

Universidad autónoma de Barcelona (UAB)
Departamento de inmunología

**IMPLICACIÓN DE LA VÍA DEL
TLR4, LA VÍA DE LOS
INTERFERONES DE TIPO I Y
LOS MONOCITOS EN LA
RESPUESTA CLÍNICA A
INTERFERON-BETA EN
PACIENTES CON ESCLEROSIS
MÚLTIPLE**

TESIS DOCTORAL

Marta Fernández Bustamante, 2014

Servei de Neurologia / Neuroimmunologia.
Centre d'Esclerosi Múltiple de Catalunya, Cemcat.
Hospital Universitari Vall d'Hebron i
Institut de Recerca (HUVH), Barcelona, España

Tesis doctoral

Implicación de la vía del TLR4 y de la vía de los IFNs de tipo I y los monocitos en la respuesta clínica a interferón-beta en pacientes con esclerosis múltiple

Marta Fernández Bustamante

Directores: Manuel Comabella y Xavier Montalbán

Tutora: Dolores Jaraquemada

Universidad Autónoma de Barcelona (UAB). Departamento de Inmunología.
Institut de Recerca Vall d'Hebron. Hospital Vall d'Hebron. Servicio de
Neurologia-Neuroimmunologia. Centro d'Esclerosis Múltiple de Catalunya
(Cemcat)



“La ciencia es incapaz de resolver los últimos misterios de la naturaleza, porque en el último análisis nosotros mismos somos parte de la naturaleza, es decir, del misterio que tratamos de resolver”

Max Planck

AGRADECIMIENTOS

Ya se va cerrando el ciclo. Me siento ambigua frente a este cambio. Por un lado, estoy deseando que ocurra, que acabe y que venga algo nuevo, diferente y por qué no, mejor. Por otro lado, me entra melancolía y un puntito de miedo de qué vendrá con el futuro. Y ahora, en este momento, me dispongo a agradecer a las personas que han pasado por mi vida en estos cinco-seis años. Y cómo empezar? Y cómo acabar?

Siempre he sido una persona muy inquieta y curiosa, de la ciencia y de la humanidad, del comportamiento humano y de la biología, de la vida, al fin y al cabo. De pequeña, recuerdo querer ser inventora. Aun no he patentado nada aunque está claro que en este trabajo hay que reinventarse, tediarse con las frustraciones y respirar hondo, ser perseverante y un poco *freaky*. Y a veces quema y a veces llena. Desde mi hemisferio izquierdo he redactado la tesis lo más correctamente que he podido, desde mi hemisferio derecho voy a escribir los agradecimientos de manera más creativa y con más corazón.

Este trabajo de tesis se centra en la respuesta clínica a un tratamiento en pacientes con EM. Es curioso que después de tantos años trabajando en esta enfermedad, casi no haya estado en contacto con nadie que la padezca, sólo he visto sus células, sus muestras y la expresión de esta proteína o de este gen. Y cómo se llaman? Qué les pasa? Qué síntomas tienen y qué dificultades tienen día a día? Recuerdo un día que gracias a la Dra. Mar Tintoré pude observar cómo pasaba visita a pacientes con la enfermedad. Ese día cambió mi visión, de moléculas a personas con problemas y con ganas de estar bien. Sin esas personas este trabajo no se hubiera llevado a cabo. Por tanto, mi más sincero agradecimiento a los pacientes de EM de la unidad por su condescendencia donando sus muestras para la investigación, gracias por confiar en nosotros.

Esta historia empezó con el máster de inmunología UB-UAB. Fue un año duro donde aprendí muchísimo, hice amigos, dormí poco y gasté mucho dinero en TMB. Durante este año realicé las prácticas en el departamento de Neuroinmunología Clínica del Hospital Vall d'Hebron y se me reabrió el gusanillo de la investigación. Las dotes persuasivas de Manuel Comabella me convencieron de hacerla con ellos.

A él quiero agradecerle su apoyo incondicional, su capacidad de motivarme, que me haya dado la oportunidad de participar en diversos proyectos, congresos, de haberme conducido esta tesis. También quiero agradecer su trato donde nunca ha habido una palabra más alta que otra, así se trabaja más a gusto. Y sobre todo te agradezco tu confianza.

De Xavier Montalbán me gustaría expresar mi admiración por el proyecto del CemCat. Esta unidad especializada en EM que con la colaboración de mucha gente detrás, ha liderado y llevado a cabo un gran proyecto. Su ambición y su pasión por dar un mejor servicio a los pacientes que

padecen EM son de destacar. También gracias a toda la unidad del CEM-CAT, neurólogos, enfermeras, la gente de ensayos clínicos, los de rehabilitación, los de administración. Esos bailoteos y cantadas en las “xornaes” y tanta sesiones de lunes compartidas!!

A Nico, por enseñarme a hacer plásmidos, por ayudarme con los animales, por ayudarme con problemas químicos de buffers y demás. Pero sobre todo gracias por estar ahí, por ser un fiel amigo durante todos estos años, por escucharme cuando lo he necesitado y por animarme el día con sus anécdotas y chistes, por abrirse y contarme sus cosas, por tu cariño y por hacerme sentir que si algún día no estoy me echarás de menos. Tantos momentos compartidos, tantos cafés, tantas charlas, tantos momentos duros y tantos momentos buenos. Me llevo una gran amistad.

A Ester, por su escucha, por su bondad, por su humildad, por su realismo que me ayuda a poner los pies en la tierra. Con ella comparto una de mis grandes pasiones, cantar y hemos compartido muchos momentos en el coro y también en un viaje por los mundos árabes! El día a día se hace más fácil a tu lado. Eres muy diferente a mí y a la vez siento que nos complementamos, y que formamos un buen equipo. Gracias por enseñarme que querer a alguien significa estar presente a su lado.

A Ana, por su jovialidad, por su desenfado y su creatividad. Por su libertad y desvergüenza, su tenacidad y su inteligencia. Gracias por ser como eres porque con tu ejemplo, me permites explorar todos esos aspectos de mí misma. Gracias también por abrirme la consciencia en zonas donde estaba nublada. Gracias Ana, por explicarme tus cosas y escucharme las mías. Gracias por tu sinceridad y honestidad porque me hace crecer.

A Luis, por su rebeldía y su compromiso con la sociedad. Gracias por hacerme reír con esas salidas que dices tan serio. Desde que no has estado en el laboratorio he notado que no estaba tu presencia.

A Laura Negrotto, por enseñarme que no todos los argentinos son unos boludos, :P! por las charlas sobre aficiones compartidas, ☺. Por tu cariño, por tus ganas de pasar tiempo juntas. Por hacerme sentir valorada y vista. Por tu sonrisa.

A Sunny, por esa sonrisa permanente en la cara, por enseñarme que adaptarse a un nuevo mundo es cuestión de actitud. Gracias por las charlas filosóficas, por abrirme la conciencia sobre la cultura humana y la sociedad. Gracias por tu cariño.

A Zoraida, por muchísimos momentos compartidos también, conversaciones, risas, complicidades, te lo agradezco. Siempre te tendré en mi corazón y deseo tu felicidad.

Al resto de compañeros del laboratorio por compartir ese día a día, esas charlas sobre el tiempo, recetas, las cosas que ocurren en el mundo, los problemillas cotidianos, cenillas, risas, cafés, y toda la ayuda que me habéis aportado a nivel científico, Montse, Jennifer, Maria José, Herena, Mireia, Laura Navarro, Carmen, Carme, Ramil, estudiantes de máster y de prácticas. Todas esas personas que han pasado por el lab y que ya no están.

Y menos mal de las aficiones...sí...yo no he sido una rata de laboratorio, al principio sí...hasta que la frustración vino y entonces qué...a fluctuar según los resultados?, según si te ha salido o no, si te olvidaste de ese pequeño detalle...la culpa, el esfuerzo en vano, el estrés, el pánico al público, el papel en blanco, el dolor de espalda?? Necesitaba otro sustento y aprendí a tener aficiones para que cuando lo personal se cae y lo laboral también, me quede ese recoveco, el de mis aficiones. He ido haciendo diferentes cosas y este espacio es para agradecer a todas esas personas que han pasado por mi vida. De la coral me llevo el disfrutar cantando y el conocer a gente con un corazón muy grande. En ese momento fue decisivo para mí estar en ese ambiente. De los grupos de música donde toqué, además de conocer a mi chico, ☺! Me llevo todo un descubrimiento a nivel musical. Disfrutar tocando el teclado y cantando a la vez, poder innovar y crear la música fue una experiencia espectacular sin olvidar las horas de risas y buen rollo. Gracias a esas personas que me enseñaron a hacerlo. También gracias a los amigos de teatro que supuso una época increíble en mi vida extralaboral y un proyecto muy personal ya que conseguimos llevar a cabo la obra de teatro que había escrito mi padre. Ser directora fue todo un reto para mí donde aprendí y disfruté mucho. Toda una experiencia, gracias por dejaros engañar faranduleros!

Gracias a los compañeros de gestalt de esta última etapa de la que me llevo una transformación personal. Gracias por haber nacido, porque os quiero tal y como sois y sé que me queréis así también. Gracias por dejarme explorar tantas partes de mí misma, por darme libertad de ser y por enseñarme que somos parte de todos y que todos tenemos el mismo dolor y el mismo amor en nuestro interior. LluísCarles, Montse, Meritxell, Tere, Dasha, Johana, Frederic, Luca, Juan, MariaJosé, Anna, Laura, Lole, Esther, Lidia, Oswaldo, Eli, Carine, Dolors, Noemí, Mar, Jesús O., Quique, Toni, Jesús E.....gracias por enseñarme tanto!!

Y no me olvido de muchos otros amigos: Victor!! Grandeeee!!!, Mercedes, Laura Fontrodona muaaa te quierooo, Maider y Sonia, los de la uni, los del master....

Durante tres-cuatro años mientras hacía esta tesis, vivía en el corazón de gracia con dos amigas. Qué fácil fue vivir con vosotras. Tenía espacio y apoyo, se hablaban las cosas pero no demasiado tampoco, se compartía el tiempo. Sois muy diferentes a mí y por eso me habéis aportado tanto, hacíamos un triángulo muy equilibrado y os echo de menos. Consol y Ana, gracias gracias gracias, gracias por hacer que vivir con compañeros de piso sea un placer.

Mis amigas siempre han estado allí. Con su música, sus risas, sus abrazos...Rosana, Meri, Neus...que haría sin vosotras? Sois imprescindibles en mi vida, un apoyo incondicional, y totalmente una descarga y desconexión de los momentos de estrés. Gracias por enseñarme qué es la amistad, por estar ahí aunque a veces yo no estuviera, por escucharme y porque vosotras también compartierais conmigo vuestras vivencias. En esta última etapa, os siento como un núcleo muy importante, imprescindible en mi vida.

A mi familia, a mis primos, tíos, a mis abuelos y a mi tía Espe que sé que estará super orgullosa desde el cielo. A mis 4 hermanos porque fuisteis como padres para mí y jugasteis

conmigo y me cuidasteis. Os quiero. A mi cuñado y cuñadas. Tengo una suerte tremenda de tener unos cuñaos tan majos y salaos!! A mis 7 sobrinos por recordarme la ilusión de los niños, por agilizar mi mente en saber a quién os parecéis, por hacerme sentir orgullosa de vosotros cada vez que os veo.

A mi chico por ser la persona que más feliz me ha hecho en la vida hasta ahora, por confirmarme mi ilusión/obsesión de que se puede ser feliz en el amor, por abrirse a mí y superar los miedos y por decirme lo que no le gusta de mí, por ayudarme a centrarme y comprobar las horas de los trenes, por cada momento, palabra, cada gesto, cada detalle, por demostrarme que me quiere y no decírmelo. Gracias desde mi corazón, desde mi luz, desde mi piel. Gracias por enseñarme a ser mejor persona.

A mis padres por darme la vida. Por confiar en mí, por estar siempre, siempre ahí, por pensar en mí y pasar por encima de vuestra felicidad dejándome vivir en otra ciudad sin reprocharme que no esté cerca. Porque me enseñaron que el amor y la libertad no están reñidas. Por darme todo lo que he necesitado. Por hacerme sentir querida, por enseñarme los valores que tengo, por creer en mí, por hacerme sentir que estáis orgullosos. Por ser como sois. Sois mis primeros amores. GRACIAS.

INDICE

INTRODUCCIÓN.....	13
(i) Esclerosis múltiple.....	14
1. Etiología y epidemiología.....	14
2. Sintomatología y formas clínicas: heterogeneidad de la EM.....	17
3. Patogenia.....	20
4. Modelo animal.....	24
5. Tratamientos.....	25
(ii) IFN- β	26
1. IFN- β en enfermedad.....	28
2. Mecanismos de acción.....	29
(iii) Receptores tipo toll.....	31
(iv) Monocitos.....	35
(v) Respuesta al tratamiento con IFN- β	37
1. Anticuerpos neutralizantes.....	38
2. Respuesta al tratamiento y variables clínicas y radiológicas.....	39
3. Respuesta al tratamiento y genética.....	40
4. Respuesta a IFN en hepatitis.....	41
5. Tipo de respuesta inmune en la respuesta al tratamiento.....	41
6. Biología molecular en la respuesta al tratamiento.....	42
OBJETIVO E HIPÓTESIS.....	47
MATERIALES Y MÉTODOS.....	51
Diseño del estudio y evaluación clínica.....	53
Criterio de respuesta a la terapia con IFN- β	54

(i) Metodología relacionada con el objetivo 1.....	54
1. Pacientes.....	54
2. Aislamiento de células mononucleares de sangre periférica.....	55
3. Cuantificación de TLR4, TLR2 y de IFNAR1 en la superficie celular de monocitos...55	
4. Determinación de los niveles de suero de HSP70.....	56
5. Cuantificación por reacción en cadena de la polimerasa a tiempo real (PCR real time).....	57
6. Experimentos de inducción de IFN- β	68
7. Análisis estadístico de resultados.....	68
(ii) Metodología relacionada con el objetivo 2.....	69
1. Pacientes.....	69
2. Separación de la población monocitaria.....	69
3. Extracción de ARN de monocitos aislados.....	70
4. <i>Microarrays</i> de expresión.....	70
5. Análisis de los datos de expresión génica con <i>microarrays</i> de expresión.....	72
(iii) Metodología relacionada con el objetivo 3.....	73
1. Pacientes.....	73
2. Elección de polimorfismos de un nucleótido (SNP).....	74
3. Procesamiento de muestras.....	74
4. Genotipado de la primera fase.....	75
5. Genotipado de la segunda fase.....	76
6. Análisis de los resultados genéticos.....	77

RESULTADOS.....79

(i) Resultados relacionados con el objetivo 1.....	81
1. Descripción clínica y radiológica de los pacientes con EM incluidos en el estudio.....	82
2. Comparaciones entre los pacientes de EM antes del inicio al tratamiento y los controles sanos.....	83
3. Efecto del IFN- β	94

(ii) Resultados relacionados con el objetivo 2.....	99
1. Descripción clínica de los pacientes incluidos en el estudio.....	99
2. Descripción de las vías de señalización con diferencias significativas entre los grupos de estudio.....	100
3. La vía de los interferones de tipo I se encuentra elevada en los pacientes que no responden al tratamiento.....	101
4. Otras vías de señalización destacables.....	104
(iii) Estudio a nivel genético de diferentes componentes de la vía del TLR4 y de los IFNs de tipo I en la respuesta a IFN- β en pacientes con esclerosis múltiple.....	110
1. Primera fase.....	110
2. Segunda fase.....	112
3. Análisis global.....	114
DISCUSIÓN.....	115
CONCLUSIONES.....	131
REFERENCIAS.....	135
ANEXOS.....	151

ABREVIATURAS

ADN: Acido Desoxirribonucleico	LMP7: <i>large multifunctional peptidase 7</i>
ARN: Acido Ribonucleico	MAP3K14: <i>mitogen-activated protein kinase 14</i>
Axl: <i>Axl receptor tyrosin kinase</i>	MB21D1: <i>Mab-21 domain-containing protein 1</i>
BDNF: <i>brain-derived neurotrophic factor</i>	MBP: proteína básica de la mielina
BHE: barrera hematoencefálica	MCH o HLA: Complejo Mayor de Histocompatibilidad
CCR/CXCR: receptores de quimiocinas	MDA5: <i>melanoma differentiation associated gene</i>
Cemcat: Centre d'Esclerosi Múltiple de Catalunya	MD ₂ : <i>myeloid differentiation 2 protein</i>
CIS:síndrome clínico aislado	MDP: célula dendrítica
CMSP: Células Mononucleares de Sangre Periférica	MMP: metaloproteasa
C57BL/6: cepa de ratones C57 <i>black6</i>	Mx: <i>myxovirus</i>
DDIT3: <i>damage inducible transcript 3</i>	MyD88: <i>myeloid differentiation primary response 88</i>
EAE: Encefalitis Autoinmune Experimental	NABs: anticuerpos neutralizantes
EDSS: Escala del estatus de discapacidad expandido	NFκB: factor nuclear potenciador de las cadenas ligeras kappa de las células B activadas
EM: Esclerosis Múltiple	NGF: <i>neural growth factor</i>
GAS: <i>IFN-gamma activated site</i>	LPS: lipopolisacárido
GWAS: <i>Genome Wide Association Study</i>	OAS: <i>2'-5'-oligoadenylate synthetase</i>
HLA: <i>Human leukocyte antigen</i>	OR: Cociente de probabilidades (<i>odds ratio</i>)
HPSE: <i>small heat shock protein</i>	PAMP: patrón molecular asociado a patógenos
IFI6: <i>interferon-inducible gene 6</i>	PEL13: <i>pellino E3 ubiquitin protein ligase family member 3</i>
IFIH1: <i>Interferon Induced With Helicase C Domain 1</i>	PHA: fitohematoglutinina
IFN: Interferón	PP: Primariamente Progresiva
IFNAR: receptor de interferon de tipo I	PTPN: <i>protein tyrosine phosphatase, non-receptor type</i>
IFNGR: receptor de interferon gamma	RHIM: <i>RIP homotypic interaction motif</i>
IL: interleuquina	RIP: <i>receptor interacting protein</i>
IKK: <i>I kappa B kinase</i>	RIPK: <i>receptor-interacting serine threonine kinase</i>
IKBKB: <i>inhibitor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells, kinase beta</i>	RM: resonancia magnética
IRAK: <i>IL-1 receptor-associated kinase</i>	RR: Remitente-Recurrente
IRF: <i>interferon regulatory factor</i>	SARM: <i>sterile alpha and TIR motif containing 1</i>
ISGF: <i>interferon stimulated gene factor</i>	SI: Sistema Inmune
ISRE: <i>interferon stimulated response element</i>	SIGIRR: <i>single immunoglobulin and toll-interleukin 1 receptor (TIR) domain</i>
JAK-STAT: <i>janus kinase - signal transducer and activator of transcription</i>	SIKE: <i>suppressor of IKBKE 1</i>
KIR: región quinasa inhibidora	
LCR: líquido cefalorraquídeo	

SNC: Ssistema Nervioso Central
SNP: *Single Nucleotide Polymorphism*
SOCS: *suppressor of cytokine signaling*
SP: Secundariamente Progresiva
STUB1: *STIP1 homology and U-box containing protein 1, E3 ubiquitin protein ligase*
TAB: *Mitogen-activated protein kinase kinase 7 interacting protein 1*
TAM: *receptor tyrosin kinase*
TAP1: *Transporter 1, ATP-Binding Cassette, Sub-Family B (MDR/TAP)*
Th: *T helper*
TICAM: *toll-like receptor adaptor molecule 1*
TIR: *Toll/interleukin-1 receptor 8*

TIRAP: *Toll-Interleukin 1 Receptor (TIR) Domain Containing Adaptor Protein*
TLR: Receptor Tipo Toll
TNF: factor de necrosis tumoral
TRADD: *Tumor necrosis factor receptor type 1-associated DEATH domain protein*
TRAF6 : *TNF-receptor-associated factor 6*
TRAIL: *TNF-related apoptosis-inducing ligand*
TRAM: *Toll-interleukin 1 receptor domain (TIR)-containing adaptor molecule (TICAM)*
Tyk2: *tirosin kinase 2*
VLA-4: *very late antigen-4 (anti-integrina alpha4beta1)*

INTRODUCCIÓN

INTRODUCCIÓN

(i) Esclerosis múltiple

1. Etiología y epidemiología

La esclerosis múltiple (EM) es una enfermedad desmielinizante y discapacitante que afecta a adultos jóvenes. Es la segunda causa más frecuente de discapacidad en este sector de la población después de los traumatismos. Se caracteriza por la aparición de lesiones desmielinizantes en el SNC (figura 1) diseminadas en el tiempo y en el espacio. Estas lesiones comportan pérdida de mielina y daño axonal que fundamentalmente se manifiestan a nivel sintomatológico como pérdida de funciones motoras, sensitivas y/o cognitivas. Desde hace algunas décadas, el origen autoinmune es la teoría más aceptada de la etiopatogenia de la enfermedad. Tras un reconocimiento específico, la respuesta autoinmune se desencadena y ataca la mielina que recubre los axones del SNC. En los últimos años ha ido ganando fuerza la hipótesis de una infección viral como detonador del proceso. Esta hipótesis considera la posibilidad de que esté ocurriendo un fenómeno de “molecular mimicry” en el que un agente infeccioso es el desencadenante de la respuesta inmune. De esta manera, el SI ataca las propias estructuras de la vaina mielínica o de los oligodendrocitos debido a la similitud molecular entre un antígeno vírico y un antígeno propio (1). Uno de los virus candidatos es el de Epstein-Barr. Éste contiene péptidos estructurales muy similares a péptidos de proteínas de la mielina (2). De hecho, un estudio epidemiológico reveló que la infección de mononucleosis en personas mayores de 17 años, que además posean el alelo DR2 en el gen del MHC, profería una probabilidad 7,9 veces mayor de tener esclerosis múltiple (3).

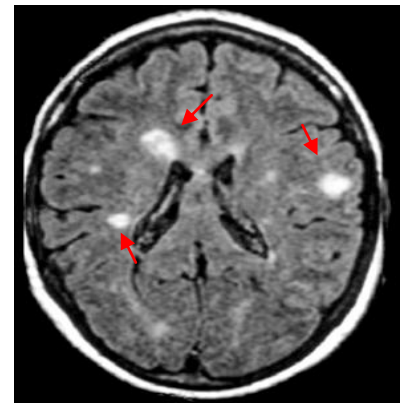


Figura 1: Imagen de resonancia magnética de un paciente con esclerosis múltiple atendido en el Cemcat. La figura muestra algunas lesiones en el parénquima cerebral señalado con flechas rojas.

La EM es más frecuente en las mujeres que en los hombres con un ratio de 2:1 (mujer:hombre) el cual es aún más evidente en niños, con un ratio de 3:1 (4). El grupo

étnico caucásico es el más afectado, las personas orientales tienen una susceptibilidad media y la raza negra una predisposición baja (5, 6). La prevalencia de la enfermedad, definida como la proporción de individuos que padecen la enfermedad en una población en un determinado momento, varía entre zonas geográficas y oscila entre 60-200/100.000 en el norte de Europa y Norteamérica hasta menos de 10/100.000 en África central. En España, los estudios más recientes apuntan a una prevalencia superior a los 70 casos por 100.000 habitantes, pudiendo superar en algunas zonas los 100 casos cada 100.000 habitantes (7-9).

La EM es una enfermedad compleja en la que tanto factores genéticos como ambientales influyen en la predisposición a padecerla. Las frecuencias de EM observadas a lo largo del mundo parecen seguir el patrón de los movimientos migracionales que los norteeuropeos realizaron durante la historia. Por ejemplo, en Australia y Nueva Zelanda existe una frecuencia relativamente alta. Sin embargo, al dividir la población entre los grupos étnicos, es posible distinguir una alta frecuencia entre los habitantes de raza blanca mientras que en aborígenes y maoríes es muy raro encontrar pacientes de EM (10). Por otro lado, los estudios de gemelos monocigóticos y dicigóticos también apoyan la influencia genética en la enfermedad. Un estudio canadiense fue concluyente ya que mostró un 26% de concordancia entre gemelos monocigóticos y un 2,3% en gemelos dicigóticos (11). No obstante, la EM no es 100% heredable y se especula que su heredabilidad sea un reflejo de la combinación de múltiples variaciones genéticas en diferentes genes.

En el contexto de una patología con un componente inmunológico tan predominante, no es de extrañar que la asociación genética más importante esté localizada en el complejo mayor de histocompatibilidad (MCH o HLA). El HLA-DRB1*15:01 es el alelo asociado con mayor frecuencia a la enfermedad, con un $OR > 3$, que se traduce en que los individuos que poseen este alelo tienen una probabilidad tres veces mayor de padecer la EM que los individuos que no lo poseen (12). Sin embargo, estudios de GWAS realizados en los últimos años han revelado asociaciones de nuevos SNPs en otros genes (13, 14). En 2011, *Sawcer et al.* publicó un estudio GWAS de gran relevancia en el que se incluyeron 9772 pacientes con EM frente a 17376 controles. En este estudio se confirmó la asociación de 23 loci que ya se habían publicado previamente y se identificaron 29 nuevos loci (12). La función de la mayoría de estos genes está relacionada con el sistema inmune,

especialmente con la inmunidad mediada por células. Además, los SNPs localizados en muchos de estos genes también están asociados a otras enfermedades autoinmunes como la artritis reumatoide y la enfermedad de Crohn (12).

Según lo descrito anteriormente, el componente genético no explica que el 74% de los gemelos monocigóticos sean discordantes. En este sentido, estudios epidemiológicos basados en los movimientos migracionales evidencian que el componente ambiental tiene una gran influencia en la predisposición a tener EM. Como ejemplo podemos considerar el caso de Sudáfrica, en el cual la fecha de prevalencia varía dependiendo de la procedencia étnica y de la edad de migración. Los adultos caucásicos que migraron a Sudáfrica en su edad adulta mantuvieron las frecuencias elevadas de su país de origen, mientras que los individuos que migraron antes de los 15 años mostraron las frecuencias bajas encontradas en los nativos nacidos en Sudáfrica (13). Los factores ambientales más destacables asociados a la EM son: la latitud geográfica, explicada por la baja exposición a la luz solar y la menor producción de vitamina D, el hábito de fumar y la exposición a agentes infecciosos, siendo uno de los más mencionados como se ha descrito anteriormente, el virus de Epstein-Barr. En el caso de la vitamina D y la luz solar, es interesante destacar un estudio en el que se demostró que la frecuencia de EM aumentaba en personas nacidas en primavera y disminuía en personas nacidas en otoño. De esta forma, las madres de las personas nacidas en primavera estaban expuestas a menos horas de sol durante el embarazo y las madres de las personas nacidas en invierno estaban expuestas a más horas de sol. Este fenómeno, se observaba también en el hemisferio sur en el sentido contrario (15).

Probablemente sea la combinación entre los factores ambientales y genéticos la que confiere susceptibilidad a la enfermedad. Un ejemplo de ello se demostró en un estudio reciente que asoció la EM con variantes raras en *CYP27B1*, gen codificante para la enzima que activa la vitamina D3. Las mutaciones asociadas a EM conferían pérdida total o parcial de la funcionalidad de este gen (16).

Otro ejemplo de la interacción genética y ambiental parte de otro estudio que reveló que el hábito de fumar incrementaba el riesgo de padecer la EM, siendo 2,8 veces mayor entre las personas que poseían el antígeno DRB1*15 y que no poseían el antígeno leucocitario humano A*02 (17). De esta manera, los no fumadores con ambos factores

genéticos tenían un riesgo de 4,9 de padecer la EM, mientras que el riesgo se incrementaba a 15,5 en los fumadores con ambos factores genéticos.

2. Sintomatología y formas clínicas: heterogeneidad de la EM

En la mayoría de los casos, la EM cursa con brotes o exacerbaciones en los que se presentan los síntomas clínicos. Las zonas más comúnmente afectadas se encuentran en el nervio óptico, la parte cervical de la médula espinal y el tronco encefálico. Estas lesiones pueden provocar síntomas como la pérdida de visión e importantes déficits motores y sensitivos. También es importante destacar el déficit cognitivo, que puede ser ya evidente en las fases iniciales de la enfermedad. (18).

Los criterios diagnósticos más aceptados en la actualidad son los criterios de McDonald, que requieren una diseminación demostrable de las lesiones en tiempo y espacio (19-21). El 80% de los pacientes comienzan la enfermedad con un episodio agudo que se denomina síndrome clínico aislado (CIS). Si este episodio se presenta con anomalías detectadas por resonancia magnética en lugares no clínicamente afectados, aumenta la probabilidad de un segundo ataque. A medida que transcurre la enfermedad, la discapacidad producida por los brotes se va acumulando (22). Se ha asociado una mayor frecuencia de exacerbaciones después de una infección viral (23) y una menor frecuencia durante el embarazo (24). Por otra parte, la enfermedad puede evolucionar en diferentes formas dependiendo del paciente y su forma clínica (25, 26). Existen las siguientes formas clínicas (figura 2):

- Síndrome clínico aislado (CIS): Es la primera demostración clínica, presenta características de desmielinización inflamatoria sugestivas EM, pero que sin embargo no ha cumplido el criterio de diseminación en el tiempo.
- Remitente-recurrente (RR): Se caracteriza por la aparición de brotes alternados con períodos de remisión. Es la forma clínica más frecuente ya que el 80-90% de los pacientes con EM lo presentan.
- Secundariamente progresiva (SP): Aproximadamente el 50-60% de los pacientes con EM-RR pasan a presentar un curso evolutivo progresivo con o sin exacerbaciones.

- Primariamente progresiva (PP): Se caracteriza por un curso progresivo de la enfermedad que inicia desde su debut. El 10-20% de los pacientes presentan esta forma clínica.

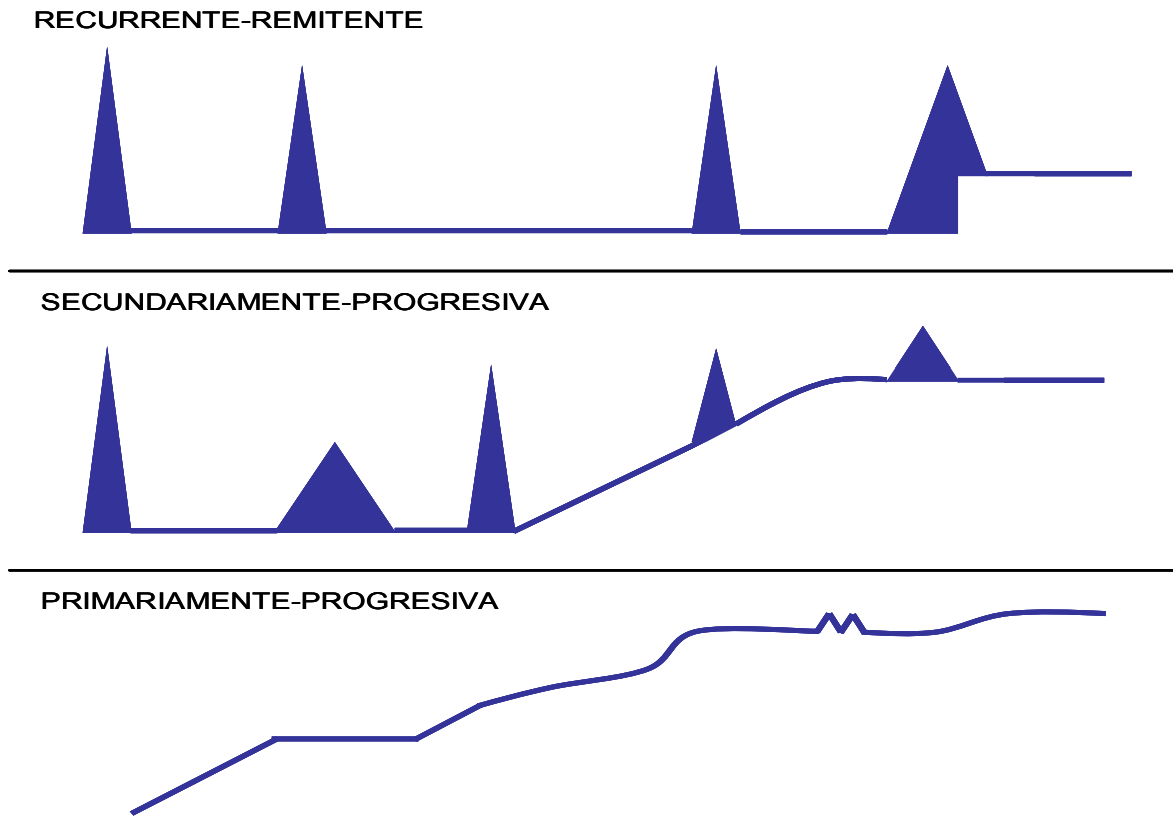


Figura 2: Esquema de las formas clínicas de la esclerosis múltiple (exceptuando CIS).

En la última década, se ha estipulado que la progresión comienza en la mayoría de los casos alrededor de los 40 años de edad. Esto ocurre tanto en el caso de la EMRR, que entraría en la fase secundariamente progresiva como en el caso de que la enfermedad inicie con progresión (EM-PP) (27). En cuanto a la EM con comienzo en edad infantil, la enfermedad tarda más años en llegar a la fase progresiva. No obstante, llega a una edad más temprana (28).

La enfermedad se caracteriza por una gran heterogeneidad, no solo en la forma clínica sino también en los hallazgos radiológicos valorados por resonancia magnética (29, 30), en las lesiones histopatológicas del SNC (31), y en la respuesta al tratamiento (32).

3. Patogenia

➤ Desarrollo

Los procesos patogénicos de la EM varían según la fase de la enfermedad (ver figura 3). En la primera fase ocurren procesos de inflamación y desmielinización. La inflamación comienza en zonas con gran densidad de venas pequeñas y vénulas. Previo contacto con el autoantígeno, los linfocitos se infiltran a través de la barrera hematoencefálica debilitada y se desencadena la respuesta inmune contra las estructuras propias de la mielina y los oligodendrocitos. El infiltrado celular se compone por células T CD8+, células T CD4+ y macrófagos (33). También se pueden encontrar células B y plasmáticas en espacios perivasculares y en las meninges. Además, las lesiones tisulares activas se asocian con presencia de microglía activa y macrófagos infiltrados (34). En estas primeras fases de la enfermedad, comienzan a observarse signos clínicos como consecuencia del daño en la vaina mielínica y del daño axonal. Estos signos son recuperables en la mayoría de los casos (formas RR) ya que la inflamación baja y el tejido se regenera por mecanismos de plasticidad y remielinización (35).

A medida que la enfermedad avanza, la inflamación se cronifica y comienzan a sucederse los procesos de desmielinización y neurodegeneración. Los oligodendrocitos entran en apoptosis y pierden sus prolongaciones y su capacidad de mielinizar. Además existe daño oxidativo en zonas de lesión de EM y afectación mitocondrial en los axones neuronales (36-38) así como desequilibrios en el flujo del calcio que llevan a la degeneración y pérdida axonal (39).

Los astrocitos se retraen y pierden moléculas propias de su superficie celular y pierden su funcionalidad. Los procesos de plasticidad y remielinización empiezan a fallar no siendo suficientes para paliar el daño crónico generado en el tejido (40). A su vez, clínicamente se empiezan a acumular los síntomas generados en los brotes y a no recuperar plenamente las facultades perdidas.

En las últimas fases de la enfermedad, la inflamación no tiene un papel predominante. La inflamación se queda atrapada tras la barrera hematoencefálica cerrada

o reparada en pacientes con EMPP o EMSP. Se forman densos agregados de células inflamatorias organizadas en estructuras que se asemejan a folículos linfoides secundarios. Estas estructuras se localizan en las meninges y de manera menos acusada en los espacios perivasculares amplios de Virchow Robin (41). Por otro lado, la neurodegeneración está más presente y se observa tanto degeneración crónica axonal como astrogliosis (42), término referido para la proliferación de astrocitos en las zonas de lesión que conlleva a la formación de la cicatriz glial. Se conoce que existen depósitos de hierro en el SNC que aumentan con la edad hasta llegar a un “plateau” a la edad de 40-50 años. Esta edad, tal y como se ha descrito previamente, se asocia con el paso de la forma RR a SP o con el propio inicio de la EMPP, es decir, con la predominancia de los procesos neurodegenerativos de la EM. En las lesiones de EM de pacientes con formas SP o PP, se acumulan una gran cantidad de macrófagos y microglía en los límites de la lesión. El hierro en un entorno oxidativo como en el que se encuentran las lesiones de EM, se transforma en hierro reactivo Fe⁺⁺ que reacciona con peróxido de hidrógeno generando radicales hidroxilo altamente reactivos, llevando en consecuencia, a un mayor aumento del daño oxidativo y por tanto, al daño axonal y neuronal (38, 43).

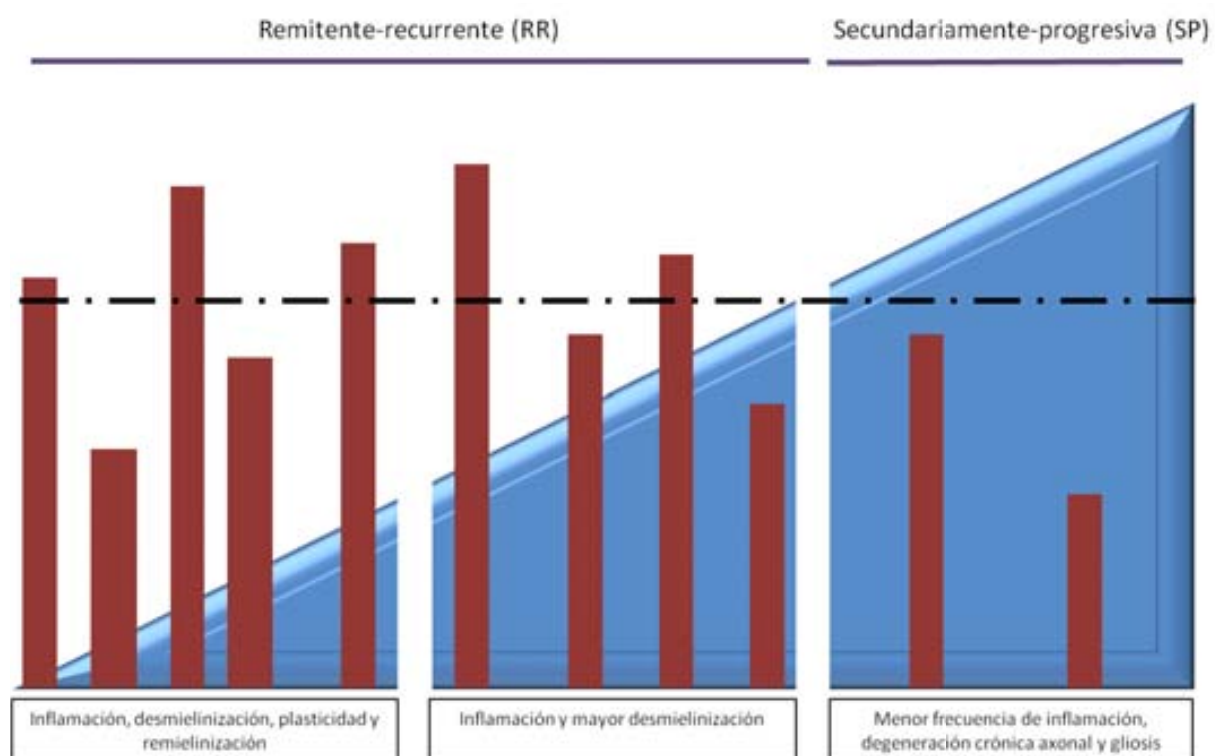


Figura 3: Ilustración del progreso de la enfermedad. Muestra la evolución en el tiempo de los procesos inflamatorios y degenerativos. Adaptado de Compston and Coles 2002

➤ Inmunología

En cualquier corte histopatológico de una lesión desmielinizante de un paciente con EM, se puede observar un infiltrado de leucocitos perivascular, daño en vainas de la mielina que cubren los axones (33) y en la mayoría de los casos también presencia del complemento (44).

El SI está diseñado para detectar cualquier molécula exógena y proteger el organismo de su agresión. Para poder diferenciar estructuras exógenas de endógenas, el SI pasa por un proceso de maduración denominado tolerancia. De esta manera, los linfocitos que reconocen péptidos endógenos entran en los programas celulares de anergia o apoptosis y son eliminados del repertorio linfocitario. Sin embargo, se producen errores en el sistema inmune y algunas células escapan a esta selección y como consecuencia es posible observar algunos linfocitos autorreactivos en controles sanos (45). Particularmente, en el caso de la EM, se considera que estas células autorreactivas son capaces de activarse por un agente infeccioso o por la presencia de un ambiente inflamatorio anormal. Una vez se activan las células, éstas inician una respuesta inmune frente a componentes de las vainas de la mielina que recubren los axones del SNC. La teoría de la autoinmunidad como proceso patogénico en la EM se apoya en la asociación genética que existe entre genes del sistema inmune y la susceptibilidad a padecer la enfermedad (14), así como por la demostrada eficacia de los tratamientos inmunomoduladores y por la patogenia del modelo animal.

Las células T CD4⁺ se pueden subdividir en diferentes estirpes o subtipos dependiendo de su función y de su capacidad de secretar diferentes citoquinas y promover diferentes tipos de inmunidad, ya sea celular o humoral. Las células T colaboradoras de tipo 1 (CD4⁺ Th1) se diferencian tras el estímulo de IL-12 y promueven la inmunidad celular mediante la secreción de IFN- γ y TNF (factor de necrosis tumoral). Las células T Th2 secretan IL-4, IL-5, IL-9 e IL-13 y fomentan la inmunidad humoral (46). Históricamente, la EM y su modelo animal, la EAE eran consideradas enfermedades mediadas principalmente por las células CD4⁺ Th1. Esta teoría se apoyaba, en parte, en los resultados obtenidos en ensayos clínicos de IFN- γ como tratamiento para pacientes con EM en los que no sólo no se observó una mejora en el curso de la enfermedad sino que hubo exacerbaciones de la misma (47). Sin embargo, estudios en EAE mostraron

resultados contradictorios, ya que ratones deficientes en algunas citoquinas claves para el tipo Th1 cursaban con una enfermedad más grave (revisado en (48)).

A raíz del descubrimiento de la estirpe Th17, subtipo celular que secreta IL-17 y cuya expansión depende de IL-23, se ha postulado que estas células podrían tener un papel clave en la patogenia de la enfermedad con un creciente número de estudios que lo apoyan. En uno de estos trabajos se detectó la expresión de IL-17 en lesiones cerebrales de pacientes con EM por análisis de expresión génica por la técnica de microarrays (49) y otro artículo demostró una mayor cantidad de células productoras de IL-17 tanto en líquido cefalorraquídeo como en sangre periférica de pacientes con EM (50). En la actualidad, se debate sobre el rol que tiene cada una de estas estirpes en la EM. Un estudio identificó numerosas células Th17+ que también expresaban IFN- γ en las lesiones cerebrales de pacientes con EM y que las células de sangre periférica de pacientes con EM tenían mayor propensión a expandir este tipo de células (51).

También se ha evidenciado el papel de las células T CD8+ en la patogenia de la enfermedad. De hecho, en placas agudas y crónicas de pacientes con EM se puede encontrar un mayor número de células T CD8+ que de células T CD4+ (52). Se considera que las células CD8+ una vez activadas por las células CD4+ se expanden y ejercen el daño tisular. De hecho, la extensión del daño axonal se correlaciona con el número de células CD8+ citotóxicas encontradas en una sección de tejido del SNC de pacientes con EM (53).

A pesar de haber relegado el papel de las células B a un segundo plano, existen cada vez más estudios que apoyan el papel de estas células en la patogenia de la EM. Como se ha mencionado anteriormente, existen folículos linfoides ectópicos que se asemejan a centros germinales en las meninges de pacientes con EMSP (41),(54). Además, es posible detectar bandas oligoclonales de IgG en el líquido cefalorraquídeo (LCR) en un 50-95% de pacientes con EM (55). Probablemente, las células B intratecales asentadas en las meninges sean las productoras de estos anticuerpos encontrados en el LCR de los pacientes. Estos anticuerpos podrían también mediar el daño de la mielina ya que se ha identificado la existencia de depósitos de complemento en lesiones de pacientes con EM (revisado en (56)). La eficacia demostrada en ensayos clínicos con rituximab, anticuerpo anti-CD20 que elimina las células B apoya el papel de estas células en la

patogenia de la enfermedad (57). No obstante, no es capaz de eliminar las células plasmáticas (células B productoras de anticuerpos) debido a que estas células carecen de CD20 y su eficacia no está asociada con una reducción en los anticuerpos en suero ni en LCR (58). Estos resultados invitan a postular que las células B podrían estar también involucradas en la patogenia de la enfermedad independientemente de la producción de anticuerpos.

4. Modelo animal

El modelo animal de la EM más utilizado es la EAE. La EAE es una enfermedad desmielinizante del SNC que comparte una fuerte semejanza con la patología humana en cuanto a los signos clínicos e histopatológicos (59). La enfermedad se induce de manera activa inyectando uno o varios componentes de la mielina junto con el adyuvante completo de Freund (60) o de manera pasiva por la transferencia adoptiva de células T CD4+ encefalitogénicas de animales con EAE activa (61, 62). La EAE es mediada por células T que reconocen péptidos de la mielina y que se activan en la periferia. Cuando estas células se activan, cruzan la barrera hematoencefálica y traspasan al SNC (63). Una vez en el SNC, las células T se reactivan por medio de las células presentadoras de antígeno y desencadenan la cascada inmunopatológica. Esta respuesta inmune junto con los procesos inflamatorios adyacentes conducirán a la desmielinización de las fibras nerviosas del SNC y finalmente el daño axonal.

Existen diferentes formas clínicas de la EAE dependiendo de la especie y la cepa en la cual se ha inducido la enfermedad. Por ejemplo, la cepa C57BL6/J desarrolla una forma crónica progresiva mientras que la cepa SJL desarrolla la EAE con un curso RR (64). El modelo animal de la EM ha permitido estudiar esta compleja enfermedad de manera exhaustiva, facilitando la comprensión de la patología de la EM y posibilitando la investigación y el desarrollo de nuevos fármacos como son el acetato de glatiramero (65) y el natalizumab (66). Cabe destacar, sin embargo, que es un modelo artificial, en la medida que es un modelo inducido de enfermedad y no una enfermedad espontánea y que los resultados obtenidos en este modelo deben ser analizados con precaución ya que algunos fármacos han demostrado ser eficaces en el modelo animal y sin embargo, no han resultado beneficiosos para el tratamiento de la EM (67).

5. Tratamientos

Para el tratamiento de la EM se indican fármacos con el fin de mejorar la sintomatología, reducir el proceso inflamatorio en el momento del brote (como los corticoides) y la mejora de los signos clínicos de la enfermedad. Las terapias que producen una mejora en el curso de la enfermedad están dirigidas a la inhibición o modulación del sistema inmune. Entre los tratamientos más utilizados destacan (revisado en (68)) :

- Interferón-beta: Modula el sistema inmune promoviendo las respuestas de tipo Th2 (*T helper-2*) y produce efectos anti-inflamatorios aunque su mecanismo de acción exacto es desconocido. Hasta la fecha, es el fármaco más utilizado en el tratamiento de pacientes con EM. Ha demostrado reducir la tasa anualizada de brotes y la actividad de la enfermedad medida por resonancia magnética. A pesar de que pueden existir efectos secundarios asociados a su uso, se considera un fármaco seguro.
- Acetato de glatirámico: Modula el sistema inmune promoviendo la producción de citoquinas de tipo Th2 y modulando la presentación antigénica. Ha demostrado reducir la tasa anualizada de brotes y la actividad de la enfermedad medida por resonancia magnética. La molécula está basada en una combinación aleatoria de 4 aminoácidos altamente representados en la proteína básica de la mielina (MBP).
- Natalizumab: Es un anticuerpo específico anti- integrina- $\alpha4\beta1$ (anti-VLA4), que bloquea el paso de los linfocitos y monocitos a través de la barrera hematoencefálica. Es muy eficaz aunque tiene un perfil de riesgo alto en algunos pacientes ya que han surgido un número no despreciable de casos con infecciones virales del SNC que pueden producir la muerte.
- Fingolimod: Primer tratamiento oral para pacientes con EM. Es un análogo de esfingosina-1 fosfato y modula sus efectos a través de la unión a sus receptores. Produce el secuestro de los linfocitos en los nódulos linfáticos. Tiene un buen balance beneficio/riesgo, aunque se ha asociado con problemas cardíacos.

(ii) IFN- β

Los interferones (IFNs), descritos por primera vez en 1957 por Isaacs y Lindenmann (69), son una familia diversa de citoquinas pleiotrópicas con funciones antivirales y antiproliferativas. Hay tres tipos de IFNs: tipo I, tipo II y tipo III. Los IFNs de tipo I abarcan una subfamilia de 14 subtipos de IFN α , IFN ω e IFN- β , que son reconocidos por un receptor común y juegan un importante papel en las respuestas antivirales. El IFN- γ , único ejemplar de los IFNs de tipo II, es secretado por linfocitos T activados y células natural Killer (NK). Esta citoquina participa de forma activa en la promoción de la respuesta inmune a través de la inducción de citoquinas proinflamatorias, del aumento de la presentación antigénica e inducción de apoptosis (70). Por último, los IFNs de tipo III, descubiertos más recientemente como IL-29, IL-28A y IL-28B, se inducen por infecciones virales y tienen un receptor común formado por dos subunidades: el receptor IL-28R1 y el receptor beta de IL-10 (IL-10RB) (71).

A pesar de unirse a receptores celulares diferentes (72), los IFNs de tipo I y II activan señales de transducción que se solapan, ambos componentes de JAK-STAT (*janus kinase - signal transducer and activator of transcription*). Los IFNs de tipo I producen una respuesta celular en la cual se encuentran implicados los heterodímeros compuestos por STAT1 y STAT2. Cuando el heterodímero STAT1-STAT2 es fosforilado, se transloca al núcleo y se une a IRF9 (*interferon regulatory factor 9*) para formar ISGF3 (*interferon stimulated gene factor 3*), un complejo que activa la transcripción de genes de respuesta a IFN mediante la unión de elementos ISRE (*interferon stimulated response element*) presentes en los promotores de ciertos genes. Por el contrario, en la respuesta a IFN- γ se forman homodímeros de STAT1 que promueven la expresión de genes regulados por GAS (*IFN-gamma activated site*) (73). La señalización de los IFNs de tipo I requiere de Tyk2 (*tirosin kinase 2*), IRF9, STAT2 e IFNAR2 (*interferon receptor-2*) y la de IFN- γ es mediada a través de las proteínas JAK2 e IFNGR1 (*interferon gamma receptor-1*). Asimismo, ambas vías comparten JAK1 y STAT1 (74) (véase figura 4).

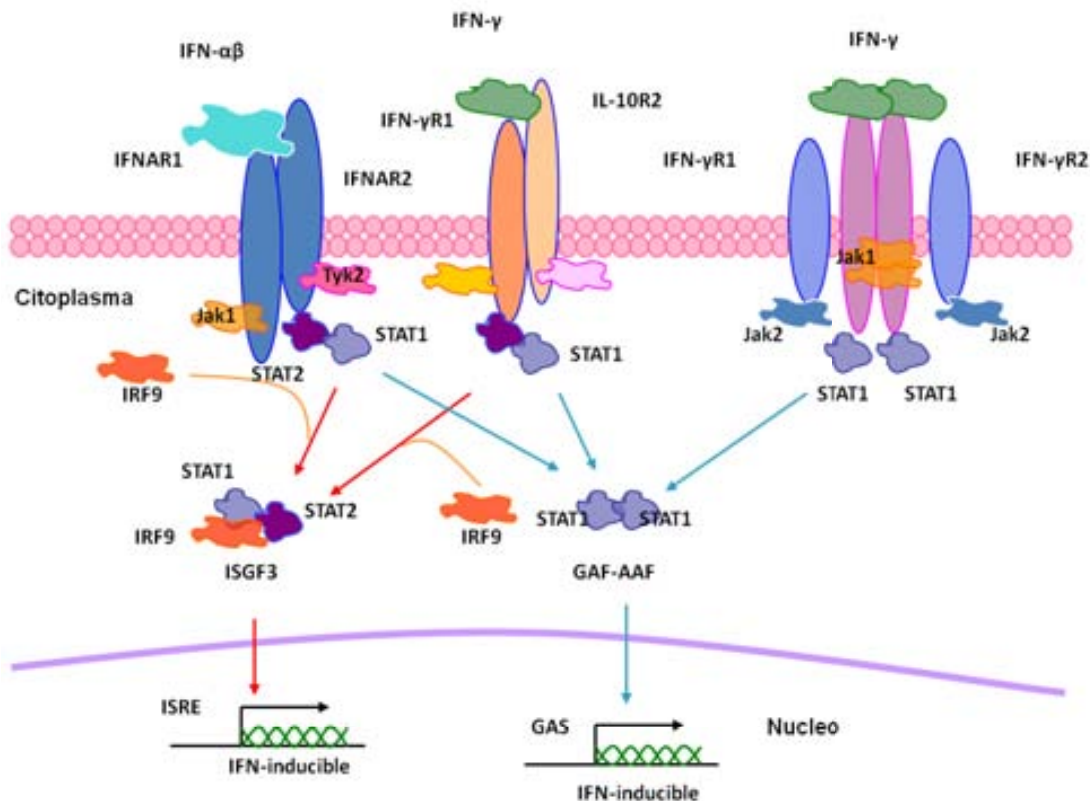


Figura 4: Detalle de las vías de señalización de los IFNs de tipo I e IFN-γ

La inhibición de la señalización JAK/STAT1 se produce mediante *feedback negativo*. JAK/STAT1 incrementa la expresión del receptor TAM (*receptor tyrosin kinase*), Axl (*Axl receptor tyrosin kinase*), que promueve la expresión de la familia SOCS (*suppressor of cytokine signaling*), que inhibe la señalización de citoquinas. Tanto SOCS1 como SOCS3 son capaces de inhibir la señalización de los IFNs de tipo I a través de diferentes mecanismos. Mientras que SOCS1 previene la fosforilación de STAT1 mediante la unión a IFNAR1, SOCS3 inhibe la actividad de la tirosina quinasa JAK mediante su región quinasa inhibidora (KIR) (75).

Los IFNs de tipo I se liberan en respuesta a algunas infecciones virales. En diferentes subtipos celulares excepto en las células dendríticas plasmacitoides, la activación de RIG-1 (*retinoic acid inducible gene 1*) por virus de ARN (ácido ribonucleico) de doble cadena, induce su translocación al núcleo de IRF3-IRF7 (*interferon regulatory factor*) y esto lleva a la producción de IFN α/β (76). Asimismo, la expresión de los IFNs de tipo I se induce mediante algunos subtipos de receptores tipo toll (TLR), en concreto TLR3 y TLR4 en conjunto con TICAM-1 o TRIF (*toll-like receptor adaptor molecule 1*) (77). Por otra parte,

la estimulación de TLR9 and TLR7 en las células dendríticas plasmacitoides induce la expresión de IFNs de tipo I a través de IRF7 (78).

Los IFNs de tipo I son citoquinas pleiotrópicas del sistema inmune innato que, además, modulan la respuesta inmune adaptativa. Estos IFNs producen un fuerte efecto antiviral que protege las células contra la invasión de patógenos virales. De hecho, algunos ISGs (genes estimulados por interferón) poseen la capacidad de reprimir la replicación de algunos virus. Entre ellos se encuentran: la familia *OAS* (*2'-5'-oligoadenylate synthetase*), *IFI6* (*interferon-inducible gene 6*), *IFI44L* (*interferon-inducible gene like 44*), *IFITM2* (*interferon induced transmembrane gene-2*), *IFITM3*, *MAP3K14* (*mitogen-activated protein kinase 14*), *IRF1*, *MB21D1* (*Mab-21 domain-containing protein 1*), *HPSE* (*small heat shock protein*), *MDA5* (*melanoma differentiation associated gene*). No obstante, a pesar de que algunos de ellos tienen un amplio efecto antiviral, otros son más específicos y solo inhiben la replicación de algunas especies de virus (79).

Por otro lado, los IFNs de tipo I son capaces de regular la función monocitaria y su diferenciación a células dendríticas (80). Estas citoquinas activan las células dendríticas potenciando la maquinaria de presentación antigénica regulando de forma positiva la expresión transmembranal del MHC de clase I, el MHC de clase II, CD40, CD80, CD86 y CD83. Por otra parte, potencian la respuesta de las células T CD8+ (81) y median las respuestas humorales frente a virus modulando las células B (82).

1. IFN- β en enfermedad

Los interferones de tipo I recombinantes son utilizados en la práctica clínica en el tratamiento de diferentes enfermedades. Por ejemplo, la infección por hepatitis C se trata con IFN- α y algunos interferones de tipo I se utilizan en quimioterapia de diferentes tipos de cánceres ya que tienen la capacidad de inducir la apoptosis en células malignas (83, 84). En el caso de la EM, tal y como se ha mencionado anteriormente, el IFN- β es actualmente el fármaco más utilizado en el tratamiento de la enfermedad. El tratamiento con IFN- β se afianzó a partir de las conclusiones sacadas de estudios de ensayo-error. Durante los años 80, se realizaron algunos trabajos tratando pacientes con EM con diferentes tipos de interferones con la base teórica de que la respuesta inmune que ocurría en el SNC de los

pacientes con EM se debía a una infección persistente (85, 86). Durante aquellos años, se observó que el IFN- γ era perjudicial en el tratamiento de la enfermedad ya que aumentaba el número de brotes en los pacientes tratados (47). No obstante, se observó una mejoría en los primeros pacientes que se trataron con IFN- β natural (86). Desde entonces, se han ido acumulando numerosos resultados de ensayos clínicos que demuestran la eficacia de los IFN- β recombinantes que se pueden encontrar hoy en día en el mercado: IFN- β 1a administrado una vez a la semana mediante una inyección intramuscular, IFN- β 1a administrado tres veces por semana por vía subcutánea, e IFN- β 1b administrado en días alternos por vía subcutánea. Las tres formulaciones presentan resultados similares en los ensayos clínicos realizados (87-89).

El IFN- β ha demostrado un efecto beneficioso en pacientes con EMRR, tanto en la disminución en la tasa de brotes como en el número de lesiones encontradas por resonancia magnética (88, 90). Aunque en menor medida, también mejora el curso de la enfermedad en los pacientes con EMSP, (91, 92). Sin embargo, no se ha demostrado su eficacia en pacientes con EMPP (93, 94).

En otras enfermedades autoinmunes se ha encontrado un aumento de la vía de los IFNs de tipo I. Este es el caso del lupus eritematoso sistémico (95) especialmente en los casos graves (96), enfermedad en la que incluso se han desarrollado estudios clínicos con inhibidores de los IFNs de tipo I (97). Otros ejemplos son la dermatomiositis (98), la esclerosis sistémica (99) y el síndrome de Sjögren (100), y un subgrupo de pacientes con artritis reumatoide (101). En el caso de los pacientes con EM, se ha observado que existe una menor activación de la vía de IFNs de tipo I comparando con los controles sanos (102).

2. Mecanismos de acción

Los mecanismos de acción del IFN- β en la EM son diversos. Cabe resaltar su papel inmunomodulador en el que se suman su capacidad de: (i) fomentar la producción de citoquinas anti-inflamatorias, (ii) inhibir la expresión de citoquinas proinflamatorias, (iii) promover la producción de células reguladoras y aumentar la producción de células NK tipo CD56^{bright} y (iv) regular el paso de leucocitos a través de la barrera hematoencefálica.

(i) Al IFN- β se le ha asignado la capacidad de inducir respuestas inmunes de tipo Th2 en el tratamiento de pacientes con EM ya que aumenta la producción de IL-10 e IL-4. En un cultivo *ex vivo* de CMSP de pacientes con EM expuestas a la proteína básica de la mielina en ausencia o presencia de IFN β -1a, se observó una mayor producción de IL-10 e IL-4 en aquellos cultivos expuestos al fármaco (103). Además, otro estudio reveló que las células T CD4+ y monocitos de pacientes con EM tratados durante dos días con IFN β -1a expresaban mayores niveles de IL-10 (104).

(ii) El IFN- β inhibe la producción de citoquinas proinflamatorias como la IL-17. En un estudio *in vivo* realizado en el modelo animal de la enfermedad, se observó que los ratones knockout para *IFNAR* desarrollaron un curso clínico más grave. Estudios mecanísticos revelaron que la señalización a través de IFNAR inhibía la IL-17 y que se relacionaba con el efecto observado en los animales knockout (105). Un estudio longitudinal con CMSP de pacientes con EM tratados con interferón-beta durante un año demostró que tras ese primer año de tratamiento, la secreción de IL-10 aumentaba espontáneamente, y más pronunciadamente si las CMSP eran estimuladas con la proteína miélnica básica. Por otro lado, los niveles de IL-17 disminuían tanto en suero como en CMSP estimuladas con PHA (fitohematoglutinina) (106).

(iii) El tratamiento con IFN- β potencia la función reguladora de las células Treg CD4+ que se encuentra disminuida en los pacientes con EM (107, 108). Además, el número de células CD4+CD25+Foxp3+ y de células NK CD56^{bright} aumenta en pacientes con EM tratados con IFN- β (109)

(iv) IFN- β inhibe la transmigración leucocitaria a través de la barrera hematoencefálica. En un modelo *in vitro* se observó que el IFN- β era capaz de estabilizar una monocapa de células endoteliales de cerebro de varias especies incluida la humana (110). Además, modifica la expresión de moléculas de adhesión de los linfocitos (111, 112) e inhibe la actividad de la metaloproteasa MMP-9 (113).

Por último, el IFN- β parece tener también un efecto en el sistema nervioso central ya que ha demostrado entrar en el cerebro donde induce genes de respuesta a IFN- β (114). Sin embargo, existe controversia en el efecto que puede tener. Por un lado, se postula que

promueve la recuperación del tejido nervioso ya que induce la expresión de *neural growth factor* (NGF) en pacientes con EM (115), un factor de crecimiento para las neuronas. Además, un estudio *in vitro* demostró que el IFN- β aumentaba la supervivencia neuronal (116). Por otro lado, otro estudio demuestra que la exposición durante un período largo de tiempo con IFN- β produce apoptosis en células de neuroblastoma humanas y neuronas corticales de ratón (117) e impide la señalización producida por BDNF (brain-derived neurotrophic factor) (118).

(iii) Receptores tipo toll

Los receptores tipo toll (TLR) son proteínas transmembranales que reconocen patrones moleculares asociados a patógenos (PAMPs) y ligandos endógenos que activan la inmunidad innata. Se ha postulado que estos receptores son responsables de la autoinmunidad debido a la capacidad que poseen de generar un ambiente inflamatorio.

Los TLRs se pueden dividir en dos subgrupos dependiendo de su localización celular y de sus respectivos ligandos. Uno de los grupos está constituido por: TLR1, TLR2, TLR4, TLR5, TLR6 y TLR11. Estos receptores se encuentran en la membrana celular y reconocen lípidos, lipoproteínas y proteínas. El otro grupo está formado por TLR3, TLR7, TLR8 y TLR9 que se hallan en las membranas de vesículas intracelulares y reconocen ácidos nucleicos microbianos (119).

El TLR4 forma un complejo estructural con MD2 (*myeloid differentiation 2 protein*) y CD14 (marcador de monocitos/macrófagos) para poder unirse al LPS de las bacterias Gram-. El TLR2, en cambio, reconoce diversos PAMPs como lipopéptidos de bacterias, peptidoglicano y ácido lipoteicoico de bacterias Gram+ y zimosán entre otros (119). La mayoría de TLRs inician una vía de transducción de señales mediante el gen de respuesta primaria a la diferenciación mieloide 88 (*MYD88*), que resulta en la expresión de citoquinas proinflamatorias como IL-1 β , TNF- α , IL-6 e IL-12 a través de la activación del factor de transcripción NF κ B (factor nuclear potenciador de las cadenas ligeras kappa de las células B activadas). Sin embargo, el TLR3 inicia la vía Myd88-independiente a través de la molécula adaptadora 1 (TICAM-1 o TRIF) que induce la transcripción de los IFNs de tipo I y de la quimiocina CXCL10. El TLR4 es el único receptor de TLR descrito hasta ahora capaz

de señalizar a través de ambas vías, Myd88 y TRIF (78). Inicialmente recluta Myd88 a través de la molécula adaptadora TIRAP (*Toll-Interleukin 1 Receptor (TIR) Domain Containing Adaptor Protein*) donde se inicia esta vía (120). Una vez iniciada esa señalización, el TLR4 se internaliza por endocitosis donde forma un complejo con TRIF a través de TRAM (*Toll-interleukin 1 receptor domain (TIR)-containing adaptor molecule (TICAM)*) que activan la vía TRIF-dependiente (121). Por otro parte TRIF, molécula adaptadora de TLR3 y TLR4, es capaz de unirse a proteínas de la familia RIP (*receptor interacting protein*) mediante su dominio RHIM (RIP homotypic interaction motif). Esta unión al margen de la unión a TRAF6 (*TNF-receptor-associated factor 6*) y la inducción de los IFNs de tipo I, puede dar lugar a la activación del factor de transcripción de NFκB (122).

En resumen, existen dos vías de señalización primordiales en la señalización de los TLRs: vía Myd88-dependiente y vía Myd88-no dependiente o TRIF-dependiente. En la figura 5 se detallan estas vías.

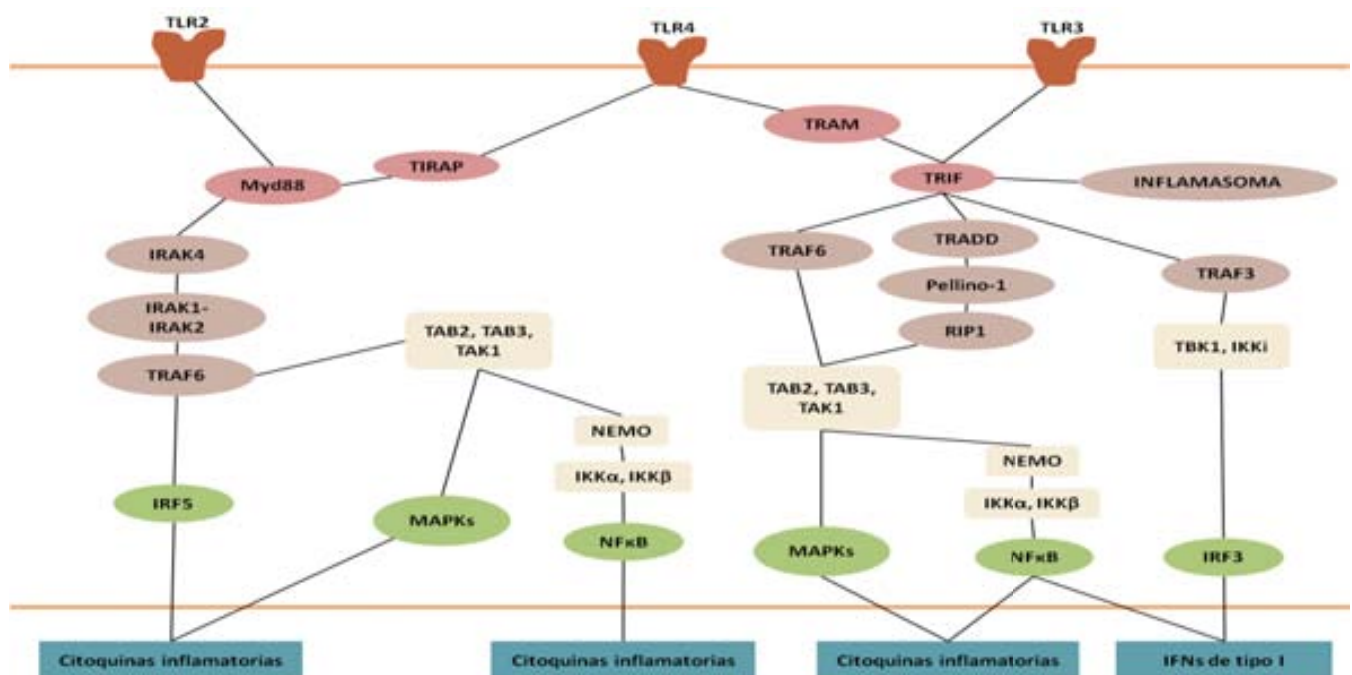


Figura 5. Imagen de la vía de señalización de los receptores tipo toll, basada en imagen de Kawai et al. (119). La mayoría de TLRs señalizan a través de Myd88 excepto TLR3. TLR4 requiere de la molécula TIRAP para señalizar por Myd88. Myd88 recluta IRAK4, IRAK1-IRAK2 y TRAF6 e induce citoquinas proinflamatorias activando los factores de transcripción IRF5 y MAPKs. A su vez, TRAF6 activa el complejo TAK1 junto con TAB2 y TAB3 y activa el complejo IKK formado por NEMO (IKKγ) e IKKα/β que induce NFκB. La vía TRIF-dependiente se inicia por TLR3 y en el caso de TLR4 a través del adaptador TRAM. TRIF recluta TRAF6, TRADD y TRAF3 además de activar el inflammasoma. A través de TRAF6 o TRADD, Pellino-1 y RIP1, se activan MAPKs y NFκB mediante el complejo TAB2, TAB3 y TAK1 y el complejo de IKKs, que fomenta la expresión de citoquinas inflamatorias. Por otro lado, cuando TRIF recluta TRAF3 se activan TBK1 y IKKi, que a su vez lleva a la activación del factor de transcripción IRF3 que facilita la expresión de los IFNs de tipo I.

Existen algunas excepciones a la clasificación estricta Myd88 dependiente o no dependiente, ya que se ha descrito que en las células dendríticas plasmacitoides el TLR9 y el TLR7 pueden promover la expresión de los IFNs de tipo I mediante IRF7 a pesar de señalar a través de la vía Myd88-dependiente (123).

Diversos mecanismos regulan o inhiben la señalización por los TLRs (para una revisión véase (124)). En el caso del TLR4, se conocen algunas moléculas encargadas de inhibir la señalización de los TLRs en diferentes puntos de la cascada de señalización. Destacaremos los siguientes:

- SIGIRR (*single immunoglobulin and toll-interleukin 1 receptor (TIR (Toll/interleukin-1 receptor 8) domain)*): Esta proteína inhibidora de la superfamilia de receptores TLR-IL1R es capaz de unirse al receptor de IL-1, al TLR4 y TLR5 así como a TRAF6 e IRAK1 (*IL-1 receptor-associated kinase*). Inhibe la vía de la IL-1 y la respuesta a LPS vía TLR4. Ratones deficientes en SIGIRR tienen mayor mortalidad frente al insulto de LPS o al tratamiento con IL-1. Esta proteína se expresa mayoritariamente en piel, hígado y esplenocitos pero no en los macrófagos (125).
- IRAK-M (*IRAK-3, interleukin receptor-associated kinase 3*): Inhibe la señalización de IL-1 y de los TLR probablemente mediante la inhibición de la fosforilación de IRAK1 o 4 o la estabilización del complejo tlr-myd88-irak(4). Se expresa primordialmente en monocitos y macrófagos y su expresión aumenta tras el estímulo de LPS (126).
- RIPK3 (*receptor-interacting serine threonine kinase 3*): Este gen codifica para una proteína de la familia RIP, proteínas involucradas en la señalización de la vía del TNF. Particularmente RIPK3 tiene una función inhibitoria que limita la activación de NFκB por parte del TNF (127). Asimismo, RIPK3 inhibe la activación de NFκB mediada por la unión de TRIF y RIP1 (122). Recientemente, se ha reportado que la activación de TLR3 y TLR4 en macrófagos da lugar a la unión de RIP3 con TRIF que resulta en la activación de citoquinas y en la muerte por necrosis mediada por la acumulación de especies reactivas de oxígeno(128).
- SARM (*sterile alpha and TIR motif containing 1*): Pertenece a la familia de adaptadores con motivo TIR, como lo son también TIRAP y TRIF. Esta proteína inhibe la señalización de TLR3 y de la vía no Myd88 dependiente del TLR4, ya que

se une a TRIF inhibiendo la consecución de la señal y por tanto la expresión de los genes que induce esta vía (129).

- SIKE (*suppressor of IKBKE 1*): Este gen codifica para una proteína capaz de bloquear IKBKE y TBK1 y por consiguiente inhibir el promotor de los IFNs de tipo I e ISRE (*interferon stimulated response element*) tras la estimulación de TLR3 y TLR4 (130).
- PTPN11 (*protein tyrosine phosphatase, non-receptor type 11*) o SHP2: Este miembro de la familia de las proteínas tirosina fosfatasas (PTP), se expresa en la mayoría de tejidos y regula diferentes procesos celulares como la activación mitogénica, el control metabólico, la regulación de la transcripción y la migración celular. En macrófagos, inhibe la expresión de IFN- α/β tras la estimulación de TLR3 y TLR4, es decir, inhibe la vía TRIF dependiente (131).
- PTPN6 (*protein tyrosine phosphatase, non-receptor type 6*) o SHP1: La proteína codificada por este gen, es miembro de la familia de las PTP y se ha asociado con la señalización en procesos hematopoyéticos. En la vía de los TLRs, inhibe IRAK4, gen que participa en la señalización de la vía Myd88 dependiente. Como consecuencia, bloquea la producción de citoquinas mediada por NF κ B. Además, potencia la producción de IFNs de tipo I mediante su unión a IRAK1 por su motivo ITIM, y por tanto, condiciona la regulación de IRAK1 sobre la producción de IFNs de tipo I vía RIG-1 y TRIF (132).

La implicación de los TLRs en la EM se ha investigado principalmente en el contexto del modelo animal. Estudios llevados a cabo en EAE han demostrado que el curso clínico de la enfermedad varía dependiendo de la cascada de señalización del TLR y de la activación de los factores de transcripción. Se ha evidenciado que la estimulación del TLR3 protege de la EAE ya que incrementa la expresión de IFN- β (133). Además, los ratones knockout para TLR4 presentaron un curso clínico de la EAE más grave (134), mientras que ratones sin el gen Myd88 fueron completamente resistentes a la enfermedad (134, 135). Dichos resultados indican que la señalización mediante la vía Myd88-independiente, la cual promueve la expresión de los IFNs de tipo I, podría tener un papel protector en la EAE mientras que la señalización mediante la vía Myd88-dependiente, que activa NF κ B y promueve la secreción de citoquinas proinflamatorias, exacerbaría la enfermedad autoinmune. Estudios con la tirosina fosfatasa 1 (SHP-1 o PTPN6), que inhibe

la vía Myd88 dependiente pero no la vía mediada por TRIF (136), apuntan en la misma dirección. Esta proteína, además, se ha encontrado menos expresada en macrófagos de pacientes con EM (137).

