

Hospital Regional Universitario de Málaga

Facultad de Medicina, Universidad de Málaga

**Perfiles de expresión génica y perfiles de
activación de la vía JAK-STAT asociados a
la respuesta al tratamiento con IFN β en
pacientes con esclerosis múltiple.**

TESIS DOCTORAL

Isaac Hurtado Guerrero

Málaga, 2017



UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA

AUTOR: Isaac Hurtado Guerrero

 <http://orcid.org/0000-0003-1936-7112>

EDITA: Publicaciones y Divulgación Científica. Universidad de Málaga



Esta obra está bajo una licencia de Creative Commons Reconocimiento-NoComercial-SinObraDerivada 4.0 Internacional:

<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/legalcode>

Cualquier parte de esta obra se puede reproducir sin autorización pero con el reconocimiento y atribución de los autores.

No se puede hacer uso comercial de la obra y no se puede alterar, transformar o hacer obras derivadas.

Esta Tesis Doctoral está depositada en el Repositorio Institucional de la Universidad de Málaga (RIUMA): riuma.uma.es





Dña. BEGOÑA OLIVER MARTOS, DOCTORA EN BIOLOGÍA,
INVESTIGADORA DE LA UNIDAD DE GESTIÓN CLÍNICA DE
NEUROCIENCIAS DEL HOSPITAL REGIONAL UNIVERSITARIO DE MÁLAGA
Y DEL INSTITUTO DE INVESTIGACIÓN BIOMÉDICA DE MÁLAGA (IBIMA)

CERTIFICA:

Que el trabajo que presenta D. ISAAC HURTADO GUERRERO, con el título “Perfiles de expresión génica y perfiles de activación de la vía JAK-STAT asociados a la respuesta al tratamiento con IFN β en pacientes con esclerosis múltiple” ha sido realizado en el Laboratorio de Investigación del Hospital Regional Universitario de Málaga (sede Hospital Civil), perteneciente al IBIMA, bajo mi dirección y considero que tiene el contenido y rigor científico necesario para ser sometido al juicio del tribunal que ha nombrado la Universidad de Málaga para optar al grado de Doctor.

Y para que así conste, en Málaga, a 12 de junio de 2017.



Fdo. Dra. Begonia Oliver Martos.



Dña. LAURA LEYVA FERNÁNDEZ, DOCTORA EN MEDICINA Y CIRUGÍA,
INVESTIGADORA "NICOLÁS MONARDES" DE LA UNIDAD DE GESTIÓN
CLÍNICA DE NEUROCIENCIAS DEL HOSPITAL REGIONAL UNIVERSITARIO
DE MÁLAGA Y DEL INSTITUTO DE INVESTIGACIÓN BIOMÉDICA DE
MÁLAGA (IBIMA),

CERTIFICA:

Que el trabajo que presenta D. ISAAC HURTADO GUERRERO, con el título
“Perfiles de expresión génica y perfiles de activación de la vía JAK-STAT
asociados a la respuesta al tratamiento con IFN β en pacientes con esclerosis
múltiple” ha sido realizado en el Laboratorio de Investigación del Hospital
Regional Universitario de Málaga (sede Hospital Civil), perteneciente al IBIMA,
bajo mi dirección y considero que tiene el contenido y rigor científico necesario
para ser sometido al juicio del tribunal que ha nombrado la Universidad de
Málaga para optar al grado de Doctor.

Y para que así conste, en Málaga, a 12 de junio de 2017.



Fdo. Dra. Laura Leyva Fernández.





UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA

D. **LUIS JAVIER SANTÍN NÚÑEZ**, DOCTOR EN PSICOLOGÍA, CATEDRÁTICO DE PSICOBIOLOGÍA EN EL DEPARTAMENTO DE PSICOBIOLOGÍA Y METODOLOGÍA DE LAS CIENCIAS DEL COMPORTAMIENTO DE LA FACULTAD DE PSICOLOGÍA DE LA UNIVERSIDAD DE MÁLAGA.

CERTIFICA:

Que el trabajo que presenta D. ISAAC HURTADO GUERRERO, con el título “Perfiles de expresión génica y perfiles de activación de la vía JAK-STAT asociados a la respuesta al tratamiento con IFN β en pacientes con esclerosis múltiple” ha sido realizado en el Laboratorio de Investigación del Hospital Regional Universitario de Málaga (sede Hospital Civil), perteneciente al IBIMA se ha realizado bajo mi tutela y considero que tiene el contenido y rigor científico necesario para ser sometido al juicio del tribunal que ha nombrado la Universidad de Málaga para optar al grado de Doctor.

Y para que así conste, en Málaga, a 12 de junio de 2017.

Fdo Dr. Luis Javier Santín Núñez.





Yo, **ISAAC HURTADO GUERRERO**, declaro que soy el autor del presente trabajo de investigación cuyo título es “Perfiles de expresión génica y perfiles de activación de la vía JAK-STAT asociados a la respuesta al tratamiento con IFN β en pacientes con esclerosis múltiple”. El trabajo ha sido realizado en el Laboratorio de Investigación del Hospital Regional Universitario de Málaga (sede Hospital Civil), perteneciente al Instituto de Investigación Biomédica de Málaga (IBIMA) bajo la dirección de las Dras. Begoña Oliver Martos y Laura Leyva Fernández.

Y para que así conste, en Málaga, a 12 de junio de 2017.



Fdo: Isaac Hurtado Guerrero.



Este trabajo ha sido subvencionado con el proyecto: “Estudio funcional y epigenética de la cascada de señalización del IFN-beta en pacientes con esclerosis múltiple. Implicación en la respuesta al tratamiento” (CTS-7670/11). Financiado por la Consejería de Economía, Innovación y Ciencia. Proyectos de Excelencia 2011



Agradecimientos











A mi familia



***“Todo lo que no tiene un objetivo por alcanzar,
un resultado por conquistar, un enigma por resolver,
un misterio por penetrar, no me interesa.”***

Pablo Picasso

***“En el campo de la ciencia aprendemos cuán grande
es la extrañeza del mundo.”***

J.Robert Oppenheimer



ABREVIATURAS UTILIZADAS

ADN: ácido desoxirribonucleico

APC: análisis de componentes principales (*en inglés, PCA*)

APC: alofocianina

ARR: la tasa de brotes anual (*en inglés annual relapsing remitting*)

ATCC: *American Type Culture Collection*

BAbs: anticuerpo de unión (*del inglés binding antibodies*)

BDNF: Factor Neurotrófico Derivado del Cerebro (*del inglés Brain-Derived Neurotrophic Factor*)

BHE: Barrera Hematoencefálica

BP: Procesos Biológicos (*del inglés Biological Processes*)

CD: Célula Dendrítica

CEI: Comité Ético de investigación

CPE: prueba del efecto citopático (*del inglés Cytopathic Effect*)

CIS: Síndrome Clínico Aislado (*del inglés Clinical Isolated Syndrome*)

COR (*del inglés Receiver Operating Characteristic*)

CPA: Célula Presentadora de Antígenos

Ct: *Cycle Threshold*

DEG: genes diferencialmente expresados (*del inglés differentially expressed genes*)

DMF: Dimetilfumarato

dNTP: desoxirribonucleótido trifosfato

EAE: Encefalomiелitis Autoimmune Experimental

EDSS: *Expanded Disability Status Scale*

EM: Esclerosis Múltiple

EMA: Agencia Europea del Medicamento (*del inglés European Medicine Agency*)

EMCD: Esclerosis Múltiple Clínicamente Definida

EMCV: virus de la encefalomiocarditis murina

EMRR: Esclerosis Múltiple Recurrente Remitente

FC tasa de cambio (del inglés **fold change**)

FDR: tasa de falsos descubrimientos (del inglés *False Discovery Rate*)

FITC: Fluoresceína

GA: acetato de glatirámero (del inglés *glatiramer acetate*)

GC: guanina y citosina

GO: Ontología Génica (del inglés *Gen Ontology*):

H: Horas

HLA: Antígeno Leucocitario Humano (del inglés *Human Leukocyte Antigen*)

IFN: Interferón

IFN β : Interferón beta

IL: Interleuquina

IMF: Intensidad Media de Fluorescencia

IRF9 Factor Regulador de Interferón 9 (del inglés *Interferon Regulatory Factor 9*)

ISG: Genes de Respuesta al Interferón (del inglés *Interferon-Stimulated Gene*)

ISGF3: Factor Genético regulado por Interferón 3 (del inglés *Interferon-Stimulated Gene Factor 3*)

ISRE: Elementos de Respuesta Estimulado por Interferón (del inglés *Interferon-Stimulated Response Element*)

JAK: Janus quinasas (del inglés *Janus kinase*)

LCR: Líquido Cefalorraquídeo

MMLV enzima MMLV (del inglés *Moloney Murine Leukemia Virus*)

MSSS puntuación de severidad de la EM (del inglés *Multiple Sclerosis Severity Score*)

MOG: Glucoproteína Mielínica Oligodendrocitaria (del inglés *Myelin Oligodendrocyte Glucoprotein*)

NAb: anticuerpo neutralizante (del inglés *neutralizing antibodies*)

NCBI: *Nacional Center for Biotechnology Information*

NEDA: Enfermedad sin Actividad Evidente (del inglés *no evident disease activity*)

NK: Asesinas Naturales (del inglés *Natural Killer*)

NR: paciente con EM no respondedor al tratamiento con IFN β

NS: no significativo

nt: nucleótidos

PBMCs: Células Mononucleares de Sangre periférica (del inglés *Peripheral Blood Mononuclear Cells*)

PCR: reacción en cadena de la polimerasa (de inglés *polymerase chain reaction*)

PE: ficoeritrina

PeCy7: ficoeritrina-cianina7

PerCP: peridín-cloroflica

PP: Progresiva Primaria

PR: Progresiva Recurrente

PS: Progresiva Secundaria

OMS: Organización mundial de la salud

R: paciente con EM respondedor al tratamiento con IFN β

RIN: número de integridad del ARN (del inglés *RNA Integrity Number*)

RM: Resonancia Magnética

RM: Resonancia Magnética Nuclear

RMA: (del inglés *Robust Multichip Average*)

RN: paciente con EM no respondedor al tratamiento con IFN β

RR: Recurrente Remitente

SNC: Sistema Nervioso Central

STAT: proteína transductora de señal y activadora de la transcripción (del inglés *signal transducer and activator of transcription*)

T: tiempo

Tyk2: Tirosina quinasa 2

Tm: temperatura de fusión o de *Melting*

UN: unidades neutralizantes



INDICE

1. INTRODUCCIÓN.....	45
1.1 Definición de EM.....	45
1.2 Anatomía Patológica.....	45
1.3 Epidemiología de la EM.....	47
1.4 Etiología de la EM.....	49
1.4.1 Factores ambientales y genéticos de la EM.....	49
1.5 Patogenia.....	52
1.5.1 Inmunología de la EM.....	52
1.5.2 Mecanismos inmunopatológicos en el inicio de la enfermedad.....	54
1.5.3 Mecanismos inmunopatológicos durante la fase progresiva.....	57
1.6 Clínica.....	59
1.6.1 Formas clínicas evolutivas.....	60
1.6.2 Sintomatología.....	62
1.6.3 Diagnóstico.....	62
1.6.4 Pruebas paraclínicas.....	63
1.7 Pronóstico.....	65
1.8 Tratamiento.....	66
1.8.1 Tratamiento de la EM con interferón beta.....	69
1.8.2 Respuesta al tratamiento con interferon beta.....	72
1.8.2.1 Anticuerpos neutralizantes frente al IFN β	74
1.8.2.2 Señalización del IFN β mediante la vía JAK-STAT.....	76
1.8.2.3 Expresión de genes inducibles por IFN β	80
2. HIPÓTESIS.....	85
3. OBJETIVOS.....	89

4. MATERIAL Y MÉTODOS.....	93
4.1 Objetivo I: Estudio funcional de la vía de señalización del IFNβ.....	93
4.1.1 Población de estudio.....	93
4.1.2 Medios de cultivo, reactivos y material utilizado.....	94
4.1.3 Toma de muestras y aislamiento de células mononucleares de sangre periférica (PBMC).....	95
4.1.4 Cultivo de PBMC en presencia de IFN β	96
4.1.4.1 Marcaje con anticuerpos.....	98
4.1.5 Citometría de flujo.....	102
4.1.5.1 Adquisición y análisis de las muestras celulares.....	103
4.1.6 Análisis estadístico.....	105
4.2 Objetivo II: Interferencia de la presencia de anticuerpos neutralizantes en la vía de señalización del IFNβ.....	107
4.2.1 Ámbito de estudio.....	107
4.2.2 Realización de Bioensayos para la determinación de Anticuerpos Neutralizantes frente a IFN beta en sueros de pacientes de Esclerosis Múltiple.....	107
4.2.2.1 Toma de muestra.....	107
4.2.2.2 Líneas celulares, virus, medios de cultivo, reactivos y material utilizado.....	108
4.2.2.3 Obtención y mantenimiento de la línea celular A549.....	109
4.2.2.4 Obtención del virus EMCV.....	110
4.2.2.5 Bioensayo o test del efecto citopático.....	111
4.2.3 Definición de reactividad cruzada y categorización de los títulos de anticuerpos.....	115
4.2.4 Ensayo de inhibición de pSTAT1 en presencia de NAbs.....	115
4.2.4.1 Población de estudio.....	116

4.2.4.2	Toma de muestra, aislamiento de células mononucleares de sangre periférica (PBMC) y obtención de suero.....	116
4.2.4.3	Estimulación de PBMC con IFN β en presencia de NAbs.....	116
4.2.5	Análisis estadístico.....	118
4.3	Objetivo III: Array de expresión génica en pacientes de EM tratados con IFNβ.....	118
4.3.1	Población de estudio.....	119
4.3.2	Toma de muestra y aislamiento de ARN.....	120
4.3.2.1	Toma de muestras de sangre.....	120
4.3.2.2	Aislamiento del ARN: <i>Tempus Spin RNA Isolation Kit</i>	121
4.3.3	Array de expresión y análisis estadístico.....	121
4.3.4	Validación de los resultados del Array de expresión por PCR a tiempo real.....	123
4.3.4.1	Retrotranscripción de ARN (RT-PCR).....	124
4.3.4.2	Diseño de Cebadores y PCR cuantitativa (pPCR).....	127
5.	RESULTADOS.....	129
5.1	Objetivo I: Estudio funcional de la vía de señalización del IFNβ.....	129
5.1.1	Población de estudio.....	129
5.1.2	Niveles de proteínas de la vía JAK-STAT en células no estimuladas y tras la estimulación in vitro con IFN β	132
5.1.2.1	Comparaciones entre controles sanos y pacientes con EM sin tratar.....	132
5.1.2.1.1	Expresión de los niveles basales.....	132
5.1.2.1.2	Expresión tras la estimulación in vitro con IFN β	134
5.1.2.2	Comparaciones entre pacientes con EM sin tratar y pacientes tratados con IFN β	135
5.1.2.2.1	Expresión de los niveles basales.....	135
5.1.2.2.2	Expresión tras la estimulación in vitro con IFN β	139

5.1.3	Niveles de proteínas de la vía JAK-STAT en pacientes de EM según su respuesta al tratamiento con IFN β	141
5.1.3.1	Expresión de los niveles basales.....	141
5.1.3.2	Expresión tras la estimulación in vitro con IFN β	143
5.1.3.3	Patrones de la vía JAK-STAT tras la estimulación in vitro con IFN β según la respuesta terapéutica.....	144
5.1.4	Correlaciones de los niveles de proteína.....	146
5.1.4.1	Correlaciones a nivel basal.....	146
5.1.4.2	Correlaciones tras la estimulación in vitro con IFN β	154
5.2	Objetivo II: Interferencia de la presencia de anticuerpos neutralizantes en la activación de la vía de señalización del IFN.....	157
5.2.1	Relación entre los títulos de anticuerpos neutralizantes frente a IFN β y la reactividad cruzada.....	158
5.2.2	Interferencia de la presencia de anticuerpos neutralizantes en la activación de la vía de señalización del IFN β	163
5.2.2.1	La presencia de NAbs inhibe la fosforilación de STAT1 in vitro.....	163
5.2.2.2	Inhibición de la fosforilación de STAT1 in vitro según el título de NAbs.....	165
5.2.2.3	La activación de pSTAT1 es inversamente proporcional al título de anticuerpos.....	170
5.3	Objetivo III: Análisis del transcriptoma de pacientes con EM en las primeras 24 horas tras la administración de IFN beta. Análisis en función de la respuesta al tratamiento.....	175
5.3.1	Población de estudio.....	175
5.3.2	Microarray. Controles de calidad, normalización y estadística de los datos.....	176
5.3.3	Análisis no supervisado. Análisis de componentes principales.....	176
5.3.4	Análisis supervisado. Cinética de expresión temporal de los genes tras la administración de IFN β sistémico.....	179

5.3.4.1	En la totalidad de los pacientes.....	179
5.3.4.2	En los pacientes clasificados en función de la respuesta terapéutica al IFN β	182
5.3.4.2.1	Comparación de la expresión génica entre los pacientes Respondedores y No Respondedores al IFN β para cada una de las determinaciones temporales.....	182
5.3.4.2.2	Cinética de la expresión génica en el tiempo por el tratamiento con IFN β para cada grupo de pacientes.....	189
5.3.4.3	Asignación de los genes diferencialmente expresados a los términos de la Ontología Génica (GO): término funcional Procesos Biológicos (BP).....	192
5.3.5	Replicación de los datos de microarrays por PCR a tiempo real.....	207
6.	DISCUSIÓN.....	215
6.1	Objetivo I.....	215
6.2	Objetivo II.....	221
6.3	Objetivo III.....	226
7.	CONCLUSIONES.....	237
8.	ANEXOS.....	243
8.1	Microarray. Controles de calidad, normalización y estadística de los datos.....	243
8.2	Listas de genes diferencialmente expresados.....	255
8.3	Publicaciones de los resultados.....	295
9.	BIBLIOGRAFÍA.....	321



ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Lesiones en tejidos de pacientes con esclerosis múltiple.....	46
Figura 2. Mapa mundial de prevalencia de la EM.....	48
Figura 3: Desarrollo de la lesión primaria mediada por antígenos extrínsecos.....	55
Figura 4. Desarrollo de la lesión primaria mediada por antígenos intrínsecos.....	57
Figura 5. Interacciones neuroinmunes y los posibles mecanismos de la enfermedad en la esclerosis múltiple progresiva.....	58
Figura 6. Formas evolutivas de la EM.....	61
Figura 7. Representación esquemática de lesiones en SNC de pacientes de EM con formas clínicas RR (A), PS (B) y PP (C).....	61
Figura 8. Estudio de RM seriado mediante secuencias potenciadas en T2 (arriba) y secuencias potenciadas en T1 con gadolinio (abajo) en un paciente con EM.....	64
Figura 9. Evolución en clínica y por resonancia magnética de la EM.....	66
Figura 10. Decisiones terapéuticas en pacientes con EM.....	69
Figura 11. Vía de señalización del IFN β	77
Figura 12. Fases obtenidas tras la realización del gradiente de densidad sobre Ficoll-Hypaque.....	96
Figura 13. Esquema del protocolo llevado a cabo para obtener los datos de expresión por citometría de flujo.....	97
Figura 14. Representación esquemática básica del funcionamiento de un citómetro de flujo.....	102
Figura 15. Fotografía del citómetro de flujo FACSCanto II.....	103
Figura 16. Ejemplo de análisis usado para la identificación de las poblaciones de monocitos y linfocitos T CD4+ y CD8+.....	104
Figura 17. Histogramas superpuestos correspondientes a un paciente sin tratamiento, un paciente respondedor y otro no respondedor representativos de cada grupo, donde se muestra la Intensidad Media de Fluorescencia (IMF) de las células no estimuladas (histogramas abiertos) y estimuladas (histogramas rellenos) que expresan IFNAR1,	

IFNAR2, pSTAT1 y pSTAT2 en linfocitos T CD4+, CD8+ y monocitos.....	105
Figura 18. Esquema de organización de una placa de Bioensayo para la titulación de NAbs en suero de pacientes de EM.....	112
Figura 19. Fotografía de una placa de Bioensayo tras finalizar el ensayo.....	114
Figura 20. Esquema de las diferentes condiciones de cultivo de PBMCs de pacientes con NAbs.....	117
Figura 21. Diseño experimental y toma de muestras.....	120
Figura 22. Representación de las IMF de IFNAR1, IFNAR2, pSTAT1 y pSTAT2 en células no estimuladas.....	134
Figura 23. Diferencias en la expresión de IFNAR1, IFNAR2, pSTAT1 y pSTAT2 tras de la estimulación con IFN β entre controles sanos y pacientes de EM sin tratamiento.....	135
Figura 24. Niveles de expresión basales de IFNAR1, IFNAR2, pSTAT1 y pSTAT2 en células no estimuladas.....	137
Figura 25. Mapas de calor que muestran diferentes perfiles de la vía de señalización JAK-STAT en células sin estimular y tras la estimulación in vitro con IFN β	138
Figura 26. Diferencias en la expresión de IFNAR1, IFNAR2, pSTAT1 y pSTAT2 tras de la estimulación con IFN β entre pacientes con EM sin tratamiento y tratados.....	140
Figura 27. Niveles de expresión basales de IFNAR1, IFNAR2, pSTAT1 y pSTAT2 en células no estimuladas.....	143
Figura 28. Diferencias en la expresión de IFNAR1, IFNAR2, pSTAT1 y pSTAT2 tras de la estimulación con IFN β entre pacientes de EM respondedores y no respondedores.....	144
Figura 29. Patrones de activación individual de la vía de señalización JAK-STAT tras la activación in vitro según la respuesta terapéutica al IFN β	145
Figura 30. Correlaciones de los niveles basales de IFNAR1, IFNAR2, pSTAT1 y PSTAT2 de los controles sanos.....	147
Figura 31. Correlaciones de los niveles basales de IFNAR1, IFNAR2, pSTAT1 y PSTAT2 en los pacientes de EM sin tratamiento.....	149

Figura 32. Correlaciones de los niveles basales de IFNAR1, IFNAR2, pSTAT1 y pSTAT2 en los pacientes de EM tratados con IFN β	151
Figura 33. Correlaciones entre las intensidades de fluorescencia media de IFNAR1, IFNAR2, pSTAT1 y pSTAT2 en células no estimuladas (IMFse) de los pacientes respondedores a IFN β	152
Figura 34. Correlaciones entre las intensidades de fluorescencia media de IFNAR1, IFNAR2, pSTAT1 y pSTAT2 en células no estimuladas (IMFse) de los pacientes no respondedores a IFN β	153
Figura 35. Correlaciones tras la activación in vitro con IFN β de IFNAR1, IFNAR2, pSTAT1 y pSTAT2 en los pacientes de EM sin tratar, tratados con IFN β y controles sanos.....	155
Figura 36. Correlaciones en la activación con IFN β a corto plazo entre el log2 (IMFe / IMFse) de IFNAR1 y el log2 (IMFe / IMFse) de IFNAR2 en células T de pacientes respondedores.....	156
Figura 37. Esquema de trabajo seguido para el estudio de la interferencia de la presencia de anticuerpos neutralizantes en la activación de la vía de señalización del IFN β	157
Figura 38. Porcentaje de pacientes que han presentado reactividad cruzada en función del título de NAbs.....	161
Figura 39. Curva COR de la probabilidad pronosticada del modelo 2.....	162
Figura 40. Niveles de expresión de pSTAT1 representados como IMF y porcentaje de células medidas por citometría de flujo.....	165
Figura 41. Paciente 1: Niveles de IMF y porcentaje de pSTAT1 en monocitos, linfocitos T CD4+ y CD8 de un paciente con EM.....	158
Figura 42. Paciente 2: Niveles de IMF y porcentaje de pSTAT1 en monocitos, linfocitos T CD4+ y CD8 de un paciente con EM.....	166
Figura 43. Paciente 3: Niveles de IMF y porcentaje de pSTAT1 en monocitos, linfocitos T CD4+ y CD8 de un paciente con EM.....	167
Figura 44. Paciente 4: Niveles de IMF y porcentaje de pSTAT1 en monocitos, linfocitos T CD4+ y CD8 de un paciente con EM.....	168
Figura 45. Niveles de IMF y porcentaje de pSTAT1 en monocitos, linfocitos T CD4+ y CD8 cuatro pacientes con EM.....	169

Figura 46. Porcentaje de inhibición de pSTAT1 en monocitos de 4 pacientes, obtenido como IMF y porcentaje de pSTAT1, según el título de NAbs (TRU).....	170
Figura 47. Porcentaje de pSTAT1 en monocitos, linfocitos T CD4+ y CD8+ en presencia de diferentes diluciones de suero con y sin NAbs.....	172
Figura 48. Representaciones gráficas del análisis de correlación (Rho de Spearman) entre el porcentaje de células positivas para pSTAT1 y el título de NAbs para las subpoblaciones de células T CD4+, CD8+ y monocitos.....	173
Figura 49. Análisis no supervisado de Componentes Principales en las primeras 24 horas tras la administración del IFN β sistémico en pacientes respondedores al tratamiento con IFN β (R) y no respondedores al tratamiento (NR).....	177
Figura 50. Análisis de componentes principales de los datos obtenidos en cada determinación temporal: T0 (basal), T4, T12 y T24h.....	178
Figura 51. Diagrama de Venn mostrando los genes diferencialmente expresados en las diferentes determinaciones temporales en todos los pacientes.....	180
Figura 52. Mapas de calor donde se muestran los genes sobreexpresados en pacientes R comparados con NR (mapa rosa) y los genes sobreexpresados en NR (mapa azul), justo antes y/o tras 4, 12, y 24 horas de la administración con IFN β	188
Figura 53. Diagrama de Venn con el número de genes diferencialmente expresados detectados por la prueba T-test para dos muestras a las 4, 12 y 24 h tras la administración del IFN β en función de la respuesta clínica a este fármaco.....	190
Figura 54. Diagrama de Venn con el número de genes diferencialmente expresados detectados por la prueba Rank-product a las 4, 12 y 24 h tras la administración del IFN β en función de la respuesta clínica a este fármaco.....	191
Figura 55. Expresión relativa de TyK2 mediante PCR a tiempo real (TyK2/GADPH) en pacientes respondedores y no respondedores.....	208
Figura 56. Expresión relativa de STAT1 mediante PCR a tiempo real (STAT1/GADPH) en pacientes respondedores y no respondedores.....	209
Figura 57. Expresión relativa de STAT2 mediante PCR a tiempo real (STAT2/GADPH) en pacientes respondedores y no respondedores.....	210
Figura 58. Expresión relativa de OAS1 mediante PCR a tiempo real (OAS1/GADPH) en pacientes respondedores y no respondedores.....	210
Figura 59. Expresión relativa de IRF9 mediante PCR a tiempo real (IRF9/GADPH) en pacientes respondedores y no respondedores.....	211

Figura A1. Diagramas de densidades de los arrays.....	247
Figura A2. Ejemplo representativo del fondo del array y del gráfico MA del paciente NR5 a nivel basal y a las 4, 12 y 24h tras la administración del IFN β	248
Figura A3. Distribución en cajas de todos los valores M de los 36 arrays representando el error estándar de cada sonda en cada uno de los arrays.....	249
Figura A4. Distribución del fondo de los 36 arrays.....	250
Figura A5. Gráficos MA para cada uno de los 36 arrays tras la sustracción de fondo.....	251
Figura A6. Valores de M para todos los arrays tras la sustracción del fondo.....	253
Figura A7. Diagrama de densidades de los arrays tras sustracción de fondo.....	253
Figura A8. Distribución de cajas de los valores M tras normalización interarrays.....	254
Figura A9. Diagrama de densidades de los arrays tras normalización interarrays....	255



ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Tabla de Tratamientos modificadores de la Esclerosis Múltiple aprobados por la European Medicines Agency (EMA) disponibles en España, donde se indican las vías y frecuencias de administración de cada uno de los medicamentos.....	68
Tabla 2. Efectos inmunomoduladores del IFN β en la EM.....	71
Tabla 3. Información detallada de los anticuerpos usados.....	100
Tabla 4. Controles isotípicos utilizados para cada anticuerpo.....	101
Tabla 5. Combinaciones de anticuerpos conjugados a distintos fluorocromos para la determinación de la expresión de los distintos marcadores en las poblaciones celulares estudiadas.....	101
Tabla 6. Secuencia de los cebadores usados en la amplificación de cada gen utilizado para la validación del microarray.....	125
Tabla 7. Datos clínicos-demográficos de los grupos control, pacientes sin tratar y pacientes tratados con IFN β	130
Tabla 8. Datos clínico-demográficos de los pacientes respondedores y no respondedores.....	131
Tabla 9. Intensidad Media de Fluorescencia (IMF) de IFNAR1, IFNAR2, pSTAT1 y pSTAT2 en células no estimuladas.....	133
Tabla 10. Intensidad Media de Fluorescencia (IMF) de IFNAR1, IFNAR2, pSTAT1 y pSTAT2 en células no estimuladas.....	136
Tabla 11. Representación de las IMF de IFNAR1, IFNAR2, pSTAT1 y pSTAT2 en células no estimuladas.....	142
Tabla 12. Correlaciones de los niveles basales de IFNAR1, IFNAR2, pSTAT1 y PSTAT2 en controles sanos, pacientes con EM sin tratamiento y pacientes con EM tratados.....	147
Tabla 13. Correlaciones significativas entre las intensidades de fluorescencia media de IFNAR1, IFNAR2, pSTAT1 y pSTAT2 en células no estimuladas (IMFse).....	153
Tabla 14. Títulos de NAbs de los pacientes.....	158
Tabla 15. Análisis de regresión logística del riesgo de tener reactividad cruzada según el título de anticuerpos.....	162

Tabla 16. Características clínicas y demográficas de los pacientes con EM incluidos en el estudio.....	175
Tabla 17. Genes diferencialmente expresados a las 4, 12 y 24 h tras la administración del IFN β comparados con su expresión basal.....	180
Tabla 18. Lista de genes diferencialmente expresados en células nucleadas de sangre periférica a las 4,12 y 24h tras la administración del IFN β en comparación con su expresión basal.....	181
Tabla 19. Lista de genes que presentan una expresión al menos dos veces superior en el grupo de pacientes R con el de NR al tratamiento con IFN β , justo antes y tras 4, 12 y 24 horas de la administración al fármaco.....	183
Tabla 20. Lista de genes que presentan una expresión al menos dos veces superior en el grupo de pacientes NR con el de R al tratamiento con IFN β , justo antes y tras 4, 12 y 24 horas de la administración al fármaco.....	184
Tabla 21. Lista de términos enriquecidos de la Ontología de Genes, con los genes diferencialmente expresados en cada grupo de pacientes a las 4h tras la administración del IFN β en comparación con su expresión basal.....	195
Tabla 22. Lista de términos enriquecidos de la Ontología de Genes, con los genes diferencialmente expresados en cada grupo de pacientes a las 12h tras la administración del IFN β en comparación con su expresión basal.....	199
Tabla 23. Lista de términos enriquecidos de la Ontología de Genes, con los genes diferencialmente expresados en cada grupo de pacientes a las 24h tras la administración del IFN β en comparación con su expresión basal.....	204
Tabla 24. Cambios en la expresión de los genes seleccionados a los diferentes tiempos en comparación con la expresión basal en Respondedores (R) y No Respondedores (NR).....	208
Tabla A1. Valores de integridad (RIN), concentración y pureza de las muestras empleadas.....	244
Tabla A2. Niveles de marcaje de las muestras empleadas.....	245
Tabla A3. Esquema seguido para el montaje de los microarrays.....	246
Tabla A4. Lista de genes diferencialmente expresados exclusivamente en No Respondedores a las 4h tras la administración del IFN β	255
Tabla A5. Lista de genes diferencialmente expresados a las 4h tras la administración del IFN β exclusivamente en Respondedores.....	256

Tabla A6. Lista de genes diferencialmente expresados a las 4h tras la administración del IFN β tanto en Respondedores como en No respondedores.....	258
Tabla A7. Lista de genes diferencialmente expresados exclusivamente en No Respondedores a las 12h tras la administración del IFN β	263
Tabla A8. Lista de genes diferencialmente expresados exclusivamente en Respondedores a las 12h tras la administración del IFN β	264
Tabla A9. Lista de genes diferencialmente expresados en Respondedores y No Respondedores a las 12h tras la administración del IFN β	269
Tabla A10. Lista de genes diferencialmente expresados exclusivamente en No Respondedores a las 4h tras la administración del IFN β mediante Rank product.....	273
Tabla A11. Lista de genes diferencialmente expresados exclusivamente en Respondedores a las 4h tras la administración del IFN β mediante Rank product.....	274
Tabla A12. Lista de genes diferencialmente expresados en Respondedores y No Respondedores a las 4h tras la administración del IFN β mediante Rank product.....	276
Tabla A13. Lista de genes diferencialmente expresados exclusivamente en No Respondedores a las 12h tras la administración del IFN β mediante Rank product.....	281
Tabla A14. Lista de genes diferencialmente expresados exclusivamente en Respondedores a las 12h tras la administración del IFN β mediante Rank product...	282
Tabla A15. Lista de genes diferencialmente expresados en Respondedores y No Respondedores a las 12h tras la administración del IFN β mediante Rank product...	286
Tabla A16. Lista de genes diferencialmente expresados exclusivamente en No Respondedores a las 24h tras la administración del IFN β mediante Rank product...	291
Tabla A17. Lista de genes diferencialmente expresados exclusivamente en Respondedores a las 24h tras la administración del IFN β mediante Rank product...	292
Tabla A18. Lista de genes diferencialmente expresados en Respondedores y No Respondedores a las 24h tras la administración del IFN β mediante Rank product...	294



INTRODUCCIÓN





1. INTRODUCCIÓN

1.1 Definición de Esclerosis Múltiple

La esclerosis múltiple (EM) es una enfermedad crónica del sistema nervioso central (SNC) en la que se producen procesos inflamatorios y desmielinizantes con un origen presumiblemente autoinmune, que tienen como órgano diana a la mielina, resultando en una progresiva degeneración axonal.

Aunque la EM se conocía como entidad clinicopatológica con anterioridad, no fue hasta 1868 cuando el médico francés Jean Martin Charcot (Charcot & Joffroy 1869) describió con detalle por primera vez la clínica y evolución de la enfermedad. Charcot correlacionó la anatomía patológica con los aspectos clínicos de la enfermedad, acuñando el término de esclerosis en placas, nombre por el que en la actualidad se conoce la enfermedad en la bibliografía francesa. Con posterioridad, autores norteamericanos, haciendo referencia a las múltiples lesiones que aparecían en el SNC junto a la presencia de episodios múltiples de disfunción neurológica, denominaron a la enfermedad esclerosis múltiple.

A día de hoy, la EM se considera como la enfermedad neurológica crónica más frecuente en adultos jóvenes de países desarrollados.

1.2 Anatomía Patológica

La EM se caracteriza por la aparición de lesiones tisulares primarias en el SNC, que suelen ser áreas focales de desmielinización en la materia blanca y gris, conocidas como **placas**. Estas lesiones presentan, además de la pérdida de mielina, un daño parcial de los axones. Dependiendo de la ubicación de estas placas, las manifestaciones neurológicas clínicas resultantes son notoriamente variables (Friese et al. 2014). Según la fase de la enfermedad, clásicamente las placas de desmielinización pueden ser de dos tipos: lesiones agudas y crónicas.

En las **lesiones agudas**, de bordes mal definidos, predominan procesos inflamatorios en los que se observan infiltrados perivasculares de linfocitos T, linfocitos B, microglía residente activada y macrófagos con restos de mielina en

distintas fases de digestión. La degradación de las vainas de mielina produce una pérdida de oligodendrocitos, degeneración axonal en grado variable y una posterior proliferación astrocitaria.

Las **lesiones crónicas** se caracterizan por su baja actividad inflamatoria, con una pérdida importante de mielina y población oligodendrocitaria. Los axones se muestran desmielinizados y en ocasiones degenerados. Estas placas sufren procesos de remielinación parcial localizadas en el borde de la placa (Lassmann 2013).

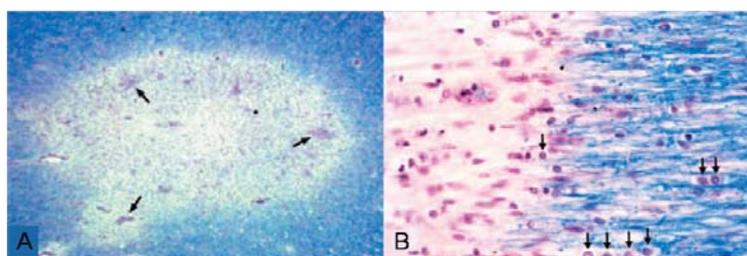


Figura 1. Lesiones en tejidos de pacientes con esclerosis múltiple. Imagen A, (tinción con Luxol Fast Blue) sección con **lesión aguda** típica, con los márgenes difusos y numerosos infiltrados perivasculares (flechas). Imagen B, (tinción con Luxol Fast Blue y PAS) sección con **lesión crónica** típica, con bordes definidos y ausencia de mielina y oligodendrocitos en el interior de la placa, solo aparecen núcleos de oligodendrocitos en los bordes y en la periferia (flechas). Imágenes tomadas de (Frohman et al. 2006).

En los focos donde se produce desmielinización se han distinguido cuatro patrones anatomopatológicos diferentes según los elementos implicados, el grado y extensión de las placas desmielinizadas así como la presencia de procesos remielinizantes. Esos cuatro patrones se producen en un ambiente inflamatorio dominado por células T, macrófagos y microglía activados (Lucchinetti et al. 1996) (Lassmann 2004).

- Patrón I y II: la desmielinización es preferentemente perivenular y está mediada por macrófagos activados y la maquinaria citotóxica de las células T. Existe una conservación parcial de oligodendrocitos y remielinización concomitante. El patrón II es el más frecuente y a diferencia del patrón I se caracteriza por el depósito de anticuerpos frente a componentes de mielina y de complemento activado en las lesiones.
- Patrón III: se caracteriza por una localización no perivenular, apoptosis de oligodendrocitos en el borde activo de la lesión y ausencia de

remielinización. El mecanismo patogénico es similar al daño tisular por hipoxia.

- Patrón IV: aparece en pacientes de curso clínico progresivo primario. Es similar a las lesiones de patrón I aunque son de mayor extensión, con más muerte de oligodendrocitos, mayor daño tisular y ausencia de remielinización. La susceptibilidad genética de los sujetos se postula como causante de este patrón.

Además de la desmielinización focal, existe un proceso neurodegenerativo difuso generalizado en el SNC que se asocia con la discapacidad clínica. Este proceso puede estar relacionado con un aumento del daño oxidativo y la degeneración en áreas del cerebro con contenido de hierro excepcionalmente alto (Haider et al. 2014).

Un objetivo importante de investigación en la EM es la identificación de procesos patológicos que podrían ser objeto de intervenciones terapéuticas. La evaluación patológica de estas lesiones es clave para tal identificación, pero tiene claras limitaciones en la obtención de los tejidos de autopsias y biopsias. En este sentido, la resonancia magnética (RM) ha alcanzado un papel fundamental en la evaluación de la EM, ya que permite a los clínicos obtener una imagen *in vivo* del grado de afectación del SNC del paciente (Filippi et al. 2012).

1.3 Epidemiología de la EM

La esclerosis múltiple es la enfermedad neurológica crónica más frecuente en adultos jóvenes en Europa y Norteamérica, siendo la principal causa de discapacidad neurológica no traumática en adultos jóvenes.

Afecta aproximadamente a 2,5 millones de personas en todo el mundo y presenta picos de incidencia a los 30 años de edad y de prevalencia a los 50 años. La prevalencia mundial media de la EM ha aumentado desde 30 por 100.000 habitantes en 2008, a 33 por cada 100.000 en 2013. Aunque esta prevalencia varía en gran medida geográficamente, la clásica noción de un gradiente latitudinal de prevalencia en Europa y América del Norte también se ha puesto recientemente en entredicho (Koch-Henriksen & Sørensen 2010).

Europa (108 por 100.000), América del Norte (140 por 100.000), Nueva Zelanda y el sureste de Australia son las zonas de mayor prevalencia, con alrededor de 100 casos por 100.000 habitantes (Belbasis et al. 2015). En nuestro entorno, en la provincia de Málaga, la prevalencia es de 125 casos cada 100.000 habitantes (Fernandez O. 2011). La mayor prevalencia publicada es de 300 por 100.000 en las Islas Orcadas, al norte de Escocia. Por otro lado, existe una escasa incidencia de la enfermedad en amplias regiones del mundo como África, México, Puerto Rico, Japón, China y Filipinas, así como en la población nativa americana (Files et al. 2015).

En los últimos años se han constatado cambios notables en la epidemiología demográfica de la EM, como el aumento de la prevalencia, probablemente debido a una mayor supervivencia (tanto de los pacientes como de la población general). Además se ha constatado un aumento de la incidencia en muchos países, que también puede reflejar mejoras en el diagnóstico y en el registro de los pacientes (Browne et al. 2014). El aumento detectado del ratio mujer/hombre en la prevalencia indica la existencia de un efecto ambiental y hormonal complejo que actúa a nivel de población en vez de a nivel genético de forma individual.

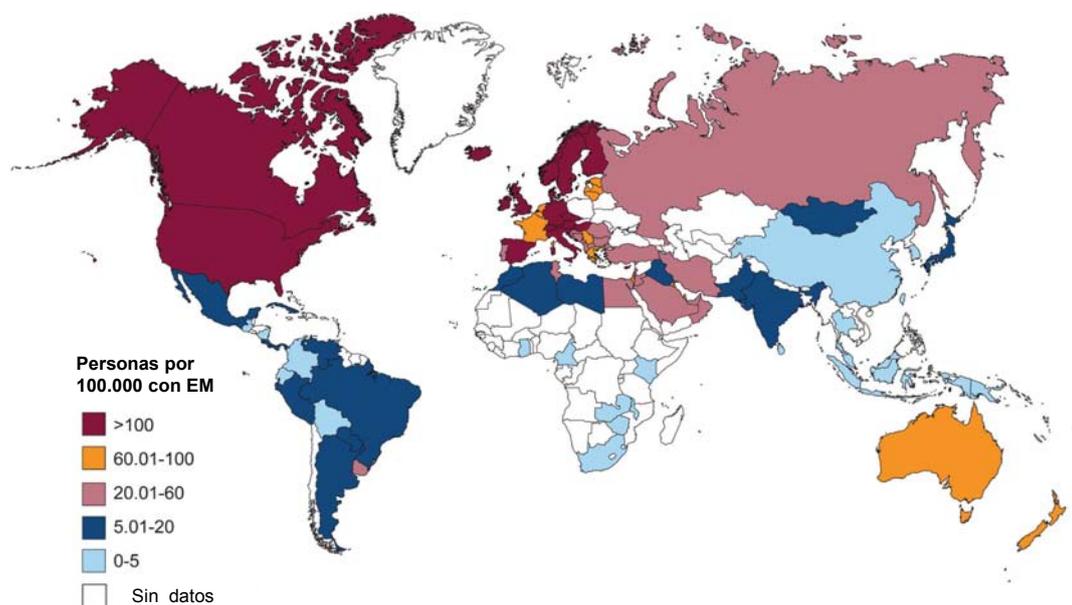


Figura 2. Mapa mundial de prevalencia de la EM. Imagen modificada de (Browne et al. 2014).

1.4 Etiología de la EM

A partir de los estudios realizados en las áreas de inmunología, epidemiología y la genética de la enfermedad, se han generado dos hipótesis complementarias referentes a la etiología de la EM. Una hipótesis supedita la enfermedad a factores ambientales (hipótesis ambiental), mientras que la otra justificaría las causas de la EM a la carga genética de cada individuo (hipótesis genética).

A continuación se describen los factores epidemiológicos, ambientales y genéticos involucrados en la causalidad de la EM.

1.4.1 Factores ambientales y genéticos de la EM

A razón de los estudios epidemiológicos se deduce que la etiología de la enfermedad es multifactorial, donde componentes genéticos y ambientales contribuyen al riesgo de padecer EM. La enfermedad sería por tanto consecuencia de una compleja interacción de factores ambientales en individuos genéticamente predispuestos. Entre los factores ambientales que confieren un mayor riesgo a padecer la enfermedad destacan:

- La **latitud** se relaciona con diferentes prevalencias de EM en distintas partes del mundo, sin tener en cuenta el factor étnico. En este sentido, el riesgo de EM se correlaciona inversamente con la exposición al sol y los niveles de **vitamina D**. Además, la vitamina D no es sólo un factor de riesgo para la enfermedad sino que también puede modificar elementos inflamatorios y neurodegenerativos de la EM (Burton & Costello 2015).
- El **hábito tabáquico** y la exposición pasiva al humo del tabaco contribuyen al riesgo de EM de forma dosis-dependiente (Hedström et al. 2015). También se ha visto que el hábito tabáquico se asocia con una conversión más rápida a formas clínicas de peor pronóstico (Ramanujam et al. 2015). Los mecanismos por los que el tabaco aumenta la susceptibilidad de desarrollar la enfermedad o incluso empeora su curso se desconocen actualmente.
- La **mononucleosis infecciosa** así como la seropositividad al virus de **Epstein-Barr** aumenta significativamente el riesgo de esclerosis múltiple

(Belbasis et al. 2015). La infección vírica es requisito previo para el desarrollo de la enfermedad, pero no suficiente para explicar la causalidad de la EM y su interacción con otros factores genéticos y/o ambientales predisponen a cada individuo a desarrollar EM (Pender 2011).

