compared with the RRMS and HC groups.

rs4950928 is a functional polymorphism located in the promoter region of the CHI3L1 which is known to correlate with serum protein levels.<sup>14-16</sup> This association between CHI3L1 genotype and phenotype was also observed in our study, and the presence of allele C was clearly associated with higher plasma proteins levels. As it has been previously reported for other diseases,<sup>17</sup> the above-mentioned genotype-related differences were not limited to the pathological condition and were observed in MS patients regardless of the clinical form and also in the HC population.

The results of similar plasma CHI3L1 levels between MS patients whose blood was extracted at the time of a clinical exacerbation and patients in clinical remission do not seem to support a role of plasma CHI3L1 in acute disease activity. Whereas in a previous study by our group<sup>9</sup> CSF CHI3L1 levels measured at the time of the first relapse or CIS were higher in patients who later converted to MS compared with those who did not convert, CHI3L1 measurements in serum samples collected from the same patients failed to show such differences. Similarly, in the Correale and Fiol study,<sup>10</sup> differences between RRMS and SPMS patients in CHI3L1 were restricted to CSF and not detected in serum samples. Altogether these findings suggest that variations in the CHI3L1 levels due to inflammation are possibly better captured in CSF than in serum and plasma samples.

Finally, to investigate whether plasma CHI3L1 levels may be modulated by current MS therapies, protein levels were also measured in a subgroup of MS patients receiving treatment with IFN $\beta$ . Although the difference was not

statistically significant, IFN $\beta$  tended to decrease protein levels after a median treatment time of 8 months, finding that suggests that the beneficial effects of IFN $\beta$  in MS may be mediated through changes in plasma CHI3L1 levels. In this context, it will be interesting to explore in future studies whether CSF levels of CHI3L1 are also modulated by IFN $\beta$ .

In summary, our study supports a role of CHI3L1 in the MS clinical course but not in acute disease activity. In this setting, whereas CSF may be more suitable to capture changes in CHI3L1 levels secondary to inflammation, plasma CHI3L1 levels discriminated well between patients with progressive forms of MS and patients with RRMS and HC. The association observed between a functional polymorphism of the *CHI3L1* gene and the PPMS group is in line with the higher plasma CHI3L1 levels observed in PPMS patients, and points to a role of CHI3L1 in this particular group of patients. However, despite the increased plasma CHI3L1 levels observed in patients with progressive forms of the disease, protein levels did not correlate with clinical variables such as the EDSS or with radiological parameters such as the BPF. Related to the latter point, the fact that neuroradiological information was only available for the PPMS group is a limitation of the study.

Although more studies are needed, our findings suggest that plasma CHI3L1 levels may be used as biomarkers of the progressive forms of MS.

## Funding

This work was supported by grants from the 'Fondo de Investigación Sanitaria' (FIS; grant numbers PI09/00788 and CP10/00526), Ministry of Science and Innovation, Spain. EC is supported by a contract from the FIS (contract number FI 09/00705), Ministry of Science and Innovation, Spain. The authors thank the 'Red Española de Esclerosis Múltiple (REEM)' sponsored by the 'Fondo de Investigación Sanitaria' (FIS), Ministry of Science and Innovation, Spain, and the 'Ajuts per donar Suport als Grups de Recerca de Catalunya' (SGR 2005-1081), sponsored by the 'Agència de Gestió d'Ajuts Universitaris i de Recerca' (AGAUR), Generalitat de Catalunya, Spain.

## Conflict of interest statement

None declared.

## References

1. Kzhyshkowska J, Gratchev A and Goerd S. Human chitinases and chitinase-like proteins as indicators for inflammation and cancer. *Biomark Insights* 2007; 2: 128–146.
2. Hakala BE, White C and Recklies AD. Human cartilage gp-39, a major secretory product of articular chondrocytes and synovial cells, is a mammalian member of a chitinase protein family. *J Biol Chem* 1993; 268: 25803–25810.
3. Kawada M, Hachiya Y, Arihiro A and Mizoguchi E. Role of mammalian chitinases in inflammatory conditions. *Keio J Med* 2007; 56: 21–27.

4. Johansen JS. Studies on serum YKL-40 as a biomarker in diseases with inflammation, tissue remodelling, fibroses and cancer. *Dan Med Bull* 2006; 53: 172–209.
5. Johansen JS, Stoltenberg M, Hansen M, et al. Serum YKL-40 concentrations in patients with rheumatoid arthritis: relation to disease activity. *Rheumatology (Oxford)* 1999; 38: 618–626.
6. Johansen JS, Drivsholm L, Price PA and Christensen IJ. High serum YKL-40 level in patients with small cell lung cancer is related to early death. *Lung Cancer* 2004; 46: 333–340.
7. Johansen JS, Milman N, Hansen M, Garbarsch C, Price PA and Graudal N. Increased serum YKL-40 in patients with pulmonary sarcoidosis—a potential marker of disease activity? *Respir Med* 2005; 99: 396–402.
8. Mitsunashi A, Matsui H, Usui H, et al. Serum YKL-40 as a marker for cervical adenocarcinoma. *Ann Oncol* 2009; 20: 71–77.
9. Comabella M, Fernandez M, Martin R, et al. Cerebrospinal fluid chitinase 3-like 1 levels are associated with conversion to multiple sclerosis. *Brain* 2010; 133: 1082–1093.
10. Correale J and Fiol M. Chitinase effects on immune cell response in neuromyelitis optica and multiple sclerosis. *Mult Scler* 2010; 17: 521–531.
11. Lublin FD and Reingold SC. Defining the clinical course of multiple sclerosis: results of an international survey. National Multiple Sclerosis Society (USA) Advisory Committee on Clinical Trials of New Agents in Multiple Sclerosis. *Neurology* 1996; 46: 907–911.
12. Morcillo-Suarez C, Alegre J, Sangros R, et al. SNP analysis to results (SNPator): a web-based environment oriented to statistical genomics analyses upon SNP data. *Bioinformatics* 2008; 24: 1643–1644.
13. Purcell S, Neale B, Todd-Brown K, et al. PLINK: a tool set for whole-genome association and population-based linkage analyses. *Am J Hum Genet* 2007; 81: 559–575.
14. Kruit A, Grutters JC, Ruven HJ, van Moorsel CC and van den Bosch JM. A CHI3L1 gene polymorphism is associated with serum levels of YKL-40, a novel sarcoidosis marker. *Respir Med* 2007; 101: 1563–1571.
15. Zhao X, Tang R, Gao B, et al. Functional variants in the promoter region of Chitinase 3-like 1 (CHI3L1) and susceptibility to schizophrenia. *Am J Hum Genet* 2007; 80: 12–18.
16. Ober C, Tan Z, Sun Y, et al. Effect of variation in CHI3L1 on serum YKL-40 level, risk of asthma, and lung function. *N Engl J Med* 2008; 358: 1682–1691.
17. Nielsen KR, Steffensen R, Boegsted M, et al. Promoter polymorphisms in the chitinase 3-like 1 gene influence the serum concentration of YKL-40 in Danish patients with rheumatoid arthritis and in healthy subjects. *Arthritis Res Ther* 2011; 13: R109.