(iv) Monocitos

Los monocitos se originan en la médula ósea a partir de un progenitor mielóide compartido con los granulocitos. Este progenitor mielóide se desarrolla a partir de una célula madre hematopoyética de la médula ósea. Posteriormente, se diferencia al progenitor de granulocitos y macrófagos y al progenitor de macrófago y célula dendrítica (MDP). El factor de crecimiento más importante para que estos pasos tengan lugar es PU.1 (138). Una vez originados, los monocitos son liberados al torrente sanguíneo. Estas células circulantes representan aproximadamente un 10% de los leucocitos periféricos en humanos. Asimismo, se pueden encontrar también en el bazo. Son células mononucleares cuyo núcleo tiene una morfología parecida a un riñón y una densidad irregular. Se piensa que estas células no se dividen y tienen una vida muy corta de unos 3 días en humanos (139). A su vez, los monocitos pueden derivar a macrófagos en diferentes tejidos o a células dendríticas como respuesta a la inflamación.

Los monocitos presentan receptores “*scavenger*” que reconocen lípidos de células apoptóticas y receptores de patógenos como los previamente descritos TLRs. La estimulación de monocitos produce concentraciones importantes de especies reactivas de oxígeno, factores de complemento, prostaglandinas y citoquinas inflamatorias como TNF- α , IL-1, CXCL8, IL-6 e IL-10. Estas moléculas promueven la inflamación en el microambiente donde se da la respuesta inmune. Conjuntamente, los monocitos desarrollan un papel en la limpieza del tejido inflamado promoviendo la regeneración tisular y son capaces de presentar antígenos, aunque no de manera tan especializada como las células dendríticas.

Los monocitos expresan CD14 en su membrana extracelular. El CD14 forma parte del receptor del lipopolisacárido, componente que forma las paredes de las bacterias gram-. Es posible clasificar a los monocitos de acuerdo a la intensidad de expresión de este

receptor y del CD16 (receptor del fragmento cristalizante (Fc) de los anticuerpos), en las siguientes poblaciones (138, 140):

- Células CD14⁺⁺, CD16⁻: También llamados monocitos clásicos por su morfología, representan el 80-90% de los monocitos de sangre periférica. Son células más grandes y más regulares con mayor actividad fagocítica y mieloperoxidasa y capaces de producir mayor liberación de superóxidos. Estas células expresan los siguientes receptores de quimiocinas: CCR1, CCR2, CCR4, CCR7, CXCR1 y CXCR2, y bajos niveles de CXCR4 y CX3CR1 y no expresan CCR5. También expresan la L-selectina CD62L. Producen IL-10 en respuesta a LPS (lipopolisacárido) *in vitro*. Estas células son similares a los monocitos murinos Ly6c⁺ (Gr1⁺).
- Células CD14⁺⁺, CD16⁺: Son células más pequeñas con menor actividad peroxidasa y una mayor capacidad de secretar citoquinas. Estas células participan en la respuesta citotóxica mediada por anticuerpo ya que además del CD16, presentan en su membrana otros receptores de Fc (CD64 y CD32). También expresan mayores niveles de CX3CR1, CXCR4 y CCR5, y no expresan CCR1, CCR2, CCR4, CCR7, CXCR1 y CXCR2. Por otro lado, cuentan con altos niveles de HLA de clase II y no presentan CD62L. En cuanto a la secreción de citoquinas, producen citoquinas proinflamatorias como TNF- α e IL-1- β en respuesta a LPS *in vitro* y su número aumenta en la inflamación y en enfermedades infecciosas.
- Células CD14⁺, CD16⁺: Similares a los monocitos CD14⁺⁺, CD16⁺, no expresan CD64 ni CD32, y no producen citoquinas inflamatorias en respuesta a LPS.

La población de monocitos es una de las poblaciones celulares que se encuentra en el infiltrado celular de las lesiones de pacientes con EM (141). Al parecer, los pacientes tienen monocitos circulantes más activos ya que frente a un estímulo inflamatorio responden secretando mayor cantidad de peróxido de hidrógeno y de superóxido (142). Además, los monocitos de pacientes con EM en brote expresan citoquinas inflamatorias (TNF- α , IL-1- β y IL-6) tras estimulación (143) mientras que de manera espontánea expresan menores niveles de TNF- α y prostaglandina (144). En otro estudio se observó que los pacientes con EM tenían un mayor porcentaje de monocitos secretores de IL-6 y de IL-12 y que, por otro lado, los pacientes con un EDSS superior a 3 y con una duración de la

enfermedad mayor de 10 años expresaron niveles altos de la molécula coestimuladora CD86 en la superficie celular de monocitos circulantes (145). Incluso se ha asociado el número de monocitos circulantes IL-12+ con una mayor actividad de la enfermedad medida por la presencia de lesiones en resonancia magnética. Asimismo, los monocitos circulantes de pacientes con EM expresan mayores niveles de transcritos de diversas metaloproteinasas (MMP-1, MMP-3, MMP-7 y MMP-9 y TIMP-1), enzimas conocidas por su contribución a la rotura de la barrera hematoencefálica (BHE) (146).

Los pacientes con EM poseen menores números de monocitos CD14+ CD16- (CCR2+CD14+) (147). En cambio, la población CD14+CD16+ (CCR5+) tiene la capacidad de atravesar la BHE durante las fases agudas de la neuroinflamación (148). En un modelo *in vitro* se observó que estas células atravesaban la BHE y una vez la atraviesan se diferencian a células presentadoras de antígeno CD86+CD80+, las cuales expresan mayores niveles de HLA-DR y tienen gran capacidad fagocítica (149). Por el contrario, la transferencia adoptiva de los monocitos CD14+CD16- (o de tipo II) protege de la EAE aumentando las células T reguladoras y suprimiendo la diferenciación a Th17 (150)

El IFN- β ejerce un efecto muy importante en los monocitos. El IFN- β puede regular la secreción de quimiocinas en monocitos activados a través de células T, produciendo CCL3 y una disminución de IL-8, CXCL10, CXCL9, CCL2 y CCL7 (151). Además, los monocitos de pacientes tratados con IFN- β producen menores niveles de IL-1 β (80) y la estimulación *in vivo* con IFN- β recombinante inhibe la expresión de esta citoquina y aumenta la expresión en monocitos de CD80, CD86 y CD40 (moléculas coestimuladoras) (152).

(v) Respuesta al tratamiento con IFN- β

La detección precoz de la respuesta al tratamiento con IFN- β en pacientes con EM tiene gran relevancia clínica. En la actualidad, no existe un método validado capaz de detectar qué paciente responderá al tratamiento y que paciente no responderá al mismo hasta que no ha transcurrido cierto periodo de tratamiento con este fármaco. Las desventajas de administrar un tratamiento a un paciente con EM que no responde al mismo son varias. Por un lado, es un fármaco que provoca efectos secundarios en un porcentaje considerable de pacientes, siendo el más común de éstos el síndrome *flu-like*,

que se caracteriza por presentar los mismos síntomas que un proceso gripal. Además, el coste económico del tratamiento es elevado.

Existe cierta controversia en la definición de respuesta al tratamiento entre la comunidad científica. En un estudio realizado por nuestro grupo en el que se incluyeron 393 pacientes con un seguimiento clínico de al menos dos años, se observó que el porcentaje de pacientes no respondedores al tratamiento varía en gran medida dependiendo de los criterios de respuesta que se utilizan. De esta manera, si se acepta un incremento de al menos un punto en el EDSS que se mantiene en dos visitas consecutivas y la ocurrencia de un brote o más durante los dos primeros años de tratamiento, el porcentaje de pacientes no respondedores equivale al 10%. Si por el contrario se acepta sólo una de estas variables, el porcentaje aumenta hasta el 50% de pacientes. En este estudio, se concluyó que el incremento de discapacidad durante los primeros dos años da mayor información de la respuesta al tratamiento a largo plazo que la ocurrencia de brotes (153).

La capacidad de identificar los pacientes que no responderán al tratamiento a IFN- β sería de gran importancia social y económica, y facilitaría las decisiones de tratamiento que se toman en la práctica clínica.

1. Anticuerpos neutralizantes

El tratamiento de los pacientes con EM con IFN- β recombinante inyectable genera, en un porcentaje de ellos, una respuesta inmune humoral contra el propio fármaco. En este sentido, algunos pacientes generan anticuerpos capaces de neutralizar los efectos del IFN- β (NABs). Ya en los ensayos clínicos se observó la presencia de NABs en algunos pacientes y en 1996 se publicó un estudio detallado sobre este fenómeno (154). Dependiendo de la vía de administración (intramuscular, subcutánea o intravenosa), de la formulación y del proceso de producción del IFN- β recombinante, la inmunogenicidad varía (155). Diversos estudios han publicado porcentajes muy variables de pacientes con EM que presentan NABs durante el tratamiento, desde un 2% hasta un 44% (156-162). La mayoría de los pacientes desarrollan NABs entre los 12 y 24 meses tras el inicio del tratamiento con IFN- β .

En cuanto al efecto clínico que produce la presencia o ausencia de NABs en la efectividad del tratamiento con IFN, encontramos en la literatura que si el periodo de seguimiento de los pacientes es menor a dos años, no se detecta ninguna diferencia entre las frecuencias de brotes entre los pacientes NABs+ y NABs- (163-165). Por el contrario, si el periodo de estudio es mayor se observan aumentos en la frecuencias de brotes en pacientes NAB+ en la mayoría de estudios (revisado en (166, 167)). Por tanto, el tiempo de seguimiento de estos pacientes influye en la relevancia clínica de la presencia de NABs. Una de las razones de este efecto tardío podría ser que la generación de los anticuerpos también requiere un tiempo para producirse.

2. Respuesta al tratamiento y variables clínicas y radiológicas

La respuesta al tratamiento con IFN- β se ha asociado a diversas variables clínicas y demográficas. Entre ellas, una mayor edad (168), la etnia (169) y el EDSS en el momento del inicio al tratamiento se han asociado a una peor respuesta al tratamiento (153). De la misma manera, también se ha observado que los pacientes que con buena respuesta al tratamiento tienen un mayor número de brotes antes del inicio al tratamiento que los pacientes con mala respuesta.

Por otro lado, se han encontrado asociaciones de variables radiológicas con la respuesta al tratamiento con IFN- β . Las variables radiológicas se evalúan mediante la resonancia magnética (RM), la cual es una herramienta muy utilizada en la práctica clínica en EM. Esta técnica ha sido muy útil en su diagnóstico y control del tratamiento ya que muestra las lesiones desmielinizantes e inflamatorias presentes en el SNC. Las mediciones de RM en pacientes con EM se realizan habitualmente con secuencias potenciadas en T1, con o sin contraste de gadolinio y potenciadas en T2. Estudios realizados con RM muestran que la actividad radiológica durante el primer año de tratamiento con IFN- β puede predecir la respuesta al tratamiento a los dos años (170, 171). Concretamente, en un estudio publicado por nuestro grupo (171) en el que se incluyeron 152 pacientes con EM, se observó que las lesiones activas detectadas por RM en el primer año de tratamiento se correlacionaban con un aumento en la discapacidad tras dos años de tratamiento con IFN- β , con una OR de 8,3. En otro estudio prospectivo publicado en 2008

con 120 pacientes de EM se apuntó que los hallazgos de RM a los 6 meses de tratamiento eran suficientes para predecir la respuesta al tratamiento con IFN- β a los dos años del mismo (172).

3. Respuesta al tratamiento y genética

Estudios genéticos han apuntado a diversas variables genéticas que podrían estar asociadas a la respuesta al tratamiento con IFN- β . Sin embargo, no hay resultados claros al respecto. En un estudio farmacogenómico de respuesta a IFN- β , se analizaron genes de respuesta al IFN (ISRE) por su directa relación con el tratamiento. Se detectó una leve asociación con 4 SNP localizados en *IFNAR1*, *LMP7* (*Large multifunctional peptidase 7*), *CTSS* (*cathepsin S*) y *MxA* (*myxovirus A*). No obstante, el estudio no contemplaba un número suficiente de individuos y además no se validó en otras poblaciones (173). Otros estudios no confirman la asociación de *IFNAR1* en la respuesta al tratamiento con IFN- β en EM (174, 175). Sin embargo, un estudio reportó asociación con buena respuesta al combinar alelos de SNPs situados en los genes *IFNAR1*, *IFNB1* y *CCR5* o *IFNAR1*, *CCR5* e *IFNG* (176). Por otro lado, otros estudios genéticos recientes han abordado la variabilidad genética en genes inducidos por IFN- β y su posible asociación con la respuesta al tratamiento. Un artículo publicado por nuestro grupo halló una asociación del genotipo AA de un SNP intrónico situado en *USP18* con el fenotipo respondedor (177). Otro estudio reveló una asociación de un SNP no sinónimo localizado en el receptor 1 de TRAIL (*TNF-related apoptosis-inducing ligand*) (*TRAILR1*), que confería protección, es decir, una mejor respuesta al tratamiento(178).

En 2008 se publicó el primer estudio genético de asociación de tipo “genome-wide” (GWAS) que abordaba la respuesta al tratamiento con IFN- β en pacientes con EM. En este estudio se incluyeron 206 pacientes tratados con IFN- β y se llevó a cabo en diferentes fases. En la primera, se generaron *pools* de los ADNs y se escogieron los SNPs candidatos que pasaron a una segunda fase en la que se genotiparon en la misma población a nivel individual. En el análisis final se obtuvieron 7 SNPs localizados en los genes *glypican 5*, *collagen type XXV α 1*, *hyaluronan proteoglycan link proteín*, *calpastatin*, *TFAA1* (*chemokine-like*), *neuronal PAS domain proteín 3* y *LOC442331*. También se observó significación estadística en SNPs que habían encontrado asociados previamente

con la respuesta al tratamiento: *ADAR*, *PTGS2*, *PRKR*, *SYN2*, *IF[CFI]*, *OGN*, *TRAF6*, *CASP1*, *IL-22*, *IFN- γ* y *POLR3F* (179). No obstante, no se observaron diferencias en *IFNAR1*, *IFNAR2*, *LMP7*, *CTSS* o *MxA*, los cuales se encontraron asociados en el estudio de Cunningham et al. (173). Posteriormente, nuestro grupo publicó otro GWAS en el que se estudiaron 500.000 SNPs en 106 pacientes con EMRR clasificados según su respuesta al tratamiento y se encontraron asociaciones en los genes *GRIA3*, *CIT*, *ADAR*, *ZFAT*, *STARDT13*, *ZFHX4* e *IFNAR2* (180). En cuanto a la variabilidad genética del HLA, un estudio publicó que no existía asociación con la respuesta al IFN- β en pacientes con EM (181), sin embargo, existe una fuerte asociación entre los alelos *HLA-DRB1*04:01* y *HLA-DRB1*04:08* y el desarrollo de NABs contra IFN- β (182).

4. Respuesta a IFN en hepatitis

El IFN- α se utiliza en el tratamiento de la hepatitis desde hace más de 20 años. Sin embargo, también se ha observado que hay algunos pacientes de hepatitis cuyos niveles de virus no decrecen tras el tratamiento con este IFN de tipo I. Esto indica que existe cierta variabilidad interindividual ante la respuesta al tratamiento con IFNs como ocurre en el caso de la EM. Recientemente, se han asociado SNPs localizados en el gen *IL28B* (IFN de tipo III) con una rápida respuesta al IFN en enfermos de hepatitis o incluso a la erradicación espontánea del virus sin necesidad de tratamiento. Un estudio realizado por nuestro grupo estudió si este polimorfismo estaba asociado a la respuesta al IFN- β en pacientes con EM y el resultado fue, sin embargo, negativo (183). Por otro lado, se ha relacionado la sobre-expresión de genes de la vía de los IFNs de tipo I en pacientes con hepatitis C que no responden al tratamiento. Por ejemplo, *Mx1* y *OAS1* así como el factor de transcripción *STAT1* presentan mayores niveles de expresión en pacientes que no responden al tratamiento antes de que lo inicien (184)

5. Tipo de respuesta inmune en la respuesta al tratamiento

En un estudio publicado en 2011 (185) se apuntaba a la respuesta del tipo Th17 como la responsable de la ineficacia del IFN- β . Los autores realizaron un estudio en el modelo animal de la enfermedad y como resultado se determinó que el IFN- β bloqueaba la

diferenciación hacia la estirpe Th17 mediante IFN- γ , una de las citoquinas responsables de la patogenia de la EAE. Asimismo, observaron que IFN- β era efectivo cuando la base inmunológica de la EAE era preferencialmente de tipo Th1 y que el curso de la enfermedad empeoraba cuando la respuesta era preferencialmente del tipo Th17. Además, al estudiar el perfil de citoquinas de pacientes con EMRR antes del tratamiento con IFN- β , observaron la existencia de un *cluster* de pacientes no respondedores que tenían concentraciones elevadas de IL-17F en suero. Sin embargo, los datos publicados en pacientes con EM son discutibles debido al bajo número de pacientes testados. Por otro lado, nuestro grupo realizó un estudio con el fin de comprobar los niveles de las citoquinas más representativas de Th1, Th2 y Th17 (IFN- γ , IL-4, IL-10, IL-17A e IL-17F) en CMSP estimuladas de pacientes con EM clasificados según su respuesta al tratamiento con IFN- β y no encontramos diferencias estadísticamente significativas (186). Otros estudios publicados recientemente tampoco han podido replicar la asociación entre IL-17 y respuesta al tratamiento (187, 188). Por otro lado, como se ha mencionado anteriormente, el IFN- β inhibe la producción de IL-17 (106), y ésta inhibición parece ser más pronunciada en pacientes respondedores.

6. Biomarcadores de respuesta al tratamiento

Se ha reportado la existencia de subgrupos de pacientes según la expresión de un *cluster* de genes tras un mes de tratamiento con IFN- β . Estos genes consistían en genes de respuesta a IFNs de tipo I. De acuerdo a este estudio, se clasificaron los pacientes en dos grupos: un grupo de pacientes con genes inducidos por IFNs de tipo I elevados (grupo 1) y un grupo de pacientes con menor expresión de estos genes (grupo 2). Además, se encontró que en el grupo 2 de pacientes la expresión de estos genes aumentó por el efecto de un mes de tratamiento con IFN- β pero que en el grupo 1 la expresión se reducía o se mantenía. No sólo eso, se observó que esta diferencia no estaba afectada por el tipo de IFN- β utilizado en el tratamiento. Estudios *in vitro* observaron una propiedad inherente en las CMSP de los individuos a la respuesta a IFN- β (189)

Un año después, en un estudio publicado por nuestro grupo se asoció este efecto con la respuesta clínica al IFN- β (166). En este estudio, base de la presente tesis, se realizó un estudio transcriptómico de las CMSP provenientes de pacientes con EM

clasificados según su respuesta antes del inicio al tratamiento y tras 3 meses de tratamiento. El criterio de respuesta utilizado fue muy estricto. A los pacientes que durante dos años de seguimiento no tuvieron ningún nuevo brote ni un aumento de más de un punto en la escala de EDSS, se les clasificó como respondedores. Los pacientes que, sin embargo, presentaron más de un brote y cuya puntuación en la escala de EDSS aumentó al menos en un punto, se clasificaron como no respondedores. El estudio reveló que la vía de los IFNs de tipo I era la vía significativamente más asociada al “fenotipo” no respondedor ya antes del inicio al tratamiento. Se encontró que este grupo de pacientes presentaba una mayor expresión de genes conocidos por ser inducidos predominantemente o selectivamente por los IFNs de tipo I. Además, estos datos se replicaron en una cohorte de validación independiente, en la que también se observó que la vía de los IFNs de tipo I es la que muestra diferencias más elevadas entre los grupos, con mayores niveles en los pacientes no respondedores. No sólo eso, mientras que en los respondedores la expresión de genes de IFN de tipo I aumentaba drásticamente a los 3 meses de tratamiento, en los pacientes que no respondían al tratamiento, o decrecía la expresión, o no había ningún cambio. En congruencia con este trabajo, el estudio de Rudick et al. reportó una mayor expresión de genes de respuesta a IFNs de tipo I en pacientes con EM con mala respuesta al tratamiento y antes del inicio del mismo. En este estudio, sin embargo, la respuesta se determina a los seis meses de tratamiento basándose en resultados de resonancia magnética y no se confirma que este grupo sea clínicamente no respondedor en un periodo más largo de tiempo (190).

Por otro lado, al estimular las CMSP de estos pacientes con diferentes agonistas de los receptores de TLR, observamos que la estimulación con LPS, agonista del TLR4, producía una diferencia en la capacidad de secreción de IFN- α , siendo mayor en los no respondedores y menor en los respondedores. Es más, la vía de los TLR fue la tercera vía más diferencialmente expresada entre los pacientes respondedores y no respondedores (166)

Experimentos mecanísticos sugerían que el aumento de la vía de señalización de los IFNs de tipo I en los no respondedores antes del inicio al tratamiento ocurría predominantemente en los monocitos. Por un lado, se encontró que en los pacientes no respondedores, los monocitos y no las células T, B o células dendríticas mieloides o plasmacitoides, presentaban una sobre-activación del factor de transcripción principal de la

vía de los IFNs de tipo I, STAT1 (166). En línea con estos resultados, un estudio reciente publicado por Zula et al. reveló que el tratamiento con IFN- β en pacientes con EM causaba un aumento en el gen de respuesta a IFN, *TRAIL* (*tumor necrosis factor (ligand) superfamily, member 10*), que sólo se observaba en la población monocitaria y granulocítica entre nueve de las poblaciones celulares de sangre periférica estudiadas (191). Asimismo, los IFNs de tipo I en monocitos se han asociado a la patogenia de la EM en un estudio con el modelo animal. Este trabajo reportó que la delección específica de IFNAR1 en células mieloides (monocitos y neutrófilos) y no en otras poblaciones celulares empeoró el curso clínico de la EAE (105). Por otro lado, otro trabajo en el que se estudiaba la farmacodinámica del IFN- β en 35 pacientes con EM con buena respuesta (sin brotes ni aumento en EDSS durante los 15 meses posteriores), observaron que había un marcado incremento en el número de monocitos periféricos tras 36 horas de tratamiento, al contrario de algunas poblaciones linfocitarias. No sólo eso, en los monocitos se intensificaba la expresión del *MHC de clase II*, *CCR5*, *CD38*, *CD40*, *CD54*, *CD64*, *CD69*, *CD86*, *CD101*, *MCP2* así como *TLR2* y *TLR4* tras 36 horas de tratamiento (192). Por último, en la enfermedad autoinmune del síndrome de Sjögren también se observa una expresión elevada de genes de respuesta a IFNs de tipo I en monocitos CD14+ purificados (193).

En resumen, esta tesis se basa en un estudio previo publicado por nuestro grupo (166) en que se apuntaba a una posible implicación de la vía de los IFNs de tipo I, la de los TLRs y de la población monocitaria en la respuesta al tratamiento con IFN- β en pacientes con EM.

A continuación se lista los artículos correspondientes a los artículos publicados como resultado del trabajo realizado en la presente tesis. Estos artículos se encuentran adjuntados en el Anexo 1:

- Orchestrating innate immune responses in multiple sclerosis: molecular players. **Fernández M**, Montalban X, Comabella M. *J Neuroimmunol*. 2010, 25; 225(1-2):5-12.
- Implication of the Toll-like receptor 4 pathway in the response to interferon- β in multiple sclerosis. **Bustamante MF**, Fissolo N, Río J, Espejo C, Costa C, Mansilla MJ, Lizasoain I, Moro MA, Carmen Edo M, Montalban X, Comabella M. *Ann Neurol*. 2011; 70(4):634-45.
- Baseline gene expression signatures in monocytes from multiple sclerosis patients treated with interferon-beta. **Bustamante MF**, Nurtdinov RN, Río J, Montalban X, Comabella M. *PLoS One*. 2013 8; 8(4):e60994.
- Pharmacogenomic study in multiple sclerosis patients responders and non-responders to interferon-beta. **Bustamante MF**¹, Morcillo-Suárez C^{2,3}, Malhotra S¹, Río J¹, Navarro A^{2,3,4}, Leyva L⁵, Fernández O⁵, Goertsches R⁶, Zettl UK⁶, Killestein J⁷, Brassat D⁸, García-Merino A⁹, Sánchez AJ⁹, Urcelay E¹⁰, Alvarez-Lafuente R¹⁰, Lechner-Scott J^{11,12}, Vandenbroeck K^{13,14}, Rodríguez-Antigüedad A¹⁵, Drulovic J¹⁶, Martinelli Boneschi F¹⁷, Giacalone G¹⁷, Chan A¹⁸, Akkad DA¹⁸, Oksenberg J¹⁹, Montalban X¹, Comabella M¹. *Neuroimmunology and neuroinflammation*. Sent for revision. 2014.

OBJETIVO E HIPÓTESIS

OBJETIVO E HIPÓTESIS

Objetivo 1

Determinar la expresión de genes de la vía de los TLR y la vía de los IFNs de tipo I en la respuesta al IFN- β en pacientes con esclerosis múltiple remitente recurrente (EMRR)

Objetivo 2

Caracterizar el perfil monocitario de sangre periférica en pacientes con EMRR según su respuesta al tratamiento a IFN- β

Objetivo 3

Identificar genes relacionados con la respuesta al IFN- β mediante un abordaje farmacogenómico en pacientes con EMRR de genes pertenecientes a la vía de los TLR y la vía de los IFNs de tipo I

Hipótesis: la vía de los IFNs de tipo I está aumentada en los pacientes que no responden al tratamiento con IFN- β antes del inicio al mismo. Este aumento se relaciona con la vía de los TLRs y se genera en los monocitos. Este hallazgo nos permitirá identificar estos pacientes antes del inicio al tratamiento.

MATERIALES Y MÉTODOS

MATERIALES Y MÉTODOS

Cada objetivo de esta tesis corresponde a un estudio diferenciado. A continuación, se describen los métodos utilizados en la tesis que se dividen en una parte común de los tres estudios y otra parte de metodología más específica de cada estudio. La parte de métodos común a los tres estudios incluye el diseño y los criterios de respuesta al IFN- β empleados para identificar pacientes con buena y mala respuesta al tratamiento.

Diseño del estudio y evaluación clínica

Los pacientes con EMRR incluidos en el estudio se trataron con IFN- β y fueron visitados de forma ambulatoria en el Centre de Esclerosis Múltiple de Catalunya (Cemcat). Todos los pacientes se incluyeron en un protocolo de seguimiento en el que se recogieron datos clínicos a nivel basal y longitudinal. Se hizo un seguimiento cada tres meses con recogida de información de brotes y grado de discapacidad evaluado mediante la escala del EDSS. Se definió un episodio de un brote como la ocurrencia, recurrencia o empeoramiento de síntomas con disfunción neurológica que se prolonga más de 24 horas (153). Además, se realizó una extracción de sangre antes del inicio al tratamiento (basal) y tras 12 meses de tratamiento (figura 6). El estudio se aprobó por el comité ético local y todos los pacientes dieron su consentimiento informado.

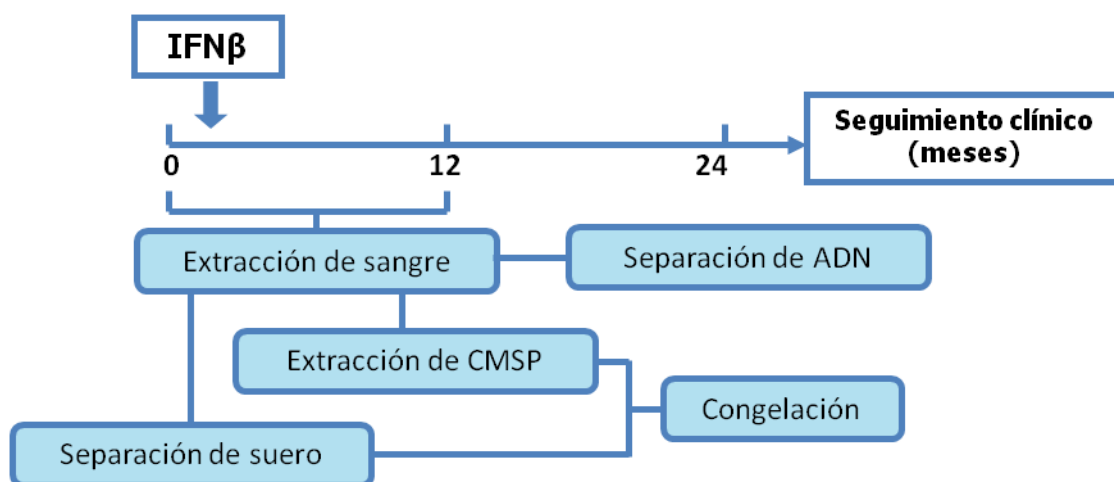


Figura 6. Representación del diseño de recogida de muestras.

Se realizaron mediciones antes del inicio al tratamiento y tras doce meses del mismo. Basándonos en la literatura, los parámetros clínicos registrados no están influidos por la presencia o ausencia de anticuerpos neutralizantes tras un año de tratamiento y obviamente, en la medición basal, no existirá influencia de los anticuerpos neutralizantes ya que serán inexistentes. Sin embargo, cabe tener en cuenta que los cambios radiológicos registrados en los pacientes NAB positivos, generalmente ocurren de manera más temprana que los efectos clínicos de los NABs (163).

Criterio de respuesta al tratamiento con IFN- β

El criterio clínico de respuesta a IFN- β fue aplicado tras dos años de tratamiento en base a las evidencias clínicas que presentaban los pacientes. Éstos se clasificaron como respondedores (R) cuando no hubo incremento en el EDSS y no sufrieron ningún brote durante el período de seguimiento. En cambio, se clasificaron como no respondedores (NR) cuando tuvieron uno o más brotes y un incremento de al menos un punto en la escala de EDSS que persistió durante dos visitas consecutivas o más separadas por un intervalo de 6 meses (153). Los pacientes se clasificaron como respondedores intermedios (IR) cuando hubo presencia de brotes con un incremento inferior a un punto en la escala de EDSS o ausencia de brotes con incremento de un punto o más en el EDSS durante el período de seguimiento.

(i) Metodología relacionada con el objetivo 1

“Determinar la expresión de genes de la vía de los TLR y la vía de los IFNs de tipo I en la respuesta al IFN- β en pacientes con esclerosis múltiple remitente recurrente (EMRR). “

1. Pacientes

Se incluyeron 85 pacientes con EMRR. De estos, 49 (57,6%) eran respondedores (R), 18 (21,2%) no respondedores (NR), y 18 (21,2%) respondedores intermedios (IR) al tratamiento con IFN- β . Ninguno de estos pacientes había recibido previamente tratamiento con IFN- β u otro tratamiento inmunosupresor previo a este estudio. Tampoco tuvieron

exacerbaciones clínicas ni recibieron corticoides en el mes anterior al inicio del tratamiento con IFN- β . Además, se incluyeron en el estudio 32 individuos sanos como grupo control. En el sub-estudio realizado *in vitro*, se utilizó un tamaño muestral menor: 5 pacientes respondedores, 5 no respondedores y 5 controles sanos.

2. Aislamiento de células mononucleares de sangre periférica

Se aislaron las CMSP de los pacientes con EMRR y de los controles sanos (CS) mediante un gradiente de densidad de Ficoll-Isopaque (Gibco BRL, Life Technologies LTD, GB). Tras dos lavados con suero fisiológico (Grifols, España), las células se congelaron en viales con más de 5×10^6 millones de células en 1 ml de medio completo (RPMI 1640 (Gibco®, Invitrogen, CA, EEUU), suero bovino fetal (FBS) al 10%, 40U/ml-40 μ g/ml de penicilina-estreptomicina (Gibco®, Invitrogen), 2mM de L-glutamina (Gibco®), tampón Hepes 1M al 2% (Gibco®)) con un 10% de dimetil sulfóxido (DMSO) y se almacenaron en nitrógeno líquido hasta su posterior uso, con un paso previo de congelación a -80°C de al menos 24 horas.

3. Cuantificación de TLR4, TLR2 y de IFNAR1 en la superficie celular de monocitos

Las muestras utilizadas fueron las CMSPs congeladas descritas anteriormente de controles sanos y de pacientes con EMRR antes del inicio al tratamiento y tras 12 meses del mismo. Se procesaron 10 muestras al día con representación proporcional de los pacientes respondedores, no respondedores y de los controles sanos. Los meses 0 y 12 de un mismo paciente se analizaron el mismo día. Se descongelaron añadiendo medio completo de manera paulatina con tal de diluir el DMSO ya que es tóxico para las células vivas. Tras un lavado con tampón fosfato salino (PBS) (Gibco®), se sembraron las células en una placa (sin tratar, de 96 pocillos en forma de U) a una concentración de 300.000 células/50ul pocillo. El marcaje extracelular se realizó incubando las células durante 25 minutos a temperatura ambiente y en oscuridad con los siguientes anticuerpos: mouse anti-human-CD14 conjugado con alofococianina (APC) (PharMingen, San Diego, CA, EEUU), mouse anti-human IFN- α/β R1 (IFNAR1) conjugado con isocianato de fluoresceína (FITC) (R&D Systems, Gaithersburg, MD, EEUU), y mouse anti-human TLR4 y TLR2

conjugados con ficoeritrina (PE) (eBioscience, San Diego, CA, EEUU), o con su correspondiente control de isotipo: mouse IgG1 conjugado con FITC y mouse IgG2a conjugado con PE (Pharmlingen), respectivamente.

Las células fueron adquiridas en un citómetro de flujo con láser dual FACSCanto (Becton Dickinson, Mountain View, CA, EEUU) equipado con el software FACSDiva. Los monocitos fueron delimitados según sus características de tamaño y complejidad así como por presentar CD14 en membrana. El porcentaje de monocitos que presentaban TLR4, TLR2 o IFNAR1 en su membrana se calculó delimitando la señal negativa a 0,3% y sustrayéndolo del porcentaje de células positivas. Por otro lado, la intensidad media de fluorescencia (MFI) de los monocitos que expresaban TLR4, TLR2 e IFNAR1 fue calculada sustrayendo la señal de fluorescencia del anticuerpo control de la señal específica. Esta medida nos da una idea de la expresión de la proteína independientemente del porcentaje de células que lo exprese.

4. Determinación de los niveles de suero de HSP70

Se recogieron las muestras de sangre periférica antes de que los pacientes con EM anteriormente descritos iniciaran tratamiento. Se dejó coagular durante 30 minutos y mediante centrifugación se aisló el suero y se almacenó congelado a -80°C hasta su posterior uso. La determinación de los niveles de HSP70 total basales fue realizada en el Departamento de Farmacología, Facultad de Medicina, Universidad Complutense de Madrid. Brevemente, los niveles basales de HSP70 (total) se midieron mediante un ELISA (enzyme immunoassay) con el kit comercial HSP70 high sensitivity EIA kit, EKS-715, (Assay Designs Inc, MI, USA) siguiendo las instrucciones del kit comercial. La recta patrón de HSP70 recombinante cubría desde 0 a 12,5 ng/mL. Tanto las muestras de suero como las muestras de la recta patrón se testaron por duplicado, y las concentraciones de HSP70 se determinaron por interpolación en la regresión lineal generada por los estándares de la HSP70 recombinante humana. Los coeficientes de variación intra e inter-ensayo fueron menores del 10%.

5. Cuantificación por reacción en cadena de la polimerasa a tiempo real (real time PCR)

a. Extracción de ARN total de CMSP

Las CMSP de pacientes con EMRR y de CS se descongelaron añadiéndoles paulatinamente medio completo hasta su completa descongelación. Tras un lavado con PBS, se lisaron las células con el buffer de lisis del kit Quiashredder™ (Quiagen, Alemania) habiéndole añadido previamente un volumen 1:100 de 2-mercaptoetanol (Sigma, CA, USA). A partir del homogenado de células, se aisló el ARN total mediante el kit RNeasy Mini Kit (Quiagen). Las muestras se procesaron según el protocolo añadiendo un paso intermedio de degradación de ADN con la enzima DNasa I (Quiagen). Las muestras de ARN total se eluyeron en 16 µl de agua libre de RNasas y se congelaron a -80°C.

b. Retrotranscripción

Las muestras de ARN total se retrotranscribieron mediante el kit High Capacity RT (Applied Biosystems, CA, EEUU). Brevemente, la reacción se realizó en un volumen total de 20 µl, de los cuales 7 µl eran la master mix: tampón 1x, 1 µl de MultiScribe™ Reverse Transcriptase, 1 µl de enzima inhibidora de la RNasa, 4 mM de dNTPs, random primers 1x y 0,2 µl de agua libre de RNasas. Los 13 µl de volumen final restantes contenía la cantidad necesaria de las muestras de ARN total mezcladas con agua libre de RNasa con tal de retrotranscribir (1500 ng, 1000 ng o 800 ng de ARN según la cantidad de muestra de partida). Se utilizó el programa de temperaturas que la casa comercial recomienda: 25°C 10 minutos, 37°C 120 minutos y 85°C 5 segundos. Posteriormente, se añadió el agua libre de RNasas necesaria para llevar todas las muestras a la misma concentración (20ng/µl). Según las indicaciones del fabricante, se acepta que por 1 µg de ARN total añadido en la muestra, se obtiene 1 µg de ADN copia.

c. Generación de curvas estándar para la cuantificación absoluta por PCR a tiempo real

Con tal de cuantificar la expresión génica de los genes de interés de manera absoluta, se generaron las curvas estándar correspondientes mediante la construcción de plásmidos que contenían un fragmento de los genes de estudio. De esta manera, era posible definir en cuánto volumen teníamos una copia del constructo. Así, mediante unas diluciones seriadas, se generaba una curva patrón capaz de extrapolar el ciclo de amplificación del umbral (Ct) en la PCR a tiempo real con el número de copias del plásmido o del ARNm (en el caso de la muestra). Para ello, los constructos realizados contenían el fragmento de los genes de estudio que abarcaba el ensayo de TaqMan correspondiente. A continuación, se exponen los pasos seguidos para la generación de los constructos.

➤ *Diseño de los primers*

Los primers se diseñaron mediante el software DS gene 1.5 (Accelrys, Inc., CA, EEUU) teniendo en cuenta que su producto abarcara para cada gen, la zona del ensayo TaqMan correspondiente.

➤ *Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)*

La reacción de PCR se realizó en un volumen final de 50 μ l que contenía 45 μ l de PCR Super Mix High Fidelity 1x (Invitrogen, CA, EEUU), 10 pM de cebador directo, 10 pM de cebador indirecto y 500 ng de cadena molde. La muestra de cadena molde se obtuvo a partir de la retrotranscripción de ARN total extraído de CMSP de controles sanos. Las condiciones de PCR fueron:

- *TICAM1* ⁽¹⁸⁶⁹⁻²⁰²⁶⁾: 1 ciclo de pre-amplificación de 30 segundos a 94°C; 35 ciclos de: desnaturalización a 94°C, 30 segundos, hibridación a 62°C, 30 segundos, elongación a 72°C durante 1 minuto; seguido de 1 ciclo de 5 minutos a 72°C.

- *MYD88*₍₄₅₆₋₅₈₂₎: 1 ciclo de pre-amplificación de 30 segundos a 94°C; 35 ciclos de: 30 segundos desnaturalización a 94°C, 30 segundos de hibridación a 56°C, 1 minuto de elongación a 72°C; seguido de 1 ciclo de 5 minutos a 72°C.

- *CXCL10*₍₉₆₋₂₄₅₎ e *IL1B*₍₄₉₀₋₆₄₉₎: 1 ciclo de pre-amplificación de 30 segundos a 94°C; 35 ciclos de: 30 segundos de desnaturalización a 94°C, 30 segundos de hibridación a 55°C, 1 minuto de elongación a 72°C; seguido de 1 ciclo de 5 minutos a 72°C.

- *TNF*₍₃₆₈₋₅₃₆₎: 1 ciclo de pre-amplificación de 30 segundos a 94°C; 35 ciclos de: 30 segundos de desnaturalización a 94°C, 30 segundos de hibridación a 55°C, y un minuto de elongación a 72 °C; seguido de 1 ciclo de 5 minutos a 72°C.

- *IFNB1*₍₆₁₁₋₇₅₁₎: 1 ciclo de pre-amplificación de 30 segundos a 94°C; 40 ciclos de: 30 segundos de desnaturalización a 94°C, 30 segundos de hibridación a 53,5 °C, un minuto de elongación a 72 °C; seguido de 1 ciclo de 5 minutos a 72 °C.

➤ Purificación

Los productos de PCR obtenidos se purificaron mediante el kit QIAquick PCR Purification Kit Protocol (Quiagen) según indica el protocolo de la casa comercial. Las muestras se resuspendieron en 80 µl de eluyente.

➤ Digestión

Se llevó a cabo la digestión de los productos de PCR purificados y el plásmido pCI (Promega, Wi, EEUU) con las enzimas NheI y XmaI (New England Biolabs, EEUU) en un volumen de reacción de 100 µl que contenía 80 µl del producto de PCR o 1 µg del plásmido, 5U (0,5µl) de NheI, 5U (0,5µl) de XmaI, BSA (albúmina sérica bovina) 1x y tampón a 50 mM de acetato de potasio, 20 mM Tris-acetato, 10 mM acetato de magnesio y 1mM de ditiotreitol a pH 7,9. Se digirió durante 4 horas a 37 °C.

➤ *Desfosforilación del plásmido pCI digerido*

El plásmido se desfosforiló para minimizar su religación en un volumen final de 120 μ l. Para la reacción, se añadieron los 100 μ l con el plásmido digerido, 2 μ l de Alkaline Phosphatase, Calf Intestinal (CIP) y tampón 1x (100mM NaCl, 50 mM Tris-HCl, 10 mM $MgCl_2$ y 1 mM de ditiotreitól a pH 7,9) (New England Biolabs).

➤ *Electroforesis con gel de agarosa*

Los productos de ADN y el plásmido cortados con los enzimas de restricción se separaron en un gel de 3g de Ultra Pure™ Agarose (Invitrogen) en 150ml de Tris-Borate-EDTA buffer 1x (Sigma). Se añadió 150 μ l de bromuro de etidio (10mg/ μ l) y se dejó secar en el recipiente durante una hora hasta su solidificación. Las muestras se cargaron con un 10% de tampón de carga. Se usó 100 bp DNA Ladder (New England Biolabs) como marcador de peso molecular que se utilizó para estimar el tamaño de los productos de ADN de las muestras. La electroforesis se llevó a cabo a 100V durante 1 hora; la corriente fue generada por el modelo Power Pac 300 (BioRad, Gran Bretaña). El gel se examinó con luz ultravioletada (254 nm) y se hicieron fotos del gel mediante un scanner de gel fluorescente. Se corroboró el tamaño de los productos de PCR.

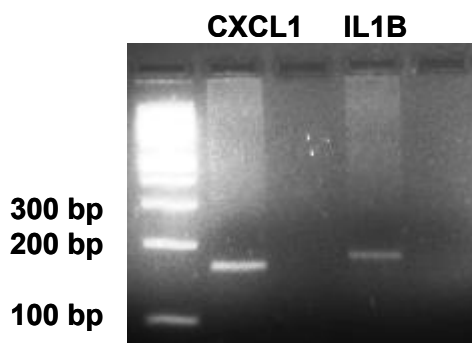


Figura 7. Ejemplo de gel de agarosa para comprobar el producto de ADN amplificado y aislar la banda de ADN deseada de los genes CXCL1 e IL1b.

➤ *Purificación de productos de PCR a partir de gel de agarosa*

La banda de ADN deseada se cortó del gel utilizando un bisturí. El fragmento de gel que contenía la banda de interés se disolvió y purificó siguiendo el protocolo del kit QIAquick Purification kit (Quiagen). Finalmente, se eluyó el producto en un volumen final de 30 μ l.

➤ *Ligación*

Para la reacción de ligación, se utilizó la enzima T4 DNA Ligase (New England BioLabs) a una concentración de 50 U/μl en un volumen final de 15μl. La reacción contenía T4 DNA Ligase Reaction Buffer a 1x y unas proporciones óptimas de inserto respecto al vector de 3:1 respectivamente. Se incubó durante 16 horas a 25°C. Se construyó un control negativo que contenía el plásmido sin el inserto.

➤ *Transformación de células competentes (E-Coli)*

El producto de la ligación se añadió a 50 μl de células competentes de E. Coli (DH5-α) (Sigma) y las muestras se incubaron en hielo durante 30 minutos. Una vez transcurridos estos 30 minutos, las bacterias se sometieron a un choque térmico de 42°C durante 55 segundos, e inmediatamente se transfirieron de nuevo al hielo durante 1-2 minutos. Se añadió 950 μl de medio LB (Sigma) en ausencia de antibiótico y se incubó durante 1 hora a 37 °C para permitir que las bacterias expresaran el gen que les da resistencia a ampicilina codificado en el plásmido. Posteriormente, se distribuyó la cantidad apropiada de las células transformadas (5, 50 y 500 μl) en placas de agar con LB que contenía 100 ug/ml de ampicilina (Sigma) para la selección de los plásmidos recombinantes. Se construyó un control positivo transformando el plásmido sin digerir y un control negativo con las bacterias sin transformar.

➤ *Clonado con TOPO TA Cloning®*

El producto de PCR de *IFNB1* ⁽⁶¹¹⁻⁷⁵¹⁾ se clonó en el vector pCR®2.1-TOPO® (Invitrogen) mediante una única reacción compuesta por el producto de PCR, solución salina, y el vector TOPO®, la cual se efectúa mediante la incubación a temperatura ambiente durante 5 minutos tal como indica el fabricante. La inserción de un producto de PCR amplificado por una *Taq* polimerasa en el vector pCR®2.1-TOPO® no necesita reacción de ligasa ni purificaciones post-PCR. Esta técnica, en cambio, se basa en que, por un lado, la Topoisomerasa I se une covalentemente al vector pCR®2.1-TOPO®, que tiene una 3'-timidina (T) colgante y así, lo linealiza. Por otro lado, el producto de PCR acaba en una deoxiadenosina (A) en el extremo 3' por acción de la polimerasa *Taq*. Los

productos de PCR entonces se ligan de manera eficiente con el vector. Una vez ligado el producto de PCR, la Topoisomerasa I se desliga del vector.

➤ *Aislamiento y producción del constructo*

Se seleccionó una colonia de la placa de agar y se inoculó en 4 ml de medio LB con 10 ug/ml de ampicilina en un tubo estéril de 15 ml y se incubó durante 15 horas a 37 °C y 200-250 rpm de agitación. Transcurridas las horas se transfirió 2 ml a un tubo de microcentrifuga y se centrifugó a 6000 rpm durante 5 minutos. Se procesó la muestra para el aislamiento del plásmido mediante el kit Miniprep (Quiagen) en la primera comprobación y maxiprep (Quiagen) para almacenar mayores cantidades del constructo para realizar la curva estándar.

➤ *Digestión con enzimas de restricción*

Con tal de comprobar que el plásmido contenía el inserto deseado, se cortó el plásmido mediante una reacción realizada en un volumen de 80µl que incluía 15 U de NheI, 15 U de XmaI, BSA 1x, y tampón a 50 mM de acetato de potasio, 20 mM Tris-acetato, 10 mM acetato de magnesio, 1mM de ditiotretitol a pH 7,9 (New England Biolabs). Se digirió durante 3 horas a 37 °C.

➤ *Gel de electroforesis de comprobación*

Los constructos digeridos con los enzimas de restricción se separaron en un gel de agarosa tal y como se ha descrito anteriormente. El gel se examinó con luz ultravioleta (254 nm) y se hicieron fotos del gel mediante un scanner de gel fluorescente. Tras corroborar que el tamaño del constructo era el correcto, se procedió a realizar un cultivo a mayor escala de la colonia que los contenía con tal de conseguir suficiente cantidad del constructo que se purificó mediante una maxiprep, como previamente se ha descrito.

➤ *Plásmidos de ADN contruídos*

- pCI-*TICAM1* ⁽¹⁸⁶⁹⁻²⁰²⁶⁾: Los 157 residuos contenidos en el gen *TICAM1* y que recubren la sonda comercial TaqMan®: Hs00706140_s1 (Applied Biosystems), fueron obtenidos a partir de ADN copia de ARN total humano con el cebador directo (AAGCTAGCTATGGGGCTCGAATGCCCTTTG generando un lugar de restricción para NheI) y el cebador indirecto (AACCCGGGAGTGACTGTGGAAAGGCTGCTG con un lugar de restricción para XmaI) y fueron clonados en el plásmido pCI.
- pCI-*MYD88* ⁽⁴⁵⁶⁻⁵⁸²⁾: El fragmento de 126 residuos, presentes en el gen *MYD88* y que comprenden la sonda comercial Taqman®: Hs00182082_m1 (Applied Biosystems), se obtuvo a partir de ADN copia de ARN total humano con el cebador directo (AAGCTAGCTCGAGCTGCTTACCAAGCTG con un lugar de restricción para NheI) y el cebador indirecto (AACCCGGGGCCACCTGTAAAGGCTTCTC que generaba un lugar de restricción para XmaI) y fue clonado en el plásmido pCI.
- pCI-*CXCL10* ⁽⁹⁶⁻²⁴⁵⁾: Los 149 residuos presentes en el gen *CXCL10*, y que comprenden la sonda comercial TaqMan®: Hs00171042_m1 (Applied Biosystems), se amplificaron a partir de ARN total humano retrotranscrito utilizando el cebador directo (AAGCTAGCGCTGCCTTATCTTTCTGACTC con un lugar de restricción para NheI) y el cebador indirecto (AACCCGGGGTGGACAAAATTGGCTTGC que generaba un lugar de restricción para XmaI) y fueron clonados en el plásmido pCI.

- pCI-*IL1B* (490-649): El fragmento de 159 nucleótidos incluidos en el gen *IL1B* y que cubre la sonda comercial TaqMan®: Hs00174097_m1 (Applied Biosystems), fue amplificado a partir de ARN total humano retrotranscrito, utilizando el cebador directo (AAGCTAGCGTGATGTCTGGTCCATATGAAC generando un lugar de restricción en NheI) y el cebador indirecto (AACCCGGGCGCAGGACAGGTACAGATTC con lugar de restricción en XmaI) y fue clonado en el plásmido pCI.
- pCI-*TNF* (368-536): El fragmento de 168 residuos contenidos en el gen de *TNF*, y que comprenden la sonda comercial TaqMan: Hs00174128_m1 (Applied Biosystems®) fue obtenido a partir de ADN copia de ARN total humano, utilizando el cebador directo (AAGCTAGCCTCTCTCTAATCAGCCCTCTG con un lugar de restricción en NheI) y el cebador indirecto (AACCCGGGGGTTATCTCTCAGCTCCACG que genera un lugar de restricción en XmaI) y fue clonado en el plásmido pCI. (figura 8)

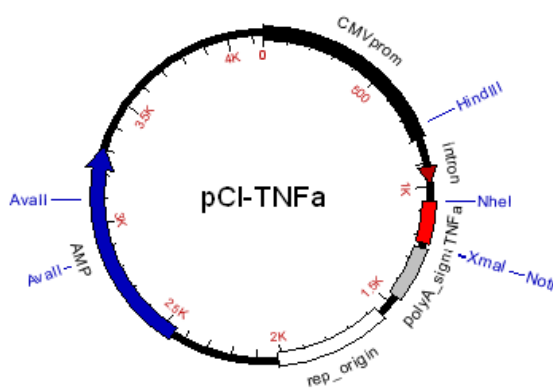


Figura 8. Ejemplo del constructo de pCI-TNFα

- pCR®2.1-TOPO®-*IFNB1* (611-751): El fragmento de 140 residuos incluidos en el gen *IFNB1* y que cubre la sonda comercial TaqMan®: Hs01077958_s1 (Applied Biosystems) fue obtenido a partir de ADN copia de ARN total humano, utilizando el cebador directo (AAGCTAGCACAGACTTACAGGTTACCTCC) y el cebador indirecto (AACCCGGGCTAGTGTCTTTCATATGCAGTAC) y fue clonado en el plásmido pCR®2.1-TOPO®.

- *Cálculo de la masa de una copia de cada constructo y elaboración de curva estándar*

La masa de una copia del constructo se obtuvo multiplicando la longitud del plásmido (bp) por el número de Avogadro.

$$M = [n] \times [1,096 \times 10^{-21}] = \text{tamaño del plásmido/copia}$$

Ejemplo:

pCI – TNF *pCI – TNF*_(368–536). Tiene 4144 pb.

$$M = 4144pb \times 1,096 \times 10^{-21} g/pb = 4,54 \times 10^{-18}$$

Se hicieron cálculos para conseguir 3E+6 copias/2µl del constructo como el primer estándar, con el cual se hizo un banco de diluciones de factor 10 (3E+6 a 3E+1) con agua libre de RNAsas. (figura 9)

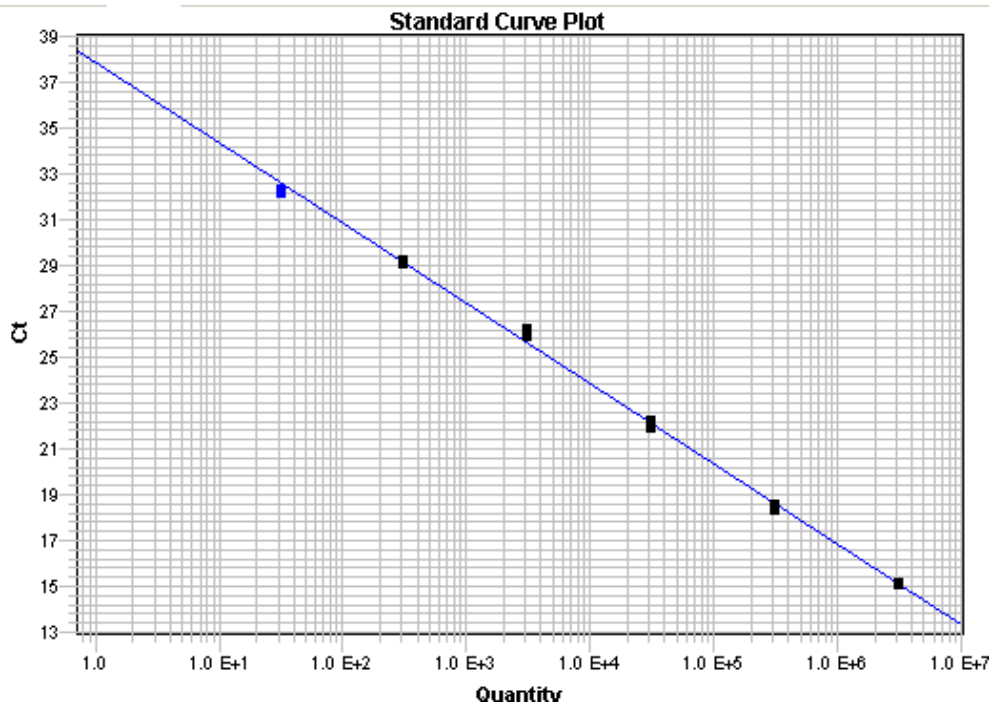


Figura 9. Ejemplo de la curva estándar generada con los constructos.

d. Cuantificación absoluta por PCR a tiempo real

Se cuantificó de manera absoluta la expresión génica de *IFNB1* (*interferon, beta 1, fibroblast*), *CXCL10* (*chemokine (C-X-C motif) ligand 1*), *IL1B* (*interleukin 1 beta*), *TNF* (*tumor necrosis factor*), *MYD88* (*myeloid differentiation primary response gene (88)*) y *TICAM1* (*toll-like receptor adaptor molecule 1*) mediante PCR a tiempo real. Esta técnica se basa en la actividad 5' nucleasa de la taq DNA polimerasa. Las sondas TaqMan® presentan un fluorocromo en el extremo 5' y un *quencher* en el extremo 3', capaz de inhibir la emisión de luz del fluorocromo cuando se encuentra en su proximidad. Cuando la reacción de polimerización ocurre, la enzima disgrega la sonda, lo que produce la separación física del fluorocromo y el *quencher*. A medida que se amplifique la muestra, la intensidad de la fluorescencia aumentará. Por tanto, una mayor cantidad de ADNc molde, proveniente de ARNm, en el inicio de la reacción, significará una mayor rapidez en alcanzar la fase exponencial de la amplificación de la fluorescencia.

El equipamiento utilizado fue el termociclador ABI-Applied Biosystems 7900 HT (Applied Biosystems) y se realizó en el soporte de las placas ópticas de 384 pocillos. Cada reacción contenía 2µl de estándar o muestra de ADN copia, 5µl de la mezcla de reacción de TaqMan Universal PCR Master Mix, No AmpErase®, UNG, 0,5 µl de la sonda correspondiente de TaqMan® Gene expression assay (Applied Biosystems) (Tabla 1), y 2,5 µl de agua libre de RNAsas con el programa de temperaturas sugerido por el fabricante. Las muestras se determinaron por duplicado. El análisis se realizó mediante la aplicación de cuantificación absoluta del software SDS 2.3 (Applied Biosystems), el cual realizaba una curva estándar contrastando el número de copias de constructo con el ciclo del umbral correspondiente. A partir de la curva, se extrapolan los ciclos del umbral de cada muestra y se obtiene el número de copias de ARNm del gen específico.

GEN	SONDA Taqman®
<i>TICAM1</i>	Hs00706140_s1
<i>MYD88</i>	Hs00182082_m1
<i>CXCL10</i>	Hs00171042_m1
<i>IL1B</i>	Hs00174097_m1
<i>TNFa</i>	Hs00174128_m1
<i>IFNB1</i>	Hs01077958_s1

Tabla 1. Listado de sondas TaqMan® utilizadas en la cuantificación absoluta

e. Cuantificación relativa por PCR a tiempo real

Se cuantificó la expresión génica de manera relativa de los genes: *TYK2* (tyrosine kinase 2), *PTPN6* (protein tyrosine phosphatase, non-receptor type 6; también conocido como *SHP1*), *PTPN11* (protein tyrosine phosphatase, non-receptor type 11; también conocido como *SHP2*), *SARM1* (sterile alpha and TIR motif containing 1), *IRAKM* (interleukin-1 receptor-associated kinase 3), *SIKE* (suppressor of IKBKE 1), *SIGIRR* (single immunoglobulin and toll-interleukin 1 receptor (TIR) domain), y *RIPK3* (receptor-interacting serine-threonine kinase 3) mediante PCR a tiempo real (table 2). El equipo utilizado fue el termociclador ABI-Applied Biosystems 7900 HT (Applied Biosystems) con el soporte de las placas ópticas de 384 pocillos. Cada reacción contenía 2µl de muestra de ADN copia, 5µl de la mezcla de reacción de TaqMan Universal PCR Master Mix, No AmpErase®, UNG, 0,5 µl de la sonda correspondiente de TaqMan® Gene expression assay (Applied Biosystems), y 2,5 µl de agua libre de RNasas. El programa de temperaturas utilizado fue el sugerido por el manufacturante. Las muestras se determinaron por duplicado. El análisis se realizó mediante la aplicación de cuantificación relativa del software SDS 2.3 (Applied Biosystems). A cada valor de ciclo umbral (Ct) de cada gen analizado se le sustrajo el Ct del gen endógeno *GAPDH* (glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase) que se empleó para la normalización de la cantidad de ADN copia utilizada. De esta manera, se obtuvieron los valores de expresión génica normalizada para estos genes (Δ CT).

GEN	SONDA TaqMan®
<i>SARM1</i>	Hs00248344-m1
<i>IRAKM</i>	Hs00936103-m1
<i>SIKE</i>	Hs00228162_m1
<i>TYK2</i>	Hs00177464_m1
<i>SIGIRR</i>	Hs00222347_m1
<i>RIPK3</i>	Hs00179132_m1
<i>PTPN6</i>	Hs00169359_m1
<i>PTPN11</i>	Hs00275784_m1
<i>GAPDH</i>	Hs99999905_m1

Tabla 2. Listado de sondas TaqMan® utilizadas en la cuantificación relativa

4. Experimentos de inducción de IFN- β

Las CMSP provenientes de pacientes con EMRR (respondedores y no respondedores) y controles sanos se descongelaron añadiendo medio completo de manera paulatina. Tras un lavado con PBS 1x, se sembraron 2×10^6 de células y se incubaron en 1 ml de medio completo en presencia o ausencia de 100 U/ml de IFN- β 1b (Betaferon®) durante 24 horas. Tras el tiempo de incubación, se recogieron las células y se lisaron para extraer su ARN (descrito anteriormente). Posteriormente, tras retrotranscribir el ARN total, se determinaron los niveles de expresión génica del gen *IFNB1* por cuantificación absoluta por PCR a tiempo real tal y como se ha descrito anteriormente. En este experimento *in vitro* se utilizó una n de 5 pacientes NR, 5 pacientes R y 5 controles sanos.

5. Análisis estadístico de resultados

El test de Kruskal-Wallis es un test no paramétrico que analiza las varianzas y que difiere de la prueba de ANOVA porque no asume normalidad en los datos. Se utilizó este test con tal de analizar las diferencias entre grupos que pudieran existir antes del inicio del tratamiento en los niveles de suero de Hsp70, los niveles de expresión de TLR4, TLR2 e IFNAR1 en la membrana de monocitos y los niveles de expresión génica de componentes de la vía de los IFNs de tipo I y de TLR4 así como de genes reguladores. Cuando existieron diferencias significativas ($p < 0,05$), se procedió a realizar un test de Mann-Whitney para estudiar las diferencias entre grupos. En los pacientes con EM, se utilizó la prueba de los signos de Wilcoxon para comparar los niveles de expresión de TLR4, TLR2 e IFNAR1 y de los niveles de expresión de los genes de la vía del TLR4 e IFNs de tipo I antes y después de 12 meses de tratamiento con IFN- β . Este test compara medianas de dos muestras relacionadas y determina si existen diferencias entre ellas. Las diferencias en la expresión en *IFNB1* entre grupos antes y después de la inducción de IFN- β *in vitro* se analizaron mediante un T test pareado. La asociación lineal entre las variables clínicas y radiológicas y los niveles de moléculas medidas se determinó por el coeficiente de correlación de Spearman. Se utilizó la corrección de Bonferroni para corregir el valor alfa por comparaciones múltiples en los análisis de correlación (alfa=0,003) y las comparaciones de los niveles de expresión de genes reguladores clave de la vía del TLR4

y la vía de IFNs de tipo I ($\alpha=0,006$). Los análisis estadísticos se realizaron con el paquete software SPSS 15.0 (SPSS, IL, USA) para MS- Windows.

(ii) Metodología relacionada con el objetivo 2

“Caracterizar el perfil monocitario de sangre periférica en pacientes con EMRR según su respuesta al tratamiento a IFN- β ”

1. Pacientes

Se incluyeron 20 pacientes con EMRR, de los cuales, 10 (50%) eran R, 7 NR y 3 IR. Dado que en los resultados del estudio correspondiente al objetivo 1 se encontraron características similares entre los pacientes estrictamente no respondedores y los pacientes con una respuesta intermedia, se decidió agruparlos en un solo grupo denominado como no respondedores (NR). Además, se incluyeron 10 controles sanos al estudio. Estos pacientes tampoco habían recibido tratamiento con IFN- β u otro inmunosupresor previamente al inicio del estudio. Ningún paciente había presentado brotes o había recibido tratamiento con corticosteroides durante el mes previo al inicio del tratamiento.

2. Separación de la población monocitaria

Las CMSP extraídas de pacientes con EMRR y controles sanos se descongelaron añadiendo medio completo de manera paulatina. Tras un lavado con PBS 1x (Gibco®), se marcaron con el anticuerpo mouse anti-human-CD14 conjugado con APC (Pharmingen) en una incubación de 25 minutos a temperatura ambiente y oscuridad. Tras dos lavados, se resuspendieron en 300 μ l de PBS 1x (Gibco®) y se separaron mediante el separador celular Legacy MoFlo (Beckman Coulter). Esta separación se realizó en el servicio de la Unidad Científico-Técnica de Apoyo (UCTS) del Instituto de Investigación del Hospital Vall d’Hebron. La separación de los monocitos del resto de CMSP se realizó basándose en su tamaño y complejidad celular y en su positividad para el marcador CD14. La metodología de sorting se ajustó para conseguir un mínimo de 99% de especificidad. El número de

monocitos obtenidos oscilaron entre 80.000 y 800.000 dependiendo de la muestra de partida.

3. Extracción de ARN de monocitos aislados

Inmediatamente después de la separación de los monocitos, las muestras se centrifugaron a 310g durante 5 minutos. Se eliminó el sobrenadante y se lisaron utilizando el protocolo de kit Quiashreder™ (Quiagen), tal y como se ha descrito anteriormente. El homogenado de células se congeló a -80°C. Posteriormente, se descongeló el lisado y se extrajo el ARN total con el kit RNeasy Mini Kit (Quiagen). Las muestras se procesaron según el protocolo del fabricante y se añadió un paso de degradación de ADN mediante la enzima DNasa I (Quiagen). Las muestras de ARN total se eluyeron en 16µl de agua libre de RNasas y se congelaron a -80°C.

4. *Microarrays* de expresión

Los *microarrays* de expresión se procesaron en la UAT (unidad de alta tecnología) del Instituto de Investigación del Hospital Vall d'Hebron. A continuación, se detallará su proceso también ilustrado en la figura 10.

Primero, se amplificó el ARN total con tal de obtener una cantidad suficiente para la hibridación en los *microarrays*. Para ello, se utilizó el sistema *Ovation Pico WTA System* (Nugen, CA, USA). Tal y como describe el protocolo recomendado por la casa comercial, a partir del ARN total se sintetizó ADNc monocatenario utilizando cebadores aleatorios para después convertirlo a ADNc bicatenario. El ADNc bicatenario se utilizó como molde en una reacción de amplificación de la cual resultaron numerosas moléculas de nuevos ADNc monocatenarios. Estas moléculas se purifican utilizando un procedimiento con bolitas magnéticas. Su calidad, dimensiones y concentración se testaron por el equipo Bioanalyzer 2100 (Agilent Technologies, CA, USA).

Posteriormente, se marcó y fragmentó 5 µg de ADNc monocatenario mediante el kit *Ovation Biotin Module* (Nugen) y se evaluó el estado y la calidad de los fragmentos con el mismo equipo (Bioanalyzer 2100). La muestra fragmentada se añadió a la mezcla de

hibridación. La mezcla de hibridación contenía el oligonucleótido control B2 (50pM) y los controles de hibridación eucarióticos (BioB, BioC, BioD,cre) a una concentración final de 1,5; 5; 25 y 100 pM respectivamente suministrados por el kit GeneChip Eukariotyc Hybridation Control Kit (Affymetrix, CA, EEUU), ADN de esperma de arenque (0,1 mg/ml) y BSA acetilado (0,5 mg/ml). Por otro lado, la sonda del *array* se equilibró a temperatura ambiente y se prehibridó con tampón de hibridación 1x (100mM MES, [Na+] 1 M, EDTA 20mM, 0,01% Tween 20) a 45°C durante 10 minutos en movimiento rotatorio. Finalmente, 100 µl de la mezcla de hibridación junto con la muestra se utilizaron para la hibridación al *array Affimetrix Human Genome U219* (Affymetrix Genechip® array, CA, USA) que se llevó a cabo a 60°C durante 16 horas en una plataforma *GeneTitan*. Esta plataforma automatiza la hibridación, lavado y escaneado de los *arrays*. Una vez hibridado, se lavó el *GeneChip* y se marcó con estreptavidina-ficoeritrina utilizando el protocolo EukGE-WS2-v5 que proporciona Affymetrix. Finalmente, el *GeneChip* se escaneó y se procesó en el software de Affymetrix AGCC. Cabe destacar que el *array* utilizado, *Human Genome U219 array*, permite realizar una cobertura de alto rendimiento del perfil de expresión génica abarcando más de 36.000 transcritos que representan más de 20.000 genes.

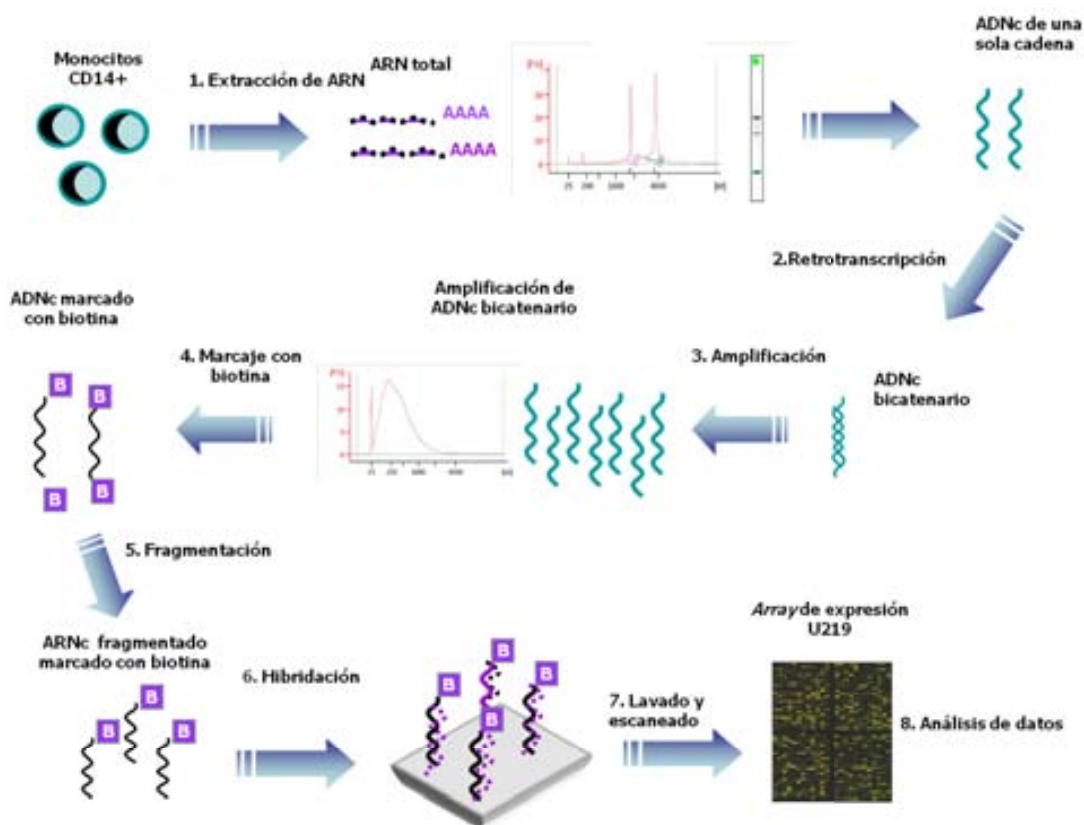


Figura 10. Esquema de la consecución de los pasos del protocolo para la realización de la técnica de los *microarrays* de expresión a partir de la sub-población monocitaria.

5. Análisis de los datos de expresión génica con *microarrays* de expresión

El análisis de los datos obtenidos por *microarrays* de expresión se llevó a cabo mediante los paquetes de Bioconductor en el entorno de programación de R. Todos los chips fueron explorados uno por uno por su calidad. Todos excepto uno pasaron el procedimiento de control de calidad. La señal de distribución de los histogramas (logarítmico) para los *arrays* fue muy similar con un pico de distribución que caía en torno al intervalo de 1,5-2,5, mientras que el *array* descartado caía en un intervalo de 2,5-4,5. Se preprocesaron los datos de los archivos .CEL con el método RMA (*probeset-level-log scaled robust multiarray analysis*) a través del software *Affymetrix Expression Console*. Este modelo se utilizó para identificar genes diferencialmente expresados entre los pacientes respondedores y los pacientes no respondedores. Se realizó el t test de dos muestras (*two-sample t-test*) y se consideraron significativos los genes diferencialmente expresados entre los pacientes respondedores y los no respondedores con un valor p por debajo de 0,01.

Para el estudio funcional elegimos los genes que estaban diferencialmente expresados entre respondedores y no respondedores con un valor p por debajo de 0,01. Estos genes se analizaron con el software *Ingenuity Pathways Analysis, Gene Ontology* (IPA).

Con tal de observar la similitud de los perfiles de expresión de las diferentes vías entre los 3 grupos de estudio (respondedores, no-respondedores y los controles sanos), calculamos la distancia de Euclides mediante la siguiente fórmula:

$$\rho(Gr_1, Gr_2) = \sqrt{\sum_{i=1}^{i=N} (DEG_i(Gr_1) - DEG_i(Gr_2))^2}$$

La elaboración del listado de genes que estaban diferencialmente expresados entre los dos grupos y pertenecían a las vías de señalización seleccionadas como destacables se realizó con el soporte de IPA. Además, se complementó la información mediante búsqueda bibliográfica debido a que no todos los genes de los correspondientes grupos están registrados en la base de datos de IPA.

(iii) Metodología relacionada con el objetivo 3

“Identificar genes relacionados con la respuesta al IFN- β mediante un abordaje farmacogenómico en pacientes con EMRR de genes pertenecientes a la vía de los TLR y la vía de los IFNs de tipo I “

1. Pacientes

Se incluyeron un total de 1385 pacientes con EMRR tratados con IFN- β y con un seguimiento clínico de al menos dos años realizado en diferentes hospitales de diferentes países y regiones (listado a continuación). En la primera fase del estudio, se incluyeron 830 pacientes con EMRR clasificados por su respuesta al tratamiento. Aproximadamente la mitad de ellos, 416, eran respondedores y los otros 414 pacientes se clasificaron como no respondedores. En la segunda fase del estudio, se incluyeron 555 pacientes con EMRR, de los cuales, 281 eran respondedores y 284 no respondedores.