La esclerosis múltiple no se considera una enfermedad hereditaria propiamente dicha. Aunque tiene un componente genético importante, ésta no se hereda siguiendo un patrón de transmisión mendeliano. Se conocen varios factores a nivel genético que confieren un mayor riesgo a la EM:

- El **grado de parentesco** confiere un mayor riesgo a padecer la enfermedad, existiendo una tasa de recurrencia familiar global de 20%. Si el riesgo de la población general de sufrir EM es del 0.3%, en personas con familiares de primer grado afectados es del 2.77%, de segundo grado del 1.02% y de tercer grado del 0.88%. Los gemelos monocigóticos presentan una concordancia en el 24-30% de los casos, mientras que en gemelos dicigóticos la concordancia es del 3-5%, que es comparable a la de los hermanos. Además, no hay mayor riesgo de padecer la enfermedad para los familiares adoptivos (Kamm et al. 2014). A pesar de ello, recientemente se ha publicado un trabajo en el que se describen dos familias en las cuales varios de sus miembros habían desarrollado formas progresivas de esclerosis múltiple. Los autores del trabajo han identificado una mutación en el gen NR1H3 que presentaban todos los miembros de ambas familias que habían desarrollado esclerosis múltiple (Wang et al. 2016). Sin embargo, al replicar este estudio en una cohorte de pacientes diferente (13 veces mayor que la anterior), no se ha encontrado ninguna asociación entre la mutación del gen NR1H3 y la EM (International Multiple Sclerosis Genetics Consortium. 2016).
- La pertenencia a un determinado **grupo étnico** confiere mayor (escandinavos, judíos asquenazí o caucásicos europeos) o menor (afroamericanos, mexicanos, japoneses, chinos o filipinos) riesgo de padecer EM. Estas diferencias entre los grupos étnicos pueden observarse bajo las mismas influencias ambientales, subrayando la contribución genética al (Files et al. 2015).

- Desde la década de los 70, variaciones en los genes del antígeno leucocitario humano (**HLA**) han sido asociadas a la susceptibilidad a padecer esclerosis múltiple, suponiendo ésta la mayor contribución genética individual a dicha susceptibilidad (Jersild et al. 1972). Se han realizado, estudios a gran escala de colaboraciones internacionales para investigar la asociación de variaciones genéticas del genoma con la EM, dando como resultado la identificación de numerosos alelos asociados. El alelo HLA-DRB1*15:01 es uno de los que confiere mayor riesgo, siendo otros alelos de importancia el HLA-DRB1*03:01, HLA-DRB1*13:03, y el HLA-DPB1*03:01. Hay otros alelos cuya presencia confiere un efecto protector, como el alelo HLA-A*02:01 (Sawcer et al. 2014). También se han identificado más de 110 variantes genéticas fuera del MHC con efectos modestos (Xia et al. 2016), subrayando la complejidad de la carga genética en la enfermedad, donde pequeñas contribuciones de multitud de genes en conjunto generarían el riesgo de un individuo.
- Las modificaciones epigenéticas del ADN pueden influir en la actividad de los genes o regiones de genes, aunque no afectan a la secuencia de ADN en sí. La **metilación del ADN** es una modificación epigenética que comúnmente se refiere a la adición de un grupo metilo al nucleótido citosina (C) en una secuencia citosina-guanina (CG). Los patrones de metilación del ADN se asocian con varias enfermedades complejas, incluida la EM (Bos et al. 2016). La metilación del ADN es específica de células. Así, en células T CD4+ de pacientes con EM, se ha observado un patrón de metilación diferencial dentro de la región del MHC (Graves et al. 2014). También se ha detectado una hipermetilación del ADN en todo el genoma en células T CD8+ asociada a la esclerosis múltiple (Bos et al. 2015).

En las últimas décadas la enfermedad parece ir en aumento a nivel mundial, y en mayor medida en mujeres, siendo sus causas desconocidas. Se han propuesto varias hipótesis relacionadas con el aumento de los niveles socioeconómicos como la hipótesis de la higiene, que relaciona este aumento de la incidencia con la mejora de las condiciones sanitarias (Versini et al. 2015). Así mismo, los cambios producidos en la dieta en estos años han provocado el consiguiente aumento de la prevalencia de la

obesidad en todo el mundo (Palavra et al. 2016). Se ha mostrado una asociación entre altos índices de masa corporal en la infancia y la adolescencia con la EM, aunque sólo en las mujeres (Munger et al. 2013) (Langer-Gould et al. 2013). Otros factores ambientales propuestos por la comunidad científica que podrían tener un efecto en la incidencia de la EM son la contaminación ambiental, la microbiota intestinal o algunos metales.

1.5 Patogenia

La hipótesis patogénica más aceptada se basa en el supuesto de que la enfermedad se desarrolla en sujetos genéticamente predispuestos, sobre los cuales incidiría un factor ambiental desconocido que originaría un amplio espectro de alteraciones en la respuesta inmunitaria, causando la inflamación presente en las lesiones de EM. La inflamación sería el proceso más inmediato, pero no el único responsable de la desmielinización y de la pérdida axonal.

1.5.1 Inmunología de la EM

Los resultados de estudios inmunológicos, genéticos, e histopatológicos junto a los ensayos clínicos, han demostrado que el sistema inmune (SI) juega un papel clave en la evolución de la enfermedad. Las lesiones en el SNC son el sello distintivo de la esclerosis múltiple, causadas por la infiltración de células inmunes a través de la barrera hematoencefálica, que promueven la inflamación, desmielinización, gliosis y la degeneración neuroaxonal, lo que lleva a la interrupción de la señalización neuronal. En la respuesta inmune implicada en la patogenia de la EM intervienen tanto el SI adaptativo como el innato.

- **Inmunidad Innata en la EM**

La microglía y los macrófagos son las células dominantes del sistema inmune innato en las lesiones del SNC de los pacientes de EM, tanto en las fases iniciales como en las progresivas. Estas células fagocíticas interactúan con células del sistema inmune adaptativo (como las células T y las B), aunque también pueden producir un daño tisular neuroinflamatorio directamente. Los fagocitos son los principales

responsables del daño y eliminación de la mielina, la principal característica de las lesiones en la EM (Sharma et al. 2010) y se cree que también son responsables del daño axonal, ya que a menudo estas células se observan junto a los axones dañados (Trapp et al. 1998), y su número se asocia positivamente con el grado de daño axonal agudo en las lesiones (Bitsch et al. 2000). Además, los macrófagos y la microglía activada son la principal fuente de estrés oxidativo, lo que contribuye al daño en sustancia gris y blanca del SNC (Haider et al. 2011) (Witte et al. 2013)

Por otro lado, estas células fagocíticas también juegan un papel importante en los procesos de regeneración tisular que se producen tras la lesión (Miron et al. 2013). Los efectos dañinos o reparadores del tejido durante la progresión de la enfermedad se relacionan con los distintos fenotipos de los fagocitos de forma que, los fagocitos que derivan de monocitos periféricos parece que serían los responsables del inicio de la inflamación y la desmielinización, mientras que los fagocitos procedentes de microglía activada, limpiarían el debris celular producido, promoviendo así la recuperación del tejido (Yamasaki et al. 2014).

- **Inmunidad Adquirida en EM**

En el sistema nervioso, las células T CD4⁺ reconocen los antígenos presentados por las células de la microglía, macrófagos infiltrantes y células B, las cuales expresan todas moléculas de HLA clase II. Por el contrario, las células T CD8⁺ reconocen los antígenos presentados por las moléculas de HLA clase I que son las que se expresan en todas las células nucleadas. Tanto en lesiones del SNC como en líquido cefalorraquídeo de pacientes de EM, se han aislado células T CD4⁺ y CD8⁺ derivadas de expansión clonal, lo que sugiere que la respuesta de células T específicas de antígeno contribuye al proceso patogénico de la enfermedad (Jacobsen et al. 2002). A pesar de todo, todavía no se ha conseguido identificar los antígenos diana de estas células T en la EM. En el LCR, la mayoría de las células T CD4⁺ tienen un fenotipo de memoria central (Kivisäkk et al. 2003) y pueden producir interferón γ . Pocas células T CD4⁺ del LCR producen IL-17, aunque su proporción parece ser mayor durante los brotes que en aquellos pacientes de EM sin actividad clínica (Brucklacher-Waldert et al. 2009).

Hasta ahora no se han encontrado diferencias en la frecuencia y el fenotipo de células T entre pacientes de EM y controles sanos. Sin embargo, la inmunización del

sistema inmune periférico con un péptido modificado de la proteína básica de la mielina (MBP), aumentó el número de células T periféricas específicas de MBP y se asoció con un aumento de actividad de la enfermedad por RM (Bielekova et al. 2000).

Recientemente, se ha propuesto que la activación antígeno-específica de células T y su diferenciación a células T colaboradoras específicas, podría producirse en el tejido linfoide asociado a intestino o al sistema bronquial. La microbiota de estas áreas, podría proporcionar las señales tanto antigénicas como adyuvantes para la diferenciación de las células T (Berer et al. 2011) (Odoardi et al. 2012).

Respecto a la respuesta humoral, en la mayoría de los pacientes con EM se localizan células plasmáticas junto con sus células precursoras (plasmablastos y células B) en las lesiones, las meninges y el LCR (Cepok et al. 2005) (Magliozzi et al. 2007) (Henderson et al. 2009). Estas células sobreviven gracias a citoquinas y factores de crecimiento sintetizados, en parte, por las células gliales. Se ha visto que parte de las IgG que enriquecen el LCR de los pacientes con EM, son secretadas por células B clonales presentes tanto en el LCR como en la sangre (Obermeier et al. 2008) (Bankoti et al. 2014). La presencia de estas células B clonales en las meninges y el LCR se asocia con la actividad de la enfermedad y la evolución clínica de los pacientes (Cepok et al. 2005) (Magliozzi et al. 2007). Así mismo, la presencia de bandas oligoclonales en pacientes con CIS, se asocia con un incremento en el riesgo de conversión en EM (Dobson et al. 2013). A pesar de todos los hallazgos anteriores que sugieren la participación de la respuesta humoral en el desarrollo de las lesiones en EM, no se han encontrado los antígenos específicos de estos autoanticuerpos.

1.5.2 Mecanismos inmunopatológicos en el inicio de la enfermedad

Se desconoce si, en la EM, los linfocitos T autorreactivos se activan en la periferia o en el SNC, por lo que se han propuesto dos modelos o hipótesis explicativos para el inicio de la enfermedad.

En un primer modelo, las células T autorreactivas se activarían en tejidos periféricos (piel, intestinos y pulmones) por un mecanismo de **mimetismo molecular**, **reactividad cruzada** o **activación inespecífica por espectador** (*bystander activation*). Tras su migración a los ganglios linfáticos, algunas de ellas junto con

linfocitos B y monocitos activados viajarían al SNC atravesando la barrera hematoencefálica (BHE) iniciando el desarrollo de la lesión pre-fagocítica. Las células T CD4+ en el espacio perivascular liberarían localmente citoquinas que afectarían las prolongaciones de los astrocitos y perturbarían la homeostasis oligodendroglial-astroglial. Las células plasmáticas activadas en la periferia podrían acumularse en el cerebro y liberar anticuerpos dirigidos contra la mielina y frente a las células gliales, alterando su funcionalidad. La liberación de mediadores inflamatorios provocaría la apertura de la BHE y la reclutación adicional de monocitos y linfocitos, lo que conduciría a la formación de la **lesión fagocítica** (Figura 3).

La mayor parte del daño tisular durante esta fase de la esclerosis múltiple será iniciada por la respuesta inmune adaptativa y mediada por fagocitos activados (inmunidad innata). Esta hipótesis se basa principalmente en resultados obtenidos en los modelos de encefalomielitis autoinmune experimental (EAE), un modelo animal de esclerosis múltiple (Dendrou et al. 2015)(Hemmer et al. 2015).

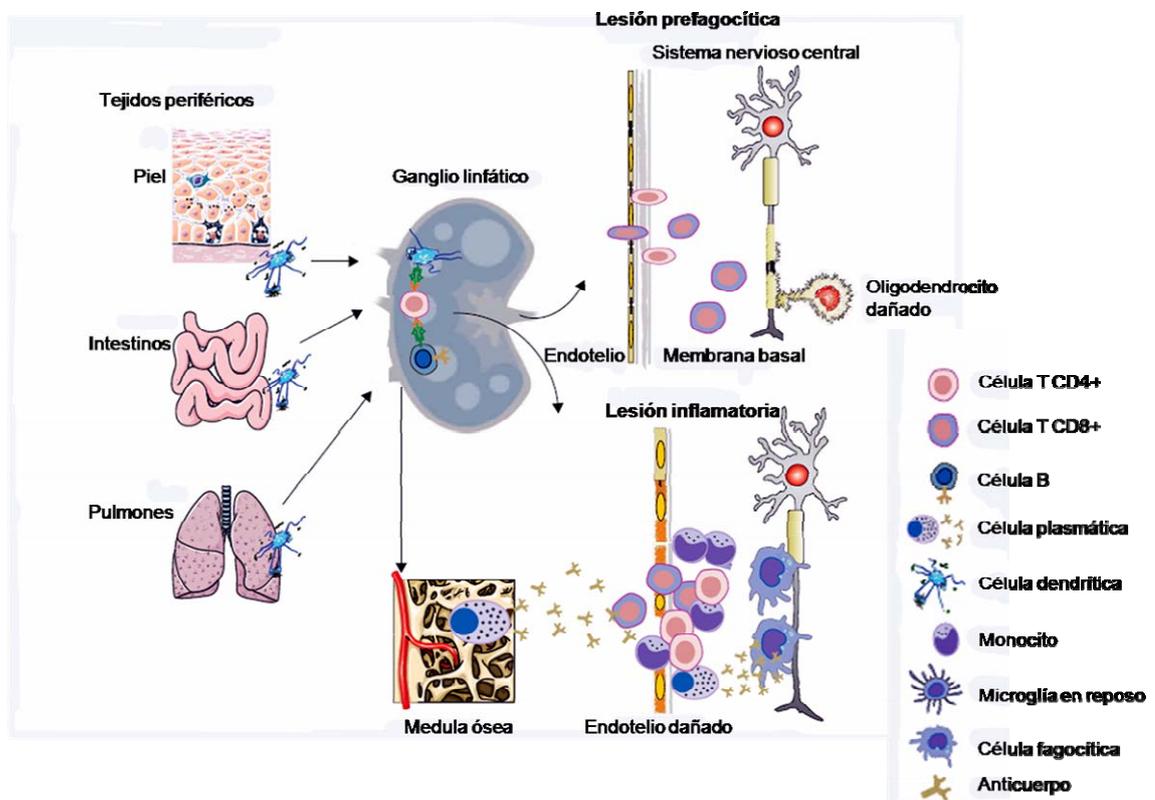


Figura 3: Desarrollo de la lesión primaria mediada por antígenos extrínsecos. Figura modificada de (Hemmer et al. 2015).

El otro modelo que se propone para explicar el inicio de la EM, es que determinados eventos intrínsecos del SNC, causarían la activación de la microglía residente y una amplificación de la reacción inmune con reclutamiento secundario de células del sistema inmune innato y adaptativo. Uno de estos eventos intrínsecos podría ser una infección viral en el SNC todavía desconocida. También, algún proceso que conduzca a neurodegeneración, un defecto primario en los oligodendrocitos (como por ejemplo una mutación genética) que provocaría una muerte espontánea de estas células, que activaría a la microglía residente, lo que se correspondería con las **lesiones prefangocíticas**. Desde estas lesiones con pérdida de oligodendrocitos, activación microglial y escaso infiltrado linfocitario, los antígenos se drenarían a los ganglios linfáticos cervicales profundos, donde inducirían la respuesta inmune adaptativa secundaria en la periferia (Figura 4). En la mayoría de los tejidos, este traslado de antígenos se llevaría a cabo por las células dendríticas que procesan antígenos en el tejido y migran a los ganglios linfáticos donde se los presentan a las células T. Éstas a su vez, migran al tejido diana, donde liberan citocinas efectoras. Sin embargo, se piensa que esta vía de la respuesta inmune adaptativa no se produce en el SNC (Dendrou et al. 2015) (Hemmer et al. 2015). Aunque muchos estudios apoyan esta idea, se han descrito células dendríticas en el parénquima juxtavascular del SNC (Prodinger et al. 2011) que migran a los ganglios linfáticos cervicales (Mohammad et al. 2014). También se ha propuesto el LCR como una vía de drenaje de los antígenos del SNC a la periferia.

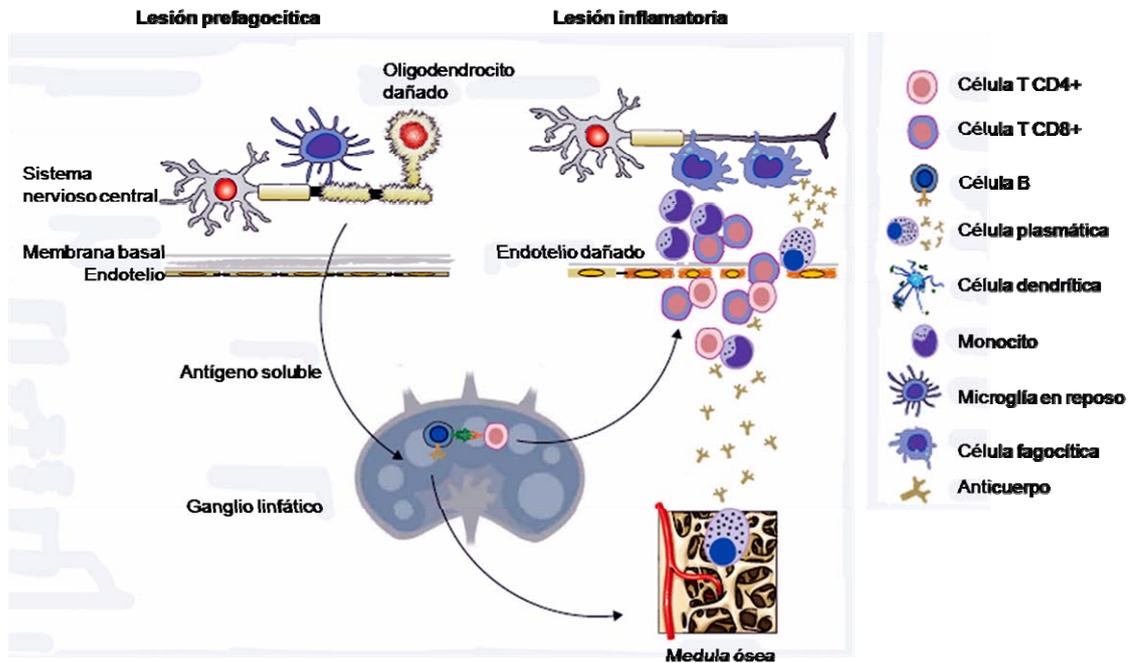


Figura 4. Desarrollo de la lesión primaria mediada por antígenos intrínsecos. Figura modificada de (Hemmer et al. 2015).

1.5.3 Mecanismos inmunopatológicos durante la fase progresiva

El curso de la esclerosis múltiple manifiesta cambios clínicos y patológicos a medida que avanza la enfermedad desde el inicio hasta alcanzar una fase progresiva. Los cambios principales que se producen en el fenotipo de la enfermedad y en las respuestas a los tratamientos, sugieren que los mecanismos patológicos en la fase inicial con presencia de brotes y en las progresivas son distintos. Para ello se postulan dos posibles mecanismos explicativos para el desarrollo de la fase progresiva (figura 5).

En el primero, algunos investigadores proponen que la neurodegeneración primaria en el SNC impulsaría la progresión de la enfermedad (Stys et al. 2012). Este concepto se basa en la hipótesis de que la alteración de la homeostasis de la unidad axo-glial desencadena con el tiempo una degeneración axonal progresiva. En este contexto, la inflamación ocurriría sólo como una respuesta secundaria a la degeneración del tejido. Este daño en la unidad axo-glial puede estar causado por una falta de soporte trófico, trastornos metabólicos, o por un espacio extracelular

alterado por mediadores tóxicos procedentes de un daño en oligodendrocitos y pérdida de mielina preexistente. La degeneración axonal podría entonces provocar una activación secundaria de la microglía circundante.

Hay varios argumentos que apoyan esta hipótesis. En primer lugar, que los abordajes terapéuticos inmunomoduladores o inmunosupresores hasta ahora no han cambiado en su mayoría el curso progresivo de la enfermedad. En segundo lugar, la discapacidad en este estadio de la enfermedad progresa de manera uniforme independientemente de la evolución inicial de la enfermedad, y además lo hace en un patrón similar a otros trastornos neurodegenerativos clásicos. En tercer lugar, los resultados obtenidos en modelos animales de desmielinización refuerzan la noción de que la alteración de la interacción axo-glial conduce a degeneración axonal progresiva.

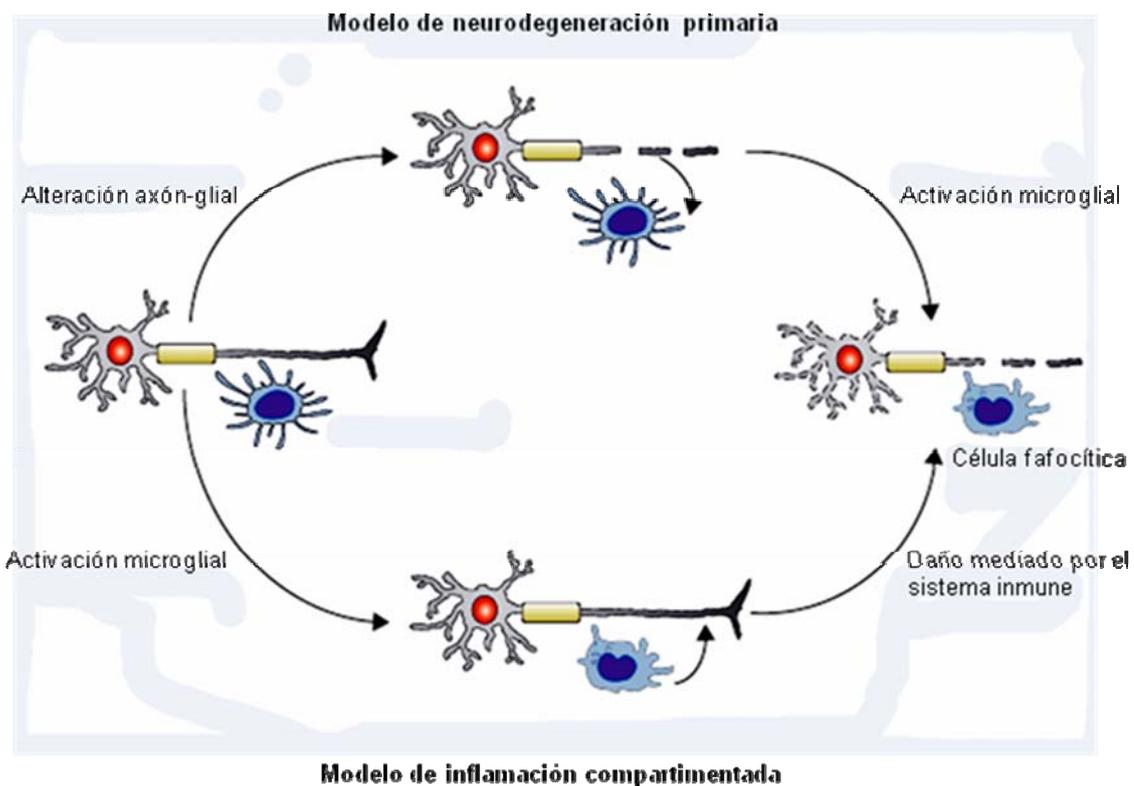


Figura 5. Interacciones neuroinmunes y los posibles mecanismos de la enfermedad en la esclerosis múltiple progresiva. Figura modificada de (Hemmer et al. 2015)

La segunda hipótesis sugiere que la inflamación compartimentada impulsa el progreso de la enfermedad (Frischer et al. 2009). Esto ocurriría por la activación de

las células microgliales debido a la presencia continua de mediadores proinflamatorios y anticuerpos procedentes de agregados celulares en las meninges o bien por cambios en el estado intrínseco de la microglía en respuesta a la inflamación prolongada. La activación microglial entonces, podría provocar la degeneración axonal probablemente a través de la liberación de mediadores tóxicos (especies reactivas o glutamato) cuyos efectos serían intensificados por el daño tisular preexistente que pudiera limitar la recaptación de glutamato y la liberación de hierro (Hemmer et al. 2015).

Ambas hipótesis no son necesariamente excluyentes y podrían actuar conjuntamente. Así, la inflamación compartimentada del SNC proporcionaría una agresión constante de bajo grado que se podría agravar por un aumento de la susceptibilidad y/o una disminución de la capacidad de reparación del daño en la unidad axo-glial. Un ejemplo de ello sería la alteración del metabolismo del hierro en las fases progresivas, el cual aumentaría el estrés oxidativo.

1.6 Clínica

La clínica de la EM se caracteriza por su heterogeneidad. Los síntomas y signos de la enfermedad van a estar determinados por el tipo de lesión acontecida. Las diferentes manifestaciones clínicas de cada paciente responden a la heterogeneidad anatomopatológica de las lesiones y a la localización de la zona afectada a lo largo del neuroeje. Existe una mayor frecuencia en la afectación del nervio y quiasma óptico, el tronco encefálico, los pedúnculos cerebelosos y la médula, resultando en debilidad, parestesias, alteración de la visión, temblor intencional, ataxia, pérdida sensorial, disfunción de la vejiga, alteraciones emocionales y deterioro cognitivo aunque la lista completa es bastante larga (Lublin 2005).

La sintomatología propia de la enfermedad puede aparecer a cualquier edad, aunque es más frecuente en la franja de los 20 a 40 años, y en mayor medida en mujeres que en varones (Magyari 2016).

En la mayoría de los casos, la EM comienza con un ataque, **brote** o exacerbación (es decir, un episodio agudo de disfunción neurológica que dura al menos 24 horas, y que se produce en ausencia de fiebre o alteraciones metabólicas). Todos los eventos clínicos que tienen lugar dentro de una franja temporal de 30 días desde el inicio del

brote, se consideran también parte de un evento clínico único, a pesar de que distintas áreas del SNC puedan estar involucradas al mismo tiempo (Lublin et al. 2014).

1.6.1 Formas clínicas evolutivas

El curso clínico de la EM es variable y casi imposible de predecir para un paciente individual. La enfermedad es aleatoria en términos de frecuencia y gravedad de los brotes y en magnitud y velocidad de progresión, así como en la acumulación de discapacidad. A pesar de ello se han descrito, cuatro formas evolutivas de la enfermedad (Lublin & Reingold 1996) (figura 6):

- Forma **recurrente-remitente** (RR): es la forma en la debutan el 90 % de los pacientes diagnosticados. Se caracteriza por la presencia de brotes que se repiten en el tiempo y que, a medida que se repiten, van dejando secuelas neurológicas funcionales.
- Forma **progresiva secundaria** (PS): en esta forma clínica existe una evolución progresiva de la enfermedad con o sin la aparición de brotes. Aproximadamente un 50% de los pacientes con formas RR, tras 5-10 años de enfermedad, evolucionan a este estado. El daño axonal ocasionado produce una afectación irreversible.
- Forma **progresiva primaria** (PP): alrededor de un 10% de los pacientes de EM presentan un curso progresivo de la enfermedad desde su comienzo, con estabilizaciones ocasionales y ausencia de brotes. Esta forma tiene una edad de comienzo significativamente mayor (45 años).
- Forma **progresiva recurrente** (PR): se presenta en un número reducido de pacientes que manifiestan un curso progresivo desde el inicio de la enfermedad, con brotes evidentes con o sin recuperación completa, y con periodos entre los brotes caracterizados por una progresión continua.

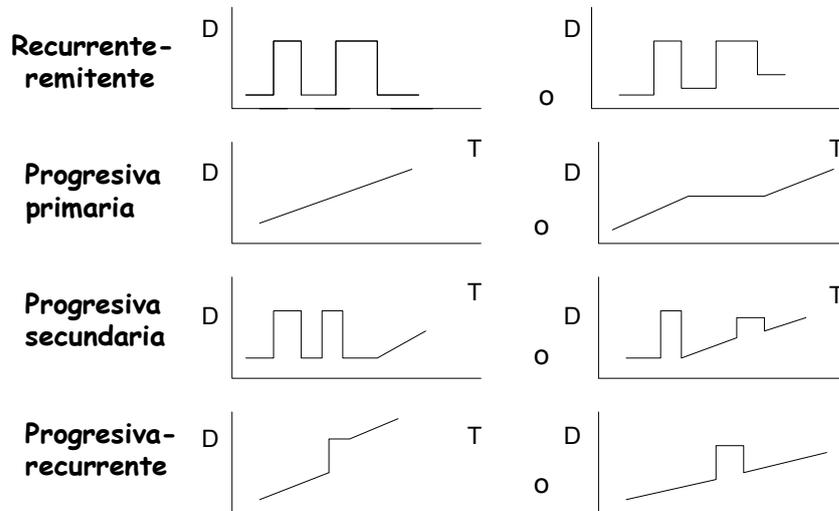


Figura 6. Formas evolutivas de la EM. (T: tiempo y D: discapacidad) (Zuvich et al. 2009)

La evolución clínica de los pacientes de EM es consecuencia del tipo de lesión y su distribución por el SNC. Las lesiones focales inflamatorias agudas están presentes en la EM de evolución aguda y en los brotes; en cambio, las formas progresivas se caracterizan por la presencia de nódulos inflamatorios de microglía distribuidos de forma difusa por la sustancia blanca de apariencia normal, daño axonal difuso y desmielinización cortical sobre una respuesta inflamatoria global del cerebro y las meninges (figura 7).

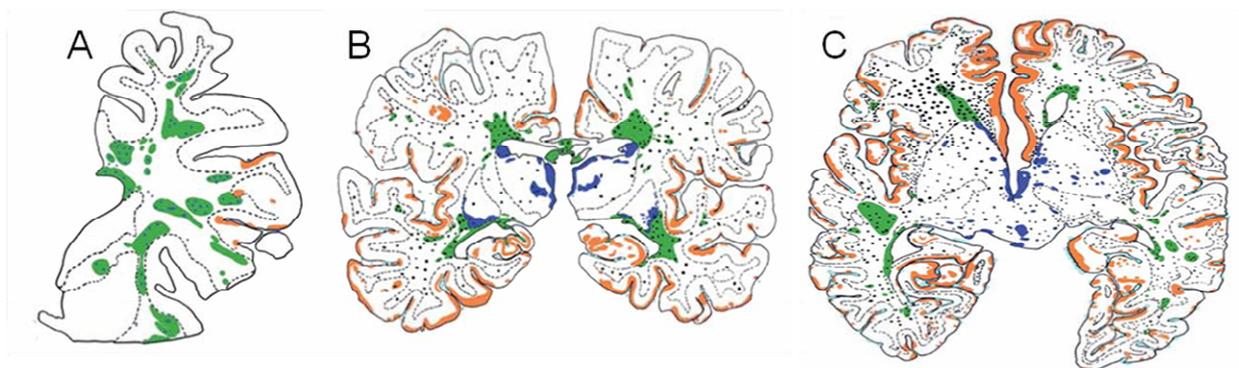


Figura 7: Representación esquemática de lesiones en SNC de pacientes de EM con formas clínicas RR (A), PS (B) y PP (C). En verde: placas de desmielinización focal en la sustancia blanca; naranja: desmielinización cortical; azul: lesiones desmielinizadas en la sustancia gris profunda; punteado azul oscuro: infiltrados inflamatorios; punteado azul claro: infiltrados inflamatorios en las meninges; punteado negro: nódulos inflamatorios de microglía. Modificado de (Kutzelnigg et al. 2005)

1.6.2 Sintomatología

Los síntomas de la EM son múltiples y variados, difiriendo bastante entre pacientes, e incluso en un mismo paciente dependiendo de la etapa de progresión de la enfermedad en la que se encuentre. La sintomatología está determinada por la localización de las lesiones a lo largo del neuroeje. Las alteraciones en la sensibilidad (parestias) son los síntomas más frecuentes al comienzo de la enfermedad, apareciendo sensaciones de pinchazos, hormigueos o acorchamiento en miembros o en el tronco. Los otros síntomas más frecuentes al comienzo de la enfermedad corresponden con alteraciones motoras (pérdida de fuerza y fatiga) (Riise et al. 1992).

Durante el curso de la EM son muy frecuentes las alteraciones motoras (90%), sensitivas (77%) y cerebelosas (75%), seguidas por alteraciones del tronco encefálico, esfinterianas, mentales y visuales. Los síntomas más frecuentes son la fatiga, atrofia muscular, dolor, signo de Lhermitte (sensación de calambre eléctrico descendiente por la espalda a los miembros inferiores), trastornos cognitivos, trastornos afectivos, neuritis óptica, alteraciones en esfínteres, alteraciones sexuales, epilepsias etc.

Para evaluar adecuadamente y de forma objetiva la progresión de la enfermedad y poder optimizar las posibilidades terapéuticas, se han desarrollado a lo largo del tiempo varias escalas que miden el grado de discapacidad de los pacientes. En la actualidad, la escala más utilizada para la valoración clínica de la EM es la **EDSS** (del inglés *Expanded Disability Status Scale*) (Kurtzke 1983). En ella, se valora la habilidad del paciente para realizar diversas actividades y determinadas funciones neurológicas. El paciente recibe una puntuación entre 0 (exploración normal) y 10 (fallecido por EM), con intervalos de 0,5 puntos a partir de 1 punto. La escala posibilita al clínico realizar un seguimiento de la evolución del paciente y detectar la aparición de formas progresivas. Un inconveniente de la escala EDSS es que debe ser aplicada por un neurólogo específicamente entrenado, para conseguir reducir al máximo la variabilidad intra e interobservador.

1.6.3 Diagnóstico

El diagnóstico de la EM es fundamentalmente clínico ya que no existe un biomarcador diagnóstico, y se basa en la demostración de brotes, excluyendo otros

procesos de episodios neurológicos recurrentes. En un paciente con EM deben concurrir la **diseminación espacial** de lesiones (al menos dos lesiones de distinta localización en el SNC) y la **dispersión temporal** sintomatológica (al menos dos episodios de disfunción neurológica separados en el tiempo). También se tienen que descartar otras enfermedades que puedan explicar esos síntomas. Hasta hace relativamente poco tiempo, combinando criterios clínicos con pruebas paraclínicas complementarias [técnicas de imagen, estudios de líquido cefalorraquídeo (LCR) y pruebas neurofisiológicas] era posible descartar con bastante seguridad otras enfermedades y llegar a un diagnóstico de certeza de la EM con los criterios diagnósticos que propuso Poser (Poser et al. 1983) .

Posteriormente, un comité de expertos presidido por McDonald, estableció unos nuevos criterios diagnósticos basados en la diseminación en el espacio y en el tiempo valorada por Resonancia Magnética (RM) (McDonald et al. 2001), sobre los que se han consensuado modificaciones posteriores que han permitido un diagnóstico más temprano y un aumento de la especificidad y sensibilidad, permitiendo un tratamiento precoz (Polman et al. 2005) (Polman et al. 2011).

Aunque en los criterios de McDonald las pruebas paraclínicas (a excepción del estudio de imágenes obtenidas por RM) no son un requisito para el diagnóstico de la EM, pueden ser importantes en la evaluación de pacientes en los que el diagnóstico no está del todo claro, ya sea para proporcionar apoyo, o para realizar el diagnóstico diferencial.

1.6.4 Pruebas paraclínicas

Las pruebas paraclínicas más usadas hoy en día para el diagnóstico de la EM son:

- El Estudio del **líquido cefalorraquídeo**: proporciona una información muy útil para establecer el diagnóstico de EM y, en algunos casos, es imprescindible para el diagnóstico diferencial. Los pacientes con EM presentan un aumento intratecal de inmunoglobulinas, sobre todo de IgG. El análisis electroforético del LCR muestra en la región catódica, bandas aisladas llamadas bandas oligoclonales (BOC), detectadas hasta en el 95% de los pacientes de EM (Villar et al. 2002).

- El estudio de imágenes de **resonancia magnética** permite descartar otras patologías, poner de manifiesto la existencia de lesiones desmielinizantes no sospechadas clínicamente, determinar los criterios de diseminación espacial y temporal, además de monitorizar la actividad de la enfermedad (Miller et al. 1993). Se pueden distinguir tres tipos de lesiones:
 - **Lesión aguda y lesión activa:** se detecta como lesión hiperintensa en T2 y captante de contraste en T1. Puede presentar captación nodular, o bien en forma de anillo abierto. En T1 sin contraste se puede visualizar como lesión hipointensa. La captación suele durar de 2 a 4 semanas, aunque puede prolongarse durante meses.
 - **Lesión crónica:** se muestra como lesión hiperintensa en T2 e hipointensa en T1. No captan contraste. Se conocen como “agujeros negros” e implican la pérdida de axones, oligodendrocitos y gliosis reactiva.
 - **Lesión remielinizada:** hiperintensa en T2 e isointensa en T1. No captan contraste. En estas lesiones no se ha producido pérdida de axones.

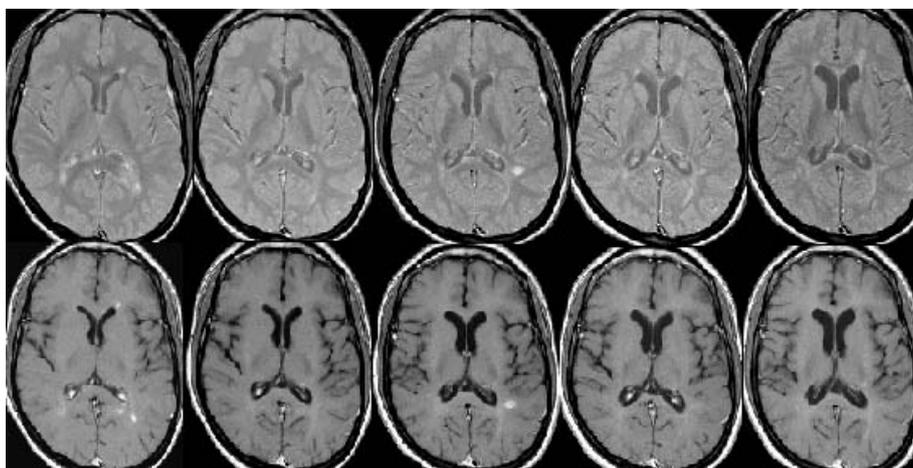


Figura 8: Estudio de RM seriado mediante secuencias potenciadas en T2 (arriba) y secuencias potenciadas en T1 con gadolinio (abajo) en un paciente con EM.

- Los **potenciales evocados:** están relacionados con el estímulo y se usan para valorar la función de algunas vías nerviosas. Las alteraciones en los potenciales evocados proporcionan una medida de la desmielinización. En el

diagnóstico de la EM se utilizan para definir la afectación de vías sensitivas (visual, acústica, somatosensitivas) y motoras en presencia de síntomas vagos, permitiendo detectar lesiones todavía asintomáticas (Gronseth & Ashman 2000).

1.7 Pronóstico

Los pacientes con EM presentan un pronóstico variable, relacionado estrechamente con el curso clínico y con la discapacidad que provoca la enfermedad. La evolución clínica en los primeros años puede predecir el comportamiento posterior de la enfermedad y el inicio de una fase progresiva. Tras el diagnóstico de la enfermedad, la expectativa de vida es alrededor de 30 años (Compston & Coles 2008), siendo las infecciones, las enfermedades no relacionadas con la EM y el suicidio, las causas de muerte más frecuentes (Ebers 2001).

Las características clínicas de la enfermedad durante los primeros años pueden indicar el comportamiento futuro de la EM y el comienzo de una fase progresiva. Se consideran factores pronósticos favorables un comienzo a edad temprana de la enfermedad, sexo femenino, síntomas de inicio visuales y sensitivos, intervalos prolongados de tiempo entre brotes, pocos brotes durante los dos primeros años y EDSS baja entre los 2 y 5 primeros años de la enfermedad. Por otro lado, son factores pronósticos desfavorables el género masculino, edad tardía de inicio, síntomas de inicio motores y cerebelosos, frecuencia elevada de brotes al comienzo de la enfermedad, recidiva temprana tras el primer brote y alcanzar una discapacidad moderada en un intervalo corto de tiempo (EDSS alta a los 2-5 años) (Hawkins & McDonnell 1999).

En el inicio de la enfermedad existe una fase denominada preclínica en la que los pacientes no presentan síntomas, sin embargo es posible detectar lesiones en el SNC mediante RM. Tras ella, la enfermedad comienza a manifestarse con la aparición del primer episodio de disfunción neurológica, lo que se conoce con el nombre de síndrome clínico aislado (CIS, del inglés "clinically isolated syndrome") cuya recuperación suele ser completa. Con la aparición de nuevos brotes comienza la EM clínicamente definida (EMCD). En este momento la enfermedad prosigue de 8 a 20 años en la forma remitente recurrente (EMRR), con brotes de disfunción neurológica

que, a medida que se repiten, van dejando secuelas funcionales neurológicas. A los 10 o 15 años de evolución, casi la mitad de los pacientes han evolucionado a un estado de disfunción neurológica progresiva, correspondiente con la forma progresiva secundaria (EMPS). En esta fase de la enfermedad, los pacientes experimentan mayor pérdida de axones y daño neuronal, acumulando progresivamente más discapacidad y afectando gravemente su calidad de vida (Dutta & Trapp 2014).

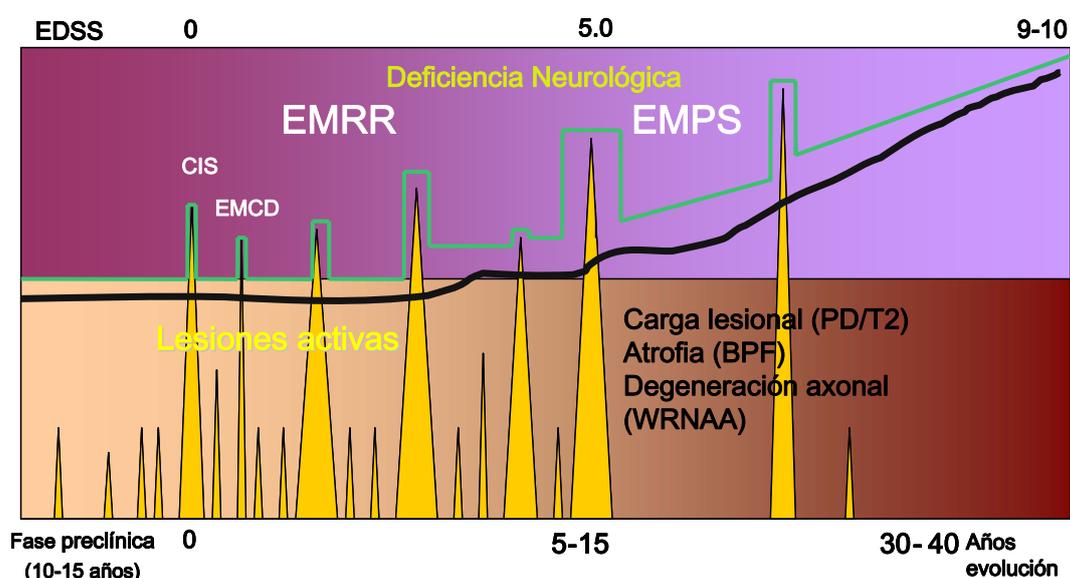


Figura 9. Evolución en clínica y por resonancia magnética de la EM. Estimación del daño neurológico (atrofia cerebral, medida por la BPF (del inglés "brain parenchymal fraction"), y degeneración axonal por RM, mediante densidad de protones (PD, del inglés "proton density") o a través de las secuencias T2. Figura modificada de Fernández y cols 2011 (Fernandez O. 2011).

1.8 Tratamiento

Históricamente se ha considerado la EM como una enfermedad carente de tratamiento, y es sólo hasta la segunda mitad del siglo pasado cuando comienzan a administrarse tratamientos antiinflamatorios. Aunque a día de hoy existen multitud de opciones terapéuticas, no existe un tratamiento capaz de curar la enfermedad.