Los hospitales y/o grupos de investigación colaboradores de este estudio son:

- Pole des neurosciences et INSERM U1043, Université de Toulouse III, Hospital Purpan, Toulouse, Francia.
- Univesidad de Rostock, Departamento de Neurología, Rostock, Alemania.
- Departamento de Neurología, John Hunter Hospital, Newcastle, Australia.
- Servicio de Neurología, Hospital Clínico San Carlos, Madrid, España.
- Servicio de Neurología, Instituto de Neurociencias Clínicas, Hospital Regional Universitario Carlos Haya, Málaga, España.
- Departamento de Neurología e Inmunología, Hospital Ramón y Cajal, Madrid
- Neuroinmunología, Hospital Universitario Puerta de Hierro, Madrid, Espaa
- IKERBASQUE, Fundación vasca por la ciencia, Bilbao, España.
- Clínica de neurología, Centro clínico de Servia (CCS), Facultad de Medicina, Universidad de Belgrado, Serbia.
- Instituto de neurología experimental (INSPE) y departamento de neurología, Instituto científico San Raffaele, Milán, Italia.
- Departamento de Neurología, St. Josef-Hospital, Ruhr-University Bochum, Alemania.

- Departamento de Neurología, School of Medicine University of California, San Francisco, CA, Estados Unidos.
- Departamento de Neurología, VU Medical Center, Amsterdam, Países bajos.

Las muestras de ADN se enviaron y centralizaron en nuestro centro de investigación y se analizaron en dos fases. En la primera fase, se genotiparon 830 pacientes con EMRR, 414 de ellos clasificados como no respondedores y 416 como respondedores. En esta fase de *screening*, se seleccionaron 246 SNPs localizados en genes relacionados con la vía del TLR4 y de los IFNs de tipo I. Posteriormente, se realizó una segunda fase de validación en la que se incluyeron 555 pacientes con EMRR, de los cuales 274 habían sido clasificados como no respondedores y 281 como respondedores. En esta fase se genotiparon 6 SNPs, los cuales habían obtenido una significación estadística en el análisis alélico de la primera fase. Los criterios que se utilizaron para seleccionar estos SNPs fueron que en el análisis alélico obtuvieran un p valor menor de 0,02 o que en el caso del SNP localizado en IFNAR1 existiera una evidencia funcional que lo justificara además de un p valor menor de 0,05. En resumen, se testaron 1385 pacientes con EMRR en dos fases diferentes. En la primera fase se genotiparon 830 pacientes y 246 SNPs y en la fase de validación se genotiparon 555 pacientes y 6 SNPs.

2. Elección de polimorfismos de un sólo nucleótido

El primer paso para la elección de los SNPs a genotipar fue determinar una lista de genes de interés. Los genes seleccionados formaban parte de la vía del TLR4 y/o de la vía del interferón de tipo I y su elección se basó en la búsqueda bibliográfica. Una vez delimitada esta lista de genes, utilizamos la herramienta informática online www.sysnps.org para elegir los polimorfismos que mejor representaban la región genética con desequilibrio de ligamiento que cubría cada gen “tagSNPs”. Los criterios utilizados fueron que la frecuencia alélica del alelo menor (MAF) fuera mayor de 0,1 y se escogió con preferencia los SNPs que tenían un posible cambio funcional o que fueran intragénicos y que a su vez, cubrieran con amplitud el bloque de desequilibrio de ligamiento de los genes escogidos.

3. Procesamiento de muestras

Se recogieron muestras de ADN de pacientes con EMRR de diferentes procedencias, centralizando en el Cemcat su recogida y procesamiento. Las muestras provenientes de nuestro centro se extrajeron a partir de sangre periférica. Muy brevemente, en un primer paso se recogieron los leucocitos de sangre periférica mediante centrifugación de la sangre completa y se lisaron los restos de eritrocitos mediante la acción del tampón de lisis RBC (red blood cells) (NH_4Cl 14mM, NaHCO_3 1mM, Na_2EDTA 1 mM) (Sigma). Posteriormente, se lisaron los leucocitos al exponerlos durante toda la noche a 37 °C al tampón Nuclei lisis (NaCl 0,2 M, Tris-HCl 10mM, Na_2EDTA 2 mM, 0,2% de dodecilsulfato sódico (SDS)) (Sigma) y a la proteinasa K a 1mg/ml (Roche, Suiza) con tal de degradar las proteínas. Al día siguiente, se agregó acetato de amonio 7,5 M (Sigma) frío y se centrifugó a 3250 rpm durante 20 minutos para eliminar los restos celulares. Se recogió la fase superior del tubo donde se encuentra el ADN y se agregó una parte igual de etanol absoluto (Sigma) para precipitar el ADN. Una vez el ADN había precipitado, se lavó con etanol al 70% y finalmente se diluyó en tampón Tris-EDTA (Sigma). Las muestras utilizadas en la primera fase del estudio tenían una concentración de 50 ng/ μl y poseían un ratio A260/280 alrededor de 1,9 medido mediante el espectrofotómetro Nanodrop 1000 (Thermo scientific, CA, USA). Las muestras de ADN utilizadas en la segunda fase del estudio tenían una concentración de 20 ng/ μl diluidas en el mismo tampón y también con buena calidad.

4. Genotipado de la primera fase

El genotipado se realizó con la tecnología Golden Gate (Illumina, CA, EEUU) en el centro especializado en genética PROGENIKA (Vizcaya, España). Esta técnica permite genotipar hasta 3072 SNPs por muestra. Para ello, en un primer paso, las muestras de ADN se activaron uniéndolas a partículas paramagnéticas. Una vez activadas se hibridaron con los oligonucleótidos del ensayo. En esta técnica se utilizan 3 oligonucleótidos diseñados para cada SNP, dos de ellos son específicos para cada alelo del SNP, *allele specific oligos*, (ASO1 y ASO2) y el tercero hibrida con una región del locus cercana al SNP, *locus-specific oligo* (LSO). Además, los 3 oligonucleótidos contienen regiones de

complementariedad genómica con cebadores universales (P1, P2 y P3, respectivamente) y el LSO también aloja una secuencia única específica para un tipo de *bead*. De esta manera se pueden testar hasta 1536 SNPs al mismo tiempo. Esta hibridación se hace previo a cualquier amplificación y posteriormente, se extiende el ASO correspondiente hasta que se une al LSO. Este producto se utiliza como molde para la posterior amplificación realizada con los cebadores universales: P1, P2 y P3, de los cuales P1 está marcado con cianina 3 (Cy3) y P2 con Cy5. Posteriormente, se hibridan al *matrix array* o *beadchip* para proporcionar una superficie sólida donde realizar la lectura individual de los genotipados de cada SNP. Finalmente, un analizador de fluorescencia procede a la lectura del *matrix array* y se procesan los resultados mediante un software que agrupa y nombra los genotipos de cada SNP.

5. Genotipado de la segunda fase

En el genotipado de los SNPs seleccionados para la segunda fase se utilizó la tecnología de genotipado basado en las sondas TaqMan®. Esta técnica incorpora la tecnología *minor groove binder* (MGB) en el extremo 3' que permite realizar una discriminación alélica. Las sondas TaqMan® contienen la molécula MGB unida a un *quencher* (NFQ) en el extremo 3' y un fluorocromo (FAM para un alelo, VIC para el otro alelo) en el extremo 5'. La molécula MGB se une al surco menor de la hélice de ADN, mejorando la hibridación y estabilidad de las sondas específicas. El *quencher* elimina la fluorescencia de fondo e inhibe la emisión de fluorescencia por el fluorocromo cuando está cercano a él, es decir, cuando la sonda está intacta. La amplificación se realiza en un termociclador y analizador de fluorescencia. El ADN molde hibrida con los cebadores y la sonda y se amplifica mediante una enzima con actividad exonucleasa 5', que rompe la sonda TaqMan liberando el fluorocromo de la cercanía del *quencher*. De esta manera emite luz a una determinada longitud de onda que es captada por el analizador. De modo que si por ejemplo, el ADN molde es homocigoto para el alelo A, se observa fluorescencia en el rango de emisión de FAM, si es homocigoto para B, se capta fluorescencia en el rango de emisión de VIC. Y si por el contrario, es heterocigoto (AB), se emitirá fluorescencia en los rangos de emisión de FAM y de VIC.

El equipo empleado fue el termociclador ABI-Applied Biosystems 7900 HT (Applied Biosystems) y las reacciones se llevaron a cabo con el soporte de las placas ópticas de 384 pocillos. Cada reacción contenía 1µl de muestra de ADN, 2,5µl de la mezcla de reacción de TaqMan Universal PCR Master Mix, No AmpErase®, UNG, 0,25 µl de la sonda correspondiente de TaqMan® SNP Genotyping assay (Applied Biosystems) 40x previamente diluída ½ en tampón Tris-EDTA (Sigma) (Tabla 3) y 1,75 µl de agua libre de RNasas y se llevó a cabo el programa de temperaturas sugerido por el fabricante. Tras la amplificación, se realizó una lectura de la fluorescencia a la que se le sustrajo la lectura previa a la amplificación. El análisis se realizó mediante la aplicación de discriminación alélica del software SDS 2.3 (Applied Biosystems), el cual agrupa las muestras según su genotipo, basándose en la fluorescencia captada.

SNP (gen)	Sonda TaqMan®
Rs10958713 (IKBKB)	C__31336747_10
Rs3747517 (IFIH1)	C_25984418_10
Rs2277302 (PELLI3)	C__1441952_10
Rs6597 (STUB1)	C__7576829_10
Rs4422395 (CXCL1)	C_27916412_10
Rs2834202 (IFNAR1)	C__26796012_20

Tabla 3. Listado de sondas TaqMan® genotyping assay utilizados en el genotipado de la segunda fase.

6. Análisis de los resultados genéticos

Los resultados se analizaron en el Instituto de Biología Evolutiva UPF-CSIC) en el Parc de Recerca de Biomedicina de Barcelona (PRBB) tal y como se describe a continuación.

En primer lugar, se eliminaron del análisis los SNPs y las muestras que habían tenido un bajo éxito de genotipado. Seguidamente, se calculó y comprobó que la ley del equilibrio de Hardy Weinberg se cumpliera en todos los SNPs. El equilibrio Hardy Weinberg establece que las frecuencias alélicas y genotípicas se mantienen constantes de generación en generación. Para ello, se utilizó el software SNPator, herramienta de ambiente web con funciones para analizar estadística genómica. Para analizar las

diferencias en la frecuencia alélicas entre los pacientes respondedores y no respondedores se estratificaron los individuos dependiendo del origen del hospital mediante el test Cochran-Mantel-Haenszel implementado en PLINK (194). Las diferencias en las frecuencias alélicas entre los respondedores y los no respondedores en cada uno de los hospitales se calcularon utilizando el test de chi cuadrado de Pearson en SNPator (195).

RESULTADOS

RESULTADOS

De la misma manera que en el apartado de los materiales y métodos, los resultados corresponden a cada uno de los objetivos de esta tesis.

(i) Resultados relacionados con el objetivo 1

“Determinar la expresión de genes de la vía de los TLR y la vía de los IFNs de tipo I en la respuesta al IFN- β en pacientes con esclerosis múltiple remitente recurrente (EMRR).

“

Nuestro primer objetivo tal y como está indicado, fue el de estudiar la expresión de genes de la vía del TLR4 y la vía de los IFNs de tipo I en la respuesta a IFN- β en pacientes con EM. Para ello, se realizaron mediciones de la expresión proteica y/o génica de ciertos componentes de las vías de señalización mencionadas en pacientes con EMRR tratados durante al menos dos años con IFN- β . Los pacientes incluidos en el estudio fueron clasificados como respondedores (R), respondedores intermedios (IR) y no respondedores (NR) según los criterios clínicos mencionados en materiales y métodos. Se analizaron CMSP extraídas de estos pacientes en dos tiempos diferentes: a nivel basal, es decir, antes del inicio del tratamiento y transcurridos doce meses de tratamiento con IFN- β . Además, se incluyó un grupo de controles sanos. En la figura 11 se ejemplifican los componentes de las vías del TLR4 e IFNs de tipo I evaluados en este estudio. Nombradas como A, se señalizan las moléculas estudiadas a nivel proteico (HSP70, TLR2, TLR4 e IFNAR1). Señaladas como B, los genes estudiados a nivel de ARNm mediante cuantificación absoluta. Y finalmente, nombradas como C, las moléculas cuya expresión génica se analizó mediante cuantificación relativa con un gen endógeno. A continuación, se detallarán los resultados obtenidos de estas determinaciones.

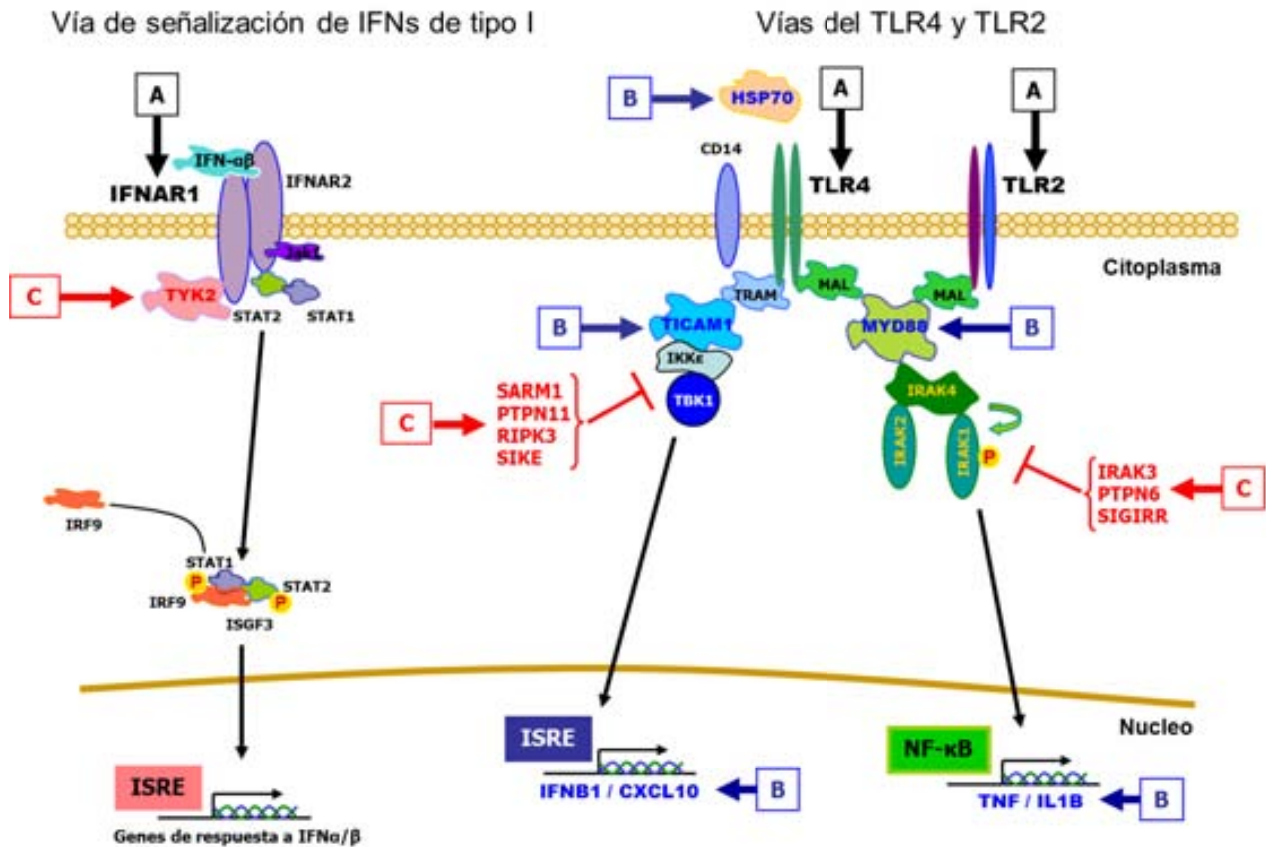


Figura 11. Descripción de las vías del TLR4 y de los IFNs de tipo I y señalización de los genes o proteínas estudiadas

1. Descripción clínica y radiológica de los pacientes con EM incluidos en el estudio

Los pacientes con EM que se incluyeron en este estudio iniciaron tratamiento y se controlaron en el Cemcat. El equipo de neurólogos de la unidad recogió todos los datos clínicos que posteriormente nos permitieron aplicar los criterios de respuesta al tratamiento con IFN- β . En la Tabla 4, se muestran las características clínicas, demográficas y radiológicas de estos pacientes, tanto a nivel global como tras la clasificación basada en la respuesta al tratamiento. Además, se exponen las características demográficas de los controles sanos incluidos en el estudio. Exceptuando la puntuación en la escala del EDSS, los diferentes grupos de pacientes (R, IR y NR) fueron comparables para todas las variables demográficas, clínicas y radiológicas (Tabla 4). La tendencia observada en la puntuación basal de EDSS en el grupo de NR respecto al grupo de R es una característica que ya había sido descrita previamente (166, 179).

2. Comparaciones entre los pacientes de EM antes del inicio del tratamiento y los controles sanos

En esta sección se reflejarán los resultados de la expresión de las moléculas descritas en la figura 11 a nivel basal en los pacientes con EM y en los controles sanos. Las muestras de partida fueron CMSP aisladas de pacientes con EM y de controles sanos. En el caso de los pacientes con EM, las muestras fueron extraídas antes del inicio del tratamiento con IFN- β .

a. La expresión basal del TLR4 en monocitos está disminuida en los pacientes con EM independientemente de la respuesta clínica al IFN- β

Mediante citometría de flujo se analizó la expresión de TLR4 en los monocitos de pacientes con EM a nivel basal y de controles sanos. Los monocitos fueron seleccionados por su tamaño y complejidad y la expresión de la molécula se determinó por dos medidas. El porcentaje y la MFI (intensidad media de fluorescencia). De modo aclaratorio, el valor porcentual nos proporciona el porcentaje de monocitos que presentan la molécula en estudio y la MFI estima la cantidad de la molécula presente en el conjunto de los monocitos.

Características basales	CS	EM ^d	Valores P ¹	R	IR	NR	Valores P ²
<i>n</i>	32	85	-	49	18	18	-
<i>Edad (años)</i>	33,9 (9,9)	34,3 (8,3)	0,814	33,7 (7,8)	33,8 (8,4)	36,3 (9,6)	0,514
<i>Mujer/hombre (% mujer)</i>	26/6 (81,3)	66/19 (77,6)	0,672	36/13 (73,5)	14/4 (77,8)	16/2 (88,9)	0,406
<i>Duración de la enfermedad (años)</i>	-	4,3 (4,4)	-	3,6 (3,7)	4,4 (4,6)	6,1 (5,8)	0,123
<i>EDSS^a</i>	-	2,0 (1,5-2,5)	-	1,9 (1,5-2,5)	2,2 (1,5-2,6)	2,4 (1,9-3,5)	0,055
<i>Número de brotes^b</i>	-	1,5 (0,7)	-	1,5 (0,8)	1,5 (0,7)	1,5 (0,5)	1,000
<i>Número de lesiones captantes de Gd</i>	-	2,6 (5,3)	-	1,9 (3,3)	4,8 (9,0)	1,4 (1,9)	0,112
<i>T2LL^c</i>	-	0,7 (0,7)	-	0,7 (0,7)	0,8 (0,9)	0,8 (0,7)	0,640
<i>Tipo de IFNβ [n (%)]</i>							
<i>IFNβ 1a IM</i>	-	25 (29,4)	-	14 (28,6)	6 (33,3)	5 (27,8)	
<i>IFNβ 1b SC</i>	-	24 (28,2)	-	13 (26,5)	4 (22,2)	7 (38,9)	0,815
<i>IFNβ 1a SC</i>	-	36 (42,4)	-	22 (44,9)	8 (44,4)	6 (33,3)	

Tabla 4. Características demográficas, clínicas y radiológicas basales de los pacientes con EMRR y los controles sanos incluidos en el estudio. Los datos se representan como la media (desviación estándar) a no ser que sea especificado de otra manera. ^a Los datos se expresan como media (rango intercuartil). ^b Se refiere al número de brotes en los dos años previos al inicio del tratamiento. ^c Se disponía de datos de resonancia magnética (RM) de 72 pacientes, 47 respondedores, 18 respondedores intermedios y 7 no respondedores). ^d Se refiere al grupo total de pacientes con EM. EDSS: Escala de estado de discapacidad expandido. IM: intramuscular. SC: subcutáneo. R: respondedores a IFN-β. IR: respondedores intermedios a IFN-β. NR: no respondedores a IFN-β. ^c T2LL: carga lesional en T2 expresado como porcentaje del total del contenido cerebral. Valores P¹: Se refiere a los valores p obtenidos tras comparar las medias del grupo total de pacientes con EM y los controles sanos mediante una test t-student (edad) y un test de X² (edad). Valores P²: Se refiere a los valores p obtenidos tras las comparaciones entre respondedores, respondedores intermedios y no-respondedores mediante un test ANOVA (edad, duración de la enfermedad, EDSS, número de brotes, número de lesiones captantes de gadolinio (Gd) y T2LL) y un test X² (edad y tipo IFN-β).

PORCENTAJE DE MONOCITOS TLR4+ O TLR2+

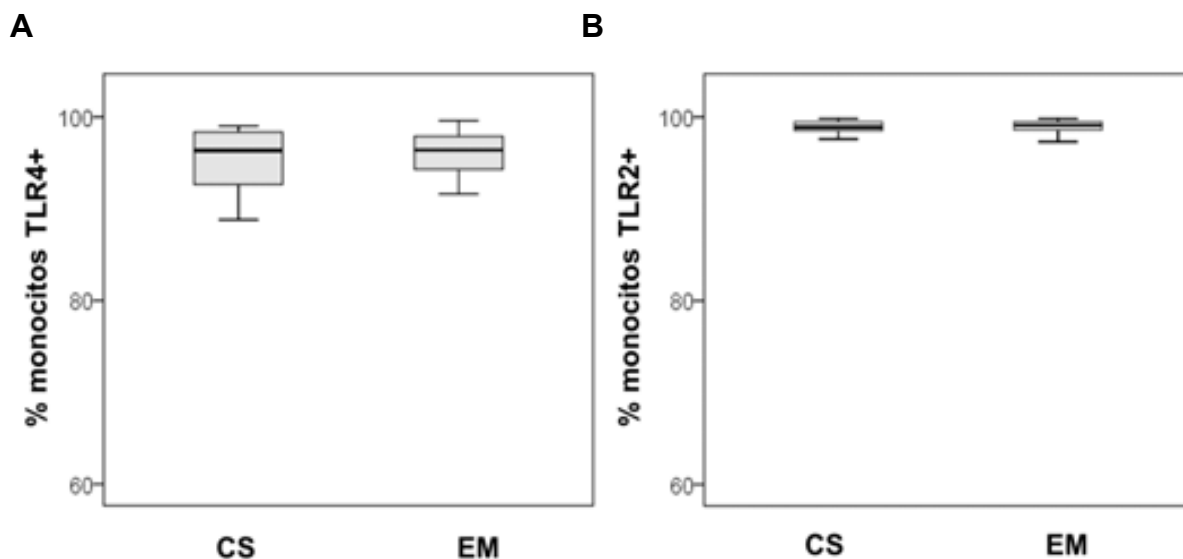


Figura 12. Porcentaje de monocitos provenientes de controles sanos y pacientes con EM que presentan TLR4 (a) o TLR2 (b) en su superficie, medido por citometría de flujo.

La gran mayoría de los monocitos de todas las muestras testadas presentaban TLR4 y TLR2 en su superficie. De hecho, tal y como se observa en la figura 12, el porcentaje de monocitos que expresan TLR2 o TLR4 rozan el 100% independientemente de la presencia o ausencia de enfermedad y de la clasificación de los pacientes según su respuesta. Sin embargo, al cuantificar la expresión de ambas proteínas con la medida de la MFI (intensidad media de fluorescencia) se observaron diferencias entre los grupos. Como se aprecia en la figura 13, el grupo total de pacientes con EM expresa menores niveles de TLR4 al compararlo con el grupo control ($p=0,019$, figura 13A). Esta diferencia no se encontraba al analizar la expresión del TLR2 en monocitos, molécula seleccionada como control de especificidad de la expresión del TLR4, ya que su expresión era similar entre pacientes con EM y controles sanos ($p=0,402$; Figura 13C). Al estratificar los pacientes con EM según su respuesta al tratamiento con IFN- β , la expresión de TLR4 y TLR2 era comparable entre respondedores, respondedores intermedios y no respondedores ($p>0,05$ para todas las comparaciones; Figura 13B y D).

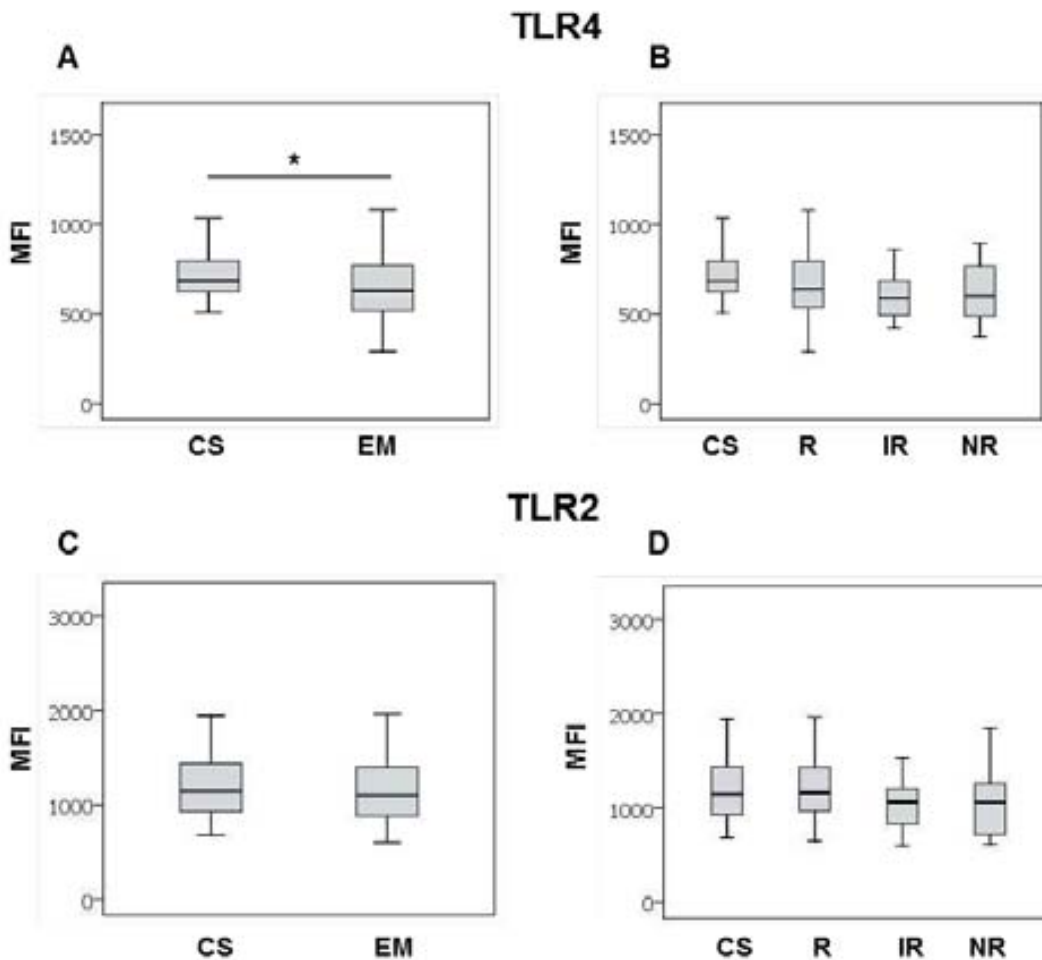


Figura 13. Expresión de TLR4 en los monocitos de pacientes con EM y en controles sanos (A). Expresión de TLR4 en monocitos de pacientes con EM clasificados según su respuesta y en controles sanos (B). Expresión de TLR4 en monocitos de controles sanos y de pacientes con EM (C). Expresión de TLR2 en monocitos de pacientes con EM clasificados según su respuesta y en controles sanos (D). MFI: intensidad media de fluorescencia. CS: controles sanos. EM: pacientes con esclerosis múltiple. R: respondedores. IR: respondedores intermedios. NR: no respondedores. * $p < 0,05$.

Posteriormente, se analizó si existía alguna relación entre las variables clínicas y radiológicas de los pacientes con EM y los niveles de expresión de TLR2 y TLR4 en monocitos. Se observó que existía una correlación negativa entre la expresión de TLR4 y los niveles de EDSS ($r = -0,40$, $p = 0,0004$) en los pacientes con EM a nivel global (Tabla 5). Tras estratificar el grupo de EM en los diferentes fenotipos de respuesta, ninguna de las correlaciones llegaron al umbral de significación estadística tras la corrección de Bonferroni (Tabla 5).

Características	EM	R	IR	NR
<i>TLR4</i>				
<i>Duración de la enfermedad</i>	-0,22 (0,062)	-0,18 (0,228)	-0,36 (0,143)	-0,15 (0,729)
<i>EDSS</i>	-0,40 (0,0004)	-0,36 (0,013)	-0,34 (0,173)	-0,49 (0,217)
<i>Número de brotes en los dos años previos</i>	-0,04 (0,724)	-0,06 (0,700)	0,11 (0,658)	0 (1,000)
<i>Número de lesiones captantes de gadolinio</i>	0,06 (0,652)	-0,00 (0,994)	0,08 (0,744)	0,51 (0,247)
<i>T2LL</i>	-0,25 (0,034)	-0,19 (0,210)	-0,32 (0,200)	-0,07 (0,879)
<i>TLR2</i>				
<i>Duración de la enfermedad</i>	-0,01 (0,906)	-0,12 (0,440)	0,17 (0,513)	0,24 (0,560)
<i>EDSS</i>	-0,21 (0,072)	-0,26 (0,077)	0,12 (0,623)	-0,15 (0,728)
<i>Número de brotes en los dos años previos</i>	-0,12 (0,303)	-0,01 (0,929)	-0,35 (0,154)	-0,22 (0,604)
<i>Número de lesiones captantes de gadolinio</i>	0,01 (0,921)	0,04 (0,775)	-0,16 (0,530)	0,24 (0,599)
<i>T2LL</i>	-0,21 (0,085)	-0,24 (0,115)	-0,10 (0,693)	-0,14 (0,760)

Tabla 5. Resumen de las correlaciones de los niveles de expresión de TLR4 y TLR2 (MFI) con las variables clínicas y radiológicas de los pacientes con EM en su conjunto (EM) o clasificados por su respuesta al tratamiento como respondedores (R), respondedores intermedios (IR) y no respondedores (NR). Expresado como coeficiente de correlación (valor p). T2LL: carga lesional en T2

b. La expresión de IFNAR1 en monocitos está aumentada a nivel basal en los pacientes de EM que no responden al tratamiento con IFN-β

Con el objetivo de explorar la implicación de la vía de señalización de los IFNs de tipo I en la enfermedad y en la respuesta al IFN-β, medimos la expresión de IFNAR1 antes del inicio de tratamiento en los monocitos de pacientes con EM y en controles sanos. Los monocitos del grupo total de pacientes con EM expresaron niveles mayores de IFNAR1 comparado con los controles sanos (figura 14A: p=0,039), observándose la misma tendencia en el porcentaje de monocitos IFNAR1+ sin llegar a la significación estadística (figura14C: p=0,08). Al estratificar los pacientes según su respuesta clínica al tratamiento con IFN-β, se ponían en relevancia las diferencias en la expresión de IFNAR1 en los monocitos. Los monocitos de pacientes clasificados como no respondedores expresaron niveles mayores de IFNAR1 al compararlos tanto con respondedores como con controles sanos (MFI: p=0,003 y p=0,002 respectivamente; Figura 14B; %: p=0,018 y p=0,012; Figura 14D). Cabe destacar que los pacientes clasificados como respondedores

intermedios también se caracterizaron por un aumento en la expresión de IFNAR1 en monocitos, y que las diferencias fueron estadísticamente significativas al compararlos con los pacientes respondedores (%:p=0,045, figura 14D) y con los controles sanos (%:p=0,007 figura14D, MFI: p=0,028, figura 14B).

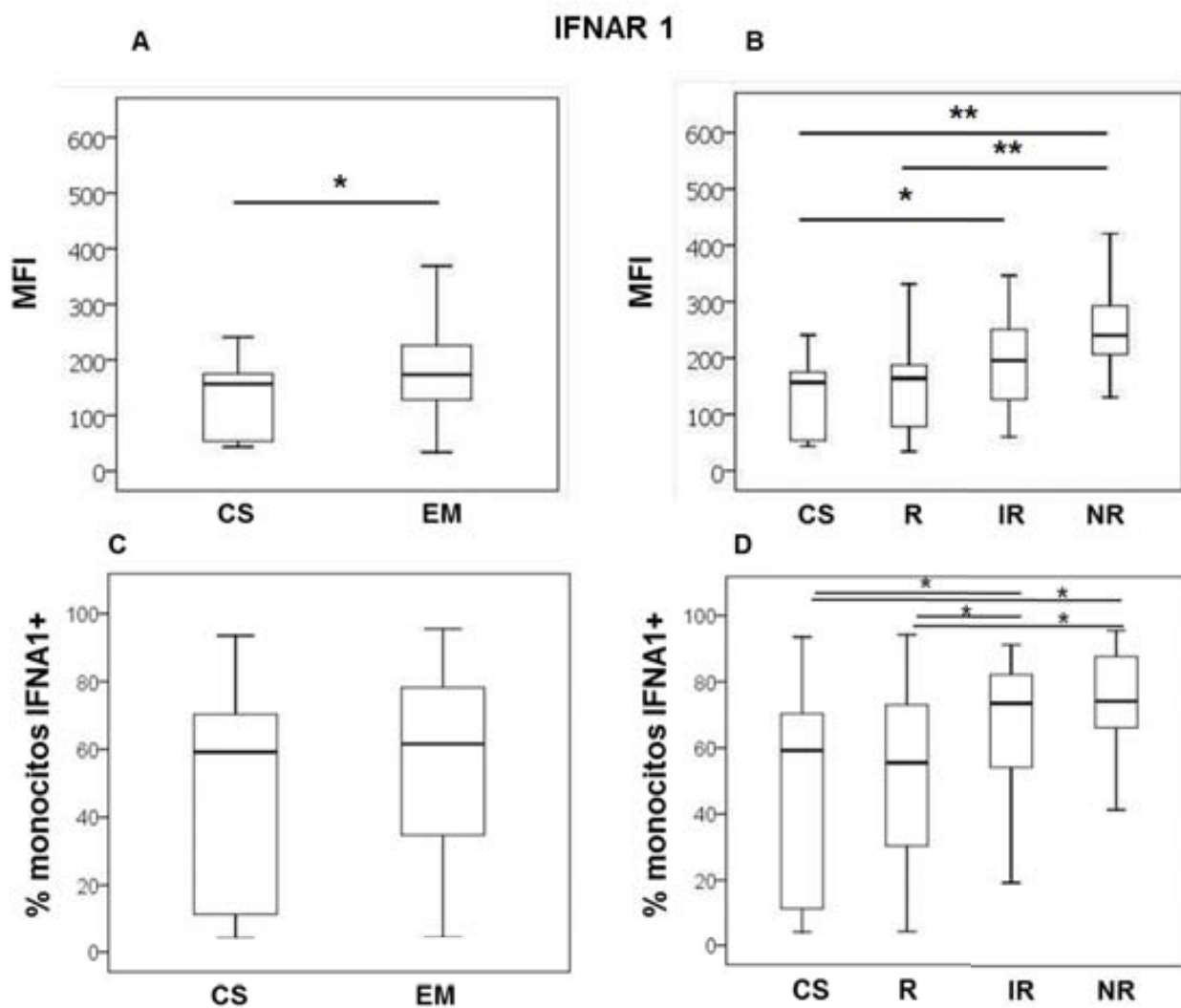


Figura 14. Expresión de IFNAR1 en monocitos de pacientes con EM antes del inicio del tratamiento con IFN- β . MFI de IFNAR1 en monocitos de controles sanos y el global de pacientes con EM (A). MFI de IFNAR1 en monocitos de controles sanos y pacientes con EM clasificados según su respuesta al tratamiento con IFN- β (B). Porcentaje de monocitos IFNAR1+ de controles sanos y pacientes con EM (C). Porcentaje de monocitos IFNAR1+ de controles sanos y pacientes con EM clasificados según su respuesta al tratamiento con IFN- β (D). MFI: intensidad media de fluorescencia. CS: controles sanos. EM: grupo global de pacientes con EM. R: pacientes respondedores al tratamiento con IFN- β . IR: pacientes clasificados como respondedores intermedios al tratamiento con IFN- β . NR: pacientes no respondedores al tratamiento con IFN- β . *p<0,05. **p<0,01.

IFNAR1	EM	R	IR	NR
Duración de la enfermedad	0,12 (0,323)	0,12 (0,429)	0,12 (0,628)	0,17
EDSS	0,17 (0,168)	0,17 (0,278)	-0,07 (0,778)	-0,76
Número de brotes en los dos años	-0,01 (0,951)	0,06 (0,701)	-0,26 (0,296)	-0,11
Número de lesiones captantes de T2LL	-0,02 (0,862)	-0,04 (0,787)	0,06 (0,823)	0,11
	0,21 (0,088)	0,22 (0,144)	0,28 (0,261)	-0,43

Tabla 6. Esta tabla muestra el resumen de las correlaciones de los niveles de expresión de IFNAR1 (MFI) con las variables clínicas y radiológicas de los pacientes con EM en su conjunto (EM) o clasificados por su respuesta al tratamiento como: respondedores (R), respondedores intermedios (IR) y no respondedores (NR). Expresado como coeficiente de correlación (valor p). T2LL: carga lesional en T2

Tras estudiar la posible relación entre las variables clínicas y radiológicas basales con la expresión de IFNAR1 basal, encontramos que no existían correlaciones significativas al analizar tanto el grupo de EM total como los pacientes estratificados según su fenotipo de respuesta (Tabla 6).

c. La expresión basal de HSP70 es similar en todos los grupos de estudio

Con el fin de estudiar los niveles de HSP70, ligando de TLR4, se evaluaron los niveles de proteína en suero mediante la técnica de ELISA. Sin embargo, no observamos ninguna diferencia significativa entre los diferentes grupos ($p > 0,05$ para todas las comparaciones; Figura 15).

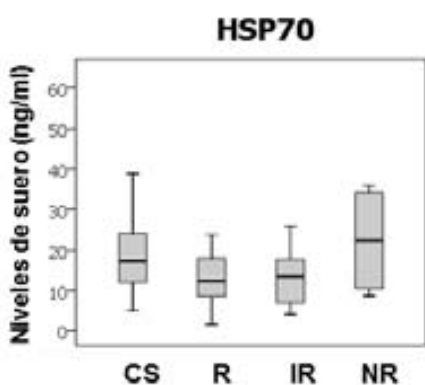


Figura 15. Niveles de HSP70 séricos en los controles sanos y pacientes con EM clasificados según su respuesta al tratamiento. CS: controles sanos. R: pacientes respondedores al tratamiento con IFN- β . IR: pacientes respondedores intermedios al tratamiento con IFN- β . NR: pacientes no respondedores al tratamiento con IFN- β .

d. La expresión endógena basal de *IFN1B* y de *IL1B* está aumentada en pacientes que no responderán al tratamiento

Con el objetivo de ahondar en la vía del TLR4 en la respuesta al tratamiento con IFN- β , se determinaron los niveles de expresión génica de moléculas de esta vía mediante cuantificación absoluta. Se analizaron los genes codificantes para las proteínas adaptadoras MYD88 y TICAM1 o TRIF, esenciales en la señalización por la vía MYD88-dependiente y MYD88-independiente respectivamente, ambas activadas por TLR4. Además, se cuantificó la expresión génica de algunos de los genes inducidos por acción de esas vías: *TNF* e *IL1B* (vía MYD88-dependiente) y *CXCL10* e *IFNB1* (vía MYD88-independiente). Cabe mencionar que estos genes también pueden ser inducidos por acción de otras vías de señalización.

La cuantificación de la expresión génica de los genes que codifican para las proteínas adaptadoras MYD88 y TICAM1 no mostró resultados con diferencias estadísticamente significativas en ninguna de las comparaciones ($p > 0,05$; Figuras 16A y D). Por el contrario, se observaron diferencias en el número de moléculas de ARNm de *IFN1B* e *IL1B*. La expresión de ambos genes estaba incrementada antes del inicio del tratamiento en los pacientes que no responden al mismo al compararlos con los que sí responden (*IFNB1*: $p = 0,005$; *IL1B*: $p = 0,019$; Figura 16C y F) y también al compararlos con los respondedores intermedios (*IFNB1*: $p = 0,033$; *IL1B*: $p = 0,014$; Figuras 16C y F). Además, las diferencias alcanzaron una significación marginal al compararse con los controles sanos ($p = 0,05$ para ambos genes). Es interesante resaltar que los respondedores intermedios fueron también caracterizados por elevados niveles de expresión génica de *IFNB1*, y las diferencias se tornaron significativas al comparar este grupo con el de los respondedores ($p = 0,033$; Figura 16F). En el caso de *CXCL10*, se observó una tendencia a tener mayores niveles de expresión génica en los no respondedores y respondedores intermedios en comparación con los respondedores ($p = 0,075$ y $p = 0,090$ respectivamente; Figura 16E). No se observaron diferencias significativas entre grupos para el *TNF* (figura 16B).

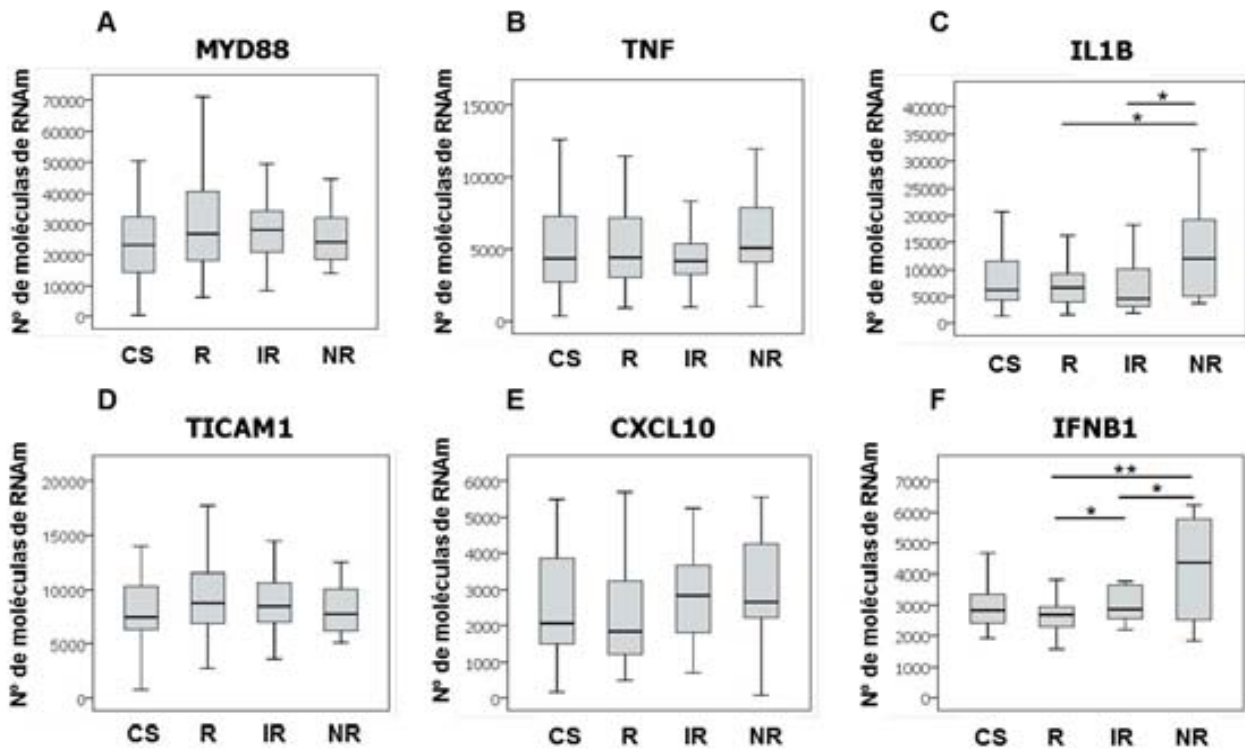


Figura 16. Número de moléculas de ARNm (RNAm) de los genes de la vía MYD88-dependiente: *MYD88* (A), *TNF* (B) e *IL1B* (C) y de la vía MYD88-independiente: *TICAM1* (D), *CXCL10* (E), *IFNB1* (F) presentes en las CMSP de controles sanos y pacientes con EM antes del inicio al tratamiento con IFN- β y clasificados según su respuesta al mismo. CS: controles sanos. R: respondedores al tratamiento con IFN- β . IR: respondedores intermedios al tratamiento con IFN- β . NR: no respondedores al tratamiento con IFN- β . * $p < 0,05$. ** $p < 0,01$.

e. Los niveles de expresión basal de *IRAKM*, un regulador negativo de la señalización del TLR4 están disminuidos en los respondedores al tratamiento con IFN- β

Los hallazgos de un aumento en la expresión de IFNAR1 y de genes inducidos por la vía del TLR4 como *IFNB1*, *IL1B*, y *CXCL10* en no respondedores hizo plantearnos si genes implicados en la regulación de la vía del TLR4 y de los IFNs de tipo I estarían involucrados en la respuesta al IFN- β . Se analizó la expresión de genes que regulan negativamente la señalización del TLR4: *RIPK3*, *PTPN1*, *SIKE* y *SARM1* que inhiben la vía MYD88-no dependiente (vía de *TICAM1* o *TRIF*), *PTPN6* e *IRAKM* que inhiben la vía MYD88-dependiente; y *SIGIRR* que inhibe la vía del TLR4 en global, a nivel del receptor.

Además, analizamos la expresión génica de *TYK2*, que es necesario para la señalización de *IFNAR1* y también regula su expresión transmembranal (196). No se observaron diferencias estadísticamente significativas entre los grupos de estudio en los niveles de expresión de *TYK2*, *PTPN6*, *PTPN11*, *SARM1*, *SIKE*, *SIGIRR*, y *RIPK3* (Figura 17). Sin embargo, los niveles de expresión de *IRAKM* en los pacientes que respondían al tratamiento fueron menores respecto a los no respondedores y a los controles sanos (figura 17). Las diferencias alcanzaron significación estadística corregida por Bonferroni cuando se compararon con los no respondedores ($p=0,002$), y una tendencia cuando se comparó con los controles sanos ($p=0,011$).

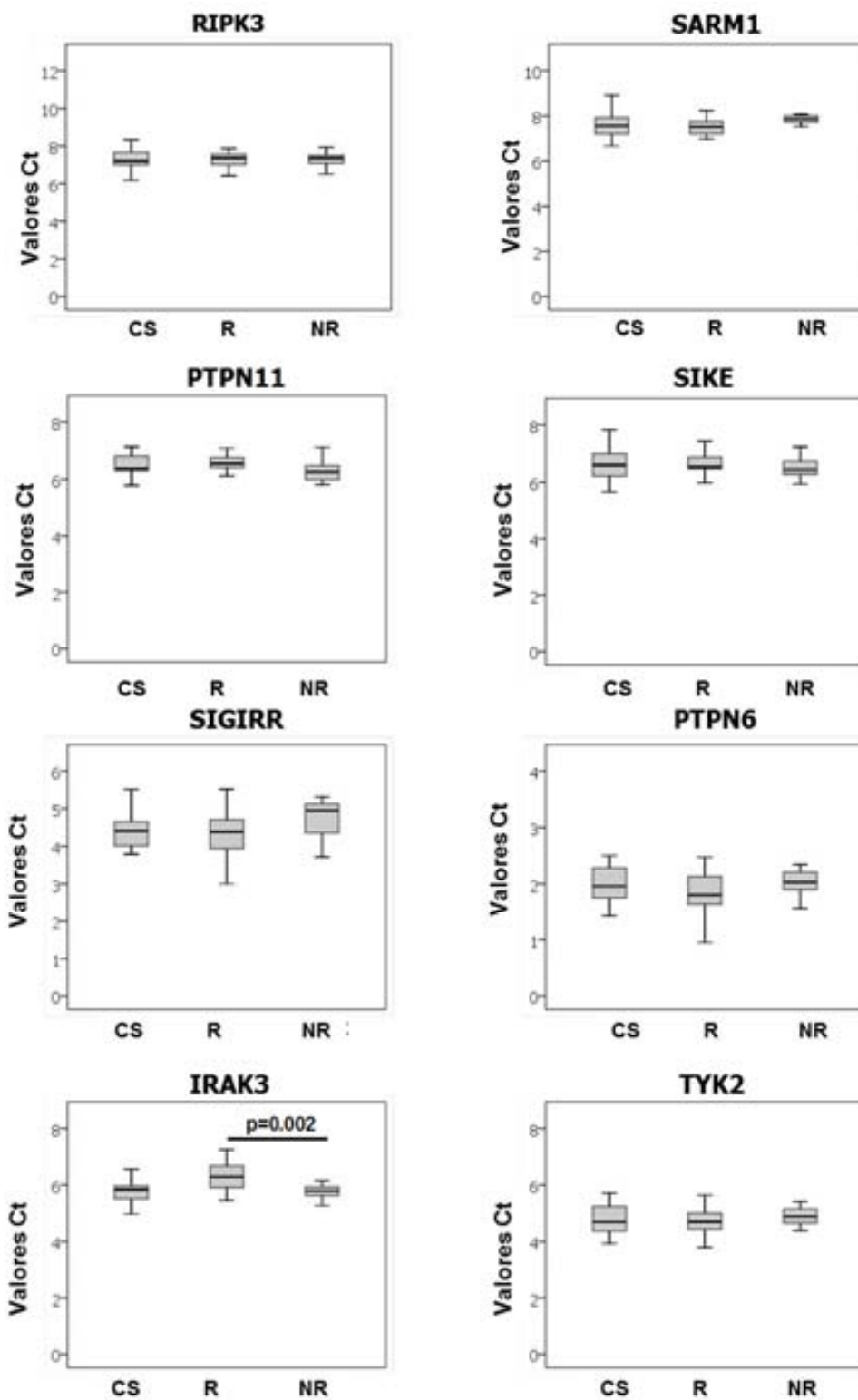


Figura 17. Expresión génica de *TYK2*, *PTPN6*, *PTPN11*, *SARM1*, *SIKE*, *SIGIRR*, *RIPK3* e *IRAKM* en CMSP de pacientes con EM clasificados según su respuesta al tratamiento con IFN- β y en controles sanos. Los valores están expresados en valores Ct, obtenidos tras la sustracción del valor umbral del gen endógeno *GAPDH* al valor umbral del gen de estudio. Este valor se ha de interpretar a la inversa, es decir, a mayor valor de Ct menor expresión génica. CS: controles sanos. R: respondedores. NR: no respondedores.

3. Efecto del IFN- β

En esta sección se abordará el efecto del IFN- β en la expresión de las moléculas de estudio. Se analizará: (1) el efecto del IFN- β *ex vivo* y (2) el efecto del IFN- β *in vitro* sobre su propia expresión. En el estudio *ex vivo*, se utilizaron las CMSPs de pacientes con EM extraídas antes del inicio y en el mes 12 del tratamiento con IFN- β . Para el estudio *in vitro*, se utilizaron CMSPs de controles sanos y de pacientes con EM antes del inicio al tratamiento y se expusieron a la acción del IFN- β recombinante (Betaferon®) durante 24 horas.

a. Efecto de un año de tratamiento con IFN- β en pacientes con EM clasificados según su respuesta al tratamiento

- *El tratamiento con IFN- β induce la expresión de TLR4 y TLR2 en monocitos de pacientes con EM, independientemente de su respuesta al tratamiento*

Mediante citometría de flujo, se determinó la expresión de TLR4 en la membrana celular de monocitos periféricos de pacientes con EM a nivel basal y tras doce meses de tratamiento. Según se muestra en la Tabla 7, el tratamiento con IFN- β ejerce una fuerte inducción de la expresión de TLR4 en el grupo completo de pacientes con EM. De hecho, los niveles de intensidad media de fluorescencia pasaron de 673,1 antes del inicio al tratamiento a un nivel medio de 782,3 tras los 12 meses de tratamiento ($p=4,3 \times 10^{-5}$). Además, este efecto se observaba de manera similar en todos los pacientes tratados llegando a ser estadísticamente significativo para respondedores ($p=0,019$) y respondedores intermedios ($p=0,001$), y mostrando una tendencia en los no respondedores ($p=0,091$) (Tabla 7).

Por otro lado, cabe mencionar que el efecto de un año de tratamiento con IFN- β en la expresión del TLR4 no era específico de este tipo de toll-like receptor ya que también se observó un incremento considerable en la expresión de TLR2 en el grupo global de pacientes con EM. Los valores de intensidad media de fluorescencia pasaron en este caso, de 1156,8 a 1416,8 unidades de fluorescencia obteniéndose un p valor de $2,0 \times 10^{-7}$ tras analizar el cambio en los valores de manera pareada. De la misma forma que en el caso de TLR4, el efecto de inducción se mantenía al clasificar los pacientes en respondedores ($p=0,001$), respondedores intermedios ($p=0,001$), y no respondedores ($p=0,018$) (Tabla 7).

Niveles de expresión			
TLR4			
	0	12	
EM	673,1(217,5)	782,3 (253,2)	4,3x10 ⁻⁵
R	696,7 (235,3)	760,7 (246,9)	0,019
IR	622,6 (178,5)	834,4 (293,5)	0,001
NR	642,2 (185,7)	797,8 (219,7)	0,091
TLR2			
	0	12	
EM	1156,8 (332,7)	1416,8 (403,1)	2,0 x10 ⁻⁷
R	1189,3 (349,2)	1362,6 (377,2)	0,001
IR	1080,4 (251,1)	1470,5 (430,0)	0,001
NR	1128,1 (397,1)	1611,5 (475,7)	0,018

Tabla 7. La tabla muestra los valores de MFI (intensidad media de fluorescencia) de TLR4 y TLR2 en monocitos de los pacientes con EM a nivel global (EM) o según su respuesta al tratamiento. Se muestra los niveles medios (desviación estándar) de los niveles de expresión antes del inicio del tratamiento (basal) y tras doce meses de tratamiento con IFN-β (IFN). Los valores p se obtuvieron mediante la prueba de t para muestras pareadas. EM: grupo global de pacientes con EM. R: pacientes respondedores. IR: pacientes respondedores intermedios. NR: pacientes no respondedores.

- *El tratamiento con IFN-β no afecta a los niveles de expresión de IFNAR1 en los monocitos de pacientes con EM*

En cuanto a la expresión de IFNAR1, observamos que no varía tras un año de tratamiento. Es decir, que el IFN-β no modificó la expresión de IFNAR1 en los monocitos de los pacientes con EM, independientemente de su respuesta al mismo (Tabla 8).

Niveles de expresión			
IFNAR1			
	0	12	Valor p
EM	177,27(89,16)	173,77 (92,34)	0,58
R	162,87 (85,29)	163,31 (86,11)	0,93
IR	182,63 (80,76)	154,56 (83,18)	0,20
NR	258,42 (101,82)	286,62 (86,07)	0,11

Tabla 8. La tabla muestra los valores de MFI (intensidad media de fluorescencia) de IFNAR1 en monocitos en los pacientes con EM a nivel global (EM) o clasificados por su respuesta al tratamiento. Se muestran los niveles medios (desviación estándar) de los niveles de expresión antes del inicio del tratamiento (basal) y tras doce meses de tratamiento con IFN-β (IFN). Los valores p se obtuvieron mediante la prueba de t para muestras pareadas. EM: grupo global de pacientes con EM. R: pacientes respondedores. IR: pacientes respondedores intermedios. NR: pacientes no respondedores.

➤ *El tratamiento con IFN-β induce la expresión de MYD88, TICAM1, CXCL10 y TNF*

Se estudió, además, el efecto del año de tratamiento con IFN-β en la expresión génica de *MYD88*, *TICAM1*, *TNF*, *IL1B*, *CXCL10* e *IFN1B* mediante cuantificación absoluta por PCR a tiempo real. Para ello, se extrajo el ARNm de las CMSPs de los pacientes con EM antes del inicio y tras los doce meses de tratamiento. El cambio en la expresión de algunos de estos genes fue evidente. Observamos que el tratamiento con IFN-β se asoció con un claro incremento estadísticamente significativo en la expresión de *MYD88*, *TICAM1*, *TNF* y *CXCL10*, el cual se observó en el grupo total de pacientes con EM (*MYD88*, $p=9,05 \cdot 10^{-4}$; *TICAM1*, $p=1,24 \cdot 10^{-4}$; *TNF*, $p=1,97 \cdot 10^{-4}$; *CXCL10*, $p=2,9 \cdot 10^{-3}$; figura 18). Esta inducción además, no dependía de la respuesta al tratamiento ya que se mantenía en todos los grupos de pacientes clasificados según su respuesta al tratamiento.

Por otro lado, los genes *IFNB1* e *IL1B* no se indujeron tras el tratamiento con IFN-β en el grupo global de pacientes con EM. Sin embargo, al clasificar los pacientes según su respuesta clínica, se observó que en el grupo de respondedores se indujo la expresión de *IFNB1* tras los doce meses de tratamiento ($p=0,025$) mientras que la expresión no varió en los respondedores intermedios y en los no respondedores (figura 19). En el caso de *IL1B*, a pesar de que las diferencias no llegan a la significancia estadística, se intuye un aumento de su expresión en los pacientes respondedores y respondedores intermedios y se mantiene en los no respondedores (figura 19).

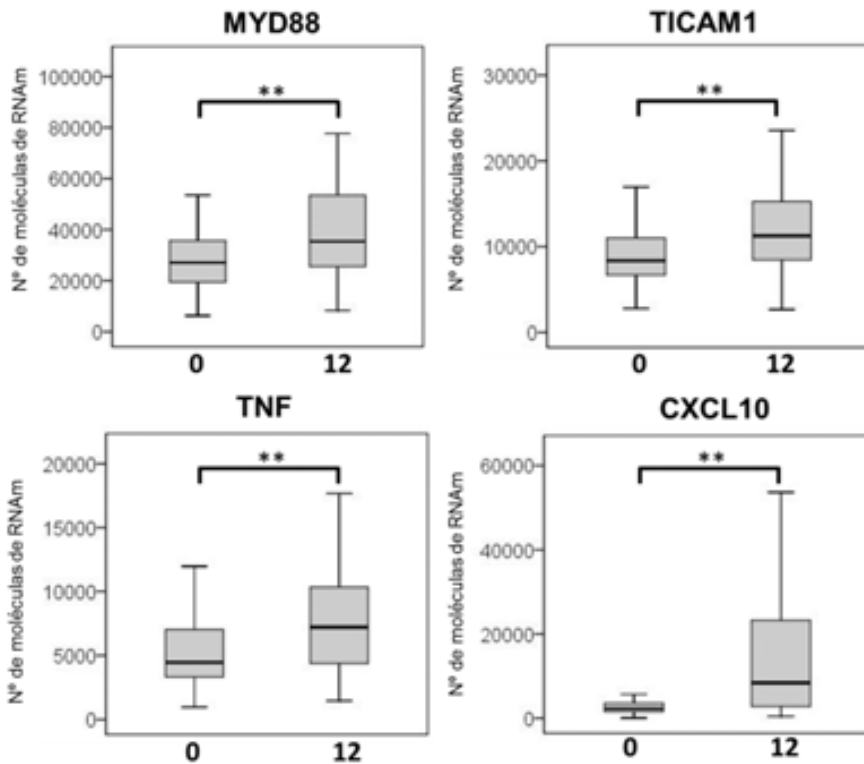


Figura 18. Gráficos que muestran el número de moléculas de ARNm de los genes *MYD88*, *TICAM1*, *TNF* y *CXCL10* en los pacientes con EM a nivel global antes del inicio del tratamiento (mes 0) y tras el año de tratamiento con IFN-β (mes 12). **p<0,01.

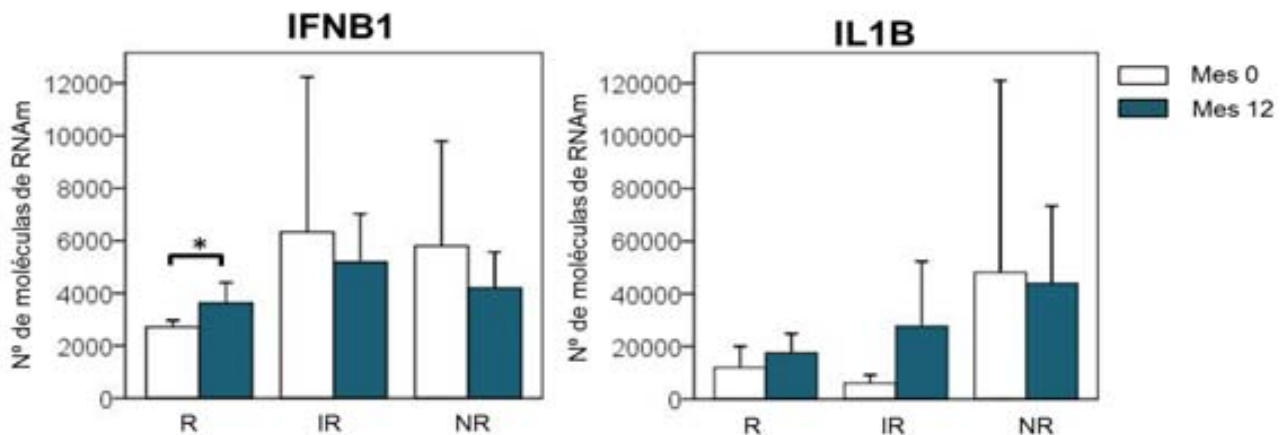


Figura 19. Esta figura muestra el número de moléculas de ARNm de los genes *IFNB1* e *IL1B* en los pacientes con EM clasificados según su respuesta al tratamiento con IFN-β antes del inicio al tratamiento (mes 0) y tras el año de tratamiento con IFN-β (mes 12). R: respondedores. IR: respondedores intermedios. NR: no respondedores. **p<0,01.

b. Efecto del IFN- β *in vitro*

➤ La inducción de IFN- β está alterada en los no respondedores

Las CMSP extraídas a nivel basal de pacientes con EM y de controles sanos se incubaron *in vitro* en presencia o ausencia de IFN- β recombinante (100 U/ml) durante 24 horas. Tras la incubación, se procedió a analizar la expresión de *IFN1B* a nivel de ARNm. De esta manera, estudiamos la inducción de IFN- β sobre su propia expresión en los pacientes con EM que respondieron o no al tratamiento y en controles sanos.

Observamos que los pacientes no respondedores tenían menor capacidad de expresar *IFN1B* tras estimular las células con IFN- β [magnitud de aumento medio (R)=1,9; p=0,172; Figura 20]. En cambio, la incubación con IFN- β de las CMSPs de los pacientes respondedores resultó en una inducción de su propia expresión de manera significativa (R=5,4; p=0,024), mientras que en controles sanos el efecto de IFN- β se encontraba entre los respondedores y los no respondedores (R=3,4; p=0,084) (Figura 20).

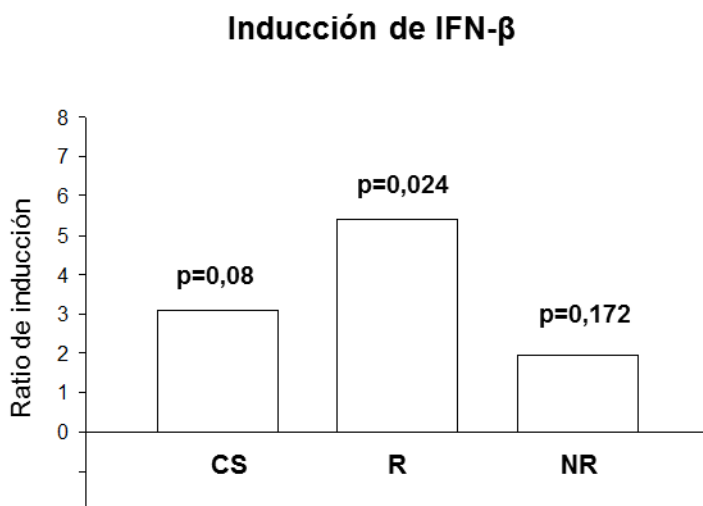


Figura 20. Gráfico que representa la inducción de la expresión de *IFN1B* por efecto del IFN- β en pacientes con EM clasificados según su respuesta al tratamiento y controles sanos. El ratio de inducción es la media de la división del número de moléculas de ARNm de *IFN1b* de las células estimuladas entre las no estimuladas de cada paciente o control. CS: controles sanos. R: pacientes respondedores. NR: pacientes no respondedores.

(ii) Resultados relacionados con el objetivo 2

“Caracterizar el perfil monocitario de sangre periférica en pacientes con EMRR según su respuesta al tratamiento a IFN-β”

1 .Descripción clínica de los pacientes con EM incluidos en el estudio

Se incluyeron 20 pacientes con EMRR y 10 controles sanos. Diez pacientes se clasificaron como respondedores, 7 como no respondedores y 3 como respondedores intermedios al tratamiento con IFN-β. Puesto que en la primera sección de “resultados” obtuvimos hallazgos similares en los pacientes no respondedores y respondedores intermedios, en esta sección, los consideramos como un único grupo denominado “no respondedores”. Ninguno de los pacientes recibió tratamiento previo con IFN-β u otro tratamiento inmunosupresor previo al estudio. Además, ningún paciente tuvo brotes clínicos ni recibió tratamiento con corticoides durante el mes previo al inicio del tratamiento con IFN-β. En la Tabla 9 se muestran las características clínicas y demográficas de los pacientes y los controles sanos incluidos en el estudio.

Variables	R	NR	CS
N	10	10	10
Mujer/hombre (% mujeres)	10/10 (100)	7/10(70)	8/10(80)
Edad (años)	32,5 (9,7)	34,7(9,9)	28,2 (6,01)
Evolución de la enfermedad (años)	2,6 (1,9)	5,7(4,7)	–
EDSS (rango intercuartílico)	1,95 (1-3)	2,35 (1,5-3-5)	–
Número de brotes en los dos años previos	2,3 (0,8)	2.1 (0,7)	–
IFN-β 1a IM	3 (30,0)	2 (20,0)	--
IFN-β 1b SC	2 (20,0)	4 (40,0)	--
IFN-β 1a SC	5 (50,0)	4 (40,0)	--

Tabla 9. Se muestran los datos clínicos y demográficos de los pacientes con EM-RR y los controles sanos incluidos en el estudio.

2. Descripción de las vías de señalización con diferencias significativas entre los grupos de estudio

Un total de 2241 genes se encontraron diferencialmente expresados entre los pacientes respondedores y no respondedores con un límite de significación estadística de 0,05. Del total, 1024 presentaron una mayor expresión en los no respondedores y 1217 genes una menor expresión. Al aplicar un umbral de significación más estricto (0,01), se encontraron 222 genes más expresados y 207 genes menos expresados en los monocitos de pacientes no respondedores a IFN- β . En un primer paso, se realizó un estudio de las vías de señalización diferencialmente expresadas entre los dos grupos de pacientes con EM clasificados según su respuesta escogiendo el valor p umbral de 0,01. Estos genes se analizaron mediante el software *Ingenuity pathways Analysis (IPA)* que fue el soporte informático para interpretar los resultados obtenidos. En la Tabla 10, se muestran todas las vías canónicas enriquecidas por los genes diferencialmente expresados entre respondedores y no-respondedores. Encontramos 5 vías canónicas más expresadas en los pacientes no respondedores al tratamiento con IFN- β y una vía con menor expresión.

Vías de señalización canónicas	Valores p	Expresión
Señalización de interferon	0,0010	Aumentada
Disfunción mitocondrial	0,0012	Aumentada
Vía de la ubiquitinización proteica	0,0014	Aumentada
Regulación de la señalización de eIF4 y p70S6K	0,0022	Aumentada
Mecanismos moleculares del cáncer	0,0079	Disminuida
Señalización de EIF2	0,0085	Aumentada

Tabla 10. Vías de señalización clasificadas por el programa Ingenuity Pathway Analysis (IPA) diferencialmente expresadas en monocitos entre no respondedores y respondedores al tratamiento con IFN- β ($p < 0,01$). Aumentada o disminuída significa que un porcentaje mayor de genes de estas vías se encontró más expresado o menos expresado en los no respondedores comparado con los respondedores

Cabe destacar que la expresión génica de los monocitos de controles sanos fue más parecida a la de los pacientes no respondedores que a la de los respondedores. Tomando como umbral un p valor de 0,05, observamos que un número similar de genes estaban

diferencialmente expresados entre los NR y los R y los NR y los controles sanos (2241 y 2208 respectivamente); el número aumentaba al comparar R con controles sanos (4113).

3. La vía de los interferones de tipo I se encuentra elevada en los pacientes que no responden al tratamiento

La vía de señalización que se encontró más diferencialmente expresada entre los dos grupos de pacientes fue la vía de señalización de IFN. Encontramos que los genes de la vía de los IFNs estaban, en general, más expresados en los monocitos de los pacientes no respondedores ($p=0,0010$; Tabla 10). La figura 21 muestra una ilustración *heatmap* de los genes de respuesta a los IFNs de tipo I que presentaban mayor expresión en los monocitos de los pacientes no respondedores al IFN- β respecto a los respondedores tal y como habíamos encontrado en estudios previos. El listado de genes con la expresión en cada grupo estudiado, el valor p y el cambio en la expresión (fold change) se muestra en la Tabla suplementaria 1. Ejemplos de ello son los genes de la familia *OAS* (*2'-5'-oligoadenylate synthetase 1*) o de la familia *GBP* (*guanylate binding protein, interferon inducible*), o genes inducibles por interferon (IFI) cuya expresión génica estaba significativamente incrementada en los pacientes no respondedores en comparación con los respondedores (figura 22 muestra 2 ejemplos).

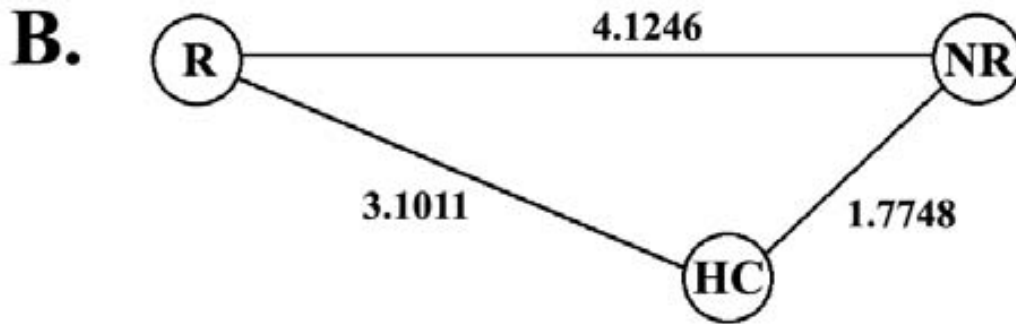
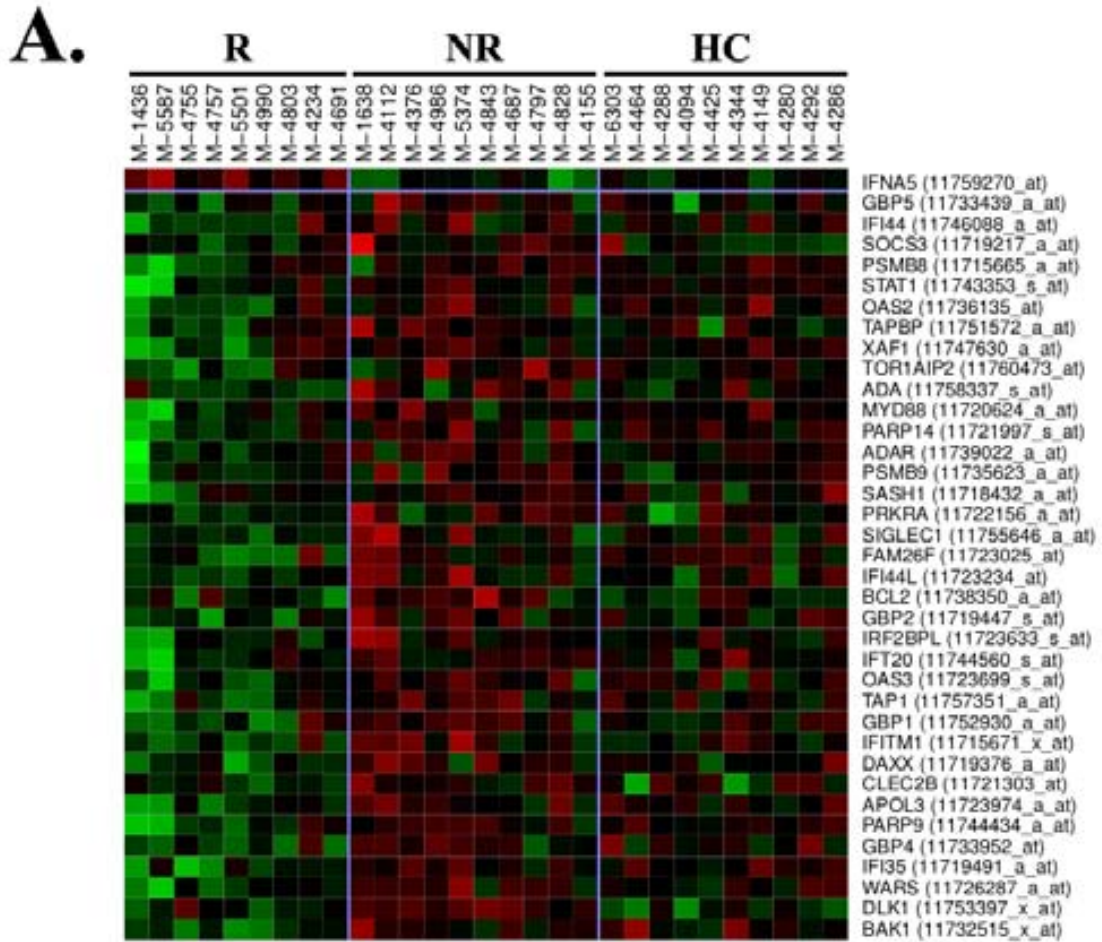


Figura 21. A) Ilustración del mapa de calor (*heatmap*) de los genes inducibles por los IFNs de tipo I que estaban más expresados de forma significativa en los pacientes no respondedores al compararlos con los respondedores ($p < 0,05$). R: pacientes respondedores. NR: pacientes no respondedores. HC: controles sanos. El color verde significa menor expresión y el color rojo mayores niveles de expresión. B) Distancia de Euclides entre R, NR y HC.