En la actualidad existen tres áreas diferenciadas para el tratamiento de la EM. Una dirigida a la modificación del curso evolutivo de la enfermedad (en la cual nos centraremos), otra enfocada al tratamiento de los brotes y la última encaminada al

tratamiento de los síntomas. Los tratamientos dirigidos a modificar la evolución de la enfermedad, al ser la EM una enfermedad autoinmune, tienen una base inmunológica para acelerar la recuperación de los pacientes tras los brotes, disminuir el número y gravedad de los mismos y prevenir el desarrollo de las formas progresivas. Se ha demostrado que el tratamiento temprano de la enfermedad se asocia con una reducción en el riesgo de desarrollar EMCD en los pacientes con CIS y una reducción en la progresión de la discapacidad en pacientes con EMRR (Jacobs et al. 2000) (Comi et al. 2001) (L Kappos et al. 2006) (Comi et al. 2009) (Ziemssen et al. 2015).

Hace poco más de 20 años que se produjo un cambio fundamental en la terapéutica de la EM, cuando un ensayo clínico demostró que el **interferón beta** (IFN β) era capaz de reducir la frecuencia de las recaídas y disminuir la actividad medida por RM (Analysis 1995). Posteriormente, han aparecido otros estudios que han demostrado la eficacia de otros fármacos modificadores del curso de la enfermedad como el acetato glatirámico (GA), mitoxantrona, natalizumab, fingolimod, teriflunomida, alemtuzumab y dimetilfumarato (DMF). Además, están en desarrollo terapias avanzadas como la terapia celular con células mesenquimales, diversos tipos de vacunas, etc. En la tabla 1 se muestran los tratamientos para la EM disponibles en España.

Principio Activo	Nombre comercial	Laboratorio titular	Año de aprobación (EMA)	Modo de administración	Frecuencia de administración
Acetato de glatirámero	Copaxone [®] . 20 o 40	Teva Pharmaceuticals Ltd	2002	Subcutáneo	Cada día o 3 veces por semana
Alemtuzumab	Lemtrada [®] .	Genzyme Therapeutics Ltd	2013	Intravenoso	Ciclos de 5 o 3 días anuales
Dimetilfumarato	Tecfidera [®] .	Biogen Idec Limited	2014	Oral	Dos veces/día
Interferón beta-1a	Avonex [®] .	Biogen Idec Limited	1997	Intramuscular	Una vez/semana
Interferón beta-1a	Rebif [®] .	Merck Serono Europe Ltd	1998	Subcutáneo	Tres veces/semana
Interferón beta-1b	Betaferon [®] .	Bayer Pharma Ag	1995	Subcutáneo	Cada dos días
Interferón beta-1b	Extavia [®] .	Novartis Europharm Ltd	2008	Subcutáneo	Cada dos días
Interferón beta-1a pegilado	Plegridy [®] .	Biogen Idec Limited	2014	Subcutáneo	Cada 2 semanas
Fingolimod	Gilenya [®] .	Novartis Europharm Ltd	2011	Oral	Cada día
Mitoxantrona (en genérico desde 2006)	Novantrone [®] .	Meda Pharma, S.A.U.	1998 (proc. Nacional)	Intravenoso	Frecuencia variable. Dosis máxima acumulada: 140 mg/m ²
Natalizumab	Tysabri [®] .	Biogen Idec Limited	2006	Intravenoso	Cada 4 semanas
Teriflunomida	Aubagio [®] .	Sanofi-Aventis Groupe	2013	Oral	Una vez/día

Tabla 1. Tabla de Tratamientos modificadores de la Esclerosis Múltiple aprobados por la European Medicines Agency (EMA) disponibles en España, donde se indican las vías y frecuencias de administración de cada uno de los medicamentos. Nota: existen otros fármacos que se usan fuera de indicación ocasionalmente. Esclerosis Múltiple España, 2016.

En la actualidad, teniendo en cuenta los distintos fármacos disponibles y las evidencias sobre la eficacia y la toxicidad de los mismos, se pueden distinguir básicamente dos líneas terapéuticas. La primera formada por el IFN β , GA, teriflunomida, y DMF, los cuales se recomiendan para su uso en pacientes sin tratamiento previo, ya que son más seguros. En pacientes cuya enfermedad continúa activa a pesar de estar tratados con algún tratamiento de primera línea, se utiliza fingolimod, natalizumab o alemtuzumab. Estos últimos fármacos son de mayor eficacia que los de primera línea, aunque son menos seguros. El algoritmo de tratamiento propuesto en la figura 10 obtenido de (Ziemssen et al. 2015) resume las decisiones terapéuticas propuestas en los pacientes de EM. La elección de un tratamiento u otro por parte de los especialistas, requiere de una cuidadosa adaptación a las necesidades individuales de los pacientes, así como sopesar los

pros y los contras de la ruta y frecuencia de administración, junto con los posibles beneficios percibidos y los riesgos para el paciente (Broadley et al. 2015).



Figura 10. Decisiones terapéuticas en pacientes con EM. Imagen modificada de (Ziemssen et al. 2015).

Actualmente, la gestión de la EM a la que tienen que enfrentarse los especialistas está alcanzando altos niveles de complejidad con la aparición de terapias nuevas y más eficaces, además de la incorporación del concepto de terapia personalizada para cada paciente. También están cambiando los objetivos que se pretenden alcanzar con estos nuevos tratamientos en los pacientes de EM debido a su mayor eficacia, como por ejemplo una enfermedad sin actividad evidente o NEDA, del inglés “no evident disease activity” (Giovannoni et al. 2015).

1.8.1 Tratamiento de la EM con Interferón beta

El interferón beta continúa siendo uno de los fármacos más empleados en el tratamiento de las formas RR y PS en EM. Fue descubierto en el año 1957 como una

sustancia capaz de inducir una actividad antiviral en las células (Isaacs & Lindenmann 1957). Numerosos ensayos clínicos avalan el uso terapéutico del IFN β en la EM para formas RR y PS con actividad, ya que demuestran que produce una reducción en la frecuencia y gravedad de los brotes, un retraso en la progresión de la discapacidad y aumento en el porcentaje de pacientes libres de brotes (Anon 1993)(Jacobs et al. 1996) (Anon 1998). Además también está aprobado para su uso en pacientes con CIS (L. Kappos et al. 2006) (Carrithers 2014).

El interferón beta pertenece al grupo de interferones tipo I y posee capacidad antiviral, inmunomoduladora, antiproliferativa y hormonal. El uso de la forma recombinante del IFN β en la EM se inició por la creencia de que la enfermedad era causada por una infección viral en personas con un sistema inmune alterado. El mecanismo de acción sigue siendo en parte desconocido, aunque se sabe que en la EM ejerce acciones moduladoras sobre el sistema inmune de los pacientes (Weinstock-Guttman et al. 1995) (Kieseier 2011) (Kasper & Reder 2014). Los interferones beta parecen contrarrestar algunos procesos patogénicos de la EM al afectar la función de las células presentadora de antígeno, las células T y las células B del sistema inmune adaptativo. En la siguiente tabla se resumen las distintas acciones del interferón beta en estas células (Tabla procedente de (Kasper & Reder 2014).

	Disfunción en EM	Efecto del interferón-beta
Células presentadoras de antígenos	<ul style="list-style-type: none"> • Puede responder a la mielina en el SNC • ↓ La secreción de IFN-alfa de células Th1 • ↓ Supresión de la actividad en células dendríticas • ↑ Expresión de marcadores coestimuladores proinflamatorios y citoquinas 	<ul style="list-style-type: none"> • ↓ Presentación antígenos y estimulación de células T • ↓ Concentración de células dendríticas en sangre periférica • ↓ Secreción de IFN-alfa mediada por TLR9 • ↓ Producción de citoquinas pro-inflamatorias
Células T	<ul style="list-style-type: none"> • Las células CD8+ atacan a oligodendrocitos • ↑ Porcentaje de células Th17 • ↓ Células reguladoras CD8+ en sangre y LCR 	<ul style="list-style-type: none"> • ↑ Apoptosis de células pro-inflamatorias CD4+ y CD8+Th17 • ↓ Producción de citoquinas pro-inflamatorias • ↓ Entrada de células T a tejidos linfoides y así reducir su activación • ↑ Producción de células T reguladoras • ↓ Adhesión de células T a la barrera hematoencefálica
Células B	<ul style="list-style-type: none"> • ↑ MHC II • ↑ Células CD80+, ratio CD80+/CD86+ • ↑ Plasma BAFF 	<ul style="list-style-type: none"> • ↓ Expresión de MHC II • ↓ Células CD80+ • ↑ Secreción de IL-10 y TGFβ
Citoquinas	<ul style="list-style-type: none"> • ↑ Secreción de IL-17 • ↑ Secreción de IL-22 conduce a un mayor desarrollo de células linfoides • ↑ Secreción IL-23 conduce a aumento de la polarización de las células T 	<ul style="list-style-type: none"> • ↓ Secreción de IL-17 en las células Th17 • ↑ La secreción de citoquinas proTh2 (IL-4, IL-5, IL-13) • ↑ Secreción de IL-27 aumenta la inducción de células T reguladoras
Otros efectos	<ul style="list-style-type: none"> • ↑ La secreción de MMP, permitiendo que macrófagos activados entren en el SNC • Expresión del receptor de BDNF en las neuronas y glía cerca de las lesiones 	<ul style="list-style-type: none"> • ↓ MMP-9, restaura el ratio MMP-9 / TIMP-1 • ↑ Secreción de BDNF, lo cual teóricamente podría contribuir a la reparación axonal

Tabla 2. Efectos inmunomoduladores del IFNβ en la EM. APC, células presentadoras de antígeno; SNC, sistema nervioso central; LCR, líquido cefalorraquídeo; MHC, complejo principal de histocompatibilidad; IL, interleucina; TGF, factor de crecimiento transformante; BAFF, factor de activación de células B de la familia TNF; MMPs, metaloproteinasas de la matriz; BDNF, cerebro-factor neurotrófico derivado; Treg, células T reguladoras.

El IFNβ presenta un amplio rango de efectos en el sistema inmune que se asocian con la modulación de vías de señalización específicas, que están implicadas en la patogénesis de la esclerosis múltiple. A través de varios mecanismos, el IFNβ interfiere en la presentación antigénica, desplaza los perfiles Th1/Th2/Th17 a un estado más antiinflamatorio, incrementa la actividad de las células T y B reguladoras, y reduce la capacidad presentadora de antígeno de las células B.

Existen tres tipos de moléculas de IFNβ aprobadas por la EMA que se utilizan como tratamiento de la EM: IFNβ-1a intramuscular Avonex® de Biogen-Idec, IFNβ-1a subcutáneo Rebif® de Merck-Serono, IFNβ-1b subcutáneo Betaferon® de Bayer-Schering, IFNβ-1b subcutáneo Extavia® de Novartis Europharm Ltd e IFNβ-1a

pegilado subcutáneo Plegridy® de Biogen-Idec, con diferentes frecuencias de administración.

Las dos formas existentes de IFN β (IFN β -1a y IFN β -1b) tienen orígenes diferentes: el IFN β -1a se produce en células de ovario de hámster chino y es idéntica a la forma humana de IFN β , mientras que el IFN β -1b se produce en *Escherichia coli* y consta de 165 aminoácidos ya que carece de la metionina N-terminal, y en la posición 17 la cisteína está sustituida una por serina (Govindappa et al. 2015).

Muchos pacientes tratados con IFN β experimentan efectos secundarios similares a una gripe de gravedad variable, y algunos pueden tener depresión. En estos casos está indicado el uso de la nueva formulación pegilada (peginterferón- β 1a), cuya administración se reduce a cada dos semanas (Kieseier et al. 2015).

Tras más de 20 años de uso del IFN β como tratamiento para la esclerosis múltiple, a día de hoy sigue siendo uno de los fármacos más utilizados por su equilibrio entre eficacia y seguridad, corroborado durante todos estos años. Además el proceso de autoadministración también ha evolucionado a partir de un sencillo kit hipodérmico hasta los actuales dispositivos auto inyectables que estandarizan y facilitan la administración de la terapia, lo que ha mejorado también la tolerabilidad y la adhesión al tratamiento (Marziniak & Meuth 2014).

1.8.2 Respuesta al tratamiento con Interferón beta

A pesar de los beneficios que aporta este tratamiento a la EM, existe un gran porcentaje de pacientes (entre un 30 y el 50%) en los que el IFN β fracasa en reducir la tasa de recaída y la progresión de la discapacidad (Río et al. 2006). Es por ello necesario identificar precozmente a esos pacientes no respondedores al tratamiento con IFN β , con el fin de ofrecerles terapias alternativas. Sin embargo, es difícil debido a las incertidumbres inherentes a la definición “ausencia de respuesta a la terapia” en una enfermedad crónica como la esclerosis múltiple (Río et al. 2006), y además no existe un criterio clínico estandarizado para evaluar y definir esta ausencia de respuesta (Sormani & De Stefano 2013). En el mismo sentido, tampoco hay un biomarcador fiable para predecir la respuesta temprana al tratamiento con IFN β , diferente al propio seguimiento de la actividad analizada por RM y la clínica del paciente (Sormani et al. 2016).

En la mayoría de los ensayos clínicos con IFN β , los resultados de la ausencia de respuesta se han realizado tras 24 meses después del inicio del tratamiento y se han definido en base a criterios como la progresión de la EDSS, la tasa de brotes, el aumento de la actividad detectada por RM, o demás discapacidades neurológicas o cognitivas (Río & Ruiz-Peña 2016). Waubant et al. (Waubant et al. 2003) consideran pacientes no respondedores a aquellos que tras dos años de tratamiento presentan una tasa de brotes no menor que la que tuvieron en los dos años previos al inicio del tratamiento con IFN β . Durelli et al. (Durelli et al. 2007a) clasifican como no respondedores a aquellos pacientes que tras dos años de tratamiento presentan progresión en la EDSS de 1 punto o más (confirmado 6 meses) o que han experimentado uno o más brotes. Romeo et al. definen los no respondedores como aquellos pacientes que presentan una reducción en la tasa anualizada de brotes menor del 50%, comparada con la que tuvieron en los 2 años anteriores al tratamiento o al menos 4 lesiones activas tras 2 años de tratamiento (Romeo et al. 2013).

Aunque se han propuesto diversos criterios de respuesta, actualmente, el criterio más aceptado es del Río et al. (Río et al. 2009), en el que, tras 12 meses de tratamiento, los pacientes son clasificados de acuerdo a su actividad clínica y resonancia magnética. Cada paciente se clasifica como positivo o negativo para brotes (positivo: al menos un brote), progresión (positivo: incremento de al menos 1 punto en la escala EDSS) y actividad en RM (positivo: dos o más lesiones activas). Según este criterio, los pacientes no respondedores al IFN β son aquellos con al menos dos de las tres variables positivas.

Se han realizado numerosos esfuerzos para la identificación de biomarcador de respuesta al tratamiento. Estos pueden clasificarse según su grado de validación en biomarcadores exploratorios (cualquier biomarcador propuesto asociado a la falta de respuesta al IFN β), biomarcadores validados (para los cuales hay una evidencia más sólida sobre su asociación con la falta de respuesta) y biomarcadores clínicamente útiles (aquellos utilizados rutinariamente en la práctica clínica como predictor o indicador de una falta de respuesta al tratamiento (Comabella & Montalban 2014).

Como biomarcadores exploratorios de respuesta al tratamiento con IFN β se han propuesto algunas citoquinas, ya que pacientes no respondedores muestran un descenso en los niveles de IL-10 durante el tratamiento (Graber et al. 2007). También se ha descrito que pacientes no respondedores pueden tener menores ratios de IL-

10/IFN γ , IL-4/IFN γ y menores niveles de BDNF que los respondedores al inicio del tratamiento (Dhib-Jalbut et al. 2013).

Algunos de los biomarcadores de respuesta validados por varios grupos de investigación serían la hidroxivitamina D (Stewart et al. 2012), así como algunos polimorfismos del gen GPC5 (Céni et al. 2009), entre otros.

Uno de los principales biomarcadores de respuesta al tratamiento con IFN β es el desarrollo de anticuerpos neutralizantes (NAbs), siendo considerado un biomarcador con utilidad en la práctica clínica (Comabella & Montalban 2014) y que serán objeto de estudio en esta tesis.

1.8.2.1 Anticuerpos neutralizantes frente a IFN β

El IFN β es una proteína terapéutica con propiedades inmunogénicas, por lo que un porcentaje importante de pacientes tratados con IFN β desarrollan anticuerpos frente a la molécula. Existen dos tipos de anticuerpos: de unión y neutralizantes. Los anticuerpos de unión se unen a epítopos de la molécula de IFN β que no son utilizados para la interacción con el receptor de membrana, por lo que no impiden su actividad biológica. Sin embargo, los anticuerpos neutralizantes son un subgrupo de anticuerpos de unión que reconocen aquellos epítopos del IFN β utilizados para interactuar con su receptor, por lo que impiden la activación de la cascada de señalización y la acción del IFN β , siendo relevantes desde el punto de vista clínico.

Numerosos ensayos clínicos (PRISMS-4 2001) (Kappos et al. 2005) y estudios observacionales (Sorensen et al. 2003) (Durelli et al. 2007b) (Paolicelli et al. 2016) han asociado el desarrollo de NAbs con un aumento de la tasa de brotes y de la actividad medida por RM. Sin embargo, otros ensayos (Hartung et al. 2011) (Goodin et al. 2012) no encontraron un impacto negativo de los NAbs sobre los resultados clínicos de los pacientes. Estos resultados contradictorios podrían deberse al uso de pruebas distintas para la detección de NAb, al tiempo de muestreo, a distintas definiciones de positividad de NAb y a la duración de los estudios (Bertolotto 2015).

Lo que parece claro es que la presencia de NAbs a títulos altos y persistentes se asocia con una menor biodisponibilidad de IFN β y con el consecuente fracaso terapéutico (Creeke & Farrell 2013). Aun así, es importante señalar que los títulos y la presencia de NAbs pueden variar con el tiempo dentro de un mismo paciente. Muchos

pacientes con anticuerpos negativizan, y/o se mantienen en títulos bajos de NAbs (menos de 100 unidades neutralizantes por mililitro) (Petkau et al. 2004).

De acuerdo con las recomendaciones actuales, el tratamiento con IFN β debería ser interrumpido cuando la presencia de NAbs es persistente (es decir, dos resultados positivos y separados de 3-6 meses entre uno y otro) (Polman et al. 2010), y/o se detectan a títulos altos (Hegen et al. 2012).

Recientemente se han realizado estudios que demuestran una predisposición genética a desarrollar NAbs, en concreto determinados alelos del HLA de clase II (DRB1*04:01, *04:08, *16:01) (Hoffmann et al. 2008) (Buck et al. 2011) y algunos polimorfismos de un solo nucleótido (SNPs) (rs 9272105 y rs4961252) (Weber et al. 2012) se han asociado con un mayor riesgo de desarrollar NAbs. El desarrollo de anticuerpos de unión al IFN β no neutralizantes, detectados 3 meses después de iniciar el tratamiento con IFN β , también parece predecir la aparición de NAbs (H Hegen et al. 2014).

Independientemente de la predisposición genética, es ampliamente conocido que en la inmunogenicidad del IFN β intervienen varios factores como el régimen del tratamiento, la vía de administración, la dosis, o la frecuencia de la administración (Bertolotto et al. 2000) (Schellekens 2005). Es por ello que existen diferencias en la inmunogenicidad entre las diferentes preparaciones de IFN β ya que los pacientes que usan IFN β -1b desarrollan NAbs en mayor porcentaje que aquellos que usan otras preparaciones. Así, del 2,0 al 18,9% de los pacientes desarrollan NAbs frente a Avonex®, del 16,5 al 35,4% de los pacientes desarrollan NAbs frente a Rebif® y del 27,3 al 53,3% de los pacientes desarrollan NAbs frente a Betaferon® (Govindappa et al. 2015), aunque el porcentaje de positividad varía entre los diferentes estudios.

Aunque por definición un anticuerpo es específico para el antígeno que lo crea, muchos antígenos pueden contener varios epítomos, o incluso diferentes antígenos pueden presentar epítomos comunes. Se ha constatado que algunos pacientes con EM, que generan NAbs frente a una preparación concreta de IFN β , tienen la capacidad de reconocer y neutralizar a las moléculas de IFN β de otras preparaciones diferentes, lo que se conoce como **reactividad cruzada**. Debido a esto, la decisión médica de cambiar de una preparación de IFN β a otra en pacientes que desarrollan NAbs puede no ser clínicamente beneficiosa (Khan & Dhib-Jalbut 1998) (Bertolotto et al. 2000) (Zare et al. 2013). Algunos estudios sin embargo contradicen estos

resultados, negando la existencia de la reactividad cruzada en los NAbs (Myhr et al. 2000).

Finalmente, la detección y cuantificación de NAbs requiere una medición de la pérdida de la actividad biológica del IFN β . Aunque se han desarrollado varios métodos para su detección, la Organización Mundial de la Salud (OMS) (WHO Expert Committee on Biological Standardisation 1985) recomienda el uso del test del efecto citopático (CPE) o bioensayo, siendo el método de referencia con el que comparar los otros métodos. En dicho ensayo, una línea celular (susceptible a ser infectada por un virus) se trata con el suero del paciente y/o con IFN β antes de ser expuesta a la acción de un virus específico. En ausencia de anticuerpos neutralizantes, las células son estimuladas por el IFN β , producen factores antivirales y el cultivo queda protegido de la acción del virus. Sin embargo, en presencia de anticuerpos se bloquea la acción del IFN β y las células son infectadas por el virus.

1.8.2.2 Señalización del IFN β mediante la vía JAK-STAT

La vía de señalización JAK-STAT es actualmente considerada como una vía de señalización conservada evolutivamente que es utilizada por diversas citoquinas, factores de crecimiento y moléculas relacionadas, para ejercer sus funciones. Esta vía proporciona a las células un mecanismo sofisticado y directo por el cual los diversos factores extracelulares controlan la expresión génica (O'Shea et al. 2015).

Dentro el sistema inmune, la vía JAK-STAT es fundamental para enlazar diversos aspectos, desde la resistencia a la infección hasta el mantenimiento de la tolerancia inmunológica, la imposición de funciones de barrera e incluso la protección contra el cáncer. Con todo ello, no es de extrañar que en casi todos los tipos de enfermedades autoinmunes se hayan encontrado algún defecto en esta vía de señalización (Villarino et al. 2015).

El IFN β es una citoquina perteneciente al grupo de interferones de tipo I (IFN) que de forma endógena es secretada por las células infectadas, además de ser utilizado como tratamiento para la EM, como ya se ha comentado anteriormente en este manuscrito. Esta citoquina ejerce su función mediada por la activación de la vía de señalización JAK-STAT, como se muestra en la figura 11 (Ivashkiv & Donlin 2013).

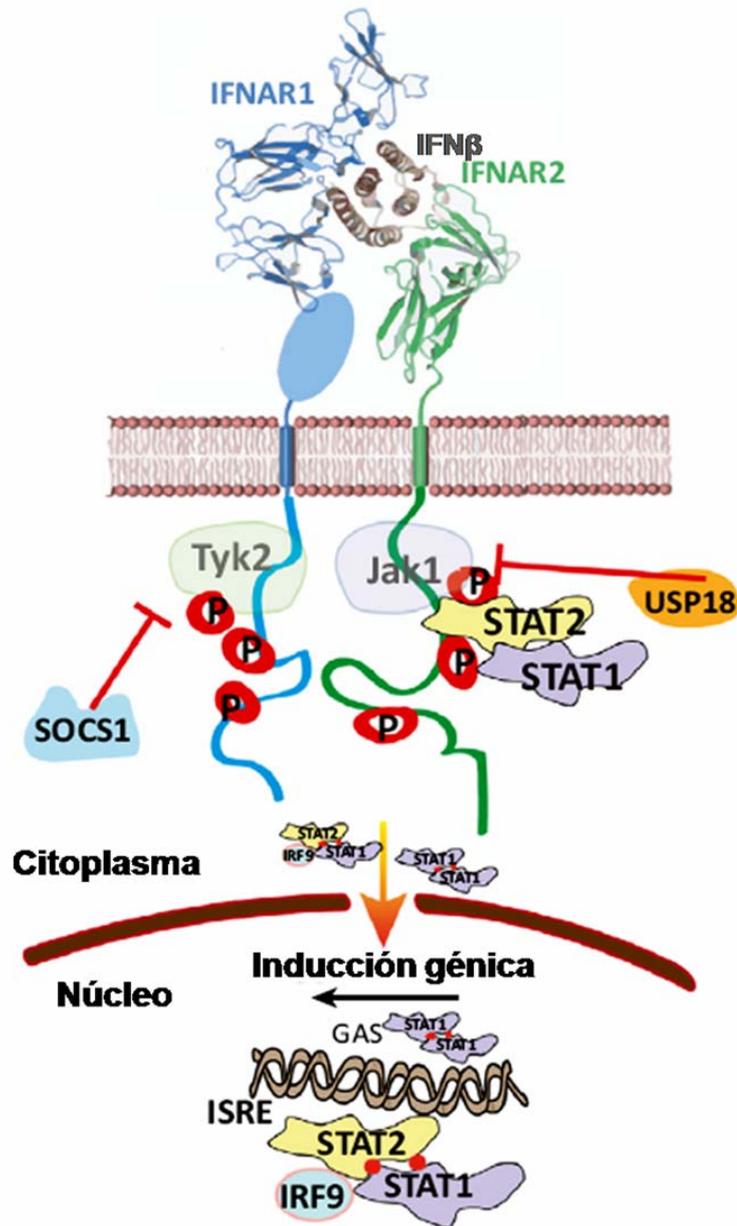


Figura 11. Vía de señalización del IFNβ. Imagen modificada de (Schreiber & Piehler 2015).

El IFNβ se une a su receptor de membrana específico denominado IFNAR, que está presente en la mayoría de los tipos celulares, activando así la vía de señalización celular JAK-STAT. Este receptor heterodimérico se compone de dos proteínas transmembrana llamadas IFNAR1 e IFNAR2, con dominios citoplasmáticos e intracelulares. Ambas están disociadas en la membrana de las células y, en presencia

de IFN β , éste se une a la subunidad IFNAR2 y produce el acercamiento y la unión de IFNAR1 formando un complejo. Tanto IFNAR1 como IFNAR2 presentan asociadas en su dominio citoplasmático protein-tirosin quinasa. IFNAR1 tiene asociada la tirosina quinasa 2 (TyK2) e IFNAR2 a la Janus quinasa 1 (JAK1). Estas quinasa se activan como consecuencia de la unión de IFNAR1 y 2, transmitiendo la señal al interior celular fosforilando a los factores transductores de la señal y activadores de la transcripción (STATs), principalmente STAT1 y STAT2 (Stark & Darnell 2012). TyK2 media la fosforilación de la tirosina en posición 466 de IFNAR1, lo cual crea un sitio de acoplamiento para los dominios SH2 de las proteínas STAT2. La tirosina 690 de STAT2, al ser fosforilada, permite la unión de STAT1. Posteriormente, se produce la fosforilación de la tirosina 701 de STAT1, permitiendo la heterodimerización de STAT1 y STAT2, siendo ambas objeto de estudio en esta tesis. El dímero STAT1-STAT2 al fosforilarse, forma un complejo trimolecular con el factor regulador de interferón 9 (IRF9). Este complejo llamado ISGF3 (factor genético regulado por interferón 3) se transloca al núcleo celular donde se une a elementos de respuesta estimulados por interferón (ISRE), activando la transcripción de los genes de respuesta al interferón (ISG).

La expresión de estos genes ISGs, que pueden llegar a ser cientos, inducen un estado antiviral, además de producir efectos inmunomoduladores y antiproliferativos en las células (MacMicking 2012). Estos genes codifican proteínas que consiguen aumentar la producción de agentes antiinflamatorios como IL-10, inhibiendo la IL-17 proinflamatoria y la osteopontina. También limitan la migración de leucocitos a través de la barrera hematoencefálica y estimulan la producción de factores tróficos que median en la reparación de tejidos, entre algunos de sus efectos (Kieseier 2011).

La actividad del IFN β se puede analizar midiendo su capacidad para inducir la fosforilación de la vía JAK-STAT y la inducción de genes específicos, así como las respuestas celulares antivirales, antiproliferativas e inmunomoduladoras. Las respuestas antivirales se observan en todas las líneas celulares incluso a muy bajas concentraciones de IFN β . Por el contrario, la actividad antiproliferativa e inmunomoduladora del IFN β es específica de cada tipo celular, y se activa en concentraciones fisiológicas de IFN β . Además es necesaria una activación continua del receptor durante días, y es dependiente de la concentración de receptores de la superficie celular (Levin et al. 2011)(Levin et al. 2014).

Las distintas acciones del IFN β están mediadas a través de la interacción con IFNAR, aunque se ven modificadas por las diferentes concentraciones de ligando, receptor y tiempos de activación. Estudios recientes consideran clave en la regulación de las respuestas celulares al IFN β , la dinámica espacio-temporal de la dimerización de IFNAR1 y IFNAR2 en la membrana plasmática (Schreiber & Piehler 2015). Aunque su correlación exacta con la propagación de la señal aún no se conoce, es importante para la comprensión de la plasticidad funcional del receptor. En el mismo sentido, la dimerización de IFNAR facilita las interacciones entre Jak1 y Tyk2, promoviendo la actividad quinasa a través de fosforilación cruzada, además de la fosforilación de varios residuos de tirosina de IFNAR1 e IFNAR2. A este nivel se conocen dos elementos que regulan la vía de señalización negativamente, SOCS1 (el cual es un potente inhibidor de las JAKs al unirse a la forma fosforilada de Tyk2) y USP18 (que actúa asociándose al dominio citosólico de IFNAR2) (Francois-Newton et al. 2012). Tanto SOCS1 como USP18 son ISGs, por lo que ejercerían la regulación negativa de la vía tras aproximadamente 4 h de la activación. Otro mecanismo regulatorio de la vía es la endocitosis de las subunidades de IFNAR, produciéndose la de IFNAR1 inmediatamente después de la ocupación del receptor y la de IFNAR2 mucho más tardíamente (Marijanovic et al. 2007) (Schreiber & Piehler 2015).

Se han descrito alteraciones de la vía de señalización JAK-STAT en algunas enfermedades autoinmunes como artritis reumatoide, lupus eritematoso y psoriasis (Axtell & Raman 2012) (Kasperkovitz 2004) (Ramírez-Vélez et al. 2012) (Hald et al. 2013), destacando la importancia de esta vía en la patogenia de enfermedades con base inmunológica. Por ello, en los últimos años se han desarrollado fármacos que tienen como diana terapéutica la vía de señalización JAK-STAT, conocidos como "Jakinib" (Schwartz et al. 2015). Como ejemplo, Tofacitinib, es un inhibidor de JAK1 ampliamente estudiado, que ha demostrado ser eficaz en ensayos clínicos como tratamiento para la artritis reumatoide y está bajo investigación para el tratamiento de otras enfermedades autoinmunes como la psoriasis, la enfermedad inflamatoria intestinal o el síndrome de Sicca (O'Shea & Plenge 2013). En la uveítis, una enfermedad ocular inflamatoria que puede tener un origen autoinmune, se ha demostrado que un péptido mimético de SOCS1 (llamado SOCS1-KIR) que inhibe la vía JAK2/STAT1 suprime la uveítis y confiere efectos neuroprotectores (He et al. 2016). Igualmente, en la EM, se han empezado a utilizar inhibidores de la vía JAK-

STAT, como es el caso de Daclizumab para el bloqueo del receptor de IL-2 (Gold et al. 2013) (Giovannoni et al. 2014).

En este sentido, también se han descrito alteraciones de la vía JAK-STAT en pacientes con EM, encontrando una activación diferencial de las STATs en las diferentes subpoblaciones leucocitarias, tras la administración sistémica de IFN β -1a o su estimulación *in vitro* (Zula et al. 2011). Además, la activación de la vía JAK-STAT se ha correlacionado con distintos aspectos clínicos. La forma fosforilada de STAT1 (pSTAT1) se ha propuesto como un marcador de la actividad en la EM ya que se ha observado un aumento de pSTAT1 en las PBMC de pacientes durante la fase activa de la enfermedad (Frisullo et al. 2006). También se ha encontrado mayores niveles de SOCS1 en células T CD4+ de pacientes con EMRR durante los brotes que en durante el periodo remisión (Lopez de Lapuente et al. 2015). En cuanto a la respuesta al tratamiento con IFN β , se ha observado que pacientes con EM no respondedores al tratamiento con IFN β , muestran antes del inicio del tratamiento un mayor grado de activación de la vía JAK-STAT, con una elevación en los niveles de IFNAR1 y pSTAT1 en monocitos (Comabella et al. 2009).

En la actualidad, aunque todavía no se ha encontrado un biomarcador precoz que permita identificar aquellos pacientes no respondedores al IFN β , parece razonable continuar en su búsqueda. Los estudios realizados en la vía JAK-STAT hasta la fecha, sugieren que esta pueda tener un papel importante en la falta de respuesta al tratamiento con IFN β . En unos de los objetivos de esta tesis doctoral planteamos el estudio de la vía JAK-STAT, en cuyo acercamiento experimental se analizan conjuntamente cuatro de sus componentes (IFNAR1, IFNAR2 y las formas fosforiladas de STAT1 y 2) para identificar patrones de activación relacionados con el fallo o con el éxito terapéutico.

1.8.2.3 Expresión de genes inducibles por IFN β

El IFN β ejerce su acción activando la transcripción de los ISG. El resultado final de la acción del IFN β lo va a determinar la naturaleza de estos genes, su magnitud, la duración y el contexto celular. Hasta la fecha, se han identificado una gran cantidad de estos ISG que se han ido recopilando en bases de datos como por ejemplo INTERFEROME (<http://www.interferome.org>), realizadas a partir de las listas de genes

generadas por las tecnologías de expresión de alto rendimiento y que se publican en la literatura científica. Estas bases de datos proporcionan herramientas muy útiles en la identificación de patrones génicos activados por interferón junto con sus potenciales consecuencias biológicas y moleculares (Samarajiva et al. 2009)(Rusinova et al. 2013). La identificación de genes inducidos por IFN β de forma diferencial durante su tratamiento en pacientes con EM, puede ayudar a identificar biomarcadores de respuesta, además de conocer en mayor profundidad los mecanismos moleculares de acción vinculados a los efectos beneficiosos del tratamiento.

Algunos ISG están muy bien caracterizados en relación con funciones específicas, por ejemplo las proteínas antivirales MX1, MX2 y OAS2, o las proteínas constituyentes de la vía de interferón tipo I como IFNAR1, IFNAR2 y STAT1, así como las citoquinas IL10, IFN β y CXCL10, receptores de membrana TRAIL y TLR1, o proteínas importantes en la regulación de los procesos celulares como USP18 (Singh et al. 2007). Sin embargo, muchos ISGs no tienen función conocida, sin olvidar que también existen genes que se reprimen con la acción del IFN β .

La expresión del gen de la proteína antiviral myxovirus A (MxA) es inducida selectivamente por IFN β y su cuantificación se ha utilizado como indicador de la biodisponibilidad *in vivo* del IFN β y como biomarcador predictor de la respuesta al tratamiento. Así, se han encontrado menores niveles de MxA en pacientes respondedores antes del tratamiento que en no respondedores a IFN β (Matas et al. 2014) y, sin embargo, tras 3 meses de tratamiento los pacientes que mostraron una menor capacidad de inducción de MxA eran más propensos a ser no respondedores (Matas et al. 2016).

Se han realizado varios perfiles transcriptómicos en sangre total o PBMC de pacientes con EM con o sin tratamiento con interferón beta, para investigar patrones de expresión génica alterados asociados a la enfermedad, a los efectos beneficiosos del IFN β o al fracaso terapéutico (Singh et al. 2007) (Yamaguchi et al. 2008) (Croze et al. 2013) (Nickles et al. 2013) (Harari et al. 2015). Así, se han encontrado incrementos en la transcripción de genes involucrados en la traducción de proteínas, fosforilación oxidativa y sinapsis inmune en pacientes de EM con formas RR, PP y PS (Gandhi et al. 2010). También se ha visto que una baja expresión de genes pertenecientes a la vía de la polimerasa I se asocia con formas benignas o poco activas de MS (Achiron et al. 2012). Además, se han identificado 11 genes sobreexpresados diferencialmente

en la EM que son corregidos por el tratamiento con IFN β , atribuyéndoles por tanto un papel patogénico en la enfermedad. Algunos de estos genes codifican para proteínas con funciones conocidas dentro del sistema inmune (100a11, Ist1, FCGRT, GMFG), genes implicados en la función del proteasoma (PSMA7), en la señalización de Wnt (CSNK2B), en la fosforilación oxidativa (COX4I1) o en el estrés oxidativo (PARK7) (Nickles et al. 2013).

A diferencia de los estudios genéticos, los resultados obtenidos con ARN son difíciles de comparar ya que el transcriptoma varía con las condiciones ambientales externas y con el diseño específico de cada estudio. La mayoría de los estudios transcriptómicos publicados analizaron los cambios en la expresión génica tras varios días (Fernald et al. 2007) (Weinstock-Guttman et al. 2008), (Hilpert et al. 2008), o varios meses (Sato et al. 2006) (van Baarsen et al. 2008) después de la administración del IFN β . Sin embargo, muy pocos estudios han evaluado el efecto *in vivo* justo tras la administración del fármaco, siendo este el abordaje experimental que se ha llevado a cabo en esta tesis doctoral para la identificación de biomarcadores de respuesta al tratamiento o perfiles de expresión asociados a la respuesta al IFN β .



HIPÓTESIS



2. HIPÓTESIS

En la actualidad, aunque existen numerosos fármacos disponibles para el tratamiento de la EM, el IFN β continúa siendo un tratamiento ampliamente utilizado por su excelente relación seguridad *versus* eficacia. Sin embargo, existe un porcentaje elevado de pacientes que no responden adecuadamente al tratamiento con este fármaco y no existe ningún biomarcador claro de respuesta al IFN β que permita identificar aquellos pacientes en los que el tratamiento va a ser eficaz.

El funcionamiento correcto de la cascada de señalización intracelular JAK-STAT tras la interacción del IFN β con su receptor es fundamental para iniciar la transcripción de los genes inducibles por IFN β y que se lleve a cabo la actividad biológica del mismo. En este sentido, la heterogeneidad en la respuesta terapéutica al IFN β podría explicarse por diferencias en la activación de la vía de señalización y/o por la inducción de determinados genes tras la administración del fármaco.

A nivel clínico, uno de los marcadores mas aceptados para monitorizar la respuesta al tratamiento es la detección de anticuerpos neutralizantes frente a IFN β , aunque existe cierta controversia sobre su uso. Debido a que estos anticuerpos bloquean la unión del IFN β a su receptor, la activación de la vía de señalización JAK-STAT podría alterarse en aquellos pacientes que desarrollan anticuerpos, afectando la actividad biológica del IFN β .

La acción del IFN β viene determinada por la naturaleza de los genes inducibles tras su administración, su magnitud, duración y el contexto celular. Por lo que un análisis de transcriptoma, analizando los cambios de expresión génica inmediatamente después de la inyección con IFN β , permitiría la identificación de patrones de expresión diferenciales entre pacientes respondedores y no respondedores.





OBJETIVOS





3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo I

Evaluar los niveles de receptores de membrana y el estado de activación de las proteínas que intervienen en la vía de señalización JAK-STAT, tras estimulación *in vitro* con IFN β , para identificar patrones de activación que puedan asociarse a una buena respuesta al tratamiento con este fármaco.

3.2 Objetivo II

Evaluar la reactividad cruzada de los anticuerpos neutralizantes frente a IFN β en pacientes con esclerosis múltiple y su implicación en la activación de vía de señalización JAK-STAT.

3.3 Objetivo III

Caracterizar, mediante arrays de expresión, los patrones de expresión génica inmediatamente después de la administración de IFN β para evaluar posibles diferencias transcriptómicas entre pacientes respondedores y no respondedores.





MATERIAL Y MÉTODOS



4. MATERIAL Y MÉTODOS

4.1 Objetivo I: Estudio funcional de la vía de señalización del IFN β .

4.1.1 Población de estudio.

Para la realización del estudio, se reclutaron 12 sujetos sanos y 48 pacientes con EM clínicamente definida según los criterios de McDonald (Polman et al. 2011) en la Unidad de Esclerosis Múltiple del Servicio de Neurología del Hospital Regional Universitario de Málaga, donde además se les realizó un seguimiento clínico regular de la enfermedad. Tanto a los pacientes como a los sujetos sanos, se les informó de los objetivos de la investigación y se les solicitó consentimiento informado para su participación. El estudio fue previamente aprobado por el Comité de Ética de la Investigación Málaga Nordeste.

De los pacientes con EM, 17 no habían recibido tratamiento previo a la toma de la muestra durante al menos 6 meses, y 31 estaban siendo tratados con IFN β -1a o 1b durante 12-14 meses. Todos los pacientes se encontraban en remisión en el momento del muestreo, y ninguno había recibido inmunosupresores o corticosteroides en los tres meses anteriores a la toma de muestras. En el caso de los pacientes tratados, la extracción de sangre se realizó entre 10-12 horas después de la administración del tratamiento. Las muestras fueron proporcionadas por el Biobanco del Sistema Sanitario Público de Andalucía.

Los sujetos sanos seleccionados no presentaban ninguna patología en el momento de la toma de la muestra y no presentaban parentesco con los pacientes.

Todos los pacientes en tratamiento que se incluyeron en el estudio fueron negativos para la presencia de anticuerpos neutralizantes frente a IFN β .

Para cada paciente se registraron las siguientes variables clínicas y demográficas: sexo, edad, duración de la enfermedad, EDSS basal (al comienzo del tratamiento con IFN β), EDSS tras un año de tratamiento, número de brotes durante el año previo al inicio del tratamiento, número de brotes durante el primer año de tratamiento, número

de pacientes con actividad en RM antes del inicio del tratamiento y número de pacientes con actividad en RM tras un año de tratamiento con IFN β .

La respuesta de los pacientes fue evaluada tras un año de tratamiento con IFN β atendiendo a criterios de actividad clínica y RM (Rio et al. 2009). Cada paciente podía ser positivo para los brotes, la progresión o la actividad en resonancia magnética. Aquellos pacientes que presentaron al menos un brote durante el primer año de tratamiento se consideraron positivos para los brotes; los pacientes que mostraron progresión en la escala EDSS de al menos un punto durante el primer año de tratamiento (confirmada a los 6 meses) se consideraron positivos para la progresión; por último, aquellos pacientes que desarrollaron tres o más lesiones activas (ya sean lesiones nuevas o ampliadas en T2, en comparación con la resonancia magnética basal, o lesiones realzadas con gadolinio) al cabo de 1 año de tratamiento, fueron clasificados como positivos para actividad en resonancia magnética. Con todos estos datos, los pacientes fueron considerados como no respondedores si presentaban dos o tres de las variables positivas durante el primer año de tratamiento. Los otros pacientes se consideraron respondedores para el tratamiento con IFN β .

4.1.2 Medios de cultivo, reactivos y material utilizado.

- Tubos tratados con litio heparina (Vacuette®).
- Solución salina fisiológica (0,9% ClNa) (Laboratorios Serra Pamies).
- Tubos de 12 ml de polipropileno con tapón (Francisco Soria Melguizo®).
- Ficoll-Hypaque 1,077g/ml (ICN Biomedicals Inc., OH, EE.UU.)
- Centrífuga (Haeraeus® Instruments, GmbH. Hanau, Germany).
- Agitador de tubos Heidolph Relax top (Heidolph Instruments GmbH & Co. KG, Germany).
- Microcentrifuga MiniSpin Plus (Eppendorf®)
- Pipeta Pasteur (Sigma-Aldrich®).
- Pipetas de 10, 100 y 1000 μ L (Eppendorf®).
- Pipeteador automático (Eppendorf®).

- Pipetas serológicas de 10 y 25 ml (TPP®).
- Criotubos (Nunc®, Thermofisher. MA, EE.UU)
- DMSO (Sigma-Aldrich®)
- Medio de cultivo RPMI: Roswell Park Memorial Institute 1640 (BioWhittaker®) suplementado con L-glutamina 2 mM (ICN Biomédica®), Gentamicina (Normon®) a 50 mg/ml y Suero Bovino Fetal (SBF) (BioWhittaker®) al 40%.
- Tubos de poliestireno de 5 ml para citometría de flujo (BD Biosciences)
- Solución fijadora Cytifix (BD Biosciences)
- Perm/Wash Buffer (BD Bioscience)
- PermBuffer III (BD Biosciences)

4.1.3 Toma de muestras y aislamiento de células mononucleares de sangre periférica (PBMC).

A cada sujeto del estudio se le extrajeron, por punción venosa, 8 ml de sangre periférica, recogida en tubos tratados con heparina litio.

Las PBMC se aislaron mediante un gradiente de densidad Ficoll-Hypaque 1,077g/ml. La sangre se diluyó con solución salina fisiológica a una proporción 1:1 y evitándose la mezcla, se dispensó lentamente en un tubo estéril de polipropileno sobre aproximadamente 4 mL de solución de Ficoll-Hypaque. Posteriormente se centrifugó a 600 x g durante 25 minutos a temperatura ambiente y sin freno. La centrifugación consigue la separación de cuatro fases en un gradiente de densidad: el plasma, la fracción mononuclear (distinguiéndose como un halo blanquecino), la solución Ficoll-Hypaque y por último los eritrocitos junto con las plaquetas. Con la ayuda de una pipeta Pasteur se recogió la fracción mononuclear evitando aspirar la fase Ficoll-Hypaque, por su toxicidad para las células.

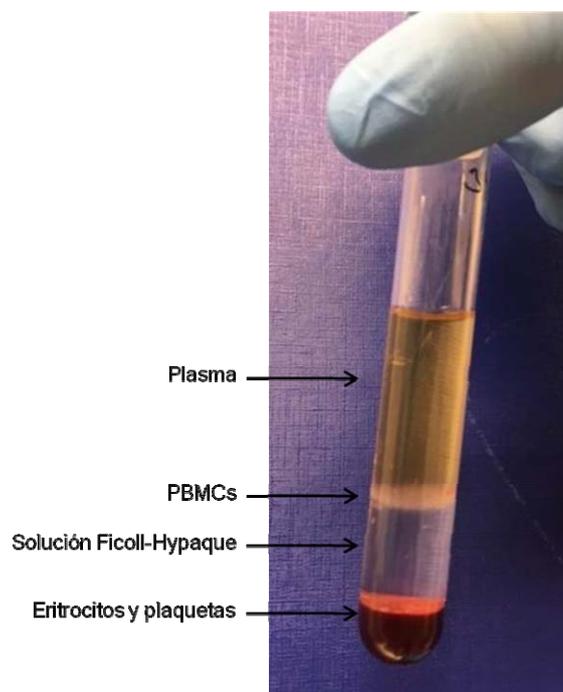


Figura 12. Fases obtenidas tras la realización del gradiente de densidad sobre Ficoll-Hypaque.

Las PBMC obtenidas se transfirieron a otro tubo estéril y se lavaron con solución salina fisiológica, centrifugando a 600 x g durante 10 minutos a temperatura ambiente. A continuación, se decantó el sobrenadante y se lavaron por segunda vez las PBMC con solución salina fisiológica, centrifugando en este caso a 120 x g durante 10 minutos. Nuevamente se desechó el sobrenadante, y el pellet de células obtenido se congeló en Nitrógeno líquido. Para ello se añadieron a cada tubo 500 μ L de medio RPMI al 40% de SBF y 500 μ L de RPMI al 40% de SBF con un 20% de DMSO.

4.1.4 Cultivo de PBMC en presencia de IFN β

Las PBMC almacenadas en nitrógeno líquido se descongelaron rápidamente en un baño termostático a 37°C. Antes de su descongelación completa, se añadieron en cabina de flujo laminar 8 mL de RPMI al 20% de SBF, y se centrifugaron a 300 x g durante 10 minutos. Tras la centrifugación, las células se resuspendieron en otros 10 mL de RPMI al 20% de SBF, se cuantificaron mediante el método de exclusión con Azul Tripán en Cámara de Neubauer, y se volvieron a centrifugar a 300 x g durante 10 minutos. El botón de células obtenido, se resuspendió en 5 mL de RPMI al 0% de SBF y la suspensión celular se incubó a 37°C durante 90 minutos, con el fin de alcanzar en las células el nivel más bajo de activación. En la figura 13 se resume en

un esquema la secuencia de pasos que se realizó hasta la adquisición de las células en el citómetro de flujo.

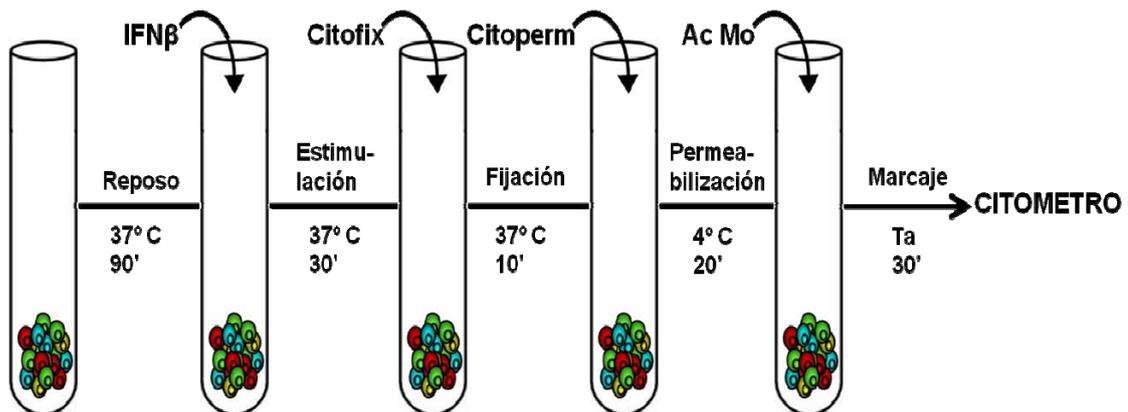


Figura 13. Esquema del protocolo llevado a cabo para obtener los datos de expresión por citometría de flujo.

Tras la incubación, las células de cada paciente se distribuyeron en tubos de poliestireno de 5 ml, específicos para la adquisición con citómetro de flujo (BD Biosciences) a razón de 500.000 células por tubo en 0.45 mL de RPMI al 0% de SBF. Posteriormente se añadieron 50 μ L de RPMI al 0% de SBF, con 1000 UI de IFN β -1a (Avonex, Biogen, Inc.), para permitir la transducción de señales y la fosforilación de las proteínas o con 50 μ L de RPMI al 0% de SBF, sin IFN β , en el caso de las células no estimuladas, que se consideraron como los niveles basales.

Las células se dejaron estimulándose durante 30 minutos en el incubador a 37°C. Este tiempo de estimulación fue establecido durante la puesta a punto del protocolo, en el que se probaron diferentes tiempos de estimulación (estableciéndose 30 minutos como el tiempo más óptimo) y diferentes concentraciones de IFN β (estableciéndose 1000UI/mL como el más conveniente). Tras ese tiempo, la estimulación se detuvo añadiendo a cada tubo 250 μ L de solución fijadora Cytfix (BD Biosciences) durante 10 minutos a 37°C. Seguidamente se realizaron dos lavados con la solución de lavado Perm/Wash Buffer (BD Biosciences), añadiendo 2 mL de solución, y centrifugando a 300 x g durante 5 minutos a 4°C.

Para permitir la permeabilización de los anticuerpos a los antígenos intracelulares y a su vez ser compatible con una tinción de marcadores de superficie celular, se le añadió a cada tubo 250 μ L de solución permeabilizadora PermBuffer III (BD Biosciences) y se incubaron los tubos a 4°C durante 20 min. A ello le siguieron dos lavados con Perm/Wash Buffer a 300 x g durante 5 minutos a 4°C, como en el paso anterior. Tras los lavados se procedió al marcaje de las células con anticuerpos específicos.

La expresión de IFNAR1 e IFNAR2 así como de las proteínas fosforiladas pSTAT1 y pSTAT2 se determinaron mediante el marcaje con anticuerpos específicos para esas proteínas. La expresión de dichas proteínas se determinó en las poblaciones de células T (CD4⁺ y CD8⁺) y en monocitos identificados mediante AcMo.

4.1.4.1 Marcaje con anticuerpos

Se usaron los siguientes Ac Mo producidos en ratón frente a antígenos de superficie linfocitaria humanos:

- **Anti-CD3** conjugado a proteína peridín-clorofílica (PerCP) (Clon SK7; IgG1; BD Biosciences). El antígeno CD3 normalmente está presente en los linfocitos T, que comprenden entre el 61% al 85% de los linfocitos de sangre periférica.
- **Anti-CD8** conjugado a ficoeritrina-cianina7 (PeCy7) (Clon RPA-T8; IgG1, BD Biosciences). El antígeno CD8 se expresa en la superficie de la subpoblación de linfocitos T supresores/citotóxicos, que representa del 19% al 48% de los linfocitos de sangre periférica, en el 60-85% de los timocitos y en subpoblaciones de linfocitos NK.
- **Anti-CD14** conjugado a alofococianina (APC) (Clon M5E2; IgG2a; BD Biosciences). En sangre, el antígeno CD14 se expresa en niveles elevados en monocitos. También puede expresarse en macrófagos interfoliculares, células dendríticas reticulares y algunas células de Langerhans.

Se usaron los siguientes anticuerpos específicos producidos frente a las proteínas humanas de la vía de señalización del IFN β .

- **Anti-IFNAR1** conjugado a Fluoresceína (FITC) (Clon 85228; IgG1; R&D Systems). El antígeno IFNAR1 se expresa en todos los tejidos, órganos y la mayoría de las líneas celulares, permitiendo a las células responder a los interferones.
- **Anti-IFNAR2** conjugado a R-ficoeritrina (PE) (Clon MMHAR-2; IgG2A; PBL Assay Science). El antígeno IFNAR2, al igual que el IFNAR1 se expresa la mayoría de tejidos, órganos y líneas celulares, permitiendo a las células responder a los interferones.
- **Anti-pSTAT1** conjugado a Alexa Fluor® 488 (Clon 4^a; IgG2A; BD Biosciences). El antígeno STAT1 está presente en la mayoría de tipos celulares. Es mediador de varias vías de señalización intracelular, estando su forma activa fosforilada.
- **Anti-pSTAT2** conjugado a Fluoresceína (FITC) (IgG; R&D Systems). STAT2 es un factor de transcripción citoplásmico, que es fosforilado y translocado al núcleo para activar la transcripción de genes.

La información detallada de los anticuerpos usados aparece reflejada en la tabla 3.

Nombre	Monoclonal o Policlonal	Especie hospedadora	Proveedor comercial	Número catálogo	Antígeno usado para producir el anticuerpo	Dilución final	Fluorocromo
CD3 PerCP	Monoclonal	Ratón	BD Biosciences	345766	Timocitos humanos	1:35	Proteína Peridín Clorofila (PerCP)
PE-Cy TM 7 Mouse Anti-Human CD8	Monoclonal	Ratón	BD Biosciences	557746	CD8a humano	1:100	Ficoeritrina-Cianina7 (PE-Cy TM 7)
APC Mouse Anti-Human CD14	Monoclonal	Ratón	BD Biosciences	555399	Proteína CD14 humana	1:32	Alofococianina (APC)
Alexa Fluor [®] 488 Mouse Anti-Stat1 (pY701)	Monoclonal	Ratón	BD Biosciences	612596	Péptido humano Stat1 fosforilado	1:17	Alexa Fluor [®] 488
Phospho-STAT2 (Y689) Fluorescein-conjugated Antibody	Policlonal	Conejo	R&D Systems	IC2890F	Fosfopéptido que incluye STAT2 humano Y689	1:20	Fluoresceína (FITC)
Human IFN-alpha/beta R1 Fluorescein-conjugated Antibody	Monoclonal	Ratón	R&D Systems	FAB245F	IFN α / β R1 recombinante humano Lys28-Lys436	1:10	Fluoresceína (FITC)
PE Conjugated Anti-Human IFNAR2 Antibody	Monoclonal	Ratón	PBL Assay Science	21385-3	Subunidad 2 del receptor de interferón humano α / β	1:20	R-Phycoerythrin (PE)

Tabla 3. Información detallada de los anticuerpos usados.

Como controles negativos se utilizaron células no marcadas (para sustraer la autofluorescencia celular). También se usaron controles isotópicos asociados a cada fluorocromo, que se muestran en la tabla 4 (para sustraer la señal de fondo procedente de uniones inespecíficas de los anticuerpos).

Control Isotípico	Anticuerpo Específico
PerCP Mouse IgG1	CD3 PerCP
PE-Cy™7 Mouse IgG1	PE-Cy™7 Mouse Anti-Human CD8
APC Mouse IgG1	APC Mouse Anti-Human CD14
Alexa Fluor®488 Mouse IgG2a	Alexa Fluor® 488 Mouse Anti-Stat1
CFS Rabbit IgG	CFS Rabbit anti-phospho-STAT2
CFS Mouse IgG1	CFS Anti-Human IFN-alpha/beta R1
PE Mouse IgG2A	PE Anti-Human IFNAR2

Tabla 4. Controles isotípicos utilizados para cada anticuerpo.

Para poder realizar el análisis de la expresión de los 4 componentes de la vía de señalización JAK-STAT en las poblaciones celulares consideradas, se tuvieron que realizar 3 combinaciones diferentes de anticuerpos, tal y como aparecen descritas en la tabla 5.

Fluorocromos					
Tubo	FITC/Alexa Fluor488	PE	PerCP	APC	PeCy7
1	IFNAR1	IFNAR2	CD3	CD14	CD8
2	pSTAT1		CD3	CD14	CD8
3	pSTAT2		CD3	CD14	CD8

Tabla 5: Combinaciones de anticuerpos conjugados a distintos fluorocromos para la determinación de la expresión de los distintos marcadores en las poblaciones celulares estudiadas.

A cada tubo con la suspensión celular, se le añadieron los anticuerpos a una concentración saturante, siendo titulados durante la puesta a punto del procedimiento. La dilución final a la que se usaron se indica en la tabla 3. Los tubos con los anticuerpos se incubaron durante 30 minutos a temperatura ambiente y protegidos de la luz.

Tras la incubación, se realizaron dos lavados con Perm/Wash Buffer a 300 x g durante 5 minutos a 4°C, para eliminar el exceso de anticuerpos en las células. En este momento las células fueron adquiridas por el citómetro de flujo.

4.1.5 Citometría de flujo

La citometría de flujo es una técnica de análisis celular multiparamétrico, que mide componentes y propiedades de las células que fluyen en una suspensión celular. El citómetro de flujo ilumina las células (u otras partículas), previamente teñidas con fluorocromos que se unen específicamente a un constituyente celular, a medida que fluyen de forma individual delante de una fuente de luz de alta intensidad (láser). La interacción del láser con cada célula produce una señal fluorescente de intensidad proporcional a su contenido en fluorocromo. Esa señal emitida, es recogida por uno o varios detectores que la transforman en pulsos eléctricos. Al mismo tiempo se recoge la luz dispersada por la célula, que se relaciona directamente con su tamaño, forma y granularidad. Los datos obtenidos son almacenados en un ordenador, donde con la ayuda de un programa informático son procesados y analizados.

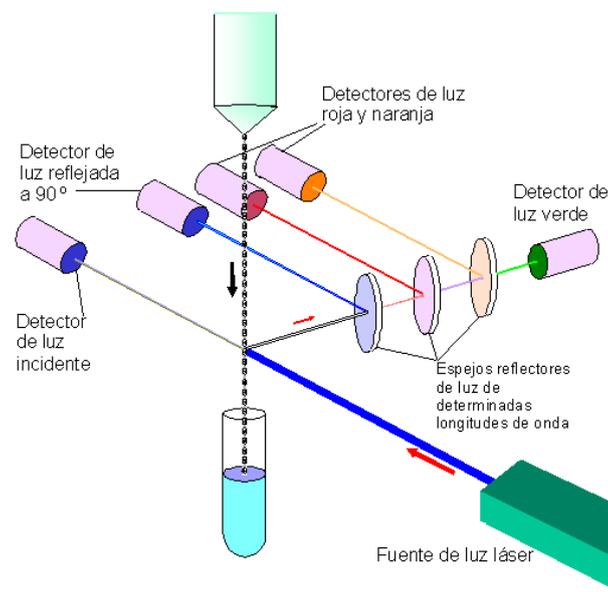


Figura 14. Representación esquemática básica del funcionamiento de un citómetro de flujo.

4.1.5.1 Adquisición y análisis de las muestras celulares

La adquisición y el análisis de las muestras celulares se realizó en el citómetro de flujo FACSCanto II™ (BD Biosciences) (Figura 17) y el programa de adquisición y análisis utilizado BD FACSDiva Software v6.1.3 (BD Biosciences). Al inicio de cada adquisición, se procedió al ajuste de detectores y voltajes y a la compensación de las distintas fluorescencias. Se adquirieron al menos 50.000 eventos de cada muestra.



Figura 15. Fotografía del citómetro de flujo FACSCanto II.

Para la identificación de las distintas poblaciones celulares, las PBMCs adquiridas por el citómetro se separaron según su tamaño (FSC) y granularidad (SSC). Según este criterio, en primer lugar, se seleccionó la nube de células que corresponderían a monocitos, y en otra ventana se identificaron a los monocitos como células CD14+ y CD3-. Del mismo modo se identificaron por tamaño y granularidad los linfocitos, y en otra ventana se seleccionaron las células CD3+. En otra ventana se identificaron como linfocitos T CD8 aquellas células CD8+ y CD3+. Los linfocitos T CD4 se identificaron como las células CD8- y CD3+. Esta estrategia de identificación de las poblaciones celulares aparece representada en la figura 17.

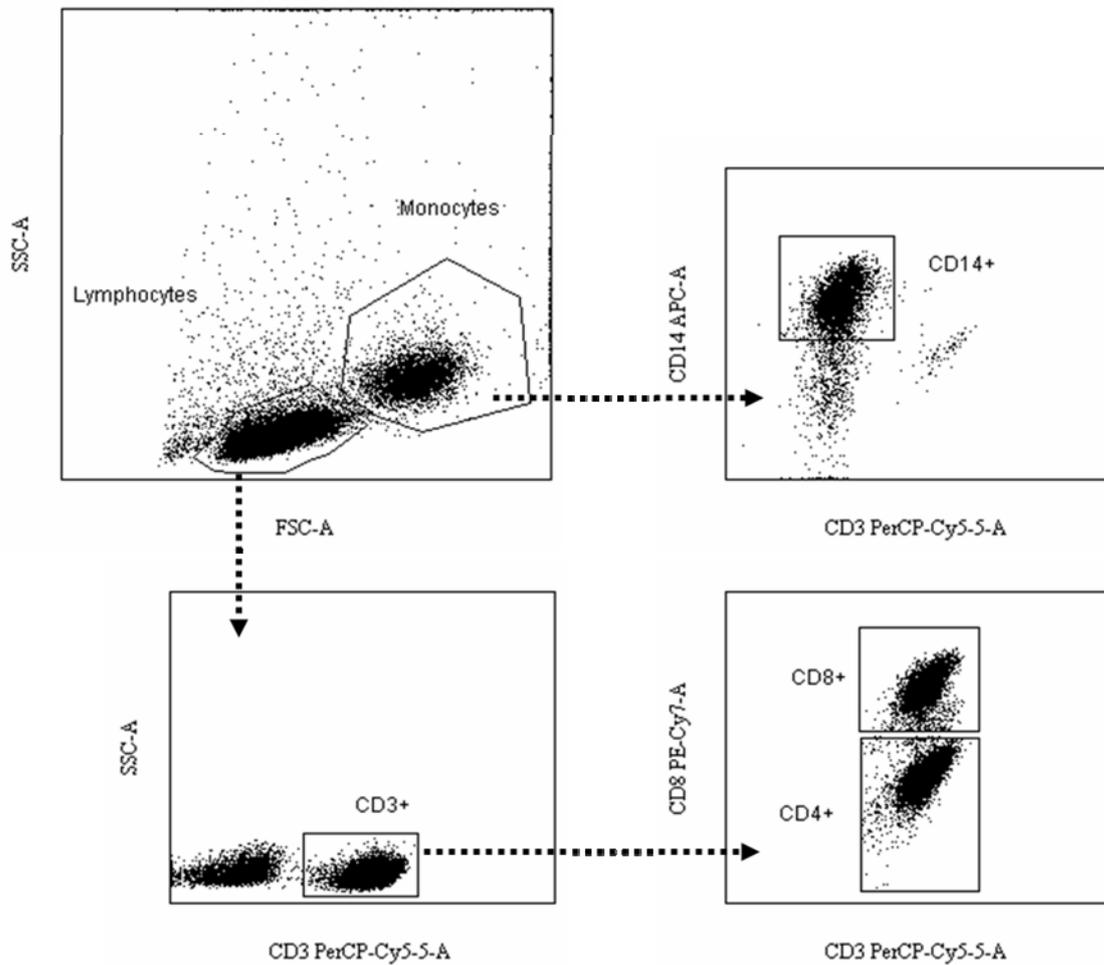


Figura 16. Ejemplo de análisis usado para la identificación de las poblaciones de monocitos y linfocitos T CD4+ y CD8+.

Una vez identificada cada una de las poblaciones celulares, se determinó la expresión de IFNAR1, IFNAR2, pSTAT1 y pSTAT2 en las células no estimuladas y en las células estimuladas con IFN β para cada sujeto de estudio. Los datos de expresión se recogieron como Intensidades Medias geométricas de Fluorescencia (IMF), como se muestra en la figura 17 o como porcentaje de células positivas para cada marcador en concreto.

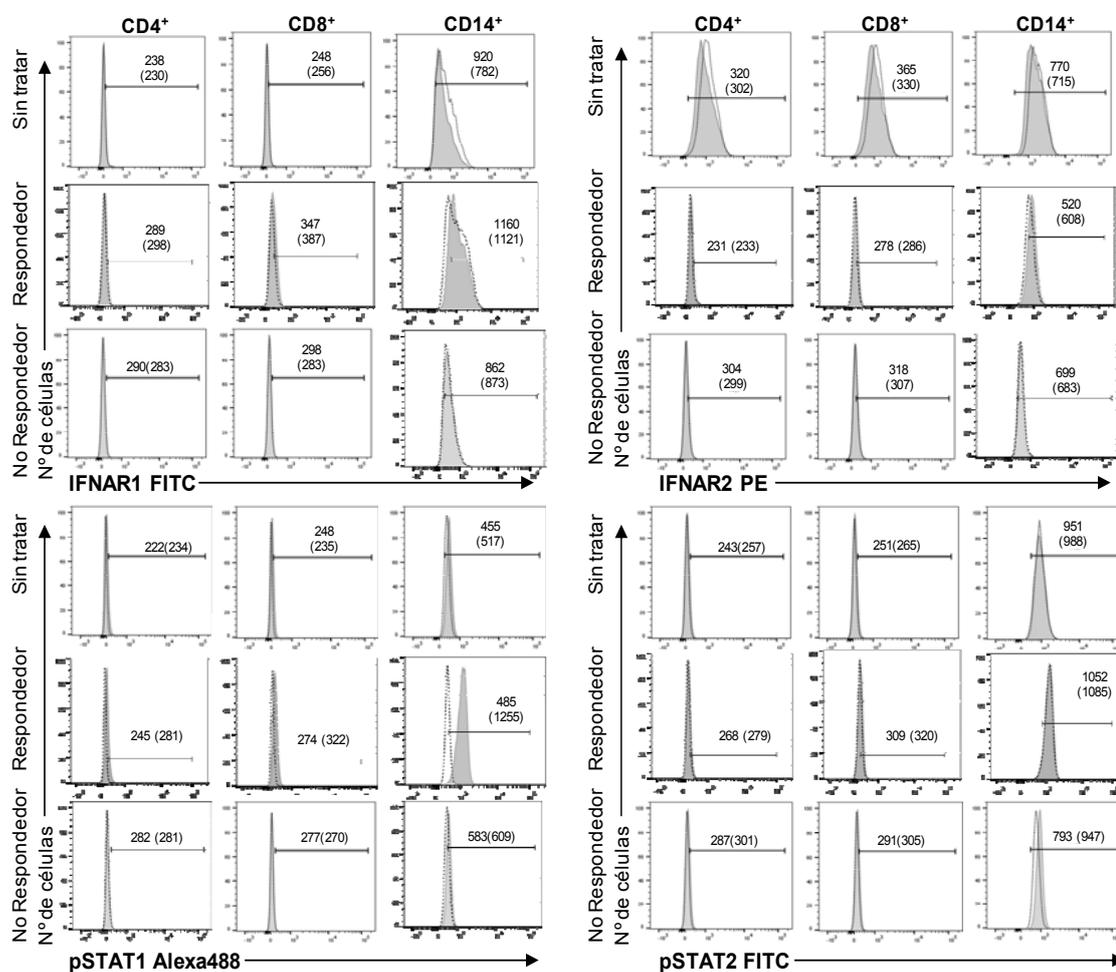


Figura 17. Histogramas superpuestos correspondientes a un paciente sin tratamiento, un paciente respondedor y otro no respondedor representativos de cada grupo, donde se muestra la Intensidad Media de Fluorescencia (IMF) de las células no estimuladas (histogramas abiertos) y estimuladas (histogramas rellenos) que expresan IFNAR1, IFNAR2, pSTAT1 y pSTAT2 en linfocitos T CD4+, CD8+ y monocitos. Los números al lado de cada uno de los histogramas indican los valores de IMF de las células no estimuladas y estimuladas (entre paréntesis) para cada proteína.

4.1.6 Análisis estadístico

En primer lugar se comprobó la distribución de las variables mediante la prueba de Kolmogorov-Smirnov y, como la mayoría de ellas no seguían una distribución normal, se aplicaron pruebas no paramétricas en todos los casos.

Los datos de células T CD4+, CD8+ y de monocitos se compararon de forma independiente en todos los casos. La significación estadística se estableció en $p \leq 0.05$.

Se efectuó la prueba U de Mann-Whitney para comparar si existían diferencias significativas en las medias de los niveles basales de expresión (en células no estimuladas) de IFNAR1, IFNAR2, pSTAT1 y pSTAT2 entre los siguientes grupos de sujetos:

- Controles sanos y pacientes con EM sin tratamiento
- Pacientes con EM sin tratamiento y pacientes de EM tratados con IFN β
- Pacientes con EM tratados con IFN β respondedores y no respondedores

Los cambios en los niveles de expresión de IFNAR1, IFNAR2, pSTAT1 y pSTAT2 tras la estimulación in vitro con IFN β se analizaron como la siguiente proporción: IMF de las células estimuladas / IMF de las células no estimuladas (IMFe / IMFse). Y se utilizó la prueba U de Mann-Whitney para comparar si existían diferencias significativas en las medias entre:

- Controles sanos y pacientes con EM sin tratamiento.
- Pacientes con EM sin tratamiento y pacientes de EM tratados con IFN β
- Pacientes con EM tratados con IFN β respondedores y no respondedores

Además, los log₂ del ratio IMFe / IMFse de IFNAR1, IFNAR2, pSTAT1 y pSTAT2 de los diferentes grupos de estudio se representaron en mapas de calor, usando el programa Genesis (Sturn et al. 2002).

Se realizaron correlaciones entre los niveles basales de expresión de IFNAR1, IFNAR2, pSTAT1 y pSTAT2 y entre los cambios en los niveles de expresión de IFNAR1, IFNAR2, pSTAT1 y pSTAT2 tras la estimulación in vitro con IFN β , en controles sanos, pacientes de EM sin tratamiento y en pacientes de EM tratados con IFN β . Las correlaciones se evaluaron mediante el coeficiente de correlación de Pearson.

Con el fin de buscar un patrón funcional relacionado con la respuesta al tratamiento con IFN β , se representó el log₂ del ratio IMFe / IMFse de IFNAR1, IFNAR2, pSTAT1 y pSTAT2 de los pacientes respondedores y no respondedores en mapas de calor. Estas variables se incluyeron en un análisis de agrupación jerárquica sin supervisión, que fue realizado con el programa Genesis. Tras ello, se usó la prueba de chi-cuadrado para determinar si la presencia o ausencia del patrón identificado se asociaba con la respuesta al tratamiento con IFN β .

4.2 Objetivo II: Interferencia de la presencia de anticuerpos neutralizantes en la vía de señalización del IFN β

4.2.1 Ámbito de estudio.

En el laboratorio de investigación del Hospital Civil de Málaga se realiza la determinación de anticuerpos neutralizantes (NAbs) frente a IFN β para los hospitales de España y Portugal desde hace más de 15 años. El servicio prestado tiene una doble función, por un lado, asistencial, informando a los neurólogos solicitantes acerca de la presencia o ausencia de anticuerpos frente a IFN β en pacientes que tienen algún motivo de sospecha, como puede ser por ineficacia clínica del tratamiento. Por otro lado, se ofrece el servicio de determinación de anticuerpos para estudios de investigación a aquellos grupos que lo solicitan. Por ello, se dispone de una seroteca con más de 900 sueros de pacientes con EM tratados con IFN β a los que se les ha determinado la presencia de NAbs frente a las moléculas de IFN β comercialmente disponibles, mediante Bioensayo.

4.2.2 Realización de Bioensayos para la determinación de Anticuerpos Neutralizantes frente a IFN beta en suero de pacientes con Esclerosis Múltiple

Los NAbs frente al IFN β se determinaron mediante el Bioensayo o prueba del efecto citopático (CPE) en suero sanguíneo. Es la técnica que recomienda la Organización mundial de la salud (OMS) (WHO Expert Committee on Biological Standardisation 1985) y requiere la utilización de una línea celular de carcinoma de pulmón (A549) y el virus de la Encefalomiocarditis murina (EMCV).

4.2.2.1 Toma de muestras

Para la determinación de anticuerpos neutralizantes, se extrajeron 5 ml de sangre en tubos separadores de suero. El suero fue almacenado a -20°C hasta el momento de la realización de los ensayos.

4.2.2.2 Líneas celulares, virus, medios de cultivo, reactivos y material utilizado

- Línea celular A549 de carcinoma de pulmón humano, obtenida de la colección Americana “American Type Culture Collection” (ATCC) nº CCL-185.
- Línea celular L929 de tejido conectivo subcutáneo de ratón, obtenida de la ATCC nº CCL -1.
- Virus EMCV: obtenido de la ATCC nº VR-129B.
- Medio de cultivo DMEM: Dulbecco’s Modified Eagle’s Medium (BioWhittaker®) suplementado con L-glutamina 2 mM (ICN Biomédica®), Gentamicina (Normon®) a 50 mg/ml y Suero Bovino Fetal (SBF) (BioWhittaker®) en proporciones variables (0% al 40%) según diferentes requerimientos.
- IFN β : IFN β -1a (Avonex® o Rebif®) o IFN β -1b (Betaferon®).
- DMSO (Sigma-Aldrich®)
- Criotubos (Nunc®, Thermofisher. MA, EE.UU)
- Azul Tripán (Sigma-Aldrich®).
- Cristal violeta (Merck ®).
- Frascos de cultivo (Nunc®).
- Trypsin-EDTA 1x (Biowest®).
- Filtros 0,22 μ m (Nunc®).
- Pipetas de 10, 100 y 1000 μ L (Eppendorf®).
- Pipeta Multicanal (Gilson®)
- Pipeta electrónica (Eppendorf®).
- Pipetas serológicas de 5, 10 y 25 mL (TPP®).
- Placas de cultivo de 96 pocillos con fondo plano (Nunc®).
- Suero bovino fetal (SBF) (BioWhittaker®).

- Solución salina fisiológica (0,9% ClNa) (Laboratorios Serra Pamiés).
- Tubos separadores de suero (Vacuette®).
- Tubos de 12 ml de polipropileno con tapón (Francisco Soria Melguizo®).
- Tubos de centrifuga de 15 y 50 mL (VWR® Radnor, USA)
- Filtros 0,22 μm (Nunc®).
- Pipetas Pasteur (Sigma-Aldrich®).
- Baño (Selecta®, Barcelona, España).
- Campana de cultivos celulares (Telstar® Bio-II-A, Tarrasa, España).
- Centrifuga (Haeraeus® Instruments, GmbH. Hanau, Germany).
- Incubador para cultivos (Binder®. Barcelona, España).
- Microscopio óptico invertido Leica DM IL LED (Leica Microsystems®. Wetzlar, Germany).
- Microscopio óptico Leica CM E (Leica Microsystems®. Wetzlar, Germany).

4.2.2.3 Obtención y mantenimiento de la línea celular A549

Un vial de la línea celular A549 procedente de la American Type Culture Collection (ATCC) (www.lgcstandards-atcc.org) se descongeló rápidamente en baño termostático a 37°C. En la campana de flujo laminar, la suspensión celular se vertió sobre 1 mL de medio DMEM al 20% de SBF en un tubo de polipropileno, luego se añadieron otros 8 mL del mismo medio. Este tubo se centrifugó a 300 x g durante 5 minutos. El sobrenadante resultante se decantó y el botón de células se resuspendió en 4 mL de medio DMEM al 10% de SBF.

Para determinar la viabilidad y realizar un conteo de la suspensión celular, se mezclaron 10 μL de una disolución comercial del colorante Azul Tripán y otros 10 μL de la suspensión celular en una cámara de Neubauer (Marinfield® Paul Marienfeld GmbH & Co. KG, Lauda-Königshofen, Alemania). De este modo se obtuvo el número de células viables por cada mililitro de la suspensión celular.

Posteriormente, las células se sembraron en frascos de cultivo a una densidad de 40.000 células viables por cm^2 , completándose con medio DMEM al 10% de SBF. Las

células se mantuvieron en crecimiento en el incubador en condiciones estándar (37°C y 5%CO $_2$), renovándose el medio de cultivo cada 48 horas.

Las células A549 crecen adheridas al plástico, así que cuando alcanzaron un nivel de confluencia del 80 al 90% se procedió al subcultivo. Para ello, se retiró el medio de cultivo, se realizó un lavado con solución salina y se añadieron 2 o 5 mL (según volumen del frasco: 25 o 75 cm 2) de solución tripsina-EDTA, dejando actuar de 5 a 15 minutos a 37°C, monitorizando al microscopio invertido el despegue de las células. Una vez despegadas se añadió al frasco de cultivo DMEM al 20% de SBF, el doble del volumen de solución tripsina-EDTA. Se centrifugó a 300 g durante 8 minutos, se decantó el sobrenadante y se resuspendió el botón de células en 2 mL de DMEM al 10% de SBF. Por último se contaron las células en la cámara de Neubauer.

En este momento las células estuvieron listas para su uso en el Bioensayo, para volverlas a sembrar en frascos de cultivo con el fin de generar una mayor masa celular o bien para congelarlas y así poder usarse en otra ocasión.

Para la congelación de las células, estas se distribuyeron en criotubos en alícuotas de 1 a 2 millones de células diluidas en 500 μ L de DMEM al 40% de SBF. Sobre hielo picado, se añaden 500 μ L de DMEM al 40% de SBF y al 20% de Dimetil Sulfóxido (DMSO). Posteriormente, se almacenaron los viales durante 24 h en un ultracongelador a -80°C y posteriormente se transfirieron a un tanque de Nitrógeno Líquido (-196°C).

4.2.2.4 Obtención del virus EMCV

Un vial de la línea celular L929 suministrada por el proveedor se descongeló rápidamente en baño termostático a 37°C. Las células se vertieron sobre 1 mL de medio DMEM al 20% de SBF en un tubo de polipropileno de 12 mL y se le añadieron otros 8 mL del mismo medio. Este tubo se centrifugó a 300 x g durante 5 minutos. El sobrenadante resultante se decantó y el botón de células se resuspendió en 10 mL de medio DMEM al 10% de SBF y se sembró en un frasco de cultivo de 75 cm 2 , dejándose crecer el cultivo en el incubador.

Tras alcanzar la confluencia, se retiró el medio junto con las células, se lavó con solución salina, y posteriormente, se añadió 10 mL de DMEM sin suero y 600 μ L del virus EMCV procedente de una replicación realizada anteriormente. Tras 1-3 días de

incubación, se fueron lisando las células por efecto del virus. Cuando se observó la muerte total del cultivo, se recogió el medio y se centrifugó a 300 x g, 5 minutos. El sobrenadante resultante con las réplicas del virus, se congeló en alícuotas de 200 μ L, y posteriormente se procede a su titulación para establecer la concentración que debe emplearse en el Bioensayo.

4.2.2.5 Bioensayo o test del efecto citopático

El Bioensayo se realiza en cuatro días consecutivos y el protocolo se detalla a continuación.

- DÍA 1

En una placa de cultivo celular de 96 pocillos con fondo plano se realiza la siembra de células A549 a una densidad de 30.000 células por pocillo y en un volumen de 100 μ L de medio de cultivo DMEM al 2% de SBF. La placa posteriormente se introduce en un incubador celular a 37°C, 5% CO₂ y 95% O₂ hasta el día siguiente, para permitir su asentamiento, adherencia al plástico y crecimiento.

- DÍA 2

Los sueros de los pacientes a los que se va a realizar el Bioensayo se incuban en un baño termostático a 56°C durante 30 minutos, con el objetivo de inactivar la cascada del complemento presente en el suero.

En una nueva placa de 96 pocillos, los sueros se enfrentan en distintas diluciones a una concentración constante de INF β , realizándose con el siguiente esquema de trabajo (figura 18):

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
	Estándar		Paciente 1		Paciente 2		Paciente 3		Paciente 4		Control Viral	
			+ IFN β	- IFN β	+ IFN β	- IFN β	+ IFN β	- IFN β	+ IFN β	- IFN β	+ IFN β	- IFN β
A	IFN β 20 UI/mL	IFN β 20 UI/mL	Suero 1/10	Suero 1/10	Suero 1/10	Suero 1/10	Suero 1/10	Suero 1/10	Suero 1/10	Suero 1/10	CV	CV
B	IFN β 10 UI/mL	IFN β 10 UI/mL	Suero 1/20	Suero 1/20	Suero 1/20	Suero 1/20	Suero 1/20	Suero 1/20	Suero 1/20	Suero 1/20	CV	CV
C	IFN β 5 UI/mL	IFN β 5 UI/mL	Suero 1/40	Suero 1/40	Suero 1/40	Suero 1/40	Suero 1/40	Suero 1/40	Suero 1/40	Suero 1/40	CV	CV
D	IFN β 2.5 UI/mL	IFN β 2.5 UI/mL	Suero 1/80	Suero 1/80	Suero 1/80	Suero 1/80	Suero 1/80	Suero 1/80	Suero 1/80	Suero 1/80	CV	CV
E	IFN β 1.25 UI/mL	IFN β 1.25 UI/mL	Suero 1/160	Suero 1/160	Suero 1/160	Suero 1/160	Suero 1/160	Suero 1/160	Suero 1/160	Suero 1/160	CC	CC
F	IFN β 0.625 UI/mL	IFN β 0.625 UI/mL	Suero 1/320	Suero 1/320	Suero 1/320	Suero 1/320	Suero 1/320	Suero 1/320	Suero 1/320	Suero 1/320	CC	CC
G	IFN β 0.312 UI/mL	IFN β 0.312 UI/mL	Suero 1/640	Suero 1/640	Suero 1/640	Suero 1/640	Suero 1/640	Suero 1/640	Suero 1/640	Suero 1/640	CC	CC
H	IFN β 0.156 UI/mL	IFN β 0.156 UI/mL	Suero 1/1280	Suero 1/1280	Suero 1/1280	Suero 1/1280	Suero 1/1280	Suero 1/1280	Suero 1/1280	Suero 1/1280	CC	CC
			+ IFN β	- IFN β	+ IFN β	- IFN β	+ IFN β	- IFN β	+ IFN β	- IFN β	+ IFN β	- IFN β
			Control Celular									

Figura 18. Esquema de organización de una placa de Bioensayo para la titulación de NAb en suero de pacientes de EM.

En primer lugar se realizan las diluciones seriadas de los sueros (dos columnas por paciente). A continuación, a una de las dos columnas con suero de paciente se añade IFN β quedando a una concentración final de 10 UI por pocillo. En la réplica no se añade IFN β . La placa de estimulación con la mezcla de suero e IFN β , se deja en el incubador una hora a 37°C con el fin de permitir, si los hubiese, la unión de los NAb presentes en el suero al IFN β .

Posteriormente, 100 μ L de dichas diluciones se transfirieron a la placa con las células A549 en crecimiento del día anterior, menos en los pocillos de las columnas 11 y 12, que se utilizaron como controles viral y celular. Las columnas 1 y 2 se dejaron como estándar de concentración de IFN β , donde se realizaron diluciones 1/2 seriadas de IFN β partiendo de 20 UI. Por último la placa se dejó en el incubador hasta el día siguiente.

- DÍA3

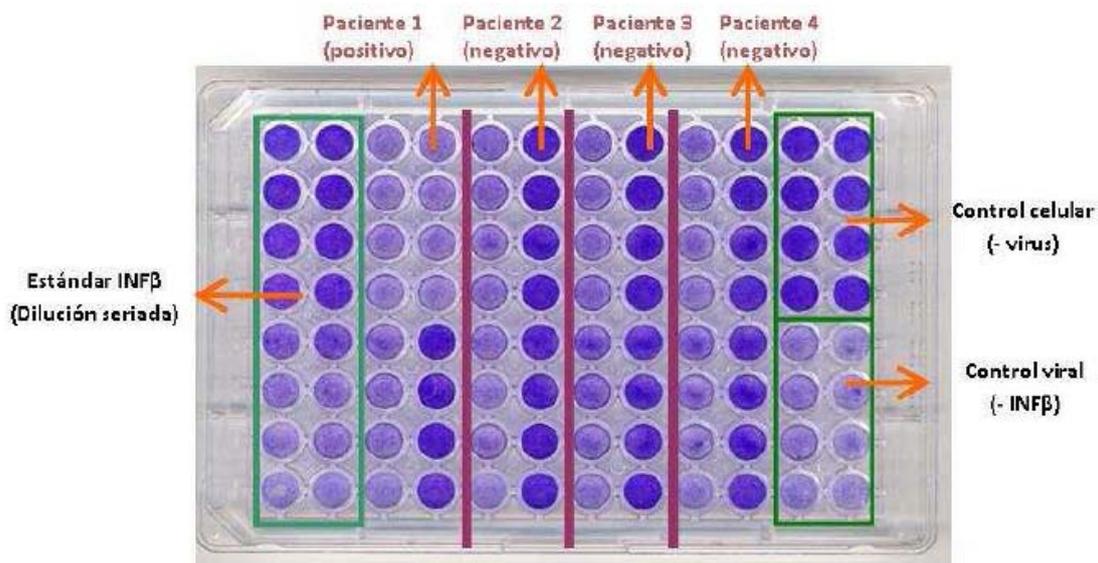
Se realizó la infección del cultivo con el virus EMCV. Se retiró el contenido de cada pocillo de la placa y se le añadieron 100 μ L de medio DMEM sin FBS y con el virus en una dilución 1/300, menos en los pocillos del control celular, que se le añadió medio DMEM sin FBS y sin virus. La placa se incubó toda la noche a 37°C y 5% CO₂. En aquellos pocillos en los que el IFN β no hubiera ejercido su acción antiviral en las células porque, o bien no estuvo presente, o por la acción de los NAbs, el virus provocará un efecto citopático en las células.

- DÍA 4

Tras la observación de las células al microscopio invertido, tienen que aparecer vivas las células de los pocillos correspondientes al control celular, y muertas las del control viral. Cuando se observó un 50% de muerte celular entre los pocillos de las filas D y E de las columnas del estándar (filas 1 y 2), se procedió a la retirada del medio con virus y a la finalización del bioensayo.

Para ello se desechó el contenido de la placa, volcándola y golpeando suavemente para eliminar cualquier resto de medio con virus, sin llegar a despegar las células. A cada pocillo se le añadió 50 μ L de colorante vital cristal violeta diluido a 1/10 en etanol al 20%, y se incubó 10 minutos a temperatura ambiente. Trascorrido ese tiempo, se retiró el colorante y se eliminó el exceso lavando con agua.

Una vez seca la placa se procedió a la cuantificación del colorante que permaneció retenido tiñendo las células en cada pocillo. Para ello se añadieron 100 μ L de ácido acético al 33% y se procedió a la cuantificación de la absorbancia a 650 nm en cada pocillo, usándose para ello un lector de placas. Los datos de absorbancia obtenidos se analizaron con la fórmula de Kawade y el título de NAbs de cada muestra se expresó en unidades neutralizantes (TRU). Se considera un paciente positivo para anticuerpos neutralizantes cuando presenta 20 o más unidades neutralizantes (Bertolotto et al. 2003).



En la figura 19 se muestra un ejemplo de una placa de Bioensayo en el momento anterior a añadirle la disolución de ácido acético. En ella se aprecia que los pocillos del control celular aparecen teñidos intensamente de azul, lo que indica que las células permanecieron vivas. Los pocillos del control vírico aparecen con muy poca tinción, indicando que el virus consiguió matar a las células del cultivo. En los pocillos del estándar, se observa como la supervivencia de las células es proporcional a la cantidad de IFN β del pocillo, que ejerció su papel protector frente al virus. Con respecto a los pocillos con suero de pacientes, se consideran negativos para NAb s aquellos teñidos de azul (al existir NAb s en el suero, el IFN β ejerce su acción protectora en las células frente al virus EMCV). Por el contrario, se consideran positivos aquellos sueros de pacientes en los que sus pocillos aparecen poco teñidos, especialmente los de mayor concentración de suero (al existir NAb s, éstos se unen al IFN β , el cual no puede ejercer su acción protectora frente al virus EMCV).

Aquellos sueros con pocillos positivos fueron reevaluados, de forma que se realizó otro Bioensayo en el cual se usaron las 8 filas de cada columna, abarcando desde la dilución 1/10 a la 1/1280. Con este segundo test, se proporcionó un título de NAB al suero, asignándole el título de la dilución del pocillo en el que el virus EMCV produce el 50% de muerte celular.

4.2.3 Definición de reactividad cruzada y categorización de los títulos de anticuerpos

De los sueros pertenecientes a la seroteca del Laboratorio de investigación de IBIMA, para el estudio se identificaron 88 pacientes con NAbs frente a IFN β , que además presentaban reactividad cruzada frente a tres formulaciones de IFN β (Avonex™, Rebif™ y Betaferon™); es decir, que estando en tratamiento con una de las moléculas de IFN β comercialmente disponibles, habían desarrollado anticuerpos frente a dicha molécula que eran capaces de neutralizar también el efecto de las otras moléculas de IFN β .