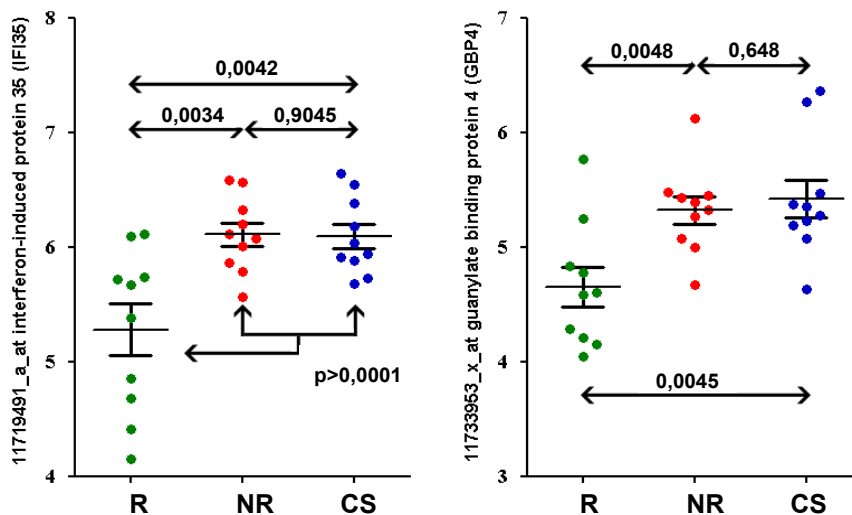


Figura 22. Gráfico que muestra la expresión por paciente de *IFI35* y *GBP4*. R: pacientes respondedores. NR: pacientes no respondedores. CS: controles sanos.

Además, al analizar los factores de transcripción diferencialmente expresados según la respuesta al IFN- β encontramos STAT1, factor de transcripción de la vía de los IFNs de tipo I, con una mayor expresión en los pacientes no respondedores. STAT1 induce la vía de los interferones de tipo I y en un estudio previo encontramos que tenía una mayor activación (mayor porcentaje de monocitos STAT1p+) en los monocitos de los pacientes no respondedores (166). Estos resultados confirman la clara huella de la vía de los interferones de tipo I que encontramos en la subpoblación monocitaria de los pacientes que no responden al tratamiento con IFN- β . En la Tabla 11, se muestra la predicción de genes regulados por STAT1 que IPA efectúa. Como se puede observar, todas las predicciones cumplen la direccionalidad en el cambio de expresión esperada. El valor p de esta estimación es de $2,3 \times 10^{-3}$.

Sonda	Gen	Predicción	FC
11752930_a_at	GBP1	Modulado	↑ 1,428
11753863_s_at	BCL2L11	Activado	↑ 1,319
11715671_x_at	IRITM1	Modulado	↑ 1,169
11757351_a_at	TAP1	Modulado	↑ 1,078
11746002_a_at	CASP4	Activado	↑ 1,050
11758693_s_at	PSME2	Activado	↑ 1,047
11719447_s_at	GBP2	Activado	↑ 1,046
11753939_x_at	PSMB10	Activado	↑ 1,043
11757790_s_at	PCDH17	Inhibido	↓ -1,211
11745287_a_at	SLFN14	Inhibido	↓ -1,304
↑ STAT1	z-score (1,331)	P valor ($2,3 \times 10^{-3}$)	

Tabla 11. Los datos de esta tabla muestran los cambios de expresión de diferentes genes modulados por STAT1 y la correspondiente predicción de IPA sobre el efecto de este gen basándose en la mayor expresión del factor de transcripción. El valor p describe la certeza del acierto en la predicción de la modulación de estos genes.

Por otro lado, en la figura 21B se puede observar que la distancia entre los no respondedores y los controles sanos es menor que entre los respondedores y los controles sanos. Es decir, los no respondedores se parecen más a los controles sanos en cuanto a la expresión génica de los genes seleccionados para esta vía.

4. Otras vías de señalización destacables

Con el objetivo de entender los procesos biológicos de la subpoblación monocitaria que podrían estar jugando un papel en la respuesta al tratamiento con IFN- β , se ahondó en los resultados de otras vías de señalización diferencialmente expresadas entre los NR y los R (Tabla 10). Consideramos como vías destacables: la disfunción mitocondrial, la señalización por EIF2 y la regulación de la señalización de eIF4 y p70S6K y la vía de la ubiquitinización proteica, todas ellas más expresadas en los no-respondedores. Encontramos varios genes implicados en la cadena respiratoria mitocondrial que correspondería a la vía de la disfunción mitocondrial, genes de composición y regulación del ribosoma (relacionado con la señalización por EIF2 y la regulación de la señalización de eIF4 y p70S6K) y genes de la estructura y función del proteosoma (relacionado con la vía de la ubiquitinización proteica) (Tabla suplementaria 1).

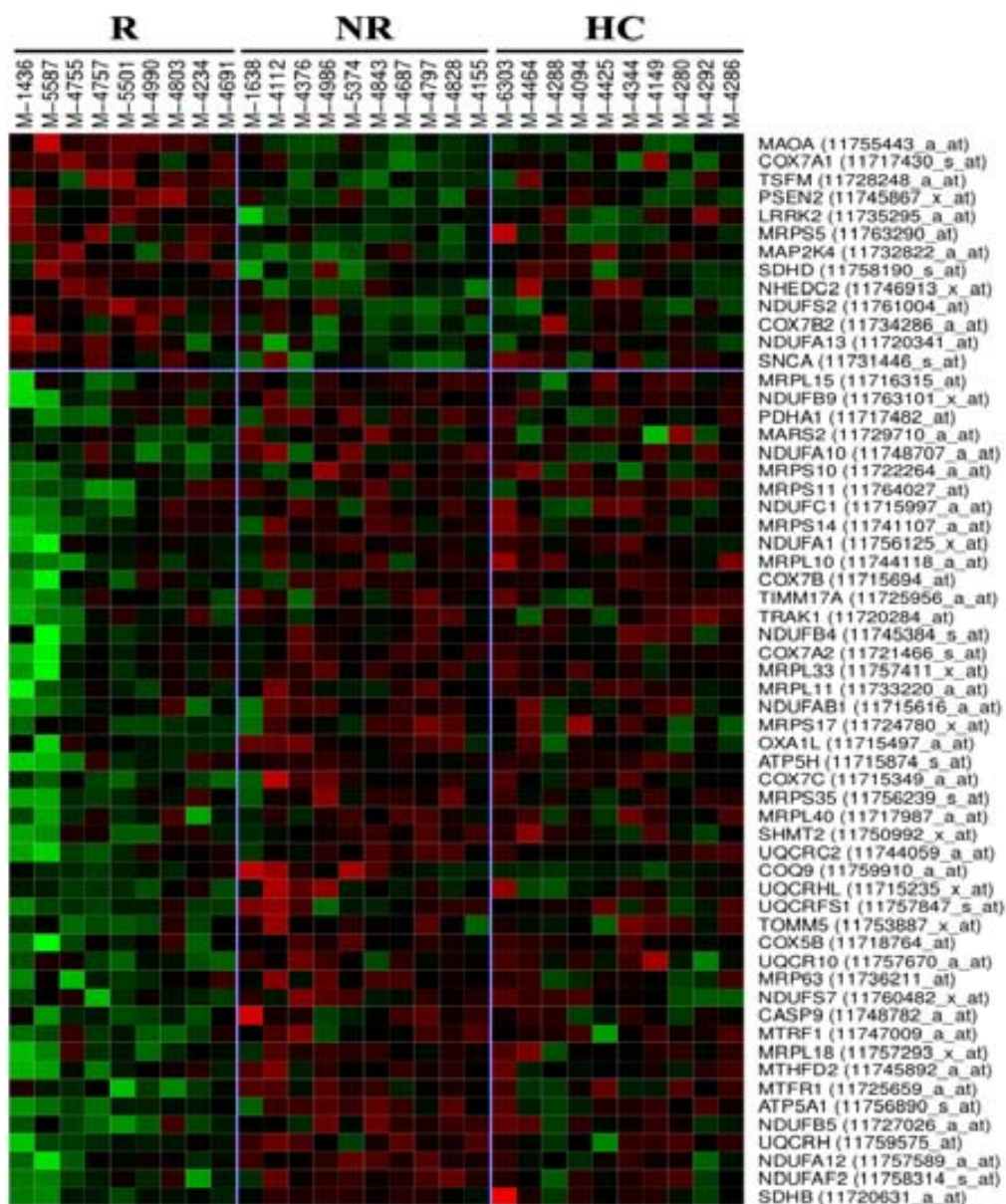
a. Los monocitos de los pacientes no respondedores a IFN- β se caracterizan por una mayor expresión de genes relacionados con la mitocondria

Una de las vías biológicas que se encontró diferencialmente expresada entre los no respondedores y los respondedores antes del inicio del tratamiento es la disfunción mitocondrial (0,0012). Se ahondó en esta vía buscando genes relacionados con la función mitocondrial que podrían estar diferencialmente expresados dependiendo de la respuesta al tratamiento (p value 0,05). De los 59 genes mitocondriales diferencialmente expresados que encontramos, la expresión de 49 de ellos estaba elevada en los no respondedores (figura 23A). Además, la mayoría de estos genes pertenecen a los diferentes complejos de la cadena respiratoria mitocondrial. Ejemplos de ello son *NDUFB9*, *NDUFA10*, *NDUFA1*, *NDUFB5*, componentes del complejo I de la cadena respiratoria, *SDHB* enzima que forma parte del complejo II de la cadena mitocondrial, *UQCRHL* y *UQCRH* que forman parte del

complejo III, *COX7B* y *COX7C* y *COX5B* que forman parte del complejo IV y *ATP5A*, componente del complejo V.

El listado de genes con los p valores correspondientes y los datos crudos se muestran en la [Tabla suplementaria 2](#), (<https://www.dropbox.com/sh/g6cqiythp3argte/Jf5p0nrPcY>). Por otro lado, tal como se observa en la figura 23B, en la expresión génica de estos genes, los monocitos de controles sanos tienen un perfil de expresión más cercano a los no respondedores que a los respondedores.

A.



B.

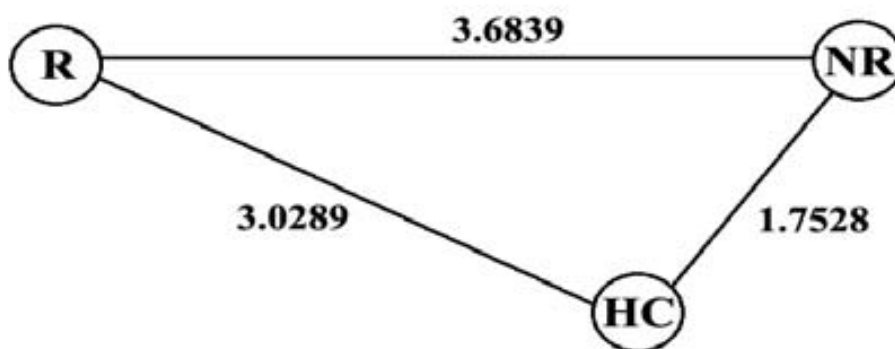


Figura 23. A) Ilustración del mapa de calor de los genes mitocondriales expresados de forma más significativa en los pacientes no respondedores al compararlos con los respondedores ($p < 0,05$). R: pacientes respondedores. NR: pacientes no respondedores. HC: controles sanos. El color verde significa menor expresión y el color rojo mayores niveles de expresión. B) Distancia de Euclides entre R, NR y HC.

b. Otras vías de señalización de monocitos potencialmente involucradas en la respuesta a IFN β

Tal y como se muestra en la Tabla 10, otras de las vías diferencialmente expresadas entre los pacientes que responden y que no responden al tratamiento fueron la vía de señalización de EIF2 ($p=0,0085$), la regulación de eIF4 y p70S6K ($p=0,0022$) y la vía de ubiquitinización proteica ($p=0,0014$), las tres sobre-expresadas en los monocitos de los no respondedores. El incremento de la expresión de la vía de señalización del EIF2 y de eIF4 y p70S6K en NR sugería una implicación de los ribosomas en la respuesta a IFN- β . De hecho, la mayoría de los genes diferencialmente expresados pertenecientes a estas vías estaban relacionados con la maquinaria de la síntesis proteica o codificaban para constituyentes de la estructura del ribosoma (listados en la Tabla suplementaria 1). Treinta y nueve de los 51 genes diferencialmente expresados, tenían más expresión en los pacientes no respondedores a IFN- β (figura 24A; Tabla suplementaria 1).

En cuanto a la vía de la ubiquitinización proteica, tal y como se muestra en la Tabla suplementaria 1, los genes incluidos en esta vía estaban relacionados con la estructura del proteasoma. De los 55 genes diferencialmente expresados, 39 genes estaban más expresados en los no respondedores respecto a los respondedores. Cabe destacar que los genes son en su mayoría componentes del inmunoproteasoma y no de la estructura del proteasoma común (figura 25A). Por ejemplo, *PSMB8 (LMP7)* y *PSMB9 (LMP2)* son subunidades β i de la subunidad 20S, que forman parte del inmunoproteasoma y desplazan el ensamblaje del proteasoma común.

Tanto para la vía de la síntesis proteica como para la del inmunoproteasoma, los controles sanos tenían un perfil de expresión génica más cercana a los no-respondedores que a los respondedores (figura 24B, Figura 25B).

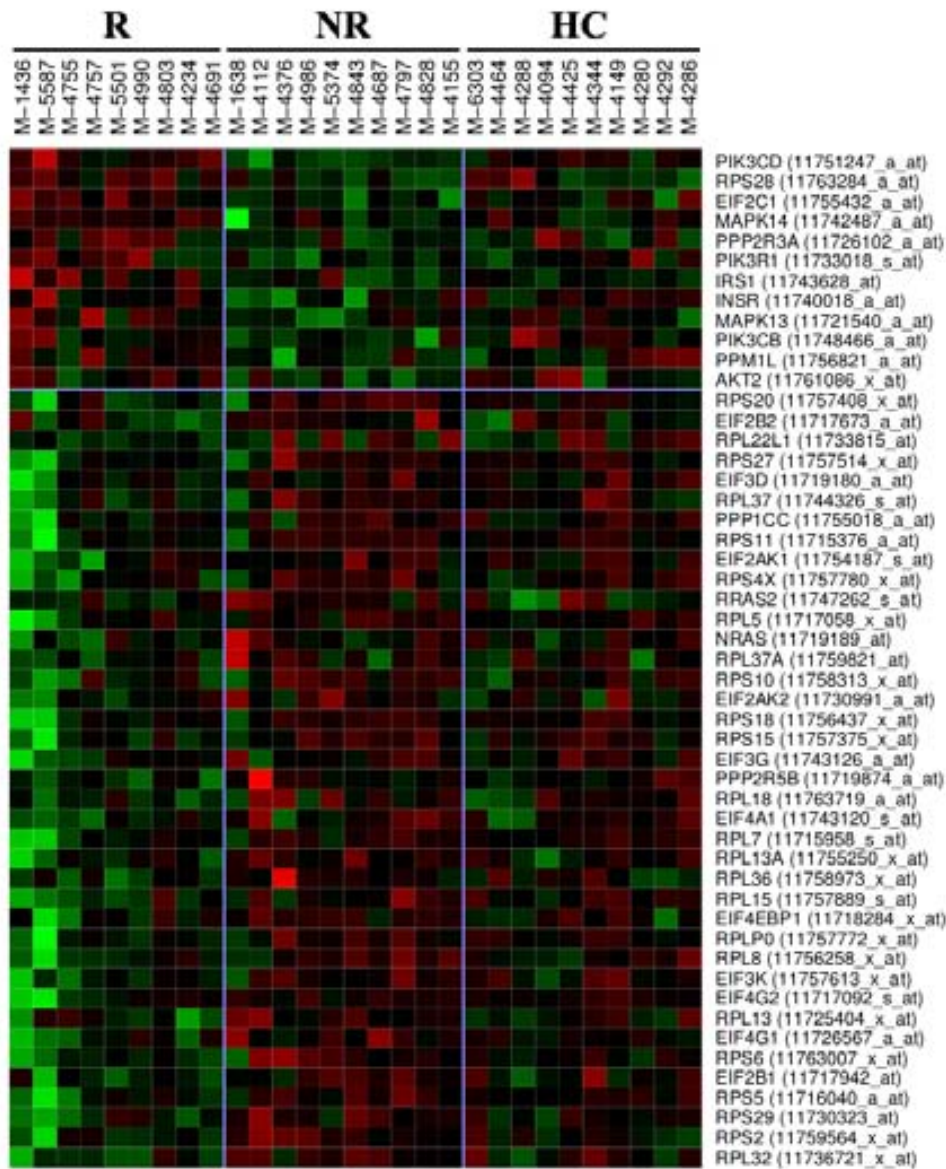
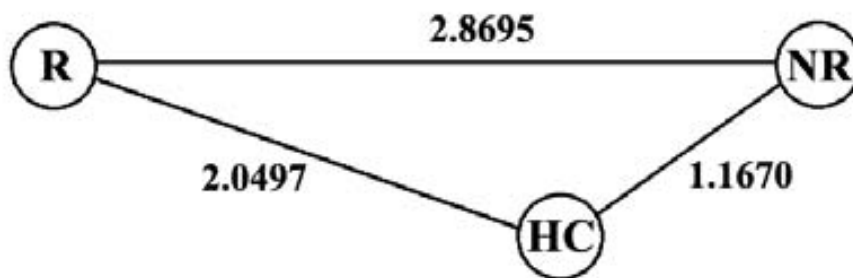
A.**B.**

Figura 24. A) Ilustración del mapa de calor de los genes de la vía del EIF2, de la vía eIF4 y p70S6K y genes ribosomales expresados de forma más significativa en los pacientes no respondedores al compararlos con los respondedores ($p < 0,05$). R: pacientes respondedores. NR: pacientes no respondedores. HC: controles sanos. El color verde significa menor expresión y el color rojo mayores niveles de expresión. B) Distancia de Euclides entre R, NR y HC.

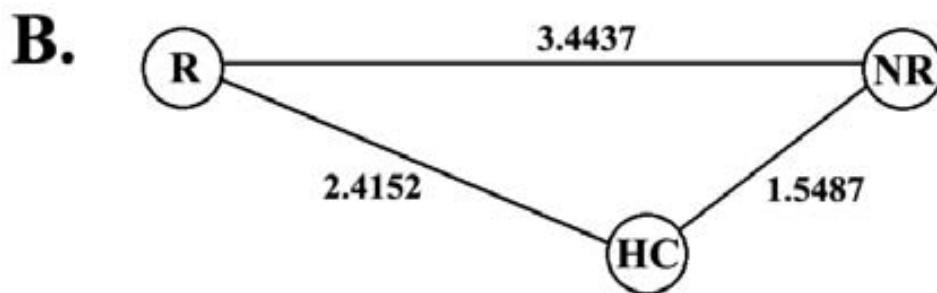
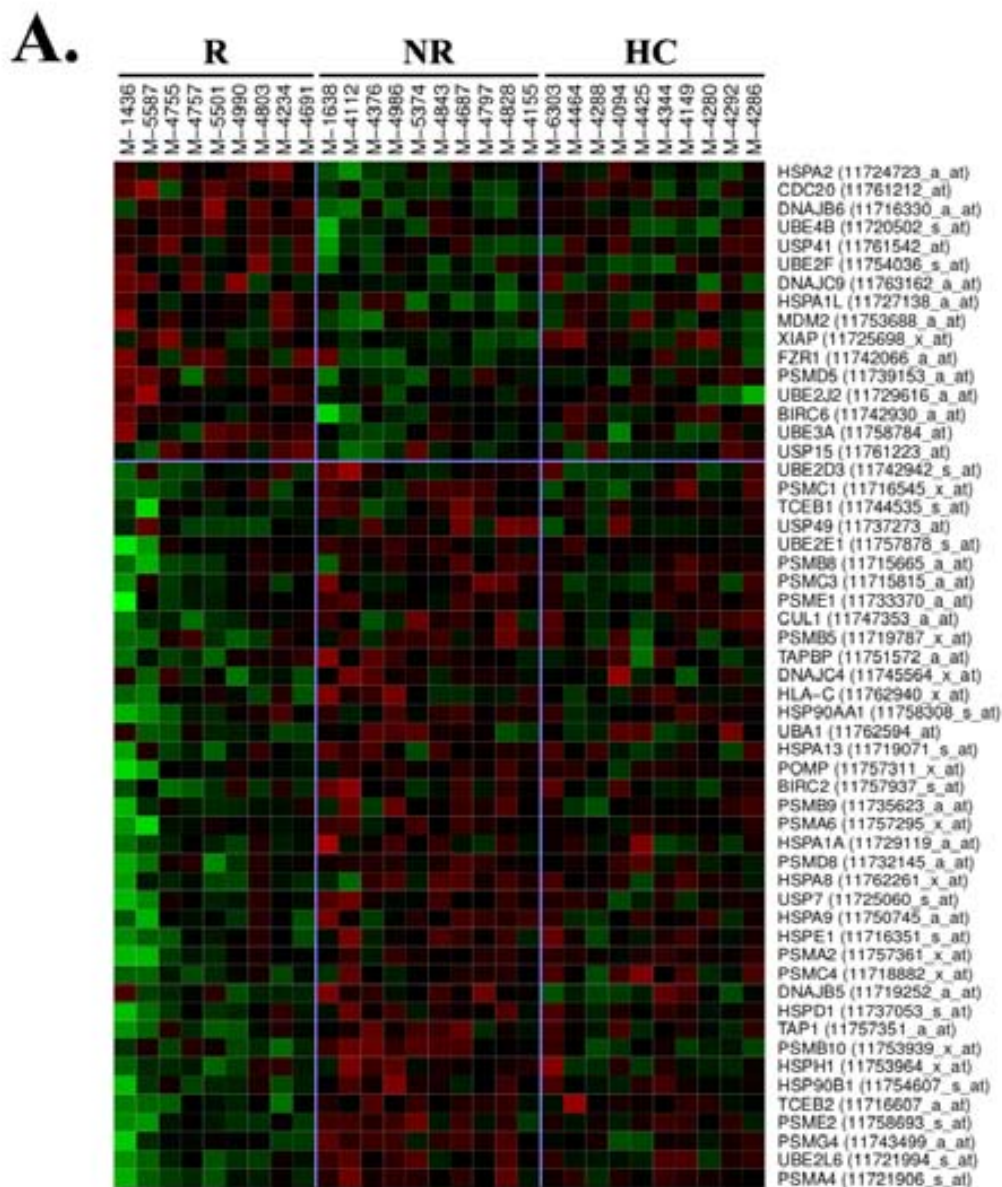


Figura 25. A) Ilustración del mapa de calor de genes de la vía de ubiquitinización proteica significativamente expresados de forma más significativa en los pacientes no respondedores al compararlos con los respondedores ($p < 0,05$). R: pacientes respondedores. NR: pacientes no respondedores. HC: controles sanos. El color verde significa menor expresión y el color rojo mayores niveles de expresión. B) Distancia de Euclides entre R, NR y HC.

(iii) Resultados relacionados con el objetivo 3

“Identificar genes relacionados con la respuesta al IFN- β mediante un abordaje farmacogenómico en pacientes con EMRR de genes pertenecientes a la vía de los TLR y la vía de los IFNs de tipo I “

Este estudio se completó en dos fases: la primera fase consistió en un screening de 246 SNPs localizados en genes relacionados con las vías de TLR4 y de los IFNs de tipo I en la que se incluyó un total de 830 individuos con EMRR, 414 de los cuales clasificados como no respondedores al tratamiento con IFN- β y 416 como respondedores. El listado de SNPs escogidos con sus características se muestra en la Tabla suplementaria 3. En la segunda fase, se escogieron los SNPs que habían resultado significativos en la primera fase y se genotiparon en una cohorte independiente comprendida por 555 pacientes con EMRR, de los cuales 274 habían sido clasificados como no respondedores y 281 como respondedores. Finalmente, se analizaron las cohortes en su conjunto.

1. Primera fase

En esta primera fase de *screening* o barrido se incluyeron 416 pacientes con EMRR que fueron clasificados como respondedores tras aplicarles el criterio de respuesta descrito anteriormente y 414 pacientes con EMRR fueron clasificados como no respondedores al tratamiento con IFN- β . Los resultados de esta primera fase se detallan en la Tabla suplementaria 3.

En la Tabla 12 se muestran los datos demográficos y clínicos de los pacientes incluidos en el estudio (se detallan ambas fases).

El genotipado realizado con la tecnología de Illumina de “GoldenGate” con más de un 95% de muestras genotipadas. Tras un análisis combinado de todas las cohortes en el que se estratificaron los resultados según la procedencia de las muestras, elegimos los SNPs que tenían un valor $p \leq 0,02$ y decidimos también validar el SNP localizado en el gen *IFNAR1* por los resultados previos encontrados en la expresión de este gen (Tabla 13).

Por tanto, se seleccionaron para una segunda fase los siguientes SNPs (*GENE and SNP databases*):

- (i) rs10958713 (*IKBKB - inhibitor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells, kinase beta*; $p=0,0030$; $OR=1,4$), un SNP intrónico. Encontramos una frecuencia mayor del alelo menos frecuente en la población europea (el alelo A) en los pacientes no respondedores y una mayor frecuencia del alelo G en los pacientes respondedores. El gen *IKBKB*, en el cromosoma 8p11.2, codifica una proteína capaz de fosforilar el inhibidor del complejo inhibidor de NF κ B, causando su disociación y por tanto, la activación del factor de transcripción NF κ B, capaz de inducir citoquinas proinflamatorias. Es parte de la cascada de señalización de la vía de los TLRs.
- (ii) rs3747517 (*IFIH1 - interferon induced with helicase C domain 1*; $p=0,0104$; $OR=1,4$), un polimorfismo no sinónimo cambia CAT por CGT y cambia una histidina por una arginina, ambos aminoácidos con carga positiva. En europeos es más común el alelo A, que es el que encontramos asociado con los respondedores al tratamiento con IFN- β . Este gen, *IFIH1*, localizado en 2q24, es un gen inducible por IFN- β y tiene un dominio de muerte (DEAD-box). Este tipo de proteínas son helicasas putativas de ARN, se caracterizan por modificar la estructura secundaria del ARN y se han involucrado en la apoptosis.
- (iii) rs2277302 (*PELI3 - pellino E3 ubiquitin protein ligase family member 3*; $p=0,0172$; $OR=1,4$), un SNP sinónimo, se cambia un codón GAT por GAC y ambos se traducen a ácido aspártico. Observamos una mayor proporción del alelo G, el menos frecuente en caucasianos, en los no respondedores y del A en los respondedores. El gen *PELI3*, en el cromosoma 11q13.2, codifica para una proteína ubiquitina ligasa implicada en la cascada de señalización de los TLRs e IL1R activando los complejos IRAK1/TRAF6 que darán lugar a la activación del factor de transcripción NF κ B.
- (iv) rs4422395 (*CXCL1 - chemokine (C-X-C motif) ligand 1*; $p=0,0173$; $OR=1,4$), un SNP intergénico. Encontramos que el alelo A, que es el alelo menor, está más representado en los pacientes respondedores. CXCL1 codificado por el gen *CXCL1* que se encuentra en el cromosoma 4q21, es una quimiocina que señaliza por un

receptor acoplado a proteína G, el receptor CXCL2, y tiene un papel en la inflamación ya que es quimioatrayente de los neutrófilos.

- (v) rs6597 (*STUB1* - *STIP1* homology and U-box containing protein 1, E3 ubiquitin protein ligase; $p=0,0193$; OR=1,5), un polimorfismo intrónico. Encontramos el alelo G, el menos frecuente en europeos, más representado en los pacientes que no responden al tratamiento. El gen *STUB1* localizado en 16p13.3, es una ubiquitina ligasa/cochaperona que tiene como función controlar la calidad de las proteínas.
- (vi) rs2834202 (*IFNAR1* - *interferon (alpha and beta) receptor 1*; $p=0,0303$; OR=1,3), que está localizado en el 3' UTR del gen. Observamos que el alelo G, el menos común en europeos está más representado en los pacientes que responden al tratamiento con IFNbeta. *IFNAR1*, cuyo gen está localizado en 21q22.11, es una subunidad del receptor de los interferones de tipo I, la subunidad encargada de reconocer el ligando.

2. Segunda fase

Se genotiparon los 6 SNPs seleccionados en una cohorte adicional de un total de 555 pacientes con EMRR clasificados según su respuesta clínica al tratamiento con IFN- β . De ellos, 281 eran respondedores y 274 eran no respondedores. Las muestras procedían de cuatro centros de EM diferentes: Rostock (Alemania), Amsterdam (Holanda), Málaga y Madrid (España). Esta cohorte coincidía a nivel poblacional con la utilizada en la fase I ya que en ambas cohortes se incluyeron pacientes del norte y el sur de Europa. Los SNPs se genotiparon mediante la tecnología TaqMan con un 97% de muestras genotipadas. Tal y como se observa en la Tabla 13, ninguno de los SNPs seleccionados se encontraron asociados de forma significativa con la respuesta al tratamiento en esta cohorte adicional. Es decir, los SNPs encontrados como posibles marcadores de respuesta en la fase I no se validaron en la segunda fase.

PHASE	Sets	N		Female/male (% females)		Age (years)		Disease duration (years)		EDSS		IFNβ (1/2/3) ^a	
		R	NR	R	NR	R	NR	R	NR	R	NR	R	NR
PHASE I	Toulouse	67	68	53/14 (80.1)	47/21 (69.1)	28.9 (8.0)	27.9 (8.7)	4.5 (5.4)	4.8 (5.8)	2.0 (1.2)	1.7 (1.3)	15/39/13	16/36/16
	Serbia	24	24	17/7 (70.8)	15/9 (62.5)	31.9 (6.4)	33.3 (7.8)	3.6 (3.5)	6.1 (4.9)	0.9 (0.8)	2.3 (0.9)	12/0/12	14/0/10
	Bochum	4	4	2/2 (50.0)	2/2 (50.0)	37.8 (4.6)	36.0 (9.8)	3.8 (3.8)	4.3 (3.6)	2.1 (1.1)	3.9 (2.5)	0/1/3	1/1/2
	Rostock	43	43	36/7 (83.7)	36/7 (83.7)	40.9 (9.9)	38.3 (11.4)	5.0 (4.8)	4.6 (5.8)	1.8 (1.6)	3.0 (1.7)	12/9/22	6/6/31
	Newcastle	32	32	25/7 (78.1)	25/7 (78.1)	42.0 (11.1)	35.2 (12.2)	6.3 (9.1)	6.0 (5.6)	-	-	16/2/14	16/2/14
	San Francisco	2	2	2/0 (100)	2/0 (100)	40.5 (6.4)	41.5 (6.4)	1.9 (0.9)	3.7 (4.1)	1.0 (1.4)	1.5 (0.7)	1/1/0	1/1/0
	Milan	6	6	4/2 (66.7)	3/3 (50.0)	39.6 (8.8)	40.8 (15.8)	3.7 (5.1)	6.3 (7.2)	1.5 (0.8)	2.5 (1.8)	4/2/0	4/2/0
	Madrid PH	20	20	12/8 (60.0)	14/6 (70.0)	37.7 (8.3)	32.7 (9.8)	4.6 (2.7)	7.2 (2.8)	-	-	10/5/5	10/8/2
	Madrid SC	29	30	21/8 (72.4)	15/15 (50.0)	33.4 (7.4)	34.1 (7.7)	5.3 (4.8)	5.1 (6.5)	2.0 (1.6)	2.1 (1.3)	12/7/10	12/5/13
	Malaga	32	32	23/9 (71.9)	23/9 (71.9)	40.0 (9.5)	44.0 (10.8)	16.0 (4.0)	15.0 (7.6)	1.0 (1.3)	2.0 (1.4)	10/17/5	9/16/7
	Bilbao	28	25	21/7 (75.0)	18/7 (72.0)	36.5 (9.8)	34.0 (8.4)	8.0 (7.4)	8.1 (8.2)	2.2 (2.0)	2.5 (1.5)	13/3/12	11/5/9
Barcelona	129	128	103/26 (79.8)	99/29 (77.3)	40.8 (8.8)	40.9 (10.3)	13.7 (7.2)	13.3 (7.3)	2.4 (1.8)	5.3 (2.1)	38/37/54	34/36/58	
ALL PHASE I	416	414	319/97 (76.7)	299/115 (72.2)	37.5 (4.1)	36.5 (4.6)	6.4 (7.0)	7.0 (3.5)	1.7 (0.5)	2.7 (1.1)	143/123/150	134/118/162	
PHASE II	Madrid RC	33	41	27/6(81.8)	29/12 (70.7)	38.0 (9.4)	35.9 (9.2)	6.2 (6.1)	3.8 (5.2)	1.6 (0.8)	1.8 (1.3)	21/4/8	22/13/6
	Malaga	130	114	82/47 (63.6)	75/39 (65.8)	45.5 (11.1)	46.8 (11.1)	16.3 (7.9)	17.3 (7.6)	1.4 (1.5)	1.7 (1.4)	48/27/48	41/38/3
	Rostock	43	43	36/7(83.7)	36/7 (83.7)	37.7 (10.2)	35.5 (11.1)	3.0 (0.9)	3.1 (0.9)	1.8 (1.3)	2.2 (1.1)	9/17/17	6/7/30
	Amsterdam	76	76	55/21 (72.3)	50/24 (67.6)	35.5 (8.3)	35.0 (9.4)	4.0 (4.2)	4.2 (4.0)	2.5 (1.3)	3.1 (1.4)	24/27/25	18/25/31
	ALL PHASE II	282	274	200/81 (71.2)	190/84 (6.9)	40.6 (11.0)	40.14 (11.8)	9.8 (8.7)	9.9 (8.8)	1.8 (1.4)	2.2 (1.5)	102/75/98	87/83/70
BOTH PHASES	ALL COHORTS	698	688	519/178 (74.5)	489/199 (71.1)	38.6 (10.6)	37.7 (11.6)	8.9 (8.0)	8.7 (7.9)	1.8 (1.5)	2.7 (2.1)	245/198/248	221/201/232

Tabla 12. Datos clínicos de la cohorte de pacientes con EMRR incluidos en el estudio farmacogenético. Están representados globalmente y clasificados por su cohorte original y por su respuesta al tratamiento. ^aIFNβ (1a intramuscular/1b subcutáneo/1a subcutáneo). EDSS: Escala de discapacidad..Madrid SC: Se refiere al Hospital Clínico San Carlos. Madrid PH: Se refiere al Hospital Universitario Puerta de Hierro, Madrid. Madrid RC: Se refiere al Hospital Ramón y Cajal, Madrid. Media (desviación estandar)

3. Análisis global

En el análisis global de ambas fases, se incluyó un total de 1385 pacientes con EMRR, de los cuales 686 eran no respondedores y 688 respondedores. En la Tabla 13 se muestran los resultados del análisis global. Como se puede observar, solamente un SNP presentó una asociación estadísticamente significativa con la respuesta al tratamiento si consideramos un valor p menor de 0,01. El SNP se identifica como rs2277302, un polimorfismo sinónimo localizado en el gen PELI3.

SNP	CROM	Gen	MA	MAF	Fase I			Fase II			Ambas fases		
					p	OR	A ⁴	p	OR	A ⁴	p	OR	A ⁴
rs10958713	8	<i>IKBKB</i>	G	0.36	0.0030	1.38	G	0.613	1.06 (0.82 - 1.38)		0.02	1.20 (1.02 - 1.40)	
rs3747517	2	<i>IFIH1</i>	G	0.26	0.0104	1.35	A	0.577	1.08 (0.81 - 1.43)		0.05	0.84 (0.71 - 1.01)	
rs2277302	11	<i>PELI3</i>	A	0.20	0.0172	1.36	A	0.331	1.16 (0.85 - 1.56)		0.005	1.30 (1.08 - 1.57)	
rs4422395	4	<i>CXCL1</i>	G	0.15	0.0173	1.42	A	0.325	1.17 (0.84 - 1.62)		0.28	0.89 (0.72 - 1.10)	
rs6597	16	<i>STUB1</i>	A	0.12	0.0193	1.47	A	0.759	0.94 (0.66 - 1.35)		0.03	1.27 (1.01 - 1.60)	
rs2834202	21	<i>IFNAR1</i>	A	0.27	0.0303	1.29	G	0.493	0.90 (0.69 - 1.19)		0.02	0.82 (0.69 - 0.98)	

DISCUSIÓN

DISCUSIÓN

Desde hace más de 15 años, el IFN- β recombinante se utiliza como tratamiento de pacientes con EMRR. El IFN- β ha demostrado ser un fármaco eficaz, disminuyendo la frecuencia de brotes y la actividad de la enfermedad medida por resonancia magnética (87-89). A pesar de ser un fármaco efectivo y seguro en la mayoría de pacientes con EMRR, existe un porcentaje de pacientes que no responden al tratamiento (153).

La detección precoz de la respuesta al tratamiento con IFN- β en pacientes con EM tiene gran relevancia clínica. Actualmente existe un modelo predictivo de la respuesta al IFN- β que se basa en la RM (171). Este modelo se basa en la presencia o ausencia de lesiones activas al año del tratamiento, que resulta ser un factor predictivo de la discapacidad de esos pacientes a los dos años. Además, se realizan tests para la detección de NABs en el suero de pacientes. Sin embargo, el efecto negativo de los NABs sobre la actividad clínica y radiológica no suele observarse en las fases iniciales de tratamiento. Es decir, ninguno de estos dos métodos consigue predecir la respuesta al tratamiento antes del inicio del mismo o antes del primer año. Una metodología que nos permita identificar los pacientes que no van a responder al tratamiento antes del inicio al mismo sería de gran importancia clínica en el abordaje de los pacientes con EM.

Por otro lado, se desconoce si la falta de respuesta se debe a alteraciones en las vías de señalización en las cuales el IFN- β ejerce sus efectos, como es la vía de los IFNs de tipo I u otras vías relacionadas, o si es consecuencia de una mayor actividad de la enfermedad en los pacientes no respondedores.

El estudio en el que se basa la presente tesis, reveló que la vía de los IFNs de tipo I y la vía de los TLRs se encontraban sobre-expresadas en los pacientes no respondedores al tratamiento con IFN- β antes de comenzar el mismo. Además, estudios mecanísticos apuntaron al TLR4 como el receptor más implicado en la respuesta a IFN- β *in vitro* y a la población monocitaria como la población con una mayor sobreactivación de la vía de los IFNs de tipo I (166). En este estudio quisimos ahondar en el papel de la vía del TLR4 y de los IFNs de tipo I según la respuesta al tratamiento con IFN- β a nivel proteico (TLR4, TLR2,

IFNAR1 y HSP70), a nivel de expresión génica (*MYD88*, *TICAM1*, *CXCL10*, *IFN1b*, *IL1b*, *TNFa*, *IRAKM*, *PTPN6*, *SIGIRR*, *SARM1*, *PTPN11*, *RIPK3*, *SIKE* y *TYK2*) y a nivel genético, escogiendo SNPs contenidos en genes de las dos vías. Además, estudiamos el perfil transcripcional de monocitos aislados provenientes de los pacientes según su respuesta al tratamiento.

➤ **Implicación de la vía del TLR4 en la respuesta al tratamiento**

Al estudiar la expresión del receptor en monocitos de pacientes con EM, no hallamos diferencias entre los pacientes que responden o que no responden al tratamiento. No obstante, a pesar de no ser uno de los objetivos primarios de la presente tesis, decidimos comparar en paralelo la expresión del TLR4 entre el grupo total de pacientes con EM y los controles sanos. Los pacientes con EM tienen un menor porcentaje de monocitos CD14+TLR4+ y menores niveles de expresión del TLR4. No sólo eso, la expresión de esta molécula correlaciona negativamente con la escala de discapacidad y con las lesiones en T2 medidas por RM. Es decir, a menor expresión de TLR4 en los monocitos, mayor EDSS y mayor número de lesiones en T2 por RM. Estos resultados nos hacen pensar en un posible papel de esta molécula en la patogenia de la enfermedad.

La función del TLR4 en la enfermedad se ha estudiado mayoritariamente en el modelo animal. Se conoce que la *toxina pertussis*, utilizada para inducir la EAE, señala a través del TLR4 y de este modo, potencia un ambiente inflamatorio (197). Existe cierta controversia en la función del TLR4 en la EAE. En un estudio en el que utilizaban ratones *knockout* para TLR4 se observó que el curso clínico de la enfermedad se agravaba en estos ratones. Los ratones *knockout* tenían mayor número de células Th17 en bazo y mayores niveles de IL-17 en suero que los ratones *wild type*. (134). En otro estudio en el que abordaron el modelo animal de la EM en ratones *knockout* para todos los receptores de TLR, sin embargo, no se observaron diferencias en la gravedad o incidencia de la enfermedad entre los ratones *knockout* para TLR4 y los *wild type* (198). Los mismos resultados obtuvimos en un estudio reportado por nuestro grupo (199). Una de las posibles razones de estos resultados contradictorios podría ser las diferentes estrategias de inducción de la EAE utilizada en los diferentes estudios ya que se utilizan ligandos del TLR4 (revisado en (56)). Por otro lado, en un estudio realizado con pacientes de EM se

observó que éstos presentan menores niveles de TLR4 tras 8 horas de un ejercicio moderado, y que se correlaciona con mayor fatiga (200).

En cuanto al efecto del tratamiento con IFN- β , nuestro estudio muestra que se incrementa de manera muy significativa la expresión de TLR4 y de TLR2 en los pacientes con EM independientemente de su clasificación de la respuesta. Observamos resultados similares en otros genes de la vía de los TLRs como *MYD88* y *TICAM1*. Ambos genes se inducen tras un año de tratamiento con IFN- β en el grupo global de pacientes con EM. Asimismo, la expresión de *CXCL10* y *TNF α* , inducido por la vía MYD88-independiente y MYD88-dependiente respectivamente, se incrementa tras el año de tratamiento con IFN- β . El IFN- β , por tanto, tiene un efecto de inducción en diversos genes de la vía de los TLRs. Está ampliamente descrita la expresión de IFNs de tipo I tras la estimulación del TLR4 (78). Sin embargo, existe menor evidencia de la inducción de IFN- β sobre los receptores toll-like. Un estudio posterior reportó que el IFN- α induce la expresión de varios receptores tipo toll, entre ellos TLR2 y TLR4, de TRIF y de MYD88 en macrófagos diferenciados provenientes de CMSP de controles sanos. De hecho, recalcan la importancia del *priming* o previa exposición con IFN- α para la expresión de sí mismo y de otros IFNs de tipo I y III vía estimulación de TLRs (201). Al parecer, los IFNs de tipo I predisponen a los macrófagos a una respuesta antiviral más fuerte. Por otro lado, en un estudio de pacientes con EM, se ha descrito un aumento de la expresión de CXCL10 tras seis horas de tratamiento con IFN- β (202). La inducción de la vía del TLR4 por los IFNs de tipo I podría ser uno de los efectos beneficiosos del IFN- β en la EM ya que se ha descrito que la sobreexpresión de TLR2/4 en monocitos modula la actividad de las células T reguladoras CD4+CD25+ en la infección viral por hepatitis B (203). Sin embargo, en nuestro estudio encontramos que el IFN- β induce ambos receptores en todos los pacientes con EM independientemente de que sean respondedores o no respondedores al tratamiento. Este hecho nos induce a pensar que este efecto del IFN- β sobre el TLR2/4 no es clave para la efectividad del fármaco.

Paralelamente, analizamos la expresión de 7 genes reguladores negativos de la vía de los TLRs y un gen, *TYK2*, implicado en la señalización de la vía de los IFNs de tipo I. Ninguno de los genes estudiados se encontraba diferencialmente expresado entre los respondedores y los no respondedores a IFN- β a nivel basal exceptuando *IRAKM*.

Sorprendentemente, encontramos que *IRAKM* estaba menos expresado en los pacientes respondedores. Es decir, los pacientes no respondedores presentaban niveles

de expresión similares a los controles sanos. En cambio, los pacientes que sí responden al tratamiento tenían una deficiencia en la expresión de este gen. *IRAKM* es un gen que se expresa mayoritariamente en monocitos / macrófagos (204) y que inhibe la vía de los TLRs (126). Pertenece a la familia de IRAK, familia de quinasas involucradas en la señalización de la vía de los TLRs. Este miembro, al contrario del resto de la familia, inhibe la vía MYD88 dependiente y no afecta la vía MYD88 independiente. Una menor expresión de este inhibidor negativo en los pacientes respondedores resultaría en una mayor activación de la vía MYD88 dependiente. La expresión de *IRAKM* se induce por LPS e inhibe la disociación de IRAK1 e IRAK4 de MYD88 y por lo tanto, la formación del complejo IRAK1-TRAF6, que son necesarios para que la cascada de señalización continúe y se active NF- κ B (126). En nuestro estudio encontramos que los respondedores tienen menor expresión de este inhibidor, que se deduce en un menor efecto inhibitorio de la vía de señalización MYD88-dependiente. Esto nos invita a especular que tras la estimulación del TLR4, habría una menor producción de citoquinas proinflamatorias en los respondedores respecto a los no respondedores. Además, se ha demostrado que IRAK1 (diana de *IRAKM*) es necesario para la inducción de citoquinas proinflamatorias, pero que es en cierta manera inhibitorio en la inducción de los IFNs de tipo I porque la vía está más balanceada hacia los genes expresados por mandato de NF- κ B (132). Estas observaciones nacen de los estudios con SHP1 (PTPN6), otro regulador negativo de la vía de los TLR que también actúa sobre IRAK1. SHP1 inhibe la activación de NF- κ B y además promueve la producción de los interferones de tipo I (132, 136). El efecto de *IRAKM* en promover la producción de los IFNs de tipo I se apoya por el estudio base de esta tesis, en el que la estimulación con LPS se asociaba a una mayor producción de IFN- α en los no respondedores respecto a los respondedores (166). De hecho, se encontró que los respondedores expresaban menores niveles de IFN- α tras el estímulo de TLR4, mientras que los no respondedores se comportaban de manera más similar a los controles sanos (166). Tal y como se observa en la figura 26, la vía se desplazaría hacia la señalización vía MYD88 dependiente tras el estímulo de LPS en los pacientes respondedores debido a la menor expresión de *IRAKM* que inhiba la misma. Por tanto, la vía MYD88 independiente quedaría parcialmente diezmada, expresándose así menores niveles del IFN de tipo I, IFN- α .

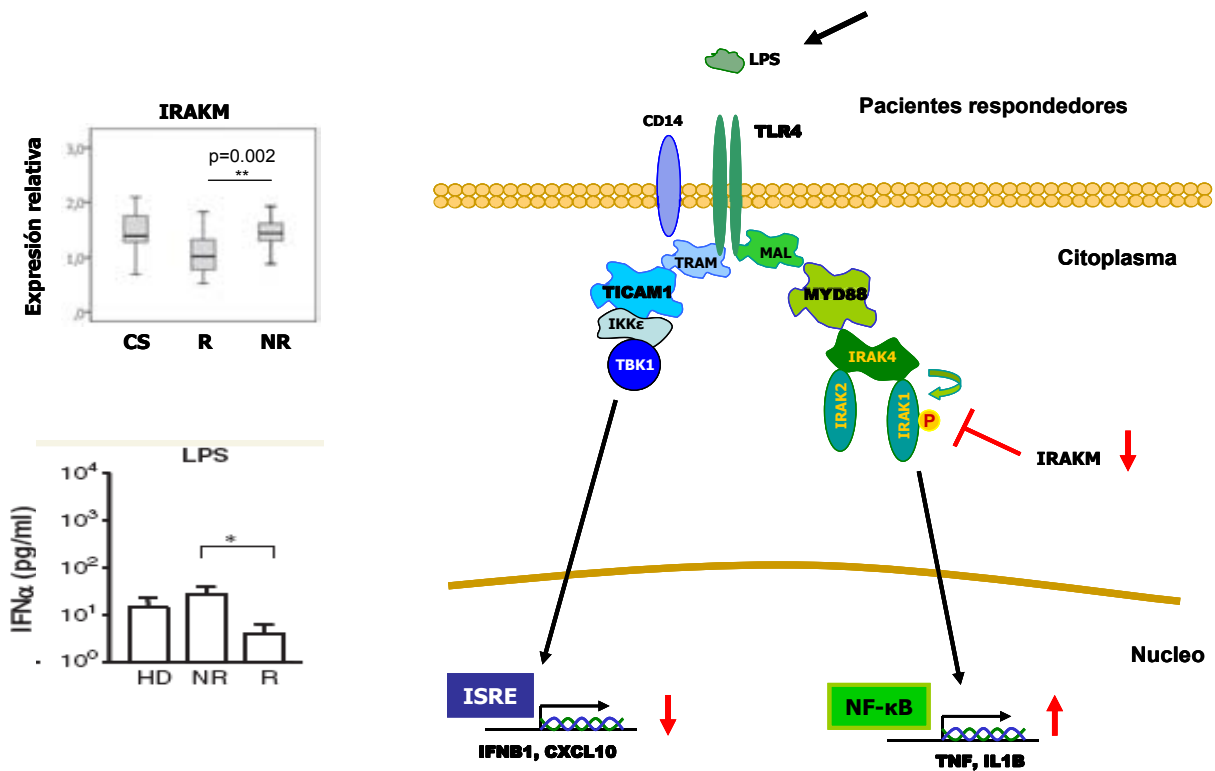


Figura 26. Gráfico de la expresión de IRAKM (IRAK3) del presente estudio y gráfico de la secreción de IFN- α tras el estímulo con LPS. Ilustración del posible efecto de la menor expresión de IRAKM en respondedores, que llevaría a una menor expresión de IFNs de tipo I tras el estímulo con LPS.

A nivel basal, encontramos que los niveles de expresión de *IFN1b* e *IL1b* se encuentran claramente elevados en los pacientes con EM que no responden al tratamiento con IFN- β . El número de moléculas de ARN de estos dos genes son significativamente mayores en estos pacientes antes de que comiencen el tratamiento. Además, encontramos niveles de expresión intermedios en los pacientes que tienen una respuesta clasificada como intermedia. Ambos genes se inducen como consecuencia de la señalización del TLR4, siendo el *IFN1b* inducido por la vía MYD88 independiente e *IL1b* por la vía MYD88 dependiente. Sin embargo, no se puede confirmar que este resultado sea consecuencia de una mayor señalización del TLR4 en estos pacientes ya que son genes que se inducen por numerosos estímulos y no se ha observado el mismo resultado con *CXCL10* y *TNF*, aunque en el caso *CXCL10* se observa cierta tendencia.

➤ Implicación de la vía de los IFNs de tipo I en la respuesta al tratamiento

Retomando el resultado obtenido en la expresión basal de *IFN1b*, es interesante observar que el *IFN1b* endógeno está elevado a nivel basal en los pacientes que no responderán al tratamiento con IFN- β con el añadido de que la expresión de *IFN1b* no aumenta tras un año de tratamiento en los pacientes que no responden ni en los pacientes clasificados como intermedios. En cambio, se observa un claro aumento en los pacientes que responden al tratamiento. Este hallazgo concuerda con los resultados publicados por Axtell *et al.* (2010), donde se encontraron niveles de IFN- β elevados en el suero de los no respondedores (205). Además, las CMSPs de pacientes respondedores expresan mayores cantidades de *IFN1b* al exponerlas *in vitro* en presencia de IFN- β exógeno mientras que las CMSPs provenientes de no respondedores y de controles sanos no responden al estímulo. La vía de los IFNs de tipo I endógenos parece estar saturada en los no respondedores, de tal manera que no responden biológicamente ni clínicamente al tratamiento exógeno con IFN- β recombinante.

La primera publicación que apuntaba hacia esta teoría se publicó en 2008 por van Baarsen *et al.* En este estudio se clasificaron los pacientes con EM en dos grupos según la expresión elevada o disminuida de genes inducidos por IFNs de tipo I. Para ello, seleccionaron un grupo de 15 genes diferencialmente expresados entre estos dos grupos y que correlacionaban negativamente con su propia expresión a los 3 o 6 meses de tratamiento. Es decir, los pacientes que a nivel basal tenían menor expresión de estos genes, presentaban una clara inducción por efecto del tratamiento. Sin embargo, los pacientes que *per se* expresaban mayores niveles de estos genes, no mostraban un efecto en los mismos (189). Posteriormente, hallamos un patrón idéntico en los microarrays reportados por Comabella *et al.*, 2009, donde además, este fenómeno se pudo asociar con la respuesta clínica al fármaco tras dos años de tratamiento (166). En un estudio adicional, se clasificaron los pacientes con EM en base a la expresión de Mx1, gen aceptado como biomarcador de respuesta biológica a IFN- β ya que se induce de manera específica. Una quinta parte de los 61 pacientes estudiados eran Mx1_{high} y además de este gen, presentaban mayores niveles de expresión de otros genes de respuesta a los IFNs de tipo I (206). Observaron que estos genes aumentaban tras un mes de tratamiento en los pacientes Mx1_{low} y no en los Mx1_{high}. Además, hemos hallado una mayor expresión

transmembranal de IFNAR1 en monocitos CD14+ de pacientes no respondedores respecto a los respondedores. No sólo eso, al aislar monocitos de pacientes con EM clasificados según su respuesta clínica al tratamiento, encontramos que la vía más diferencialmente expresada entre ambos grupos es la de los IFNs de tipo I.

Cabe destacar que el aumento observado en la expresión de IFN- β endógeno y en la expresión de IFNAR1 en los monocitos, aunque fuera más prominente, no se limita al subgrupo de pacientes clasificados como no respondedores estrictos al IFN- β . De hecho, también hallamos niveles elevados de IFN- β y expresión elevada de IFNAR1 en monocitos de pacientes clasificados como respondedores intermedios, con un criterio de respuesta no tan estricto que incluía la presencia de brotes o la progresión de al menos un punto en la escala de discapacidad. Estos hallazgos son relevantes a nivel clínico ya que una importante proporción de pacientes que no responden al tratamiento cumplen los criterios de los denominados respondedores intermedios.

➤ **Implicación de los monocitos en la respuesta al tratamiento**

En el estudio base de la presente tesis, se observó que la activación del factor de transcripción de la vía de los IFNs de tipo I, STAT1, se encontraba activado en monocitos periféricos y no en otras poblaciones de las CMSP (166). Este hallazgo sigue la línea de los resultados observados en el estudio transcriptómico realizado en monocitos. Hallamos que STAT1 está más expresado en los no respondedores y pudimos predecir la expresión de genes modulados por este factor de transcripción. Además, encontramos que una de las subunidades del receptor de IFN- β , el IFNAR1, tiene una mayor presencia en la membrana celular de los monocitos provenientes de los no respondedores así como de los respondedores intermedios respecto los pacientes respondedores. No sólo eso, la vía de los IFNs de tipo I resulta ser la vía más enriquecida en el estudio transcriptómico de los monocitos aislados. En el perfil de expresión de esta vía, encontramos diversos genes de respuesta a los IFNs de tipo I claramente elevados en los no respondedores. En conjunto, estos resultados apuntan a un papel clave de los monocitos como mediadores de la respuesta terapéutica al IFN- β . A su vez, un estudio reciente reportó que las respuestas diferenciales observadas en la estimulación *in vitro* con IFN- β en poblaciones celulares mayoritariamente reside en la población monocitaria (191).

Diversas líneas de investigación apoyan un papel importante de los monocitos en la patogénesis de la EM: (i) los monocitos circulantes de pacientes con EM son más activos y están presentes en lesiones cerebrales activas (141); (ii) los monocitos de pacientes con EM secretan mayores cantidades de peróxido de hidrógeno y de superóxido (142) y expresan mayor cantidad de citoquinas proinflamatorias (TNF α , IL-1 β y IL6) en CMSP estimuladas de pacientes en brote agudo (143); (iii) los pacientes con EM tienen mayor porcentaje de monocitos secretores de IL-6 e IL-12 y se asocian con mayor actividad de la enfermedad medida por RM (145); (iv) los monocitos tipo CD14+CD16+ (CCR5+) atraviesan la barrera hematoencefálica durante las fases agudas de neuroinflamación (148).

Existe evidencia en la literatura sobre la relevancia de la vía de los IFNs de tipo I en monocitos de pacientes con EM y otras enfermedades autoinmunes. Los monocitos de pacientes con EM son la única población de CMSP que al responder al tratamiento con IFN- β incrementan la expresión de TRAIL (191). TRAIL es un receptor transmembranal proapoptótico inducido por los IFNs de tipo I que ha sido propuesto como posible biomarcador de respuesta al IFN- β (207). De hecho, otro estudio reveló que el tratamiento con IFN- β predispone a la apoptosis monocítica mediante la inducción de TRAIL (208).

A pesar de que nosotros no lo hemos analizado, se ha reportado que no existen diferencias en los porcentajes de células pDC entre pacientes con EMRR que responden y no responden al tratamiento con IFN- β (209). No es descartable, sin embargo, que estas células, conocidas por su alta capacidad de producción de IFNs de tipo I, estuvieran produciendo más IFNs en los no respondedores. Por otro lado, la señalización de los IFNs de tipo I en monocitos podría jugar un papel importante en la patogénesis de la EM. En ratones knockout condicionales para *ifnar1* en monocitos y neutrófilos, el curso clínico de la EAE fue más grave. Este efecto se daba en los *knockout* condicionales *ifnar1*^{-/-} para monocitos y neutrófilos y no para otras poblaciones celulares periféricas (105). Además, en otra enfermedad autoinmune, el síndrome de Sjögren, se encontró una mayor expresión de los genes de respuesta a IFNs de tipo I en los monocitos CD14+ purificados (193).

Además de la vía de los IFNs de tipo I, hemos hallado otras vías de señalización en el monocito que podrían jugar un papel importante en la respuesta a IFN- β . Entre las vías de señalización que estaban diferencialmente expresadas entre respondedores y no

respondedores, destacamos la disfunción mitocondrial, la señalización de EIF2, eIF4 y p70S6K y la vía de la ubiquitinización proteica por considerarlas potencialmente relacionadas con la respuesta al IFN- β .

Un número considerable de genes encontrados como diferencialmente expresados apuntó a la disfunción mitocondrial en monocitos de pacientes no respondedores a IFN- β . La mitocondria genera ATP a través de la cadena respiratoria mitocondrial, que tiene importantes funciones en procesos celulares como la oxidación celular y la apoptosis. En este contexto, la cadena respiratoria mitocondrial detecta situaciones de estrés intra- y extracelulares y responde liberando citocromo c que lleva a la activación de caspasas y a la muerte celular.

En nuestro estudio, los no respondedores al IFN- β se caracterizaron por la sobreexpresión de genes que pertenecen a la cadena respiratoria mitocondrial. Una de las posibles explicaciones de este hallazgo, es que sea debido a la regulación elevada de la vía de los IFNs de tipo I. Los IFNs de tipo I pueden modular la estabilidad de la membrana mitocondrial y tener efectos apoptóticos. Por ejemplo, en un estudio de Yanase et al. (210), los IFNs de tipo I inducían la despolarización mitocondrial, la liberación de citocromo c y la activación de la caspasa 3 en células Daudi, una línea celular de linfoma de células B. En otro estudio, Huang et al. (211) reportó una clara interrelación entre la cadena respiratoria mitocondrial, la señalización por IFN- β y la muerte celular. Estos autores observaron un efecto sinérgico entre el ácido retinoico y el IFN- β que potencia los procesos apoptóticos dependientes de la mitocondria y que fomenta una mayor expresión de los genes de la cadena respiratoria mitocondrial (211). No sólo eso, el IFN- β también ha demostrado inducir la señalización por p53 (212, 213). Es interesante destacar un estudio realizado por van Boxel-Dezaire et al. (214), el cual apuntó a los monocitos como la población celular específica que entraba en apoptosis tras la estimulación con IFN- β vía la activación de STAT1 y de STAT3. En nuestro estudio, los factores de transcripción STAT1, p53 y DDIT3 (*damage inducible transcript 3*) (Tabla suplementaria 2; <https://www.dropbox.com/sh/g6cqiythp3argte/Jf5p0nrPcY>) estaban más expresados en monocitos de no respondedores, hallazgos que, en su conjunto, sugieren una mayor apoptosis en monocitos de pacientes no respondedores a IFN- β , seguramente debido a la despolarización mitocondrial.

Por otro lado, encontramos numerosos genes ribosomales más expresados en los pacientes no respondedores al IFN- β , y la señalización por eIF2, eIF4 y p70S6K, estrechamente relacionadas con la síntesis proteica, estaban más expresadas en estos pacientes. Estos hallazgos podrían estar relacionados con la mayor expresión basal de los IFNs de tipo I observada en los no respondedores. En este contexto, los IFNs de tipo I pueden bloquear la síntesis proteica induciendo la expresión de la protein quinasa PKR, que a su vez fosforila eIF2 (215). Este factor de iniciación de la maquinaria de la traducción forma un complejo inactivo con eIF2B que reduce la síntesis proteica dentro de la célula. Estos procesos están relacionados con las funciones antivirales de los IFNs de tipo I dirigidos a inhibir la transcripción viral.

Por último, la vía de la ubiquitinización proteica estaba más expresada en monocitos de los no respondedores al tratamiento. Curiosamente, cuando investigamos los genes relacionados en esta vía, observamos que la mayoría de ellos pertenecían a la maquinaria del inmunoproteosoma pero no del proteasoma común. El inmunoproteasoma está muy involucrado en la presentación antigénica y los monocitos son unas de las células de presentación antigénica del sistema inmune. La mayor expresión de la vía de la ubiquitinización podría estar relacionada con la mayor expresión de los IFNs de tipo I en monocitos de los no respondedores. Se ha reportado que los IFNs de tipo I pueden inducir el cambio del proteasoma común al inmunoproteasoma (216, 217) y este efecto parece que está relacionado con la respuesta memoria antiviral (218). Además, algunos genes relacionados con el inmunoproteasoma estaban más expresados en los no respondedores como TAP1 (*Transporter 1, ATP-Binding Cassette, Sub-Family B (MDR/TAP)*), LMP2/PSMB9 y LMP7/PSMB8, conocidos por ser inducibles por IFN- β (219).

Es importante volver a resaltar que las vías adicionales más expresadas en monocitos de pacientes no respondedores al tratamiento con IFN- β están de alguna manera relacionadas con la vía de señalización de los IFNs de tipo I. Este hecho nos invita a especular que la sobre-expresión de genes pertenecientes a estas vías es una consecuencia de la mayor expresión de la vía de los IFNs de tipo I en los pacientes de este particular subgrupo.

➤ ¿Cuál es el grupo aberrante?

Un descubrimiento intrigante que merece ser discutido es el comportamiento de los controles sanos respecto a los respondedores o a los no respondedores. Los resultados que hemos obtenido son en cierta manera incongruentes con la posición de los controles sanos respecto a un grupo o a otro de pacientes. Por un lado, encontramos que la expresión de IFNAR1 en monocitos CD14+ y la expresión de IFN1b y de *IL-1b* en controles sanos es más cercana a los respondedores que a los no respondedores. Por otro lado, encontramos que la expresión de *IRAKM*, la inducción *in vitro* de *IFN1b* mediante IFN-β exógeno y la transcriptómica de los monocitos en controles sanos se parece más a los no respondedores. Estos hallazgos inducen a especular sobre cuál es el grupo aberrante en la respuesta a IFN-β, los no respondedores, o los respondedores. Diversas enfermedades autoinmunes tales como lupus eritematoso sistémico (95, 96), síndrome de Sjögren (100), esclerosis sistémica (99), dermatomiositis (98) y un subgrupo de pacientes con artritis reumatoide (101) se han asociado a un perfil de expresión elevado de la vía de los IFNs de tipo I. En un estudio reciente en el que comparan sueros de pacientes con diferentes enfermedades autoinmunes observaron que los pacientes con EM presentaban menor bioactividad de IFN-α/β respecto a los pacientes con lupus eritematoso sistémico, neuromielitis óptica y respecto a los controles sanos (220). También en 1997, se publicó un estudio realizado en 21 pacientes con EM, 10 de ellos en el momento del brote y 11 en remisión y 20 controles sanos emparejados por edad y sexo. En este estudio midieron la producción de IFNs de tipo I de CMSPs en respuesta a estimulación mitogénica o viral y observaron que los pacientes con enfermedad estable producían menores cantidades de IFN-α/β que los pacientes con enfermedad activa o controles sanos (221).

Una posible explicación a todos estos resultados es la divergencia interindividual en las capacidades de respuesta inmune frente a diferentes organismos. Los controles sanos podrían tener, por tanto, diferencias interindividuales en cuanto a la capacidad de respuesta al IFN-β. Sin embargo, los resultados obtenidos en el estudio transcriptómico de monocitos y los resultados del estudio de Feng et al. invitan a especular que la mayoría de pacientes con EM tienen un perfil de expresión de los IFNs de tipo I bajo. De hecho, existe una revisión en la que comparan este perfil bajo de expresión de IFNs de tipo I en pacientes con EM con la alta expresión de IFNs de tipo I encontrada en lupus (222).

Recordemos que la mayoría de pacientes con EMRR responden bien al tratamiento con IFN- β . Por tanto, la suplementación exógena de IFN- β reestablecería el balance en su sistema inmune y se traduciría en una alta efectividad del tratamiento. Sin embargo, parece existir un grupo de pacientes con EM cuya vía de los IFNs de tipo I se encuentra especialmente elevada. Como consecuencia, el tratamiento exógeno con IFN- β no tendría un efecto en la actividad clínica de la enfermedad o incluso es posible que la agravara.

➤ **Farmacogenética**

Previamente en la literatura se había sugerido una posible implicación de genes de respuesta a los IFNs de tipo I y genes relacionados con la vía del TLR en la respuesta al tratamiento de IFN- β en pacientes con EM (166, 179, 180). Basándonos en estos estudios previos, nos propusimos genotipar un panel de polimorfismos localizados en genes relacionados con estas vías de señalización en una cohorte de pacientes extensa. Hasta la fecha, es el estudio farmacogenético realizado de mayor envergadura con pacientes de EM tratados con IFN- β .

A pesar de que en la primera fase del estudio, se encontraron 6 SNPs que se asociaban a la respuesta al tratamiento de manera estadísticamente significativa, ninguno de estos SNPs sobrevivió a la segunda fase del estudio. Sin embargo, no se descarta que una de las posibles causas para que no se hayan validado estos SNPs sea la falta de poder estadístico de la segunda cohorte. De hecho, al hacer el análisis combinado de ambas fases, encontramos un SNP que se asociaba de manera significativa a la respuesta: rs2277302.

El SNP rs2277302 localizado en *PELI3* también se asocia a la respuesta con un p valor de 0,013 en el análisis global y una OR de 1,3. El gen *PELI3* codifica para una proteína E3 ubiquitina ligasa, que participa en la vía de señalización de los TLRs. Hasta el momento, en la bibliografía no se ha descrito ningún polimorfismo localizado en este locus asociado a ninguna enfermedad o condición. El SNP que hemos encontrado asociado con la respuesta es sinónimo. Cambia un codón GAT por GAC, ambos dos traducidos a ácido aspártico. Los resultados muestran que el alelo menos frecuente de la población

européa es el asociado a la no respuesta. La función de este gen es la ubiquitinización de proteínas. En concreto, se ha descrito que la actividad de Peli3 se relaciona con una menor expresión de IFNs de tipo I. En una reciente publicación se reportó que los ratones Peli3 deficientes presentaban niveles de expresión elevados de IFN β endógeno previa activación del TLR3 (223). Proponían que se estaba dando un mecanismo de auto-regulación donde PELI3 inhibía los IFNs de tipo I a través de la ubiquitinización de TRAF6 que resulta en la inhabilitación de IRF7, factor de transcripción de los IFNs de tipo I (223). Estos hallazgos estarían en resonancia con los datos descritos en la presente tesis donde reportamos niveles basales de IFN- β endógeno en las CMSP de los pacientes no respondedores.

En conclusión, los resultados de este estudio no apoyan una asociación entre los polimorfismos localizados en genes relacionados con la vía de los IFNs de tipo I y la vía de los TLRs y la respuesta clínica al IFN- β . Sin embargo, los hallazgos encontrados con respecto al polimorfismo rs2277302 abren la posibilidad de explorar la función de *PELI3* en la respuesta al IFN- β .

➤ **Perspectivas de futuro**

A mi parecer, esta tesis constituye un paso más para esclarecer qué pacientes responden o no responden al tratamiento con IFN- β . En la línea de los hallazgos respecto a la vía del IFN- β , la mayoría de los pacientes con EM tienen esta vía de señalización poco activa, por lo que el tratamiento es efectivo. Sin embargo, existe un subgrupo de pacientes con EM en los que esta vía está saturada y que no responden al tratamiento.

También hemos encontrado que el tratamiento tras un año con IFN- β induce genes de la vía de los TLRs. No obstante, este efecto es independiente de la respuesta clínica al tratamiento por lo que no parece ser determinante en cuanto a la efectividad clínica del mismo. En cuanto a la relevancia de la vía del TLR4 en la respuesta al tratamiento, sólo encontramos diferencias entre R y NR en la expresión de *IRAKM*, un regulador negativo de la vía Myd88 dependiente.

Finalmente, hemos llevado a cabo un estudio farmacogenético de gran envergadura en el que no se ha validado ningún SNP como biomarcador genético de respuesta.

Los resultados obtenidos en la presente tesis así como en trabajos anteriores nos han permitido conocer con mayor profundidad la base molecular de la respuesta al tratamiento con IFN- β en pacientes con EM. En nuestras perspectivas de futuro contemplamos llevar a la práctica clínica y para beneficio del paciente todo este conocimiento. Concretamente, comenzaremos un estudio prospectivo para testar un ensayo rápido y efectivo que determine con fiabilidad la respuesta a IFN- β en pacientes con EM antes del inicio y/o a los tres meses de tratamiento.

CONCLUSIONES

CONCLUSIONES

- La vía de los IFNs de tipo I se encuentra sobre-expresada en los pacientes que no responden al tratamiento. Estos pacientes no responden a nivel molecular al efecto del IFN- β . Esta vía parece estar saturada en estos pacientes y es refractaria a la administración de IFN- β exógeno.
- Los respondedores intermedios presentan niveles de expresión de la vía de los IFNs de tipo I aumentados, pero con valores intermedios entre respondedores y no respondedores.
- La vía de los IFNs de tipo I se encuentra sobre-expresada en la población de monocitos de sangre periférica de pacientes no respondedores. Estos hallazgos apuntan a una alteración selectiva de la vía de los IFNs de tipo I en esta población celular.
- La vía de los TLRs no parece jugar un papel relevante en la respuesta al tratamiento con IFN- β , a excepción del regulador negativo *IRAKM*. Sin embargo, el tratamiento con IFN- β induce la expresión de genes pertenecientes a esta vía de señalización y la expresión del TLR4 correlaciona con discapacidad.
- El estudio farmacogenómico sugiere que un polimorfismo localizado en el gen *PELI3* podría jugar un papel importante en la respuesta clínica al tratamiento con IFN- β .

REFERENCIAS

REFERENCIAS

1. Sospedra M, Martin R. Immunology of multiple sclerosis. *Annu Rev Immunol* 2005;23:683-747.
2. Jahnke U, Fischer EH, Alvord EC, Jr. Sequence homology between certain viral proteins and proteins related to encephalomyelitis and neuritis. *Science* 1985;229:282-284.
3. Martyn CN, Cruddas M, Compston DA. Symptomatic Epstein-Barr virus infection and multiple sclerosis. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 1993;56:167-168.
4. Duquette P, Murray TJ, Pleines J, et al. Multiple sclerosis in childhood: clinical profile in 125 patients. *J Pediatr* 1987;111:359-363.
5. Simpson S, Jr., Blizzard L, Otahal P, et al. Latitude is significantly associated with the prevalence of multiple sclerosis: a meta-analysis. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 2011;82:1132-1141.
6. Koch-Henriksen N, Sorensen PS. The changing demographic pattern of multiple sclerosis epidemiology. *Lancet Neurol* 2010;9:520-532.
7. Fernandez O, Fernandez V, Guerrero M, et al. Multiple sclerosis prevalence in Malaga, Southern Spain estimated by the capture-recapture method. *Mult Scler* 2012;18:372-376.
8. 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; 19:245-248
9. Ares B, Prieto JM, Lema M, et al. Prevalence of multiple sclerosis in Santiago de Compostela (Galicia, Spain). *Mult Scler* 2007;13:262-264.
10. Miller DH, Hammond SR, McLeod JG, et al. Multiple sclerosis in Australia and New Zealand: are the determinants genetic or environmental? *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 1990;53:903-905.
11. Ebers GC, Bulman DE, Sadovnick AD, et al. A population-based study of multiple sclerosis in twins. *N Engl J Med* 1986;315:1638-1642.
12. Sawcer S, Hellenthal G, Pirinen M, et al. Genetic risk and a primary role for cell-mediated immune mechanisms in multiple sclerosis. *Nature* 2011;476:214-219.
13. Hafler DA, Compston A, Sawcer S, et al. Risk alleles for multiple sclerosis identified by a genomewide study. *N Engl J Med* 2007;357:851-862.
14. Sawcer S, Hellenthal G, Pirinen M, et al. Genetic risk and a primary role for cell-mediated immune mechanisms in multiple sclerosis. *Nature* 2011;476:214-219.
15. Torkildsen O, Grytten N, Aarseth J, Myhr KM, Kampman MT. Month of birth as a risk factor for multiple sclerosis: an update. *Acta Neurol Scand Suppl* 2012:58-62.
16. Ramagopalan SV, Dyment DA, Cader MZ, et al. Rare variants in the CYP27B1 gene are associated with multiple sclerosis. *Ann Neurol* 2011;70:881-886.
17. Hedstrom AK, Sundqvist E, Baarnhielm M, et al. Smoking and two human leukocyte antigen genes interact to increase the risk for multiple sclerosis. *Brain* 2011;134:653-664.
18. Benedict RH, Zivadinov R. Risk factors for and management of cognitive dysfunction in multiple sclerosis. *Nat Rev Neurol* 2011;7:332-342.