Posteriormente se analizó la relación entre la reactividad cruzada de los sueros, con su nivel de títulos de anticuerpos. Para ello se clasificaron los sueros de los pacientes con reactividad cruzada, en tres grupos según su titulación de anticuerpos (Bertolotto 2015):

- Pacientes con títulos bajos de NAbs, aquellos con un TRU menor de 100.
- Pacientes con títulos intermedios de NAbs, aquellos con TRU mayores de 100 y menores de 300.
- Pacientes con títulos altos de NAbs, aquellos con un TRU mayor de 300.

Con ello, se analizó el porcentaje de pacientes que presentaron reactividad cruzada en función del título de anticuerpos. La relación entre la reactividad cruzada de los sueros con su nivel de títulos de anticuerpos se analizó mediante la prueba estadística de chi-cuadrado.

4.2.4 Ensayo de inhibición de pSTAT1 en presencia de NAbs

Para estudiar si los anticuerpos neutralizantes desarrollados por los pacientes de EM interferían en la vía de señalización JAK-STAT *in vitro*, se comprobó si la presencia de estos anticuerpos los NAbs inhibía específicamente la fosforilación de STAT1 tras la estimulación con IFN β .

4.2.4.1 Población de estudio.

Se seleccionaron 8 pacientes con EM que desarrollaron NAbs frente a IFN β en títulos altos (mayor de 300 TRU) de los cuales se disponía de una muestra de sangre de la que se habían aislado y almacenado las PBMC, obtenida en el mismo momento que el suero.

4.2.4.2 Toma de muestras, aislamiento de células mononucleares de sangre periférica (PBMC) y obtención de suero.

La toma de muestras de sangre, el aislamiento de PBMC y la obtención suero de los pacientes se realizó del mismo modo que queda descrito en los apartados 4.2.2 y 4.3.1.1 de este manuscrito.

4.2.4.3 Estimulación de PBMC con IFN β en presencia de NAbs

Los sueros de los 8 pacientes incluidos en el ensayo, además de una mezcla de sueros de 4 pacientes con EM sin NAbs (que se usó como control negativo), se incubaron en baño termostático a 56°C durante 30 minutos, con el objetivo de inactivar la cascada del complemento presente en el suero.

Una vez descomplementados y atemperados a 37°C, los sueros se diluyeron a la mitad con medio RPMI al 0% + 5000UI/mL de IFN β (Rebif, Avonex ó Betaferon). La mezcla se dejó incubando durante una hora a 37°C para permitir la interacción antígeno-anticuerpo.

Por otra parte, las PBMC de los 8 pacientes con NAbs almacenadas en nitrógeno líquido, se descongelaron en un baño termostático. Antes de su descongelación completa, en condiciones estériles y en otro tubo, se añadieron 8 mL de RPMI al 20% de SBF, y se centrifugó a 300 x g durante 10 minutos.

Tras centrifugar las células se resuspendieron en otros 10 mL de RPMI al 20% de SBF, se cuantificaron con la Cámara de Neubauer y se volvieron a centrifugar a 300 x g durante 10 minutos. El botón de células, se resuspendió en 5 mL de RPMI al 0% de SBF y se incubaron a 37°C durante 90 minutos, con el fin de que las células alcanzasen su nivel más bajo de activación.

Las células de cada paciente en estado basal, se distribuyeron en tubos de poliestireno de 5 ml, específicos para la adquisición con citómetro de flujo (BD Biosciences) a razón de 500.000 células por tubo en un volumen final de 500 μ L en diferentes condiciones de cultivo, tal y como se detalla a continuación y se representa en la figura 20:

- Medio RPMI al 0% de SBF
- Medio RPMI al 0% de SBF + 1000UI/mL de IFN β (Rebif, Avonex ó Betaferon)
- Medio RPMI al 0% de SBF + 1000UI/mL de IFN β (Rebif, Avonex ó Betaferon) + Suero propio del paciente con NAbs al 20% (suero autólogo)
- Medio RPMI al 0% de SBF + 1000UI/mL de IFN β (Rebif, Avonex ó Betaferon) + Pool de sueros sin NAbs al 20% (suero heterólogo)

Las células de mantuvieron en cultivo en presencia del IFN β durante 30 minutos en el incubador.

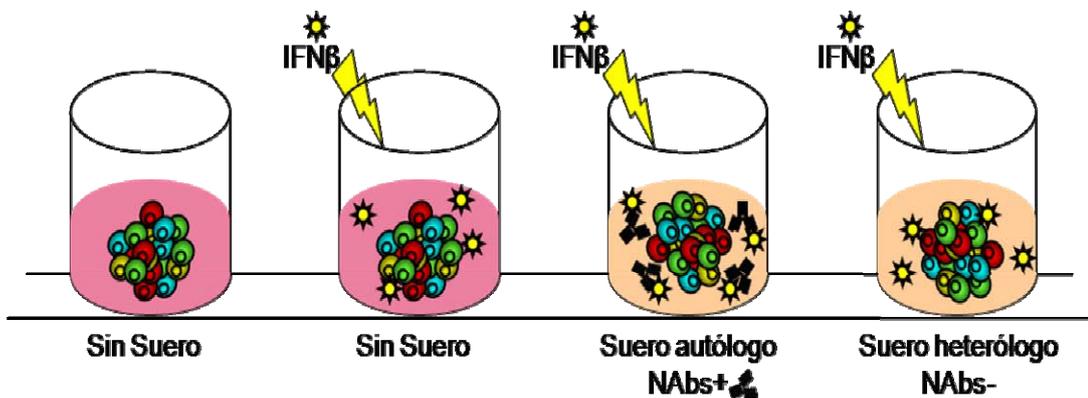


Figura 20. Esquema de las diferentes condiciones de cultivo de PBMCs de pacientes con NAbs.

Transcurridos los 30 minutos, la estimulación se detuvo añadiendo a cada tubo 250 μ L de solución fijadora Cytfix (BD Biosciences) durante 10 minutos a 37°C, y se continuó el protocolo llevado a cabo para obtener los datos de expresión por citometría de flujo descrito en el punto 4.1.3 de este manuscrito.

La expresión de la proteína fosforilada pSTAT1 se determinó, en las poblaciones de células T (CD4⁺ y CD8⁺) y en monocitos mediante en marcaje con Ac Mo: anti-CD3, anti-CD8, anti-CD14 y anti-pSTAT1 de la misma forma que en 4.1.3. Los datos se analizaron como IFM de pSTAT1 y porcentaje de células positivas para pSTAT1 en las tres subpoblaciones mencionadas.

4.2.5 Análisis estadístico.

El análisis de la relación entre los títulos de anticuerpos y la reactividad cruzada se realizó mediante la prueba de la chi cuadrado. Posteriormente se realizó un análisis de regresión logística para calcular el riesgo de tener reactividad cruzada según el título de anticuerpos y realizó un análisis de curvas COR.

Mediante el análisis de muestras relacionadas usando la prueba de los rangos con signo de Wilcoxon, se compararon las células estimuladas sólo con IFN β respecto a las células estimuladas en presencia de suero NAbs positivo. El porcentaje de inhibición obtenido con títulos altos de anticuerpos respecto al porcentaje de inhibición obtenido con títulos bajos se comparó mediante un análisis de muestras independientes usando la prueba de U de Mann-Whitney.

Para analizar si existía una correlación entre el porcentaje de células positivas para pSTAT1 y el título de NAbs se usó el análisis de correlación Rho de Spearman.

4.3 Objetivo III: Arrays de expresión génica en pacientes con EM tratados con IFN β

La tecnología de microarrays de expresión, permite medir los niveles de ARN mensajero (ARNm) de cada uno de los genes que en un momento determinado están presentes en las células del paciente.

El IFN β participa en numerosas vías de señalización e induce la expresión de multitud de genes, así que para caracterizar patrones de expresión génica *in vivo* que se pudiesen utilizar para caracterizar la respuesta al tratamiento con interferón, se realizó un microarray de expresión de genoma completo en pacientes respondedores y no respondedores tras recibir el tratamiento. La toma de muestra del estudio, se

realizó con la intención de cubrir la ventana justo después de la inyección del IFN β terapéutico para la identificación de genes de expresión temprana, media y tardía.

4.3.1 Población de estudio

Para la selección de la población de estudio, se examinaron más de 120 historias clínicas de pacientes con EM que tenían un seguimiento de forma regular en la Unidad de Esclerosis Múltiple del Servicio de Neurología del Hospital Regional Universitario de Málaga. De ellas, fueron cuidadosamente seleccionados 20 pacientes con EM remitente recurrente según los criterios de McDonald (Polman et al. 2011) que cumplían los siguientes los criterios de inclusión:

- Pacientes con EMRR clínicamente definida.
- Un año en tratamiento con IFN β .
- Respuesta a IFN β definida.
- Ausencia de NAbs.
- Residencia próxima al hospital para evitar el ingreso del paciente.

Finalmente de los 20 pacientes, sólo pudieron ser incluidos 9 pacientes con EM, debido a la complejidad del diseño experimental. Todos los participantes dieron su consentimiento informado por escrito. El protocolo de investigación fue aprobado por el Comité Ético de Investigación (CEI Málaga Nordeste).

La respuesta al tratamiento con IFN β se evaluó en los pacientes al año del inicio del tratamiento según datos de número de brotes, progresión de la EDSS y actividad observada en RM, de la misma forma que se describió en el apartado 4.1.1 de este manuscrito. De los 9 pacientes, 4 fueron clasificados como buenos respondedores y 5 fueron clasificados como no respondedores.

4.3.2 Toma de muestras y aislamiento de ARN

4.3.2.1 Toma de muestras de sangre

De cada paciente, se extrajeron 9 mL de sangre periférica en diferentes tiempos, que fueron controlados con total precisión. Un esquema resumen del diseño experimental se muestra en la figura 21. Las tomas de muestras se realizaron:

- Justo antes de la administración de la dosis de IFN β (t_0)
- A las 4 horas tras la administración del IFN β (t_4)
- A las 12 horas tras la administración del IFN β (t_{12})
- A las 24 horas tras la administración del IFN β (t_{24})

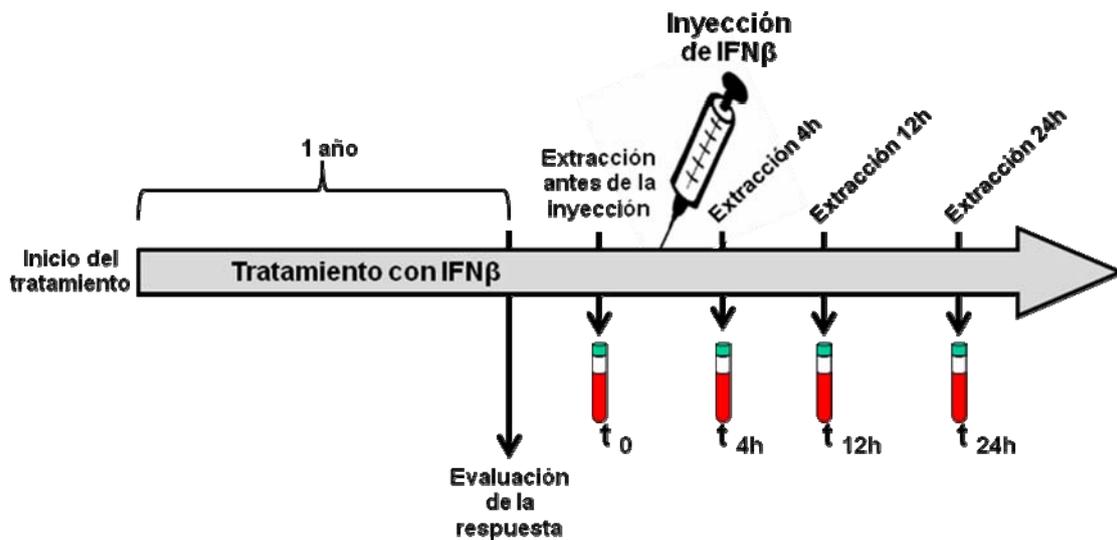


Figura 21. Diseño experimental y toma de muestras.

La sangre se recogió en tubos de sangre TempusTM RNA (Applied Biosystems), específicos para la estabilización y aislamiento del ARN total de sangre completa. Estos tubos contienen aditivos que lisan las células sanguíneas casi inmediatamente, desactivan las ribonucleasas liberadas (ARNasa), y precipitan de forma selectiva el ARN y el ADN genómico, mientras que las proteínas permanecen en la solución. El

ARN permanece estable para su aislamiento posterior inhibiéndose los procesos de modificación de la expresión génica.

La sangre recogida en los tubos Tempus™ se envió a la empresa Bioarray® con sede en Elche (España), quien realizó el aislamiento de ARN de las muestras, así como el análisis de expresión génica por microarrays.

4.3.2.2 Aislamiento del ARN: Tempus™ Spin RNA Isolation Kit

Tras la extracción de sangre, los tubos se agitaron vigorosamente en un agitador de tubos durante 10 segundos y se enviaron mediante paquetería rápida y refrigerados a 4°C a la empresa Bioarray®.

Para el aislamiento del ARN de las muestras, se utilizó Tempus™ Spin RNA Isolation Kit (Applied Biosystems), siguiendo el protocolo del fabricante. Este aislamiento implica la centrifugación del lisado celular diluido para obtener y recoger el precipitado de ARN. El ARN precipitado se purifica posteriormente en columnas de centrifugación con filtros de purificación, utilizando distintas soluciones de purificación, lavado y elución. Tras el aislamiento, el ARN se almacena a -80°C.

A todas las muestras de ARN aisladas se les midió su concentración, pureza e integridad del ARN con el espectrofotómetro Nanodrop 2000 (Thermo Fisher Scientific) y el equipo de microelectroforesis Bioanalyzer Agilent 2100 (Agilent Technologies, Palo Alto, CA).

Con el Bioanalyzer Agilent 2100 se obtuvo un algoritmo denominado RIN (RNA Integrity Number) que permitió determinar la calidad de las muestras de ARN en base a un rango numérico del 1 al 10, siendo 1 el valor para una muestra de ARN totalmente degradada y 10 el valor obtenido para una muestra intacta. Para el estudio solo se incluyeron muestras de ARN con un RIN mayor de 7.

4.3.3 Arrays de expresión y análisis estadístico

Realizado en la empresa Bioarray®.

La expresión génica de las muestras de sangre de los pacientes con EM se analizó usando los *microarrays SurePrint G3 Human GE 8x60K Microarray* (Agilent,

ID 028004). La preparación de las muestras de ARN e hibridación de las sondas se llevó a cabo como se describe en el protocolo *One-Color Microarray-Based Gene Expression Microarrays Analysis v. 6.5* (Agilent).

Los estudios de expresión génica con microarrays son procedimientos con múltiples pasos donde pequeñas diferencias entre las muestras y/o variaciones introducidas por el usuario pueden alterar los datos del microarrays. Es por ello que se utilizó el *Kit Agilent One Color RNA Spike-In* que proporciona controles positivos para el seguimiento de una correcta amplificación y marcaje de las muestras de ARN. El control positivo consiste en un conjunto de 10 transcritos conocidos, optimizados para hibridar con sondas complementarias del microarray, con una mínima autohibridación o hibridación cruzada. Los controles *Spike-In* se incorporan a cada una de las muestras, por lo que están diseñados para no tener secuencias complementarias a las muestras biológicas utilizadas en la mayoría de los microarrays.

A partir de 200 ng de ARN total de las muestras se generaron ARNc marcados fluorescentemente. El método utiliza la enzima ARN polimerasa T7, la cual simultáneamente amplifica y marca el ARNc generado incorporando cianina 3-CTP.

A continuación se procedió a realizar la hibridación de las muestras sobre los microarrays, la cual tuvo lugar durante 17 horas a 65°C en un horno rotatorio. La micromatriz en concreto contiene 42.406 sondas, 28.083 corresponden a sondas de genes bien identificados y 14.323 sondas corresponden a ARN no codificante. Finalmente tras la hibridación, se lavaron los microarrays y se escanearon en un *Agilent Microarray Scanner*.

Las imágenes extraídas fueron procesadas con el programa *Agilent Feature Extraction v 10.7*. El programa permitió antes de proceder al análisis, descartar los puntos identificados como valores atípicos. El background o ruido de fondo de los datos en crudo fue restado con el método *normexp* realizado con el programa Limma. Por último, los datos se normalizaron con cuantiles.

Los datos normalizados se ajustaron a un modelo lineal y a un modelo Bayesiano empírico para extraer aquellos genes con expresión diferencial significativa entre los diferentes tiempos y la expresión basal antes de la administración del IFN β mediante un análisis T test. En la construcción del modelo se eliminaron las sondas control. De esta forma, se construyó la matriz de diseño y se extrajeron todos los contrastes de

interés. Todos los datos de sondas para ARN no codificantes, así como las sondas repetidas fueron eliminados del análisis.

Los mismos datos se sometieron a un segundo análisis por un método no paramétrico conocido como rango de productos (rank product). Este método detecta variables que aparecen altas en un ranking de forma consistente al comparar una serie de listas, por ejemplo, genes que aparecen de forma consistente como los más sobreexpresados en una condición frente a otra. Este tipo de análisis es más adecuado cuando se tienen datos con cierta variabilidad, porque no tiene tanto en cuenta el valor de cambio como la posición que tiene en la lista de ordenadas de expresión, y logra un equilibrio entre la "tasa de falsos descubrimientos" (del inglés False Discovery Rate, FDR) de genes debido a variación aleatoria, y la tasa de no descubrimiento de genes realmente expresados de forma diferencial.

En todos los casos se seleccionaron aquellos genes con una tasa de cambio (fold change [FC]) mayor o igual a 2, y un valor de p ajustada $\leq 0,05$.

El análisis bioinformático se realizó con el programa R/Bioconductor usando los paquetes Limma, M-Array, PCA-Methods, GOstats, RankProd y GSEABase.

4.3.4 Validación de los resultados del Array de expresión por PCR a tiempo real

Para la validación de los datos de microarray se realizó un estudio de la expresión de 5 genes diferencialmente expresados en el microarray por la técnica de PCR cuantitativa a tiempo real (qRT-PCR). Esta técnica permite la cuantificación relativa de la expresión de un gen concreto, en relación a la expresión de un gen constitutivo endógeno de referencia. Este gen constitutivo se utiliza para normalizar los productos de la PCR ya que se expresa por igual en todos los tipos celulares. En este estudio se utilizó un gen constitutivo de bajo número de copias implicado en la síntesis del grupo hemo, el GADPH. Los genes seleccionados fueron: IRF9, OAS1, STAT1, Tyk2 y STAT2, todos ellos genes de respuesta a IFN β .

4.3.4.1 Retrotranscripción del ARN (RT-PCR)

Partiendo del ARN total extraído de cada muestra de sangre, se obtuvo el ADN complementario (ADNc) mediante retrotranscripción inversa (RT-PCR). Para ello se mezcló por cada muestra 1 μ g de ARN, 1 μ l de *Random Primers* (oligos de 6 deoxinucleótidos sintetizados aleatoriamente) y con agua DEPC (dietil pirocarbonato; Sigma-Aldrich®) se completó la mezcla hasta 10 μ l de volumen final. Seguidamente mediante un termociclador, esta mezcla se incubó a 70 °C durante 10 minutos. Durante este tiempo se favoreció la unión de los *primers* al ARN.

Para completar la RT-PCR, se añadió a cada muestra 10 μ l de una mezcla formada por: 1 μ l de desoxirribonucleótido trifosfato (dNTP; Roche Applied Science®), 0.5 μ L de inhibidor de la ARNasa (Roche Applied Science®), 1 μ l de tampón de MMLV (del inglés *Moloney Murine Leukemia Virus*; Sigma-Aldrich®), 1 μ l de enzima MMLV (Sigma-Aldrich®) y 6.5 μ L de agua DEPC. A continuación, en el termociclador se incubaron las muestras en un ciclo de 10 minutos a 25°C, 60 minutos a 42°C, 15 minutos a 70°C y se mantuvieron finalmente a 4°C. El ADNc resultante de la reacción se congeló a -20°C hasta su posterior uso.

4.3.4.2 Diseño de Cebadores y PCR cuantitativa (qPCR)

Para el diseño de los cebadores que hibridan en la secuencia de ADNc de cada gen, se utilizó la base de datos Nucleotide (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide>), un motor de búsqueda de secuencias nucleotídicas de genes de diferentes especies, perteneciente al NCBI (*Nacional Center for Biotechnology Information*) de Estados Unidos. Tras localizar los ARNm de interés en Nucleotide, con el programa informático Primer3 (<http://frodo.wi.mit.edu/primer3>) se diseñaron los cebadores complementarios de cada ARNm. En la tabla 6 se muestran las secuencias de los cebadores diseñados y sus características de hibridación.

Cebador	Longitud del Cebador	Secuencia 5'a 3'	%GC	Tm(°C)	Gen
IRF9 fwd	20 nt.	CCTGGACAGCAACTCAGGTA	55	59.4	IRF9
IRF9 rev	20 nt.	CCTCCTGACCTTTGCCTACA	55	59.4	
OAS1 fwd	20 nt.	CGAAACCAACAGCAGTCCAA	50	57.3	OAS1
OAS1 rev	20 nt.	TGGTTGATTTGCATGCGGAA	45	55.3	
STAT1 fwd	20 nt.	TGCAAAACCTTGACAGAACAG	45	55.3	STAT1
STAT1 rev	20 nt.	GGGCATTCTGGGTAAGTTCA	50	57.3	
TYK2 fwd	20 nt.	CCTCCTGGAGATCTGCTTTG	55	59.4	TYK2
TYK2 rev	20 nt.	TCTGGGTTGGCTCATAGGTC	55	59.4	
STAT2 fwd	20 nt.	GAGGCCTCAACTCAGACCAG	60	61.4	STAT2
STAT2 rev	20 nt.	GCGTCCATCATTCCAGAGAT	50	57.3	
GAPDH fwd	20 nt.	GAAGATGGTGATGGGATTTTC	45	60,8	GADPH
GADPH rev	18 nt.	GAAGGTGAAGGTCGGAGT	55	59.2	

Tabla 6. Secuencia de los cebadores usados en la amplificación de cada gen utilizado para la validación del microarray. Se indica los cebadores sentido (fwd) y los anti sentido (rev), la longitud en nucleótidos (nt.) de cada cebador, el porcentaje de guanina y citosina de la secuencia así como su temperatura de fusión o *Melting*.

Para la cuantificación de las muestras se utilizó la plataforma de amplificación a tiempo real Rotor-Gene Q (QIAGEN®). En cada reacción se utilizó un volumen final de 20 μ L formado por los siguientes constituyentes: 2 μ L de ADNc, 6.4 μ L de agua DEPC, 0.5 μ L de cada uno de los dos cebadores de cada gen concreto (a una concentración de 20 mM) y 10.6 μ L de QuantiTect SYBR Green PCR Master Mix 2X.

Como controles internos de cada tanda de PCR se incluyó una curva estándar obtenida a partir de 5 diluciones seriadas de una mezcla de ADNc de concentración conocida, obtenido de un ARN total comercial de PBMC humano (BD Biosciences®). También se incluyó un control negativo (reacción con agua DEPC en vez de ADNc) y un calibrador (reacción con una mezcla de todos los ADNc testados en vez de ADNc de una sola muestra) que se incluyó en todas las tandas realizadas. Por último, todas las reacciones se realizaron por duplicado.

El programa de PCR utilizado en el Rotor Gene Q tuvo unas etapas de temperatura y tiempo de:

- Desnaturalización inicial: 95°C durante 15 minutos.
- Amplificación: consistente en la repetición de 40 ciclos de:
 - Desnaturalización: 95°C durante 30 segundos.
 - Anillamiento: 57 ó 58°C (según el gen) durante 30 segundos.
 - Extensión: 72°C durante 30 segundos.
- Melting: incrementos de temperatura de 1°C cada 5 segundos, desde 65°C hasta 95°C.

Para cada reacción de qPCR, la plataforma proporciona un valor de Ct (*Cycle Threshold*), siendo éste el ciclo de amplificación de qPCR en el cual el aumento de la fluorescencia (y con ello de la amplificación) empieza a ser exponencial, por lo que este valor es inversamente proporcional a la expresión del gen en cuestión. Estos datos de Ct se analizaron con el método del $\Delta\Delta$ Ct (delta-delta Ct) utilizando las siguientes fórmulas:

$$\Delta\text{Ct} = \text{Ct del gen problema} - \text{Ct del gen referencia}$$

$$\Delta\Delta\text{Ct} = \Delta\text{Ct muestra} - \Delta\text{Ct calibrador}$$

$$\text{Expresión relativa} = 2^{-(\Delta\Delta\text{Ct})}$$

RESULTADOS





5. RESULTADOS

5.1 Objetivo I: Estudio funcional de la vía de señalización del IFN β .

Este objetivo se centra en evaluar los niveles basales y la activación a corto plazo de la vía JAK-STAT tras la estimulación con IFN β en controles sanos, pacientes con EM no tratados y tratados con IFN β , y su relación con la respuesta terapéutica. Para ello se evaluaron en PBMC, los niveles de superficie celular de las subunidades del receptor de IFN β (IFNAR1 e IFNAR2) y las formas fosforiladas de STAT1 y STAT2 mediante citometría de flujo.

5.1.1 Población de estudio

Se incluyeron en el estudio 12 controles sanos, así como 48 pacientes con EM, de los que 17 eran pacientes sin tratamiento y 31 eran pacientes tratados con IFN β . Para cada paciente se registraron las siguientes variables clínicas y demográficas: sexo, edad, duración de la enfermedad, EDSS basal (al comienzo del tratamiento con IFN β), EDSS tras un año de tratamiento, número de brotes durante el año previo al inicio del tratamiento, número de brotes durante el primer año de tratamiento, número de pacientes con actividad en RM antes del inicio del tratamiento y número de pacientes con actividad en RM tras un año de tratamiento con IFN β .

Los tres grupos presentaban variables demográficas similares por lo que no se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre ellos. En cuanto a los datos clínicos de los pacientes con EM, tampoco había diferencias significativas entre los grupos. Los datos clínicos-demográficos de todos los grupos aparecen recogidos en la tabla 7.

	Pacientes sin tratamiento		Pacientes tratados con IFN β	p
	Controles			
Número de sujetos	12	17	31	ns
Mujer/Hombre	7/5	10/7	19/12	ns
Edad (años)	35 \pm 4	37 \pm 11	36 \pm 10	ns
Duración de la EM (años)		6.5 \pm 5.4	6.9 \pm 5.4	ns
EDSS Basal		1(0-3.75)	1(0-1.5)	ns
EDSS tras 1 año de tratamiento			1(0-1.5)	
Nº de brotes antes del inicio del tratamiento		1(0-1.5)	1(0-1)	ns
Nº de brotes durante el primer año de tratamiento			0(0-1)	

Tabla 7. Datos clínicos-demográficos de los grupos control, pacientes sin tratar y pacientes tratados con IFN β . Los datos cuantitativos se presentan como media \pm desviación estándar (edad y duración de la EM) o como mediana (rango intercuartílico) para EDSS y número de recaídas. Valores de P obtenidos entre pacientes no tratados y tratados por prueba de chi-cuadrado (sexo), prueba T (edad, duración) o prueba de Mann-Whitney (EDSS y número de recaídas).

De los 31 pacientes con EM tratados con IFN β , 19 fueron clasificados como respondedores y 12 como no respondedores. Los datos clínico-demográficos de los pacientes respondedores y no respondedores se recogen en la tabla 8. No hubo diferencias significativas en las variables demográficas entre los dos grupos. En cuanto a las características clínicas, se encontraron diferencias estadísticamente significativas en la EDSS tras un año de tratamiento, en el número de brotes durante el año de tratamiento, en el número de pacientes con actividad en la RM durante el año previo al inicio del tratamiento y durante el año de tratamiento.

	Respondedores	No Respondedores	p
Número de sujetos	19	12	
Mujer/Hombre	12/7	6/6	ns
Edad (años)	36±10	35±11	ns
Duración de la EM (años)	6.4±5.6	7.7±5.2	ns
EDSS Basal	0(0-1)	1(0-2.5)	ns
EDSS tras 1 año de tratamiento	0(0-1)	1.75(1-2.88)	0.003
Nº de brotes antes del inicio del tratamiento	1(1-1)	1(0-2)	ns
Nº de brotes durante el primer año de tratamiento	0(0-0)	1(1-1)	9x10 ⁻⁶
Nº de pacientes con actividad en RM antes del inicio del tratamiento	6/19	10/12	<0.005
Nº de pacientes con actividad en RM tras un año de tratamiento	1/19	9/12	<0.00005

Tabla 8. Datos clínico-demográficos de los pacientes respondedores y no respondedores. Los datos cuantitativos se presentan como media ± desviación estándar (edad y duración de la EM) o como mediana (rango intercuartílico) para EDSS y número de recaídas. Valores de P obtenidos entre pacientes respondedores y no respondedores por prueba de chi-cuadrado (sexo, actividad de MRI), prueba T (edad, duración) o prueba de Mann-Whitney (EDSS y número de recaídas). N.s: no significativo, EDSS: escala de estado de discapacidad expandida, IFNβ: interferón-β.

5.1.2 Niveles de proteínas de la vía JAK-STAT en células no estimuladas y tras la estimulación *in vitro* con IFN β

5.1.2.1 Comparaciones entre controles sanos y pacientes con EM sin tratar

5.1.2.1.1 Expresión de los niveles basales

La expresión de los niveles basales se realizó comparando las IMF en células no estimuladas. No existían diferencias significativas en los niveles de expresión basal de las proteínas IFNAR1, IFNAR2, pSTAT1 y pSTAT2 en las subpoblaciones celulares analizadas entre los pacientes sin tratamiento y los controles sanos. Los datos de expresión de los niveles basales, en las células sin estimular aparecen recogidos en la tabla 9 y representados en la figura 22.

IMF de Células Sin Estimular				
		Sin Tratamiento	Controles	p
CD4+	IFNAR1	247.65 ± 33.52	269.50 ± 59.31	NS
	IFNAR2	243.82 ± 43.61	232.08 ± 31.01	NS
	pSTAT1	243.12 ± 28.74	251.58 ± 28.06	NS
	pSTAT2	259.88 ± 35.28	256.73 ± 44.71	NS
CD8+	IFNAR1	262.23 ± 42.52	297.75 ± 82.70	NS
	IFNAR2	270.41 ± 53.31	241.75 ± 39.03	NS
	pSTAT1	245.76 ± 37.75	265.67 ± 46.20	NS
	pSTAT2	267.88 ± 40.08	268.45 ± 51.06	NS
CD14+	IFNAR1	735.36 ± 136.79	1156.58 ± 574.89	NS
	IFNAR2	556.59 ± 130.45	499.08 ± 122.96	NS
	pSTAT1	648.23 ± 173.80	751.33 ± 151.25	NS
	pSTAT2	1061.18 ± 298.78	939.55 ± 186.52	NS

Tabla 9. Intensidad Media de Fluorescencia (IMF) de IFNAR1, IFNAR2, pSTAT1 y pSTAT2 en células no estimuladas. Comparación entre controles sanos y pacientes con EM sin tratamiento. Datos expresados como medias ± desviación estándar. NS = no significativo.

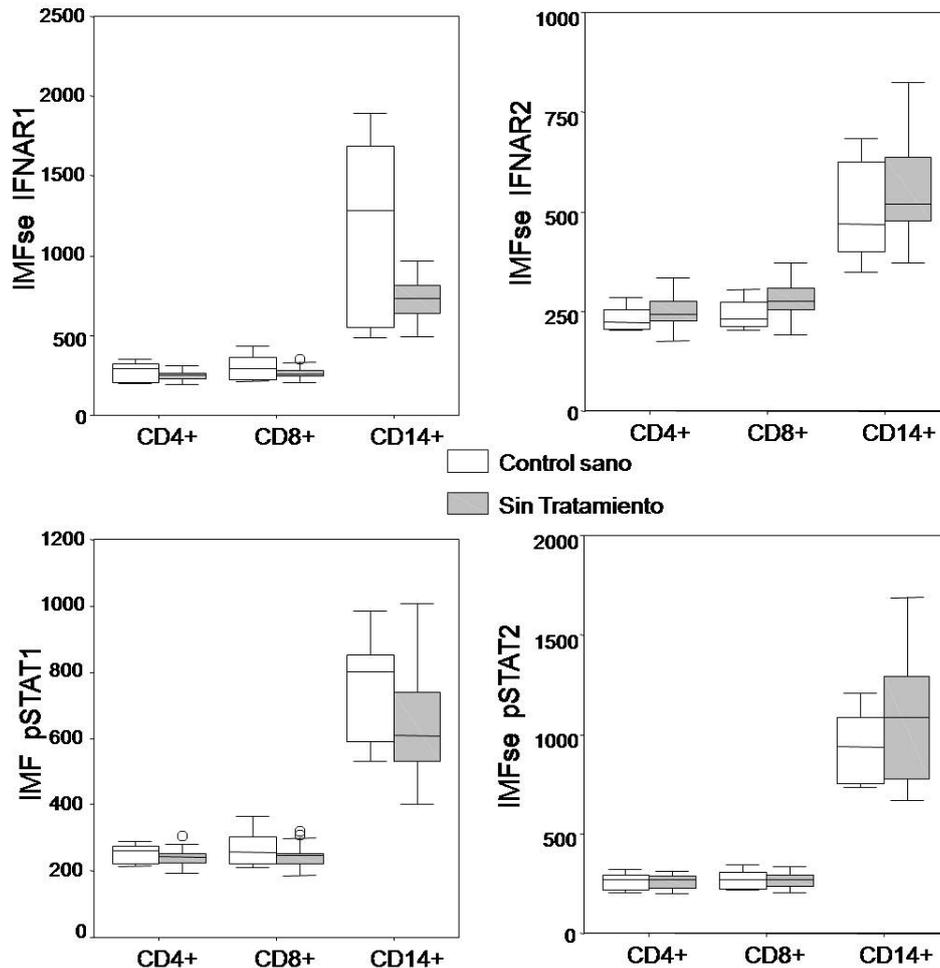


Figura 22. Representación de las IMF de IFNAR1, IFNAR2, pSTAT1 y pSTAT2 en células no estimuladas. Comparación entre controles sanos y pacientes con EM sin tratamiento.

5.1.2.1.2 Expresión tras la estimulación *in vitro* con IFN β

Para evaluar los cambios tras la estimulación *in vitro* con IFN β se analizó la IMF en células estimuladas respecto a la IMF en condiciones basales (IMFe / IMFse).

Al comparar los niveles de expresión de las proteínas de la vía JAK-STAT (IFNAR1, IFNAR2, pSTAT1 y pSTAT2) tras la estimulación *in vitro* con IFN β , entre controles y pacientes sin tratamiento, se observó que los monocitos de los pacientes sin tratar presentaban mayores niveles de pSTAT1 y pSTAT2 ($p=0.008$ y $p=0.015$) que los de los controles. Además los linfocitos T CD4+ de los pacientes expresaban mayores niveles de IFNAR1 que los de los controles ($p=0.007$). Por el contrario, los

monocitos de los pacientes sin tratar tenían menor expresión de IFNAR1 que los monocitos de los controles ($p=0.034$) (Figura 23).

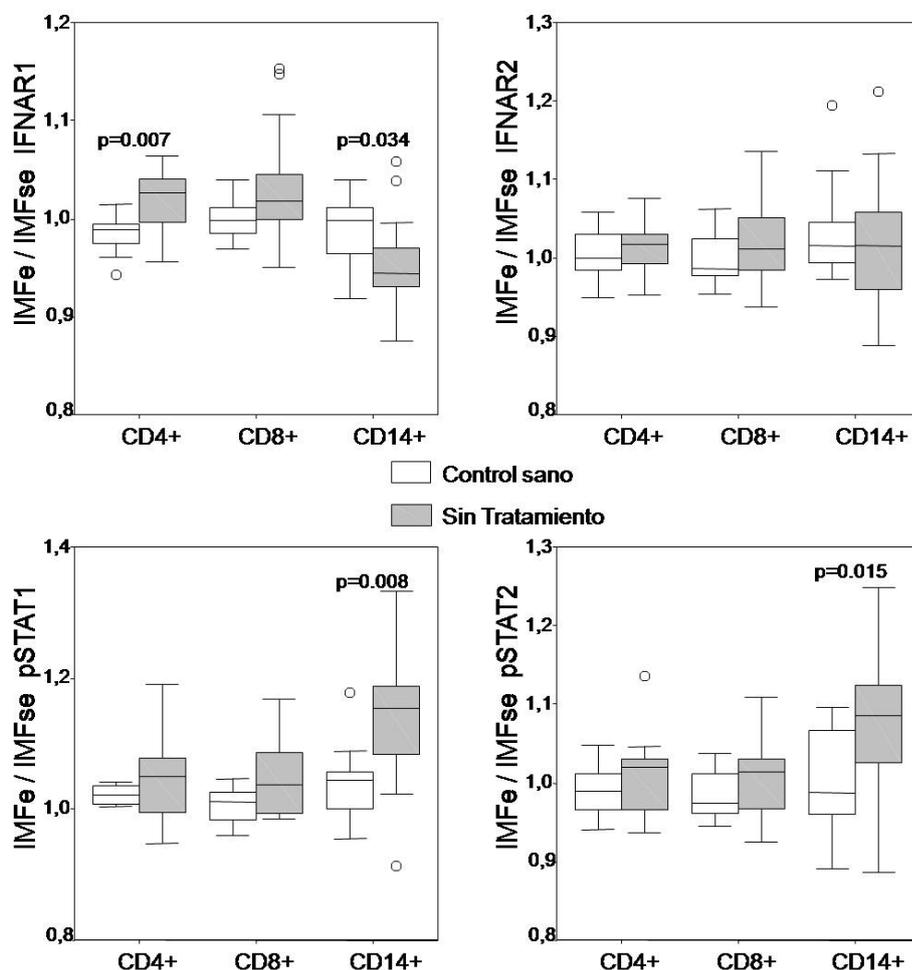


Figura 23. Diferencias en la expresión de IFNAR1, IFNAR2, pSTAT1 y pSTAT2 tras de la estimulación con IFN β entre controles sanos y pacientes de EM sin tratamiento. La expresión se representa como la relación de entre la IMF de las células estimuladas (IMFe) y la IMF de las células sin estimular (IMFse).

5.1.2.2 Comparaciones entre pacientes con EM sin tratar y pacientes tratados con IFN β

5.1.2.2.1 Expresión de los niveles basales

En condiciones basales, los monocitos fueron la subpoblación celular que mostró mayores niveles de IMF en todos los marcadores analizados.

Los pacientes tratados con IFN β mostraron valores de IMF significativamente mayores de IFNAR1 y pSTAT1 en células T CD4+ ($p = 0,019$; $p = 0,020$), células T CD8+ ($p = 0,001$; $p = 0,026$) y monocitos ($p < 0,0001$; $p = 0,008$) comparado con los pacientes sin tratamiento, como se recoge en la tabla 10. Las diferencias se representan en la figura 24.

IMF de Células Sin Estimular				
		Sin Tratamiento	Tratados	p
CD4+	IFNAR1	247.65 \pm 33.52	274.9 \pm 37.79	0,019
	IFNAR2	243.82 \pm 43.61	254.9 \pm 25.10	NS
	pSTAT1	243.12 \pm 28.74	266.52 \pm 33.81	0,020
	pSTAT2	259.88 \pm 35.28	270.71 \pm 38.20	NS
CD8+	IFNAR1	262.23 \pm 42.52	315.97 \pm 54.96	0,001
	IFNAR2	270.41 \pm 53.31	277.16 \pm 45.08	NS
	pSTAT1	245.76 \pm 37.75	273.58 \pm 35.16	0,026
	pSTAT2	267.88 \pm 40.08	288.16 \pm 41.94	NS
CD14+	IFNAR1	735.36 \pm 136.79	1143.81 \pm 290.34	<0,0001
	IFNAR2	556.59 \pm 130.45	583.29 \pm 100.18	NS
	pSTAT1	648.23 \pm 173.80	794.48 \pm 176.49	0,008
	pSTAT2	1061.18 \pm 298.78	1090.29 \pm 232.95	NS

Tabla 10. Intensidad Media de Fluorescencia (IMF) de IFNAR1, IFNAR2, pSTAT1 y pSTAT2 en células no estimuladas. Comparación entre pacientes con EM sin tratamiento y pacientes tratados con IFN β . Datos expresados como medias \pm desviación estándar. NS = no significativo.

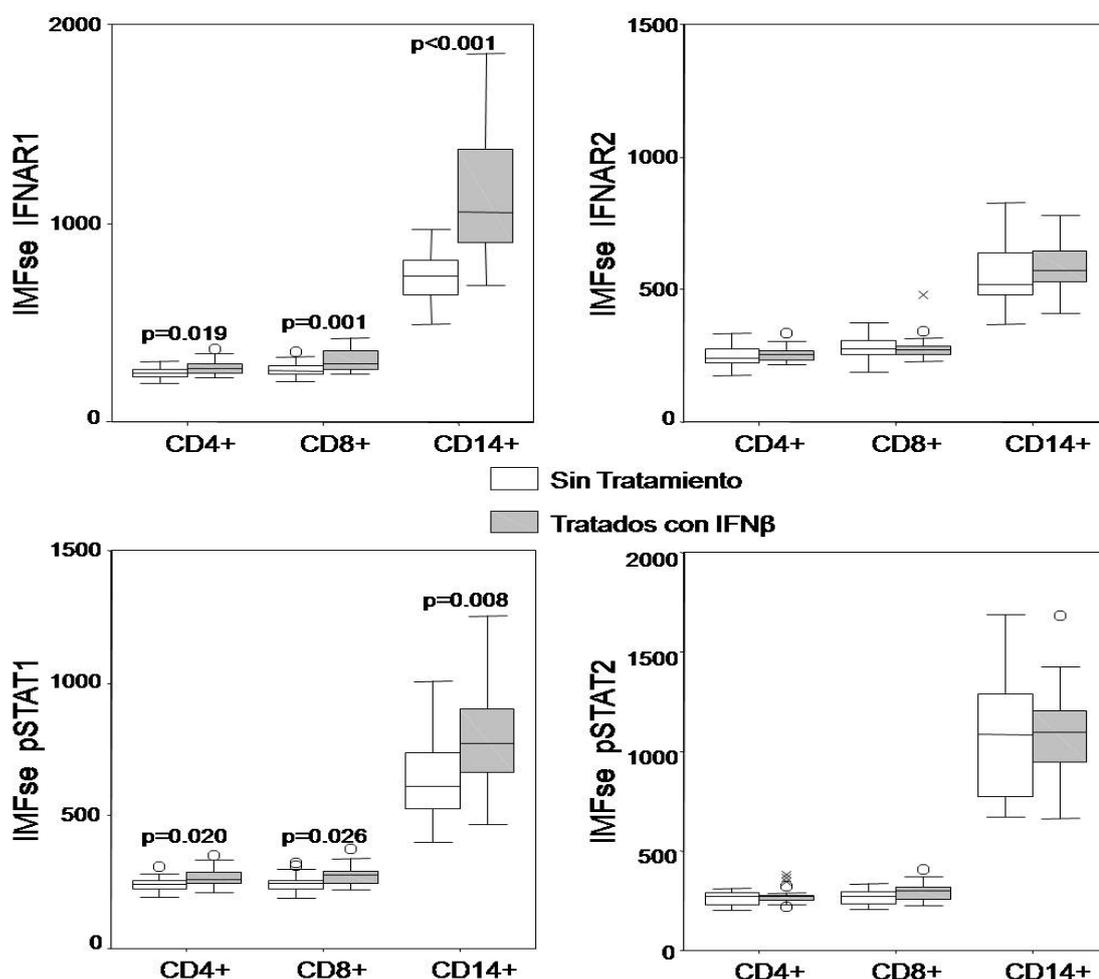


Figura 24. Niveles de expresión basales de IFNAR1, IFNAR2, pSTAT1 y pSTAT2 en células no estimuladas. Comparación entre pacientes con EM sin tratamiento y tratados con IFNβ.

La representación de los datos de expresión a nivel basal de IFNAR1, IFNAR2, pSTAT1 y pSTAT2 de pacientes tratados y no tratados, se realizó mediante mapas de calor. Estos mapas se generaron representando el \log_2 de la IMF media de cada grupo de pacientes dividido por la IMF media de todos los pacientes de EM. Este valor se calculó para IFNAR1, IFNAR2, pSTAT1 y pSTAT2 y para cada subpoblación (Figura 25a). En estos mapas de calor, los niveles de expresión de las proteínas se corresponden con una escala de color, en el que las proteínas sin cambios se muestran en negro, las proteínas que aumentan su expresión se muestran en amarillo, mientras que las proteínas que disminuyen su expresión se representan en violeta.