19. 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;50:121-127.
20. Polman CH, Reingold SC, Banwell B, et al. Diagnostic criteria for multiple sclerosis: 2010 revisions to the McDonald criteria. *Ann Neurol* 2011;69:292-302.
21. Polman CH, Reingold SC, Edan G, et al. Diagnostic criteria for multiple sclerosis: 2005 revisions to the "McDonald Criteria". *Ann Neurol* 2005;58:840-846.
22. Compston A, Coles A. Multiple sclerosis. *Lancet* 2008;372:1502-1517.
23. Buljevac D, Flach HZ, Hop WC, et al. Prospective study on the relationship between infections and multiple sclerosis exacerbations. *Brain* 2002;125:952-960.
24. Vukusic S, Hutchinson M, Hours M, et al. Pregnancy and multiple sclerosis (the PRIMS study): clinical predictors of post-partum relapse. *Brain* 2004;127:1353-1360.
25. 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;46:907-911.
26. Lublin FD, Reingold SC, Cohen JA, et al. Defining the clinical course of multiple sclerosis: the 2013 revisions. *Neurology* 2014;83:278-286.
27. Confavreux C, Vukusic S. Age at disability milestones in multiple sclerosis. *Brain* 2006;129:595-605.
28. Renoux C, Vukusic S, Mikaeloff Y, et al. Natural history of multiple sclerosis with childhood onset. *N Engl J Med* 2007;356:2603-2613.
29. McFarland HF. Correlation between MR and clinical findings of disease activity in multiple sclerosis. *AJNR Am J Neuroradiol* 1999;20:1777-1778.
30. Bielekova B, Kadom N, Fisher E, et al. MRI as a marker for disease heterogeneity in multiple sclerosis. *Neurology* 2005;65:1071-1076.
31. Raine CS, Scheinberg LC. On the immunopathology of plaque development and repair in multiple sclerosis. *J Neuroimmunol* 1988;20:189-201.
32. Stone LA, Frank JA, Albert PS, et al. Characterization of MRI response to treatment with interferon beta-1b: contrast-enhancing MRI lesion frequency as a primary outcome measure. *Neurology* 1997;49:862-869.
33. Prineas JW, Wright RG. Macrophages, lymphocytes, and plasma cells in the perivascular compartment in chronic multiple sclerosis. *Lab Invest* 1978;38:409-421.
34. Jack C, Ruffini F, Bar-Or A et al. Microglia and multiple sclerosis. *J Neurosci Res* 2005;81:363-373.
35. Prineas JW, Barnard RO, Kwon EE, et al. Multiple sclerosis: remyelination of nascent lesions. *Ann Neurol* 1993;33:137-151.
36. Mahad DJ, Ziabreva I, Campbell G, et al. Mitochondrial changes within axons in multiple sclerosis. *Brain* 2009;132:1161-1174.
37. Campbell GR, Ziabreva I, Reeve AK, et al. Mitochondrial DNA deletions and neurodegeneration in multiple sclerosis. *Ann Neurol* 2011;69:481-492.
38. Witte ME, Mahad DJ, Lassmann H et al. Mitochondrial dysfunction contributes to neurodegeneration in multiple sclerosis. *Trends Mol Med* 2014;20:179-187.

39. Stirling DP, Stys PK. Mechanisms of axonal injury: internodal nanocomplexes and calcium deregulation. *Trends Mol Med* 2010;16:160-170.
40. Stoffels JM, de Jonge JC, Stancic M, et al. Fibronectin aggregation in multiple sclerosis lesions impairs remyelination. *Brain* 2013;136:116-131.
41. Serafini B, Rosicarelli B, Magliozzi R et al. Detection of ectopic B-cell follicles with germinal centers in the meninges of patients with secondary progressive multiple sclerosis. *Brain Pathol* 2004;14:164-174.
42. Hibbits N, Yoshino J, Le TQ et al. Astrogliosis during acute and chronic cuprizone demyelination and implications for remyelination. *ASN Neuro* 2012;4:393-408.
43. Lassmann H, van Horssen J. The molecular basis of neurodegeneration in multiple sclerosis. *FEBS Lett* 2011;585:3715-3723.
44. Lucchinetti C, Bruck W, Parisi J, et al. Heterogeneity of multiple sclerosis lesions: implications for the pathogenesis of demyelination. *Ann Neurol* 2000;47:707-717.
45. Hong J, Zang YC, Li S, et al. Ex vivo detection of myelin basic protein-reactive T cells in multiple sclerosis and controls using specific TCR oligonucleotide probes. *Eur J Immunol* 2004;34:870-881.
46. Delves PJ, Roitt IM. The immune system. Second of two parts. *N Engl J Med* 2000;343:108-117.
47. Panitch HS, Hirsch RL, Haley AS et al. Exacerbations of multiple sclerosis in patients treated with gamma interferon. *Lancet* 1987;1:893-895.
48. Steinman L. A brief history of T(H)17, the first major revision in the T(H)1/T(H)2 hypothesis of T cell-mediated tissue damage. *Nat Med* 2007;13:139-145.
49. Lock C, Hermans G, Pedotti R, et al. Gene-microarray analysis of multiple sclerosis lesions yields new targets validated in autoimmune encephalomyelitis. *Nat Med* 2002;8:500-508.
50. Matusevicius D, Kivisakk P, He B, et al. Interleukin-17 mRNA expression in blood and CSF mononuclear cells is augmented in multiple sclerosis. *Mult Scler* 1999;5:101-104.
51. Kebir H, Ifergan I, Alvarez JI, et al. Preferential recruitment of interferon-gamma-expressing TH17 cells in multiple sclerosis. *Ann Neurol* 2009;66:390-402.
52. Friese MA, Fugger L. Pathogenic CD8(+) T cells in multiple sclerosis. *Ann Neurol* 2009;66:132-141.
53. Kuhlmann T, Lingfeld G, Bitsch A, et al. Acute axonal damage in multiple sclerosis is most extensive in early disease stages and decreases over time. *Brain* 2002;125:2202-2212.
54. Lovato L, Willis SN, Rodig SJ, et al. Related B cell clones populate the meninges and parenchyma of patients with multiple sclerosis. *Brain* 2011;134:534-541.
55. Lechner-Scott J, Spencer B, de Malmanche T, et al. The frequency of CSF oligoclonal banding in multiple sclerosis increases with latitude. *Mult Scler* 2012;18:974-982.
56. Fernandez M, Montalban X, Comabella M. Orchestrating innate immune responses in multiple sclerosis: molecular players. *J Neuroimmunol* 2010;225:5-12.
57. Hawker K, O'Connor P, Freedman MS, et al. Rituximab in patients with primary progressive multiple sclerosis: results of a randomized double-blind placebo-controlled multicenter trial. *Ann Neurol* 2009;66:460-471.
58. Naismith RT, Piccio L, Lyons JA, et al. Rituximab add-on therapy for breakthrough relapsing multiple sclerosis: a 52-week phase II trial. *Neurology* 2010;74:1860-1867.

59. Zamvil SS, Steinman L. The T lymphocyte in experimental allergic encephalomyelitis. *Annu Rev Immunol* 1990;8:579-621.
60. Stromnes IM, Goverman JM. Active induction of experimental allergic encephalomyelitis. *Nat Protoc* 2006;1:1810-1819.
61. Stromnes IM, Goverman JM. Passive induction of experimental allergic encephalomyelitis. *Nat Protoc* 2006;1:1952-1960.
62. 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;127:1420-1423.
63. Furtado GC, Marcondes MC, Latkowski JA, et al. Swift entry of myelin-specific T lymphocytes into the central nervous system in spontaneous autoimmune encephalomyelitis. *J Immunol* 2008;181:4648-4655.
64. Constantinescu CS, Farooqi N, O'Brien K, et al. Experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE) as a model for multiple sclerosis (MS). *Br J Pharmacol* 2011;164:1079-1106.
65. Teitelbaum D, Meshorer A, Hirshfeld T, et al. Suppression of experimental allergic encephalomyelitis by a synthetic polypeptide. *Eur J Immunol* 1971;1:242-248.
66. Yednock TA, Cannon C, Fritz LC, et al. Prevention of experimental autoimmune encephalomyelitis by antibodies against alpha 4 beta 1 integrin. *Nature* 1992;356:63-66.
67. Pachner AR. Experimental models of multiple sclerosis. *Curr Opin Neurol* 2011;24:291-299.
68. Buck D, Hemmer B. Treatment of multiple sclerosis: current concepts and future perspectives. *J Neurol* 2011;258:1747-1762.
69. Isaacs A, Lindenmann J. Virus interference. I. The interferon. *Proc R Soc Lond B Biol Sci* 1957;147:258-267.
70. Boehm U, Klamp T, Groot M et al. Cellular responses to interferon-gamma. *Annu Rev Immunol* 1997;15:749-795.
71. Kotenko SV. IFN-lambdas. *Curr Opin Immunol* 2011;23:583-590.
72. Farrar MA, Schreiber RD. The molecular cell biology of interferon-gamma and its receptor. *Annu Rev Immunol* 1993;11:571-611.
73. Stark GR, Kerr IM, Williams BR, et al. How cells respond to interferons. *Annu Rev Biochem* 1998;67:227-264.
74. Stark GR. How cells respond to interferons revisited: from early history to current complexity. *Cytokine Growth Factor Rev* 2007;18:419-423.
75. Yoshimura A, Naka T, Kubo M. SOCS proteins, cytokine signalling and immune regulation. *Nat Rev Immunol* 2007;7:454-465.
76. Kato H, Sato S, Yoneyama M, et al. Cell type-specific involvement of RIG-I in antiviral response. *Immunity* 2005;23:19-28.
77. Fernandez M, Montalban X, Comabella M. Orchestrating innate immune responses in multiple sclerosis: molecular players. *J Neuroimmunol* 2010;225:5-12.
78. Takeda K, Akira S. Toll-like receptors in innate immunity. *Int Immunol* 2005;17:1-14.

79. Schoggins JW, Wilson SJ, Panis M, et al. A diverse range of gene products are effectors of the type I interferon antiviral response. *Nature* 2011;472:481-485.
80. Zang YC, Skinner SM, Robinson RR, et al. Regulation of differentiation and functional properties of monocytes and monocyte-derived dendritic cells by interferon beta in multiple sclerosis. *Mult Scler* 2004;10:499-506.
81. Le Bon A, Durand V, Kamphuis E, et al. Direct stimulation of T cells by type I IFN enhances the CD8+ T cell response during cross-priming. *J Immunol* 2006;176:4682-4689.
82. Le Bon A, Thompson C, Kamphuis E, et al. Cutting edge: enhancement of antibody responses through direct stimulation of B and T cells by type I IFN. *J Immunol* 2006;176:2074-2078.
83. Phase III randomized study of two fluorouracil combinations with either interferon alfa-2a or leucovorin for advanced colorectal cancer. Corfu-A Study Group. *J Clin Oncol* 1995;13:921-928.
84. Falkson CI, Ibrahim J, Kirkwood JM, et al. Phase III trial of dacarbazine versus dacarbazine with interferon alpha-2b versus dacarbazine with tamoxifen versus dacarbazine with interferon alpha-2b and tamoxifen in patients with metastatic malignant melanoma: an Eastern Cooperative Oncology Group study. *J Clin Oncol* 1998;16:1743-1751.
85. Confavreux C, Chapuis-Cellier C, Arnaud P, et al. Oligoclonal "fingerprint" of CSF IgG in multiple sclerosis patients is not modified following intrathecal administration of natural beta-interferon. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 1986;49:1308-1312.
86. Jacobs L, O'Malley J, Freeman A, et al. Intrathecal interferon reduces exacerbations of multiple sclerosis. *Science* 1981;214:1026-1028.
87. Jacobs LD, Cookfair DL, Rudick RA, et al. A phase III trial of intramuscular recombinant interferon beta as treatment for exacerbating-relapsing multiple sclerosis: design and conduct of study and baseline characteristics of patients. Multiple Sclerosis Collaborative Research Group (MSCRG). *Mult Scler* 1995;1:118-135.
88. 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;352:1498-1504.
89. Interferon beta-1b is effective in relapsing-remitting multiple sclerosis. I. Clinical results of a multicenter, randomized, double-blind, placebo-controlled trial. The IFNB Multiple Sclerosis Study Group. *Neurology* 1993;43:655-661.
90. Jacobs LD, Wende KE, Brownscheidle CM, et al. A profile of multiple sclerosis: the New York State Multiple Sclerosis Consortium. *Mult Scler* 1999;5:369-376.
91. Randomized controlled trial of interferon- beta-1a in secondary progressive MS: Clinical results. *Neurology* 2001;56:1496-1504.
92. Li DK, Zhao GJ, Paty DW. Randomized controlled trial of interferon-beta-1a in secondary progressive MS: MRI results. *Neurology* 2001;56:1505-1513.
93. Montalban X. Overview of European pilot study of interferon beta-1b in primary progressive multiple sclerosis. *Mult Scler* 2004;10 Suppl 1:S62; discussion 62-64.

94. Montalban X, Sastre-Garriga J, Tintore M, et al. A single-center, randomized, double-blind, placebo-controlled study of interferon beta-1b on primary progressive and transitional multiple sclerosis. *Mult Scler* 2009;15:1195-1205.
95. Han GM, Chen SL, Shen N, et al. Analysis of gene expression profiles in human systemic lupus erythematosus using oligonucleotide microarray. *Genes Immun* 2003;4:177-186.
96. Baechler EC, Batliwalla FM, Karypis G, et al. Interferon-inducible gene expression signature in peripheral blood cells of patients with severe lupus. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2003;100:2610-2615.
97. Merrill JT, Wallace DJ, Petri M, et al. Safety profile and clinical activity of sifalimumab, a fully human anti-interferon alpha monoclonal antibody, in systemic lupus erythematosus: a phase I, multicentre, double-blind randomised study. *Ann Rheum Dis* 2011;70:1905-1913.
98. Baechler EC, Bauer JW, Slattery CA, et al. An interferon signature in the peripheral blood of dermatomyositis patients is associated with disease activity. *Mol Med* 2007;13:59-68.
99. Tan FK, Zhou X, Mayes MD, et al. Signatures of differentially regulated interferon gene expression and vasculotrophism in the peripheral blood cells of systemic sclerosis patients. *Rheumatology (Oxford)* 2006;45:694-702.
100. Gottenberg JE, Cagnard N, Lucchesi C, et al. Activation of IFN pathways and plasmacytoid dendritic cell recruitment in target organs of primary Sjogren's syndrome. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2006;103:2770-2775.
101. van der Pouw Kraan TC, Wijbrandts CA, van Baarsen LG, et al. Rheumatoid arthritis subtypes identified by genomic profiling of peripheral blood cells: assignment of a type I interferon signature in a subpopulation of patients. *Ann Rheum Dis* 2007;66:1008-1014.
102. Feng X, Reder NP, Yanamandala M, et al. Type I interferon signature is high in lupus and neuromyelitis optica but low in multiple sclerosis. *J Neurol Sci* 2012;313:48-53.
103. Kozovska ME, Hong J, Zang YC, et al. Interferon beta induces T-helper 2 immune deviation in MS. *Neurology* 1999;53:1692-1697.
104. Liu Z, Pelfrey CM, Coteleur A, et al. Immunomodulatory effects of interferon beta-1a in multiple sclerosis. *J Neuroimmunol* 2001;112:153-162.
105. Prinz M, Schmidt H, Mildner A, et al. Distinct and nonredundant in vivo functions of IFNAR on myeloid cells limit autoimmunity in the central nervous system. *Immunity* 2008;28:675-686.
106. Kvarnstrom M, Ydrefors J, Ekerfelt C, et al. Longitudinal interferon-beta effects in multiple sclerosis: Differential regulation of IL-10 and IL-17A, while no sustained effects on IFN-gamma, IL-4 or IL-13. *J Neurol Sci* 2013;325:79-85.
107. de Andres C, Aristimuno C, de Las Heras V, et al. Interferon beta-1a therapy enhances CD4+ regulatory T-cell function: an ex vivo and in vitro longitudinal study in relapsing-remitting multiple sclerosis. *J Neuroimmunol* 2007;182:204-211.
108. Korporal M, Haas J, Balint B, et al. Interferon beta-induced restoration of regulatory T-cell function in multiple sclerosis is prompted by an increase in newly generated naive regulatory T cells. *Arch Neurol* 2008;65:1434-1439.

109. Vandenberg AA, Huan J, Agostsch M, et al. Interferon-beta-1a treatment increases CD56bright natural killer cells and CD4+CD25+ Foxp3 expression in subjects with multiple sclerosis. *J Neuroimmunol* 2009;215:125-128.
110. Kraus J, Voigt K, Schuller AM, et al. Interferon-beta stabilizes barrier characteristics of the blood-brain barrier in four different species in vitro. *Mult Scler* 2008;14:843-852.
111. Muraro PA, Liberati L, Bonanni L, et al. Decreased integrin gene expression in patients with MS responding to interferon-beta treatment. *J Neuroimmunol* 2004;150:123-131.
112. Muraro PA, Leist T, Bielekova B, et al. VLA-4/CD49d downregulated on primed T lymphocytes during interferon-beta therapy in multiple sclerosis. *J Neuroimmunol* 2000;111:186-194.
113. Stuve O, Dooley NP, Uhm JH, et al. Interferon beta-1b decreases the migration of T lymphocytes in vitro: effects on matrix metalloproteinase-9. *Ann Neurol* 1996;40:853-863.
114. Wang J, Campbell IL, Zhang H. Systemic interferon-alpha regulates interferon-stimulated genes in the central nervous system. *Mol Psychiatry* 2008;13:293-301.
115. Biernacki K, Antel JP, Blain M, et al. Interferon beta promotes nerve growth factor secretion early in the course of multiple sclerosis. *Arch Neurol* 2005;62:563-568.
116. Jin S, Kawanokuchi J, Mizuno T, et al. Interferon-beta is neuroprotective against the toxicity induced by activated microglia. *Brain Res* 2007;1179:140-146.
117. Dedoni S, Olanas MC, Onali P. Interferon-beta induces apoptosis in human SH-SY5Y neuroblastoma cells through activation of JAK-STAT signaling and down-regulation of PI3K/Akt pathway. *J Neurochem* 2010;115:1421-1433.
118. Dedoni S, Olanas MC, Ingianni A, et al. Type I interferons impair BDNF-induced cell signaling and neurotrophic activity in differentiated human SH-SY5Y neuroblastoma cells and mouse primary cortical neurons. *J Neurochem* 2012;122:58-71.
119. Kawai T, Akira S. The role of pattern-recognition receptors in innate immunity: update on Toll-like receptors. *Nat Immunol* 2010;11:373-384.
120. Kagan JC, Medzhitov R. Phosphoinositide-mediated adaptor recruitment controls Toll-like receptor signaling. *Cell* 2006;125:943-955.
121. Kagan JC, Su T, Horng T, et al. TRAM couples endocytosis of Toll-like receptor 4 to the induction of interferon-beta. *Nat Immunol* 2008;9:361-368.
122. Meylan E, Burns K, Hofmann K, et al. RIP1 is an essential mediator of Toll-like receptor 3-induced NF-kappa B activation. *Nat Immunol* 2004;5:503-507.
123. Takeda K, Kaisho T, Akira S. Toll-like receptors. *Annu Rev Immunol* 2003;21:335-376.
124. Kondo T, Kawai T, Akira S. Dissecting negative regulation of Toll-like receptor signaling. *Trends Immunol* 2012;33:449-458.
125. Wald D, Qin J, Zhao Z, et al. SIGIRR, a negative regulator of Toll-like receptor-interleukin 1 receptor signaling. *Nat Immunol* 2003;4:920-927.
126. Kobayashi K, Hernandez LD, Galan JE, et al. IRAK-M is a negative regulator of Toll-like receptor signaling. *Cell* 2002;110:191-202.

127. Sun X, Yin J, Starovasnik MA, Fairbrother WJ, et al. Identification of a novel homotypic interaction motif required for the phosphorylation of receptor-interacting protein (RIP) by RIP3. *J Biol Chem* 2002;277:9505-9511.
128. He S, Liang Y, Shao F, Wang X. Toll-like receptors activate programmed necrosis in macrophages through a receptor-interacting kinase-3-mediated pathway. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2011;108:20054-20059.
129. Carty M, Goodbody R, Schroder M, et al. The human adaptor SARM negatively regulates adaptor protein TRIF-dependent Toll-like receptor signaling. *Nat Immunol* 2006;7:1074-1081.
130. Huang J, Liu T, Xu LG, et al. SIKE is an IKK epsilon/TBK1-associated suppressor of TLR3- and virus-triggered IRF-3 activation pathways. *Embo J* 2005;24:4018-4028.
131. An H, Zhao W, Hou J, et al. SHP-2 phosphatase negatively regulates the TRIF adaptor protein-dependent type I interferon and proinflammatory cytokine production. *Immunity* 2006;25:919-928.
132. An H, Hou J, Zhou J, et al. Phosphatase SHP-1 promotes TLR- and RIG-I-activated production of type I interferon by inhibiting the kinase IRAK1. *Nat Immunol* 2008;9:542-550.
133. Touil T, Fitzgerald D, Zhang GX, et al. Cutting Edge: TLR3 stimulation suppresses experimental autoimmune encephalomyelitis by inducing endogenous IFN-beta. *J Immunol* 2006;177:7505-7509.
134. Marta M, Andersson A, Isaksson M, et al. Unexpected regulatory roles of TLR4 and TLR9 in experimental autoimmune encephalomyelitis. *Eur J Immunol* 2008;38:565-575.
135. Prinz M, Garbe F, Schmidt H, et al. Innate immunity mediated by TLR9 modulates pathogenicity in an animal model of multiple sclerosis. *J Clin Invest* 2006;116:456-464.
136. O'Neill LA. 'Fine tuning' TLR signaling. *Nat Immunol* 2008;9:459-461.
137. Christophi GP, Panos M, Hudson CA, et al. Macrophages of multiple sclerosis patients display deficient SHP-1 expression and enhanced inflammatory phenotype. *Lab Invest* 2009;89:742-759.
138. Auffray C, Sieweke MH, Geissmann F. Blood monocytes: development, heterogeneity, and relationship with dendritic cells. *Annu Rev Immunol* 2009;27:669-692.
139. Yona S, Jung S. Monocytes: subsets, origins, fates and functions. *Curr Opin Hematol* 2010;17:53-59.
140. Gordon S. Macrophage heterogeneity and tissue lipids. *J Clin Invest* 2007;117:89-93.
141. Adams CW. The onset and progression of the lesion in multiple sclerosis. *J Neurol Sci* 1975;25:165-182.
142. Fisher M, Levine PH, Weiner BH, et al. Monocyte and polymorphonuclear leukocyte toxic oxygen metabolite production in multiple sclerosis. *Inflammation* 1988;12:123-131.
143. Imamura K, Suzumura A, Hayashi F, et al. Cytokine production by peripheral blood monocytes/macrophages in multiple sclerosis patients. *Acta Neurol Scand* 1993;87:281-285.
144. Rudick RA, Ransohoff RM. Cytokine secretion by multiple sclerosis monocytes. Relationship to disease activity. *Arch Neurol* 1992;49:265-270.
145. Kouwenhoven M, Teleshova N, Ozenci V, et al. Monocytes in multiple sclerosis: phenotype and cytokine profile. *J Neuroimmunol* 2001;112:197-205.
146. Bar-Or A, Nuttall RK, Duddy M, et al. Analyses of all matrix metalloproteinase members in leukocytes emphasize monocytes as major inflammatory mediators in multiple sclerosis. *Brain* 2003;126:2738-2749.

147. Nakajima H, Sugino M, Kimura F, et al. Decreased CD14+CCR2+ monocytes in active multiple sclerosis. *Neurosci Lett* 2004;363:187-189.
148. Ubogu EE, Callahan MK, Tucky BH, et al. CCR5 expression on monocytes and T cells: modulation by transmigration across the blood-brain barrier in vitro. *Cell Immunol* 2006;243:19-29.
149. Ifergan I, Kebir H, Bernard M, et al. The blood-brain barrier induces differentiation of migrating monocytes into Th17-polarizing dendritic cells. *Brain* 2008;131:785-799.
150. Weber MS, Prod'homme T, Youssef S, et al. Type II monocytes modulate T cell-mediated central nervous system autoimmune disease. *Nat Med* 2007;13:935-943.
151. Comabella M, Imitola J, Weiner HL, et al. Interferon-beta treatment alters peripheral blood monocytes chemokine production in MS patients. *J Neuroimmunol* 2002;126:205-212.
152. Marckmann S, Wiesemann E, Hilse R, et al. Interferon-beta up-regulates the expression of co-stimulatory molecules CD80, CD86 and CD40 on monocytes: significance for treatment of multiple sclerosis. *Clin Exp Immunol* 2004;138:499-506.
153. Rio J, Nos C, Tintore M, et al. Defining the response to interferon-beta in relapsing-remitting multiple sclerosis patients. *Ann Neurol* 2006;59:344-352.
154. Neutralizing antibodies during treatment of multiple sclerosis with interferon beta-1b: experience during the first three years. The IFNB Multiple Sclerosis Study Group and the University of British Columbia MS/MRI Analysis Group. *Neurology* 1996;47:889-894.
155. Hegen H, Schleiser M, Gneiss C, et al. Persistency of neutralizing antibodies depends on titer and interferon-beta preparation. *Mult Scler* 2012;18:610-615.
156. Antonelli G, Simeoni E, Bagnato F, et al. Further study on the specificity and incidence of neutralizing antibodies to interferon (IFN) in relapsing remitting multiple sclerosis patients treated with IFN beta-1a or IFN beta-1b. *J Neurol Sci* 1999;168:131-136.
157. Sellebjerg F, Ross C, Koch-Henriksen N, et al. CD26 + CD4 + T cell counts and attack risk in interferon-treated multiple sclerosis. *Mult Scler* 2005;11:641-645.
158. Sorensen PS, Koch-Henriksen N, Ross C, et al. Appearance and disappearance of neutralizing antibodies during interferon-beta therapy. *Neurology* 2005;65:33-39.
159. Gneiss C, Tripp P, Reichartseder F, et al. Differing immunogenic potentials of interferon beta preparations in multiple sclerosis patients. *Mult Scler* 2006;12:731-737.
160. Sominanda A, Rot U, Suoniemi M, et al. Interferon beta preparations for the treatment of multiple sclerosis patients differ in neutralizing antibody seroprevalence and immunogenicity. *Mult Scler* 2007;13:208-214.
161. Hurwitz BJ. Important sources of variability in clinical studies of neutralizing antibodies against interferon beta. *J Neurol Sci* 2008;272:8-19.
162. Strayer DR, Carter WA. Recombinant and natural human interferons: analysis of the incidence and clinical impact of neutralizing antibodies. *J Interferon Cytokine Res* 2012;32:95-102.
163. Panitch H, Goodin DS, Francis G, et al. Randomized, comparative study of interferon beta-1a treatment regimens in MS: The EVIDENCE Trial. *Neurology* 2002;59:1496-1506.

164. Durelli L, Verdun E, Barbero P, et al. Every-other-day interferon beta-1b versus once-weekly interferon beta-1a for multiple sclerosis: results of a 2-year prospective randomised multicentre study (INCOMIN). *Lancet* 2002;359:1453-1460.
165. Rudick RA, Simonian NA, Alam JA, et al. Incidence and significance of neutralizing antibodies to interferon beta-1a in multiple sclerosis. Multiple Sclerosis Collaborative Research Group (MSCRG). *Neurology* 1998;50:1266-1272.
166. Comabella M, Lunemann JD, Rio J, et al. A type I interferon signature in monocytes is associated with poor response to interferon-beta in multiple sclerosis. *Brain* 2009;132:3353-3365.
167. Paolicelli D, D'Onghia M, Pellegrini F, et al. The impact of neutralizing antibodies on the risk of disease worsening in interferon beta-treated relapsing multiple sclerosis: a 5 year post-marketing study. *J Neurol* 2013;260:1562-1568.
168. Villoslada P, Oksenberg JR, Rio J, et al. Clinical characteristics of responders to interferon therapy for relapsing MS. *Neurology* 2004;62:1653.
169. Cree BA, Al-Sabbagh A, Bennett R, et al. Response to interferon beta-1a treatment in African American multiple sclerosis patients. *Arch Neurol* 2005;62:1681-1683.
170. Rudick RA, Lee JC, Simon J, et al. Defining interferon beta response status in multiple sclerosis patients. *Ann Neurol* 2004;56:548-555.
171. Rio J, Rovira A, Tintore M, et al. Relationship between MRI lesion activity and response to IFN-beta in relapsing-remitting multiple sclerosis patients. *Mult Scler* 2008;14:479-484.
172. Durelli L, Barbero P, Bergui M, et al. MRI activity and neutralising antibody as predictors of response to interferon beta treatment in multiple sclerosis. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 2008;79:646-651.
173. Cunningham S, Graham C, Hutchinson M, et al. Pharmacogenomics of responsiveness to interferon IFN-beta treatment in multiple sclerosis: a genetic screen of 100 type I interferon-inducible genes. *Clin Pharmacol Ther* 2005;78:635-646.
174. Leyva L, Fernandez O, Fedetz M, et al. IFNAR1 and IFNAR2 polymorphisms confer susceptibility to multiple sclerosis but not to interferon-beta treatment response. *J Neuroimmunol* 2005;163:165-171.
175. Sriram U, Barcellos LF, Villoslada P, et al. Pharmacogenomic analysis of interferon receptor polymorphisms in multiple sclerosis. *Genes Immun* 2003;4:147-152.
176. Kulakova OG, Tsareva EY, Boyko AN, et al. Allelic combinations of immune-response genes as possible composite markers of IFN-beta efficacy in multiple sclerosis patients. *Pharmacogenomics* 2012;13:1689-1700.
177. Malhotra S, Morcillo-Suarez C, Nurtdinov R, et al. Roles of the ubiquitin peptidase USP18 in multiple sclerosis and the response to interferon-beta treatment. *Eur J Neurol* 2013;20:1390-1397.
178. Lopez-Gomez C, Pino-Angeles A, Orpez-Zafra T, et al. Candidate gene study of TRAIL and TRAIL receptors: association with response to interferon beta therapy in multiple sclerosis patients. *PLoS One* 2012;8:e62540.
179. Byun E, Caillier SJ, Montalban X, et al. Genome-wide pharmacogenomic analysis of the response to interferon beta therapy in multiple sclerosis. *Arch Neurol* 2008;65:337-344.

180. Comabella M, Craig DW, Morcillo-Suarez C, et al. Genome-wide scan of 500,000 single-nucleotide polymorphisms among responders and nonresponders to interferon beta therapy in multiple sclerosis. *Arch Neurol* 2009;66:972-978.
181. Comabella M, Fernandez-Arquero M, Rio J, et al. HLA class I and II alleles and response to treatment with interferon-beta in relapsing-remitting multiple sclerosis. *J Neuroimmunol* 2009;210:116-119.
182. Hoffmann S, Cepok S, Grummel V, et al. HLA-DRB1*0401 and HLA-DRB1*0408 are strongly associated with the development of antibodies against interferon-beta therapy in multiple sclerosis. *Am J Hum Genet* 2008;83:219-227.
183. Malhotra S, Morcillo-Suarez C, Brassat D, et al. IL28B polymorphisms are not associated with the response to interferon-beta in multiple sclerosis. *J Neuroimmunol*;239:101-104.
184. Onomoto K, Morimoto S, Kawaguchi T, et al. Dysregulation of IFN system can lead to poor response to pegylated interferon and ribavirin therapy in chronic hepatitis C. *PLoS One*;6:e19799.
185. Axtell RC, Raman C, Steinman L. Interferon-beta exacerbates Th17-mediated inflammatory disease. *Trends Immunol* 2011;32:272-277.
186. Bustamante MF, Rio J, Castro Z, et al. Cellular immune responses in multiple sclerosis patients treated with interferon-beta. *Clin Exp Immunol* 2013;171:243-246.
187. Bushnell SE, Zhao Z, Stebbins CC, et al. Serum IL-17F does not predict poor response to IM IFNbeta-1a in relapsing-remitting MS. *Neurology* 2012;79:531-537.
188. Hartung HP, Steinman L, Goodin DS, et al. Interleukin 17F level and interferon beta response in patients with multiple sclerosis. *JAMA Neurol* 2013;70:1017-1021.
189. van Baarsen LG, Vosslamber S, Tijssen M, et al. Pharmacogenomics of interferon-beta therapy in multiple sclerosis: baseline IFN signature determines pharmacological differences between patients. *PLoS One* 2008;3:e1927.
190. Rudick RA, Rani MR, Xu Y, et al. Excessive biologic response to IFNbeta is associated with poor treatment response in patients with multiple sclerosis. *PLoS One* 2011;6:e19262.
191. Zula JA, Green HC, Ransohoff RM, et al. The role of cell type-specific responses in IFN-beta therapy of multiple sclerosis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2011;108:19689-19694.
192. Kantor AB, Deng J, Waubant E, et al. Identification of short-term pharmacodynamic effects of interferon-beta-1a in multiple sclerosis subjects with broad-based phenotypic profiling. *J Neuroimmunol* 2007;188:103-116.
193. Brkic Z, Maria NI, van Helden-Meeuwssen CG, et al. Prevalence of interferon type I signature in CD14 monocytes of patients with Sjogren's syndrome and association with disease activity and BAFF gene expression. *Ann Rheum Dis* 2013;72:728-735.
194. 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.
195. 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.
196. Marijanovic Z, Ragimbeau J, Kumar KG, et al. TYK2 activity promotes ligand-induced IFNAR1 proteolysis. *Biochem J* 2006;397:31-38.

197. Kerfoot SM, Long EM, Hickey MJ, et al. TLR4 contributes to disease-inducing mechanisms resulting in central nervous system autoimmune disease. *J Immunol* 2004;173:7070-7077.
198. Miranda-Hernandez S, Gerlach N, Fletcher JM, et al. Role for MyD88, TLR2 and TLR9 but not TLR1, TLR4 or TLR6 in experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Immunol* 2011;187:791-804.
199. Bustamante MF, Fissolo N, Rio J, et al. Implication of the Toll-like receptor 4 pathway in the response to interferon-beta in multiple sclerosis. *Ann Neurol* 2011;70:634-645.
200. White AT, Light AR, Hughen RW, et al. Differences in metabolite-detecting, adrenergic, and immune gene expression after moderate exercise in patients with chronic fatigue syndrome, patients with multiple sclerosis, and healthy controls. *Psychosom Med* 2012;74:46-54.
201. Siren J, Pirhonen J, Julkunen I, et al. IFN-alpha regulates TLR-dependent gene expression of IFN-alpha, IFN-beta, IL-28, and IL-29. *J Immunol* 2005;174:1932-1937.
202. Buttmann M, Merzyn C, Rieckmann P. Interferon-beta induces transient systemic IP-10/CXCL10 chemokine release in patients with multiple sclerosis. *J Neuroimmunol* 2004;156:195-203.
203. Zhang Y, Lian JQ, Huang CX, et al. Overexpression of Toll-like receptor 2/4 on monocytes modulates the activities of CD4(+)CD25(+) regulatory T cells in chronic hepatitis B virus infection. *Virology* 2010;397:34-42.
204. Wesche H, Gao X, Li X, et al. IRAK-M is a novel member of the Pelle/interleukin-1 receptor-associated kinase (IRAK) family. *J Biol Chem* 1999;274:19403-19410.
205. Axtell RC, de Jong BA, Boniface K, et al. T helper type 1 and 17 cells determine efficacy of interferon-beta in multiple sclerosis and experimental encephalomyelitis. *Nat Med* 2010;16:406-412.
206. Hundeshagen A, Hecker M, Paap BK, et al. Elevated type I interferon-like activity in a subset of multiple sclerosis patients: molecular basis and clinical relevance. *J Neuroinflammation* 2012;9:140.
207. Gilli F, Marnetto F, Caldano M, et al. Biological markers of interferon-beta therapy: comparison among interferon-stimulated genes MxA, TRAIL and XAF-1. *Mult Scler* 2006;12:47-57.
208. Wandinger KP, Lunemann JD, Wengert O, et al. TNF-related apoptosis inducing ligand (TRAIL) as a potential response marker for interferon-beta treatment in multiple sclerosis. *Lancet* 2003;361:2036-2043.
209. de Andres C, Aristimuno C, Bartolome M, et al. Clinical response to interferon-beta-1a may be linked to low baseline circulating BDCA1 myeloid dendritic cells Differential role of circulating dendritic cells and CD4+ regulatory T-cells in relapsing-remitting multiple sclerosis: a 1-year longitudinal study. *J Neuroimmunol* 2009;212:112-120.
210. Yanase N, Ohshima K, Ikegami H, et al. Cytochrome c release, mitochondrial membrane depolarization, caspase-3 activation, and Bax-alpha cleavage during IFN-alpha-induced apoptosis in Daudi B lymphoma cells. *J Interferon Cytokine Res* 2000;20:1121-1129.
211. Huang G, Chen Y, Lu H, et al. Coupling mitochondrial respiratory chain to cell death: an essential role of mitochondrial complex I in the interferon-beta and retinoic acid-induced cancer cell death. *Cell Death Differ* 2007;14:327-337.
212. Wittnebel S, Jalil A, Thiery J, et al. The sensitivity of renal cell carcinoma cells to interferon alpha correlates with p53-induction and involves Bax. *Eur Cytokine Netw* 2005;16:123-127.

213. Zhang F, Sriram S. Identification and characterization of the interferon-beta-mediated p53 signal pathway in human peripheral blood mononuclear cells. *Immunology* 2009;128:e905-918.
214. van Boxel-Dezaire AH, Zula JA, Xu Y, et al. Major differences in the responses of primary human leukocyte subsets to IFN-beta. *J Immunol* 2010;185:5888-5899.
215. Su Q, Wang S, Baltzis D, et al. Interferons induce tyrosine phosphorylation of the eIF2alpha kinase PKR through activation of Jak1 and Tyk2. *EMBO Rep* 2007;8:265-270.
216. Lattanzi L, Rozera C, Marescotti D, et al. IFN-alpha boosts epitope cross-presentation by dendritic cells via modulation of proteasome activity. *Immunobiology* 2011;216:537-547.
217. Shin EC, Seifert U, Kato T, et al. Virus-induced type I IFN stimulates generation of immunoproteasomes at the site of infection. *J Clin Invest* 2006;116:3006-3014.
218. Jaitin DA, Schreiber G. Upregulation of a small subset of genes drives type I interferon-induced antiviral memory. *J Interferon Cytokine Res* 2007;27:653-664.
219. Jamaluddin M, Wang S, Garofalo RP, et al. IFN-beta mediates coordinate expression of antigen-processing genes in RSV-infected pulmonary epithelial cells. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2001;280:L248-257.
220. Feng X, Reder NP, Yanamandala M, et al. Type I interferon signature is high in lupus and neuromyelitis optica but low in multiple sclerosis. *J Neurol Sci* 2012;313:48-53.
221. Wandinger KP, Wessel K, Neustock P, et al. Diminished production of type-I interferons and interleukin-2 in patients with multiple sclerosis. *J Neurol Sci* 1997;149:87-93.
222. Reder AT, Feng X. Aberrant Type I Interferon Regulation in Autoimmunity: Opposite Directions in MS and SLE, Shaped by Evolution and Body Ecology. *Front Immunol* 2013;4:281.
223. Siednienko J, Jackson R, Mellett M, et al. Pellino3 targets the IRF7 pathway and facilitates autoregulation of TLR3- and viral-induced expression of type I interferons. *Nat Immunol* 2012;13:1055-1062.

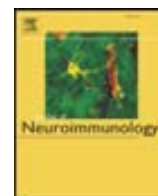
ANEXOS

ANEXO A: ARTÍCULOS



Contents lists available at ScienceDirect

Journal of Neuroimmunology

journal homepage: www.elsevier.com/locate/jneuroim

Review article

Orchestrating innate immune responses in multiple sclerosis: Molecular players

Marta Fernández, Xavier Montalban, Manuel Comabella*

Centre d'Esclerosi Múltiple de Catalunya, CEM-Cat, Unitat de Neuroimmunologia Clínica, Hospital Universitari Vall d'Hebron (HUVH), Barcelona, Spain

ARTICLE INFO

Article history:

Received 30 March 2010

Accepted 3 May 2010

Available online xxxx

Keywords:

Innate immunity

Multiple sclerosis

Complement

Toll-like receptors

ABSTRACT

Innate immunity is the body's first line of defense against foreign pathogens. Although adaptive immune responses have for long time been considered to play important roles in the etiopathogenesis of autoimmune disorders such as multiple sclerosis (MS), evidence exists that adaptive immunity is not acting in isolation but rather in conjunction with components of the innate immune system. In fact, innate immune responses influence the nature of adaptive immune responses, and many components of innate immunity are used by adaptive immunity as effectors. In this review, we will focus on the role of key players of the innate immune system, including Toll-like receptors, the complement system and cytokines, on MS and its animal model, experimental autoimmune encephalomyelitis. We discuss *in vitro* and *in vivo* experimental data showing that the interaction mechanisms operating between adaptive and innate immune systems should be considered to better understand disease etiopathogenesis and the effect of therapies targeting components of the innate immune system.

© 2010 Elsevier B.V. All rights reserved.

Contents

1. Introduction	0
2. TLR	0
3. The complement system	0
4. Cytokines of the innate immune system	0
4.1. IL-6	0
4.2. IL-1 β	0
4.3. TNF α	0
4.4. Type I IFNs	0
5. Conclusions	0
References	0

1. Introduction

Multiple sclerosis (MS) is a chronic inflammatory demyelinating autoimmune disease of the central nervous system (CNS) and a leading cause of neurological disability in young adults. The disease is characterized by an inflammatory component, which predominates in the initial relapsing–remitting phases, and a neurodegenerative component associated with the progressive phase of the disease. Although the etiopathology of MS is not well defined, consensus exists in considering an inflammatory autoimmune reaction against CNS

antigens as the cause of the tissue damage. Adaptive immune responses have long been thought as major players in the pathogenesis of MS, in particular the CD4+ and CD8+ T cell subpopulations (Governman, 2009). Although for a long time deemed passive actors, B cells are also currently being considered to play key roles in the disease (McLaughlin and Wucherpfennig, 2008). The presence of autoreactive T cells in healthy controls insinuates that other mechanisms may also be playing important roles in disease etiopathogenesis (Sospedra and Martin, 2005). To name a few, propensity to inflammation processes may create the excellent surrounding environment for autoreactive T cells to initiate a specific immune reaction against self structures, breaking peripheral tolerance; chronicity or persistence of this immune response may be the consequence of an altered regulation of inflammation, or a detrimental maintenance of the blood–brain barrier (BBB) integrity.

* Corresponding author. Unitat de Neuroimmunologia Clínica, CEM-Cat. Edif. EUI 2ª planta, Hospital Universitari Vall d'Hebron, Pg. Vall d'Hebron 119–129 08035 Barcelona, Spain. Tel.: +34 932746834; fax: +34 932746084.

E-mail address: mcomabel@ir.vhebron.net (M. Comabella).

Over the last years, innate immunity has been receiving increasing attention in the etiopathogenesis of MS. It is the first line of defense to infections and is present in all multicellular organisms, including plants and insects, while adaptive immunity is a more evolutionated response, which appeared in yawning vertebrates. Although not as specific as adaptive immunity, innate immunity is able to recognize structures shared by microorganisms. It is composed by physical and chemical barriers, blood proteins, specific receptors, and a wide variety of cells. Despite the differences, strong interactions exist between these two types of immune responses. Innate immune responses influence the nature of adaptive responses, and many components of innate immunity are used by adaptive immunity as effectors. Furthermore, signaling pathways of both innate and adaptive responses share many molecules and transcription factors. Therefore, it is inevitable to consider the mechanisms of innate immunity as part of any immune response and, among them, autoimmune responses.

In this review, we will discuss the molecular components that are part of innate immunity, with special attention on what is known regarding their contribution to the pathogenesis of MS and its animal model, experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE). We will focus on Toll-like receptors (TLR), the complement system, and a variety of key innate cytokines including interleukin (IL)-6, IL-1 β , tumor necrosis factor (TNF) α and type I interferons (IFNs).

2. TLR

TLR are transmembrane proteins that recognize pathogen-associated molecular patterns (PAMPs) and several endogenous ligands that activate innate immunity. It has been suggested as a possible role for these receptors in the break-down of self-tolerance owing to their ability of generating an inflammatory environment. Most types of TLR initiate a signal transduction mediated by the myeloid differentiation primary response gene 88 (MYD88), which results in the expression of proinflammatory cytokines such as IL1 β , TNF α , IL-6 and IL-12 through the NF κ B transcription factor. TLR3, however, initiates a MYD88-independent pathway through the TLR adaptor molecule 1 (TRIF), which induces the transcription of type I IFNs. An exception to the rule is TLR4, the only TLR described so far that signals through both MYD88 and TRIF pathways (Takeda and Akira, 2005). Cross-talk between both pathways has also been described and, for instance, TLR9 and TLR7 can promote the expression of type I IFNs in spite of signaling through the MYD88 pathway (Takeda et al., 2003).

The implication of TLR in MS has been mostly investigated in its animal model. EAE studies suggest that the clinical course of the disease varies depending on the TLR signaling cascade and the transcription factors that are activated. Hence, TLR3 stimulation was observed to have protective effects in EAE as a consequence of an increased expression of IFN β (Touil et al., 2006). In addition, TLR4-deficient mice displayed a more severe EAE course (Marta et al., 2008) whereas Myd88-deficient mice were resistant to the disease (Prinz et al., 2006; Marta et al., 2008). These results invite to speculate that signaling through the Myd88-independent pathway, which promotes the expression of type I IFNs, would have a protective role in EAE whereas signaling through the Myd88-dependent pathway, which activates NF κ B and leads to the secretion of proinflammatory cytokines, would exacerbate the autoimmune disease. Studies on the tyrosine phosphatase SHP-1, which inhibits the MYD88-dependent pathway but not the TRIF-mediated pathway (O'Neill, 2008) point in the same direction. Thus in a recent study, deficient expression of SHP-1 at both the protein and mRNA levels was found in macrophages from MS patients (Christophi et al., 2009). The decreased expression of SHP-1 led to higher presence of inflammatory cytokines (TNF α , IL-6) and chemokines (CCL2, CCL7) following TLR stimulation. Furthermore, SHP-1 silenced macrophages from healthy controls also exhibited enhanced inflammatory responses (Christophi et al., 2009).

Evidence exists that different cell subsets may react in a distinct manner to TLR activation. For instance, EAE induction in mice carrying B cell-restricted MyD88 deficiencies resulted in a chronic course of the disease (Lampropoulou et al., 2008), demonstrating that following TLR agonist stimulation, naïve B cells depend on Myd88 for the suppression of T cell proliferation and proinflammatory cytokine secretion via IL-10. Thus, Myd88 would play different roles depending on the cell subpopulation, participating in the initiation of EAE by macrophages and dendritic cells and in the resolution by B cells. It should also be remarked that TLR9 stimulation displays different biological responses depending on the subpopulation of immune cells, activating type I IFNs in dendritic cells but NF κ B in macrophages and B cells (Takeda et al., 2003). Probably, this duality in TLR9 activation explains the controversial results that have been observed in the clinical course of EAE in TLR9 deficient mice (Prinz et al., 2006; Marta et al., 2008).

Nonetheless, these conclusions should be taken with caution since the adjuvant required for EAE induction is per se a TLR agonist, and a certain degree of “manipulation” of the TLR pathway is inevitable.

3. The complement system

The complement system, composed by more than 30 soluble and transmembrane proteins, is an important player of the immune system. The main biological functions of complement include immune defense against pathogens, interface between innate and adaptive immunity, and clearance of immune complexes and apoptotic cells (Walport, 2001). Complement can be activated by three different pathways: the classical pathway (activated by both immune complexes and some endogenous ligands), the alternative pathway (activated by cell wall constituents that are foreign to the host), and the lectin pathway (activated by binding of mannose-binding lectin to glycoproteins or carbohydrates of certain microorganisms) (see Fig. 1). All three pathways converge on a C3 convertase, an enzyme that initiates a proteolytic cascade which is tightly restricted at different points. The process generates opsonins and anaphylatoxins, molecules with potent proinflammatory and chemotactic properties, and finally leads to the formation of the membrane-attack complex (MAC), which lyses cells by forming pores in the surface of cell membranes (Ingram et al., 2009).

The implication of the complement system in MS pathogenesis derives from the presence of complement components in demyelinating plaques from MS patients. Histopathological studies localized the C3 fraction and immunoglobulins on myelin sheaths in the demyelinating marginal zone of MS plaques (Lumsden, 1971). Further, final steps of complement cascade were occurring since MAC was localized between macrophages and myelin sheaths from post-mortem tissues of early MS cases (Gay et al., 1997). Deposition of complement and immunoglobulins may be characteristic of a subgroup of MS patients, suggesting that some degree of heterogeneity may exist in MS lesions (Lucchinetti et al., 2000). In a more recent study, complement and immunoglobulin depositions were described in all active lesions from autopsy brains of established MS patients (Breij et al., 2008). Supporting the findings by Gay et al., complement and immunoglobulin deposits were observed very proximate to macrophages. Similarly, a recent study comparing brain tissue from MS patients and individuals with other neurological diseases reported that the presence of strong positive immunostaining for C3d along with microglial nodules surrounding demyelinating axons is a characteristic feature of MS periplaque white matter (Barnett et al., 2009).

Several studies have also evaluated the presence of complement components in serum and cerebrospinal fluid (CSF) from MS patients and healthy controls (for a review, see Ingram et al., 2009). Although divergent data exist in the presence of C3 and C4 in serum and CSF, three studies consistently found increased CSF concentrations of MAC in MS patients (Sellebjerg et al., 1998; Sanders et al., 1986; Mollnes et

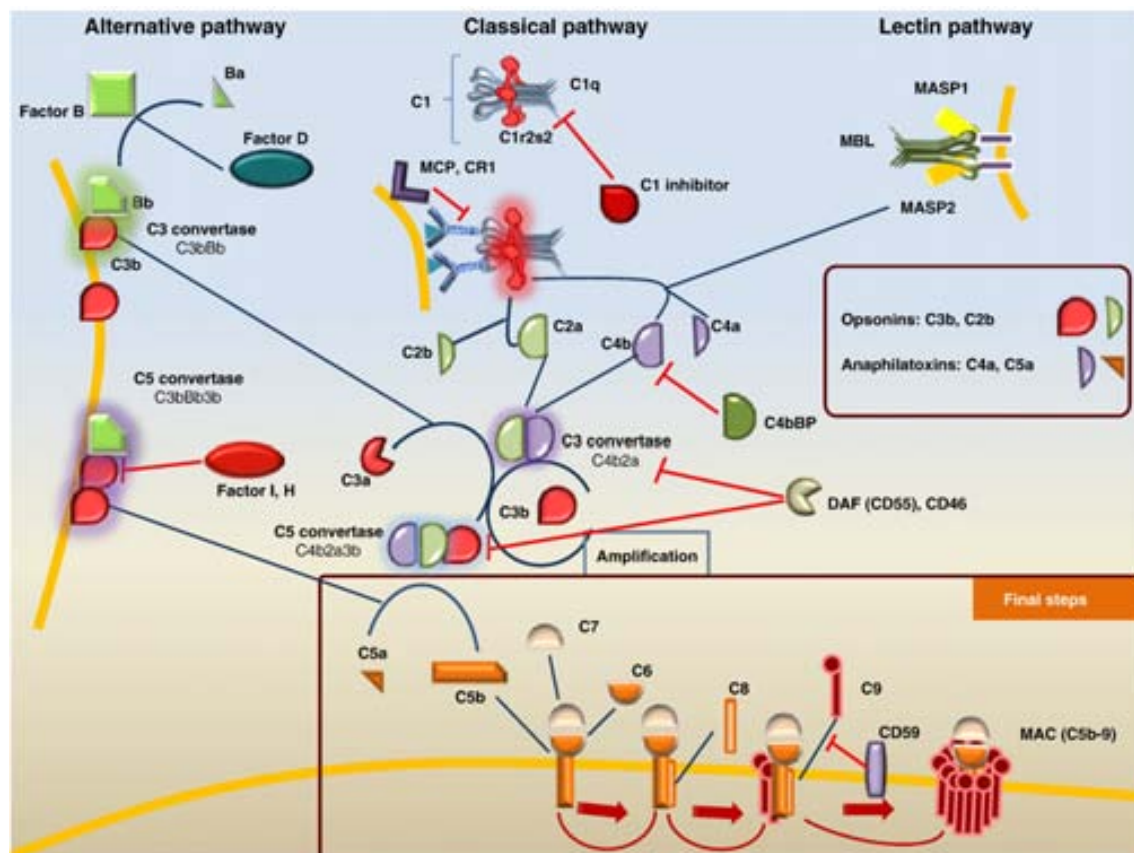


Fig. 1. Complement cascade. The alternate pathway is initiated following binding of C3b to activating surfaces. C3 convertase is formed by C3b and the protease fragment Bb, which is generated after factor D cleavage. The classical pathway is activated when C1 binds to antigen–antibody complexes that provoke cleavage of C2 and C4. C2a and C4b will form C3 convertase. The lectin pathway is initiated by the binding of mannose-binding lectin (MBL) to the pathogen surface and converges with the classical pathway at the level of C3 convertase by cleavage of C2 and C4 through the mannose-binding lectin-associated serine proteases 1 and 2 (MASP1, MASP2). All three pathways generate C3 convertase. This step amplifies the cascade, producing large amounts of C3b, which form parts of C5 convertase. During the process, opsonins and anaphylatoxins are released. C5 convertase cleaves C5 generating C5b that will assemble to C6, C7, C8 and several C9 molecules all together forming the membrane-attack complex (MAC). Complement cascade can be inhibited at several levels: membrane cofactor protein (MCP); complement receptor 1 (CR1) or CD35; C1 inhibitor; factor I; factor H; decay-accelerating factor (DAF) or CD55; CD46 and CD59.

al., 1987), and in one of them, this finding correlated with neurological disability (Sellebjerg et al., 1998).

This outcome makes obvious the implication of the complement system in MS pathogenesis, however, the mechanisms of its contribution are yet to be elucidated. In fact, CNS but not peripheral nervous system myelin can activate the classical complement pathway through the interaction of C1 without the presence of specific antibodies (Vanguri et al., 1982; Vanguri and Shin, 1986), and this activation generates MAC *in vitro* (Silverman et al., 1984). Moreover, mature oligodendrocytes (MBP + OG) also bind to C1 leading to the assembly of C5b-9 (MAC), a property that is not shared by astrocytes and OG progenitors (Wren and Noble, 1989). In addition, myelin and differentiated OG have been proposed as susceptible to the complement attack owing to a lack of inhibitory molecules of the complement system (see Fig. 1). Human MBP + OG express decay-accelerating factor (DAF) but not complement receptor 1 (CR1), membrane cofactor protein (MCP), MAC-inhibiting protein (MIP) or clusterin (Scolding et al., 1998). In rat OG, which are sensitive to complement lysis in the absence of antibodies, incorporation of human CD59 protected cells from complement attack (Wing et al., 1992). Intriguingly, although human OG express CD59, its expression is restricted to some types of OG and becomes markedly less intense or even absent in cell processes. In contrast, human myelin expresses CD59 but lacks MCP and DAF. Nonetheless, despite a deficiency of some of the inhibitory molecules of the complement cascade, significant demyelination in explants requires the presence of anti-myelin antibodies (Rus et al., 2006b). A plausible explanation is that full activation of complement is associated with the interaction of C1 with immune complexes, whereas C1 recognition of

endogenous ligands does not produce intensive responses. Apoptotic cells or amyloid P are endogenous ligands of C1 that can also bind to the complement inhibitors C4-binding protein and factor H (Sjöberg et al., 2009), and this inhibitory mechanism might also be modulating the complement response to isolated myelin.

The role of complement in EAE has been investigated by inhibition of complement activation and targeting particular complement components (summarized in Table 1). Several studies have found that demyelinating autoantibodies mediate their disease-promoting function through the complement cascade. In a recent study, posterior administration of anti-MOG antibodies to C1q deficient mice did not lead to EAE exacerbation while wild type mice suffered from worsening in the clinical course of the disease (Urich et al., 2006). Nevertheless, controversial data exist on the complement components involved in disease pathogenesis, and whereas some studies support a role of the initial steps of the cascade (Piddlesden et al., 1991, 1994), some others point out to MAC as the most important component (Mead et al., 2002). For instance, EAE induction in C6 deficient PVG rats, which are unable to form MAC but maintain intact the first steps of complement cascade, was associated with an absence of areas of demyelination and no clinical worsening following administration of anti-MOG antibodies (Mead et al., 2002), results that suggest a requirement of MAC for the demyelinating effect of specific antibodies.

On the other hand, gene-deleted mice targeting inhibitors of the complement cascade have also been studied in EAE. Interestingly, mice with deficiencies of inhibitors such as factor B and DAF presented an exacerbated EAE clinical course compared to control mice (Nataf

Table 1
Summary of EAE studies targeting particular components of the complement system.

Complement component targeted	Strains, species	Immunization	Summary of main findings	Reference
C1q KO	C57BL/6 mice	MOG _{35–55} + post autoantibodies	Prevents acute exacerbation	Urich et al. (2006)
C3 KO	B6x129/F1 mice	MOG _{35–55}	No effect	Calida et al. (2001)
	C57BL/6 mice	MOG _{35–55}	Attenuated EAE	Nataf et al. (2000)
	C57BL/6 mice	MOG _{35–55} ; ADEAE	Attenuated EAE	Szalai et al. (2007)
	C57BL/6 mice; BALB/c mice	MOG _{38–50}	No effect	Liu et al. (2005)
	C57BL/6 mice	MOG _{35–55}	Attenuated EAE	Smith et al. (2008)
C3 + ICAM-1 DKO	C57BL/6 mice	MOG _{35–55}	Attenuated EAE	Smith et al. (2008)
C3aR KO	C57BL/6 mice	MOG _{35–55}	Attenuated EAE	Boos et al. (2004)
Astrocyte-specific C3aR KO	C57BL/6 mice	MOG _{35–55}	Exacerbated EAE	Boos et al. (2004)
Factor B KO	C57BL/6 mice	MOG _{35–55}	Attenuated EAE	Nataf et al. (2000)
DAF1 KO	C57BL/6 mice; BALB/c mice	MOG _{38–50}	Exacerbated EAE	Liu et al. (2005)
DAF1 + C3 DKO	C57BL/6 mice; BALB/c mice	MOG _{38–50}	Attenuated EAE	Liu et al. (2005)
DAF1 TG	C57BL/6 mice	MOG _{35–55}	Attenuated EAE	Li et al. (2009)
C4 KO	C57BL/6 mice	MOG _{35–55}	No effect	Boos et al. (2005)
C5aR KO	C57BL/6 mice	MOG _{35–55}	No effect	Reiman et al. (2002)
C5 deficient	B10.D2/oSnj mice	Guinea pig myelin	Exacerbated EAE	Weerth et al. (2003)
C6 deficient	PVG rats	MBP	Attenuated EAE	Tran et al. (2002)
	PVG rats	MBP	No effect	Mead et al. (2002)
	PVG rats	MBP + anti-MOG antibodies	Attenuated EAE	Mead et al. (2002)

et al., 2000; Liu et al., 2005), while transgenic mice overexpressing DAF were found to suffer from a less severe disease (Li et al., 2009). Similar ameliorating results in EAE rats were also reported in previous publications following the administration of cobra venom factor or CR1, the latter known by its ability to inhibit the classical pathway (Piddlesden et al., 1994; Linington et al., 1989). The role of C3 in the disease is more controversial and, as shown in Table 1, different results have been reported in C3 deficient animals, mostly depending on the strain and EAE induction protocol.

Some of these contradictory data may be explained by the “other face of complement”, which refers to neuroprotective effects of complement through the promotion of OG survival. It has been shown that sublytic C5b-9 can inhibit induced apoptosis via FasL and TNF α in OG. In detail, low levels of this complex prevented apoptosis of OG by promoting the PI3-K/Akt axis and subsequently, inhibiting the cleavage of caspase-8 (Rus et al., 2006a; Tegla et al., 2009). In a model of acute EAE, C5 deficient mice presented more OG apoptosis compared to wild type mice, despite the fact that more diffuse and extensive lesions were observed in C5 sufficient mice (Weerth et al., 2003). In summary, the complement system plays a key role in the inflammatory phase of the disease, promoting both inflammation and demyelination, however, other more beneficial neuroprotective functions should also be considered during the recovery phase.

4. Cytokines of the innate immune system

4.1. IL-6

IL-6 is a member of the IL-6-type cytokine family which also includes IL-11, leukaemia inhibitory factor (LIF), oncostatin M (OSM), ciliary neurotrophic factor (CNTF), cardiotrophin-1 (CT-1), and cardiotrophin-like cytokine (CLC). Their transmembrane receptors share at least one molecule of gp130 (glycoprotein 130) (Heinrich et al., 2003). In particular, IL-6 receptor is a heterotrimer formed by two molecules of gp130 and one of IL-6R α . The ability of cells to respond to IL-6 depends on the expression of IL-6R α since gp130 is ubiquitously expressed. Once IL-6 is recognized by its receptor, gp130 subunits activate JAK/STAT signal transduction and MAPK signaling pathway (Heinrich et al., 2003). Activation of this pathway can be regulated by the presence of sIL-6R α , the soluble form of the limiting subunit of IL-6 receptor that competes with the transmembrane form for binding to IL-6. Firstly known as BSF-2 (B cells stimulatory factor-2), IL-6 induces the synthesis of acute-phase inflammatory proteins by the liver and participates in the differentiation and growth of immune and hematopoietic cells. For instance, IL-6 is the key factor

that in combination with TGF- β promotes differentiation of Th17 cells instead of regulatory T cells when TGF- β acts by itself (Bettelli et al., 2006). IL-6 is a proinflammatory cytokine secreted by many types of cells such as monocytes, T cells, endothelial cells, astrocytes and microglia, and its expression is up-regulated under inflammatory conditions (Fig. 2).

The proinflammatory properties of IL-6 point to a possible implication of this cytokine in chronic inflammation and autoimmunity. Studies on CSF IL-6 levels in MS patients have shown divergent results, and both elevated and normal IL-6 levels have been reported compared with control individuals (Hauser et al., 1990; Frei et al., 1991; Maimone et al., 1991; Padberg et al., 1999; Malmeström et al., 2006). Plasma IL-6 concentrations were increased in MS patients compared with controls, although cytokine levels were not associated with disease activity (Frei et al., 1991). Additionally, CSF cells from MS patients transcribed higher amounts of IL-6 mRNA (Navikas et al., 1996; Perez et al., 1995), and *in vitro* experiments revealed that CSF cells depend on IL-6 expression for secreting IgG (Perez et al., 1995).

Regarding regulators of the IL-6 pathway, increased serum levels of sgp130 (soluble form of gp130) and sIL-6R were found to correlate with disease severity (Padberg et al., 1999), although despite the IL-6 B cell stimulatory properties, no association was found between IL-6 and sIL-6R levels and the presence of anti-MOG antibodies (Padberg et al., 2001). In another study, CSF levels of sIL-6R were increased in MS patients compared to healthy controls (Michalopoulou et al., 2004).

Stronger evidence comes from the animal model where IL-6 knockout mice have revealed a crucial role for this cytokine in EAE development. IL-6 gene-deleted mice are resistant to EAE (Samoilova et al., 1998; Okuda et al., 1999) and susceptibility can be restored by the administration of exogenous IL-6 (Mendel et al., 1998). Resistance to EAE is not explained by decreased T cell reactivity since T cells from knockout mice are able to proliferate in response to the specific antigen and produce similar levels of IFN γ and IL-2 to those of wild type T cells. Differences, however, were observed in the expression of molecules such as vascular cell adhesion molecule 1 (VCAM-1) and intercellular adhesion molecule 1 (ICAM-1) that are involved in the transcytosis of leukocytes through the BBB. Endothelial cells from wild type mice exhibited increased levels of VCAM-1 and ICAM-1 compared with IL6 deficient mice (Eugster et al., 1998). Further, reduced expression of VCAM-1 was also observed in spinal cord microvessels after blocking the IL-6 signaling pathway with a gp130-Fc fusion protein (Linker et al., 2008), suggesting that the significant delayed in EAE onset observed in these mice resides in BBB integrity. The critical role for IL-6 in leukocyte infiltration was further emphasized by the use of transgenic mice (GFAP-IL6) in which IL-6 production was restricted to cerebellum. EAE

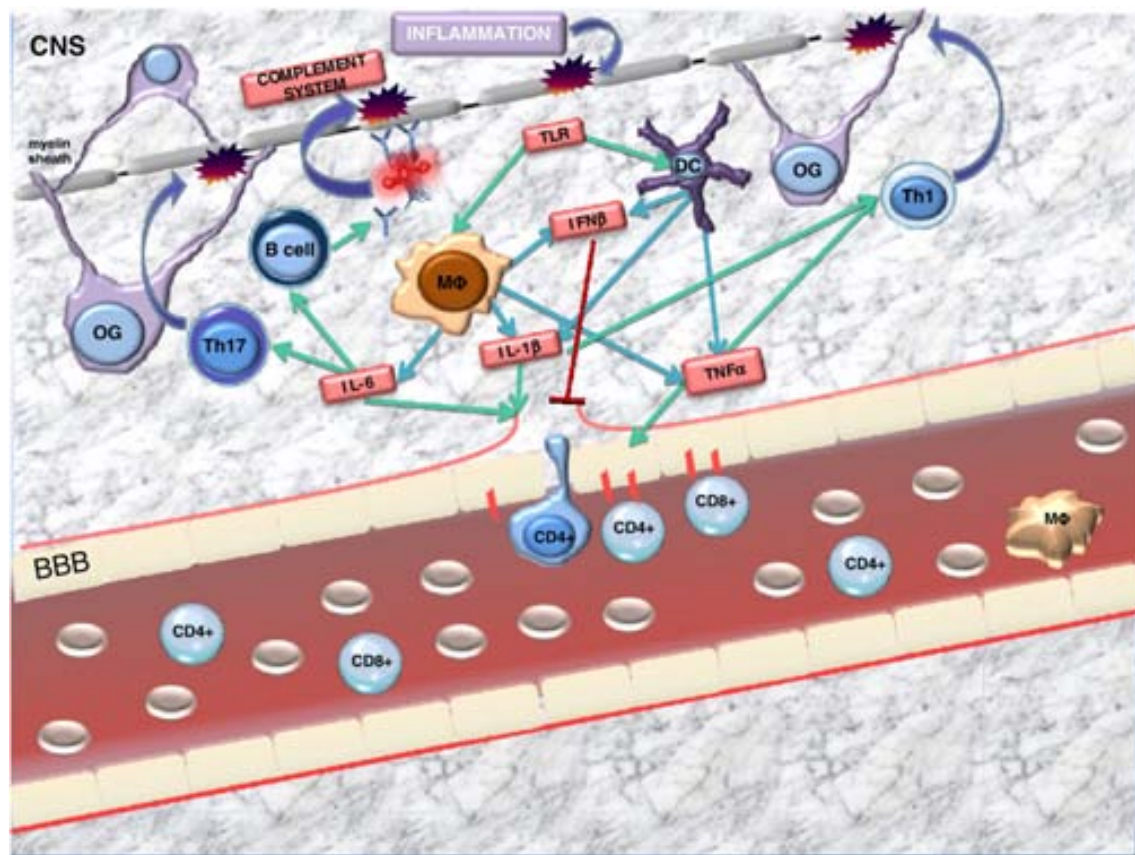


Fig. 2. Interrelationship between molecular and cellular components of innate immune system. Complement system recognizes autoantibodies and attacks myelin sheath. TLR activate macrophages (MΦ), microglia and dendritic cells (DC) resulting in the production of cytokines of the innate immune system such as IL-6, IL-1β, and TNFα. These cytokines participate in blood-brain barrier disruption and lymphocyte attraction to sites of inflammation, promote inflammation and modulate adaptive immunity. For instance, IL-6 promotes Th17 and B cell differentiation. Th17 and Th1 cells and inflammation will contribute to tissue damage. Finally, MG, microglia and DC also secrete IFNβ which, among other immunomodulatory functions, prevents leukocyte adhesion and extravasation across the blood-brain barrier (BBB).

induction in these mice resulted in a different clinical course characterized by severe ataxia but not paralysis. Strikingly, in these transgenic mice demyelinating lesions and leukocyte infiltration were mostly observed in cerebellum and almost absent from the spinal cord (Quintana et al., 2009).

The role of IL-6 in Th17 cell differentiation has also been addressed in EAE. In a recent study, EAE was induced with MOG_{35–55}/complete Freund adjuvant in gp130-deleted mice restricted to CD4+ T cells. IL-6 signaling was selectively blocked in this cell population. Interestingly, these mice were resistant to induced EAE, and increased numbers of antigen specific regulatory T cells (Foxp3+) were detected whereas IL-17 and IFNγ production were significantly reduced (Korn et al., 2008). These results highlight the importance of IL-6 polarizing specific CD4+ T cells to a Th17 response instead of committing them to regulatory functions in the autoimmune disease.

4.2. IL-1β

IL-1β is a secreted proinflammatory cytokine with pyrogenic effects that belongs to the IL-1 cytokine family. Its receptor, the type I IL-1 receptor (IL-1RI), also binds IL-1α and IL-1 receptor antagonist (IL-1RA) which inhibits the consequent signaling pathway. The secretion of active IL-1β goes through two critical steps: 1. the precursor, pro-IL-1β, must first be produced. This precursor is an inducible gene expressed by immune cells after activation of NFκB and other pathways such as p38 MAPK. 2. Pro-IL-1β must be cleaved to become IL-1β, the biologically active form. Caspase-1 or ICE (interleukin-1 converting enzyme) is one of the most studied mechanisms that cleave pro-IL-1β, although alternative pathways also exist (Simi et al., 2007). Matrix

metalloproteinases (MMPs) have been suggested as one of the possible proteases implicated in the IL-1β maturation process (Russo et al., 2007). The recognition of IL-1β by IL-1RI initiates a signaling cascade that bears much similarity to the TLR pathway and includes adaptor molecules such as MYD88 and kinases of the IRAK family. IL-1β is produced by many types of cells including immune cells, glia and neurons in inflammation conditions.

CSF of active MS patients has been reported to present higher incidence of IL-1β compared with inactive MS patients or patients with other neurological diseases (Hauser et al., 1990). Among the possible roles that IL-1β may have in MS pathogenesis, disruption of BBB permeability is one of the most studied. An ultrastructural study of rabbit blood-retina barrier showed that exposure to IL-1β induced an inflammatory response associated with extravasation of polymorphonuclear and mononuclear cells (Claudio et al., 1994). In addition, IL-1β has been reported to induce ICAM-1 in rat astrocytes (Shrikant et al., 1994) and vascular endothelial growth factor-A (VEGF-A) indirectly by the upregulation of hypoxia inducible factor-1 (HIF-α) in cultures of primary human astrocytes (Argaw et al., 2006). In the study, the authors highlighted the importance of regulating BBB permeability through this HIF-VEGF axis. Moreover, IL-1β is present in active MS lesions but not in normal appearing white matter, and HIF-α and VEGF-A are localized in hypertrophic astrocytes of MS active lesions but not in normal control tissue.

In another study, mice lacking IL-1α or IL-1β had similar incidence and clinical severity compared with wild type mice; however, mice lacking both IL-1α and IL-1β exhibited significant resistance to the disease. Furthermore, *in vitro* proliferation of T cells after MOG stimulation was diminished and cells expressed lower levels of IFNγ

and IL-17 (Matsuki et al., 2006). This outcome suggests compensation mechanisms between IL-1 α and IL-1 β in their implication to EAE.

4.3. TNF α

TNF α , a member of the TNF superfamily, is a strong proinflammatory cytokine that also participates in cell differentiation and apoptosis. It has two biologically active forms, both composed of three TNF monomers; the transmembrane and the soluble forms. The transmembrane form is cleaved by the matrix metalloprotease TNF alpha converting enzyme (TACE; ADAM17), and consequently secreted in its soluble form (McCoy and Tansey, 2008). TNF α shares two receptors with lymphotoxin (LT) α : TNFR1 and TNFR2. The soluble form binds with more avidity to p55 (TNFR1), expressed in most cell types, while the transmembrane form binds preferentially to p75 (TNFR2), strictly regulated and expressed mainly by macrophages and endothelial cells. TNFR1 contains cytoplasmic death domains which are responsible for the TNF-induced apoptosis, whereas TNFR2 lacks death domains and signals by adaptor molecules known as TNF-receptor associated factors (TRAFs). Results from infectious animal models suggest that TNFR1 enhances inflammation while TNFR2 is more involved in suppressing immune responses (Weinberg and Montler, 2005).

Blocking TNF α function has demonstrated promising results in the treatment of rheumatoid arthritis (Maini et al., 1999; Weinblatt et al., 1999). Antibodies anti-TNF as well as an immunoglobulin fusion protein of soluble TNF-receptor (TNFR:Ig) have been used as therapeutic approaches for this autoimmune disease. In addition, TNF neutralization in transfer clone-mediated EAE resulted in abrogation of clinical signs (Ruddle et al., 1990) and prevented adoptive transfer EAE in SJL mice (Selmaj et al., 1991). In brain tissue from MS patients, the number of cells expressing TNF α mRNA was increased in active lesions and correlated with apoptosis of T cells and OG (Bitsch et al., 2000). All these findings suggested that similar approaches might also be beneficial for MS patients. In this setting, a two-year phase II placebo-controlled study with three different doses of the soluble form of TNFR1 was conducted in 168 MS patients (The Lenercept Multiple Sclerosis Study Group and The University of British Columbia MS/MRI Analysis Group, 1999). Unexpectedly, acute clinical activity was significantly increased in treated patients compared with the placebo group. MRI activity was similar between treated and placebo groups. This surprising outcome dissuaded neurologists from continuing the use of TNF blocking agents to treat MS patients. Furthermore, several cases of demyelination and neurological lesions have been recently reported following treatment of patients with rheumatoid arthritis and Chron's disease with either anti-TNF or soluble TNFR1:IgG1 (Thomas et al., 2004; Freeman and Flak, 2005; Kameda et al., 2008).

Considering these negative results the question arises whether a CNS specific tissue involvement exists following therapy with TNF α blockers. The detrimental effect of blocking TNF α in MS is most likely related with other functions attributed to this cytokine: 1/ TNF α specifically influences homeostasis of CNS cells. In a very controlled model of demyelination and remyelination induced by the toxin cuprizone, TNF α -deleted mice triggered longer to remyelinate the damaged zone, which was accompanied by a reduction of both proliferating OG progenitors and mature OG. When mice lacking TNFR1 or TNFR2 were evaluated using the same model, CNS regeneration in TNFR2 deficient mice was similar to TNF α deficient mice, whereas TNFR1 $^{-/-}$ mice displayed similar derangements in CNS remyelination to wild type mice (Arnett et al., 2001). 2/ TNF α has immunosuppressive effects after its first proinflammatory burst. In this context, MOG_{35–55} induced EAE was investigated in mice lacking both ligands TNF α /LT α , as well as TNFR1, TNFR2, or double knockout mice (TNFR1/2 $^{-/-}$) (Eugster et al., 1999). A similar disease course was found in mice deficient for TNF α /LT α , TNFR1 and TNFR1/2 with a

significant delay in disease onset, reduction in demyelination but increased inflammation. In contrast, TNFR2 $^{-/-}$ mice presented enhanced disease course and more remarkable demyelination suggesting a protective role for TNFR2 in the clinical course of EAE.

These data indicate a differential effect in the TNF α action depending on the TNF-receptor engaged. Based on this, selective blocking of the TNFR1 but not TNFR2 would seem, "a priori", a more reasonable approach to treat MS. Given the preferential binding of the soluble form to TNFR1, therapies specifically targeting TACE may also prove beneficial for the disease.

4.4. Type I IFNs

Type I IFNs are a diverse family of pleiotropic cytokines, composed of 14 subtypes of IFN α , IFN κ , IFN ϵ , IFN ω and IFN β that are known by their antiviral and immunomodulatory functions. There are two types of IFN receptors: IFNAR1 and IFNAR2, the latter with a 1000-fold stronger affinity for their ligands. Receptor binding occurs in a two-step process: IFN first binds to one IFNAR subunit and subsequently the other IFNAR subunit is recruited forming a ternary complex, whose stability will define different biological activities (Kalie et al., 2008). The signaling pathway initiates with the activation of two kinases from the JAK family, JAK1 and TYK2, which are associated to IFNAR2 and IFNAR1 respectively.

In 1993, the FDA approved the use of IFN β , a type I IFN, for the treatment of MS and, since then, it has widely been used in clinical practice. IFN β has demonstrated beneficial effect in the treatment of MS patients by means of a reduction in the number of clinical relapses and disease activity measured by MRI (Paty and Li, 1993; Kappos et al., 2006). Although the mechanisms of action associated with the therapeutic effect of IFN β in MS are not yet fully understood, its immunomodulatory properties seem to play a key role in treatment efficacy. For instance, IFN β has been shown to decrease the expression of metalloproteases and adhesion molecules thus reducing the trafficking of peripheral blood cells through the BBB. Additionally, it modulates adaptive immune responses by the induction of anti-inflammatory cytokines such as IL-10 and neurotrophic factors (Sospedra and Martin, 2005).

The immunomodulatory actions of IFN β contrast with other functions also attributed to type I IFNs which may not be beneficial for the disease. For instance, type I IFNs have been shown to activate dendritic cells (Radvanyi et al., 1999), enhance humoral immunity (Le Bon et al., 2001), and favour Th1 immune responses (Brinkmann et al., 1993). A functional type I IFN pathway is probably needed to modulate MS disease activity and, for example, conditional deletion of ifnar1 in myeloid cells has been associated with enhanced disease activity in EAE mice. Additionally, dysregulation of the type I IFN pathway in MS patients may be associated with more disease activity and/or lack of response to IFN β (Comabella et al., 2009).

5. Conclusions

Adaptive immune responses are major players in MS pathogenesis. T cell activation depends not only on antigen specific recognition but also on the expression of costimulatory molecules all together forming the immunological synapse. The expression of these costimulatory signals by antigen presenting cells depends on the surrounding microenvironment and is increased under inflammatory conditions. Innate immunity is involved in the development of inflammation and modulation of immune responses. TLR and other receptors of innate immune system influence the consequent immune responses by recognition of consensus structures of microorganisms and endogen molecules that sign for tissue destruction or cell stress (i.e., fibrinogen, HSP70, hyaluronan). Although their precise role in MS has yet to be fully elucidated, TLR may contribute to the modulation of triggered autoimmunity. In addition, effector molecules of innate

immunity are used by adaptive immunity. Complement has been demonstrated to participate in demyelination and tissue damage in MS lesions. On the other hand, cytokines of the innate immune system are released to attract leukocytes and perpetuate an inflammatory microenvironment. In MS, migration of blood leukocytes across the BBB has been considered a critical step in disease pathogenesis. Cytokines such as IL-6, IL-1 and TNF α contribute to BBB disruption thus influencing leukocyte infiltration into the CNS. In addition, they promote inflammation and modulate immune responses.

To summarize, MS is a very complex trait in which genetic, environmental and immunological factors come together to give rise to a particular disease phenotype. In recent years, the different molecular players of the innate immune system addressed in the present review have been receiving increasing attention in disease etiopathogenesis. The interaction mechanisms taking place between innate and adaptive immune systems should be taken into account in order to achieve a better understanding of not only disease etiopathogenesis but also the beneficial or detrimental effects that particular therapies may have in MS patients.

References

- Argaw, A.T., Zhang, Y., Snyder, B.J., Zhao, M.L., Kopp, N., Lee, S.C., Raine, C.S., Brosnan, C.F., John, G.R., 2006. IL-1 β regulates blood-brain barrier permeability via reactivation of the hypoxia-angiogenesis program. *J. Immunol.* 177, 5574–5584.
- Arnett, H.A., Mason, J., Marino, M., Suzuki, K., Matsushima, G.K., Ting, J.P., 2001. TNF α promotes proliferation of oligodendrocyte progenitors and remyelination. *Nat. Neurosci.* 4, 1116–1122.
- Barnett, M.H., Parratt, J.D., Cho, E.S., Prineas, J.W., 2009. Immunoglobulins and complement in postmortem multiple sclerosis tissue. *Ann. Neurol.* 65, 32–46.
- Bettelli, E., Carrier, Y., Gao, W., Korn, T., Strom, T.B., Oukka, M., Weiner, H.L., Kuchroo, V.K., 2006. Reciprocal developmental pathways for the generation of a regulatory effector TH17 and regulatory T cells. *Nature* 441, 235–238.
- Bitsch, A., Kuhlmann, T., Da Costa, C., Bunkowski, S., Polak, T., Brück, W., 2000. Tumour necrosis factor alpha mRNA expression in early multiple sclerosis lesions: correlation with demyelinating activity and oligodendrocyte pathology. *Glia* 29, 366–375.
- Boos, L., Campbell, I.L., Ames, R., Wetsel, R.A., Barnum, S.R., 2004. Deletion of the complement anaphylatoxin C3a receptor attenuates, whereas ectopic expression of C3a in the brain exacerbates, experimental autoimmune encephalomyelitis. *J. Immunol.* 173, 4708–4714.
- Boos, L.A., Szalai, A.J., Barnum, S.R., 2005. Murine complement C4 is not required for experimental autoimmune encephalomyelitis. *Glia* 49, 158–160.
- Breijl, E.C., Brink, B.P., Veerhuis, R., van den Berg, C., Vloet, R., Yan, R., Dijkstra, C.D., van der Valk, P., Bö, L., 2008. Homogeneity of active demyelinating lesions in established multiple sclerosis. *Ann. Neurol.* 63, 16–25.
- Brinkmann, V., Geiger, T., Alkan, S., Heusser, C.H., 1993. Interferon alpha increases the frequency of interferon gamma-producing human CD4+ T cells. *J. Exp. Med.* 178, 1655–1663.
- Calida, D.M., Constantinescu, C., Purev, E., Zhang, G.X., Ventura, E.S., Lavi, E., Rostami, A., 2001. Cutting edge: C3, a key component of complement activation, is not required for the development of myelin oligodendrocyte glycoprotein peptide-induced experimental autoimmune encephalomyelitis in mice. *J. Immunol.* 166, 723–726.
- Christophi, G.P., Panos, M., Hudson, C.A., Christophi, R.L., Gruber, R.C., Mersich, A.T., Blystone, S.D., Jubelt, B., Massa, P.T., 2009. Macrophages of multiple sclerosis patients display deficient SHP-1 expression and enhanced inflammatory phenotype. *Lab. Invest.* 89, 742–759.
- Claudio, L., Martiney, J.A., Brosnan, C.F., 1994. Ultrastructural studies of the blood-retina barrier after exposure to interleukin-1 beta or tumor necrosis factor-alpha. *Lab. Invest.* 70, 850–861.
- Comabella, M., Lünemann, J.D., Río, J., Sánchez, A., López, C., Julià, E., Fernández, M., Nonell, L., Camiña-Tato, M., Deisenhammer, F., Caballero, E., Tortola, M.T., Prinz, M., Montalban, X., Martin, R., 2009. A type I interferon signature in monocytes is associated with poor response to interferon-beta in multiple sclerosis. *Brain* 132 (Pt 12), 3353–3365 Dec.
- Eugster, H.P., Frei, K., Kopf, M., Lassmann, H., Fontana, A., 1998. IL-6-deficient mice resist myelin oligodendrocyte glycoprotein-induced autoimmune encephalomyelitis. *Eur. J. Immunol.* 28, 2178–2187.
- Eugster, H.P., Frei, K., Bachmann, R., Bluethmann, H., Lassmann, H., Fontana, A., 1999. Severity of symptoms and demyelination in MOG-induced EAE depends on TNFR1. *Eur. J. Immunol.* 29, 626–632.
- Freeman, H.J., Flak, B., 2005. Demyelination-like syndrome in Crohn's disease after infliximab therapy. *Can. J. Gastroenterol.* 19, 313–316.
- Frei, K., Fredrikson, S., Fontana, A., Link, H., 1991. Interleukin-6 is elevated in plasma in multiple sclerosis. *J. Neuroimmunol.* 31, 147–153.
- Gay, F.W., Drye, T.J., Dick, G.W., Esiri, M.M., 1997. The application of multifactorial cluster analysis in the staging of plaques in early multiple sclerosis. Identification and characterization of the primary demyelinating lesion. *Brain* 120, 1461–1483.
- Goverman, J., 2009. Autoimmune T cell responses in the central nervous system. *Nat. Rev. Immunol.* 9, 393–407.
- Hauser, S.L., Doolittle, T.H., Lincoln, R., Brown, R.H., Dinarello, C.A., 1990. Cytokine accumulations in CSF of multiple sclerosis patients: frequent detection of interleukin-1 and tumor necrosis factor but not interleukin-6. *Neurology* 40, 1735–1739.
- Heinrich, P.C., Behrmann, I., Haan, S., Hermanns, H.M., Müller-Newen, G., Schaper, F., 2003. Principles of interleukin (IL)-6-type cytokine signalling and its regulation. *Biochem. J.* 374, 1–20.
- Ingram, G., Hakobyan, S., Robertson, N.P., Morgan, B.P., 2009. Complement in multiple sclerosis: its role in disease and potential as a biomarker. *Clin. Exp. Immunol.* 155, 128–139.
- Kalie, E., Jaitin, D.A., Podoplelova, Y., Piehler, J., Schreiber, G., 2008. The stability of the ternary interferon-receptor complex rather than the affinity to the individual subunits dictates differential biological activities. *J. Biol. Chem.* 283, 32925–32936.
- Kameda, T., Dobashi, H., Kittaka, K., Susaki, K., Hosomi, N., Deguchi, K., Ishida, T., 2008. A case of rheumatoid arthritis complicated by demyelination in both cerebral cortex and spinal cord during etanercept therapy. *Mod. Rheumatol.* 18, 399–402.
- Kappos, L., Traboulsee, A., Constantinescu, C., Erälä, J.P., Forrester, F., Jongen, P., Pollard, J., Sandberg-Wollheim, M., Sindic, C., Stubinski, B., Uitdehaag, B., Li, D., 2006. Long-term subcutaneous interferon beta-1a therapy in patients with relapsing-remitting MS. *Neurology* 67, 944–953.
- Korn, T., Mitsdoerffer, M., Croxford, A.L., Awasthi, A., Dardalhon, V.A., Galileos, G., Vollmar, P., Stritesky, G.L., Kaplan, M.H., Waisman, A., Kuchroo, V.K., Oukka, M., 2008. IL-6 controls Th17 immunity in vivo by inhibiting the conversion of conventional T cells into Foxp3+ regulatory T cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 105, 18460–18465.
- Lampropoulou, V., Hoehlig, K., Roch, T., Neves, P., Calderón Gómez, E., Sweeney, C.H., Hao, Y., Freitas, A.A., Steinhoff, U., Anderton, S.M., Fillatreau, S., 2008. TLR-activated B cells suppress T cell-mediated autoimmunity. *J. Immunol.* 180, 4763–4773.
- Le Bon, A., Schiavoni, G., D'Agostino, G., Gresser, I., Belardelli, F., Tough, D.F., 2001. Type I interferons potentially enhance humoral immunity and can promote isotype switching by stimulating dendritic cells in vivo. *Immunity* 14, 461–470.
- Li, Q., Huang, D., Nacion, K., Bu, H., Lin, F., 2009. Augmenting DAF levels in vivo ameliorates experimental autoimmune encephalomyelitis. *Mol. Immunol.* 46, 2885–2891.
- Linington, C., Morgan, B.P., Scolding, N.J., Wilkins, P., Piddlesden, S., Compston, D.A., 1989. The role of complement in the pathogenesis of experimental allergic encephalomyelitis. *Brain* 112, 895–911.
- Linker, R.A., Lühder, F., Kallen, K.J., Lee, D.H., Engelhardt, B., Rose-John, S., Gold, R., 2008. IL-6 transsignalling modulates the early effector phase of EAE and targets the blood-brain barrier. *J. Neuroimmunol.* 205, 64–72.
- Liu, J., Miwa, T., Hilliard, B., Chen, Y., Lambiris, J.D., Wells, A.D., Song, W.C., 2005. The complement inhibitory protein DAF (CD55) suppresses T cell immunity in vivo. *J. Exp. Med.* 201, 567–577.
- Lucchinetti, C., Brück, W., Parisi, J., Scheithauer, B., Rodriguez, M., Lassmann, H., 2000. Heterogeneity of multiple sclerosis lesions: implications for the pathogenesis of demyelination. *Ann. Neurol.* 47, 707–717.
- Lumsden, C.E., 1971. The immunogenesis of the multiple sclerosis plaque. *Brain Res.* 28, 365–390.
- Maimone, D., Gregory, S., Arnason, B.G., Reder, A.T., 1991. Cytokine levels in the cerebrospinal fluid and serum of patients with multiple sclerosis. *J. Neuroimmunol.* 32, 67–74.
- Maini, R., St Clair, E.W., Breedveld, F., Furst, D., Kalden, J., Weisman, M., Smolen, J., Emery, P., Harriman, G., Feldmann, M., Lipsky, P., 1999. Infliximab (chimeric anti-tumor necrosis factor alpha monoclonal antibody) versus placebo in rheumatoid arthritis patients receiving concomitant methotrexate: a randomised phase III trial. ATTRACT Study Group. *Lancet* 354, 1932–1939.
- Malmeström, C., Andersson, B.A., Haghighi, S., Lycke, J., 2006. IL-6 and CCL2 levels in CSF are associated with the clinical course of MS: implications for their possible immunopathogenic roles. *J. Neuroimmunol.* 175, 176–182.
- Marta, M., Andersson, A., Isaksson, M., Kämpe, O., Lobell, A., 2008. Unexpected regulatory roles of TLR4 and TLR9 in experimental autoimmune encephalomyelitis. *Eur. J. Immunol.* 38, 565–575.
- Matsuki, T., Nakae, S., Sudo, K., Horai, R., Iwakura, Y., 2006. Abnormal T cell activation caused by the imbalance of the IL-1/IL-1R antagonist system is responsible for the development of experimental autoimmune encephalomyelitis. *Int. Immunol.* 18, 399–407.
- McCoy, M.K., Tansey, M.G., 2008. TNF signaling inhibition in the CNS: implications for normal brain function and neurodegenerative disease. *J. Neuroinflammation* 5, 45.
- McLaughlin, K.A., Wucherpfennig, K.W., 2008. B cells and autoantibodies in the pathogenesis of multiple sclerosis and related inflammatory demyelinating diseases. *Adv. Immunol.* 98, 121–149.
- Mead, R.J., Singhrao, S.K., Neal, J.W., Lassmann, H., Morgan, B.P., 2002. The membrane attack complex of complement causes severe demyelination associated with acute axonal injury. *J. Immunol.* 168, 458–465.
- Mendel, I., Katz, A., Kozak, N., Ben-Nun, A., Revel, M., 1998. Interleukin-6 functions in autoimmune encephalomyelitis: a study in gene-targeted mice. *Eur. J. Immunol.* 28, 1727–1737.
- Michalopoulou, M., Nikolaou, C., Tavernarakis, A., Alexandri, N.M., Rentzos, M., Chatzipanagiotou, S., Cambouris, C., Vassilopoulos, D., 2004. Soluble interleukin-6 receptor (sIL-6R) in cerebrospinal fluid of patients with inflammatory and non-inflammatory neurological diseases. *Immunol. Lett.* 94, 183–189.
- Mollnes, T.E., Vandvik, B., Lea, T., Vartdal, F., 1987. Intrathecal complement activation in neurological diseases evaluated by analysis of the terminal complement complex. *J. Neurol. Sci.* 78, 17–28.

- Nataf, S., Carroll, S.L., Wetsel, R.A., Szalai, A.J., Barnum, S.R., 2000. Attenuation of experimental autoimmune demyelination in complement-deficient mice. *J. Immunol.* 165, 5867–5873.
- Navikas, V., Matuszevicius, D., Söderström, M., Fredrikson, S., Kivisäkk, P., Ljungdahl, A., Höjberg, B., Link, H., 1996. Increased interleukin-6 mRNA expression in blood and cerebrospinal fluid mononuclear cells in multiple sclerosis. *J. Neuroimmunol.* 64, 63–69.
- Okuda, Y., Sakoda, S., Fujimura, H., Saeki, Y., Kishimoto, T., Yanagihara, T., 1999. IL-6 plays a crucial role in the induction phase of myelin oligodendrocyte glycoprotein 35–55 induced experimental autoimmune encephalomyelitis. *J. Neuroimmunol.* 101, 188–196.
- O'Neill, L.A., 2008. 'Fine tuning' TLR signaling. *Nat. Immunol.* 9, 459–461.
- Padberg, F., Feneberg, W., Schmidt, S., Schwarz, M.J., Körschenhausen, D., Greenberg, B.D., Nolde, T., Müller, N., Trapmann, H., König, N., Möller, H.J., Hampel, H., 1999. CSF and serum levels of soluble interleukin-6 receptors (sIL-6R and sgp130), but not of interleukin-6 are altered in multiple sclerosis. *J. Neuroimmunol.* 99, 218–223.
- Padberg, F., Haase, C.G., Feneberg, W., Schwarz, M.J., Hampel, H., 2001. No association between anti-myelin oligodendrocyte glycoprotein antibodies and serum/cerebrospinal fluid levels of the soluble interleukin-6 receptor complex in multiple sclerosis. *Neurosci. Lett.* 305, 13–16.
- Paty, D.W., Li, D.K., 1993. Interferon beta-1b is effective in relapsing-remitting multiple sclerosis. II. MRI analysis results of a multicenter, randomized, double-blind, placebo-controlled trial. UBC MS/MRI Study Group and the IFNB Multiple Sclerosis Study Group. *Neurology* 43, 662–667.
- Perez, L., Alvarez-Cermeño, J.C., Rodríguez, C., Roldán, E., Brieva, J.A., 1995. B cells capable of spontaneous IgG secretion in cerebrospinal fluid from patients with multiple sclerosis: dependency on local IL-6 production. *Clin. Exp. Immunol.* 101, 449–452.
- Piddlesden, S., Lassmann, H., Laffafian, I., Morgan, B.P., Linington, C., 1991. Antibody-mediated demyelination in experimental allergic encephalomyelitis is independent of complement membrane attack complex formation. *Clin. Exp. Immunol.* 83, 245–250.
- Piddlesden, S.J., Storch, M.K., Hibbs, M., Freeman, A.M., Lassmann, H., Morgan, B.P., 1994. Soluble recombinant complement receptor 1 inhibits inflammation and demyelination in antibody-mediated demyelinating experimental allergic encephalomyelitis. *J. Immunol.* 152, 5477–5484.
- Prinz, M., Garbe, F., Schmidt, H., Mildner, A., Gutcher, I., Wolter, K., Piesche, M., Schoers, R., Weiss, E., Kirschning, C.J., Rochford, C.D., Brück, W., Becher, B., 2006. Innate immunity mediated by TLR9 modulates pathogenicity in an animal model of multiple sclerosis. *J. Clin. Invest.* 116 (2), 456–464.
- Quintana, A., Müller, M., Frausto, R.F., Ramos, R., Getts, D.R., Sanz, E., Hofer, M.J., Krauthausen, M., King, N.J., Hidalgo, J., Campbell, I.L., 2009. Site-specific production of IL-6 in the central nervous system retargets and enhances the inflammatory response in experimental autoimmune encephalomyelitis. *J. Immunol.* 183, 2079–2088.
- Radvanyi, L.G., Banerjee, A., Weir, M., Messner, H., 1999. Low levels of interferon-alpha induce CD86 (B7.2) expression and accelerates dendritic cell maturation from human peripheral blood mononuclear cells. *Scand. J. Immunol.* 50, 499–509.
- Reiman, R., Gerard, C., Campbell, I.L., Barnum, S.R., 2002. Disruption of the C5a receptor gene fails to protect against experimental allergic encephalomyelitis. *Eur. J. Immunol.* 32, 1157–1163.
- Ruddle, N.H., Bergman, C.M., McGrath, K.M., Lingenheld, E.G., Grunnet, M.L., Padula, S.J., Clark, R.B., 1990. An antibody to lymphotoxin and tumor necrosis factor prevents transfer of experimental allergic encephalomyelitis. *J. Exp. Med.* 172, 1193–1200.
- Rus, H., Cudrici, C., David, S., Niculescu, F., 2006a. The complement system in central nervous system diseases. *Autoimmunity* 39, 395–402.
- Rus, H., Cudrici, C., Niculescu, F., Shin, M.L., 2006b. Complement activation in autoimmune demyelination: dual role in neuroinflammation and neuroprotection. *J. Neuroimmunol.* 180, 9–16.
- Russo, R., Siviglia, E., Gliozzi, M., Amantea, D., Paoletti, A., Berliocchi, L., Bagegga, G., Corasaniti, M.T., 2007. Evidence implicating matrix metalloproteinases in the mechanism underlying accumulation of IL-1beta and neuronal apoptosis in the neocortex of HIV/gp120-exposed rats. *Int. Rev. Neurobiol.* 82, 407–421.
- Samoilova, E.B., Horton, J.L., Hilliard, B., Liu, T.S., Chen, Y., 1998. IL-6-deficient mice are resistant to experimental autoimmune encephalomyelitis: roles of IL-6 in the activation and differentiation of autoreactive T cells. *J. Immunol.* 161, 6480–6486.
- Sanders, M.E., Koski, C.L., Robbins, D., Shin, M.L., Frank, M.M., Joiner, K.A., 1986. Activated terminal complement in cerebrospinal fluid in Guillain-Barré syndrome and multiple sclerosis. *J. Immunol.* 136, 4456–4459.
- Scolding, N.J., Morgan, B.P., Compston, D.A.J., 1998. The expression of complement regulatory proteins by adult human oligodendrocytes. *J. Neuroimmunol.* 84, 69–75.
- Sellebjerg, F., Jaliashvili, I., Christiansen, M., Garred, P., 1998. Intrathecal activation of the complement system and disability in multiple sclerosis. *J. Neurol. Sci.* 157, 168–174.
- Selmaj, K., Raine, C.S., Cross, A.H., 1991. Anti-tumor necrosis factor therapy abrogates autoimmune demyelination. *Ann. Neurol.* 30, 694–700.
- Shrikant, P., Chung, I.Y., Ballestas, M.E., Benveniste, E.N., 1994. Regulation of intercellular adhesion molecule-1 gene expression by tumor necrosis factor-alpha, interleukin-1 beta, and interferon-gamma in astrocytes. *J. Neuroimmunol.* 51, 209–220.
- Silverman, B.A., Carney, D.F., Johnston, C.A., Vanguri, P., Shin, M.L., 1984. Isolation of membrane attack complex of complement from myelin membranes treated with serum complement. *J. Neurochem.* 42, 1024–1029.
- Simi, A., Lerouet, D., Pinteaux, E., Brough, D., 2007. Mechanisms of regulation for interleukin-1beta in neurodegenerative disease. *Neuropharmacology* 52, 1563–1569.
- Sjöberg, A.P., Trouw, L.A., Blom, A.M., 2009. Complement activation and inhibition: a delicate balance. *Trends Immunol.* 30, 83–90.
- Smith, S.S., Ludwig, M., Wohler, J.E., Bullard, D.C., Szalai, A.J., Barnum, S.R., 2008. Deletion of both ICAM-1 and C3 enhances severity of experimental autoimmune encephalomyelitis compared to C3-deficient mice. *Neurosci. Lett.* 442, 158–160.
- Sospedra, M., Martin, R., 2005. Immunology of multiple sclerosis. *Annu. Rev. Immunol.* 23, 683–747.
- Szalai, A.J., Hu, X., Adams, J.E., Barnum, S.R., 2007. Complement in experimental autoimmune encephalomyelitis revisited: C3 is required for development of maximal disease. *Mol. Immunol.* 44, 3132–3136.
- Takeda, K., Akira, S., 2005. Toll-like receptors in innate immunity. *Int. Immunol.* 17, 1–14.
- Takeda, K., Kaisho, T., Akira, S., 2003. Toll-like receptors. *Annu. Rev. Immunol.* 21, 335–376.
- Tegla, C.A., Cudrici, C., Rus, V., Ito, T., Vlaicu, S., Singh, A., Rus, H.J., 2009. Neuroprotective effects of the complement terminal pathway during demyelination: implications for oligodendrocyte survival. *J. Neuroimmunol.* 213, 3–11.
- The Lenercept Multiple Sclerosis Study Group and The University of British Columbia MS/MRI Analysis Group, 1999. TNF neutralization in MS: results of a randomized, placebo-controlled multicenter study. *Neurology* 53 (3), 457–465.
- Thomas Jr., C.W., Weinschenker, B.G., Sandborn, W.J., 2004. Demyelination during anti-tumor necrosis factor alpha therapy with infliximab for Crohn's disease. *Inflamm. Bowel Dis.* 10, 28–31.
- Touil, T., Fitzgerald, D., Zhang, G.X., Rostami, A., Gran, B., 2006. Cutting edge: TLR3 stimulation suppresses experimental autoimmune encephalomyelitis by inducing endogenous IFN-beta. *J. Immunol.* 177, 7505–7509.
- Tran, G.T., Hodgkinson, S.J., Carter, N., Killingsworth, M., Spicer, S.T., Hall, B.M., 2002. Attenuation of experimental allergic encephalomyelitis in complement component 6-deficient rats is associated with reduced complement C9 deposition, P-selectin expression, and cellular infiltrate in spinal cords. *J. Immunol.* 168, 4293–4300.
- Urich, E., Gutcher, I., Prinz, M., Becher, B., 2006. Autoantibody-mediated demyelination depends on complement activation but not activatory Fc-receptors. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 103, 18697–18702.
- Vanguri, P., Shin, M.L., 1986. Activation of complement by myelin: identification of C1-binding proteins of human myelin from central nervous tissue. *J. Neurochem.* 46, 1535–1541.
- Vanguri, P., Koski, C.L., Silverman, B., Shin, M.L., 1982. Complement activation by isolated myelin: activation of the classical pathway in the absence of myelin-specific antibodies. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 79, 3290–3294.
- Walport, M.J., 2001. Complement. First of two parts. *N Engl J. Med.* 344, 1058–1066.
- Weerth, S.H., Rus, H., Shin, M.L., Raine, C.S., 2003. Complement C5 in experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE) facilitates remyelination and prevents gliosis. *Am. J. Pathol.* 163, 1069–1080.
- Weinberg, A.D., Montler, R., 2005. Modulation of TNF receptor family members to inhibit autoimmune disease. *Curr. Drug Targets Inflamm. Allergy* 4, 195–203.
- Weinblatt, M.E., Kremer, J.M., Bankhurst, A.D., Bulpitt, K.J., Fleischmann, R.M., Fox, R.I., Jackson, C.G., Lange, M., Burge, D.J., 1999. A trial of etanercept, a recombinant tumor necrosis factor receptor: Fc fusion protein, in patients with rheumatoid arthritis receiving methotrexate. *N Engl J. Med.* 340, 253–259.
- Wing, M.G., Zajicek, J., Seilly, D.J., Compston, D.A., Lachmann, P.J., 1992. Oligodendrocytes lack glycolipid anchored proteins which protect them against complement lysis. Restoration of resistance to lysis by incorporation of CD59. *Immunology* 76, 140–145.
- Wren, D.R., Noble, M., 1989. Oligodendrocytes and oligodendrocyte/type-2 astrocyte progenitor cells of adult rats are specifically susceptible to the lytic effects of complement in absence of antibody. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 86, 9025–9029.

Implication of the Toll-Like Receptor 4 Pathway in the Response to Interferon- β in Multiple Sclerosis

Marta F. Bustamante, BSc,¹ Nicolás Fissolo, PhD,¹ Jordi Río, MD,¹
 Carmen Espejo, PhD,¹ Carme Costa, PhD,¹ María José Mansilla, BSc,¹
 Ignacio Lizasoain, PhD,² María Angeles Moro, PhD,² Mari Carmen Edo, MD,¹
 Xavier Montalban, MD,¹ and Manuel Comabella, MD¹

Objective: Interferon-beta (IFN β) has demonstrated beneficial effects reducing disease activity in multiple sclerosis (MS) patients, but a relatively large proportion of patients do not respond to treatment. Here we aimed to investigate the roles of the Toll-like receptor 4 (TLR4) and the type I IFN pathways in the response to IFN β in MS patients.

Methods: The expression levels of several components of the TLR4 and the type I IFN pathways were determined by flow cytometry and real-time polymerase chain reaction (PCR) in peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) from a cohort of 85 MS patients treated for at least 2 years with IFN β and classified into responders, intermediate responders, and nonresponders based on their clinical response to treatment. Thirty-two healthy controls were also included in the study for comparison purposes.

Results: Compared to responders and controls, PBMCs from nonresponders and intermediate responders were characterized by increased baseline expression levels of endogenous IFN β and elevated IFN receptor 1 (IFNAR1) expression in monocytes. Furthermore, the capacity of IFN β to induce its own expression was deficient in cells from nonresponders compared with responders. Baseline expression of the interleukin-1 receptor-associated kinase 3 (IRAK3), a negative regulator of TLR4 signaling primarily expressed in monocytes, was found to be significantly decreased in IFN β responders compared with nonresponders.

Interpretation: These findings provide evidence of the involvement of the TLR4 and type I IFN signaling pathways in the response to IFN β .

ANN NEUROL 2011;70:634–645

Interferon-beta (IFN β) is the most widely prescribed treatment for relapsing-remitting multiple sclerosis (RRMS) and has shown positive effects on reducing disease activity.^{1–3} However, IFN β is only partially effective and a significant proportion of MS patients do not respond to treatment.⁴ In a previous study, we showed that peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) from patients who will show a lack of response to IFN β were characterized by a baseline overexpression of type I IFN responsive genes.⁵ The type I IFN pathway appeared to be selectively altered in monocytes from a subgroup of IFN β -treated patients

whose lack of response was determined by applying stringent clinical criteria after 2 years of treatment.⁵ However, these findings could indicate a true lack of response to IFN β , the presence of more active disease in patients who continue to have relapses and disability progression despite treatment, or a combination of both factors.

Toll-like receptors (TLRs) are transmembrane proteins that recognize pathogen-associated molecular patterns and play important roles in the regulation of immune function and inflammation.^{6,7} Among the TLRs, Toll-like receptor 4 (TLR4) signals through myeloid differentiation

View this article online at wileyonlinelibrary.com. DOI: 10.1002/ana.22511

Received Feb 17, 2011, and in revised form May 3, 2011. Accepted for publication May 31, 2011.

Address correspondence to Dr Comabella, Unitat de Neuroimmunologia Clínica, CEM-Cat. Edif. EUI 2^a planta, Hospital Universitari Vall d'Hebron. Pg. Vall d'Hebron 119-129 08035 Barcelona, Spain. E-mail: mcomabel@ir.vhebron.net

From the ¹Centre d'Esclerosi Múltiple de Catalunya, CEM-Cat, Unitat de Neuroimmunologia Clínica, Hospital Universitari Vall d'Hebron (HUVH)—Universitat Autònoma de Barcelona, 08035 Barcelona, Spain; and ²Departamento de Farmacología, Facultad de Medicina, Universidad Complutense de Madrid, Spain.

Additional Supporting Information can be found in the online version of this article.

primary response gene 88 (MYD88)-dependent and MYD88-independent pathways, leading to the production of proinflammatory cytokines such as interleukin-1 beta (IL1 β) and tumor necrosis factor-alpha (TNF α) and type I IFNs like IFN β , respectively.⁸ TLR4 is abundantly expressed in myelomonocytic subpopulations of leukocytes, and its upregulation in peripheral blood monocytes has been found to correlate with the severity of disorders such as cerebral infarction and type 1 diabetes mellitus.^{9,10} Based on these findings, and taking into account the close relationship existing between the TLR4 and the type I IFN pathways,¹¹ in the present study we aimed to investigate the roles of the TLR4 and the type I IFN pathways in disease activity and the response to IFN β in MS patients.

Patients and Methods

Study Design and Clinical Assessment

This is a prospective study of RRMS patients treated with IFN β at the outpatient clinic of the Centre d'Esclerosi Múltiple de Catalunya (CEM-Cat, Barcelona, Spain). All patients were included in a follow-up protocol collecting basal and longitudinal clinical data, as previously described.¹² The study was approved by the local ethics committee, and all patients gave their informed consent.

Criteria of Response to IFN β Therapy

Clinical criteria of response to IFN β were applied after 2 years of treatment. Patients were labeled as responders when there was no increase in the Expanded Disability Status Scale (EDSS) score and no relapses over the follow-up period. Patients were classified as nonresponders when they experienced during the follow-up period 1 or more relapses and an increase of at least 1 point in the EDSS score that persisted for a minimum of 2 consecutive scheduled visits separated by a 6-month interval.¹² Patients were labeled as intermediate responders when there was, during the follow-up period, presence of relapses with an increase of less than 1 point in the EDSS score, or absence of relapses with an increase in the EDSS score of 1 point or higher.

Patients

Eighty-five RRMS patients were included in the study. Of these, 49 (57.6%) were responders, 18 (21.2%) nonresponders, and 18 (21.2%) intermediate responders to IFN β . None of these patients had ever received treatment with IFN β or other immunosuppressive therapy before study entry. No patient had clinical exacerbations or received corticosteroid treatment during the month before initiation of IFN β . A control group of 32 individuals was also included in the study.

Sample Collection and Cell Surface Quantification of TLR4, TLR2, and IFN Receptor 1 by Flow Cytometry in Monocytes

PBMC from RRMS patients and healthy controls were isolated in the same conditions by Ficoll-Isopaque density gradient cen-

trifugation (Gibco BRL, Life Technologies Ltd., Paisley, UK) and stored in liquid nitrogen until used. Cell surface expression of TLR4, TLR2, and IFN receptor 1 (IFNAR1) in monocytes was determined by flow cytometry in RRMS patients at baseline and after 12 months of IFN β treatment and in healthy controls. For this, PBMCs were thawed and stained with allophycocyanin (APC)-conjugated mouse anti-human CD14 (Pharmingen, San Diego, CA), fluorescein isothiocyanate (FITC)-conjugated mouse anti-human IFN- α/β R1 (IFNAR1) (R&D Systems, Gaithersburg, MD), and phycoerythrin (PE)-conjugated mouse anti-human TLR4 and TLR2 (eBioscience, San Diego, CA), or the corresponding isotype controls (FITC-conjugated mouse immunoglobulin G1 [IgG1] and PE-conjugated mouse IgG2a; Pharmingen). Cells were analyzed using a dual laser FACSCanto (Becton Dickinson, Mountain View, CA) flow cytometer equipped with FACSDiva software. Monocytes were gated based on forward and side light scatter properties and also on their CD14 positivity. Median fluorescence intensity of monocytes expressing TLR4, TLR2, and IFNAR1 was calculated by subtracting the antibody control signal from the specific signal.

Determination of Serum Levels of Heat Shock Protein 70

Peripheral blood was collected by standard venipuncture and allowed to clot spontaneously for 30 minutes. Serum was isolated by centrifugation and stored frozen at -80°C until used. Baseline levels of heat shock protein 70 (HSP70) (total) were measured in MS patients and healthy controls by means of an enzyme immunoassay (EIA) using a commercially available kit (HSP70 high sensitivity EIA kit, EKS-715; Assay Designs, Inc., Ann Arbor, MI) according to the manufacturer's instructions. Recombinant HSP70 standards ranged from 0 to 12.5ng/mL. Serum samples and standards were tested in duplicate, and concentrations of HSP70 were determined by interpolation from a lineal regression standard curve generated from the range of recombinant human HSP70. The intraassay and interassay coefficients of variation were determined to be $<10\%$.

Real-Time Quantitative Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction

Total RNA was isolated using the RNeasy Mini Kit (Qiagen, Germany) from frozen PBMC samples of RRMS patients at baseline and healthy controls. RNA was retrotranscribed with the High Capacity cDNA Retrotranscription Kit (Applied Biosystems, Foster City, CA) and gene expression levels of interferon, beta 1, fibroblast (*IFNB1*), chemokine (C-X-C motif) ligand 10 (*CXCL10*), interleukin 1 β (*IL1B*), *TNF*, *MYD88*, and toll-like receptor adaptor molecule 1 (*TICAM1*) were determined by real-time polymerase chain reaction (PCR) absolute quantification. In brief, fragments covering the commercial TaqMan expression assay of 6 genes were amplified by conventional PCR from human total RNA, using the corresponding forward primer with a NheI restriction site and the reverse primer with a XmaI site (primer information is shown in Supporting Table 1). The products of *CXCL10*₍₉₆₋₂₄₅₎, *IL1B*₍₄₉₀₋₆₄₉₎, *TNF*₍₃₆₈₋₅₃₆₎, *MYD88*₍₄₅₆₋₅₈₂₎, and *TICAM1*₍₁₈₆₉₋₂₀₂₆₎, were cloned into a pCI vector (Promega,

Mannheim, Germany) using the NheI/XmaI restriction enzymes to create the following constructs: pCI-*CXCL10*_(96–245), pCI-*IL1B*_(490–649), pCI-*TNF*_(368–536), pCI-*MYD88*_(456–582), and pCI-*TICAM1*_(1869–2026). The product of *IFNBI*_(611–751) was inserted into a pCR[®]2.1-TOPO[®] vector using the TOPO TA Cloning[®] system according to the manufacturer's protocol in order to create the pCR[®]2.1-TOPO[®]-*IFNBI*_(611–751) construct.

The mass of 1 construct copy was obtained by multiplying the plasmid length (bp) with the Avogadro number. Calculi were made to achieve 3×10^6 copies/ $2\mu\text{l}$ of the construct as the first standard, which was subjected to a 10-fold serial dilution (3×10^6 to 3×10^1) with RNase free water. Real-time PCR was carried out using the ABI-Applied Biosystems 7900 HT Thermal Cycler (Applied Biosystems) in 384 optical PCR plates. Each reaction contained $2\mu\text{l}$ standard/complementary DNA (cDNA) template, $5\mu\text{l}$ of TaqMan Universal PCR Master Mix, No AmpErase[®], UNG, $0.5\mu\text{l}$ of corresponding TaqMan[®] Gene expression assay (Applied Biosystems), and $2.5\mu\text{l}$ of RNase-free water following the standard PCR program suggested by the manufacturer. Samples were determined in duplicates. Analysis was performed with the absolute quantification application of the software SDS 2.3 (Applied Biosystems) in order to obtain the number of messenger RNA (mRNA) copies of the specific gene for each sample.

mRNA expression levels of tyrosine kinase 2 (TYK2), protein tyrosine phosphatase, nonreceptor type 6 (PTPN6, also known as SHP1), protein tyrosine phosphatase, nonreceptor type 11 (PTPN11, also known as SHP2), sterile alpha and TIR motif containing 1 (SARM1), interleukin-1 receptor-associated kinase 3 (IRAK3), suppressor of IKBKE 1 (SIKE), single immunoglobulin and toll-interleukin 1 receptor (TIR) domain (SIGIRR), and receptor-interacting serine-threonine kinase 3 (RIPK3) were determined by real-time PCR relative quantification in RRMS patients at baseline and healthy controls. Glycer-aldehyde 3-phosphate dehydrogenase (*GAPDH*) was employed for the normalization of the quantity of RNA used. Its threshold cycle (Ct) was subtracted from that of the specific genes to obtain a ΔCt value.

IFN β Induction Experiments

PBMC from responders, nonresponders, and healthy controls were cultured for 24 hours in the presence or absence of 100IU/ml of IFN β -1b (Betaferon). After cell culture, mRNA expression levels of *IFNBI* were determined by real-time PCR absolute quantification, as described above.

Experimental Autoimmune Encephalomyelitis Induction in TLR4-Deficient Mice

Eight-week-old to 10-week-old TLR4-deficient mice (B6.B10ScN-Tlr4^{lps-del/JthJ}) and age-matched and sex-matched C57Bl/6J wild-type mice purchased from Jackson Laboratory (Bar Harbor, ME) were used. Experiments were done according to the European Union regulations and approved by our institutional Ethics Committee on Animal Experimentation. Disease induction, proliferation assays, and histopathology were performed as described in Supporting Methods.

Statistical Analysis

The Kruskal-Wallis test was used to analyze differences among groups at baseline in serum levels of HSP70, protein expression levels of TLR4, TLR2, and IFNAR1, and mRNA expression levels of TLR4 downstream genes and key regulators belonging to the TLR4 and type I IFN pathways. If significant differences ($p < 0.05$) were found, a Mann-Whitney test was then used to test for significant differences between 2 groups. In MS patients, comparisons of TLR4, TLR2, and IFNAR1 expression levels before and after 12 months of IFN β treatment were assessed by a Wilcoxon signed ranks test. Differences in *IFNBI* expression between groups before and after IFN β induction were assessed by a paired t test. Linear association between clinical and radiological variables and levels of measured molecules were determined by the Spearman rank correlation coefficient. Bonferroni correction was used to correct the alpha level for multiple comparisons in correlation analyses (alpha = 0.003) and comparisons of expression levels of key regulators of the TLR4 and type I IFN pathways (alpha = 0.006). Statistical analysis was performed by using the SPSS 15.0 package (SPSS, Inc., Chicago, IL) for MS Windows.

Results

Figure 1 exemplifies the components of the TLR4, TLR2, and type I IFN pathways interrogated in the study.

Clinical and Magnetic Resonance Imaging Description of MS Patients Included in the Study

Except for EDSS scores, responders, intermediate responders, and nonresponders were comparable for all clinical and radiological variables (Table 1). A trend toward increased baseline EDSS was observed in nonresponders compared with responders, a pattern already reported in previous studies.^{5,13}

Baseline TLR4 Expression by Monocytes Is Decreased in MS Patients Irrespective of the Clinical Response to IFN β

We first evaluated the roles of the TLR4 pathway in the disease and the response to IFN β treatment by determining TLR4 expression by flow cytometry at baseline in monocytes from MS patients and controls. As shown in Figure 2A, TLR4 expression was significantly decreased in the whole MS group compared with the control group ($p = 0.019$). However, TLR2 expression by monocytes, which was selected as specificity control of TLR4 expression, was similar between MS patients and controls ($p = 0.402$; see Fig 2B). When the MS group was stratified based on the response to IFN β treatment, TLR4 and TLR2 expression was comparable between responders, intermediate responders, and nonresponders ($p > 0.05$ for all comparisons; see Fig 2A, B).

Correlations between baseline clinical and radiological variables in the whole MS group and TLR4 and TLR2 expression in monocytes revealed a statistically significant negative association between TLR4 levels and EDSS scores

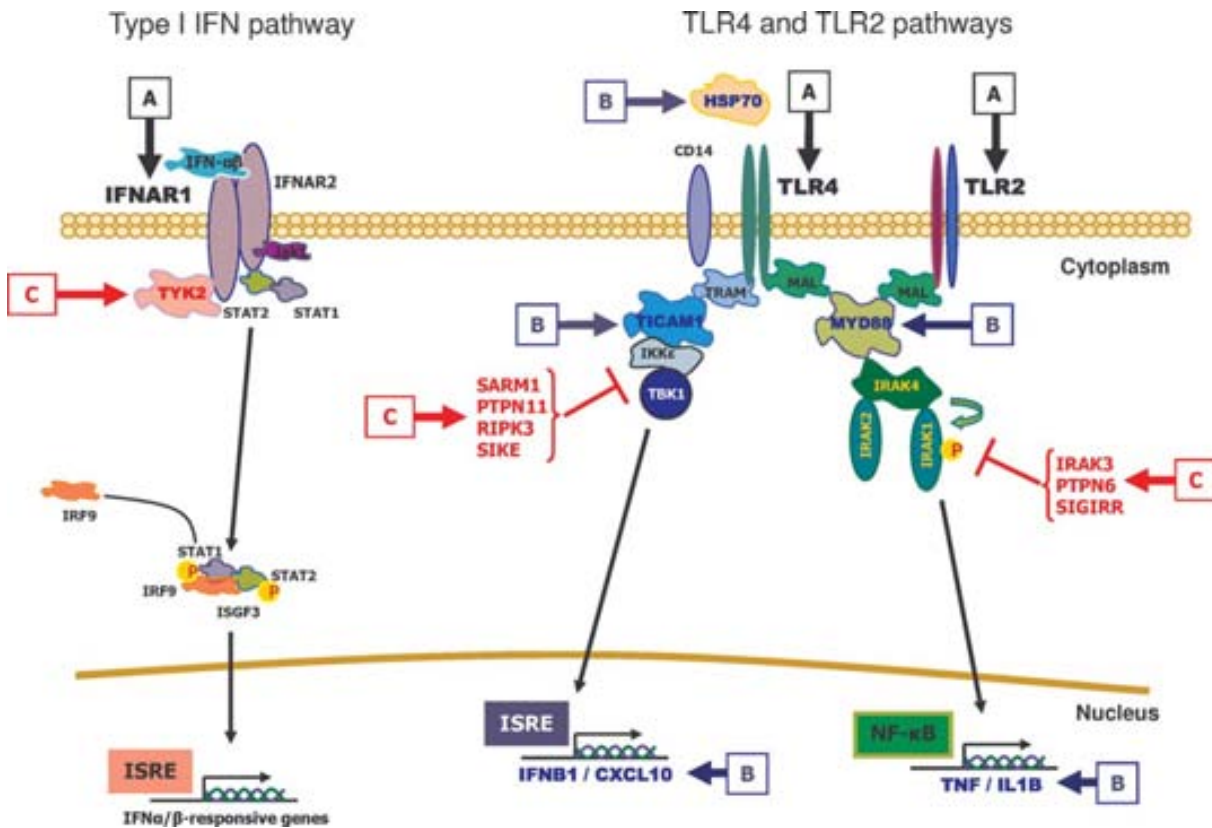


FIGURE 1: Schematic representation of the components of the TLR4, TLR2, and type I IFN pathways investigated in the study. Molecules measured in the study were grouped into 3 different levels: A: Expression of the surface receptors TLR4, TLR2, and IFNAR1 was determined by flow cytometry in monocytes; B: Serum levels of the TLR4 ligand HSP70 and IFN β were measured by ELISA, and mRNA expression levels of TLR4 downstream genes such as *TICAM1*, *MYD88*, *IFNB1*, *CXCL10*, *TNF*, and *IL1B* were determined by real-time PCR absolute quantification; and C: mRNA expression levels of key regulators belonging to the type I IFN pathway like *TYK2*, and to the TLR4 pathway such as *SARM1*, *PTPN11*, *RIPK3*, *SIKE*, *IRAK3*, *PTPN6*, and *SIGIRR* were evaluated by real-time PCR relative quantification. *CXCL10* = chemokine (C-X-C motif) ligand 10; *HSP70* = heat shock protein 70; *IFNAR1* and *IFNAR2* = interferon receptors 1 and 2, respectively; *IFNB1* = interferon beta; *IKK ϵ* = inhibitor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells, kinase epsilon; *IL1B* = interleukin 1 beta; *IRAK1-4* = interleukin-1 receptor-associated kinases 1–4; *IRF9* = interferon regulatory factor 9; *ISGF3* = interferon-stimulated gene factor 3; *ISRE* = interferon-stimulated responsive genes; *MAL* = T-cell differentiation protein; *MYD88* = myeloid differentiation primary response (88); *NF- κ B* = nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells 1; *PTPN6* and *PTPN11* = protein tyrosine phosphatases, nonreceptor types 6 and 11, respectively; *RIPK3* = receptor-interacting serine-threonine kinase 3; *SARM1* = sterile alpha and TIR-containing motif 1; *SIGIRR* = single immunoglobulin and TIR domain; *SIKE* = suppressor of *IKBKE1*; *STAT1* and *STAT2* = signal transducers and activators of transcription 1 and 2, respectively; *TBK1* = TANK-binding kinase 1; *TICAM1* = Toll-like receptor adaptor molecule 1; *TIR* = toll-interleukin 1 receptor; *TLR2* and *TLR4* = Toll-like receptors 2 and 4, respectively; *TNF* = tumor necrosis factor; *TRAM* = translocation associated membrane protein 1; *TYK2* = tyrosine kinase 2.

($r = -0.40$, $p = 0.0004$) (Table 2). Following stratification of the MS group into different response phenotypes, none of the correlations reached the threshold for statistical significance after Bonferroni correction (see Table 2).

Taking into account the differences observed in TLR4 expression between MS patients and controls, and the significant association obtained between TLR4 expression and EDSS scores in the MS group, we aimed to further investigate the role of TLR4 in the disease by inducing experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE) in mice deficient for TLR4. As shown in Supplementary Figure 1A, both TLR4-deficient and wild-type mice developed EAE and no significant differences in the disease onset or clinical severity were

observed between the two groups. Histopathology revealed similar degrees of inflammation and demyelination in TLR4 deficient and wild-type mice, and T cell proliferative responses did not differ between groups (Supporting Fig 1B, C).

TLR4 Expression Is Induced by IFN β Treatment in Responders and Nonresponders to Treatment

We next evaluated the effect of IFN β on TLR4 expression by monocytes after 12 months of treatment. As shown in Figure 2C, IFN β treatment was associated with a strong induction in TLR4 expression in the whole MS group ($p = 4.3 \times 10^{-5}$). However, this effect was similarly

TABLE 1: Demographic and Baseline Clinical and Radiological Characteristics of MS Patients and Healthy Controls Included in the Study

Baseline Characteristics	HC	MS ^a	<i>p</i> ^b	R	IR	NR	<i>p</i> ^c
n	32	85	—	49	18	18	—
Age (yr)	33.9 (9.9)	34.3 (8.3)	0.814	33.7 (7.8)	33.8 (8.4)	36.3 (9.6)	0.514
Female/male (% women)	26/6 (81.3)	66/19 (77.6)	0.672	36/13 (73.5)	14/4 (77.8)	16/2 (88.9)	0.406
Duration of disease (yr)	—	4.3 (4.4)	—	3.6 (3.7)	4.4 (4.6)	6.1 (5.8)	0.123
EDSS ^d	—	2.0 (1.5-2.5)	—	1.9 (1.5-2.5)	2.2 (1.5-2.6)	2.4 (1.9-3.5)	0.055
Number of relapses ^e	—	1.5 (0.7)	—	1.5 (0.8)	1.5 (0.7)	1.5 (0.5)	1.000
Number of Gd-enhancing lesions ^f	—	2.6 (5.3)	—	1.9 (3.3)	4.8 (9.0)	1.4 (1.9)	0.112
T2LL ^f	—	0.7 (0.7)	—	0.7 (0.7)	0.8 (0.9)	0.8 (0.7)	0.640
Type of IFN β , n (%)	—	—	—	—	—	—	—
IFN β 1a IM	—	25 (29.4)	—	14 (28.6)	6 (33.3)	5 (27.8)	—
IFN β 1b SC	—	24 (28.2)	—	13 (26.5)	4 (22.2)	7 (38.9)	0.815
IFN β 1a SC	—	36 (42.4)	—	22 (44.9)	8 (44.4)	6 (33.3)	—

Data are expressed as mean (standard deviation) unless otherwise stated.

^aRefers to the whole MS group.

^bRefers to *p* values obtained following comparisons between the whole MS group and healthy controls by means of Student *t* test (age) and chi-square test (gender).

^cRefers to *p* values obtained following comparisons between responders, intermediate responders, and nonresponders by means of an ANOVA test (age, duration, EDSS, number of relapses, number of Gd-enhancing lesions, and T2LL) and chi-square test (gender and type of IFN β).

^dData are expressed as mean (interquartile range).

^eRefers to the number of relapses in the 2 previous years.

^fMRI data were available for 72 patients, 47 responders, 18 intermediate responders, and 7 nonresponders.

ANOVA = analysis of variance; EDSS = Expanded Disability Status Scale; HC = healthy controls; IFN β = interferon beta; IM = intramuscular; IR = intermediate responders to IFN β ; MRI = magnetic resonance imaging; MS = multiple sclerosis; NR = nonresponders to IFN β ; R = responders to IFN β ; SC = subcutaneous; T2LL = T2 lesion load expressed as percentage of total brain content.

observed in all treated patients, and reached statistical significance for responders ($p = 0.019$) and intermediate responders ($p = 0.001$). Although TLR4 expression was also induced by IFN β treatment in nonresponders, the difference did not reach statistical significance ($p = 0.091$; see Fig 2C).

The effect of IFN β was not specific for TLR4, as similar induction levels by IFN β were observed for TLR2 in the whole MS group ($p = 2.0 \times 10^{-7}$) and in responders ($p = 0.001$), intermediate responders ($p = 0.001$), and nonresponders ($p = 0.018$) (see Fig 2C).

Baseline Endogenous IFN β Expression Levels Are Increased in Patients Who Will Show a Lack of Response to Treatment

Following, we measured the baseline levels of several components of the TLR4 pathway in MS patients strati-

fied by the clinical response to IFN β treatment and controls. First, serum levels of HSP70, a ligand for TLR4, were measured by an enzyme immunoassay and found to be similar between the different groups ($p > 0.05$ for all group comparisons; Fig 3A).

Next, we determined the mRNA expression levels of TLR4 downstream molecules by real-time PCR absolute quantification. Expression levels of the genes coding for the adaptor proteins MYD88 and TICAM1 were comparable between controls, responders, intermediate responders, and nonresponders ($p > 0.05$; see Fig 3B, C). However, expression levels of *IFN β 1* and *IL1B*, genes induced through MYD88-independent and MYD88-dependent pathways, respectively, were significantly higher in IFN β nonresponders compared with responders (*IFN β 1*: $p = 0.005$; *IL1B*: $p = 0.019$) and intermediate

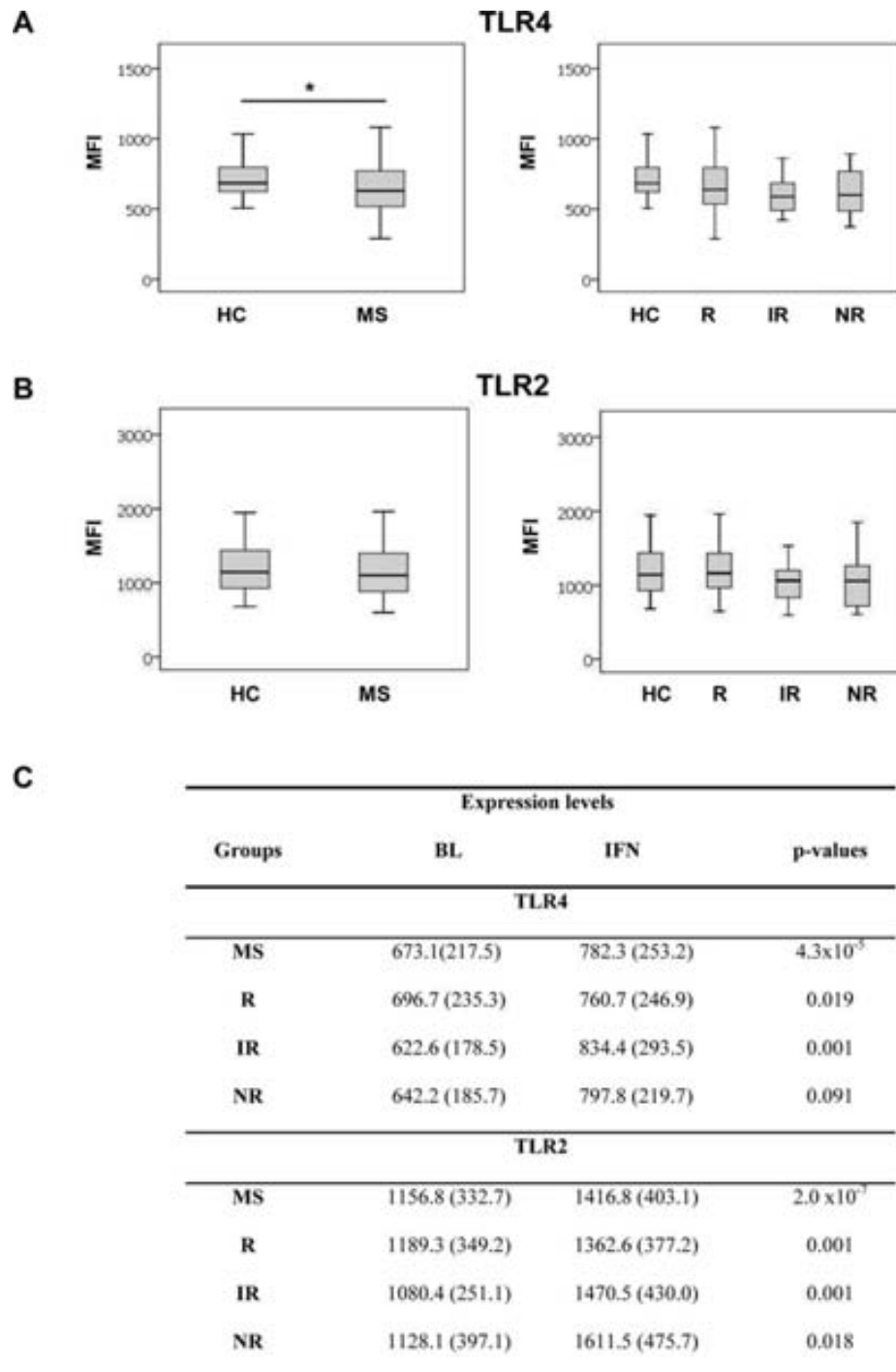


FIGURE 2: Baseline and IFN β -induced TLR4 and TLR2 expression levels in CD14 $^{+}$ monocytes from MS patients classified by their response to IFN β treatment and healthy controls. Box plots showing (A) TLR4 and (B) TLR2 expression in monocytes at baseline in the whole MS group, patients with different response phenotypes and healthy controls. TLR4 and TLR2 expression in CD14 $^{+}$ cells was determined by flow cytometry, as described in Patients and Methods. Monocytic TLR4 expression is decreased in MS patients compared with healthy controls ($*p = 0.019$). (C) Table showing changes in TLR4 and TLR2 expression induced by IFN β after 12 months of treatment. Data are expressed as mean values (standard deviation) of MFI levels. BL = baseline; HC = healthy controls ($n = 32$); IFN = 1-year interferon beta (IFN β) treatment; IR = intermediate responders to IFN β ($n = 18$); MFI = median fluorescence intensity; MS = whole multiple sclerosis (MS) group ($n = 71$); NR = nonresponders to IFN β ($n = 8$); R = responders to IFN β ($n = 45$); TLR = Toll-like receptor.

responders (*IFNB1*: $p = 0.033$; *IL1B*: $p = 0.014$; see Fig 3B, C), and differences reached marginal significance when compared with controls ($p = 0.05$ for both genes). Interest-

ingly, intermediate responders were also characterized by elevated *IFNB1* expression levels, and differences became significant when compared with responders ($p = 0.033$; see

TABLE 2: Summary of Correlations between Clinical and Radiological Variables and Expression Levels of TLR4, TLR2, and IFNAR1 at Baseline

Characteristics	MS	R	IR	NR
TLR4				
Duration of disease	-0.22 (0.062)	-0.18 (0.228)	-0.36 (0.143)	-0.15 (0.729)
EDSS	-0.40 (0.0004)	-0.36 (0.013)	-0.34 (0.173)	-0.49 (0.217)
Number of relapses in the 2 previous years	-0.04 (0.724)	-0.06 (0.700)	0.11 (0.658)	0.00 (1.000)
Number of Gd-enhancing lesions	0.06 (0.652)	-0.00 (0.994)	0.08 (0.744)	0.51 (0.247)
T2LL	-0.25 (0.034)	-0.19 (0.210)	-0.32 (0.200)	-0.07 (0.879)
TLR2				
Duration of disease	-0.01 (0.906)	-0.12 (0.440)	0.17 (0.513)	0.24 (0.560)
EDSS	-0.21 (0.072)	-0.26 (0.077)	0.12 (0.623)	-0.15 (0.728)
Number of relapses in the 2 previous years	-0.12 (0.303)	-0.01 (0.929)	-0.35 (0.154)	-0.22 (0.604)
Number of Gd-enhancing lesions	0.01 (0.921)	0.04 (0.775)	-0.16 (0.530)	0.24 (0.599)
T2LL	-0.21 (0.085)	-0.24 (0.115)	-0.10 (0.693)	-0.14 (0.760)
IFNAR1				
Duration of disease	0.12 (0.323)	0.12 (0.429)	0.12 (0.628)	0.17 (0.686)
EDSS	0.17 (0.168)	0.17 (0.278)	-0.07 (0.778)	-0.76 (0.028)
Number of relapses in the 2 previous years	-0.01 (0.951)	0.06 (0.701)	-0.26 (0.296)	-0.11 (0.797)
Number of Gd-enhancing lesions	-0.02 (0.862)	-0.04 (0.787)	0.06 (0.823)	0.11 (0.811)
T2LL	0.21 (0.088)	0.22 (0.144)	0.28 (0.261)	-0.43 (0.337)

Data are expressed as Spearman correlation coefficients: r (p values). Bold values indicate statistically significant correlations following Bonferroni correction.
EDSS = Expanded Disability Status Scale; IFN = interferon; IR = intermediate responders to IFN β ; MS = whole multiple sclerosis (MS) group; NR = nonresponders to IFN β ; R = responders to IFN β ; T2LL = T2 lesion load.

Fig 3C). For CXCL10, trends toward increased expression levels were observed in nonresponders and intermediate responders when compared with responders ($p = 0.075$ and $p = 0.090$, respectively; see Fig 3C). No significant differences between groups were observed for *TNF*.

IFNAR1 Expression in Monocytes Is Elevated at Baseline in MS Patients and Nonresponders to Treatment

We next explored the implication of the type I IFN signaling pathway in the disease and the response to IFN β by measuring IFNAR1 expression at baseline in monocytes from patients and controls. As depicted in Figure 4A, IFNAR1 expression in monocytes was significantly higher in the whole MS group compared with controls ($p = 0.039$). Comparison of IFNAR1 expression in MS patients further stratified based on their response to IFN β treatment revealed significantly higher IFNAR1

expression in nonresponders when compared with responders and controls ($p = 0.003$ and $p = 0.002$, respectively; see Fig 4A). Of note, patients classified as intermediate responders were also characterized by increased IFNAR1 expression in monocytes, and differences were statistically significant when compared with controls ($p = 0.028$). A trend toward increased IFNAR1 expression was also observed in intermediate responders compared with responders ($p = 0.086$).

No significant correlations were observed between baseline clinical and radiological variables and IFNAR1 expression in the whole MS group or in patients stratified by the IFN β response phenotype (see Table 2).

IFN β Induction Is Altered in Nonresponders to Treatment

We next aimed to investigate the effect of exogenous IFN β on the type I IFN pathway of responders and

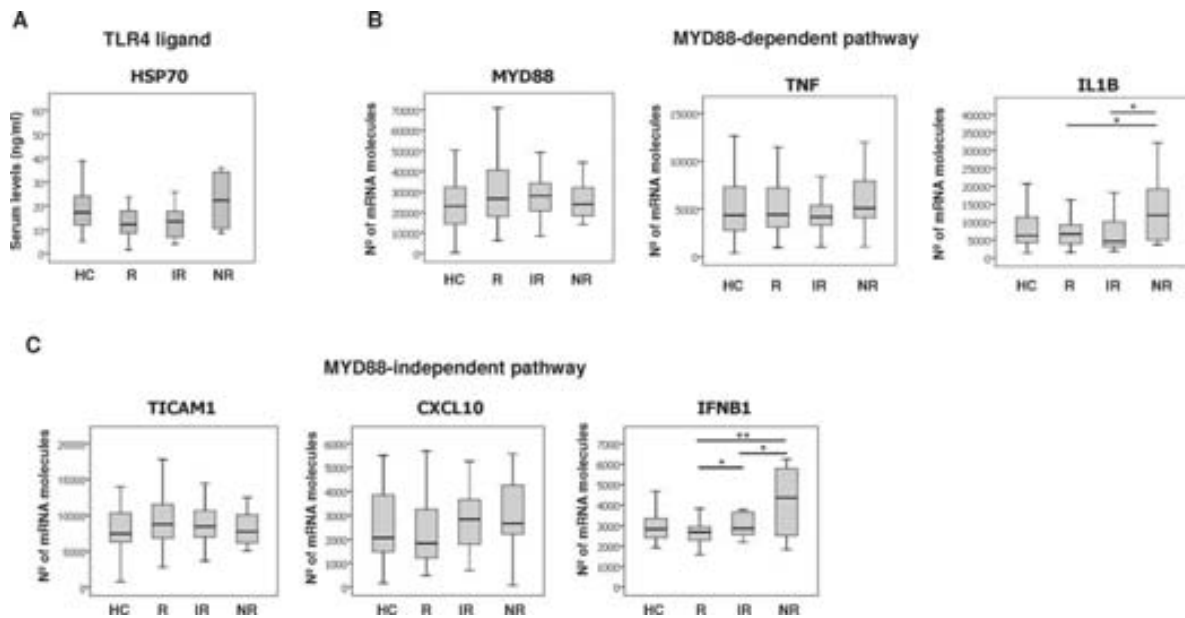


FIGURE 3: Baseline levels of HSP70 and TLR4 downstream genes in MS patients with different response phenotypes and healthy controls. Box plots showing (A) serum levels of the TLR4 ligand HSP70 and (B) expression levels of MYD88-dependent and (C) MYD88-independent TLR4 downstream genes. As described in Patients and Methods, serum levels of HSP70 were determined by ELISA and represented as ng/ml. Expression levels of TLR4 downstream genes were determined by real-time PCR absolute quantification and results expressed as number of mRNA molecules. *IL1B* expression is increased in nonresponders compared with responders ($*p = 0.019$) and intermediate responders ($*p = 0.014$). *IFNB1* expression is elevated in nonresponders compared with responders ($**p = 0.005$) and intermediate responders ($*p = 0.033$), and in intermediate responders compared with responders ($*p = 0.033$). ELISA = enzyme-linked immunosorbent assay; HSP70 = heat shock protein 70; *IFNB1* = interferon, beta 1, fibroblast; *IL1B* = interleukin 1 beta; IR = intermediate responders to IFN β ($n = 18$); mRNA = messenger RNA; MYD88 = myeloid differentiation primary response gene 88; NR = nonresponders to IFN β ($n = 18$); HC = healthy controls ($n = 32$); PCR = polymerase chain reaction; R = responders to IFN β ($n = 49$); TLR = Toll-like receptor.

nonresponders to treatment by evaluating both the changes in IFNAR1 expression induced by IFN β after 12 months of treatment and the ability of IFN β to induce its own expression. As depicted in Figure 4B, ex vivo determination of IFNAR1 expression in monocytes before and after 12 months of IFN β treatment did not reveal significant differences in the whole MS group or in patients stratified by the response to treatment. However, a lack of significant induction of IFN β was observed in baseline PBMC from nonresponders after in vitro culture with IFN β for 24 hours (magnitude of median increase [Δ] = 1.9; $p = 0.172$; see Fig 4C). In responders, IFN β resulted in a significant induction of its own expression ($\Delta = 5.4$; $p = 0.024$), whereas in controls the addition of IFN β was associated with induction ratios that were in between responders and nonresponders ($\Delta = 3.4$; $p = 0.084$) (see Fig 4C).

Expression Levels of IRAK3, a Negative Regulator of TLR4 Signaling, Are Decreased in IFN β Responders

As a next step, the findings of an increased expression of IFNAR1 and TLR4 downstream genes such as *IFNB1*, *IL1B*, and *CXCL10* in nonresponders prompted us to

investigate the expression levels of genes involved in the regulation of the TLR4 and the type I IFN pathways. Figure 5 depicts the Ct values obtained for these genes, which are inversely related to quantity. Expression levels of *IRAK3* in responders were lower than in nonresponders and controls, and differences reached statistical significance when compared with nonresponders ($p = 0.002$), and a trend was observed when compared with controls ($p = 0.011$). Based on this finding, *IRAK3* expression was also determined in a group of intermediate responders ($n = 16$), and levels were found to be similar to the responder group (data not shown).

No statistically significant differences were observed between groups in the expression levels of *TYK2*, *PTPN6*, *PTPN11*, *SARM1*, *SIKE*, *SIGIRR*, and *RIPK3* (Fig 5).

Discussion

In a previous study by our group we reported that PBMC, most likely monocytes, from a subgroup of IFN β nonresponders were characterized by overexpression of type I IFN responsive genes at baseline.⁵ However, it was unknown whether this lack of response was due to alterations in the pathways through which IFN β

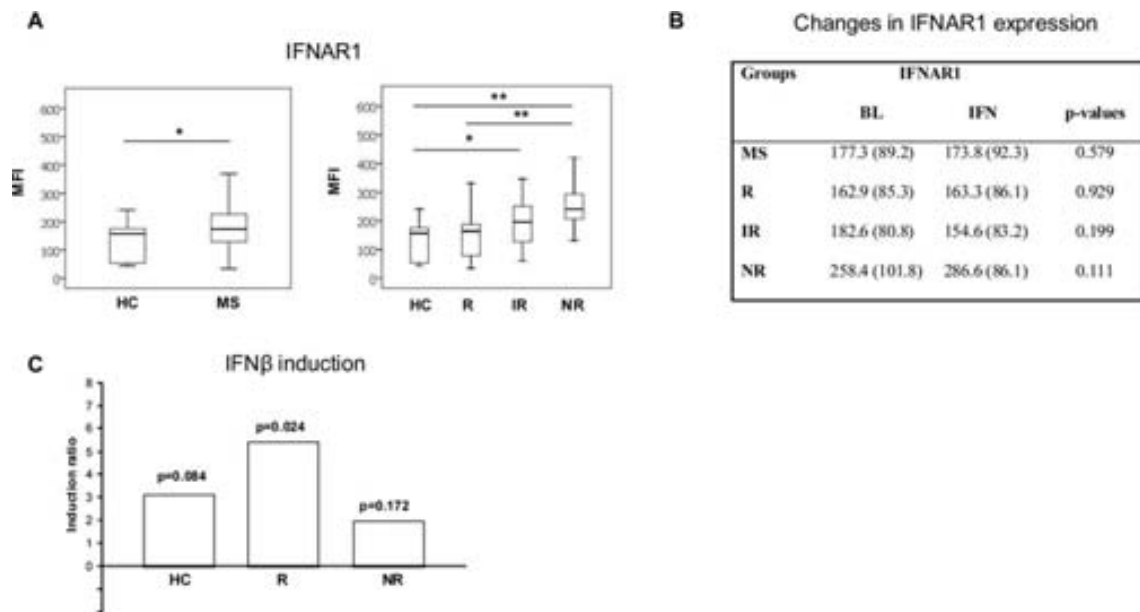


FIGURE 4: Comparison of baseline and IFN β -induced IFNAR1 expression in monocytes and IFNB1 expression levels after in vitro exposure to IFN β in MS patients stratified by their response to treatment and healthy controls. (A) Box plots showing IFNAR1 expression in CD14+ monocytes from MS patients and healthy controls. Determination of IFNAR1 expression was performed by flow cytometry, as described in Patients and Methods. IFNAR1 expression is increased in the whole MS group compared with controls (* $p = 0.039$; left). In patients classified by their response to IFN β (right), IFNAR1 expression is elevated in nonresponders vs responders and controls (** $p = 0.003$ and $p = 0.002$, respectively), and in intermediate responders compared with controls (* $p = 0.028$). Results are expressed as MFI. Analysis was also performed with the percentage of CD14+ cells expressing IFNAR1 and resulted in similar differences (data not shown). HC ($n = 32$); IR ($n = 18$); MS group ($n = 71$); R ($n = 45$); NR ($n = 8$). (B) Table showing changes in IFNAR1 expression induced by IFN β after 12 months of treatment. Data are expressed as mean values (standard deviation) of MFI levels. IR ($n = 15$); MS ($n = 60$); NR ($n = 6$); R ($n = 39$). (C) Bars represent induction ratios of IFNB1 expression in PBMC after in vitro addition of IFN β -1b (100IU/ml) for 24 hours. Induction ratios were calculated as the quotient of median number of IFNB1 mRNA molecules obtained in PBMC cultured in the presence (numerator) or absence (denominator) of IFN β -1b. IFNB1 expression was determined by real-time PCR absolute quantification. HC ($n = 4$); R: responders ($n = 5$); NR ($n = 5$). BL = baseline; HC = healthy controls; IFN = 1-year interferon β treatment; IFNAR1 = IFN receptor 1; IFNB1 = interferon, beta 1, fibroblast; IR = intermediate responders to IFN β ; MFI = median fluorescence intensity; mRNA = messenger RNA; MS = multiple sclerosis; NR = nonresponders to IFN β ; PBMC = peripheral blood mononuclear cells; PCR = polymerase chain reaction; R = responders to IFN β .

exerts its effects, such as the type I IFN pathway or related pathways, or was a consequence of higher disease activity in nonresponders. In the present study, we aimed to explore the implication of the TLR4 signaling pathway, which is in close relationship with the type I IFN pathway,¹¹ in MS disease activity and the response to IFN β .