Al observar el mapa de calor de los pacientes sin tratamiento y el de los tratados (figura 25a), se observa que en el mapa de los pacientes tratados con IFN β a largo plazo predominan colores amarillos, mientras que el mapa de calor de los pacientes sin tratamiento principalmente predominan colores violetas. Esto indica que los pacientes tratados mostraron un mayor patrón de activación en condiciones basales que los pacientes sin tratamiento.

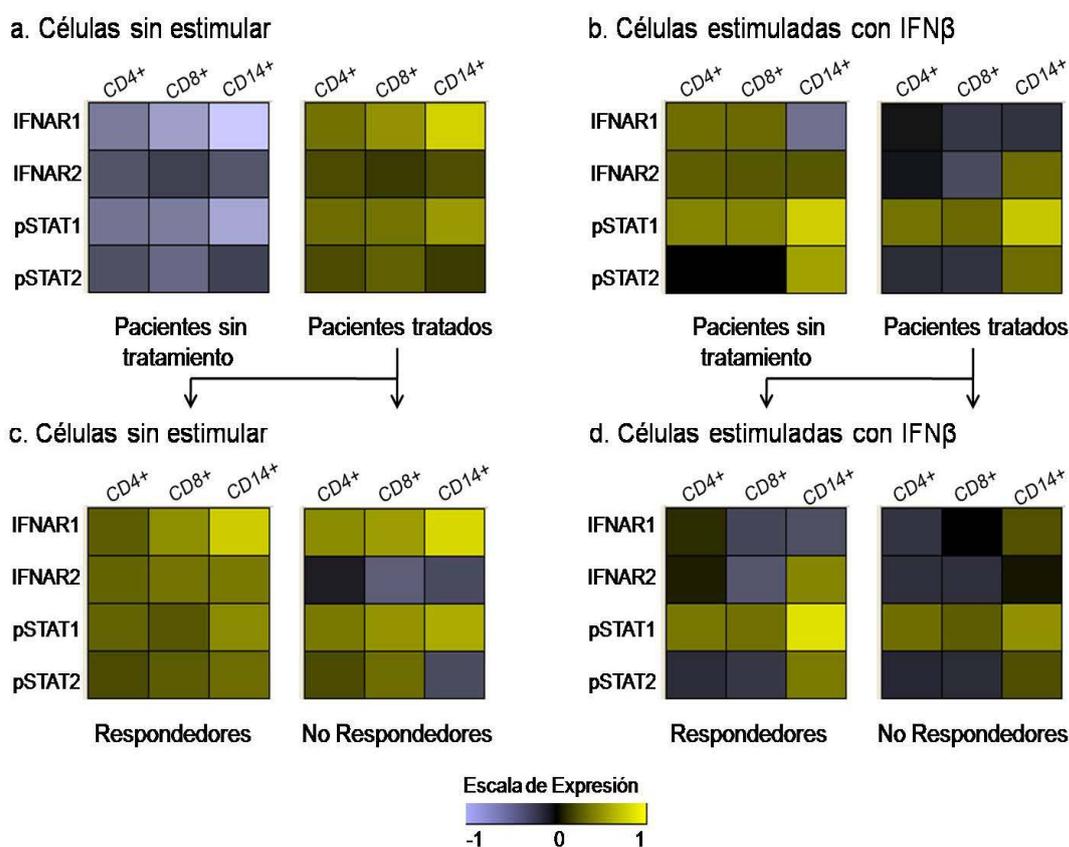


Figura 25. Mapas de calor que muestran diferentes perfiles de la vía de señalización JAK-STAT en células sin estimular y tras la estimulación *in vitro* con IFN β . Para la representación de las células sin estimular (a y c) se ha utilizado el log2 de la IMF media de cada grupo de pacientes dividido por la IMF media de todos los pacientes de EM, para IFNAR1, IFNAR2, pSTAT1 y pSTAT2, y para cada subpoblación. Para la representación de las células estimuladas con IFN β (b y d), de cada paciente se calculó el log2 de la IMF de las células estimuladas dividido por la IMF de las células sin estimular y se calculó la media de cada grupo de pacientes, para IFNAR1, IFNAR2, pSTAT1 y pSTAT2, y para cada subpoblación. a) Células sin estimular de pacientes de EM sin tratamiento y tratados sin estimular. b) Células de pacientes sin tratar y tratados tras la estimulación *in vitro* con IFN β . c)

Células de pacientes respondedores y no respondedores en condiciones no estimuladas. d) Células de pacientes respondedores y no respondedores al tratamiento tras la estimulación a corto plazo de IFN β . En la escala de expresión, las proteínas sin cambios se muestran en negro, las proteínas que aumentan su expresión se muestran en amarillo, mientras que las proteínas que disminuyen su expresión se representan en violeta. IMF intensidad media de fluorescencia.

5.1.2.2.2 Expresión tras la estimulación *in vitro* con IFN β

Las diferencias tras la estimulación *in vitro* con IFN β entre pacientes sin tratamiento y aquellos tratados con IFN β se analizaron como la relación IMFe / IMFse de IFNAR1, IFNAR2, pSTAT1 y pSTAT2 en cada subpoblación de celular. Esta relación nos proporcionó información sobre el estado de activación de las células tras la estimulación a corto plazo con IFN β y, por lo tanto, sobre la funcionalidad de su vía de señalización.

Tras la estimulación con IFN β , los monocitos de los pacientes no tratados mostraron una menor expresión de IFNAR1 ($p = 0,012$) y una mayor expresión de pSTAT2 ($p = 0,027$) que los monocitos de los pacientes tratados, no encontrándose diferencias en los niveles de IFNAR2 y pSTAT1 entre ambos grupos. Por el contrario, en las subpoblaciones de células T, la estimulación *in vitro* con IFN β aumentó ligeramente los niveles de IFNAR1 en mayor medida en pacientes sin tratar que en aquellos pacientes tratados previamente con IFN β ($p = 0,044$ y $p = 0,040$ en células T CD4+ y CD8+, respectivamente) como se muestra en la figura 26.

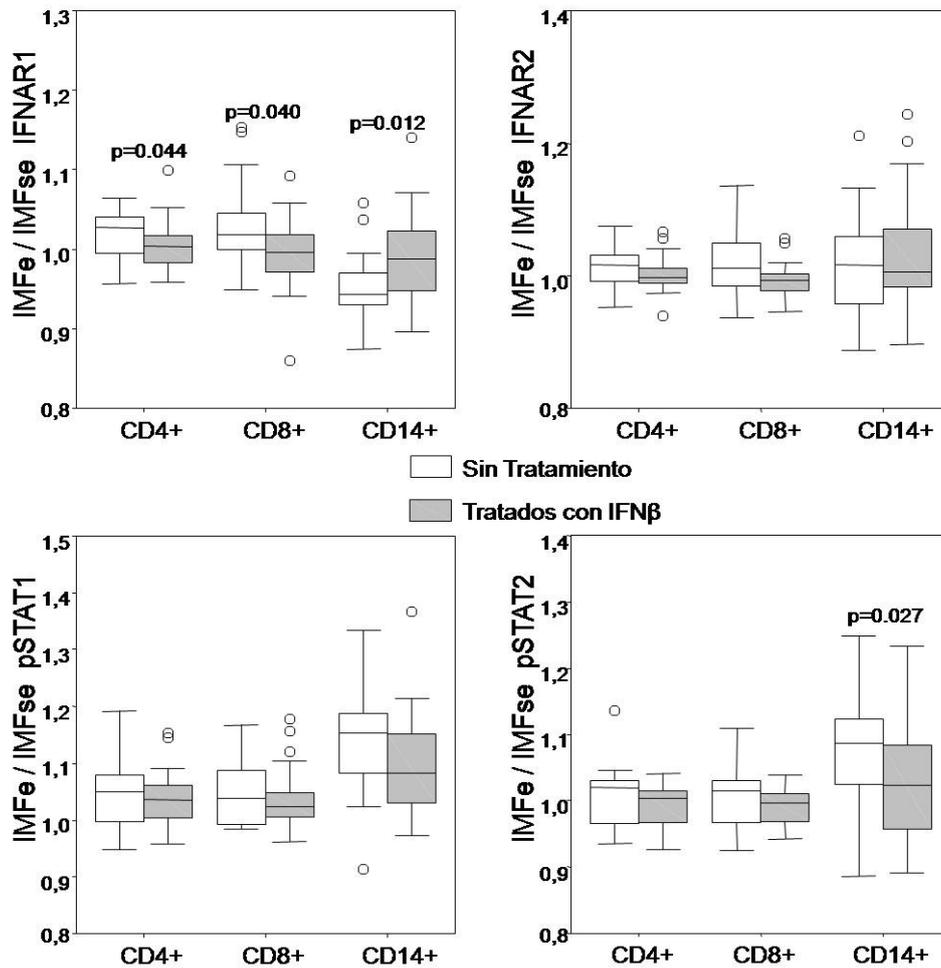


Figura 26. Diferencias en la expresión de IFNAR1, IFNAR2, pSTAT1 y pSTAT2 tras de la estimulación con IFN β entre pacientes con EM sin tratamiento y tratados. La expresión se representa como la relación de entre la IMF de las células estimuladas (IMFe) y la IMF de las células sin estimular (IMFse).

Los datos de activación tras la estimulación in vitro con IFN β de las células de los pacientes tratados y sin tratar se representaron en mapas de calor. Para ello, de cada paciente se calculó el log2 de la IMF de las células estimuladas dividido por la IMF de las células sin estimular y se calculó la media de cada grupo de pacientes, para IFNAR1, IFNAR2, pSTAT1 y pSTAT2, y para cada subpoblación (figura 25b).

Al representar los datos de activación de los componentes de la vía JAK-STAT tras la estimulación con IFN β en los mapas de calor, se aprecia que los pacientes sin tratamiento mostraron un mayor patrón de activación como consecuencia de la

estimulación con IFN β (ya que el mapa de calor presenta más cuadrículas amarillas), que los pacientes con tratamiento prolongado con IFN β (figura 25b).

5.1.3 Niveles de proteínas de la vía JAK-STAT en pacientes de EM según su respuesta al tratamiento con IFN β

Los 31 pacientes con EM tratados con IFN β se clasificaron en función de la respuesta al tratamiento como respondedores (19 pacientes) y no respondedores (12 pacientes). Esta respuesta se evaluó tras un año de tratamiento con IFN β atendiendo a criterios de actividad clínica y resonancia magnética (Rio et al. 2009) como quedó explicado en la sección de material y métodos de este manuscrito. Los datos clínico-demográficos de estos pacientes se recogen en la tabla 8.

Entre respondedores y no respondedores se evaluaron las diferencias en los niveles de expresión de las proteínas IFNAR1, IFNAR2, pSTAT1 y pSTAT2 en las células a nivel basal o no estimuladas (comparando las IMF) y tras la estimulación *in vitro* con IFN β (comparando el ratio IMF_e / IMF_{se}). Además se analizaron patrones funcionales en la vía de señalización del IFN β relacionados con la respuesta terapéutica.

5.1.3.1 Expresión de los niveles basales

Como ocurría en los anteriores grupos de estudios analizados, los monocitos tanto de los pacientes respondedores al IFN β como los de los no respondedores, fueron la subpoblación celular que mostró mayores niveles de IMF en todos los marcadores analizados.

Al analizar los niveles basales de los marcadores de la vía de señalización JAK-STAT en las células no estimuladas de los pacientes tratados de acuerdo con la respuesta terapéutica a IFN β , no se observaron diferencias significativas en las IMF de IFNAR1, IFNAR2, pSTAT1 y pSTAT2 en ninguna de las tres subpoblaciones celulares entre los pacientes respondedores y los respondedores subóptimos. Los datos se muestran en la tabla 11 y se representan gráficamente en la figura 27.

IMF de Células Sin Estimular				
		Respondedores	No Respondedores	p
CD4+	IFNAR1	271.32 \pm 41.39	280.58 \pm 32.15	ns
	IFNAR2	257.84 \pm 25.64	250.25 \pm 24.58	ns
	pSTAT1	264.95 \pm 36.31	269 \pm 30.80	ns
	pSTAT2	270.68 \pm 43.61	270.75 \pm 29.46	ns
CD8+	IFNAR1	314.21 \pm 61.94	318.75 \pm 44.10	ns
	IFNAR2	285.05 \pm 51.87	264.67 \pm 29.37	ns
	pSTAT1	269 \pm 39.80	280.83 \pm 26.18	ns
	pSTAT2	287.11 \pm 48.55	289.83 \pm 30.58	ns
CD14+	IFNAR1	1136.58 \pm 281.91	1155.25 \pm 315.64	ns
	IFNAR2	597.37 \pm 71.61	561 \pm 134.52	ns
	pSTAT1	784.79 \pm 159.39	809.83 \pm 207.25	ns
	pSTAT2	1113.26 \pm 229.07	1053.92 \pm 244.51	ns

Tabla 11. Representación de las IMF de IFNAR1, IFNAR2, pSTAT1 y pSTAT2 en células no estimuladas. Comparación entre pacientes con EM respondedores y no respondedores al tratamiento con IFN β .

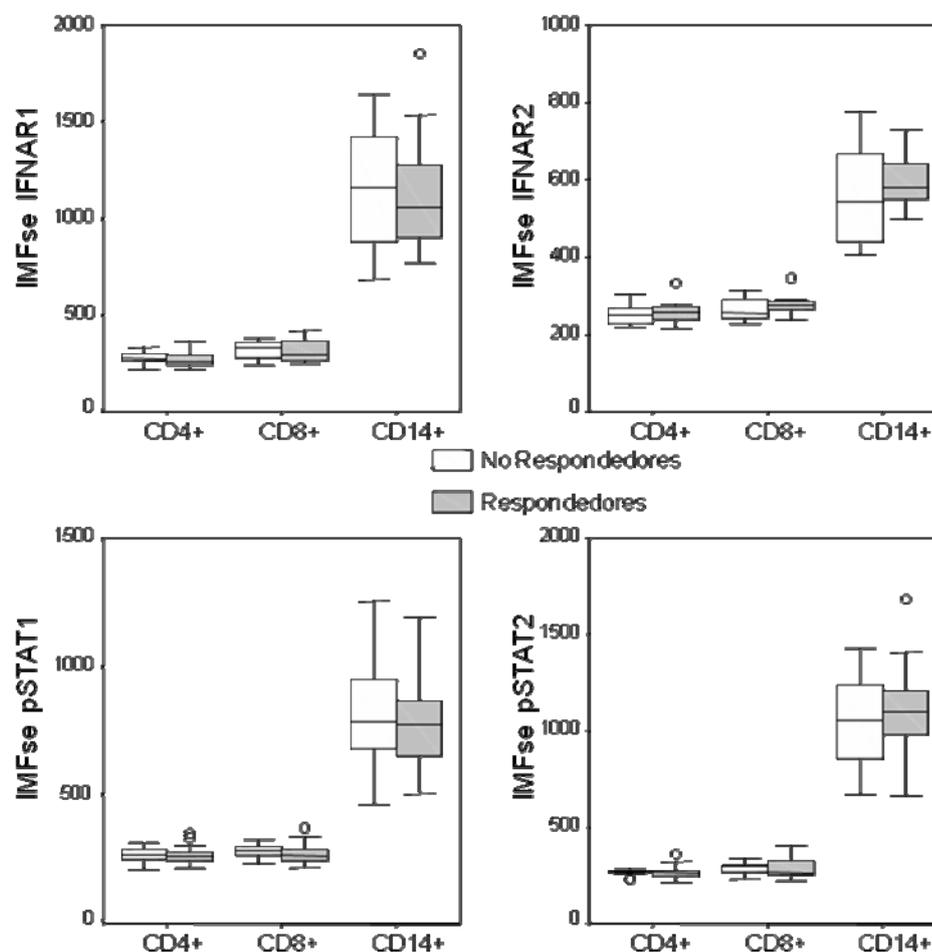


Figura 27. Niveles de expresión basales de IFNAR1, IFNAR2, pSTAT1 y pSTAT2 en células no estimuladas. Comparación entre pacientes con EM respondedores y no respondedores al tratamiento con IFN β .

5.1.3.2 Expresión tras la estimulación in vitro con IFN β

Las diferencias en la activación de la cascada de señalización tras la estimulación de las PBMC con IFN β entre respondedores y no respondedores al tratamiento, se analizaron con la relación IMFe / IMFse para cada uno de los cuatro marcadores (IFNAR1, IFNAR2, pSTAT1 y pSTAT2). Como resultado se obtuvo que los monocitos de los pacientes respondedores mostraron niveles ligeramente inferiores de IFNAR1 ($p = 0,039$) y mayores niveles de IFNAR2 ($p = 0,035$) que los monocitos de los pacientes no respondedores (figura 28). Sin embargo las diferencias entre los respondedores y los no respondedores en la capacidad de activar las proteínas STAT tras la estimulación con IFN β , no alcanzaron significación estadística.

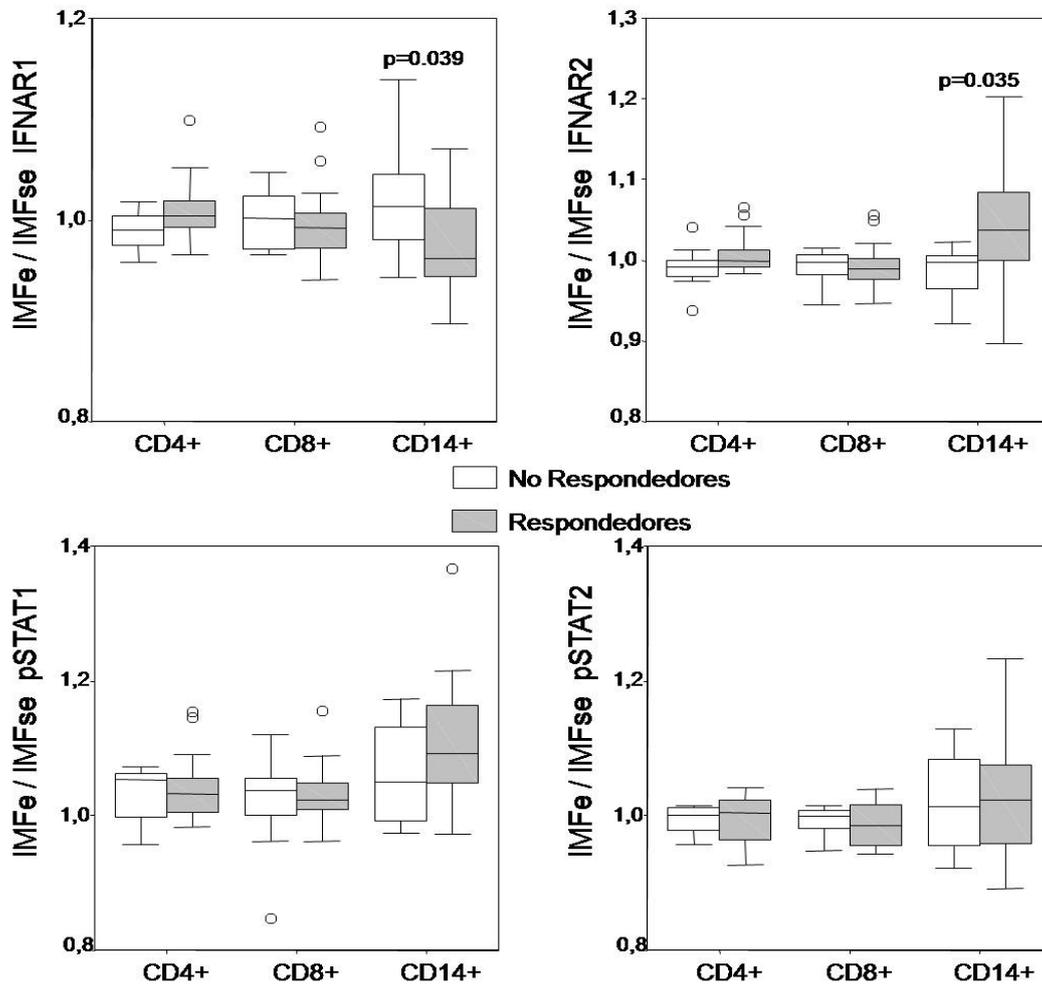


Figura 28. Diferencias en la expresión de IFNAR1, IFNAR2, pSTAT1 y pSTAT2 tras de la estimulación con IFN β entre pacientes de EM respondedores y no respondedores. La expresión se representa como la relación de entre la IMF de las células estimuladas (IMFe) y la IMF de las células sin estimular (IMFse).

5.1.3.3 Patrones de la vía JAK-STAT tras la estimulación *in vitro* con IFN β según la respuesta terapéutica

Con el fin de identificar diferentes patrones funcionales en la vía de señalización del IFN β relacionados con la respuesta terapéutica al interferón, de cada paciente se representó en un mapa de calor el log₂ (IMFe / IMFse) de los componentes de la vía IFNAR1, IFNAR2, pSTAT1 y pSTAT2 para cada subpoblación de celular (figura 29).

Tras realizar un análisis de agrupamiento jerarquizado no supervisado, en base a los niveles de IFNAR1, IFNAR2, pSTAT1 y pSTAT2 en monocitos, se agruparon 13 de los 19 pacientes respondedores (68%) con un patrón de expresión similar. Este patrón "respondedor" observado en los monocitos se caracterizaba por una disminución de los niveles de IFNAR1 y un aumento simultáneo de IFNAR2, pSTAT1 y pSTAT2 tras la estimulación *in vitro* con IFN β . Además, estadísticamente se comprobó positivamente la asociación entre la presencia de este patrón y el fenotipo clínico de buena respuesta terapéutica al IFN β ($p = 0,013$). Sin embargo, este patrón relacionado con la respuesta terapéutica al IFN β no pudo ser identificado en las subpoblaciones de células T CD4+ o CD8+.

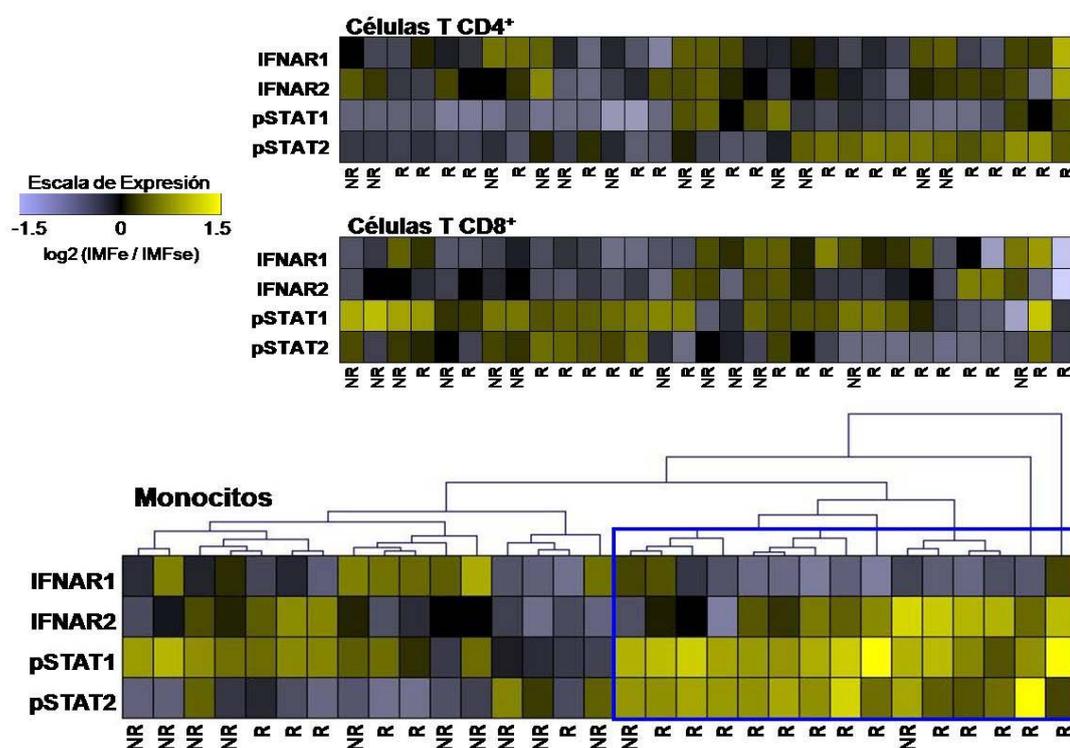


Figura 29. Patrones de activación individual de la vía de señalización JAK-STAT tras la activación *in vitro* según la respuesta terapéutica al IFN β . Se representó en un mapa de calor el log₂ (IMFe / IMFse) de IFNAR1, IFNAR2, pSTAT1 y pSTAT2 de cada uno de los pacientes tratados para de cada una de las subpoblaciones celulares analizadas. En la escala de expresión correspondiente a los mapas de calor, cuando las proteínas no presentan cambios tras la estimulación *in vitro* con IFN β se muestran en negro, en amarillo cuando las proteínas aumentan su expresión tras la estimulación y en violeta cuando disminuyen su expresión. En los monocitos, un agrupamiento jerárquico de vinculación media no supervisado

agrupó a 13 de los 19 pacientes respondedores con un patrón de expresión similar (rectángulo azul). IMF_e: intensidad media de fluorescencia de células estimuladas. IMF_{se}: intensidad media de fluorescencia de células no estimuladas. NR: pacientes no respondedores al tratamiento con IFN β . R pacientes respondedores al tratamiento con IFN β .

5.1.4 Correlaciones de los niveles de proteína

Una vez analizados los niveles de proteínas de la vía JAK-STAT en células sin estimular y tras la estimulación in vitro con IFN β entre los diferentes grupos de estudio, se realizó un análisis de correlación entre los niveles de expresión de los distintos marcadores (IFNAR1, IFNAR2, pSTAT1 y pSTAT2) en las tres subpoblaciones de células (monocitos, linfocitos T CD4+ y CD8+). Estas correlaciones se evaluaron en células sin estimular (a nivel basal) y tras la estimulación con IFN β .

5.1.4.1 Correlaciones a nivel basal

En los **controles sanos** se encontró una correlación positiva entre el nivel de expresión de cada uno de los marcadores analizados (IFNAR1, IFNAR2, pSTAT1 y pSTAT2) con los niveles de los otros tres marcadores en las tres subpoblaciones celulares sin estimular (monocitos, linfocitos T CD4+ y CD8+) a excepción de los niveles de pSTAT1 que no se correlacionaron con los de IFNAR1, IFNAR2 y pSTAT2 en las células T CD8+. Además, tampoco hubo correlación entre los niveles de IFNAR1 y pSTAT2 e IFNAR2 y pSTAT1 en monocitos. Estas correlaciones aparecen representadas en la figura 30 y resumidas en la tabla 12.

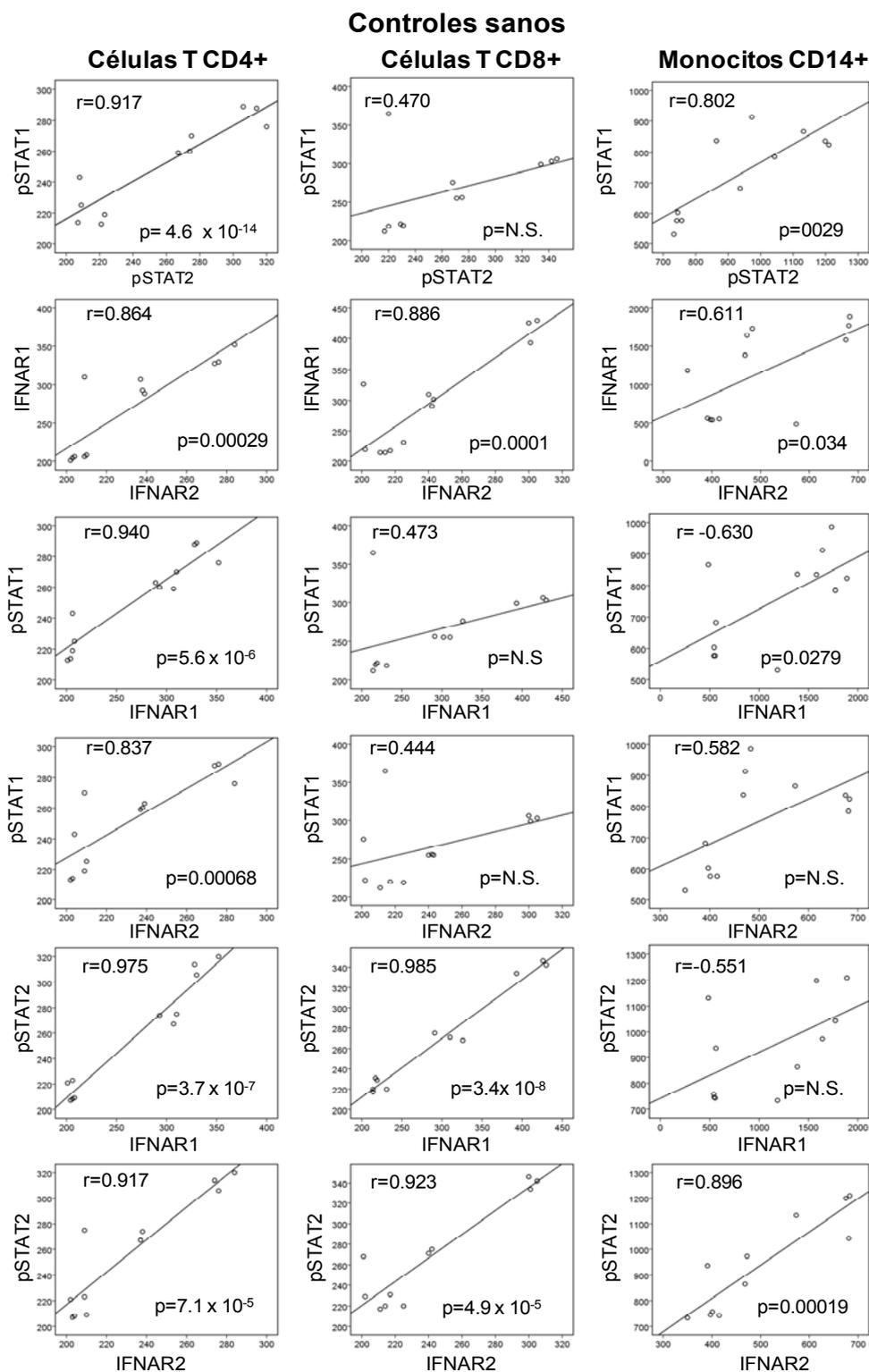


Figura 30: Correlaciones de los niveles basales de IFNAR1, IFNAR2, pSTAT1 y PSTAT2 de los controles sanos.

CORRELACIONES	GRUPOS DE ESTUDIO	CD4+		CD8+		CD14+	
		r	p	r	p	r	p
pSTAT1- pSTAT2	Controles	0.917	4.6 x 10 ⁻⁵	0.470	ns	0.802	0.0029
	Sin Tratar	0.935	3.8 x 10 ⁻⁸	0.962	6.9 x 10 ⁻¹⁰	0.942	1.7 x 10 ⁻⁸
	Tratados	0.882	5.5 x 10 ⁻¹¹	0.927	6.6 x 10 ⁻¹⁴	0.733	2.7 x 10 ⁻⁶
IFNAR1-IFNAR2	Controles	0.864	0.00029	0.886	0.000125	0.611	0.034
	Sin Tratar	0.797	0.00013	0.715	0.001	0.803	0.0001
	Tratados	0.248	ns	0.316	ns	0.237	ns
pSTAT1-IFNAR1	Controles	0.940	5.6 x 10 ⁻⁶	0.473	ns	0.630	0.0279
	Sin Tratar	0.972	7.1 x 10 ⁻¹¹	0.965	3.7 x 10 ⁻¹⁰	0.732	0.001
	Tratados	0.795	8.9 x 10 ⁻⁸	0.810	3.4 x 10 ⁻⁸	0.100	ns
pSTAT1-IFNAR2	Controles	0.837	0.00068	0.444	ns	0.582	ns
	Sin Tratar	0.730	0.001	0.676	0.003	0.595	0.012
	Tratados	0.442	0.013	0.144	ns	0.481	0.006
pSTAT2-IFNAR1	Controles	0.975	3.7 x 10 ⁻⁷	0.985	3.4 x 10 ⁻⁸	0.551	ns
	Sin Tratar	0.933	4.8 x 10 ⁻⁸	0.947	8.2 x 10 ⁻⁹	0.765	0.0003
	Tratados	0.876	1.1 x 10 ⁻¹⁰	0.864	3.7 x 10 ⁻¹⁰	0.067	ns
pSTAT2-IFNAR2	Controles	0.917	7.1 x 10 ⁻⁵	0.923	4.9 x 10 ⁻⁵	0.896	0.00019
	Sin Tratar	0.855	0.000012	0.800	0.000012	0.689	0.002
	Tratados	0.365	0.043	0.211	ns	0.291	ns

Tabla 12. Correlaciones de los niveles basales de IFNAR1, IFNAR2, pSTAT1 y pSTAT2 en controles sanos, pacientes con EM sin tratamiento y pacientes con EM tratados.

En los **pacientes sin tratamiento** se encontró una correlación positiva entre el nivel de expresión de cada uno de los marcadores analizados con los niveles de los otros tres marcadores en las tres subpoblaciones celulares sin estimular. Estas correlaciones aparecen representadas en la figura 31.

Pacientes con EM sin tratar

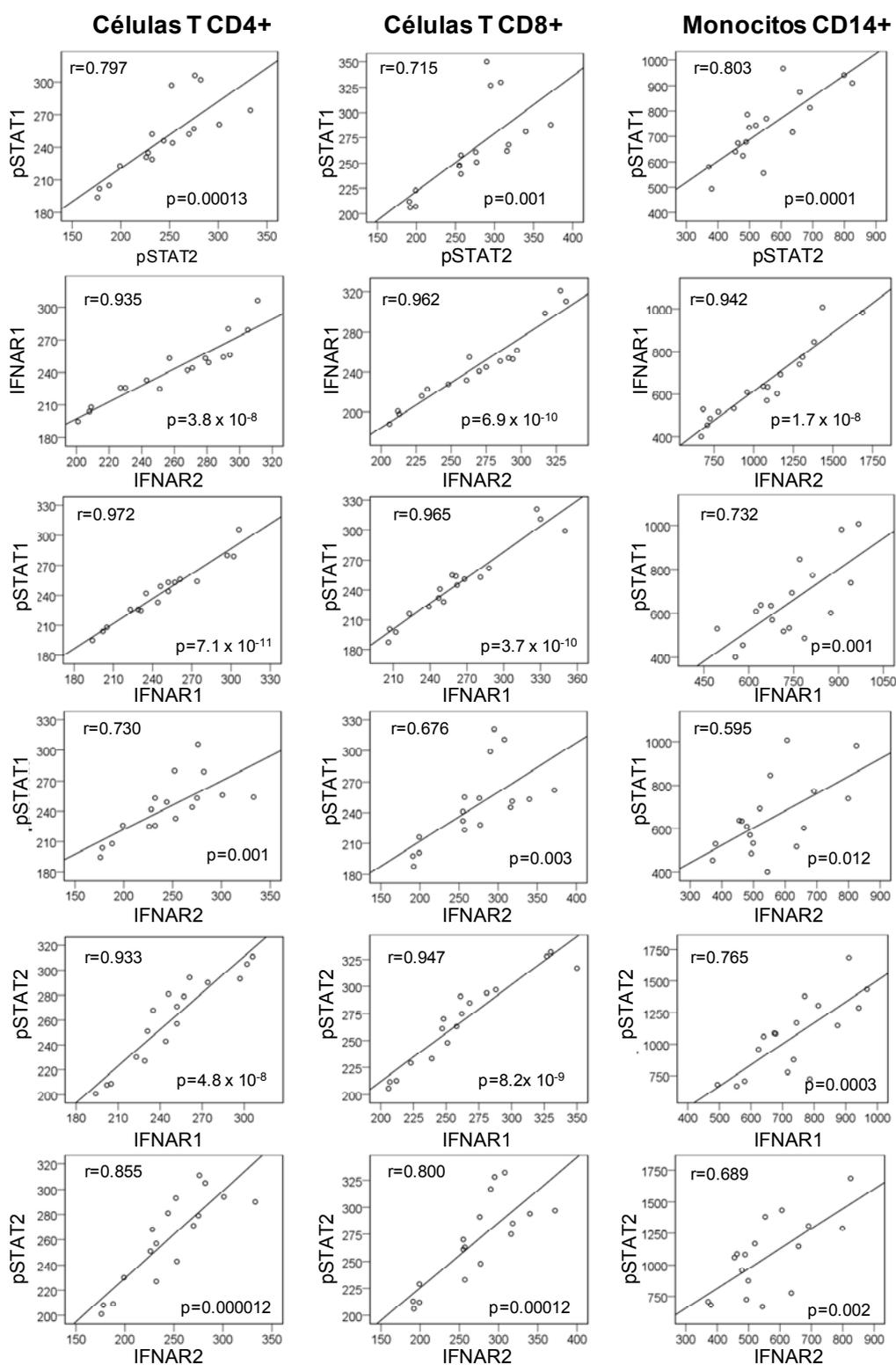


Figura 31: Correlaciones de los niveles basales de IFNAR1, IFNAR2, pSTAT1 y PSTAT2 en los pacientes de EM sin tratamiento.

Sin embargo, a diferencia de en los pacientes con EM sin tratamiento, en los **pacientes previamente tratados con IFN β** , los niveles de IFNAR1 no se correlacionaron con niveles de IFNAR2 en ninguna de las subpoblaciones celulares. Además, los niveles de IFNAR1 tampoco se correlacionaron con niveles de pSTAT1 o pSTAT2 en monocitos, y los niveles de IFNAR2 no se correlacionaron con los de pSTAT1 en las células T CD8+ o con los niveles pSTAT2 en las células T CD8+ y monocitos, como se observa en la figura 32.

Pacientes con EM tratados

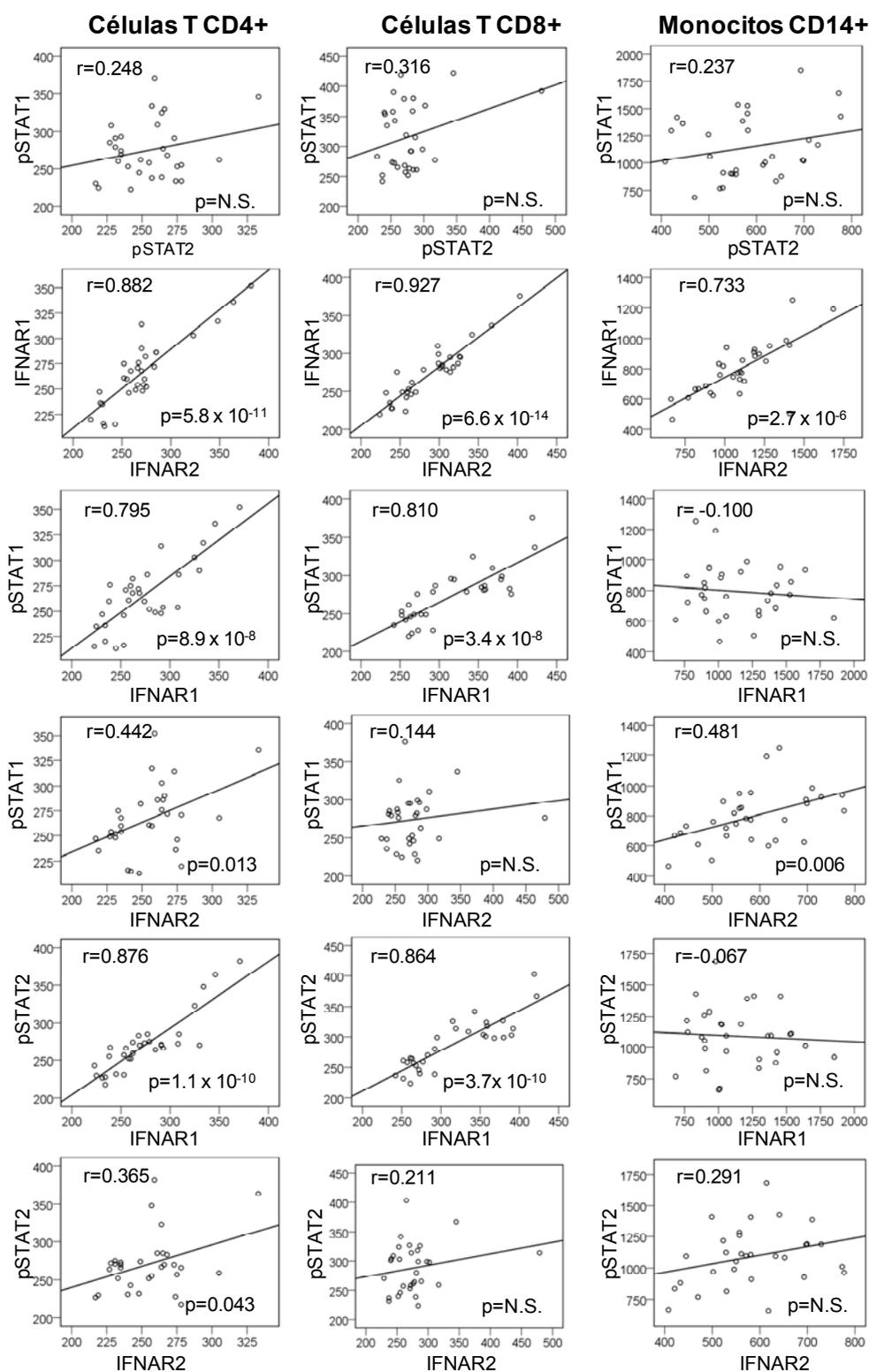


Figura 32. Correlaciones de los niveles basales de IFNAR1, IFNAR2, pSTAT1 y pSTAT2 en los pacientes de EM tratados con IFN β .

Cuando dividimos el grupo de pacientes tratados en **pacientes respondedores y no respondedores** al IFN β , en las correlaciones entre los niveles basales de expresión de las distintas proteínas de la vía JAK-STAT analizadas, los niveles de IFNAR1 se correlacionaron con los niveles de pSTAT1 y pSTAT2 en las dos subpoblaciones de células T, tanto en respondedores como en no respondedores. Además la expresión de pSTAT1 correlacionó con la expresión de pSTAT2 en las tres subpoblaciones de células de los dos grupos, como se muestra en las figuras 33 y 34 y en la tabla 13.

Pacientes respondedores a IFN β

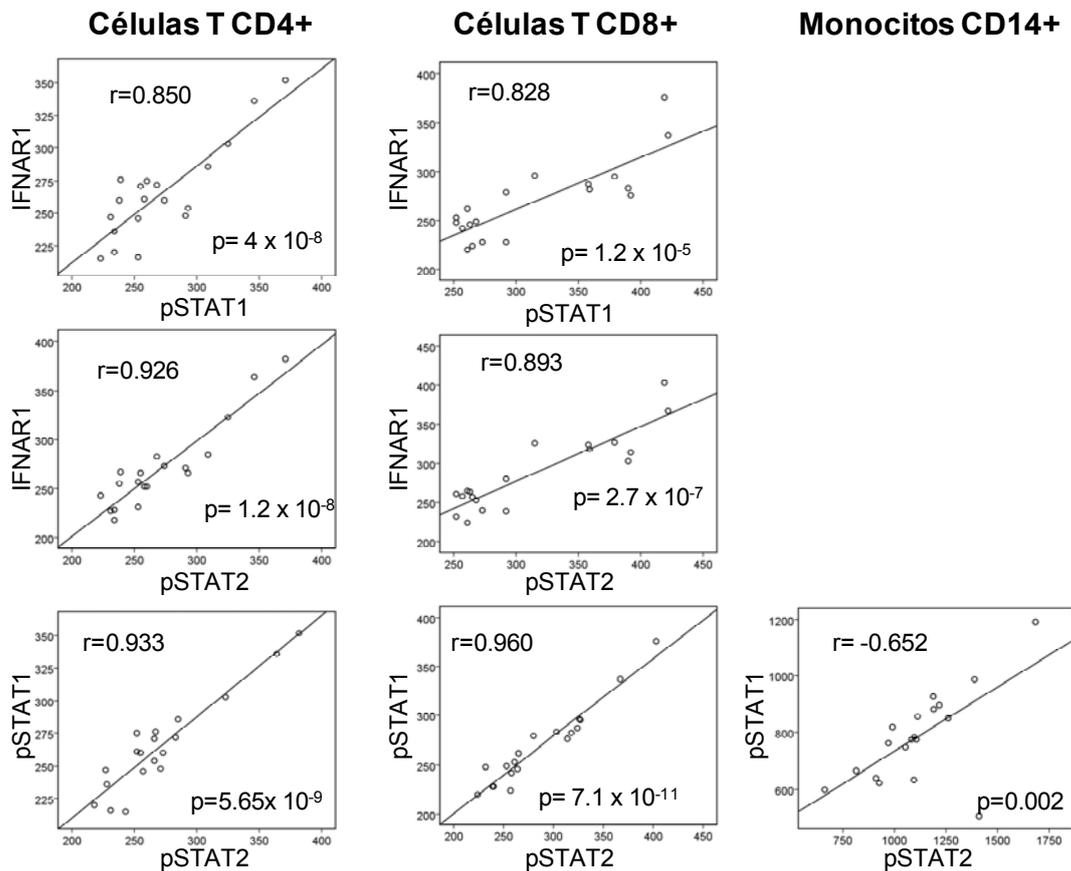


Figura 33. Correlaciones entre las intensidades de fluorescencia media de IFNAR1, IFNAR2, pSTAT1 y pSTAT2 en células no estimuladas (IMFse) de los pacientes respondedores a IFN β .