Despite the finding of lower TLR4 expression in monocytes from MS patients at baseline compared with controls and the significant negative correlation observed between TLR4 expression and EDSS scores, its lack of association with other clinical and radiological variables of disease activity together with the presence of similar EAE disease courses in wild-type and TLR4-deficient mice do not further support a role of TLR4 in MS disease activity. Previous EAE studies in TLR4-deficient mice have resulted in discordant results.^{14,15}

A major finding that emerged from the investigation of the TLR4 pathway in the response to IFN β was the presence of an increased baseline expression of en-

dogenous IFN β in patients who will show a lack of response to treatment. This finding is in agreement with a previous study by our group,⁵ in which type I IFN bioactivity measured in baseline serum samples was found to be elevated in nonresponders compared with responders, and may explain both the overexpression of type I IFN responsive genes reported in nonresponders in the previous study and the increased expression levels of other TLR4 downstream genes such as *IL1B* and *CXCL10* observed for nonresponders in the present study. This finding is also in agreement with a recent publication by Axtell and colleagues¹⁶ in which the authors reported the presence of increased serum IFN β levels in a subgroup of IFN β nonresponders.

It is worth mentioning that the increase observed in endogenous IFN β expression levels and monocytic IFNAR1 expression, while more prominent, was not restricted to the subgroup of patients classified as IFN β nonresponders based on stringent clinical criteria that

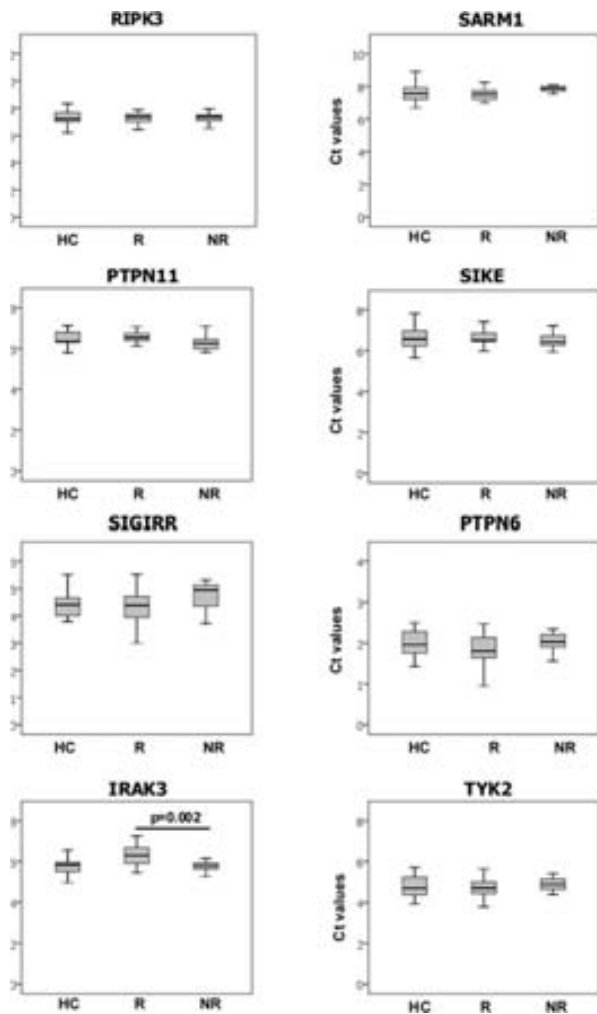


FIGURE 5: Comparison of baseline gene expression levels of key regulators of TLR4 and type I IFN pathways in MS patients stratified based on the response to IFN β treatment and healthy controls. mRNA expression levels for each gene were determined by real-time RT-PCR relative quantification, as described in Patients and Methods. *IRAK3* expression is deficient in R compared with NR ($p = 0.002$). The y-axis represents the Ct values obtained for each individual after *GAPDH* subtraction (Δ Ct values). Ct is inversely related to quantity, and higher Ct values are indicative of lower mRNA expression levels. HC (n = 18); NR (n = 18); R (n = 18). Ct = threshold cycle; *GAPDH* = glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase; HC = healthy controls; IFN = interferon; *IRAK3* = interleukin-1 receptor-associated kinase 3; mRNA = messenger RNA; MS = multiple sclerosis; NR = nonresponders to IFN β ; R = responders to IFN β ; RT-PCR = reverse transcription polymerase chain reaction; TLR = Toll-like receptor.

required both the presence of relapses and progression on neurological disability. In this regard, increased IFN β and IFNAR1 expression was also a feature of patients labeled as IFN β intermediate responders according to less stringent criteria that included either the presence of relapses or progression on neurological disability. Inasmuch as a large proportion of patients showing lack of

response to IFN β fall into this intermediate response phenotype, findings such as those mentioned above in these patients may have significant relevance to clinical practice. However, it should be emphasized that no consensus on the definition of lack of response to IFN β treatment has been reached yet, and the definitions that were used in the present study to classify patients into responders, nonresponders, and intermediate responders were based on data from previous studies by our group using response criteria that were validated by a long-term follow-up.^{4,12}

In the present study, the finding of high endogenous IFN β expression levels in nonresponders may have different origins and do not suggest per se an involvement of the TLR4 pathway in the response to IFN β . Supporting this notion, expression levels of TLR4 upstream molecules such as *MYD88* and *TICAM1*, expression of the membrane receptor itself, and serum levels of HSP70, a TLR4 ligand, were comparable between the different IFN β response phenotypes and healthy controls. However, investigation of the expression levels of key regulators of the TLR4 signaling pathway revealed an interesting finding in relation to *IRAK3* that points to an implication of this pathway in the response to treatment. *IRAK3* was found to be significantly differentially expressed between IFN β responders and nonresponders. Much to our surprise, the defect in *IRAK3* expression appeared to be present in IFN β responders, as *IRAK3* expression levels were similar between nonresponders and healthy controls and they clearly differed from the levels found in responders. *IRAK3*, also known as *IRAKM*, is primarily expressed in monocytes and macrophages¹⁷ and functions as a negative regulator of TLR signaling.¹⁸

IRAK3 expression is induced by lipopolysaccharide (LPS) and inhibits the dissociation of *IRAK1* and *IRAK4* from *MYD88* and thus the formation of *IRAK1*-*TRAF6* (TNF-receptor-associated factor 6) complexes, which are necessary for downstream signaling and nuclear factor (NF)- κ B activation.¹⁸ Based on our expression findings, the inhibitory effect of *IRAK3* on the TLR4 *MYD88*-dependent pathway should be diminished and, as a result, the production of proinflammatory cytokines upon TLR4 stimulation increased in responders compared with nonresponders. Interestingly, it has been shown that *IRAK1* is required for the induction of proinflammatory cytokines, but is somewhat inhibitory for the induction of type I IFNs.¹⁹ These observations stem from studies with *SHP1* (*PTPN6*), another negative regulator of TLR signaling acting on *IRAK1*, in which *SHP1* inhibits NF- κ B activation but in addition boosts the production of type I IFNs.^{19,20}

Of note, the restricted expression of *IRAK3* to the monocytes/macrophage lineage is in line with previous observations from our group pointing to a selective alteration of the type I IFN pathway in monocytes from IFN β nonresponders.⁵ One of the major findings derived from the investigation of the type I IFN signaling pathway in the response to IFN β treatment was the increase expression of IFNAR1 observed in monocytes from nonresponders at baseline, which was already reported by our group and somehow validates our previous findings,⁵ since the present study was conducted in an independent cohort of IFN β -treated patients. Interestingly, similar to the results in IFN β expression the elevated IFNAR1 expression was also observed in MS patients with intermediate response phenotypes, suggesting that the molecular mechanisms underlying IFN β treatment failure are the same for all MS patients showing a lack of response to IFN β regardless of the stringency of the criteria used to classify patients.

While most of the determinations were performed in PBMC from responders and nonresponders collected at baseline, similar *ex vivo* studies in patients following 12 months of treatment revealed either strong inductions of TLR4 and TLR2 expression or a lack of significant induction of IFNAR1 expression by IFN β . However, all MS patients responded similarly to IFN β in terms of changes in TLR4, TLR2, and IFNAR1 expression induced by treatment regardless of their response phenotypes. Of note, when PBMC from MS patients were challenged to induce IFN β by the *in vitro* exposure to IFN β , the capacity of IFN β to induce its own expression was clearly deficient in cells from nonresponders compared with responders, which suggests that in patients receiving exogenous IFN β the presence of high baseline endogenous IFN β levels may result in an attenuation of the intracellular pathways amplifying IFN β signaling and, consequently, in a decrease induction of IFN β -responsive genes by exogenous IFN β .

One matter that deserves further discussion is the “behavior” of healthy controls as comparison group for the findings observed in responders and nonresponders. For some determinations, findings in healthy controls appear to be closer to nonresponders than responders. One such example is *IRAK3* expression in healthy controls, which was found to be similar to nonresponders. However, contrary to nonresponders, PBMC from controls were not characterized by elevated expression levels of TLR4 downstream genes or IFNAR1 expression in monocytes. While *IRAK3* findings may be playing a role in the response to IFN β , other molecular mechanisms must be operating to explain the increased production of type I IFNs and altered monocytic type I IFN pathway observed in nonresponders vs responders but not vs healthy controls.

To summarize, PBMC from MS patients who will show a lack of response to IFN β are characterized by an increased endogenous IFN β expression at baseline compared with responders, which may explain the type I IFN signature reported in a previous study in a subgroup of IFN β nonresponders. Furthermore, the differences in the expression levels observed for *IRAK3* and IFNAR1 between responders and nonresponders provide compelling evidence of the involvement of the TLR4 and type I IFN signaling pathways in the response to IFN β , and point to monocytes as the main players in determining the response outcome of MS patients who will receive treatment with IFN β .

Acknowledgments

This research was supported by grants from the Red Española de Esclerosis Múltiple (REEM), Fondo de Investigación Sanitaria (FIS), Ministry of Science and Innovation, Spain; Ajuts per donar Suport als Grups de Recerca de Catalunya, Agència de Gestió d'Ajuts Universitaris i de Recerca (AGAUR), Generalitat de Catalunya, Spain (SGR 2009-0793); the Miguel Servet, FIS, Ministry of Science and Innovation, Spain (CP07/00146 to C.E.).

Potential Conflict of Interest

M.C. has consulted for Bayer Schering Pharma, Biogen Idec, Merck Serono, and Teva Pharmaceuticals; and has received payment for lectures including service on speakers bureaus for Bayer Schering Pharma, Merck Serono, Teva Pharmaceuticals, Novartis. X.M. received support for travel to meetings for the study or other purposes from NMSS; has consulted for Bayer Schering Pharma, Biogen Idec, EMD Merck Serono, Genentech, Genzyme, Novartis, Sanofi-Aventis, Teva Pharmaceuticals and Almirall; has grants/grants pending from Bayer Schering Pharma, Biogen Idec, EMD Merck Serono, Genentech, Genzyme, Novartis, Sanofi-Aventis, Teva Pharmaceuticals and Almirall; and has received payment for lectures including service on speakers bureaus from Bayer Schering Pharma, Biogen Idec, EMD Merck Serono, Genentech, Genzyme, Novartis, Sanofi-Aventis, Teva Pharmaceuticals and Almirall.

References

1. The Interferon β Multiple Sclerosis Study Group. Interferon beta-1b is effective in relapsing-remitting multiple sclerosis. I. Clinical results of a multicenter, randomized, double-blind, placebo-controlled trial. *Neurology* 1993;43:655–661.
2. Jacobs LD, Cookfair DL, Rudick RA, et al. Intramuscular interferon beta-1a for disease progression in relapsing multiple sclerosis. The Multiple Sclerosis Collaborative Research Group (MSCRG). *Ann Neurol* 1996;39:285–294.

3. PRISMS (Prevention of Relapses and Disability by Interferon beta-1a Subcutaneously in Multiple Sclerosis) Study Group. Randomised double-blind placebo-controlled study of interferon beta-1a in relapsing/remitting multiple sclerosis. *Lancet* 1998;352:1498–1504.
4. Rio J, Nos C, Tintoré M, et al. Assessment of different treatment failure criteria in a cohort of relapsing-remitting multiple sclerosis patients treated with interferon beta: implications for clinical trials. *Ann Neurol* 2002;52:400–406.
5. Comabella M, Lünemann JD, Rio J, et al. A type I interferon signature in monocytes is associated with poor response to interferon- β in multiple sclerosis. *Brain* 2009;132:3353–3365.
6. Takeda K, Akira S. Roles of Toll-like receptors in innate immune responses. *Genes Cells* 2001;6:733–742.
7. Uematsu S, Akira S. Toll-like receptors and innate immunity. *J Mol Med* 2006;84:712–725.
8. Akira S. TLR signaling. *Curr Top Microbiol Immunol* 2006;311:1–16.
9. Yang QW, Li JC, Lu FL, et al. Upregulated expression of toll-like receptor 4 in monocytes correlates with severity of acute cerebral infarction. *J Cereb Blood Flow Metab* 2008;28:1588–1596.
10. Devaraj S, Jialal I, Yun JM, Bremer A. Demonstration of increased toll-like receptor 2 and toll-like receptor 4 expression in monocytes of type 1 diabetes mellitus patients with microvascular complications. *Metabolism* 2011;60:256–259.
11. Rothlin CV, Ghosh S, Zuniga EI, et al. MB, Lemke G. TAM receptors are pleiotropic inhibitors of the innate immune response. *Cell* 2007;131:1124–1136.
12. Rio J, Nos C, Tintoré M, et al. Defining the response to interferon-beta in relapsing-remitting multiple sclerosis patients. *Ann Neurol* 2006;59:344–352.
13. Byun E, Caillier SJ, Montalban X, et al. Genome-wide pharmacogenomic analysis of the response to interferon beta therapy in multiple sclerosis. *Arch Neurol* 2008;65:337–344.
14. Kerfoot SM, Long EM, Hickey MJ, et al. TLR4 contributes to disease-inducing mechanisms resulting in central nervous system autoimmune disease. *J Immunol* 2004;173:7070–7077.
15. Marta M, Andersson A, Isaksson M, et al. Unexpected regulatory roles of TLR4 and TLR9 in experimental autoimmune encephalomyelitis. *Eur J Immunol* 2008;38:565–575.
16. Axtell RC, de Jong BA, Boniface K, et al. T helper type 1 and 17 cells determine efficacy of interferon-beta in multiple sclerosis and experimental encephalomyelitis. *Nat Med* 2010;16:406–412.
17. Wesche H, Gao X, Li X, et al. IRAK-M is a novel member of the Pelle/interleukin-1 receptor-associated kinase (IRAK) family. *J Biol Chem* 1999;274:19403–19410.
18. Kobayashi K, Hernandez LD, Galán JE, et al. IRAK-M is a negative regulator of Toll-like receptor signaling. *Cell* 2002;110:191–202.
19. An H, Hou J, Zhou J, et al. Phosphatase SHP-1 promotes TLR- and RIG-I-activated production of type I interferon by inhibiting the kinase IRAK1. *Nat Immunol* 2008;9:542–550.
20. O'Neill LA. "Fine tuning" TLR signaling. *Nat Immunol* 2008;9:459–461.

Baseline Gene Expression Signatures in Monocytes from Multiple Sclerosis Patients Treated with Interferon-beta

Marta F. Bustamante, Ramil N. Nurtdinov, Jordi Río, Xavier Montalban, Manuel Comabella*

Servei de Neurologia/Neuroimmunologia. Centre d'Esclerosi Múltiple de Catalunya, Cemcat. Hospital Universitari Vall d'Hebron (HUVH), Barcelona, Spain

Abstract

Background: A relatively large proportion of relapsing-remitting multiple sclerosis (RRMS) patients do not respond to interferon-beta (IFN β) treatment. In previous studies with peripheral blood mononuclear cells (PBMC), we identified a subgroup of IFN β non-responders that was characterized by a baseline over-expression of type I IFN inducible genes. Additional mechanistic experiments carried out in IFN β non-responders suggested a selective alteration of the type I IFN signaling pathway in the population of blood monocytes. Here, we aimed (i) to investigate whether the type I IFN signaling pathway is up-regulated in isolated monocytes from IFN β non-responders at baseline; and (ii) to search for additional biological pathways in this cell population that may be implicated in the response to IFN β treatment.

Methods: Twenty RRMS patients classified according to their clinical response to IFN β treatment and 10 healthy controls were included in the study. Monocytes were purified from PBMC obtained before treatment by cell sorting and the gene expression profiling was determined with oligonucleotide microarrays.

Results and discussion: Purified monocytes from IFN β non-responders were characterized by an over-expression of type I IFN responsive genes, which confirms the type I IFN signature in monocytes suggested from previous studies. Other relevant signaling pathways that were up-regulated in IFN β non-responders were related with the mitochondrial function and processes such as protein synthesis and antigen presentation, and together with the type I IFN signaling pathway, may also be playing roles in the response to IFN β .

Citation: Bustamante MF, Nurtdinov RN, Río J, Montalban X, Comabella M (2013) Baseline Gene Expression Signatures in Monocytes from Multiple Sclerosis Patients Treated with Interferon-beta. PLoS ONE 8(4): e60994. doi:10.1371/journal.pone.0060994

Editor: Lionel G. Filion, University of Ottawa, Canada

Received: October 1, 2012; **Accepted:** March 5, 2013; **Published:** April 18, 2013

Copyright: © 2013 Bustamante et al. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Funding: 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, sponsored by the Agència de Gestió d'Ajuts Universitaris i de Recerca (AGAUR), Generalitat de Catalunya, Spain. The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

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

* E-mail: manuel.comabella@vhir.org

Introduction

Interferon-beta (IFN β), a first-line disease modifying therapy for relapsing-remitting multiple sclerosis (RRMS), has demonstrated beneficial effects on reducing clinical and radiological disease activity [1,2,3]. Nevertheless, a relatively important percentage of MS patients do not respond to IFN β [4]. Previous studies performed by our group revealed a baseline type I IFN signature in peripheral blood mononuclear cells (PBMC) from a subgroup of IFN β non-responders selected by stringent clinical response criteria after two years of treatment [5]. A type I IFN dysregulation has also been observed in hepatitis C patients who do not respond to IFN-alpha, another type I IFN [6]. Similar to the findings observed in MS non-responders to IFN β , hepatitis C non-responders present higher levels of type I IFN responsive genes such as *MX1*, *OAS1* and *STAT1* before treatment initiation [6]. Furthermore, an up-regulation of the type I IFN pathway has also been reported in other autoimmune disorders such as rheumatoid arthritis [7], systemic lupus erythematosus [8], and Sjögren's syndrome [9].

Additional mechanistic experiments conducted in RRMS patients treated with IFN β suggested a selective alteration of the

type I IFN signaling pathway in blood monocytes from IFN β non-responders based on the findings of an increased expression of the membrane IFN receptor 1 (IFNAR1) and intracellular STAT1 phosphorylation in CD14+ cells from this subgroup of patients [5]. In a later study [10], we observed that the baseline increased expression of IFNAR1 was also present in monocytes from IFN β non-responders selected according to less stringent response criteria (intermediate responders).

The biological relevance of the type I IFN pathway in monocytes and its relationship with MS pathogenesis and IFN β treatment has been underscored in recent studies [11,12]. Conditional genetic knockout of *ifnar1* in monocytes, but not in other cell subsets, led to enhanced disease severity in the animal model of MS, experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE) [11]. In another study, IFN β treatment in MS patients was found to induce a specific over-expression of the proapoptotic and IFN inducible gene *TRAIL* only in the monocyte and granulocyte populations among nine peripheral blood cell subsets investigated [12].

The purpose of the present study was (i) to investigate whether the type I IFN signature is observed in blood monocytes isolated from IFN β non-responders at baseline; and (ii) to identify

additional biological pathways in monocytes that may be playing relevant roles in the response to IFN β treatment.

Results

A total of 2241 genes were differentially expressed with p -values < 0.05 between IFN β responders and non-responders. Of these, 1024 genes were up-regulated and 1217 down-regulated in monocytes from IFN β non-responders (see Table S1). When applying a more strict p -value threshold of 0.01, 222 genes were up-regulated and 207 down-regulated. In order to identify relevant biological pathways in monocytes from IFN β responders and non-responders, differentially expressed genes with p -values < 0.01 were analyzed with the Ingenuity Pathway Analysis software.

The Type I interferon Signaling Pathway is Over-expressed at Baseline in Monocytes from IFN β Non-responders

As shown in Table 1, 5 canonical pathways were found to be up-regulated and 1 down-regulated with p -values < 0.01 in monocytes from IFN β non-responders versus responders. Less significant pathways are shown as Table S1.

The most differentially expressed canonical pathway corresponded to the type I interferon signaling pathway, which was up-regulated in monocytes from non-responders ($p = 0.0010$; Table 1). These results were further supported by the finding of STAT1, the main mediator of the signaling of IFNs, as one of the transcription factors that was over-expressed in monocytes from IFN β non-responders compared with responders (Table S1).

Figure 1A shows a heatmap representation of the type I IFN responsive genes that were significantly differentially expressed in monocytes from IFN β non-responders compared with responders. The vast majority of type I IFN responsive genes were over-expressed in IFN β non-responders when compared to responders. Interestingly, the expression pattern observed for these genes in monocytes from healthy controls was more similar to IFN β non-responders than to responders (Figure 1B).

Monocytes from IFN β Non-responders at Baseline are Characterized by an Over-expression of Mitochondria-related Genes

When exploring other biological pathways that could be playing roles in the response to IFN β , we observed that the second most differentially canonical pathway was mitochondrial dysfunction ($p = 0.0012$; Table 1), which was up-regulated in monocytes from IFN β non-responders.

As illustrated in the heatmap of Figure 2A, many of the differentially expressed genes belonged to different complexes of the mitochondrial respiratory chain and a high proportion of these genes (46 out of 59 genes) were significantly up-regulated in monocytes from non-responders. Again, the expression patterns observed for these genes in healthy controls were closer to IFN β non-responders than to responders (Figure 2B).

Other Biological Pathways in Monocytes Potentially Involved in the Response to IFN β

As shown in Table 1, other top canonical pathways that were differentially expressed in monocytes from responders and non-responders were the EIF2 signaling ($p = 0.0085$), regulation of eIF4 and p70S6K signaling ($p = 0.0022$), and protein ubiquitination ($p = 0.0014$) pathways, all of which were also up-regulated in monocytes from IFN β non-responders when compared to responders.

The identification of the eIF2 signaling and eIF4 and p70S6K signaling pathways suggest an implication of ribosomes in the response to IFN β . In fact, most of the significantly differentially expressed genes belonging to these pathways were related with the protein synthesis machinery or coded for structural constituents of ribosomes (Table S2). Thirty-nine of 51 differentially expressed genes were over-expressed in monocytes from IFN β non-responders compared with responders (Figure 3A).

Another pathway differentially expressed in monocytes from responders and non-responders to IFN β was protein ubiquitination. As shown in Table S2, genes included in this pathway were related to proteasome structure. Of note, these genes are components of the immunoproteasome but not of the common proteasome structure, and 39 out of 55 differentially expressed genes were found to be up-regulated in monocytes from IFN β non-responders compared with responders (Figure 4A).

For both ribosomal and immunoproteasomal pathways, gene expression signatures in monocytes from healthy controls were also closer to IFN β non-responders than to responders (Figures 3B and 4B).

Discussion

Several lines of evidence support an important role of monocytes in MS pathogenesis: (i) circulating monocytes from MS patients are more active and they are present in brain active lesions [13]; (ii) monocytes from MS patients secrete more quantity of hydrogen peroxide and superoxide [14] and express more proinflammatory cytokines (TNF α , IL1 β and IL6) during acute disease relapses upon stimulation [15]; (iii) MS patients have a higher percentage of monocytes secreting IL6 and IL12, and IL12-secreting monocytes are associated with higher disease activity when measured by magnetic resonance imaging [16]; (iv) non-classical type CD14+CD16+ (CCR5+) monocytes go through the blood brain barrier during acute phases of neuroinflammation [17].

A pharmacogenomic study from van Baarsen et al. reported negative significant correlations between baseline expression levels of type I IFN responsive genes and the biological

Table 1. Pathways classified by the Ingenuity Pathways Analysis software that were differentially expressed in monocytes between non-responders and responders to IFN β treatment ($p < 0.01$).

Top canonical pathways	P-values	Expression
Interferon signaling	0.001	Up-regulated
Mitochondrial Dysfunction	0.0012	Up-regulated
Protein Ubiquitination Pathway	0.0014	Up-regulated
Regulation of eIF4 and p70S6K Signaling	0.0022	Up-regulated
eIF2 Signaling	0.0085	Up-regulated
Molecular Mechanisms of Cancer	0.0079	Down-regulated

Up-regulated and down-regulated means that a higher percentage of genes of these pathways were up-regulated or down-regulated in non-responders versus responders.

doi:10.1371/journal.pone.0060994.t001

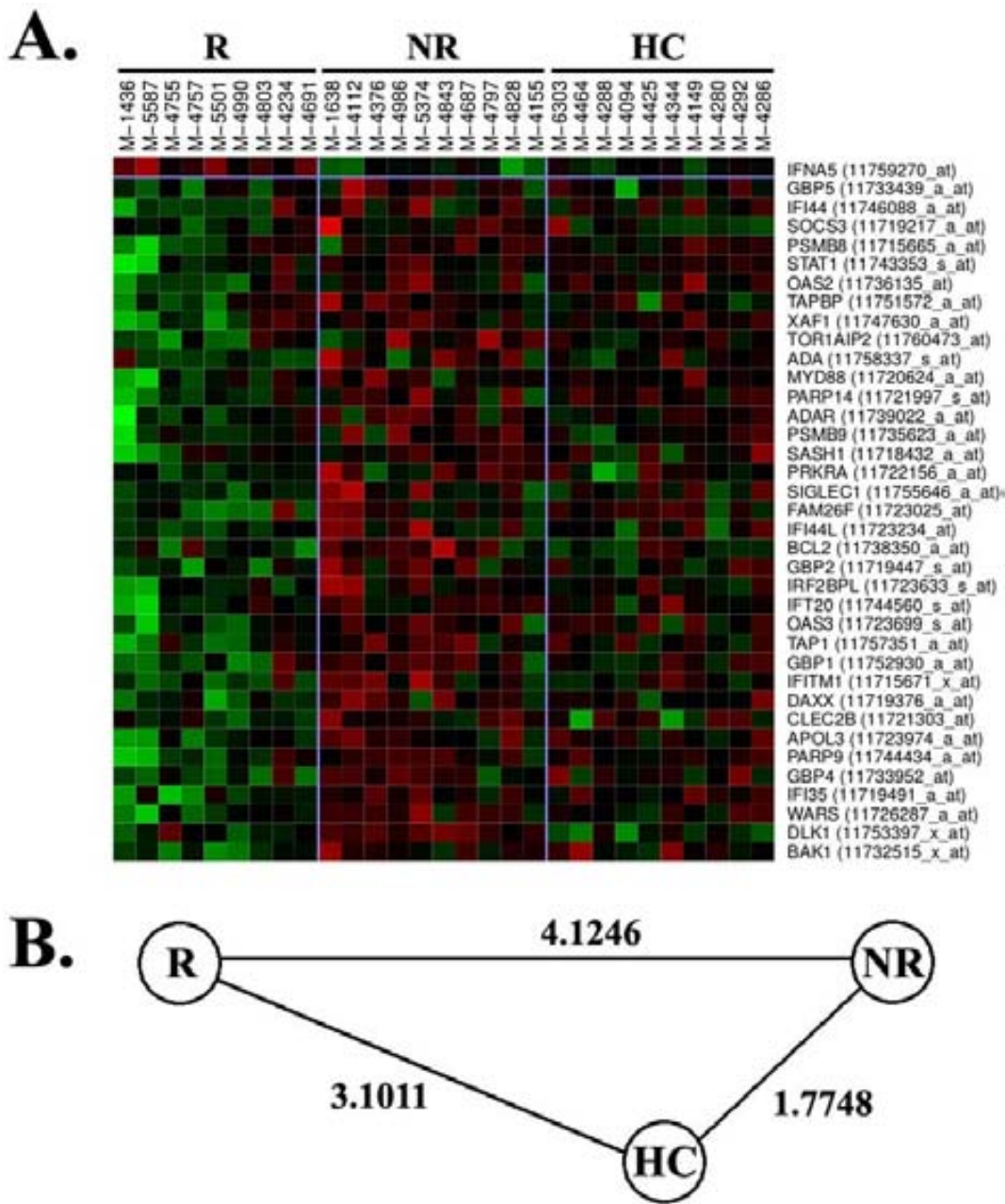


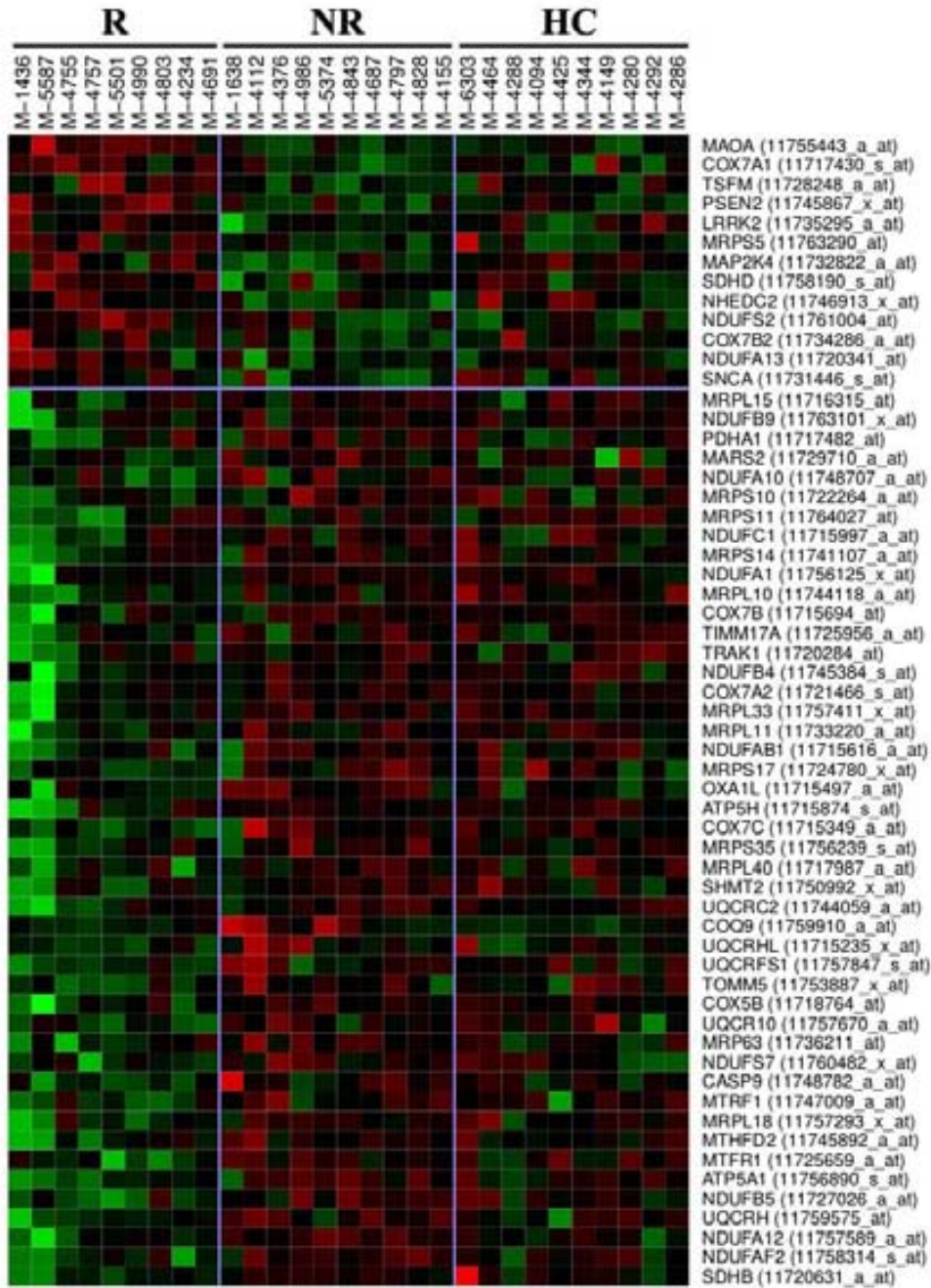
Figure 1. Heatmap illustration of type I IFN inducible genes. (A) The heatmap shows genes that belong to the type I IFN signaling pathway and were differentially expressed between IFN β responders and non-responders. Gene names and Affymetrix probe sets are shown on the right part of the figure. Green colour means down-regulation and red colour up-regulation. R: responders. NR: non-responders. HC: healthy controls. (B) Euclidean distance graph summarizing distances between mean expression values for all the genes displayed in the heatmap for all pairs of the study groups (R, NR, and HC).

doi:10.1371/journal.pone.0060994.g001

responses measured by the induction ratios observed for these genes after 3 or 6 months of treatment with IFN β [18]. In a later study by our group, we identified a baseline over-expression of type I IFN responsive genes in PBMC from a subgroup of RRMS patients who showed a lack of response to IFN β [5], which was in part explained by the presence of an increased baseline expression of endogenous IFN β in non-responders [10]. Additional mechanistic experiments carried out by the group suggested a selective alteration of the type I IFN signaling pathway in monocytes from non-responders at baseline [5]: (i) increased STAT1 phosphorylation and IFNAR1 expres-

sion in monocytes but not in T cells, B cells, or myeloid or plasmacytoid dendritic cells; (ii) increased production of interferon-alpha (IFN α) upon TLR4 stimulation of PBMC. Based on these previous findings, our primary goal in the present study was to investigate whether type I IFN responsive genes were over-expressed in monocytes isolated from IFN β non-responders at baseline. To achieve this, CD14 $^{+}$ monocytes were first purified from PBMC of MS patients and healthy controls and then, gene expression profiling was determined with oligonucleotide microarrays. The clinical criteria used to classify patients into responders and non-responders to IFN β ,

A.



B.

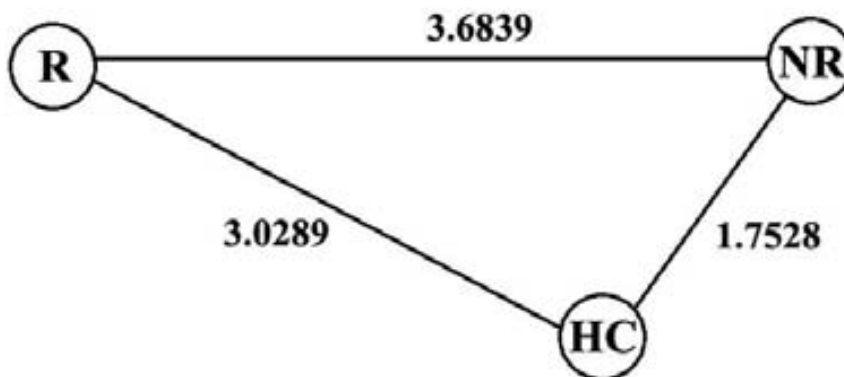


Figure 2. Heatmap representation of mitochondria-related genes. (A) The heatmap illustrates genes belonging to the mitochondrial dysfunction that was differentially expressed between IFN β responders and non-responders. Gene names and Affymetrix probe sets are shown on the right part of the figure. Green colour means down-regulation and red colour up-regulation. R: responders. NR: non-responders. HC: healthy controls. (B) Euclidean distance between R, NR, and HC.
doi:10.1371/journal.pone.0060994.g002

was the same as in previous studies [5,10]. The type I IFN signaling pathway appeared as one of the most differentially expressed pathways between responders and non-responders, and many type I IFN responsive genes were over-expressed in monocytes from IFN β non-responders when compared with responders. Furthermore, the transcription factor STAT1, a key mediator of the type I IFN signaling pathway, was also up-regulated in monocytes from non-responders. These results confirm previous findings by our group [5,10], and altogether point out to a key role of blood monocytes as cell mediators of the therapeutic response to IFN β . In line with these results, in a recent study it was reported that the differential responses observed to *in vitro* stimulation with IFN β in PBMC cell subsets mainly lied in the monocyte subpopulation [12].

Evidence exists in the literature about the relevance of the type I IFN pathway in monocytes from patients with MS and other autoimmune disorders. Monocytes from MS patients was the only PBMC subset that increased TRAIL expression in response to IFN β treatment [12]. TRAIL is a proapoptotic transmembrane receptor induced by type I IFNs. It has been proposed that IFN β treatment predisposes monocytes to apoptosis through the induction of TRAIL [19]. Type I IFN signaling in monocytes may play an important role in the pathogenesis of MS since conditional genetic knockout of *ifnar1* in monocytes and neutrophils but not in other blood cell subtypes led to a more severe clinical course of EAE [11]. Additionally, a higher expression of type I IFN responsive genes was found in purified CD14 $^{+}$ monocytes from patients with Sjögren's syndrome [9].

Another important goal in the present study was to identify additional biological pathways in monocytes that may also be playing important roles in the response to IFN β . Among the top canonical pathways that were differentially expressed between IFN β responders and non-responders, the mitochondrial dysfunction, eIF2 signaling and eIF4 and p70S6K signaling, and protein ubiquitination pathways were all considered potentially related with the response to IFN β .

A number of genes found to be differentially expressed pointed to mitochondrial dysfunction in monocytes from IFN β non-responders. Mitochondria generate ATP through the mitochondrial respiratory chain, which has important roles in processes such as cellular oxidation and apoptosis. In this context, the mitochondrial respiratory chain detects intra- and extra-cellular stresses and responds releasing cytochrome c that leads to the activation of caspases and cell death. In our study, non-responders to IFN β treatment were characterized by an over-expression of genes belonging to the mitochondria respiratory chain, which could be due to the basal up-regulation of the type I IFN signaling pathway observed in these patients. Type I IFNs may modulate mitochondrial membrane stability and have apoptotic effects. For instance, in one study by Yanase et al. [20], type I IFNs were shown to induce mitochondrial depolarization, cytochrome c release and caspase-3 activation in Daudi cells, a B-lymphoblastoid human cell line. In another study, Huang et al. [21] reported a clear interrelationship between the mitochondrial respiratory chain, IFN signaling and cell death. These authors observed synergistic effects of the retinoid acid and IFN β in increasing apoptotic processes mediated by mitochondria and a higher expression of mitochondrial respiratory chain genes [21].

IFN β has also been demonstrated to induce p53 signaling [22,23]. Interestingly, a recent study by van Boxel-Dezaire et al. [24] pointed out to monocytes as the specific cell subset going into apoptosis after IFN β stimulation via activation of both STAT1 and STAT3. In our study, the transcription factors STAT1, p53 and DDIT3 (see Table S1) were all up-regulated in monocytes from non-responders, findings that, altogether, suggest increased apoptosis in monocytes from IFN β non-responders, most likely owing to mitochondrial depolarization.

A number of ribosomal genes were over-expressed in IFN β non-responders, and the eIF2 signaling and eIF4 and p70S6K signaling pathways, which are closely related with ribosomal protein synthesis, were significantly up-regulated in these patients. These findings may also be related with the baseline up-regulation of type I IFNs observed in non-responders. In this setting, type I IFNs can block protein synthesis by inducing the expression of the protein kinase PKR, which in turn phosphorylates eIF2 [25]. This translation initiation factor forms an inactivate complex with eIF2B to reduce protein synthesis within the cell. These processes are related with the antiviral functions of type I IFNs to inhibit viral transcription.

The protein ubiquitination pathway was up-regulated in monocytes from non-responders to treatment. Strikingly, when investigating genes related with this pathway, we observed that the vast majority of them belonged to the immunoproteasome machinery but not to the common proteasome. Immunoproteasome is highly involved in antigen presentation and monocytes are one of the antigen presenting cells of the immune system. The up-regulation of the ubiquitination pathway may also be related with the over-expression of type I IFNs in monocytes from non-responders. It has been reported that type I IFNs can induce the immunoproteasome switch [26,27] and this effect seems to be long lasting producing a memory antiviral response [28]. In addition, some of the immunoproteasome-related genes that were up-regulated in non-responders such as TAP1, LMP2/PSMB9, and LMP7/PSMB8 are known to be induced by IFN β [29].

It is important to highlight that all these additional pathways found up-regulated in monocytes from IFN β non-responders are somehow related with type I IFN signaling, and prompt us to speculate that the over-expression of genes belonging to these pathways are a consequence of the baseline up-regulation of type I IFNs in this particular subgroup of patients. Finally, an intriguing finding that deserves some discussion is the behaviour of healthy controls in terms of gene expression, which is closer to IFN β non-responders than to responders for all the pathways that were considered relevant for treatment response. Similar findings in relation with type I IFN responsive genes were already reported in a previous study by our group [10], and may induce speculation about which is the aberrant group in the response to IFN β , “non-responders” or “responders”.

In summary, in the present study we confirm the baseline type I IFN signature in isolated monocytes from IFN β non-responders that was suggested from previous studies. Additional pathways relevant to monocyte biology and related to the IFN β effects were also up-regulated in monocytes from non-responders and, together with the type I IFN signaling pathway, may all be playing important roles in the response to IFN β .

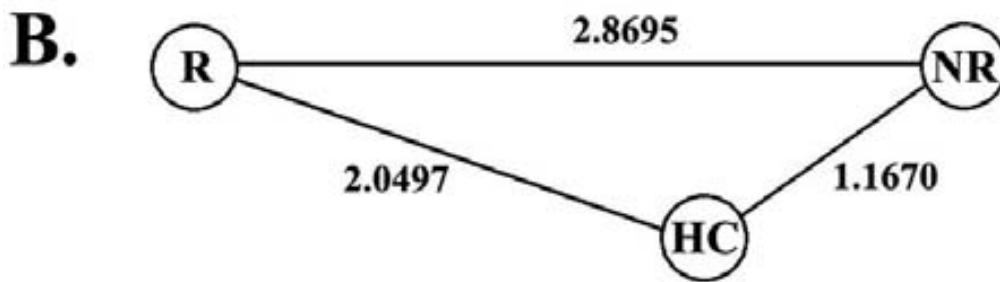
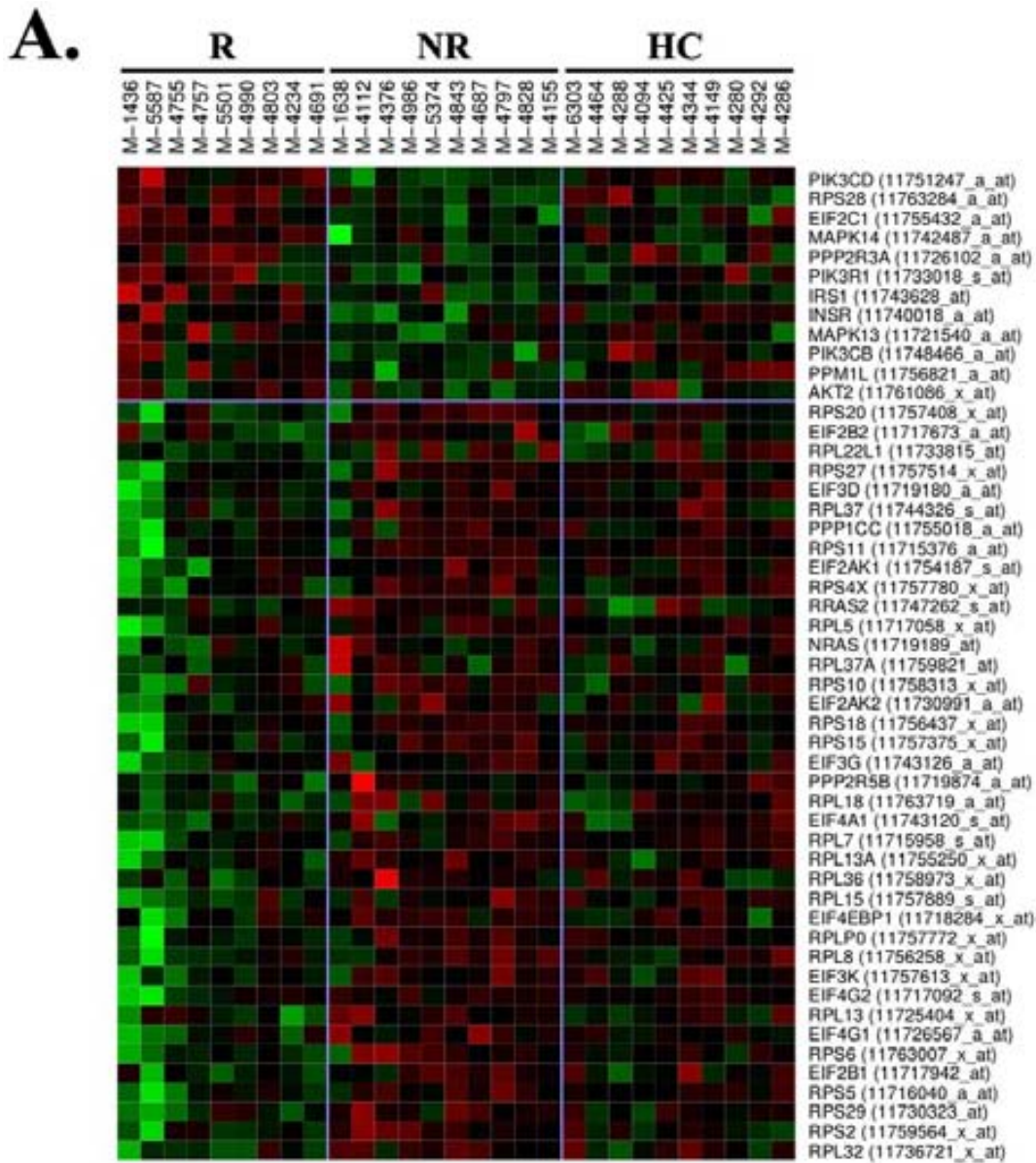


Figure 3. Heatmap representation of ribosomal genes. (A) The heatmap depicts ribosomal genes (eIF2 signaling and eIF4 and p70S6K signaling pathways) that were differentially expressed between IFN β responders and non-responders. Gene names and Affymetrix probe sets are shown on the right part of the figure. Green colour means down-regulation and red colour up-regulation. R: responders. NR: non-responders. HC: healthy controls. (B) Euclidean distance between R, NR, and HC. doi:10.1371/journal.pone.0060994.g003

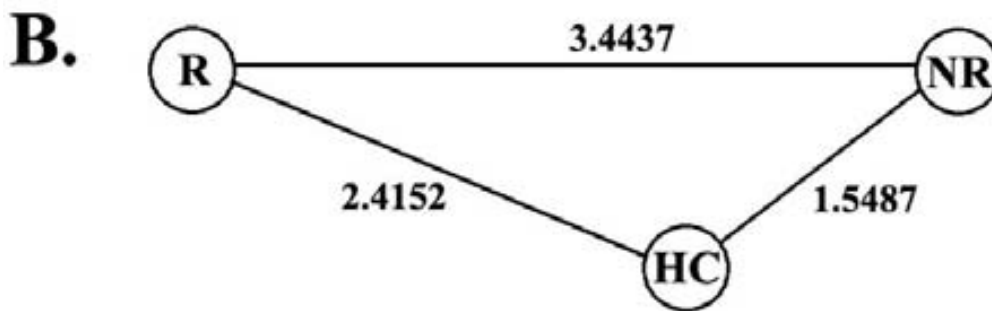
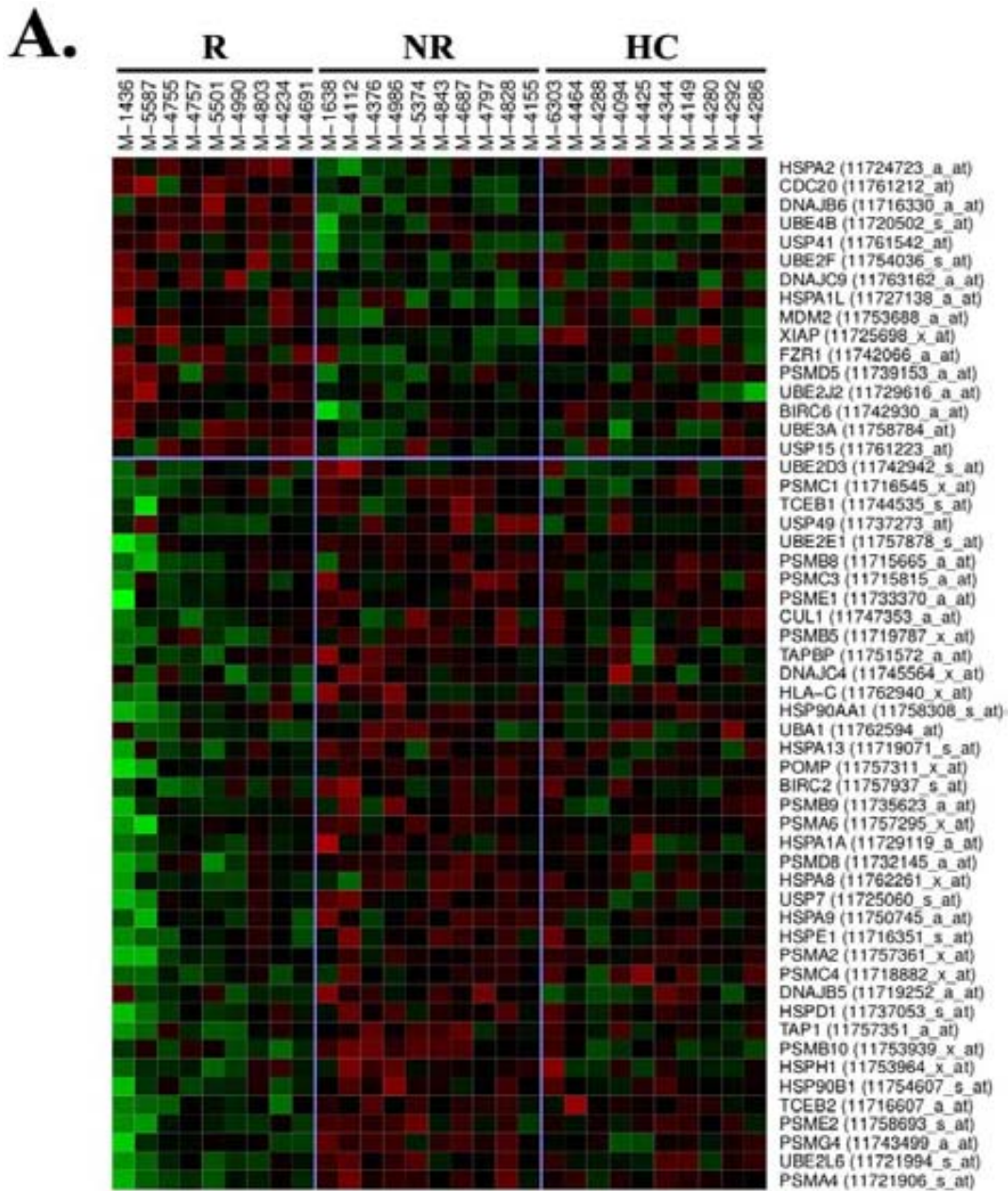


Figure 4. Heatmap illustration of immunoproteasome genes. (A) The heatmap shows immunoproteasome genes (protein ubiquitination pathway) that were differentially expressed in monocytes from IFN β responders and non-responders. Gene names and Affymetrix probe sets are shown on the right part of the figure. Green colour means down-regulation and red colour up-regulation. R: responders. NR: non-responders. HC: healthy controls. (B) Euclidean distance between R, NR, and HC. doi:10.1371/journal.pone.0060994.g004

Materials and Methods

Study Design and Clinical Assessment

In this study, RRMS patients treated with IFN β at the outpatient clinic of the *Centre d'Esclerosi Múltiple de Catalunya* (CEM-Cat) were included. All patients followed an internal protocol that consisted in collecting basal and longitudinal clinical data, as previously described [30]. All patients gave their informed consent and the study was approved by the local ethics committee. Clinical criteria of response to IFN β were applied after two years of treatment. Briefly, patients were classified as responders when there were no relapses and no increment in the EDSS (expanded disability status scale) score during the follow-up period. Patients were labeled as non-responders when there was one and more relapses and confirmed increase of at least one point in the EDSS score during the two years of follow-up [30]. Patients were labeled as intermediate responders when there was, during the follow-up period, presence of relapses with an increase of less than 1 point in the EDSS score, or absence of relapses with an increase in the EDSS score of one point or higher [10].

Patients

Twenty RRMS patients and ten healthy controls were included in the study. Ten patients were classified as responders, 7 as non-responders, and 3 as intermediate responders to IFN β treatment. Inasmuch as in a previous study we observed similar findings related with the type I IFN signature in stringent non-responders and intermediate responders [10], for the present study non-responders and intermediate responders were considered as a unique patient group labeled as “non-responders”. None of these patients had ever received treatment with IFN β or other immunosuppressive therapy before study entry. No patient had clinical exacerbations or received corticosteroid treatment during the month before initiation of IFN β . Table 2 summarizes the demographic and baseline characteristics of patients and healthy controls included in the study.

Sample Collection and Monocyte Isolation

Peripheral blood was collected from healthy controls and RRMS patients before treatment with IFN β . PBMC were isolated by Ficoll-Isopaque density gradient centrifugation (Gibco BRL, Life Technologies LTD, UK) and stored in liquid nitrogen until used. For monocyte isolation, PBMC were thawed and stained with allophycocyanin (APC)-conjugated mouse anti-human CD14 (Pharmingen, San Diego, CA, USA). After cell washing, monocytes were separated based on their side-scatter pattern and CD14 positivity using a Legacy MoFlo Cell Sorter (Beckman-Coulter, Fullerton, CA, USA). Methodology of sorting was fit to achieve 99% of cell purity. The number of purified monocytes obtained per sample ranged from 80,000 to 800,000 cells.

Total RNA Isolation and Pre-amplification

Total RNA was isolated from purified monocytes using the RNeasy Mini Kit (Qiagen, Germany). An additional step using DNase I (Quiagen, Germany) was included for DNA degradation. Total RNA was pre-amplified using the Ovation Pico WTA System (Nugen, CA, USA) according to the manufacturer's recommendations. In brief, total RNA was used to synthesize single-stranded cDNA with random primers and subsequently converted into double-stranded cDNA, which was then used as template in an amplification reaction that resulted in numerous molecules of new single-stranded cDNA. The amplified single-stranded cDNA was finally purified using magnetic beads. Its quality, dimensions and concentration were checked in a Bioanalyzer 2100 (Agilent Technologies, CA, USA).

Gene Expression Microarrays

Five μ g of purified single-stranded cDNA was labeled and fragmented with the Ovation Biotin Module (Nugen, CA, USA) and their quality was checked in a Bioanalyzer 2100. The fragmented samples were then added to a hybridization cocktail containing Control oligonucleotide B2 (50 pM) and Eukaryotic Hybridization controls (BioB, BioC, BioD, cre) at 1.5, 5, 25 and 100 pM final concentration respectively from the GeneChip Eukaryotic Hybridization Control Kit (Affymetrix, CA, USA), herring sperm DNA (0.1 mg/ml) and acetylated BSA (0.5 mg/ml). Probe array was equilibrated to room temperature and pre-hybridized with 1 \times hybridization buffer (100 mM MES, 1 M [Na $^{+}$], 20 mM EDTA, 0.01% Tween 20) at 45°C for 10 minutes with rotation. One hundred μ l of the mixture were used for the hybridization to the Affymetrix Human Genome U219 (Affymetrix Genechip $^{\text{®}}$ array, CA, USA), that was performed at 60°C during 16 hours in a GeneTitan platform. This platform automates the hybridization, washing and scanning processes of arrays. GeneChips were washed and marked with streptavidin-phycoerythrin using the protocol EukGE-WS2-v5 provided by Affymetrix. Afterwards, they were scanned and processed in the Affymetrix software AGCC. Figure S1 illustrates the different steps undertaken in sample preparation and microarray processing.

Data Analysis

All chips were one by one explored and checked for quality. All except one array passed through the quality control procedure. The signal distribution histograms (logarithmic) for the arrays were very similar with a peak of distribution falling into a 1.5–2.5 interval, while for the discarded array this peak was shifted to a 2.5–4.5 interval. The probeset-level log-scaled robust multiarray analysis (RMA) was performed with the Affymetrix Expression Console software. Linear models for microarray data R package was used to identify differentially expressed genes between

Table 2. Demographic and baseline clinical characteristics of MS patients and controls included in the study.

Characteristics	R	NR*	HC
n	10	10	10
Age (years)	32.5 (9.7)	34.7 (9.9)	28.2 (6.0)
Female/male (% women)	10/–(100)	7/3 (70)	8/2 (80)
Duration of disease (years)	2.6 (1.9)	5.7 (4.7)	–
EDSS ^a	2.0 (1.0–3.0)	2.4 (1.5–3.5)	–
Number of relapses ^b	2.3 (0.8)	2.1 (0.7)	–
Type of IFN β [n (%)]			
IFN β 1a IM	3 (30.0)	2 (20.0)	–
IFN β 1b SC	2 (20.0)	4 (40.0)	–
IFN β 1a SC	5 (50.0)	4 (40.0)	–

Data are expressed as mean (standard deviation) unless otherwise stated. ^aData are expressed as mean (interquartile range). ^bRefers to the number of relapses in the two previous years. EDSS: Expanded Disability Status Scale. IM: intramuscular. SC: subcutaneous. R: responders to IFN β . NR: non-responders to IFN β . *NR includes 7 stringent non-responders and 3 intermediate responders to IFN β .

doi:10.1371/journal.pone.0060994.t002

responders and non-responders to IFN β treatment [31]. Differentially expressed genes (DEG) with p values < 0.01 following two sample t tests were analyzed with the Ingenuity Pathway Analysis (IPA) software. The Euclidean distance between non-responders, responders and healthy controls was calculated according to the following formula:

$$\rho(Gr_1, Gr_2) = \sqrt{\sum_{i=1}^N (DEG_i(Gr_1) - DEG_i(Gr_2))^2}$$

The $d(Gr_1, Gr_2)$ is the calculated Euclidean distance. We summarized the data for a particular list of DEG displayed on each heatmap. $DEG_i(Gr_N)$ represents the particular mean value of gene expression level in the corresponding group.

Regarding data interpretation, we first compared DEG between responders and non-responders to IFN β . Gene expression profiling in responders and non-responders was subsequently compared to the healthy control group that was taken as a reference to determine the treated group that deviated from the healthy condition.

The Ingenuity Pathway Analysis was used to identify relevant differentially expressed pathways in monocytes from IFN β -treated patients. For pathway identification, only genes with p-values < 0.01 were included in the analysis. For heatmap representation, differentially expressed genes with p-values < 0.05 were considered. Inasmuch as not all of the genes from the corresponding groups are annotated in the Ingenuity knowledge database, additional functionally related genes with p-values below < 0.05 were also added to the heatmaps. P-values and fold changes for all the genes included in the pathways are provided in Table S2.

References

1. PRISMS (Prevention of Relapses and Disability by Interferon beta-1a Subcutaneously in Multiple Sclerosis) Study Group (1998) Randomised double-blind placebo-controlled study of interferon beta-1a in relapsing/remitting multiple sclerosis. *Lancet* 352: 1498–1504.
2. The IFN β Multiple Sclerosis Study Group (1993) Interferon beta-1b is effective in relapsing-remitting multiple sclerosis. I. Clinical results of a multicenter, randomized, double-blind, placebo-controlled trial. *Neurology* 43: 655–661.
3. Jacobs LD, Cookfair DL, Rudick RA, Herndon RM, Richert JR, et al. (1996) Intramuscular interferon beta-1a for disease progression in relapsing multiple sclerosis. The Multiple Sclerosis Collaborative Research Group (MSCRG). *Ann Neurol* 39: 285–294.
4. Rio J, Nos C, Tintore M, Borrás C, Galán I, et al. (2002) Assessment of different treatment failure criteria in a cohort of relapsing-remitting multiple sclerosis patients treated with interferon beta: implications for clinical trials. *Ann Neurol* 52: 400–406.
5. Comabella M, Lunemann JD, Rio J, Sanchez A, Lopez C, et al. (2009) A type I interferon signature in monocytes is associated with poor response to interferon-beta in multiple sclerosis. *Brain* 132: 3353–3365.
6. Onomoto K, Morimoto S, Kawaguchi T, Toyoda H, Tanaka M, et al. (2011) Dysregulation of IFN system can lead to poor response to pegylated interferon and ribavirin therapy in chronic hepatitis C. *PLoS One* 6: e19799.
7. van der Pouw Kraan TC, Wijbrandts CA, van Baarsen LG, Voskuyl AE, Rustenburg F, et al. (2007) Rheumatoid arthritis subtypes identified by genomic profiling of peripheral blood cells: assignment of a type I interferon signature in a subpopulation of patients. *Ann Rheum Dis* 66: 1008–1014.
8. Han GM, Chen SL, Shen N, Ye S, Bao CD, et al. (2003) Analysis of gene expression profiles in human systemic lupus erythematosus using oligonucleotide microarray. *Genes Immun* 4: 177–186.
9. Brkic Z, Maria NI, van Helden-Meeuwse CG, van de Merwe JP, van Daele PL, et al. (2012) Prevalence of interferon type I signature in CD14 monocytes of patients with Sjogren's syndrome and association with disease activity and BAFF gene expression. *Ann Rheum Dis*.
10. Bustamante MF, Fissolo N, Rio J, Espejo C, Costa C, et al. (2011) Implication of the Toll-like receptor 4 pathway in the response to interferon-beta in multiple sclerosis. *Ann Neurol* 70: 634–645.
11. Prinz M, Schmidt H, Mildner A, Knobloch KP, Hanisch UK, et al. (2008) Distinct and nonredundant in vivo functions of IFNAR on myeloid cells limit autoimmunity in the central nervous system. *Immunity* 28: 675–686.
12. Zula JA, Green HC, Ransohoff RM, Rudick RA, Stark GR, et al. (2011) The role of cell type-specific responses in IFN-beta therapy of multiple sclerosis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 108: 19689–19694.
13. Adams CW (1975) The onset and progression of the lesion in multiple sclerosis. *J Neurol Sci* 25: 165–182.
14. Fisher M, Levine PH, Weiner BH, Vaudreuil CH, Natale A, et al. (1988) Monocyte and polymorphonuclear leukocyte toxic oxygen metabolite production in multiple sclerosis. *Inflammation* 12: 123–131.
15. Imamura K, Suzumura A, Hayashi F, Marunouchi T (1993) Cytokine production by peripheral blood monocytes/macrophages in multiple sclerosis patients. *Acta Neurol Scand* 87: 281–285.
16. Kouwenhoven M, Teleshova N, Ozenci V, Press R, Link H (2001) Monocytes in multiple sclerosis: phenotype and cytokine profile. *J Neuroimmunol* 112: 197–205.
17. Ubogee EE, Callahan MK, Tucky BH, Ransohoff RM (2006) CCR5 expression on monocytes and T cells: modulation by transmigration across the blood-brain barrier in vitro. *Cell Immunol* 243: 19–29.
18. van Baarsen LG, Vosslander S, Tijssen M, Baggen JM, van der Voort LF, et al. (2008) Pharmacogenomics of interferon-beta therapy in multiple sclerosis: baseline IFN signature determines pharmacological differences between patients. *PLoS One* 3: e1927.
19. Wandinger KP, Lunemann JD, Wengert O, Bellmann-Strobl J, Aktas O, et al. (2003) TNF-related apoptosis inducing ligand (TRAIL) as a potential response marker for interferon-beta treatment in multiple sclerosis. *Lancet* 361: 2036–2043.
20. Yanase N, Ohshima K, Ikegami H, Mizuguchi J (2000) Cytochrome c release, mitochondrial membrane depolarization, caspase-3 activation, and Bax-alpha

Supporting Information

Figure S1 Sample preparation and microarray processing workflow. First steps involve PBMC extraction and monocyte isolation by cell sorting. Afterwards, RNA is extracted, retrotranscribed, and amplified to generate single strand cDNA (sscDNA). In subsequent steps, single-stranded cDNA is labeled, fragmented and hybridized to U219 expression arrays. As final steps, microarray data are analyzed and interpreted. (TIF)

Table S1 Differentially expressed genes, pathways and regulation genes. In the first tab, the list of all differentially expressed genes between responders and non responders with raw data, fold change and p-values are represented (p < 0.05). In the second tab, the list of all pathways returned by IPA is represented. In the third tab, all regulatory genes identified by IPA that were differentially expressed between responders and non responders are listed. (XLS)

Table S2 Genes included in heatmaps. All genes included in heatmaps are listed in the table. Raw data for each group, p-values and fold changes (FC) are included. (XLS)

Acknowledgments

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, sponsored by the “Agència de Gestió d’Ajuts Universitaris i de Recerca” (AGAUR), Generalitat de Catalunya, Spain.

Author Contributions

Conceived and designed the experiments: MC MFB JR XM. Performed the experiments: MFB. Analyzed the data: RNN MFB. Wrote the paper: MFB MC.

- cleavage during IFN-alpha-induced apoptosis in Daudi B lymphoma cells. *J Interferon Cytokine Res* 20: 1121–1129.
21. Huang G, Chen Y, Lu H, Cao X (2007) Coupling mitochondrial respiratory chain to cell death: an essential role of mitochondrial complex I in the interferon-beta and retinoic acid-induced cancer cell death. *Cell Death Differ* 14: 327–337.
 22. Wittnebel S, Jalil A, Thiery J, DaRocha S, Viey E, et al. (2005) The sensitivity of renal cell carcinoma cells to interferon alpha correlates with p53-induction and involves Bax. *Eur Cytokine Netw* 16: 123–127.
 23. Zhang F, Sriram S (2009) Identification and characterization of the interferon-beta-mediated p53 signal pathway in human peripheral blood mononuclear cells. *Immunology* 128: e905–918.
 24. van Boxel-Dezaire AH, Zula JA, Xu Y, Ransohoff RM, Jacobberger JW, et al. (2010) Major differences in the responses of primary human leukocyte subsets to IFN-beta. *J Immunol* 185: 5888–5899.
 25. Su Q, Wang S, Baltzis D, Qu LK, Raven JF, et al. (2007) Interferons induce tyrosine phosphorylation of the eIF2alpha kinase PKR through activation of Jak1 and Tyk2. *EMBO Rep* 8: 265–270.
 26. Lattanzi L, Rozera C, Marescotti D, D'Agostino G, Santodonato L, et al. (2011) IFN-alpha boosts epitope cross-presentation by dendritic cells via modulation of proteasome activity. *Immunobiology* 216: 537–547.
 27. Shin EC, Seifert U, Kato T, Rice CM, Feinstone SM, et al. (2006) Virus-induced type I IFN stimulates generation of immunoproteasomes at the site of infection. *J Clin Invest* 116: 3006–3014.
 28. Jaitin DA, Schreiber G (2007) Upregulation of a small subset of genes drives type I interferon-induced antiviral memory. *J Interferon Cytokine Res* 27: 653–664.
 29. Jamaluddin M, Wang S, Garofalo RP, Elliott T, Casola A, et al. (2001) IFN-beta mediates coordinate expression of antigen-processing genes in RSV-infected pulmonary epithelial cells. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 280: L248–257.
 30. Rio J, Nos C, Tintore M, Tellez N, Galan I, et al. (2006) Defining the response to interferon-beta in relapsing-remitting multiple sclerosis patients. *Ann Neurol* 59: 344–352.
 31. Smyth GK (2004) Linear models and empirical bayes methods for assessing differential expression in microarray experiments. *Stat Appl Genet Mol Biol* 3: Article3.

Copyright of PLoS ONE is the property of Public Library of Science and its content may not be copied or emailed to multiple sites or posted to a listserv without the copyright holder's express written permission. However, users may print, download, or email articles for individual use.

Pharmacogenomic study in multiple sclerosis patients responders and non-responders to interferon-beta

Bustamante MF¹, Morcillo-Suárez C^{2,3}, Malhotra S¹, Rio J¹, Navarro A^{2,3,4}, Leyva L⁵, Fernández O⁵, Zettl UK⁶, Killestein J⁷, Brassat D⁸, García-Merino A⁹, Urcelay E¹⁰, Alvarez-Lafuente R¹⁰, Villar LM¹¹, Alvarez-Cermeño JC¹¹, Lechner-Scott J^{12,13}, Vandebroek K^{14,15}, Rodríguez-Antigüedad A¹⁶, Drulovic J¹⁷, Martinelli Boneschi F¹⁸, Giacalone G¹⁹, Chan A²⁰, Akkad DA²⁰, Oksenberg J²⁰, Montalban X¹, Comabella M¹.

¹*Servei de Neurologia-Neuroimmunologia. Centre d'Esclerosi Múltiple de Catalunya (Cemcat). Institut de Recerca Vall d'Hebron (VHIR). Hospital Universitari Vall d'Hebron. Universitat Autònoma de Barcelona, Barcelona, Spain.*

²*Institute of Evolutionary Biology (UPF-CSIC), PRBB. Barcelona, Spain.*

³*National Institute for Bioinformatics, Universitat Pompeu Fabra, Barcelona, Spain.*

⁴*Institució Catalana de Recerca i Estudis Avançats (ICREA), Barcelona, Spain.*

⁵*Servicio de Neurología. Instituto de Neurociencias Clínicas, Hospital Regional Universitario Carlos Haya, Málaga, Spain.*

⁶*University of Rostock, Department of Neurology, Rostock, Germany.*

⁷*Department of Neurology, Multiple Sclerosis Centre Amsterdam, Vrije University Medical Centre, Amsterdam, Netherlands*

⁸*Pole des neurosciences et INSERM U1043, Université de Toulouse III, Hopital Purpan, Toulouse, France.*

⁹*Neuroimmunología, Hospital Universitario Puerta de Hierro, Madrid, Spain.*

¹⁰*Servicio de Neurología, Hospital Clínico San Carlos, Madrid, Spain*

¹¹*Department of Neurology and Immunology, Hospital Ramón y Cajal, Madrid, Spain*

¹²*Department of Neurology, John Hunter Hospital, Newcastle, Australia. Hunter Medical Research Institute, University Newcastle, Australia.*

¹³*University NewCastle, Callaghan Campus, Australia.*

¹⁴*Neurogenomik Group, Universidad del País Vasco (UPV/EHU), Leioa, Spain*

¹⁵*IKERBASQUE, Basque Foundation for Science, Bilbao, Spain*

¹⁶*Servicio de Neurología, Hospital de Basurto, Bilbao, Spain.*

¹⁷*Clinic of Neurology, Clinical Centre of Serbia (CCS), Faculty of Medicine, University of Belgrade, Serbia.*

¹⁸*Laboratory of Genetics of Neurological Complex Disorders and Department of Neurology, Institute of Experimental Neurology (INSPE), Division of Neuroscience, San Raffaele Scientific Institute, Milan, Italy.*

¹⁹*Department of Neurology, St. Josef-Hospital, Ruhr-University Bochum, Germany.*

²⁰*Department of Neurology, School of Medicine University of California, San Francisco, CA, USA.*

Corresponding author: Manuel Comabella; Servei de Neurologia-Neuroimmunologia. Centre d'Esclerosi Múltiple de Catalunya (Cemcat). Institut de Recerca Vall d'Hebron (VHIR). Hospital Universitari Vall d'Hebron. Universitat Autònoma de Barcelona, Barcelona, Spain. Pg. Vall d'Hebron 119-129 08035 Barcelona, Spain. Phone: +34932746834, Fax: +34932746084. e-mail: manuel.comabella@vhir.org

ABSTRACT

Objectives

A relatively large proportion of patients with multiple sclerosis (MS) do not respond to interferon-beta (IFN β) treatment. Previous pharmacogenomic studies have suggested potential roles for genes induced by type I IFNs, genes belonging to the toll-like receptor (TLR) pathway, and genes coding for neurotransmitter receptors in the response to IFN β . Here, we genotyped polymorphisms located in a large number of genes belonging to these pathways in order to investigate their association with IFN β response.

Methods

In a first or screening phase of the study, 384 polymorphisms were genotyped in 830 MS patients classified into responders (N=416) and non-responders (N=414) to IFN β according to clinical criteria. In a second or validation phase of the study, most significant polymorphisms associated with IFN β response were genotyped in an independent validation cohort of 555 MS patients, 281 responders and 274 non-responders to IFN β .

Results

Seven SNPs were selected from the screening phase for further validation: rs832032 (*GABRR3* p=0.0006); rs6597 (*STUB1*; p=0.019); rs3757517 (*IFIH1*; p=0.010); rs2277302 (*PELI3*; p=0.017); rs10958713 (*IKBKB*; p=0.003); rs2834202 (*IFNAR1*; p=0.030); rs4422395 (*CXCL1*; p=0.017). None of these SNPs were significantly associated with the response to IFN β when genotyped in an independent cohort of patients. Combined analysis of these SNPs in all MS patients (N=1385) revealed two polymorphisms associated with IFN β response: rs2277302 (*PELI3*; p=0.008) and rs832032 (*GABRR3*; p=0.006).

These findings do not support an association between polymorphisms located in genes related with the type I IFN or TLR pathways, or genes coding for neurotransmitter receptors and the clinical response to IFN β .

Introduction

Interferon-beta (IFN β) is one of the most widely prescribed disease-modifying therapies for patients with relapsing-remitting multiple sclerosis (RRMS) and has demonstrated positive effects on reducing disease activity (1). However, IFN β is partially effective and a significant proportion of MS patients will show a lack of response to this treatment (2). Despite many efforts to identify allelic variants influencing the response to IFN β (3), to date, there is a lack of biomarkers reliably associated with IFN β response.

A previous IFN β transcriptomic study conducted by our group (Cemcat) pointed to an implication of genes belonging to the type I IFN pathway and genes related to the toll-like receptor (TLR) pathway in the clinical response to IFN β (4). The two genome-wide pharmacogenomic studies published thus far in relation with the response to IFN β (5, 6) also suggested an implication of type I IFN responsive genes (5), and an intriguing relationship between neuronal excitation and response to IFN β based on the findings of a high representation of genes coding for glutamate and gamma-aminobutyric acid (GABA) receptors among the polymorphisms that best discriminated between IFN β responders and non-responders (5, 6).