Pacientes no respondedores a IFN β

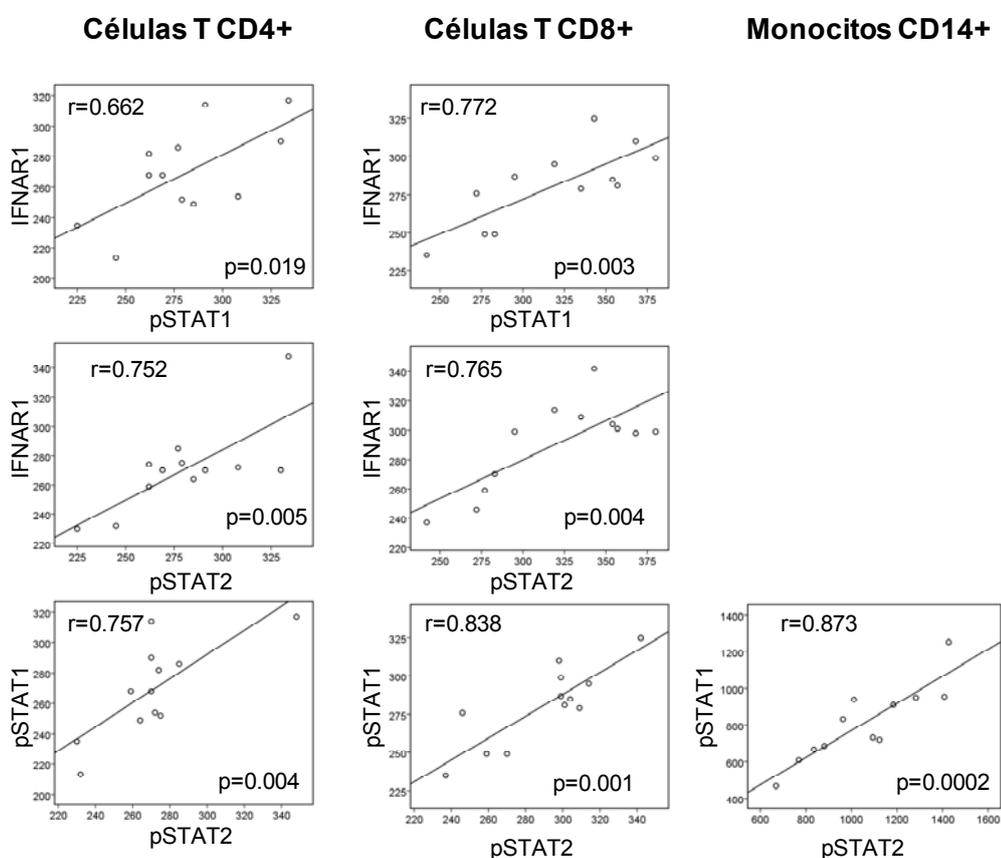


Figura 34. Correlaciones entre las intensidades de fluorescencia media de IFNAR1, IFNAR2, pSTAT1 y pSTAT2 en células no estimuladas (IMFse) de los pacientes no respondedores a IFN β .

Correlaciones	Respuesta terapéutica al IFN β	CD4+		CD8+		CD14+	
		r	p	r	p	r	p
IFNAR1-pSTAT1	R	0.850	4×10^{-8}	0.828	1.2×10^{-5}		
	NR	0.662	0.019	0.772	0.003		
IFNAR1-pSTAT2	R	0.926	1.2×10^{-8}	0.893	2.7×10^{-7}		
	NR	0.752	0.005	0.765	0.004		
pSTAT1-pSTAT2	R	0.933	5.5×10^{-9}	0.960	7.1×10^{-11}	0.652	0.002
	NR	0.757	0.004	0.838	0.001	0.873	0.0002

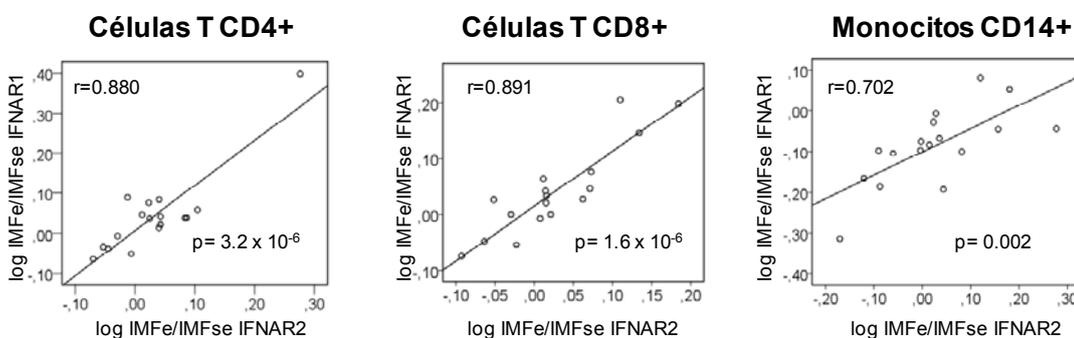
Tabla 13. Correlaciones significativas entre las intensidades de fluorescencia media de IFNAR1, IFNAR2, pSTAT1 y pSTAT2 en células no estimuladas (IMFse). Comparación entre los respondedores y los respondedores subóptimos a la terapia con IFN β .

5.1.4.2 Correlaciones tras la estimulación *in vitro* con IFN β

Tras la activación *in vitro* con IFN β , se analizaron las correlaciones entre los niveles de expresión de cada uno de los marcadores analizados con los niveles de los otros tres marcadores en las tres subpoblaciones de células. Para realizar estas correlaciones, se utilizó el logaritmo del cociente IMF estimulado / IMF sin estimular ($\log \text{IMFe/IMFse}$) como medida del nivel de estimulación para cada proteína. Al analizar las correlaciones, estas se perdieron en gran medida tras la activación con IFN β *in vitro* (comparadas a las correlaciones obtenidas en los niveles basales descritas en la apartado anterior) tanto para el grupo de pacientes sin tratamiento como para el de tratados con IFN β .

En el grupo de controles sanos, sólo los niveles de expresión de IFNAR1 correlacionaron con los de IFNAR2 en los linfocitos T CD4+ tras la activación con IFN β *in vitro*. En los pacientes sin tratar, la expresión de IFNAR1 se correlacionó con la expresión de IFNAR2 en las tres subpoblaciones de células analizadas (monocitos, linfocitos T CD4+ y CD8+). Esta correlación se replicó en los pacientes tratados en las células T, pero se perdió en los monocitos, en los que las únicas correlaciones observadas fueron entre los niveles de IFNAR1 y STAT2, y entre los niveles de IFNAR2 y STAT1 (figura 35).

Pacientes con EM sin tratar



Pacientes con EM tratados

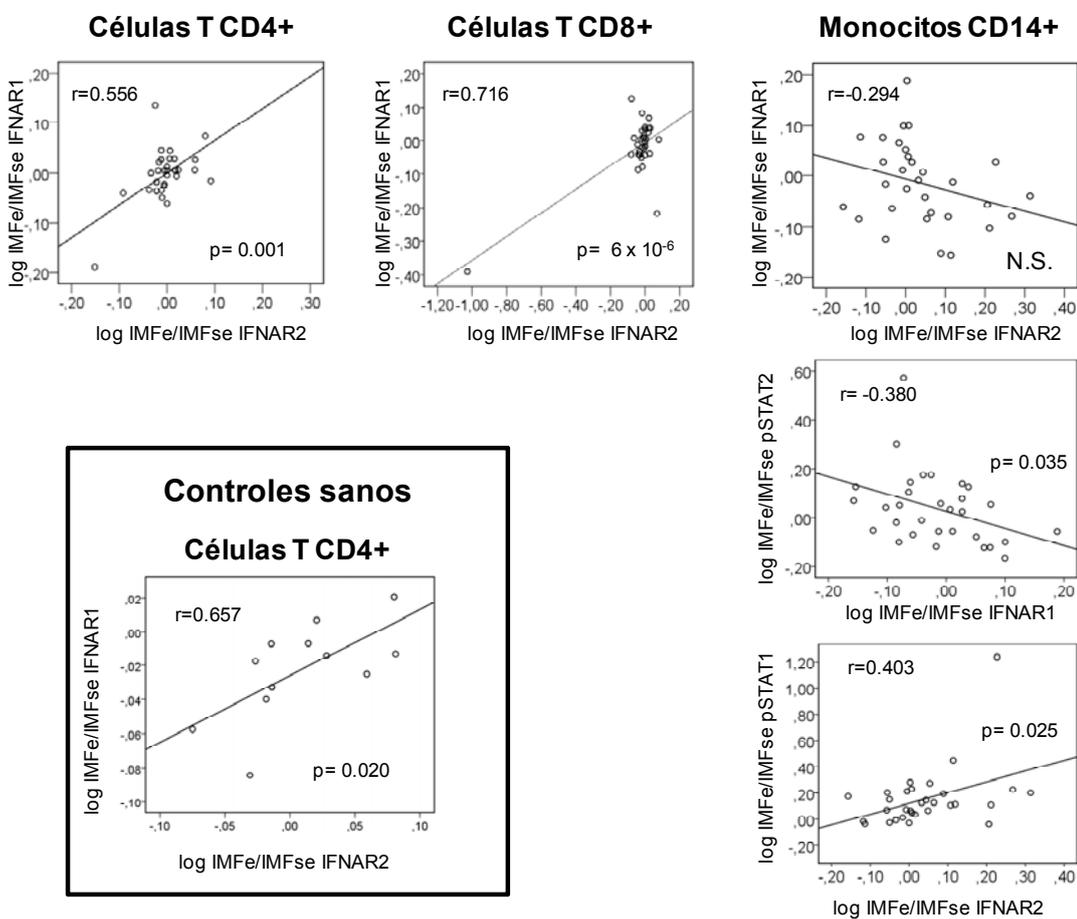


Figura 35. Correlaciones tras las activación in vitro con IFN β de IFNAR1, IFNAR2, pSTAT1 y pSTAT2 en los pacientes de EM sin tratar, tratados con IFN β y controles sanos.

En cuanto a las correlaciones según la respuesta terapéutica, tras analizar *in vitro* la activación con IFN β a corto plazo, observamos también que los cambios en los niveles de IFNAR1 e IFNAR2 se correlacionaban de forma significativa solo en las células T CD4+ ($r = 0.583$; $p = 0.009$) y CD8+ ($r = 0.726$; $p = 0.00043$) de los pacientes respondedores. Esta correlación no se encontró en los monocitos (figura 36).

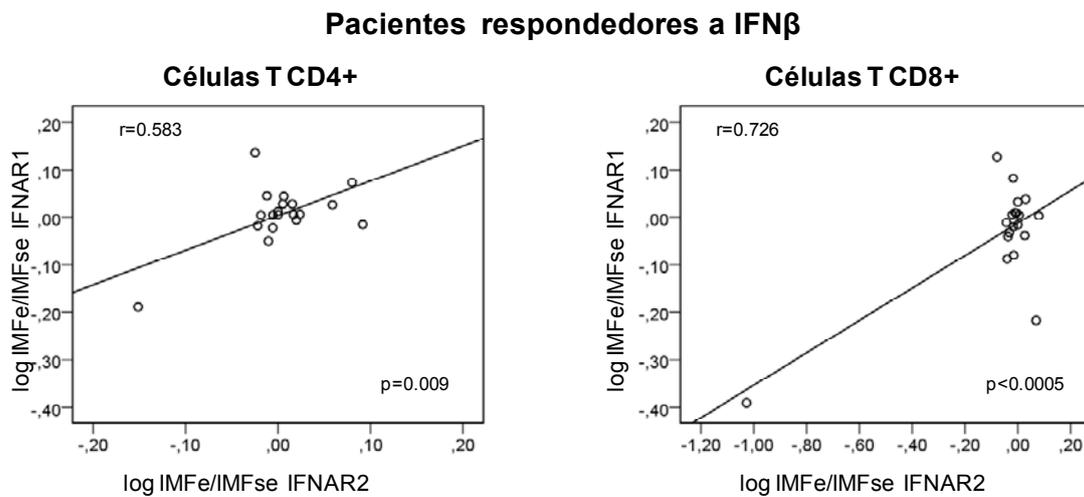


Figura 36. Correlaciones en la activación con IFN β a corto plazo entre el log₂ (IMFe / IMFse) de IFNAR1 y el log₂ (IMFe / IMFse) de IFNAR2 en células T de pacientes respondedores.

5.2 Objetivo II: Interferencia de la presencia de anticuerpos neutralizantes en la activación de la vía de señalización del IFN β

En este objetivo se evaluó la relación entre los títulos de NAbs y la reactividad cruzada frente a distintas preparaciones comerciales de IFN β .

Adicionalmente, se evaluó si los NAbs interferían en la activación de la vía de señalización JAK-STAT, viéndose reflejada esta interferencia en la fosforilación de STAT1 tras la estimulación con IFN β in vitro.

El esquema de trabajo seguido para el desarrollo de este objetivo se resume en la figura 37.

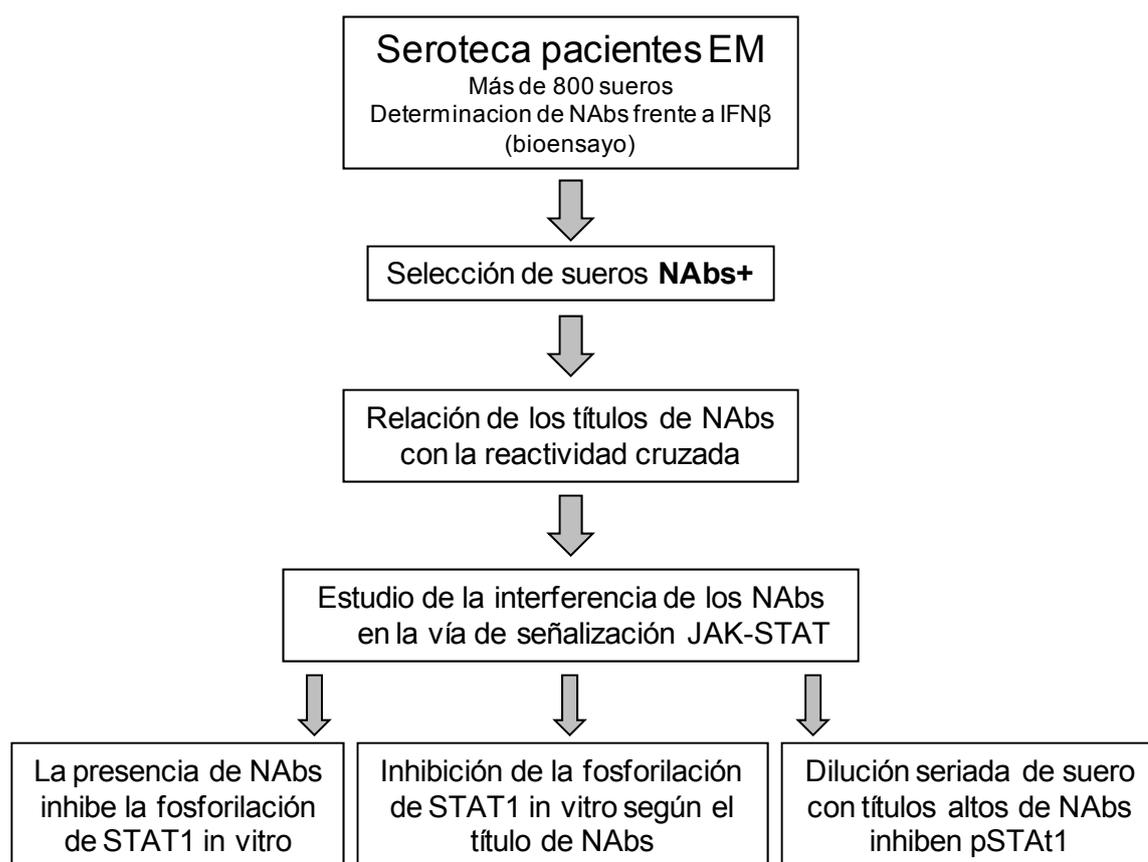


Figura 37. Esquema de trabajo seguido para el estudio de la interferencia de la presencia de anticuerpos neutralizantes en la activación de la vía de señalización del IFN β .

5.2.1 Relación entre los títulos de anticuerpos neutralizantes frente a IFN β y la reactividad cruzada

En la seroteca de pacientes con EM del Laboratorio de investigación de IBIMA se seleccionaron 88 sueros con NAbs positivos. Independientemente de la molécula de IFN β recibida como tratamiento, el bioensayo para la determinación del título de NAbs se realizó frente a tres formulaciones comerciales de IFN β (AvonexTM, RebifTM y BetaferonTM).

Los pacientes fueron clasificados según el título de anticuerpos como: pacientes con títulos bajos (<100 TRU), con títulos intermedios (>100 y <300 TRU) y con títulos altos (>300 TRU). En aquellos pacientes que presentaban títulos de anticuerpos diferentes según la molécula de IFN β , la clasificación se realizó en referencia al título de anticuerpos obtenido frente la molécula recibida como tratamiento.

Se consideró que un paciente presentaba reactividad cruzada cuando los anticuerpos generados reaccionaban al menos frente a dos de las moléculas de interferón beta analizadas. Los títulos de los pacientes incluidos se muestran en la tabla 14.

	Título de NAbs (TRU) frente a:			Nivel NAbs	Reactividad Cruzada
	Avonex	Betaferon	Rebif		
Paciente 1	negativo	27	negativo	Bajos	No
Paciente 2	negativo	25	negativo	Bajos	No
Paciente 3	40	negativo	negativo	Bajos	No
Paciente 4	24	negativo	negativo	Bajos	No
Paciente 5	negativo	22	negativo	Bajos	No
Paciente 6	negativo	27	negativo	Bajos	No
Paciente 7	302	negativo	negativo	Intermedios	No
Paciente 8	22	negativo	negativo	Bajos	No
Paciente 9	negativo	negativo	20	Bajos	No
Paciente 10	negativo	40	negativo	Bajos	No
Paciente 11	negativo	27	negativo	Bajos	No
Paciente 12	negativo	25	negativo	Bajos	No
Paciente 13	40	negativo	negativo	Bajos	No
Paciente 14	27	negativo	negativo	Bajos	No
Paciente 15	23	negativo	negativo	Bajos	No
Paciente 16	40	negativo	negativo	Bajos	No
Paciente 17	negativo	negativo	29	Bajos	No
Paciente 18	negativo	20	negativo	Bajos	No
Paciente 19	negativo	51	negativo	Bajos	No
Paciente 20	640	4822	146	Altos	Si

Título de NAbS (TRU) frente a:					
	Avonex	Betaferon	Rebif	Nivel NAbS	Reactividad Cruzada
Paciente 21	232	243	376	Altos	Si
Paciente 22	negativo	644	211	Altos	Si
Paciente 23	1728	304	1915	Altos	Si
Paciente 24	986	444	1558	Altos	Si
Paciente 25	262	609	1067	Altos	Si
Paciente 26	101	negativo	640	Altos	Si
Paciente 27	422	175	325	Altos	Si
Paciente 28	803	175	1266	Altos	Si
Paciente 29	20	24	67	Bajos	Si
Paciente 30	659	82	215	Altos	Si
Paciente 31	30	25	63	Bajos	Si
Paciente 32	640	640	640	Altos	Si
Paciente 33	17263	12996	47787	Altos	Si
Paciente 34	34	62	55	Bajos	Si
Paciente 35	835	negativo	220	Altos	Si
Paciente 36	23	negativo	23	Bajos	Si
Paciente 37	1223	1455	3875	Altos	Si
Paciente 38	243	336	62	Altos	Si
Paciente 39	640	4822	146	Altos	Si
Paciente 40	8960	791	1123	Altos	Si
Paciente 41	5200	5200	5200	Altos	Si
Paciente 42	232	243	376	Altos	Si
Paciente 43	158	385	64	Altos	Si
Paciente 44	negativo	644	211	Altos	Si
Paciente 45	1728	304	1915	Altos	Si
Paciente 46	986	444	1558	Altos	Si
Paciente 47	6618	958	6618	Altos	Si
Paciente 48	5200	5200	5200	Altos	Si
Paciente 49	262	609	1067	Altos	Si
Paciente 50	17	40	30	Bajos	Si
Paciente 51	101	negativo	640	Altos	Si
Paciente 52	360	360	360	Altos	Si
Paciente 53	722	263	783	Altos	Si
Paciente 54	100	71	121	Intermedios	Si
Paciente 55	570	236	147	Altos	Si
Paciente 56	121	41	negativo	Intermedios	Si
Paciente 57	59	147	negativo	Intermedios	Si
Paciente 58	422	175	325	Altos	Si
Paciente 59	803	175	1266	Altos	Si
Paciente 60	20	24	67	Bajos	Si
Paciente 61	640	640	640	Altos	Si
Paciente 62	22	53	negativo	Bajos	Si
Paciente 63	640	640	640	Altos	Si
Paciente 64	320	320	320	Altos	Si
Paciente 65	320	320	91	Altos	Si
Paciente 66	158	44	75	Intermedios	Si
Paciente 67	640	347	428	Altos	Si

Título de NAbs (TRU) frente a:					
	Avonex	Betaferon	Rebif	Nivel NAbs	Reactividad Cruzada
Paciente 68	640	184	378	Altos	Si
Paciente 69	52	280	320	Altos	Si
Paciente 70	478	280	232	Altos	Si
Paciente 71	1192	889	2151	Altos	Si
Paciente 72	negativo	24	37	Bajos	Si
Paciente 73	80	32	56	Bajos	Si
Paciente 74	4379	1097	1843	Altos	Si
Paciente 75	187	negativo	34	Intermedios	Si
Paciente 76	960	negativo	76	Altos	Si
Paciente 77	104	31	77	Intermedios	Si
Paciente 78	1536	753	1484	Altos	Si
Paciente 79	22	24	43	Bajos	Si
Paciente 80	241	63	257	Intermedios	Si
Paciente 81	476	235	557	Altos	Si
Paciente 82	5120	5120	5120	Altos	Si
Paciente 83	232	25	80	Intermedios	Si
Paciente 84	25	17	78	Bajos	Si
Paciente 85	27	21	93	Bajos	Si
Paciente 86	5120	299	5120	Altos	Si
Paciente 87	43	52	28	Bajos	Si
Paciente 88	5120	5120	5120	Altos	Si

Tabla 14. Títulos de NAbs de los pacientes. Se indican los títulos (en TRU) de NAbs frente a Avonex, Betaferon y Rebif. Al lado se indica la clasificación del paciente según su título de NAbs como bajo, intermedio y alto. La presencia de reactividad cruzada viene indicada como sí o no.

En relación al título de anticuerpos, se observó que el 35.23% de los pacientes tenían títulos bajos, el 10.23 % tenían títulos intermedios y el 54.54% tenían títulos altos, como queda reflejado en la figura 38.

Posteriormente se calculó el porcentaje de pacientes que presentaron reactividad cruzada frente al menos dos de las moléculas de interferón analizadas según el título de anticuerpos. Así, se obtuvo que el 41.9% de pacientes con títulos bajos presentaron reactividad cruzada, el 88.8% en el grupo de pacientes con títulos intermedios y el 100% de los pacientes con títulos altos de NAbs

El análisis estadístico mediante chi cuadrado mostró que existe una relación los títulos de anticuerpos y la reactividad cruzada ($p < 0.0001$), de forma que aquellos pacientes con títulos altos presentan más reactividad cruzada que aquellos con títulos bajos.

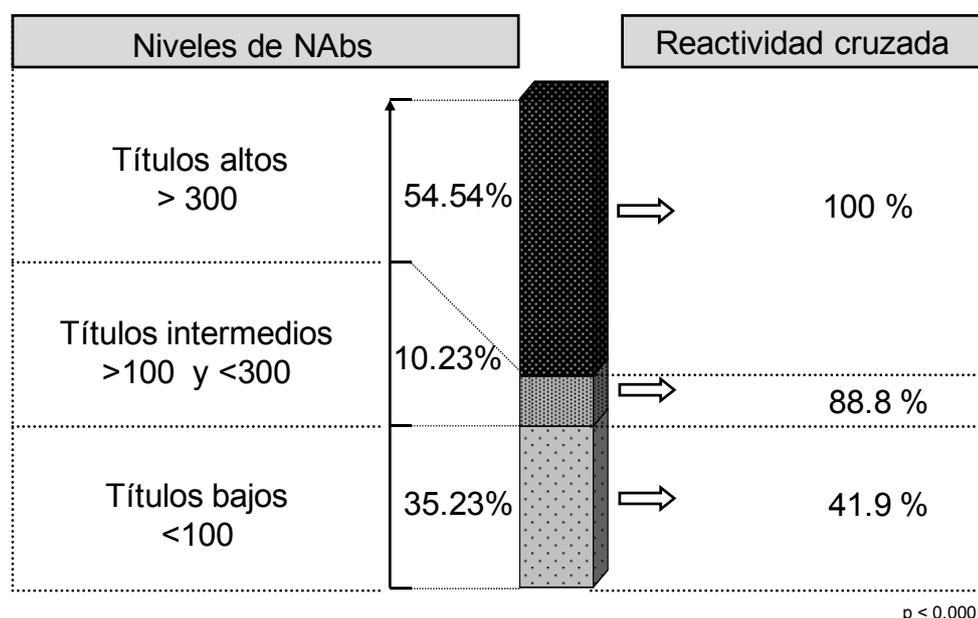


Figura 38. Porcentaje de pacientes que han presentado reactividad cruzada en función del título de NAbs

Posteriormente se realizó un análisis de regresión logística para calcular el riesgo de tener reactividad cruzada según el título de anticuerpos.

Se realizó un modelo donde se incluyeron los pacientes con títulos bajos y medios de anticuerpos, no pudiéndose incluir los títulos altos puesto que todos ellos presentan reactividad cruzada. Por esta razón, construimos un segundo modelo combinando los títulos medio-altos para evaluar el riesgo a tener reactividad cruzada en relación a los títulos bajos.

En el modelo 1 se observa que los pacientes con títulos medios de anticuerpos tienen un riesgo significativo de 11,08 veces a presentar reactividad cruzada respecto a los pacientes con títulos bajos (tabla 15).

En el modelo 2 se observa que los pacientes con títulos medios-altos tienen un riesgo significativo de 77,54 veces a presentar reactividad cruzada respecto a los pacientes con títulos bajos (tabla 15).

Modelo 1	OR	IC95%	p
Títulos medios vs títulos bajos de NAbs	11,08	1,20-99,75	0.032
Modelo 2	OR	IC95%	p
Títulos medios-altos vs títulos bajos de NAbs	77,54	9,47-634,54	4,98x10 ⁻⁵

Tabla 15. Análisis de regresión logística del riesgo de tener reactividad cruzada según el título de anticuerpos.

Por último, en el análisis de curvas COR (del inglés *Receiver Operating Characteristic*) de la probabilidad pronosticada del modelo 2, se obtuvo un área bajo la curva de 0,879 (IC: 0,79-9,61), $p= 4,52 \times 10^{-7}$. De esta forma, se obtiene que el poder de discriminación máximo del modelo 2 es del 87% (un 87% del máximo posible) (Figura 39).

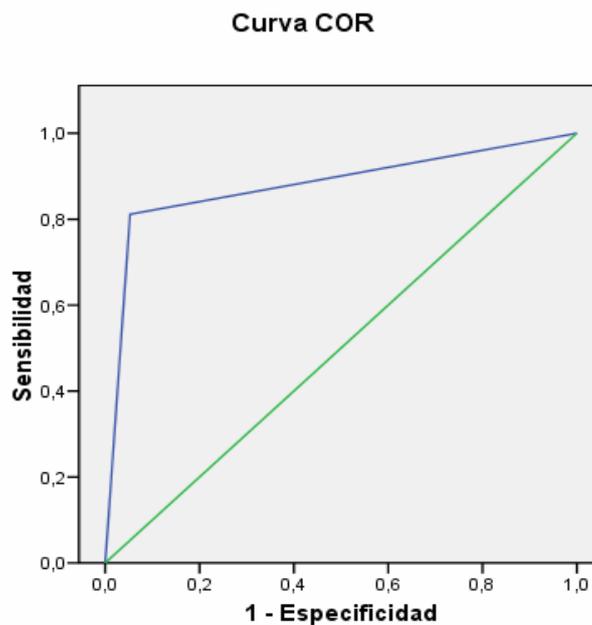


Figura 39. Curva COR de la probabilidad pronosticada del modelo 2.

5.2.2 Interferencia de la presencia de anticuerpos neutralizantes en la activación de la vía de señalización del IFN β

Para valorar si los anticuerpos neutralizantes que desarrollan los pacientes con EM interferían en la vía de señalización JAK-STAT, se evaluó si la presencia de éstos inhibían específicamente la fosforilación de STAT1 tras la estimulación *in vitro* con IFN β .

5.2.2.1 La presencia de NAbs inhibe la fosforilación de STAT1 *in vitro*.

En primer lugar se seleccionaron 8 pacientes con reactividad cruzada y títulos altos de NAbs (> de 300 TRU) de los que se disponían muestras de PBMC, de forma que la determinación de NAbs en suero y el estudio de activación de la vía en PBMC se realizó en muestras procedentes de la misma extracción sanguínea.

Como se ha indicado en el apartado de material y métodos, las células se estimularon *in vitro* con las tres formulaciones de IFN β disponibles (AvonexTM, RebifTM y BetaferonTM), incluyéndose tres condiciones de cultivo:

- Estimulado con IFN β , sin suero.
- Estimulado con IFN β y con el suero autólogo del paciente NAbs positivo.
- Estimulado con IFN β y con un pool heterólogo de sueros NAbs negativos.

La expresión de pSTAT1 se determinó en las subpoblaciones de células T (CD4+ y CD8+) y en monocitos mediante citometría de flujo, obteniéndose los datos como IMF y porcentaje de células pSTAT1 positivas.

En experimentos previos se comprobó que la presencia de un suero heterólogo negativo no inhibía la fosforilación de STAT1 y un suero heterólogo positivo era capaz de inhibir la fosforilación de STAT1 de la misma forma que un suero autólogo, como se demuestra a continuación.

En la figura 40 se representan los valores de IMF y porcentaje de pSTAT1 en las diferentes condiciones de cultivo. Los niveles de expresión de pSTAT1 en presencia de suero NAbs positivo y NAbs negativo se compararon respecto al nivel de expresión de pSTAT1 alcanzado tras la estimulación con IFN β en medio sin suero.

Al realizar un análisis de muestras relacionadas para comparar las células estimuladas solo con IFN β respecto a las células estimuladas en presencia de suero NAbs positivo, se observó que tanto la IMF como el porcentaje de células positivas para pSTAT1 disminuía en presencia de suero autólogo NAbs positivo. Estas diferencias fueron estadísticamente significativas (* $p=0.0011$ y ** $p=0.035$) en las tres subpoblaciones analizadas y con las tres moléculas de IFN β utilizadas (Avonex, Betaferon y Rebif). Sin embargo, no se observó disminución en los niveles de expresión de pSTAT1 en presencia del pool de sueros NAbs negativos, tal y como puede observarse en la figura 40.

Anteriormente, con la realización de bioensayos demostramos la presencia de NAbs en el suero y que estos muestran reactividad cruzada. Con este experimento *in vitro*, demostramos además, que los anticuerpos generados frente a una molécula son capaces de inhibir la señalización inducida con una molécula de IFN β diferente.

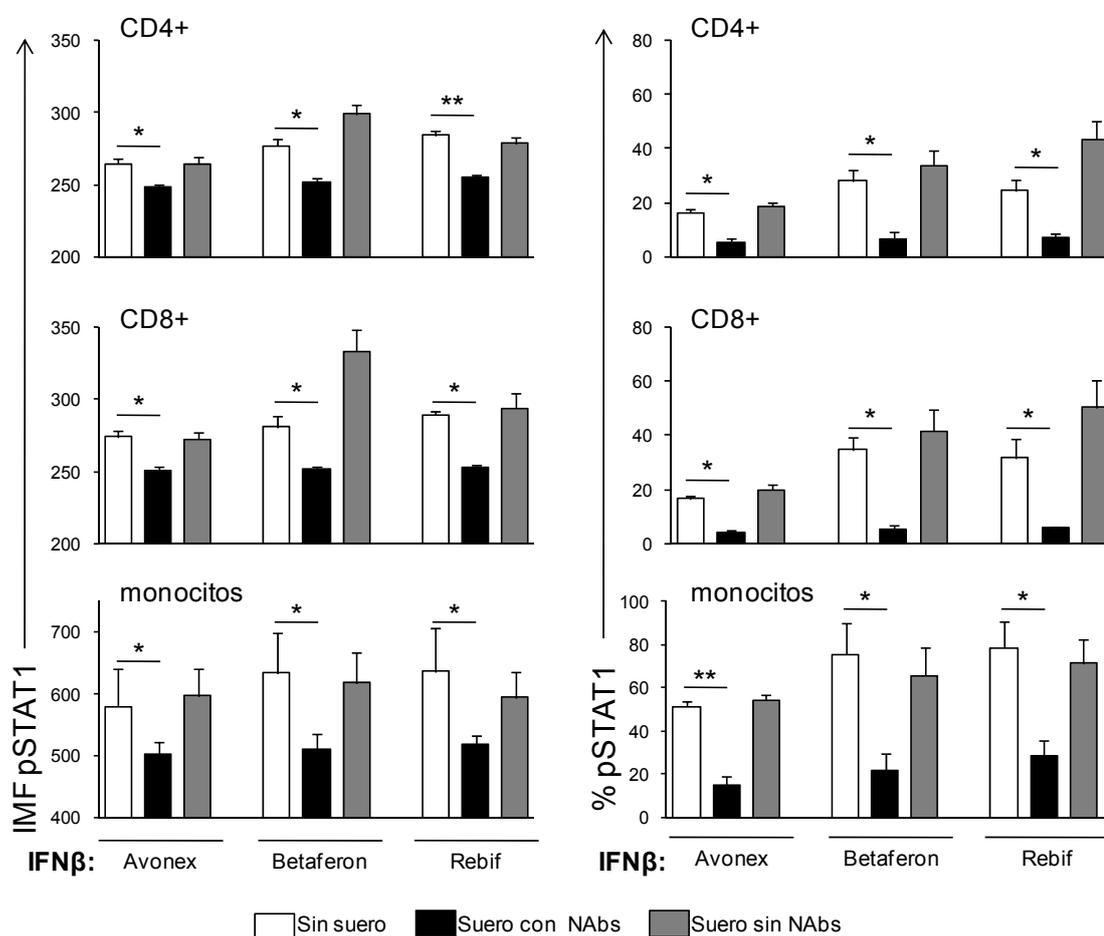


Figura 40. Niveles de expresión de pSTAT1 representados como IMF y porcentaje de células medidas por citometría de flujo. La expresión de pSTAT1 se cuantificó en monocitos, linfocitos T CD4+ y CD8+ en pacientes con títulos altos de NAbs. Las células se estimularon con 1000UI/mL de IFN β (Avonex, Betaferon o Rebif) sin presencia de suero, en presencia del suero propio del paciente (suero autólogo NAbs positivo) y en presencia de un pool de sueros sin NAbs (suero heterólogo NAbs negativo) (* p=0.0011; ** p=0.035).

5.2.2.2 Inhibición de la fosforilación de STAT1 *in vitro* según el título de NAbs

Para evaluar la inhibición de la fosforilación de STAT1 según el título de NAbs, se realizó una mezcla de sueros con títulos altos de NAbs de diferentes pacientes. A este pool de sueros se le realizó un bioensayo, determinando un título de 4586 TRU frente a Avonex.

Posteriormente, se estimularon PBMC de cuatro pacientes con EM con tres concentraciones diferentes de IFN β : 200 UI/mL, 1000 UI/mL y 5000 UI/mL, y sin suero, siendo esta la condición de referencia. Además, las células se estimularon con las mismas concentraciones de IFN β en presencia de diluciones crecientes del pool de sueros con NAbs positivos (1/2, 1/20 y 1/200). De esta forma, se analizaron los niveles de pSTAT1 en presencia de títulos altos (2293 TRU), medios (230 TRU) y bajos (23TRU) de anticuerpos. Mediante citometría de flujo se determinó la expresión de la proteína fosforilada pSTAT1 en las subpoblaciones de células T (CD4+ y CD8+) y en monocitos, como se detalla en el apartado 4.1.3. El experimento se realizó de forma independiente para cada paciente, en cuatro días diferentes.

Para cada uno de los pacientes se representaron los datos de IMF y porcentaje de células positivas para pSTAT1 de cada subpoblación y en cada una de las condiciones de estimulación (figuras 41, 42, 43 y 44).

Como puede observarse en las representaciones gráficas, los monocitos son la subpoblación donde los NAbs consiguen una inhibición mayor que en los linfocitos T CD4+ y CD8+. Además, esta inhibición en los monocitos es proporcional a los niveles de NAbs y se observa cuando las células se estimulan con 200 UI/, 1000 UI/mL y 5000 UI/mL.

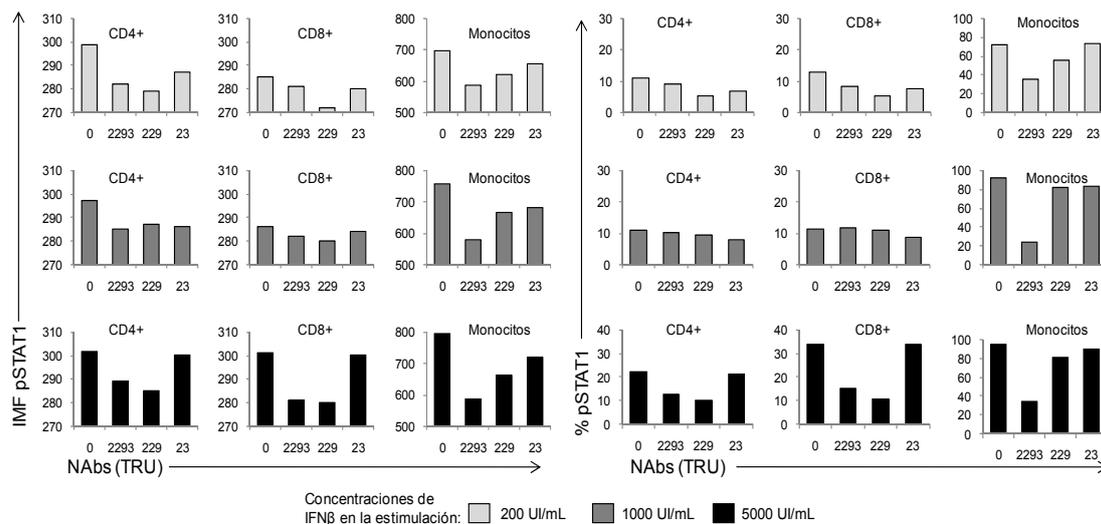


Figura 41. Paciente 1: Niveles de IMF y porcentaje de pSTAT1 en monocitos, linfocitos T CD4+ y CD8 de un paciente con EM. Las células se estimularon con 200UI/mL, 1000UI/mL o 5000UI/mL de IFN β (Avonex) sin suero y con 3 concentraciones decrecientes de un pool de sueros con títulos altos de NAbs.

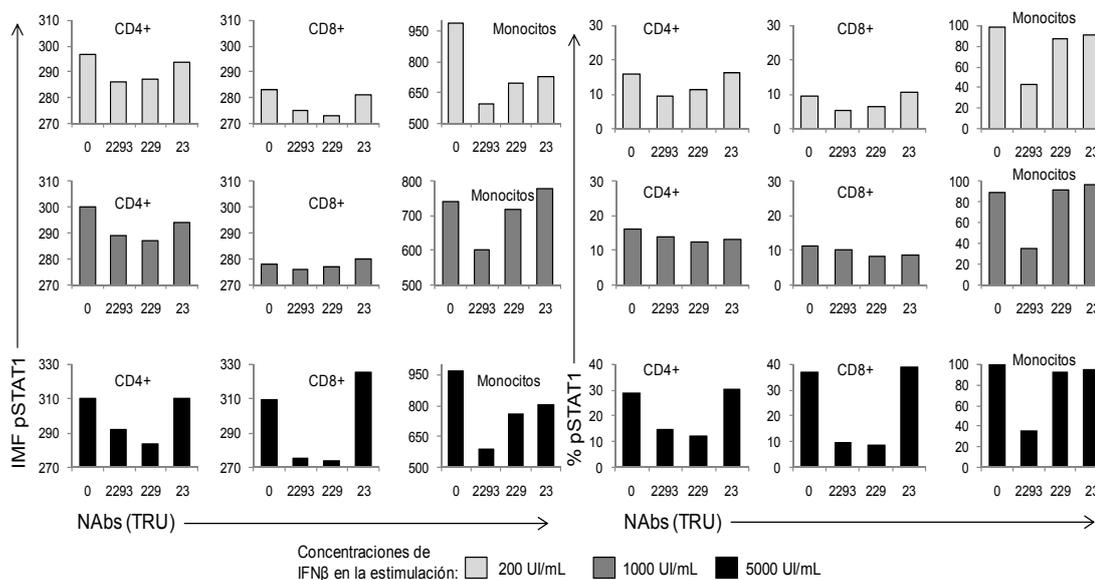


Figura 42. Paciente 2: Niveles de IMF y porcentaje de pSTAT1 en monocitos, linfocitos T CD4+ y CD8 de un paciente con EM. Las células se estimularon con 200UI/mL, 1000UI/mL o 5000UI/mL de IFNβ (Avonex) sin suero y con 3 concentraciones decrecientes de un pool de sueros con títulos altos de NAbs.

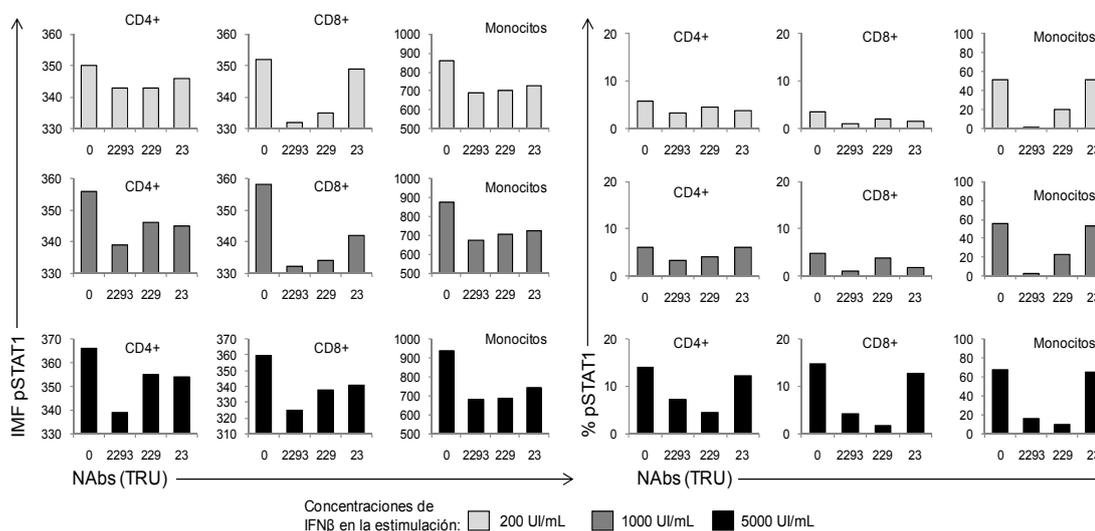


Figura 43. Paciente 3: Niveles de IMF y porcentaje de pSTAT1 en monocitos, linfocitos T CD4+ y CD8 de un paciente con EM. Las células se estimularon con 200UI/mL, 1000UI/mL o 5000UI/mL de IFNβ (Avonex) sin suero y con 3 concentraciones decrecientes de un pool de sueros con títulos altos de NAbs.