In the present study, we aimed to genotype an extensive panel of polymorphisms located in genes related with the type I IFN and TLR pathways, and genes coding for GABA and glutamate receptors in a large cohort of IFN β responders and non-responders, in order to investigate their potential association with the response to this treatment.

METHODS

Definition of response to IFN β therapy

Patients with relapse-onset MS treated with IFN β and with a follow-up of at least two years were classified according to the following clinical criteria: (i) Responders were patients with no relapses and no increase in the Expanded Disability Status Scale (EDSS) score over the follow-up period. (ii) Non-responders were patients having during the follow-up period one or more relapses and an increase in the EDSS score of at least one point confirmed at 6 months (7). The study was approved by the corresponding local ethics committee, and all patients gave their informed consent.

Single nucleotide polymorphism (SNP) selection

A total of 384 SNPs were obtained from www.sysnps.org, an online tool for selecting tagSNPs from a list of genes. Genes related to the type I IFN and TLR pathways and genes coding for GABA and glutamate receptors were selected through bibliographical searches in the literature. The list of candidate genes was then uploaded to the online tool and the biologically more informative SNPs were selected for genotyping.

Study design

In a first or screening phase of the study (phase I), 384 SNPs were genotyped in 830 MS patients classified by their response to IFN β . There were 416 responders and 414 non-responders. Genomic DNA samples were obtained using standard methods and genotyping was performed using an Illumina GoldenGate assay at Progenika Biopharma SA (Bizkaia, Spain). Overall genotyping success rate was 95%. The full list of SNPs and probes is provided as Table e-1.

In a second or validation phase of the study (phase II), the most significant SNPs obtained in phase I were genotyped in an independent cohort of 555 MS patients, 281 responders and 274 non-responders to IFN β . Genotyping was performed using TaqMan® assays at the Cemcat (Barcelona, Spain). Genotyping success rate was 97%.

A summary of demographic and baseline clinical characteristics of all patient cohorts is shown in Table 1.

Statistical analysis

Data processing, missingness, Hardy-Weinberg analysis, and allele frequency comparisons between responders and non-responders to IFN β were performed with SNPator (www.snparator.org) (8). Possible stratification owing to different population origin was assessed using the Cochran-Mantel-Haenszel test implemented in PLINK (<http://pngu.mgh.harvard.edu/~purcell/plink/>).

RESULTS

In the first phase of the study, a total of 384 SNPs were genotyped in 830 MS patients classified by their clinical response to IFN β treatment. The results of the allelic association analysis for all the study cohorts (combined and stratified by MS center) are shown in Table e-2. The following most significant SNPs associated with the response to IFN β were selected for further validation (Table 2): (i) rs832032 - *GABRR3* (p=0.0006); (ii) rs6597 - *STUB1* (p=0.019); (iii) rs3757517 - *IFIH1* (p=0.010); (iv) rs2277302 - *PELI3* (p=0.017); (v) rs10958713 - *IKBKB* (p=0.003); (vi) rs2834202 - *IFNAR1* (p=0.030); (vii) rs4422395 - *CXCL1* (p=0.017).

In a second phase of the study, these 7 SNPs were genotyped in an independent cohort of 555 MS patients classified according to the same clinical criteria as in phase I. As depicted in Table 2, allelic analysis in this validation cohort showed a lack of statistically significant associations between selected polymorphisms from phase I and the response to IFN β . Combined analysis in the whole cohort of MS patients (N=1385; Table 2) revealed two SNPs associated with the response to IFN β with p-values below 0.01: rs2277302, a synonymous polymorphism located in the *PELI3* gene; and rs832032, a polymorphism located in the *GABRR3* gene which results in a premature stop codon and protein truncation.

DISCUSSION

Previous pharmacogenomic studies have suggested potential implications of genes responsive to type I IFNs, genes related with the TLR pathway, and genes coding for neurotransmitter receptors in the response to IFN β treatment in MS patients (4-6). Prompted by these observations, we genotyped an extensive panel of polymorphisms positioned in genes related with these pathways in a large cohort – the largest thus far published in the field – of responders and non-responders to IFN β from different MS centers. Classification of MS patients into IFN β responders and non-responders was conducted after two years of follow-up according to stringent criteria based on the presence of relapses and progression on the EDSS score. These clinical criteria were similar to those used in previous studies (4-6).

Despite the statistically significant associations with the response to IFN β observed for some of the SNPs genotyped in the screening phase of the study, none of these associations remained significant following genotyping in an independent cohort of responders and non-responders to IFN β . While the reasons for this lack of association observed between selected polymorphisms from the screening phase and the response to IFN β are manifold, a lack of statistical power to detect statistically significant associations in the validation cohort cannot totally be ruled out. In fact, combined analysis in the whole cohort of 1385 MS patients revealed significant associations for two polymorphisms, rs832032 and rs2277302.

Rs832032, is located in the *GABRR3* gene and encodes a subunit of the GABA (C) receptor. Interestingly, this polymorphism results in a premature stop codon and subsequent protein truncation. At present, there is no evidence in the literature of a functional relationship between GABAC receptors and IFN β mechanism of action.

Rs2277302 is a synonymous SNP located in the *PELI3* gene, which codes for an E3 ubiquitin protein ligase involved in TLR signaling. In a recent publication (9), Peli3 deficient mice expressed increased levels of endogenous IFN β in response to TLR3 activation, and an auto-regulation mechanism was proposed where PELI3 inhibited type I IFNs by targeting IRF7. These findings are in

agreement with previous data from our group revealing increased baseline levels of endogenous IFN β in peripheral blood cells from IFN β non responders (10).

Overall, results from this study do not support an association between polymorphisms positioned in genes belonging to the type I IFN or TLR pathways, or genes coding for GABA or glutamate receptors and the clinical response to IFN β . Findings with rs832032 and rs2277302 polymorphisms warrant further studies exploring the role of *GABRR3* and *PELI3* in the response to IFN β in larger cohorts of MS patients.

REFERENCES

1. Jacobs LD, Cookfair DL, Rudick RA, et al. Intramuscular interferon beta-1a for disease progression in relapsing multiple sclerosis. The Multiple Sclerosis Collaborative Research Group (MSCRG). *Ann Neurol* 1996;39:285-294.
2. Rio J, Nos C, Tintore M, et al. Assessment of different treatment failure criteria in a cohort of relapsing-remitting multiple sclerosis patients treated with interferon beta: implications for clinical trials. *Ann Neurol* 2002;52:400-406.
3. Mahurkar S, Suppiah V, O'Doherty C. Pharmacogenomics of interferon beta and glatiramer acetate response: a review of the literature. *Autoimmun Rev* 2014;13:178-186.
4. Comabella M, Lunemann JD, Rio J, et al. A type I interferon signature in monocytes is associated with poor response to interferon-beta in multiple sclerosis. *Brain* 2009;132:3353-3365.
5. Comabella M, Craig DW, Morcillo-Suarez C, et al. Genome-wide scan of 500,000 single-nucleotide polymorphisms among responders and nonresponders to interferon beta therapy in multiple sclerosis. *Arch Neurol* 2009;66:972-978.
6. Byun E, Caillier SJ, Montalban X, et al. Genome-wide pharmacogenomic analysis of the response to interferon beta therapy in multiple sclerosis. *Arch Neurol* 2008;65:337-344.
7. Rio J, Nos C, Tintore M, et al. Defining the response to interferon-beta in relapsing-remitting multiple sclerosis patients. *Ann Neurol* 2006;59:344-352.
8. 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.
9. Siednienko J, Jackson R, Mellett M, et al. Pellino3 targets the IRF7 pathway and facilitates autoregulation of TLR3- and viral-induced expression of type I interferons. *Nat Immunol* 2012;13:1055-1062.
10. Bustamante MF, Fissolo N, Rio J, et al. Implication of the Toll-like receptor 4 pathway in the response to interferon-beta in multiple sclerosis. *Ann Neurol* 2011;70:634-645.

Table 1. Summary of demographic and baseline clinical characteristics for all the cohorts of MS patients responders and non-responders to IFN β treatment.

PHASE	Sets	N		Female/male (% females)		Age (years)		Disease duration (years)		EDSS		IFN β (1/2/3) ^a	
		R	NR	R	NR	R	NR	R	NR	R	NR	R	NR
PHASE I	Toulouse	67	68	53/14 (80.1)	47/21 (69.1)	28.9 (8.0)	27.9 (8.7)	4.5 (5.4)	4.8 (5.8)	2.0 (1.2)	1.7 (1.3)	15/39/13	16/36/16
	Serbia	24	24	17/7 (70.8)	15/9 (62.5)	31.9 (6.4)	33.3 (7.8)	3.6 (3.5)	6.1 (4.9)	0.9 (0.8)	2.3 (0.9)	12/0/12	14/0/10
	Bochum	4	4	2/2 (50.0)	2/2 (50.0)	37.8 (4.6)	36.0 (9.8)	3.8 (3.8)	4.3 (3.6)	2.1 (1.1)	3.9 (2.5)	0/1/3	1/1/2
	Rostock	43	43	36/7 (83.7)	36/7 (83.7)	40.9 (9.9)	38.3 (11.4)	5.0 (4.8)	4.6 (5.8)	1.8 (1.6)	3.0 (1.7)	12/9/22	6/6/31
	Newcastle	32	32	25/7 (78.1)	25/7 (78.1)	42.0 (11.1)	35.2 (12.2)	6.3 (9.1)	6.0 (5.6)	-	-	16/2/14	16/2/14
	San Francisco	2	2	2/0 (100)	2/0 (100)	40.5 (6.4)	41.5 (6.4)	1.9 (0.9)	3.7 (4.1)	1.0 (1.4)	1.5 (0.7)	1/1/0	1/1/0
	Milan	6	6	4/2 (66.7)	3/3 (50.0)	39.6 (8.8)	40.8 (15.8)	3.7 (5.1)	6.3 (7.2)	1.5 (0.8)	2.5 (1.8)	4/2/0	4/2/0
	Madrid PH	20	20	12/8 (60.0)	14/6 (70.0)	37.7 (8.3)	32.7 (9.8)	4.6 (2.7)	7.2 (2.8)	-	-	10/5/5	10/8/2
	Madrid SC	29	30	21/8 (72.4)	15/15 (50.0)	33.4 (7.4)	34.1 (7.7)	5.3 (4.8)	5.1 (6.5)	2.0 (1.6)	2.1 (1.3)	12/7/10	12/5/13
	Malaga	32	32	23/9 (71.9)	23/9 (71.9)	40.0 (9.5)	44.0 (10.8)	16.0 (4.0)	15.0 (7.6)	1.0 (1.3)	2.0 (1.4)	10/17/5	9/16/7
	Bilbao	28	25	21/7 (75.0)	18/7 (72.0)	36.5 (9.8)	34.0 (8.4)	8.0 (7.4)	8.1 (8.2)	2.2 (2.0)	2.5 (1.5)	13/3/12	11/5/9
	Barcelona	129	128	103/26 (79.8)	99/29 (77.3)	40.8 (8.8)	40.9 (10.3)	13.7 (7.2)	13.3 (7.3)	2.4 (1.8)	5.3 (2.1)	38/37/54	34/36/58
ALL PHASE I	416	414	319/97 (76.7)	299/115 (72.2)	37.5 (4.1)	36.5 (4.6)	6.4 (7.0)	7.0 (3.5)	1.7 (0.5)	2.7 (1.1)	143/123/150	134/118/162	
PHASE II	Madrid RC	33	41	27/6(81.8)	29/12 (70.7)	38.0 (9.4)	35.9 (9.2)	6.2 (6.1)	3.8 (5.2)	1.6 (0.8)	1.8 (1.3)	21/4/8	22/13/6
	Malaga	129	114	82/47 (63.6)	75/39 (65.8)	45.5 (11.1)	46.8 (11.1)	16.3 (7.9)	17.3 (7.6)	1.4 (1.5)	1.7 (1.4)	48/27/48	41/38/3
	Rostock	43	43	36/7(83.7)	36/7 (83.7)	37.7 (10.2)	35.5 (11.1)	3.0 (0.9)	3.1 (0.9)	1.8 (1.3)	2.2 (1.1)	9/17/17	6/7/30
	Amsterdam	76	76	55/21 (72.3)	50/24 (67.6)	35.5 (8.3)	35.0 (9.4)	4.0 (4.2)	4.2 (4.0)	2.5 (1.3)	3.1 (1.4)	24/27/25	18/25/31
	ALL PHASE II	281	274	200/81 (71.2)	190/84 (6.9)	40.6 (11.0)	40.14 (11.8)	9.8 (8.7)	9.9 (8.8)	1.8 (1.4)	2.2 (1.5)	102/75/98	87/83/70
BOTH PHASES	ALL COHORTS	698	688	519/178 (74.5)	489/199 (71.1)	38.6 (10.6)	37.7 (11.6)	8.9 (8.0)	8.7 (7.9)	1.8 (1.5)	2.7 (2.1)	245/198/248	221/201/232

Data are expressed as mean (standard deviation). ^aIFN β (1a intramuscular/1b subcutaneous/1a subcutaneous). EDSS: Expanded Disability Status Scale..Madrid SC: Refers to Hospital Clínico San Carlos. Madrid PH: Refers to Hospital Universitario Puerta de Hierro, Madrid. Madrid RC: Refers to Hospital Ramón y Cajal, Madrid.

Table 2. Summary of results of allele association analysis.

SNP ID	Chr	Gene ID	MA	MAF	Screening cohort ¹			Validation cohort ²			Combined cohorts ³		
					p-value	OR (95% CI)	A ⁴	p value	OR (95% CI)	A ⁴	p value	OR (95% CI)	A ⁴
rs832032	3	GABRR3	T	0.21	0.0006	1.55 (1.21 - 1.99)	A	0.745	1.06 (0.76 - 1.46)	T	0.006	1.31 (1.08 - 1.59)	A
rs10958713	8	IKBKB	G	0.36	0.0030	1.38 (1.11 - 1.70)	G	0.601	1.07 (0.83 - 1.39)	G	0.016	1.22 (1.04 - 1.43)	G
rs3747517	2	IFIH1	G	0.26	0.0104	1.35 (1.07 - 1.69)	A	0.602	1.08 (0.81 - 1.43)	G	0.065	1.18 (0.99 - 1.40)	A
rs2277302	11	PELI3	A	0.20	0.0172	1.36 (1.05 - 1.75)	A	0.310	1.17 (0.87 - 1.58)	A	0.008	1.29 (1.07 - 1.56)	A
rs4422395	4	CXCL1	G	0.15	0.0173	1.42 (1.06 - 1.89)	A	0.338	1.17 (0.85 - 1.62)	G	0.289	1.12 (0.91 - 1.38)	A
rs6597	16	STUB1	A	0.12	0.0193	1.47 (1.06 - 2.03)	A	0.746	1.06 (0.74 - 1.52)	C	0.040	1.27 (1.01 - 1.60)	A
rs2834202	21	IFNAR1	A	0.27	0.0303	1.29 (1.03 - 1.62)	G	0.509	1.10 (0.83 - 1.44)	G	0.048	1.19 (1.00 - 1.41)	G

¹Corresponds to phase I of the study (N=830). ²Corresponds to phase II of the study (N=555). ³Corresponds to combined analysis in both cohorts (N=1385). ⁴A corresponds to the allele associated with the response to IFN β . Chr: Chromosome. Gene ID: Gene symbol. MA: minor allele. MAF: minor allele frequency. OR (95% CI): odds ratio (95% confidence interval). *GABRR3* (gamma-aminobutyric acid - GABA - A receptor, rho 3): rs832032 results in a premature stop codon and protein truncation. *STUB1* (STIP1 homology and U-box containing protein 1, E3 ubiquitin protein ligase): rs6597 is an intronic polymorphism. *IFIH1* (interferon induced with helicase C domain 1): rs3747517 is a nonsynonymous coding polymorphism. *PELI3* (pellino E3 ubiquitin protein ligase family member 3): rs2277302 is a synonymous polymorphism. *IKBKB* (inhibitor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells, kinase beta): rs10958713 is an intronic polymorphism. *IFNAR1* (interferon - alpha and beta - receptor 1): rs2834202 is located in the 3' untranslated region. *CXCL1* (chemokine (C-X-C motif) ligand 1): rs4422395 is an intergenic polymorphism.

ANEXO B: TABLAS SUPLEMENTARIAS

Tabla suplementaria 1

Señalización de los IFNs de tipo I							
Sonda	Símbolo	Nombre del gen	Valor p	R	NR	CS	FC
11758337_s_at	ADA	adenosine deaminase	0,024	3,23	3,75	3,52	1,161
11739022_a_at	ADAR	adenosine deaminase, RNA-specific	0,02	4,51	5,12	4,96	1,135
11723974_a_at	APOL3	apolipoprotein L, 3	0,0034	6,92	7,52	7,45	1,087
11738350_a_at	BCL2	B-cell CLL/lymphoma 2	0,013	4,5	5,48	4,62	1,218
11732515_x_at	BAK1	BCL2-antagonist/killer 1	0,001	3,18	3,74	3,74	1,176
11723633_s_at	C14orf4	chromosome 14 open reading frame 4	0,008	8,68	9,18	8,97	1,058
11721303_at	CLEC2B	C-type lectin domain family 2, member B	0,0039	5,35	6,08	5,59	1,136
11719376_a_at	DAXX	death-domain associated protein	0,0042	5,13	5,66	5,5	1,103
11753397_x_at	DLK1	delta-like 1 homolog (Drosophila)	0,0015	2,59	2,97	2,47	1,147
11723025_at	FAM26F	family with sequence similarity 26, member F	0,015	7,48	8,12	8,13	1,086
11752930_a_at	GBP1	guanylate binding protein 1, interferon-inducible, 67kDa	0,0049	2,97	4,24	3,84	1,428
11719447_s_at	GBP2	guanylate binding protein 2, interferon-inducible	0,01	8,23	8,61	8,47	1,046
11733952_at	GBP4	guanylate binding protein 4	0,0032	4,7	5,41	5,31	1,151
11733439_a_at	GBP5	guanylate binding protein 5	0,044	3,11	3,63	3,34	1,167
11715671_x_at	IFITM1	interferon induced transmembrane protein 1 (9-27)	0,0044	5,09	5,95	5,53	1,169
11759270_at	IFNA5	interferon, alpha 5	0,0012	0,91	0,58	0,68	-1,569
11719491_a_at	IFI35	interferon-induced protein 35	0,0031	5,4	6,11	6,09	1,131
11746088_a_at	IFI44	interferon-induced protein 44	0,043	6,41	7,1	7,04	1,108
11723234_at	IFI44L	interferon-induced protein 44-like	0,014	5,42	6,41	5,95	1,183
11744560_s_at	IFT20	intraflagellar transport 20 homolog (Chlamydomonas)	0,0074	6,39	6,92	6,8	1,083
11720624_a_at	MYD88	myeloid differentiation primary response gene (88)	0,024	5,79	6,21	6,18	1,073
11736135_at	OAS2	2'-5'-oligoadenylate synthetase 2, 69/71kDa	0,029	5,38	6,01	6,14	1,117
11723699_s_at	OAS3	2'-5'-oligoadenylate synthetase 3, 100kDa	0,0068	8,11	8,89	8,87	1,096
11721997_s_at	PARP14	poly (ADP-ribose) polymerase family, member 14	0,021	7,28	7,7	7,75	1,058
11744434_a_at	PARP9	poly (ADP-ribose) polymerase family, member 9	0,0034	4,15	5,37	5,27	1,294
11715665_a_at	PSMB8	proteasome (prosome, macropain) subunit, beta type, 8 (large multifunctional peptidase 7)	0,036	7,12	7,5	7,5	1,053
11735623_a_at	PSMB9	proteasome (prosome, macropain) subunit, beta type, 9 (large multifunctional peptidase 2)	0,019	6,29	6,83	6,62	1,086

Tabla suplementaria 1

11722156_a_at	PRKRA	protein kinase, interferon-inducible double stranded RNA dependent activator	0,016	3,61	4	3,74	1,108
11718432_a_at	SASH1	SAM and SH3 domain containing 1	0,018	4,79	5,56	5,38	1,161
11755646_a_at	SIGLEC1	sialic acid binding Ig-like lectin 1, sialoadhesin	0,016	4,33	5,47	5,04	1,263
11743353_s_at	STAT1	signal transducer and activator of transcription 1, 91kDa	0,032	6,65	7,3	7,32	1,098
11719217_a_at	SOCS3	suppressor of cytokine signaling 3	0,039	4,31	5,04	4,26	1,169
11751572_a_at	TAPBP	TAP binding protein (tapasin)	0,029	5,03	5,38	5,13	1,07
11760473_at	TOR1AIP2	torsin A interacting protein 2	0,027	1,76	2,1	1,99	1,193
11757351_a_at	TAP1	transporter 1, ATP-binding cassette, sub-family B (MDR/TAP)	0,0056	6,16	6,64	6,51	1,078
11726287_a_at	WARS	tryptophanyl-tRNA synthetase	0,0031	7,94	8,35	8,22	1,052
11747630_a_at	XAF1	XIAP associated factor 1	0,028	5,97	6,73	6,73	1,127
Disfunción mitocondrial							
Sonda	Símbolo	Nombre del gen	Valor p	R	NR	CS	FC
11756890_s_at	ATP5A1	ATP synthase, H+ transporting, mitochondrial F1 complex, alpha subunit 1, cardiac muscle	0,0024	8,08	8,45	8,37	1,046
11715874_s_at	ATP5H	ATP synthase, H+ transporting, mitochondrial F0 complex, subunit d	0,023	5,99	6,47	6,51	1,08
11748782_a_at	CASP9	caspase 9, apoptosis-related cysteine peptidase	0,0075	3,74	4,41	4,14	1,179
11759910_a_at	COQ9	coenzyme Q9 homolog (S, cerevisiae)	0,017	1,47	2,48	1,35	1,687
11718764_at	COX5B	cytochrome c oxidase subunit Vb	0,013	7,23	7,67	7,65	1,061
11717430_s_at	COX7A1	cytochrome c oxidase subunit VIIa polypeptide 1 (muscle)	0,0062	1,84	1,56	1,66	1,179
11721466_s_at	COX7A2	cytochrome c oxidase subunit VIIa polypeptide 2 (liver)	0,026	8,71	9,04	8,99	1,038
11715694_at	COX7B	cytochrome c oxidase subunit VIIb	0,029	7,26	7,75	7,76	1,067
11734286_a_at	COX7B2	cytochrome c oxidase subunit VIIb2	0,039	2,01	1,77	1,93	-1,136
11715349_a_at	COX7C	cytochrome c oxidase subunit VIIc	0,022	9,88	10,09	10,05	1,021
11735295_a_at	LRRK2	leucine-rich repeat kinase 2	0,016	7,76	7,4	7,64	-1,049
11755443_a_at	MAOA	monoamine oxidase A	0,00053	3,07	2,55	2,59	-1,204
11732822_a_at	MAP2K4	mitogen-activated protein kinase kinase 4	0,019	2,83	2,09	2,87	-1,354
11729710_a_at	MARS2	methionyl-tRNA synthetase 2, mitochondrial	0,041	3,18	3,38	3,25	1,063
11736211_at	MRP63	mitochondrial ribosomal protein 63	0,011	3,79	4,42	4,12	1,166
11744118_a_at	MRPL10	mitochondrial ribosomal protein L10	0,031	4,35	4,82	5,13	1,108
11733220_a_at	MRPL11	mitochondrial ribosomal protein L11	0,025	5,34	5,79	5,82	1,084

Tabla suplementaria 1

11716315_at	MRPL15	mitochondrial ribosomal protein L15	0,048	4,28	4,66	4,57	1,089
11757293_x_at	MRPL18	mitochondrial ribosomal protein L18	0,0051	5,6	6,22	6,22	1,111
11757411_x_at	MRPL33	mitochondrial ribosomal protein L33	0,026	8,77	9,14	9,12	1,042
11717987_a_at	MRPL40	mitochondrial ribosomal protein L40	0,02	5,57	6	6	1,077
11722264_a_at	MRPS10	mitochondrial ribosomal protein S10	0,04	5,52	5,79	5,72	1,049
11764027_at	MRPS11	mitochondrial ribosomal protein S11	0,037	3,94	4,48	4,65	1,137
11741107_a_at	MRPS14	mitochondrial ribosomal protein S14	0,033	3,77	4,5	4,46	1,194
11724780_x_at	MRPS17	mitochondrial ribosomal protein S17	0,024	3,01	3,44	3,36	1,143
11756239_s_at	MRPS35	mitochondrial ribosomal protein S35	0,022	3,41	3,95	3,85	1,158
11763290_at	MRPS5	Mitochondrial ribosomal protein S5	0,016	1,03	0,8	0,85	-1,287
11725659_a_at	MTFR1	mitochondrial fission regulator 1	0,0025	3,62	4,24	4,13	1,171
11745892_a_at	MTHFD2	methylenetetrahydrofolate dehydrogenase (NADP+ dependent) 2, methenyltetrahydrofolate cyclohydrolase	0,0045	5,71	6,44	6,29	1,128
11747009_a_at	MTRF1	mitochondrial translational release factor 1	0,0066	4,25	4,7	4,6	1,106
11756125_x_at	NDUFA1	NADH dehydrogenase (ubiquinone) 1 alpha subcomplex, 1, 7,5kDa	0,033	9,35	9,71	9,7	1,039
11748707_a_at	NDUFA10	NADH dehydrogenase (ubiquinone) 1 alpha subcomplex, 10, 42kDa	0,041	6,11	6,36	6,29	1,041
11757589_a_at	NDUFA12	NADH dehydrogenase (ubiquinone) 1 alpha subcomplex, 12	0,00094	7,38	7,98	7,69	1,081
11720341_at	NDUFA13	NADH dehydrogenase (ubiquinone) 1 alpha subcomplex, 13	0,044	7,33	6,95	7,07	-1,055
11715616_a_at	NDUFAB1	NADH dehydrogenase (ubiquinone) 1, alpha/beta subcomplex, 1, 8kDa	0,025	4,86	5,23	5,18	1,076
11758314_s_at	NDUFAF2	NADH dehydrogenase (ubiquinone) 1 alpha subcomplex, assembly factor 2	0,00081	5,29	6,05	5,79	1,144
11745384_s_at	NDUFB4	NADH dehydrogenase (ubiquinone) 1 beta subcomplex, 4, 15kDa	0,027	5,96	6,45	6,51	1,082
11727026_a_at	NDUFB5	NADH dehydrogenase (ubiquinone) 1 beta subcomplex, 5, 16kDa	0,0024	6,55	6,98	6,9	1,066
11763101_x_at	NDUFB9	NADH dehydrogenase (ubiquinone) 1 beta subcomplex, 9, 22kDa	0,047	8,67	9,04	9,08	1,043
11715997_a_at	NDUFC1	NADH dehydrogenase (ubiquinone) 1, subcomplex unknown, 1, 6kDa	0,037	4,65	5,04	5,02	1,084
11761004_at	NDUFS2	NADH dehydrogenase (ubiquinone) Fe-S protein 2, 49kDa (NADH-coenzyme Q reductase)	0,025	3,53	3,1	2,98	-1,139
11760482_x_at	NDUFS7	NADH dehydrogenase (ubiquinone) Fe-S protein 7, 20kDa (NADH-coenzyme Q reductase)	0,0099	3,71	4,11	3,94	1,108
11746913_x_at	NHEDC2	Na ⁺ /H ⁺ exchanger domain containing 2	0,024	2,4	2,08	2,39	-1,154
11715497_a_at	OXA1L	oxidase (cytochrome c) assembly 1-like	0,024	7,83	8,07	7,88	1,031
11717482_at	PDHA1	pyruvate dehydrogenase (lipoamide) alpha 1	0,041	2,83	3,24	3,02	1,145
11745867_x_at	PSEN2	presenilin 2 (Alzheimer disease 4)	0,0084	3,76	3,14	3,18	-1,197
11720631_a_at	SDHB	succinate dehydrogenase complex, subunit B, iron sulfur (lp)	0,00076	6,91	7,35	7,37	1,064

Tabla suplementaria 1

11758190_s_at	SDHD	succinate dehydrogenase complex, subunit D, integral membrane protein	0,02	7,35	6,89	7,08	1,067
11750992_x_at	SHMT2	serine hydroxymethyltransferase 2 (mitochondrial)	0,018	4,31	4,85	4,8	1,125
11731446_s_at	SNCA	synuclein, alpha (non A4 component of amyloid precursor)	0,044	1,6	1,35	1,66	-1,185
11725956_a_at	TIMM17A	translocase of inner mitochondrial membrane 17 homolog A (yeast)	0,029	3,88	4,45	4,47	1,147
11753887_x_at	TOMM5	translocase of outer mitochondrial membrane 5 homolog (yeast)	0,014	6,04	6,49	6,47	1,075
11720284_at	TRAK1	trafficking protein, kinesin binding 1	0,027	3,72	4,22	4,24	1,134
11728248_a_at	TSFM	Ts translation elongation factor, mitochondrial	0,0078	4,8	4,32	4,56	-1,111
11757670_a_at	UQCR10	ubiquinol-cytochrome c reductase, complex III subunit X	0,012	6,12	6,4	6,38	1,046
11744059_a_at	UQCRC2	ubiquinol-cytochrome c reductase core protein II	0,018	7,58	8,02	8,02	1,058
11757847_s_at	UQCRFS1	ubiquinol-cytochrome c reductase, Rieske iron-sulfur polypeptide 1	0,015	6,8	7,11	7,05	1,046
11759575_at	UQCRH	ubiquinol-cytochrome c reductase hinge protein	0,0015	5,06	5,66	5,42	1,119
11715235_x_at	UQCRHL	ubiquinol-cytochrome c reductase hinge protein-like	0,016	6,12	6,48	6,31	1,059
Regulación de la señalización de eIF4 y p70S6K/ Señalización de EIF2/ Estructura del proteasoma							
Sonda	Símbolo	Nombre del gen	Valor p	R	NR	CS	FC
11761086_x_at	AKT2	v-akt murine thymoma viral oncogene homolog 2	0,049	7,13	6,94	7,11	-1,027
11754187_s_at	EIF2AK1	eukaryotic translation initiation factor 2-alpha kinase 1	0,035	5,45	5,8	5,77	1,064
11730991_a_at	EIF2AK2	eukaryotic translation initiation factor 2-alpha kinase 2	0,029	5,97	6,43	6,2	1,077
11717942_at	EIF2B1	eukaryotic translation initiation factor 2B, subunit 1 alpha, 26kDa	0,0065	4,95	5,38	5,26	1,087
11717673_a_at	EIF2B2	eukaryotic translation initiation factor 2B, subunit 2 beta, 39kDa	0,047	4,83	5,14	4,94	1,064
11755432_a_at	EIF2C1	eukaryotic translation initiation factor 2C, 1	0,0035	5,29	4,99	5,13	-1,06
11719180_a_at	EIF3D	eukaryotic translation initiation factor 3, subunit D	0,039	6,84	7,18	7,19	1,05
11743126_a_at	EIF3G	eukaryotic translation initiation factor 3, subunit G	0,027	7,13	7,51	7,48	1,053
11757613_x_at	EIF3K	eukaryotic translation initiation factor 3, subunit K	0,014	7,74	8,06	8,03	1,041
11743120_s_at	EIF4A1	eukaryotic translation initiation factor 4A1	0,023	9,29	9,55	9,46	1,028
11718284_x_at	EIF4EBP1	eukaryotic translation initiation factor 4E binding protein 1	0,016	4,67	5,21	4,91	1,116
11726567_a_at	EIF4G1	eukaryotic translation initiation factor 4 gamma, 1	0,0081	5,49	6,05	5,85	1,102
11717092_s_at	EIF4G2	eukaryotic translation initiation factor 4 gamma, 2	0,014	7,25	7,86	7,83	1,084
11740018_a_at	INSR	insulin receptor	0,023	6,68	6,33	6,65	1,055
11743628_at	IRS1	insulin receptor substrate 1	0,021	1,46	1,17	1,18	1,248
11721540_a_at	MAPK13	mitogen-activated protein kinase 13	0,028	3,41	3,13	3,25	1,089
11742487_a_at	MAPK14	mitogen-activated protein kinase 14	0,0058	5,99	5,33	5,65	1,124
11719189_at	NRAS	neuroblastoma RAS viral (v-ras) oncogene homolog	0,032	6,14	6,48	6,37	1,055

Tabla suplementaria 1

11748466_a_at	PIK3CB	phosphoinositide-3-kinase, catalytic, beta polypeptide	0,039	5,83	5,58	5,85	1,045
11751247_a_at	PIK3CD	phosphoinositide-3-kinase, catalytic, delta polypeptide	0,00016	4,92	4,31	4,71	1,142
11733018_s_at	PIK3R1	phosphoinositide-3-kinase, regulatory subunit 1 (alpha)	0,019	5,34	4,96	5,14	1,077
11756821_a_at	PPM1L	protein phosphatase, Mg ²⁺ /Mn ²⁺ dependent, 1L	0,044	4,18	3,9	4,12	1,072
11755018_a_at	PPP1CC	protein phosphatase 1, catalytic subunit, gamma isozyme	0,038	5,72	6,15	6,11	1,075
11726102_a_at	PPP2R3A	protein phosphatase 2 (formerly 2A), regulatory subunit B", alpha	0,016	1,83	1,47	1,6	1,245
11719874_a_at	PPP2R5B	protein phosphatase 2, regulatory subunit B', beta	0,025	2,59	3,09	2,94	1,193
11725404_x_at	RPL13	ribosomal protein L13	0,011	6,95	7,38	7,15	1,062
11755250_x_at	RPL13A	ribosomal protein L13a	0,02	9,51	9,74	9,64	1,024
11757889_s_at	RPL15	ribosomal protein L15	0,018	8,36	8,65	8,65	1,035
11763719_a_at	RPL18	ribosomal protein L18	0,025	2,26	2,69	2,51	1,19
11733815_at	RPL22L1	ribosomal protein L22-like 1	0,044	1,32	2,01	1,94	1,523
11736721_x_at	RPL32	ribosomal protein L32	0,00098	3,9	4,38	4,24	1,123
11758973_x_at	RPL36	ribosomal protein L36	0,019	5,01	5,41	5,19	1,08
11744326_s_at	RPL37	ribosomal protein L37 /// small nucleolar RNA, C/D box 72	0,039	7,99	8,38	8,34	1,049
11759821_at	RPL37A	ribosomal protein L37a	0,032	1,59	2,13	1,84	1,34
11717058_x_at	RPL5	ribosomal protein L5	0,034	9,35	9,67	9,63	1,034
11715958_s_at	RPL7	ribosomal protein L7	0,023	8,1	8,55	8,57	1,056
11756258_x_at	RPL8	ribosomal protein L8	0,015	9,24	9,53	9,45	1,031
11757772_x_at	RPLP0	ribosomal protein, large, P0	0,016	8,9	9,33	9,3	1,048
11758313_x_at	RPS10	ribosomal protein S10	0,032	8,99	9,36	9,22	1,041
11715376_a_at	RPS11	ribosomal protein S11	0,036	10,06	10,33	10,3	1,027
11757375_x_at	RPS15	ribosomal protein S15	0,028	10,39	10,63	10,6	1,023
11756437_x_at	RPS18	ribosomal protein S18	0,029	8,59	9,1	9,07	1,059
11759564_x_at	RPS2	ribosomal protein S2	0,0028	7,96	8,41	8,16	1,057
11757408_x_at	RPS20	ribosomal protein S20	0,048	10,53	10,72	10,67	1,018
11757514_x_at	RPS27	ribosomal protein S27	0,043	11,12	11,42	11,4	1,027
11763284_a_at	RPS28	ribosomal protein S28	0,0028	2,96	2,54	2,67	1,165
11730323_at	RPS29	ribosomal protein S29	0,0046	7,23	7,65	7,49	1,058
11757780_x_at	RPS4X	ribosomal protein S4, X-linked	0,035	10,16	10,44	10,4	1,028
11716040_a_at	RPS5	ribosomal protein S5	0,0064	8,11	8,56	8,5	1,055
11763007_x_at	RPS6	ribosomal protein S6	0,0073	9,96	10,25	10,14	1,029

Tabla suplementaria 1

Ubiquitinización proteica/Proteasoma							
Sonda	Símbolo	Nombre del gen	Valor p	R	NR	CS	FC
11757937_s_at	BIRC2	baculoviral IAP repeat-containing 2	0,019	7,26	7,59	7,48	1,045
11742930_a_at	BIRC6	baculoviral IAP repeat-containing 6	0,046	5,79	5,41	5,81	-1,07
11754036_s_at	UBE2F	ubiquitin-conjugating enzyme E2F (putative)	0,03	4,56	4,13	4,28	-1,104
11761212_at	CDC20	cell division cycle 20 homolog (S, cerevisiae)	0,0084	2,3	2	2,16	-1,15
11753939_x_at	PSMB10	proteasome (prosome, macropain) subunit, beta type, 10	0,0055	6,1	6,36	6,13	1,043
11747353_a_at	CUL1	cullin 1	0,033	6,57	6,95	6,95	1,058
11719252_a_at	DNAJB5	DnaJ (Hsp40) homolog, subfamily B, member 5	0,0079	2,38	3,07	2,39	1,29
11716330_a_at	DNAJB6	DnaJ (Hsp40) homolog, subfamily B, member 6	0,014	3,08	2,55	2,77	-1,208
11745564_x_at	DNAJC4	DnaJ (Hsp40) homolog, subfamily C, member 4	0,027	5,3	5,59	5,48	1,055
11763162_a_at	DNAJC9	DnaJ (Hsp40) homolog, subfamily C, member 9	0,031	2,21	1,92	1,98	-1,151
11742066_a_at	FZR1	fizzy/cell division cycle 20 related 1 (Drosophila)	0,039	4,13	3,81	3,95	-1,084
11762940_x_at	HLA-C	major histocompatibility complex, class I, C	0,026	4,32	4,88	4,68	1,13
11758308_s_at	HSP90AA1	heat shock protein 90kDa alpha (cytosolic), class A member 1	0,024	7,04	7,5	7,43	1,065
11754607_s_at	HSP90B1	heat shock protein 90kDa beta (Grp94), member 1	0,0042	7,45	7,95	7,84	1,067
11719071_s_at	HSPA13	heat shock protein 70kDa family, member 13	0,021	5,43	5,98	5,8	1,101
11729119_a_at	HSPA1A	heat shock 70kDa protein 1A /// heat shock 70kDa protein 1B	0,015	4,81	6	5,63	1,247
11727138_a_at	HSPA1L	heat shock 70kDa protein 1-like	0,032	3,13	2,76	3,11	-1,134
11724723_a_at	HSPA2	heat shock 70kDa protein 2	0,0071	1,92	1,61	1,74	-1,193
11762261_x_at	HSPA8	heat shock 70kDa protein 8	0,014	8,04	8,5	8,47	1,057
11750745_a_at	HSPA9	heat shock 70kDa protein 9 (mortalin)	0,011	6,03	6,43	6,29	1,066
11737053_s_at	HSPD1	heat shock 60kDa protein 1 (chaperonin)	0,0067	6,55	7,33	7,23	1,119
11716351_s_at	HSPE1	heat shock 10kDa protein 1 (chaperonin 10)	0,01	8,31	8,75	8,69	1,053
11753964_x_at	HSPH1	heat shock 105kDa/110kDa protein 1	0,0045	3,73	4,52	4,13	1,212
11753688_a_at	MDM2	Mdm2 p53 binding protein homolog (mouse)	0,032	7,61	7,14	7,24	-1,066
11757311_x_at	POMP	proteasome maturation protein	0,021	8,8	9,18	9,14	1,043
11757361_x_at	PSMA2	proteasome (prosome, macropain) subunit, alpha type, 2	0,0099	8,1	8,59	8,62	1,06
11721906_s_at	PSMA4	proteasome (prosome, macropain) subunit, alpha type, 4	0,00032	7,26	7,76	7,65	1,069
11757295_x_at	PSMA6	proteasome (prosome, macropain) subunit, alpha type, 6	0,018	7,91	8,39	8,29	1,061
11719787_x_at	PSMB5	proteasome (prosome, macropain) subunit, beta type, 5	0,032	4,34	4,66	4,48	1,074

Tabla suplementaria 1

11715665_a_at	PSMB8	proteasome (prosome, macropain) subunit, beta type, 8 (large multifunctional peptidase 7)	0,036	7,12	7,5	7,5	1,053
11735623_a_at	PSMB9	proteasome (prosome, macropain) subunit, beta type, 9 (large multifunctional peptidase 2)	0,019	6,29	6,83	6,62	1,086
11716545_x_at	PSMC1	proteasome (prosome, macropain) 26S subunit, ATPase, 1	0,047	7,63	7,81	7,72	1,024
11715815_a_at	PSMC3	proteasome (prosome, macropain) 26S subunit, ATPase, 3	0,035	5,19	5,49	5,33	1,058
11718882_x_at	PSMC4	proteasome (prosome, macropain) 26S subunit, ATPase, 4	0,0082	6,21	6,55	6,65	1,055
11739153_a_at	PSMD5	proteasome (prosome, macropain) 26S subunit, non-ATPase, 5	0,039	5,33	4,91	5,11	-1,086
11732145_a_at	PSMD8	proteasome (prosome, macropain) 26S subunit, non-ATPase, 8	0,015	6,14	6,52	6,42	1,062
11733370_a_at	PSME1	proteasome (prosome, macropain) activator subunit 1 (PA28 alpha)	0,034	8,28	8,65	8,57	1,045
11758693_s_at	PSME2	proteasome (prosome, macropain) activator subunit 2 (PA28 beta)	0,0023	9,5	9,95	9,86	1,047
11743499_a_at	PSMG4	proteasome (prosome, macropain) assembly chaperone 4	0,0011	4,52	5,39	4,9	1,192
11757351_a_at	TAP1	transporter 1, ATP-binding cassette, sub-family B (MDR/TAP)	0,0056	6,16	6,64	6,51	1,078
11751572_a_at	TAPBP	TAP binding protein (tapasin)	0,029	5,03	5,38	5,13	1,07
11744535_s_at	TCEB1	transcription elongation factor B (SIII), polypeptide 1 (15kDa, elongin C)	0,044	6,52	6,84	6,79	1,049
11716607_a_at	TCEB2	transcription elongation factor B (SIII), polypeptide 2 (18kDa, elongin B)	0,0024	8,72	9,04	9,03	1,037
11762594_at	UBA1	ubiquitin-like modifier activating enzyme 1	0,023	2,17	2,82	2,77	1,3
11742942_s_at	UBE2D3	ubiquitin-conjugating enzyme E2D 3 (UBC4/5 homolog, yeast)	0,049	6,37	6,66	6,43	1,046
11757878_s_at	UBE2E1	ubiquitin-conjugating enzyme E2E 1 (UBC4/5 homolog, yeast)	0,038	7,84	8,26	8,17	1,054
11729616_a_at	UBE2J2	ubiquitin-conjugating enzyme E2, J2 (UBC6 homolog, yeast)	0,04	3,47	3,25	3,19	-1,068
11721994_s_at	UBE2L6	ubiquitin-conjugating enzyme E2L 6	0,001	7,87	8,31	8,21	1,056
11758784_at	UBE3A	Ubiquitin protein ligase E3A	0,046	3	2,75	2,71	-1,091
11720502_s_at	UBE4B	ubiquitination factor E4B (UFD2 homolog, yeast)	0,018	8,03	7,74	7,8	-1,037
11761223_at	USP15	ubiquitin specific peptidase 15	0,05	4,3	3,96	4,14	-1,086
11761542_at	USP41	ubiquitin specific peptidase 41	0,023	1,82	1,55	1,76	-1,174
11737273_at	USP49	ubiquitin specific peptidase 49	0,041	1,84	2,14	1,92	1,163
11725060_s_at	USP7	ubiquitin specific peptidase 7 (herpes virus-associated)	0,014	6,5	7	6,78	1,077
11725698_x_at	XIAP	X-linked inhibitor of apoptosis	0,037	2,78	2,42	2,9	-1,149

Tabla suplementaria 2

<https://www.dropbox.com/sh/g6cqiythp3argte/Jf5p0nrPcY>

Tabla suplementaria 3

SNP	Gen	NCBI	Cromosoma	BP	MAF cau	Localización	LRG	Codificación	Cambio aa	Risk	OR	Valor p
rs10958713	IKBKB	3551	8	42180716	0,41	intron	-704	-1	-1	G	1,376	0,003
rs3747517	IFIH1	64135	2	163128824	0,21	coding	[88/73]	NONSYN	H843R (NP_71451.2)	A	1,345	0,010
rs2277302	PELI3	246330	11	66240882	0,27	coding	[170/24]	SYNON	D209D (NP_659502.2)	A	1,359	0,017
rs4422395	CXCL1	2919	4	74741983	0,12	flanking_3UTR	-5030			A	1,418	0,017
rs6597	STUB1	339123	16	731725	0,16	3UTR	[58/1068]	-1	-1	A	1,466	0,019
rs2834202	IFNAR1	3454	21	34730954	0,29	3UTR	[3098/1175]	-1	-1	G	1,290	0,030
rs2239911	SARM1	23098	17	26723613	0,48	3UTR	[307/4452]	-1	-1	A	1,258	0,031
rs2246444	TYRO3	7301	15	41865488	0,33	intron	-18	-1	-1	A	1,262	0,032
rs4251520	IRAK4	51135	12	44175338	0,12	intron	-772	-1	-1	G	1,417	0,041
rs8177376	TIRAP	114609	11	126163612	0,25	3UTR	[29/1216]	-1	-1	C	1,279	0,053
rs1719153	CCL4	6351	17	34433229	0,28	flanking_3UTR	-215	-1	-1	T	1,277	0,056
rs7255265	TICAM1	148022	19	4818378	0,35	coding	[2127/11]	-1	-1	A	1,225	0,062
rs6457878	MAPK14	1432	6	36076280	0,15	3UTR	[55/2255]	-1	-1	A	1,406	0,070
rs2229857	ADAR	103	1	154573967	0,33	coding	[450/265]	NONSYN	K89R (NP_12278.1)	A	1,217	0,076
rs5277	PTGS2	5743	1	186648197	0,24	coding	[7/136]	SYNON	V12V (NP_954.1)	C	1,265	0,083
rs6870870	LOC727988	727988	5	55294328	0,41	flanking_3UTR	-3016			C	1,197	0,084
rs17765088	CCR9	10803	3	45943595	0,10	3UTR	[204/1071]	-1	-1	G	1,349	0,092
rs12432194	IRF9	10379	14	24636025	0,11	flanking_3UTR	-251	-1	-1	A	1,260	0,092
rs1290149	ADAM12	8038	10	127729754	0,29	intron	-160	-1	-1	G	1,206	0,093
rs8177352	TIRAP	114609	11	126153843	0,19	intron	-795	-1	-1	A	1,234	0,102
rs4807650	TICAM1	148022	19	4821612	0,46	flanking_5UTR	-3161			G	1,185	0,104
rs17021220	UBE2N	7334	12	93810859	0,13	intron	-5784	-1	-1	G	1,262	0,105
rs303210	IFIT1	3434	10	91162677	0,12	3UTR	[627/929]	SYNON	D215D (NP_11887.1)	A	1,250	0,110
rs702688	MAP3K1	4214	5	56190986	0,38	3UTR	[1478/993]	-1	-1	A	1,186	0,113
rs8101605	LILRB1	10859	19	55148487	0,15	3UTR	[157/520]	-1	-1	G	1,248	0,119
rs6853	MYD88	4615	3	38184370	0,13	3UTR	[1592/143]	-1	-1	A	1,266	0,119
rs3845978	PTX3	5806	3	157159694	0,07	intron	-461	-1	-1	G	1,541	0,128
rs832575	MAP3K1	4214	5	56161787	0,12	coding	[131/17]	SYNON	T664T (XP_4266.1)	G	1,265	0,130
rs11894425	STAT1	6772	2	191837841	0,43	intron	-1715	-1	-1	A	1,176	0,133
rs3811632	MERTK	10461	2	112754828	0,29	intron	-72	-1	-1	A	1,199	0,135
rs370655	CXCL3	2921	4	74903134	0,36	intron	-140	-1	-1	A	1,172	0,135

Tabla suplementaria 3

rs7742990	MAP3K7IP2	23118	6	149704526	0,12	intron	-3872	-1	-1	A	1,291	0,144
rs11070339	TYRO3	7301	15	41856543	0,42	intron	-75	-1	-1	G	1,163	0,153
rs5275	PTGS2	5743	1	186643058	0,31	3UTR	[2089/426]	-1	-1	A	1,168	0,157
rs7628626	CD80	941	3	119244421	0,20	3UTR	[1281/175]	-1	-1	A	1,199	0,158
rs1990760	IFIH1	64135	2	163124051	0,39	coding	[62/28]	NONSYN	A946T (NP_71451.2)	G	1,160	0,163
rs315921	IL1RN	3557	2	113872051	0,15	flanking_5UTR	-3419			A	1,216	0,166
rs11136286	LY6E	4061	8	144102493	0,32	intron	-85	-1	-1	G	1,162	0,172
rs4732	ADAM12	8038	10	127730144	0,11	3UTR	[230/556]	-1	-1	A	1,265	0,183
rs11820062	RELA	5970	11	65429936	0,50	intron	-260	-1	-1	G	1,147	0,189
rs962409	BCL10	8915	1	85732941	0,49	3UTR	[1010/368]	-1	-1	C	1,146	0,190
rs3093662	TNF	7124	6	31544189	0,07	intron	-122	-1	-1	G	1,240	0,198
rs1150258	IL24	11009	1	207074905	0,44	coding	[66/92]	NONSYN	Y124H (NP_6841.1)	A	1,141	0,204
rs987495	IFI44L	10964	1	79095581	0,24	coding	[176/19]	NONSYN	I196T (NP_6811.1)	A	1,165	0,208
rs1552931	UBE2E2	7325	3	23248486	0,34	intron	-1697	-1	-1	G	1,148	0,230
rs9131	CXCL2	2920	4	74963049	0,35	3UTR	[293/423]	-1	-1	A	1,134	0,236
rs2248202	IFNAR2	3455	21	34603880	0,27	intron	-1359	-1	-1	A	1,140	0,238
rs7486100	TBK1	29110	12	64875787	0,47	coding	[165/14]	SYNON	I326I (NP_37386.1)	A	1,129	0,245
rs2292305	THBS1	7057	15	39880822	0,10	coding	[95/78]	NONSYN	T523A (NP_3237.2)	G	1,186	0,250
rs9991272	CXCL1	2919	4	74742402	0,21	flanking_3UTR	-5449			A	1,152	0,254
rs17665482	CARD8	22900	19	48736223	0,32	intron	-1156	-1	-1	C	1,136	0,259
rs1609798	NFKB1	4790	4	103537442	0,33	intron	-149	-1	-1	G	1,135	0,260
rs1889532	ARHGEF2	9181	1	155951502	0,27	flanking_5UTR	-3551			A	1,145	0,264
rs702689	MAP3K1	4214	5	56177443	0,30	coding	[46/1250]	NONSYN	D142N (XP_4266.1)	G	1,134	0,268
rs3775291	TLR3	7098	4	187004074	0,33	coding	[600/1252]	NONSYN	L412F (NP_3256.1)	A	1,132	0,269
rs3771300	STAT1	6772	2	191835596	0,48	intron	-153	-1	-1	C	1,122	0,272
rs40544	RIPK2	8767	8	90781095	0,39	intron	-905	-1	-1	A	1,121	0,273
rs7719246	IL6ST	3572	5	55244777	0,14	intron	-1360	-1	-1	A	1,173	0,279
rs1127313	ADAR	103	1	154556425	0,43	3UTR	[1892/856]	-1	-1	G	1,118	0,285
rs280523	TYK2	7297	19	10477206	0,10	coding	[113/501]	SYNON	T172T (NP_3322.2)	A	1,257	0,291
rs10735510	ATF3	467	1	212785460	0,42	intron	-2900	-1	-1	G	1,113	0,302
rs5743291	NOD2	64127	16	50757276	0,11	coding	[64/19]	NONSYN	V955I (NP_71445.1)	G	1,190	0,309
rs7099772	ADAM12	8038	10	127729222	0,41	intron	-692	-1	-1	G	1,112	0,316
rs17226566	LY96	23643	8	74919912	0,27	intron	-2324	-1	-1	A	1,134	0,317
rs2285933	OAS3	4940	12	113386779	0,22	coding	[113/231]	NONSYN	S381R (NP_6178.2)	G	1,127	0,319
rs321058	NFKB1	4790	4	103508824	0,46	intron	-2847	-1	-1	A	1,113	0,319
rs2304204	IRF3	3661	19	50169020	0,28	UTR	[132/94]	-1	-1	G	1,125	0,320
rs4129460	MAP3K7IP3	257397	23	30951398	0,07	intron	-34118	-1	-1	A	1,290	0,328
rs3024866	STAT4	6775	2	191922841	0,31	intron	-4	-1	-1	A	1,123	0,330
rs16945874	ABCC12	94160	16	48175235	0,12	coding	[122/29]	NONSYN	A12E (NP_15229.2)	C	1,179	0,341

Tabla suplementaria 3

rs11217234	CBL	867	11	119177938	0,31	3UTR	[7446/921]	-1	-1	A	1,120	0,343
rs3775296	TLR3	7098	4	186997767	0,16	UTR	[0/6]	-1	-1	C	1,134	0,345
rs4804461	PIN1	5300	19	9959556	0,28	intron	-210	-1	-1	G	1,119	0,349
rs10471960	IL6ST	3572	5	55236374	0,12	flanking_3UTR	-320	-1	-1	A	1,150	0,363
rs10199616	MERTK	10461	2	112737185	0,32	intron	-3234	-1	-1	A	1,102	0,368
rs2257167	IFNAR1	3454	21	34715699	0,13	coding	[125/29]	NONSYN	V168L (NP_62.2)	G	1,128	0,379
rs390993	RIPK2	8767	8	90773210	0,20	intron	-1848	-1	-1	G	1,117	0,379
rs2066804	STAT1	6772	2	191841759	0,33	intron	-8	-1	-1	G	1,116	0,382
rs1267068	TANK	10010	2	162012135	0,33	intron	-18561	-1	-1	A	1,100	0,388
rs1293755	OAS2	4939	12	113435450	0,35	coding	[125/110]	SYNON	V251V (NP_2526.2)	A	1,099	0,392
rs10500299	CARD8	22900	19	48722180	0,25	coding	[52/89]	SYNON	E311E (NP_55774.1)	G	1,107	0,394
rs698366	TMED7	51014	5	114951140	0,41	3UTR	[1937/765]	-1	-1	C	1,094	0,394
rs3213545	OASL	8638	12	121471337	0,30	coding	[73/209]	SYNON	L136L (NP_3724.1)	A	1,100	0,406
rs2287838	PIN1	5300	19	9959014	0,45	intron	-198	-1	-1	A	1,090	0,409
rs4251961	IL1RN	3557	2	113874467	0,40	flanking_5UTR	-1003	-1	-1	G	1,092	0,409
rs3748022	IKBKE	9641	1	206669465	0,28	coding	[20/13]	NONSYN	P713L (NP_54721.1)	G	1,110	0,410
rs2735592	LOC646626	646626	1	85743741	0,25	3UTR	[354/30]	-1	-1	A	1,100	0,417
rs9616	ADAR	103	1	154555733	0,27	3UTR	[1200/1548]	-1	-1	T	1,095	0,420
rs10887946	IFIT3	3437	10	91090086	0,20	intron	-2217	-1	-1	A	1,110	0,424
rs7251	IRF3	3661	19	50162909	0,31	coding	[4/181]	NONSYN	S427T (NP_1562.1)	C	1,092	0,425
rs3168046	TOLLIP	54472	11	1296649	0,43	3UTR	[1048/1619]	-1	-1	G	1,087	0,428
rs4853533	STAT1	6772	2	191836771	0,38	intron	-1328	-1	-1	G	1,089	0,428
rs7310161	PTPN6	5777	12	7057134	0,40	intron	-1232	-1	-1	T	1,086	0,431
rs1004420	LCK	3932	1	32729702	0,11	intron	-10224	-1	-1	C	1,127	0,437
rs954439	IFIT2	3433	10	91066460	0,50	coding	[741/708]	SYNON	V249V (NP_1538.3)	A	1,084	0,438
rs13311	OAS2	4939	12	113448652	0,39	3UTR	[362/876]	-1	-1	A	1,089	0,441
rs1539243	IKBKE	9641	1	206647787	0,14	coding	[113/27]	SYNON	I67I (NP_54721.1)	G	1,119	0,444
rs11576939	BCL10	8915	1	85742012	0,33	coding	[33/23]	SYNON	L8L (NP_3912.1)	G	1,089	0,447
rs2230460	PIK3CG	5294	7	106524689	0,15	coding	[89/22]	SYNON	D95D (NP_264.2)	A	1,130	0,478
rs1559526	TANK	10010	2	162015831	0,41	intron	-20294	-1	-1	A	1,078	0,481
rs2292151	TICAM1	148022	19	4816719	0,29	coding	[226/1258]	NONSYN	D42M (NP_5576.1)	G	1,097	0,482
rs2305619	PTX3	5806	3	157154861	0,49	intron	-9	-1	-1	G	1,075	0,487
rs4251067	IL1RN	3557	2	113874068	0,17	flanking_5UTR	502	-1	-1	G	1,085	0,488
rs1900300	MAP3K7IP2	23118	6	149641627	0,48	intron	-2476	-1	-1	G	1,075	0,494
rs14355	HSPA4	3308	5	132440285	0,28	3UTR	[156/424]	-1	-1	C	1,085	0,498
rs4251513	IRAK4	51135	12	44174204	0,49	intron	-1906	-1	-1	G	1,073	0,500
rs5750824	MAP3K7IP1	10454	22	39830123	0,20	intron	-2236	-1	-1	A	1,100	0,512
rs708563	MAP3K14	9020	17	43340936	0,49	3UTR	[441/1066]	-1	-1	A	1,070	0,517
rs39508	RIPK2	8767	8	90795302	0,48	intron	-976	-1	-1	G	1,071	0,521

Tabla suplementaria 3

rs268566	TRAM1	23471	8	71486568	0,17	3UTR	[895/598]	-1	-1	C	1,095	0,522
rs16824035	STAT1	6772	2	191837634	0,21	intron	-1922	-1	-1	G	1,093	0,527
rs4858483	UBE2E2	7325	3	23249069	0,31	intron	-1114	-1	-1	C	1,071	0,528
rs3448	RHOA	387	3	49396751	0,40	3UTR	[173/890]	-1	-1	A	1,077	0,529
rs6012846	TMEM189	387521	20	48737514	0,48	flanking_3UTR	-2793	-1	-1	A	1,069	0,530
rs1077667	TNFSF14	8740	19	6668972	0,21	intron	-890	-1	-1	G	1,086	0,533
rs2799	IFI27	3429	14	94582926	0,03	3UTR	[61/107]	-1	-1	G	1,156	0,534
rs4807651	TICAM1	148022	19	4822855	0,35	flanking_5UTR	-4404			A	1,070	0,534
rs7342715	CYLD	1540	16	50787483	0,48	intron	-747	-1	-1	G	1,067	0,535
rs7913591	ADAM12	8038	10	127705404	0,33	3UTR	[1979/443]	-1	-1	G	1,068	0,545
rs1333973	IFI44L	10964	1	79094081	0,27	intron	-3	-1	-1	A	1,068	0,546
rs7949	MAP3K7IP1	10454	22	39827553	0,25	3UTR	[1325/334]	-1	-1	G	1,066	0,546
rs3173908	PIK3CG	5294	7	106546087	0,27	3UTR	[254/1505]	-1	-1	G	1,080	0,553
rs2660	OAS1	4938	12	113357442	0,36	3UTR	[83/270]	NONSYN	G397R	G	1,067	0,555
rs709012	SIGLEC1	6614	20	3675498	0,42	coding	[188/72]	NONSYN	H919P (NP_75556.1)	A	1,066	0,558
rs2289743	TYRO3	7301	15	41860698	0,35	intron	-138	-1	-1	G	1,068	0,558
rs9304675	CARD8	22900	19	48737449	0,30	intron	-211	-1	-1	C	1,065	0,576
rs1921	ISG15	9636	1	949608	0,40	coding	[244/250]	NONSYN	S83N (NP_005092.1)	G	1,062	0,579
rs1724120	DUSP2	1844	2	96809331	0,47	3UTR	[420/230]	-1	-1	G	1,060	0,580
rs1025689	IL17RB	55540	3	53883722	0,34	coding	[40/100]	SYNON	P42P (NP_61195.2)	C	1,061	0,583
rs7845046	UBE2V2	7336	8	48926264	0,07	intron	-5234	-1	-1	T	1,131	0,585
rs7744	MYD88	4615	3	38184021	0,14	3UTR	[1243/492]	-1	-1	A	1,083	0,596
rs2227543	IL8	3576	4	74607910	0,30	intron	-161	-1	-1	G	1,058	0,599
rs1059447	MAIT1	10897	18	56416693	0,10	3UTR	[1618/677]	-1	-1	G	1,089	0,604
rs1049871	TMEM189-UBE2V1	387522	20	48697791	0,18	UTR	[130/1513]	-1	-1	T	1,081	0,606
rs11066301	PTPN11	5781	12	112871372	0,35	flanking_5UTR	-12708	-1	-1	A	1,054	0,609
rs625413	TIRAP	114609	11	126164349	0,24	3UTR	[766/479]	-1	-1	A	1,060	0,626
rs889916	TANK	10010	2	162032662	0,15	intron	-3463	-1	-1	A	1,069	0,635
rs12720356	TYK2	7297	19	10469975	0,10	coding	[124/3]	NONSYN	I684S (NP_3322.2)	C	1,105	0,638
rs12149826	ABCC12	94160	16	48164777	0,40	coding	[78/29]	SYNON	V386V (NP_15229.2)	G	1,055	0,642
rs16938758	LY96	23643	8	74919749	0,19	intron	-2487	-1	-1	A	1,060	0,650
rs4959774	RIPK1	8737	6	3076336	0,11	flanking_5UTR	-722	-1	-1	A	1,076	0,656
rs11911133	IFNAR2	3455	21	34629175	0,36	intron	-3727	-1	-1	G	1,051	0,657
rs1047833	MAP3K14	9070	17	43342141	0,35	coding	[138/261]	NONSYN	S92* (NP_3945.2)	G	1,050	0,659
rs12667819	PIK3CG	5294	7	106546657	0,44	3UTR	[824/935]	-1	-1	A	1,047	0,660
rs1051442	THBS1	7057	15	39887649	0,15	3UTR	[78/2019]	-1	-1	A	1,060	0,667
rs2277624	ABCC3	8714	17	48761105	0,08	coding	[134/12]	SYNON	H1314H (NP_3777.2)	A	1,054	0,668
rs625372	SIGLEC1	6614	20	3684729	0,43	coding	[257/9]	NONSYN	K239R (NP_75556.1)	G	1,048	0,669
rs280519	TYK2	7297	19	10472933	0,48	intron	-7	-1	-1	G	1,046	0,671

Tabla suplementaria 3

rs15895	OAS2	4939	12	113448288	0,38	coding	[109/1]	-1	-1	A	1,047	0,671
rs1800797	IL6	3569	7	22766221	0,48	flanking_5UTR	-599	-1	-1	A	1,044	0,683
rs4669114	RSAD2	91543	2	7036621	0,10	3UTR	[547/1742]	-1	-1	A	1,074	0,685
rs4648127	NFKB1	4790	4	103535905	0,10	intron	-1167	-1	-1	G	1,098	0,685
rs2230804	CHUK	1147	10	101977883	0,50	coding	[131/4]	NONSYN	V268I (NP_1269.3)	A	1,043	0,685
rs7119750	RELA	5970	11	65422591	0,16	intron	-120	-1	-1	A	1,065	0,690
rs6125890	TMEM189-UBE2V1	387522	20	48703970	0,29	flanking_5UTR	-3179	-1	-1	G	1,048	0,695
rs7743206	CD83	9308	6	14131804	0,16	coding	[53/175]	SYNON	R69R (NP_13537.1)	G	1,057	0,700
rs348389	TNFSF9	8744	19	6535637	0,38	3UTR	[559/296]	-1	-1	A	1,043	0,704
rs7967461	OAS3	4940	12	113369759	0,40	flanking_5UTR	-6490			G	1,041	0,707
rs11783456	LY96	23643	8	74918171	0,37	intron	-1051	-1	-1	G	1,043	0,713
rs1062484	ITGA3	3675	17	48167362	0,35	3UTR	[732/482]	-1	-1	G	1,045	0,715
rs2302759	CYLD	1540	16	50827601	0,14	intron	-26	-1	-1	G	1,054	0,720
rs2326173	RIPK1	8737	6	3075553	0,33	flanking_5UTR	-1505	-1	-1	A	1,038	0,729
rs8070488	HGS	9146	17	79663931	0,23	coding	[77/97]	SYNON	P595P (NP_473.1)	A	1,040	0,739
rs1551443	STAT4	6775	2	191996518	0,33	intron	-14821	-1	-1	G	1,036	0,740
rs7699006	HERC5	51191	4	89397091	0,30	coding	[99/90]	NONSYN	M498V (NP_5747.2)	G	1,038	0,748
rs12810210	OAS1	8638	12	121458400	0,22	coding	[36/461]	SYNON	S53S (NP_3724.1)	G	1,046	0,748
rs1874328	IRF5	3663	7	128585104	0,30	intron	-795	-1	-1	A	1,034	0,754
rs3740199	ADAM12	8038	10	128019025	0,42	coding	[44/53]	NONSYN	G48R (NP_3465.3)	C	1,031	0,772
rs3017	IL17RB	55540	3	53899580	0,39	3UTR	[244/247]	-1	-1	G	1,032	0,773
rs2304231	AXL	558	19	41762670	0,15	intron	-154	-1	-1	A	1,041	0,774
rs1046668	TNFAIP6	7130	2	152226570	0,14	coding	[36/192]	NONSYN	Q144R (NP_946.2)	G	1,044	0,775
rs5030419	TRAF6	7189	11	36530743	0,22	intron	-855	-1	-1	C	1,043	0,789
rs268593	TRAM1	23471	8	71512377	0,33	intron	-60	-1	-1	A	1,029	0,798
rs3769823	CASP8	841	2	202122995	0,38	5UTR	[216/110]	-1	-1	A	1,029	0,800
rs2072138	OAS2	4939	12	113424893	0,23	coding	[50/220]	SYNON	T76T (NP_12793.1)	G	1,030	0,802
rs2066843	NOD2	64127	16	50745199	0,36	coding	[730/1085]	SYNON	R459R (NP_71445.1)	A	1,029	0,804
rs2285932	OAS3	4940	12	113386950	0,39	coding	[284/60]	SYNON	I438I (NP_6178.2)	A	1,028	0,804
rs12732199	IFI6	2537	1	27996472	0,36	intron	-615	-1	-1	A	1,028	0,805
rs1894644	HIF0	3005	22	38202552	0,13	3UTR	[415/891]	-1	-1	G	1,034	0,814
rs2072136	OAS3	4940	12	113398919	0,23	coding	[43/132]	SYNON	S567S (NP_6178.2)	G	1,031	0,814
rs1126526	ATF3	467	1	212793505	0,10	3UTR	[607/612]	-1	-1	G	1,034	0,815
rs2271546	AXL	558	19	41727197	0,12	intron	-46	-1	-1	A	1,038	0,820
rs256996	TICAM2	353376	5	114916090	0,49	3UTR	[1742/155]	-1	-1	A	1,023	0,825
rs1232220	IFIT3	2437	10	91088706	0,27	intron	-961	-1	-1	A	1,027	0,828
rs3125296	ATF3	467	1	212778286	0,19	intron	-3708	-1	-1	G	1,024	0,837
rs1138357	BCL2A1	597	15	80263406	0,25	coding	[364/55]	NONSYN	C19Y (NP_44.1)	A	1,023	0,842
rs752637	IRF5	3663	7	128579420	0,45	intron	-1122	-1	-1	A	1,022	0,845

Tabla suplementaria 3

rs6920337	RIPK1	8737	6	3073912	0,23	flanking_5UTR	-3146			A	1,022	0,855
rs2070845	IFIT2	3433	10	91066075	0,27	coding	[356/1093]	NONSYN	K121R (NP_1538.3)	A	1,022	0,855
rs15672	IKBKE	9641	1	206669958	0,43	UTR	[479/264]	-1	-1	G	1,019	0,856
rs3807306	IRF5	3663	7	128580680	0,50	intron	-1444	-1	-1	C	1,019	0,857
rs11536889	TLR4	7099	9	120478131	0,10	3UTR	[1204/1637]	-1	-1	C	1,026	0,857
rs2292692	ADAM12	8038	10	127737930	0,17	coding	[108/90]	SYNON	P66P (NP_3465.3)	G	1,025	0,858
rs8177375	TIRAP	114609	11	126163064	0,09	3UTR	[51/7]	-1	-1	A	1,018	0,863
rs3750920	TOLLIP	54472	11	1309956	0,44	coding	[102/50]	SYNON	P139P (NP_61882.2)	G	1,018	0,868
rs695161	LCK	3932	1	32743866	0,48	intron	-1406	-1	-1	G	1,017	0,872
rs16967637	STAT5A	6776	17	40446422	0,26	intron	-1215	-1	-1	C	1,018	0,880
rs673114	SIGLEC1	6614	20	3677736	0,41	coding	[4/253]	SYNON	V792V (NP_75556.1)	A	1,016	0,883
rs7958372	PTPN11	5781	12	112935553	0,13	intron	-4395	-1	-1	G	1,028	0,884
rs6431838	RSAD2	91543	2	7036838	0,37	3UTR	[764/1525]	-1	-1	C	1,015	0,888
rs157688	MAP3K7	6885	6	91260867	0,31	intron	-599	-1	-1	A	1,016	0,888
rs3181248	RIPK3	11035	14	24808168	0,37	intron	-53	-1	-1	G	1,015	0,890
rs10113478	RIPK2	8767	8	90778902	0,11	intron	-1178	-1	-1	A	1,031	0,892
rs11227491	PELI3	246330	11	66237178	0,02	intron	-803	-1	-1	A	1,105	0,895
rs3783525	IL1A	3552	2	113541819	0,29	intron	-201	-1	-1	A	1,015	0,898
rs3746660	VISA	57506	20	3846843	0,48	3UTR	[48/1130]	-1	-1	A	1,013	0,900
rs730430	ADAM1	23008	17	26723822	0,26	3UTR	[516/1243]	-1	-1	A	1,018	0,902
rs784501	AXUD1	64651	3	39183895	0,17	3UTR	[549/650]	-1	-1	G	1,015	0,904
rs3734665	CD83	9308	6	14136373	0,19	3UTR	[905/776]	-1	-1	G	1,016	0,909
rs7105001	FADD	8772	11	70051949	0,48	intron	-290	-1	-1	G	1,011	0,917
rs2396506	CCL20	6364	2	228680580	0,03	intron	-296	-1	-1	G	1,023	0,919
rs3730358	AKT1	207	14	105246407	0,15	intron	-18	-1	-1	G	1,014	0,920
rs661561	TNFAIP3	7128	6	138197331	0,41	intron	-28	-1	-1	C	1,011	0,924
rs1051640	ABCC3	8714	17	48768486	0,18	coding	[33/75]	SYNON	E153E (NP_3777.2)	G	1,012	0,925
rs7631705	UBE2E2	7325	3	23632234	0,17	flanking_3UTR	-164	-1	-1	G	1,011	0,927
rs7873784	TLR4	7099	9	120478936	0,14	3UTR	[2009/832]	-1	-1	C	1,013	0,929
rs39764	RIPK2	8767	8	90780341	0,33	intron	-1659	-1	-1	A	1,008	0,945
rs11066323	PTPN11	5781	12	112923361	0,10	intron	-918	-1	-1	A	1,012	0,949
rs13117745	NFKB1	4790	4	103478703	0,18	intron	-9442	-1	-1	G	1,008	0,952
rs2569190	CD14	929	5	140012916	0,47	5UTR	[259/94]	-1	-1	A	1,006	0,952
rs7269320	VISA	57506	20	3846397	0,14	coding	[67/397]	NONSYN	S49F (NP_65797.2)	A	1,007	0,953
rs2230587	JAK1	3716	1	65311262	0,08	coding	[66/61]	SYNON	S671S (NP_2218.2)	G	1,010	0,954
rs7280479	IFNAR2	3455	21	34611197	0,13	intron	-2948	-1	-1	G	1,009	0,956
rs17561	IL1A	3552	2	113537223	0,31	coding	[150/20]	NONSYN	A114S (NP_566.3)	A	1,006	0,960
rs12204461	MAP3K7IP2	23118	6	149701535	0,22	intron	-881	-1	-1	A	1,006	0,961
rs3746455	ITCH	83737	20	32957216	0,43	UTR	[16/60]	-1	-1	G	1,005	0,962

Tabla suplementaria 3

rs3804452	MAPK14	1432	6	36076934	0,13	3UTR	[709/1601]	-1	-1	G	1,006	0,967
rs2304234	AXL	558	19	41748753	0,34	intron	-35	-1	-1	G	1,004	0,970
rs5030437	TRAF6	7189	11	36524755	0,13	intron	-1394	-1	-1	G	1,005	0,971
rs3135499	NOD2	64127	16	50766127	0,42	3UTR	[396/860]	-1	-1	A	1,004	0,972
rs6000898	H1FO	3005	22	38202399	0,33	3UTR	[262/1044]	-1	-1	G	1,004	0,973
rs1045485	CASP8	841	2	202149589	0,13	coding	[50/451]	NONSYN	D32H (NP_1219.2)	G	1,005	0,974
rs3865469	TNFSF9	8744	19	6535498	0,44	3UTR	[420/435]	-1	-1	G	1,003	0,979
rs719150	TNFAIP3	7128	6	138192761	0,10	intron	-102	-1	-1	A	1,004	0,981
rs1599796	CD80	941	3	119243934	0,15	3UTR	[794/662]	-1	-1	A	1,002	0,989
rs1053023	STAT3	6774	17	40465616	0,21	3UTR	[273/2146]	-1	-1	G	1,001	0,993
rs1143634	IL1B	3553	2	113590390	0,29	coding	[151/13]	SYNON	F15F (NP_567.1)	A	1,001	0,994
rs16960862	TA-NFKBH	84807	19	36390123	0,01	intron	-399	-1	-1	A	1,000	1,000