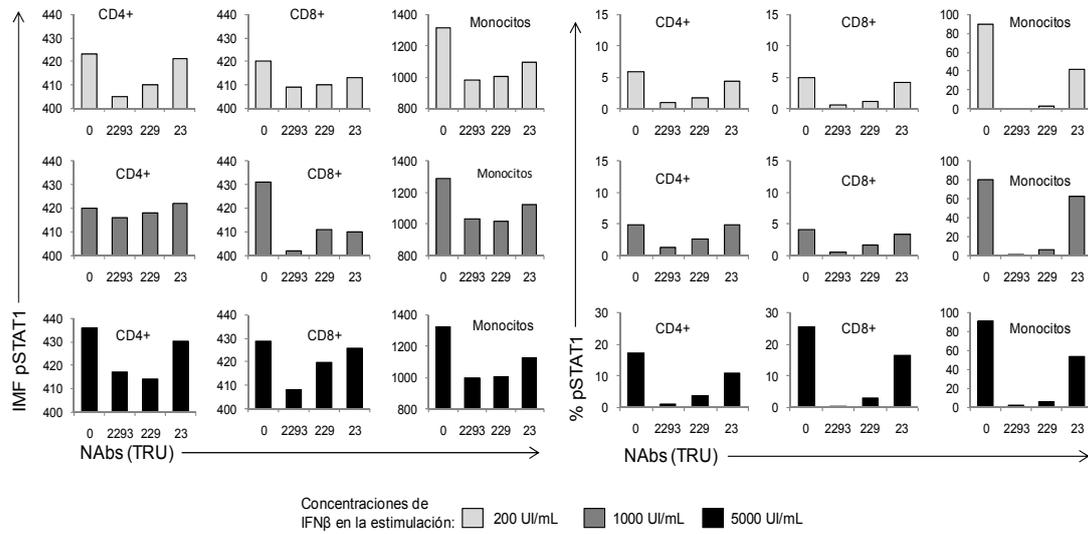


Figura 44. Paciente 4: Niveles de IMF y porcentaje de pSTAT1 en monocitos, linfocitos T CD4+ y CD8 de un paciente con EM. Las células se estimularon con 200UI/mL, 1000UI/mL o 5000UI/mL de IFN β (Avonex) sin suero y con 3 concentraciones decrecientes de un pool de sueros con títulos altos de NAb.

Al analizar los datos de activación de STAT1 de los cuatro pacientes en conjunto como muestras relacionadas, no se encontraron diferencias significativas en la activación de pSTAT1 en presencia de anticuerpos respecto a la activación en ausencia de NAb debido al escaso tamaño muestral. Sin embargo, se observa una tendencia cercana a la significación, al disminuir tanto la IFM ($p=0.068$) como el porcentaje de pSTAT1 ($p=0.068$) en presencia de títulos altos y medios de NAb en las tres subpoblaciones y en las tres concentraciones de IFN β . Los datos de IMF y porcentaje de células positivas para pSTAT1 de los cuatro pacientes en conjunto se muestran en la figura 45.

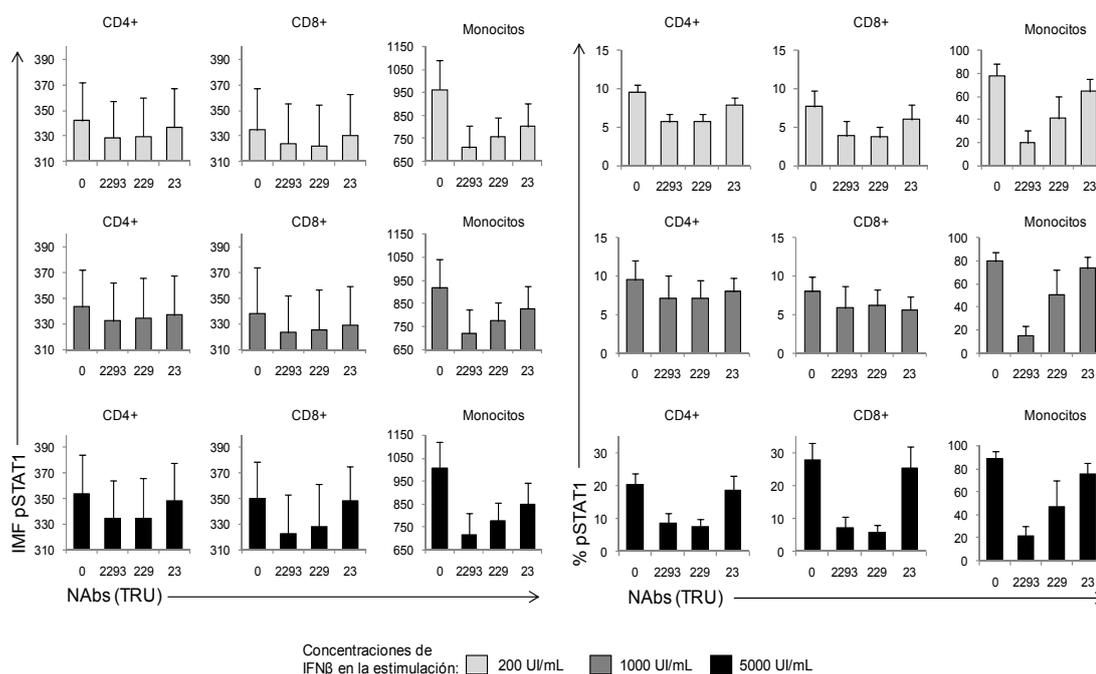


Figura 45. Niveles de IMF y porcentaje de pSTAT1 en monocitos, linfocitos T CD4+ y CD8 cuatro pacientes con EM. Las células se estimularon con 200UI/mL, 1000UI/mL o 5000UI/mL de IFN β (Avonex) sin suero y con 3 concentraciones decrecientes de un pool de sueros con títulos altos de NAbs.) (Media y desviación típica).

Como se ha comentado anteriormente, los monocitos son la subpoblación donde se observa de forma más clara la inhibición de pSTAT1 en presencia de NAbs, siendo esta inhibición proporcional a los niveles de NAbs en las diferentes concentraciones de IFN β probadas.

Por ello, calculamos el porcentaje de inhibición observado en monocitos tanto de la IMF como del porcentaje de pSTAT1, considerando el 100% de activación el valor de pSTAT1 obtenido en ausencia de NAbs.

Se puede observar como el porcentaje de inhibición de pSTAT1 es directamente proporcional al título de anticuerpos, de forma que títulos altos consiguen una mayor inhibición de la activación de pSTAT1. El análisis de muestras independientes mostró diferencias significativas entre el porcentaje de inhibición obtenido con títulos altos de anticuerpos respecto al porcentaje de inhibición obtenido con títulos bajos ($p=0.029$ a 1000 y 5000 UI/mL de IFN β), analizado como IMF y como porcentaje de células positivas para pSTAT1. Ver figura 46.

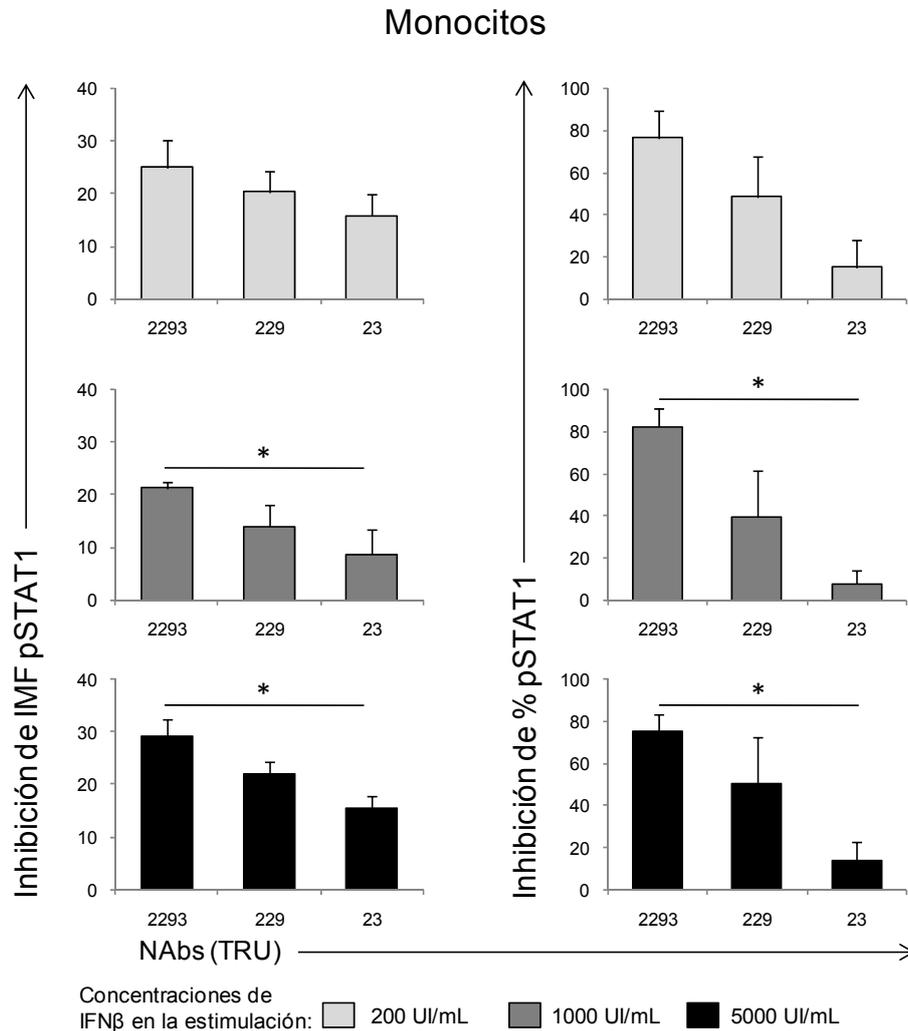


Figura 46. Porcentaje de inhibición de pSTAT1 en monocitos de 4 pacientes, obtenido como IMF y porcentaje de pSTAT1, según el título de NAbs (TRU).

5.2.2.3 La activación de pSTAT1 es inversamente proporcional al título de anticuerpos.

Los experimentos anteriores muestran que la activación de pSTAT1 tras la estimulación con IFN β , sobre todo en monocitos, es inversamente proporcional a título de NAbs. Por ello se realizó un experimento similar incluyendo más diluciones de suero con NAbs positivos e incluyendo como control un suero sin NAbs.

PBMC de un paciente con EM se estimularon con IFN β (Avonex) a una concentración de 5000ul/mL. La estimulación se realizó en presencia de un pool de sueros positivos con un título de 4586 TRU frente a Avonex y en diluciones seriadas:

1, 1/2, 1/4, 1/8, 1/16, 1/32 1/64. Como control, se realizaron las mismas diluciones de un suero sin NAbs.

Por citometría de flujo se determinó la expresión de pSTAT1 en las células T (CD4+ y CD8+) y en monocitos, de la misma forma que en el apartado 4.1.3. Los datos de porcentaje de células positivas para pSTAT1 se muestran en la figura 47.

Cuando las células se estimularon con IFN β en presencia de suero sin NAbs, se puede observar como las diluciones menores de suero aumentan la fosforilación de STAT1 (respecto a la condición sin suero) debido a las citoquinas y factores de crecimiento presentes en dicho suero. A medida que se va diluyendo el suero, y por tanto la concentración de citoquinas y factores de crecimiento, va disminuyendo la activación de STAT1. Sin embargo, la estimulación con IFN β en presencia de suero con NAbs disminuye la activación de STAT1, observándose menor activación en las diluciones menores de suero donde hay títulos de anticuerpos más altos (figura 47).

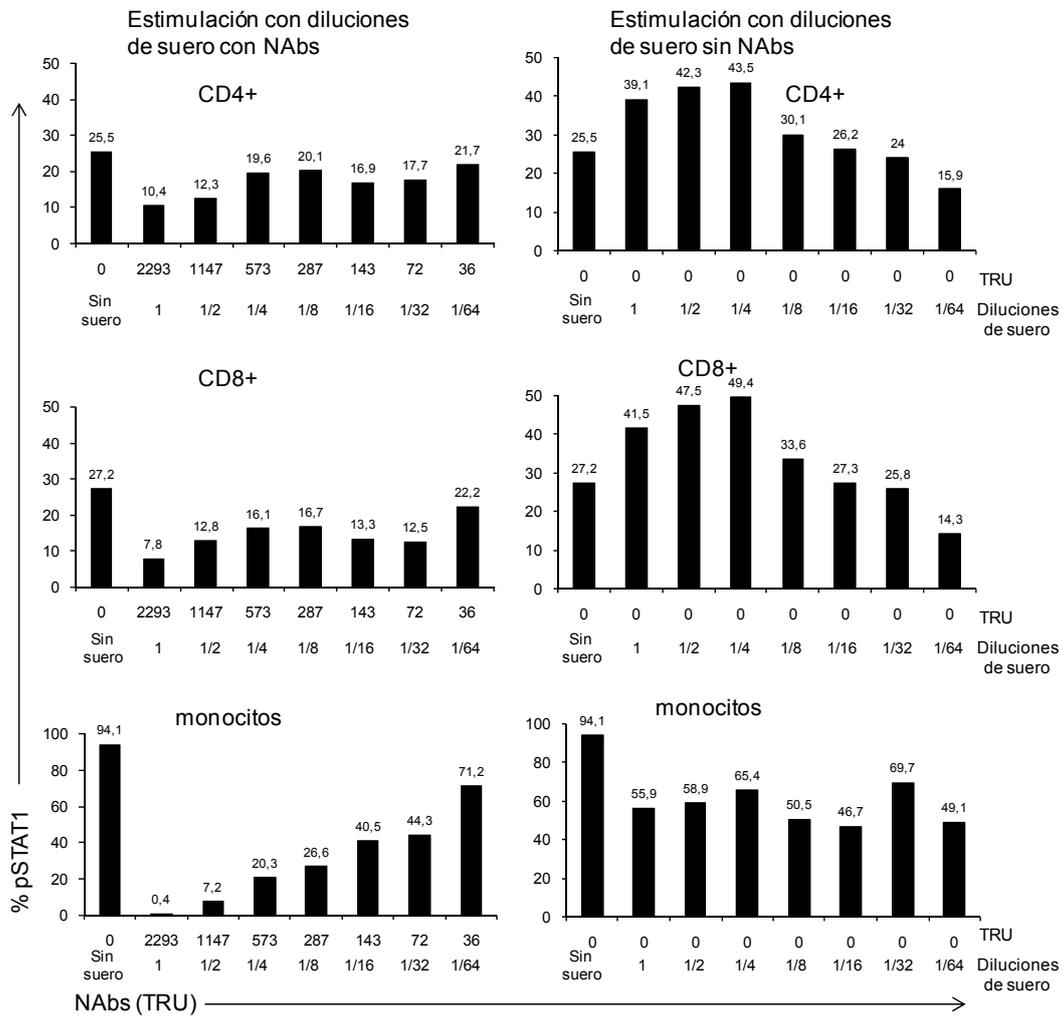


Figura 47. Porcentaje de pSTAT1 en monocitos, linfocitos T CD4+ y CD8+ en presencia de diferentes diluciones de suero con y sin NAb. Las células se estimularon con 5000UI/mL de IFN β (Avonex) sin suero y con varias diluciones de un pool de sueros con títulos altos de NAb y con varias diluciones de un pool de sueros sin NAb.

El análisis de correlación (Rho de Spearman) mostró que existe una correlación negativa significativa entre el porcentaje de células positivas para pSTAT1 y el título de NAb, no solo en monocitos ($p=0.01$), sino también en CD4+ ($p=0.015$) y mostrando una tendencia a la significación en CD8+ ($p=0.058$) (Figura 48).

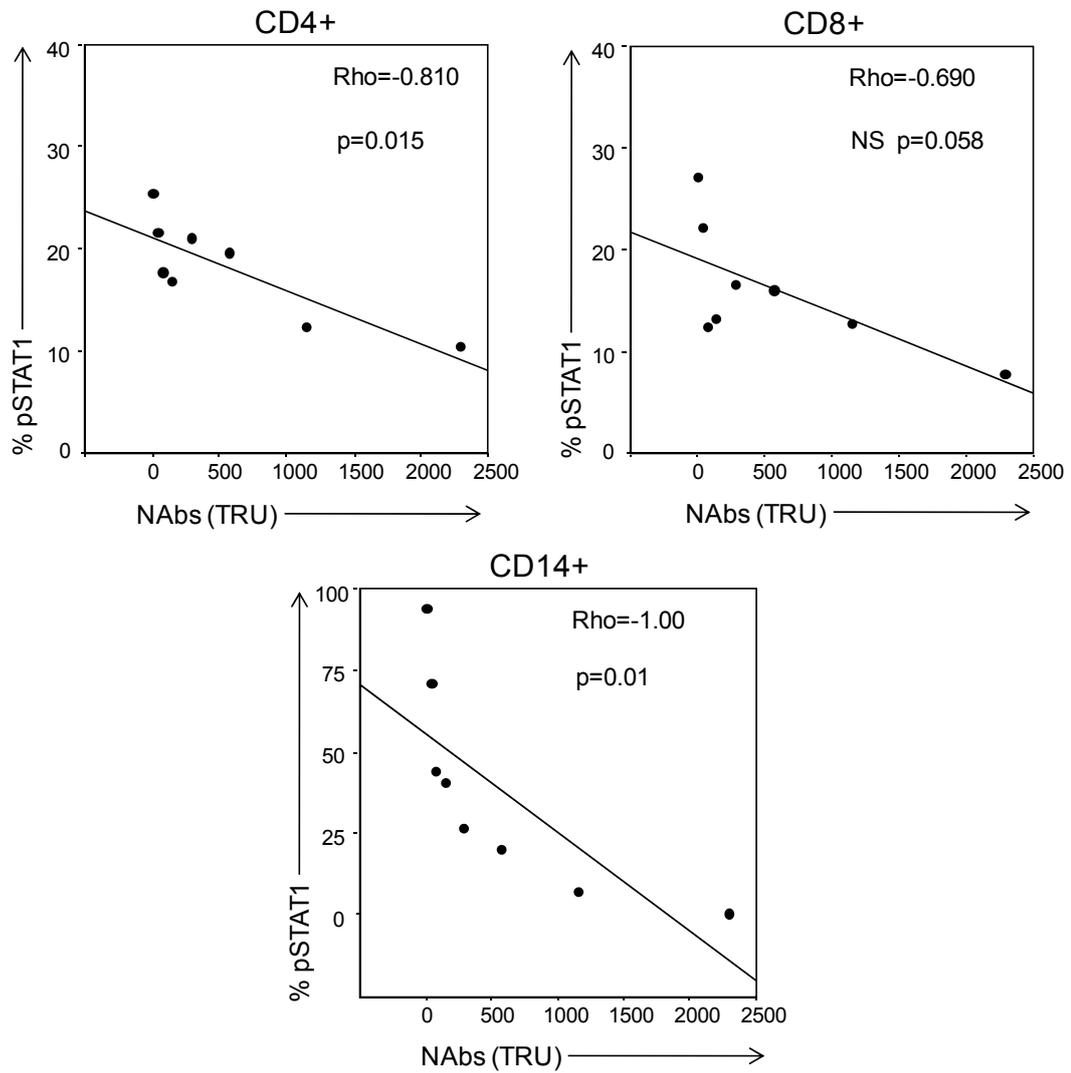


Figura 48. Representaciones gráficas del análisis de correlación (Rho de Spearman) entre el porcentaje de células positivas para pSTAT1 y el título de NAb para las subpoblaciones de células T CD4+, CD8+ y monocitos.

Perfiles de expresión génica y perfiles de activación de la vía JAK-STAT asociados a la respuesta al tratamiento con IFN β en pacientes con esclerosis múltiple

5.3 Objetivo III: Análisis del transcriptoma de pacientes con EM en las primeras 24 horas tras la administración de IFN beta. Análisis en función de la respuesta al tratamiento.

5.3.1 Población de estudio

Los 9 pacientes con EM incluidos en el estudio se clasificaron según su respuesta al IFN β como respondedores y no respondedores, tal y como se describe en el epígrafe 4.1.1. de Material y Métodos. Sus características clínicas y demográficas se muestran a continuación en la Tabla 16.

	Respondedores (n=4)	No respondedores (n=5)	Valor p
Cociente mujer/varón	3/1	2/3	
Edad de inicio de la EM (años)	31.50 (24.00-36.75)	22.00 (18.00-34.00)	0.142
Edad al diagnóstico (años)	34.50 (24.25-43.25)	38.00 (22.50-44.00)	0.710
Nº de brotes en el momento del diagnóstico	2.00 (1.25-3.50)	3.00 (2.50-3.50)	0.250
Puntuación EDSS en el momento del diagnóstico	1.25 (1.00-2.25)	2.00 (1.25-2.75)	0.370
Puntuación MSSS en el momento del diagnóstico	3.28 (1.57-4.25)	3.17 (1.29-6.14)	0.900
Tiempo desde el diagnóstico al inicio del tratamiento (meses)	80.00 (20-0-203.0)	120.00 (18.00-294.50)	0.620
Edad al inicio del tratamiento (años)	42.50 (27.50-46.25)	43.00 (23.00-50.00)	0.800
Tratamientos previos al IFN no/sí	3/1	4/1	1.00
Nº de brotes en el año previo al inicio del tratamiento con IFN β	3.50 (1.25-5.00)	4.00 (3.50-5.50)	0.45
EDSS al inicio del tratamiento con IFN β	1.75 (0.37-2.37)	2.00 (1.25-2.75)	0.70
MSSS al inicio del tratamiento con IFN β	2.37 (0.42-4.17)	2.34 (0.57-6.14)	0.71
Tasa anual de brotes (ARR) en los dos años anteriores al inicio del tratamiento con IFN β	0.50 (0.50-0.87)	1.00 (0.25-1.75)	0.44
Actividad por RMN antes del inicio del tratamiento con IFN β (sí/no)	3/4	3/5	0.48

	Respondedores (n=4)	No respondedores (n=5)	Valor p
Duración del tratamiento con IFN β (meses)	25.00 (22.75-29.50)	25.00 (17.50-29.00)	0.80
Edad en el momento de la toma de muestras (años)	45.00 (29.75-49.00)	45.00 (24.50-52.00)	0.90
EDSS en el momento de la extracción	1.75 (0.37-2.37)	2.00 (1.75-4.50)	0.26
MSSS en el momento de la extracción	2.00 (0.38-3.54)	3.25 (0.74-6.95)	0.46
ARR durante el tratamiento con IFN β	0.00 (0.00-0.00)	0.75 (0.42-2.18)	0.016
Actividad por RMN durante el tratamiento con IFN β (sí/no)	0/4	1/5	0.343
Progresión de la enfermedad durante el tratamiento con IFN β (sí/no)	0/4	5/5	0.048

Tabla 16. Características clínicas y demográficas de los pacientes con EM incluidos en el estudio.

5.3.2 Microarray. Controles de calidad, normalización y estadística de los datos.

Este epígrafe se detalla íntegramente en Anexos, en el apartado 8.1.

5.3.3 Análisis no supervisado. Análisis de componentes principales

La primera aproximación a los datos generados en el array de expresión génica a nivel basal y en las primeras 24 horas tras la administración del IFN β , fue un análisis no supervisado, mediante la discriminación ciega por análisis de componentes principales (en español, ACP; en inglés, PCA) para reducir la dimensionalidad de un conjunto de datos. Este tipo de análisis determina cómo se agrupan las muestras entre sí, además de poder identificar de manera visual cualquier posible outlier.

En la figura 49 se observa una separación relativa de ambos grupos de pacientes: R (respondedores) y NR (no respondedores).

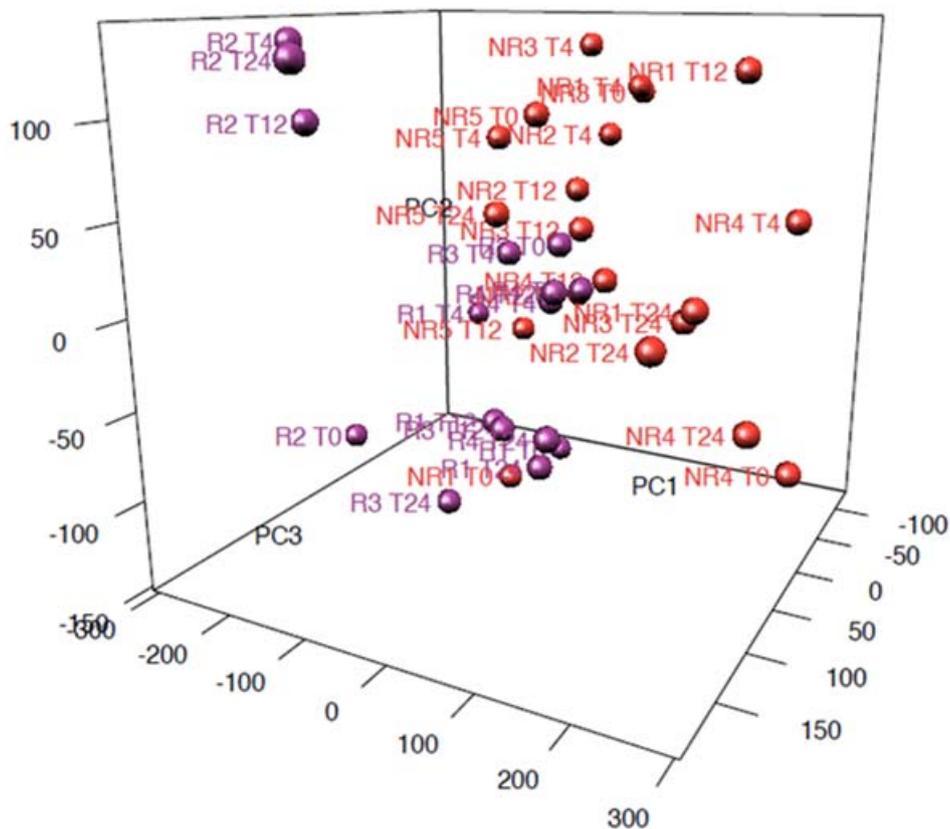


Figura 49. Análisis no supervisado de Componentes Principales en las primeras 24 horas tras la administración del IFN β sistémico en pacientes respondedores al tratamiento con IFN β (R) y no respondedores al tratamiento (NR). El ACP muestra como se separan ambas poblaciones de pacientes. Determinación basal (T0); Determinaciones a las 4h (T4), 12h (T12) y 24h (T24) tras la inyección del IFN β sistémico.

Los tres primeros componentes principales derivados del ACP explicaban juntos el 52.73% de la varianza en los datos. Estos tres componentes principales podían asociarse con la respuesta al tratamiento con IFN β (CP1, p=32.33% CP2, p=11.83% y CP3, p=8.57%) ya que la distribución de ambos grupos de pacientes "respondedores" y "no respondedores" se localizaba de forma separada a las 12 y 24 horas post-inyección del IFN β , como se puede observar en la figura 50.

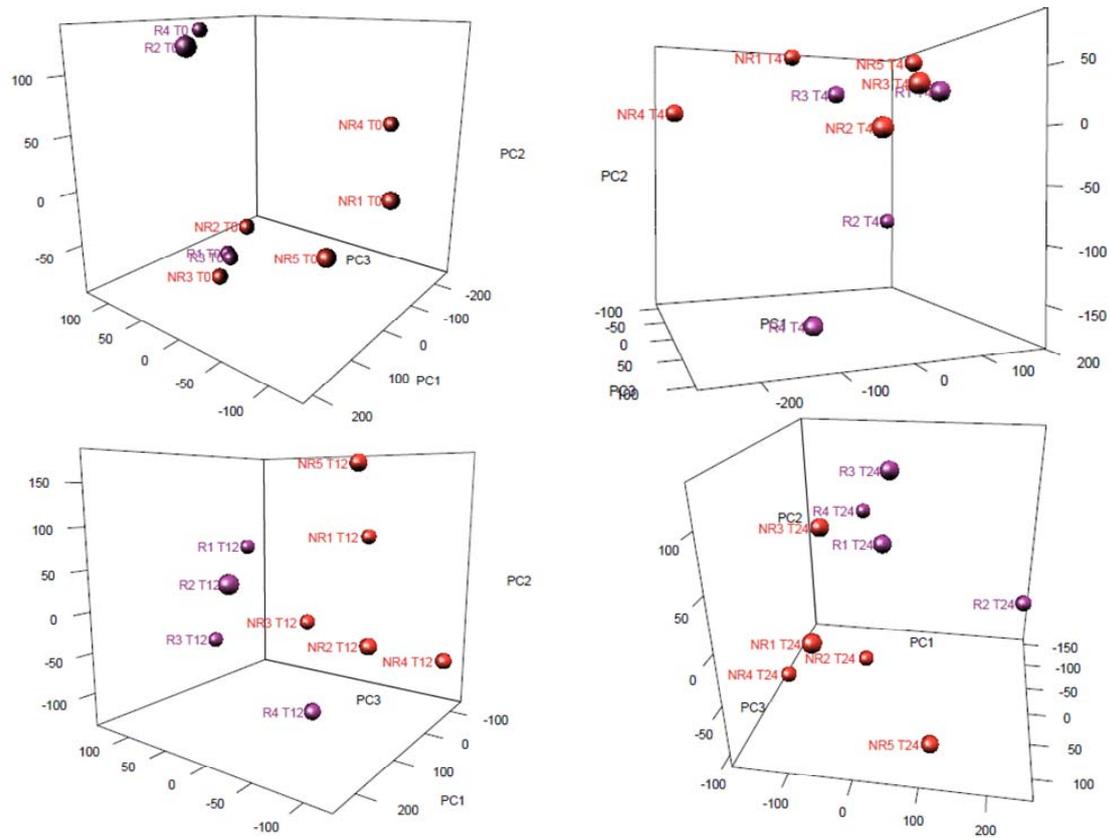


Figura 50. Análisis de componentes principales de los datos obtenidos en cada determinación temporal: T0 (basal), T4, T12 y T24h.

5.3.4 Análisis supervisado. Cinética de expresión temporal de los genes tras la administración de IFN β sistémico.

5.3.4.1 En la totalidad de los pacientes

Se analizaron los resultados de expresión génica obtenidos a partir de las 36 muestras de ARN procedentes de los 9 pacientes de forma basal y en los 3 tiempos (4h, 12h y 24h) tras administración del IFN β .

Cuando se evaluaron los datos de expresión génica en todos los pacientes, independientemente de la respuesta terapéutica al IFN β , se observó un total de 1315 genes cuya expresión sufría una tasa de cambio (FC: fold-change) ≥ 2 tras la administración de este fármaco, en alguno de los tiempos en comparación con los niveles basales, y con un valor de p-ajustada < 0.05 . En los gráficos y tablas, el cambio en la expresión génica se muestra como Log₂ FC y sólo se incluyen aquellos genes con Log₂ FC ≤ -1 o Log₂ FC ≥ 1 , lo que indica un cambio de expresión de al menos dos veces.

De estos 1315 genes diferencialmente expresados (DEG, del inglés *differentially expressed genes*), 962 genes sufrían un incremento en su expresión tras la administración del IFN β sistémico respecto a la determinación basal y 353 genes una disminución. La modificación temporal en la expresión de los genes se distribuyó de la siguiente manera: 792 genes se modificaron a las 4h de la inyección del IFN β , 1063 genes a las 12h, y 45 genes a las 24h, como puede observarse en la tabla 17 y en la figura 51.

	T4h vs. T0	T12h vs. T0	T24h vs. T0	Total
Regulados a la baja	154	228	3	353
Regulados al alza	638	835	42	962
DEG	792	1063	45	1315

Tabla 17. Genes diferencialmente expresados a las 4, 12 y 24 h tras la administración del IFN β comparados con su expresión basal. Resumen de los DEG con un cambio de expresión ≥ 2 respecto a la basal y valores de $p < 0.05$. La columna "Total" muestra la suma de aquellos genes diferencialmente expresados en alguno de los tiempos.

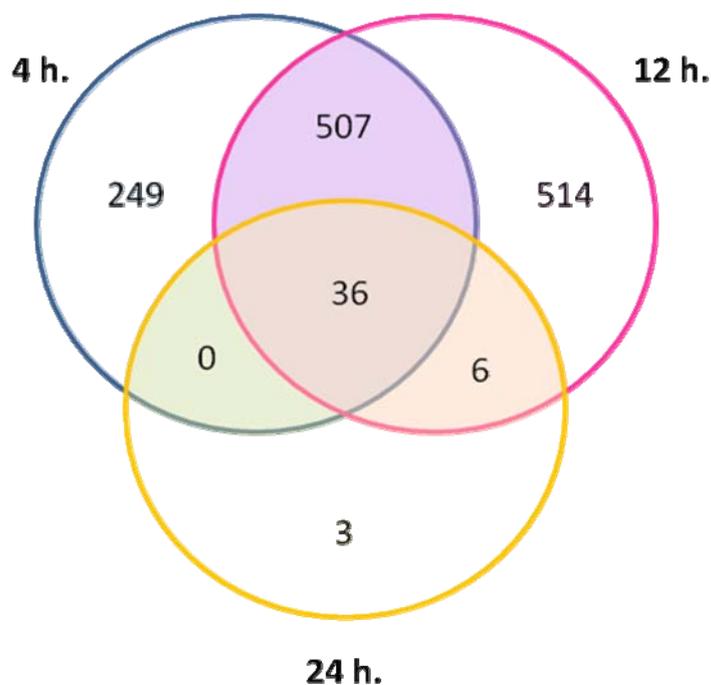


Figura 51. Diagrama de Venn mostrando los genes diferencialmente expresados en las diferentes determinaciones temporales en todos los pacientes. Algunos genes se modifican exclusivamente en una única determinación temporal, pero otros mantienen el cambio en dos (4 y 12h, o 12 y 24h) o en las tres determinaciones (4, 12 y 24h) tras la administración del IFN β .

Como se puede observar en el diagrama de Venn, el tiempo en el que se modifica la expresión de un mayor número de genes con respecto a su expresión basal es a

las 12 horas de la administración del IFN β , seguido de las 4 horas. A las 24 horas se modifica la expresión de un número de genes considerablemente menor, probablemente porque en la dinámica de expresión génica, en este intervalo temporal el efecto del IFN β sistémico ya no sea capaz de modificar la expresión con una intensidad de al menos dos veces la basal.

Curiosamente, el tratamiento con IFN β fue capaz de aumentar la expresión de 36 genes en todas las determinaciones temporales pos-tratamiento, la mayoría de ellos con una cinética que mostraba un pico máximo de expresión a las 12h tras la inyección del fármaco. Examinando el enriquecimiento de los 36 DEG en todos los tiempos se observó un enriquecimiento de genes asociados con "*Respuesta celular al zinc*" (Fold Enrichment [FE]: >100; p ajust: 1.64E-06), "*Regulación de procesos biosintéticos de IFN-gamma*" (FE: >100; P_{ajust}: 2.42E-02), "*Respuesta a IFN-gamma*" (FE: 28.53, P_{ajust} < 0,00005), "*Vías de señalización de IFN tipo I*" (FE:55.31; P_{ajust}< 0,00002), "*Respuesta a IFN tipo I*" (FE:52.10, P_{ajust}< 0.00002), "*Respuesta defensiva a virus*" (FE:24.53, P_{ajust}< 0,0002) y "*Regulación negativa del crecimiento*" (FE: 15.43; P_{ajust}< 0,02).

Símbolo del gen	Descripción del gen	Log ₂ Fold Change		
		4h	12h	24h
AZIZ2	5-azacytidine induced 2	1,51	1,60	1,04
CCL2	chemokine (C-C motif) ligand 2	9,91	8,97	5,57
DRAP1	DR1-associated protein 1 (negative cofactor 2 alpha)	2,08	2,36	1,33
HERC6	HECT& RLD domain containing E3 ubiquitin protein ligase fam 6	4,96	4,01	2,53
HESX1	HESX homeobox 1	6,56	6,87	3,62
IFI35	interferon-induced protein 35	3,66	4,35	4,35
IFI6	interferon, alpha-inducible protein 6	3,58	5,25	3,74
IFITM1	interferon induced transmembrane protein 1	1,47	2,76	1,94
IFITM3	interferon induced transmembrane protein 3	1,21	2,25	1,83
IL27	interleukin 27	4,44	3,83	2,08
IL4I1	interleukin 4 induced 1	4,42	4,52	2,83
IRF7	interferon regulatory factor 7	3,95	4,38	2,77
LAMP3	lysosomal-associated membrane protein 3	6,41	8,11	4,07
LAP3	leucine aminopeptidase 3	3,92	4,47	2,66
LILRB1	leukocyte immunoglobulin-like receptor, subfamily B , member 1	1,46	2,19	1,80
MT1B	metallothionein 1B	3,03	4,21	2,90
MT1H	metallothionein 1H	3,96	5,18	2,82
MT1L	metallothionein 1L (gene/pseudogene)	3,71	4,95	2,91
MT1X	metallothionein 1X	3,92	5,17	2,68
MT2A	metallothionein 2A	3,70	4,90	2,96

Símbolo del gen	Descripción del gen	Log ₂ Fold Change		
		4h	12h	24h
<i>NCOA7</i>	nuclear receptor coactivator 7	3,69	5,03	2,11
<i>OAS2</i>	2'-5'-oligoadenylate synthetase 2, 69/71kDa	4,21	4,65	2,98
<i>P2RY6</i>	pyrimidinergic receptor P2Y, G-protein coupled, 6	3,43	3,53	2,26
<i>PML</i>	promyelocytic leukemia	4,16	4,18	2,10
<i>PRIC285</i>	peroxisomal proliferator-activated receptor A complex 285	4,18	3,64	1,87
<i>RGL1</i>	ral guanine nucleotide dissociation stimulator-like 1	4,92	4,14	2,30
<i>SAMD4A</i>	sterile alpha motif domain containing 4A	4,06	5,12	3,25
<i>SCO2</i>	SCO cytochrome oxidase deficient homolog 2 (yeast)	2,24	3,45	2,04
<i>SERPIN1</i>	serpin peptidase inhibitor, clade G (C1 inhibitor), m1	3,52	5,97	3,75
<i>SLC27A3</i>	solute carrier family 27 (fatty acid transporter), member 3	2,83	3,24	1,65
<i>SP140</i>	SP140 nuclear body protein	3,16	3,17	1,71
<i>TFEC</i>	transcription factor EC	3,82	4,88	2,51
<i>TLR7</i>	toll-like receptor 7	3,06	3,52	2,16
<i>TNFSF10</i>	tumor necrosis factor (ligand) superfamily, member 10	4,71	4,95	2,47
<i>TOR1B</i>	torsin family 1, member B (torsin B)	4,23	3,86	1,93
<i>TREX1</i>	three prime repair exonuclease 1	3,67	3,28	1,96

Tabla 18. Lista de genes diferencialmente expresados en células nucleadas de sangre periférica a las 4,12 y 24h tras la administración del IFN β en comparación con su expresión basal. La tasa de cambio "Fold change" indica las diferencias de expresión génica entre los valores encontrados a las 4h, 12h y 24h tras la administración del IFN β y su expresión basal. Los valores positivos indican un incremento en la expresión con respecto a los valores basales. Valores de p ajustados <0.05.

5.3.4.2 En función de la respuesta terapéutica al IFN β

5.3.4.2.1 Comparación de la expresión génica entre pacientes Respondedores y No Respondedores al IFN β para cada una de las determinaciones temporales

Posteriormente, los datos se analizaron comparando la expresión de cada gen en el grupo de Respondedores (R) frente a la expresión del mismo gen en el grupo de No Respondedores (NR) al tratamiento con IFN β , para cada tiempo mediante análisis del Rank-product (Log₂ FC R/NR), de forma que si este valor es >1 significa que la expresión de un determinado gen es al menos dos veces mayor en el grupo de R con respecto al grupo de NR, y si es <-1 significa que la expresión de ese gen es al menos dos veces mayor en el grupo de NR con respecto al grupo de R.

En el grupo de los pacientes R, se encontraron 27 genes con mayor expresión que en el grupo de los NR en alguno de los tiempos, 17 de esos genes a nivel basal, tal y como se muestra en la tabla 19.

Expresión de los genes en Respondedores vs No Respondedores					
Símbolo del gen	Descripción del gen	Log ₂ FC R/NR			
		0h	4h	12h	24h
ALPL	alkaline phosphatase, liver/bone/kidney	1,35			
BTNL8	butyrophilin-like 8	2,00			
CBS	cystathionine-beta-synthase	1,38			
CD274	CD274 molecule			1,12	
CEACAM8	carcinoembryonic antigen-related cell adhesion m8		1,42	1,31	1,45
CES1	carboxylesterase 1			1,91	
CHRM4	cholinergic receptor, muscarinic 4		1,43	1,94	1,97
CLEC4F	C-type lectin domain family 4, member F			1,31	
CTSG	cathepsin G		1,51	1,27	1,66
DDX58	DEAD (Asp-Glu-Ala-Asp) box polypeptide 58			1,69	
DEFA3	defensin, alpha 3, neutrophil-specific	1,59	1,77	1,92	2,05
DEFA4	defensin, alpha 4, corticostatin	1,90	2,08	2,06	2,39
ELANE	elastase, neutrophil expressed	1,26	1,45	1,33	1,54
FAM3B	family with sequence similarity 3, member B	2,43	2,70	2,42	2,44
LOC10050632	uncharacterized LOC100506328	1,39			
LPAR1	lysophosphatidic acid receptor 1			1,41	
MADCAM1	mucosal vascular addressin cell adhesion molecule 1	1,20			
OLFM4	olfactomedin 4		1,24		1,34
ORM1	orosomucoid 1	1,69	1,48	1,43	
ORM2	orosomucoid 2	1,50	1,38	1,41	
PAQR6	progesterin and adipoQ receptor family member VI	1,18			
PI3	peptidase inhibitor 3, skin-derived	1,03			
PROK2	prokineticin 2	1,36			
RNF182	ring finger protein 182		1,20	1,24	1,28
S100P	S100 calcium binding protein P	2,38	2,03	2,02	1,82
VNN3	vanin 3	1,22			
XIST	X (inactive)-specific transcript (non-protein coding)	2,31	2,18	2,14	2,29
ZFP57	zinc finger protein 57 homolog (mouse)				1,28

Tabla 19. Lista de genes que presentan una expresión al menos dos veces superior en el grupo de pacientes Respondedores comparado con el de No Respondedores al tratamiento con IFN β , justo antes tras 4, 12 y 24 horas de la administración de este fármaco. Log₂FC: logaritmo en base 2 del *Fold Change* (Tasa de cambio). Valores de p ajustados <0.05.

Expresión de los genes en Respondedores vs No Respondedores					
Símbolo del gen	Descripción del gen	Log ₂ FC R/NR			
		0h	4h	12h	24h
B3GAT1	beta-1,3-glucuroniltransferase 1			-1,40	
BLK	B lymphoid tyrosine kinase				-1,11
CACNA2D2	calcium channel, voltage-dependent, α 2/delta subunit 2			-1,00	
CACNG6	calcium channel, voltage-dependent, gamma subunit 6		-1,19		
CD22	CD22 molecule				-1,05
CDCA7	cell division cycle associated 7				-1,10
CERCAM	cerebral endothelial cell adhesion molecule			-1,09	
CTSW	cathepsin W			-1,00	
CX3CR1	chemokine (C-X3-C motif) receptor 1		-1,14		
DDX3Y	DEAD (Asp-Glu-Ala-Asp) box polypeptide 3, Y-linked	-1,62	-1,63	-1,70	-1,84
DSP	desmoplakin	-1,25	-1,19	-1,12	-1,23
EIF1AY	eukaryotic translation initiation factor 1A, Y-linked	-1,76	-1,44	-1,99	-1,88
FAM129C	family with sequence similarity 129, member C				-1,09
FCRL6	Fc receptor-like 6		-1,43	-1,35	-1,02
FGFBP2	fibroblast growth factor binding protein 2		-1,13	-1,60	-1,00
FLJ43681	ribosomal protein L23a pseudogene			-1,70	
FOLR3	folate receptor 3 (gamma)			-1,22	-1,09
GABRA3	gamma-aminobutyric acid (GABA) A receptor, alpha 3				-1,11
GNLY	granulysin			-1,22	
GPR56	G protein-coupled receptor 56		-1,26	-1,60	
GSTM1	glutathione S-transferase mu 1				-1,00
GSTM2	glutathione S-transferase mu 2 (muscle)			-1,03	-1,00
GZMA	granzyme A (granzyme 1)			-1,01	
GZMB	granzyme B (granzyme 2)			-1,16	
GZMH	granzyme H (cathepsin G-like 2, protein h-CCPX)		-1,09	-1,46	
HDC	histidine decarboxylase			-1,12	
KCNG1	potassium voltage-gated channel, subfamily G, member 1				-1,00
KDM5D	lysine (K)-specific demethylase 5D	-1,52	-1,72	-1,35	-1,40
KIR2DL2	killer cell immunoglobulin-like receptor, two domains, long cytoplasmic tail, 2			-1,35	-1,00
KIR2DS2	killer cell immunoglobulin-like receptor, two domains, short cytoplasmic tail, 2		-1,30	-1,61	-1,20
KIR2DS3	killer cell immunoglobulin-like receptor, two domains, short cytoplasmic tail, 3		-1,04	-1,39	-1,33
KIR2DS4	killer cell immunoglobulin-like receptor, two domains, short cytoplasmic tail, 4		-1,19	-1,50	-1,22
KLRD1	killer cell lectin-like receptor subfamily D, member 1		-1,03	-1,12	
KRT72	keratin 72	-1,21	-1,33	-1,65	-1,55
LAIR2	leukocyte-associated immunoglobulin-like receptor 2	-1,70	-1,68	-1,64	-1,73
LLGL2	lethal giant larvae homolog 2 (Drosophila)			-1,09	
MDGA1	MAM domain containing glycosylphosphatidylinositol anchor 1	-1,00	-1,09	-1,35	-1,08

Expresión de los genes en Respondedores vs No Respondedores					
Símbolo del gen	Descripción del gen	Log ₂ FC R/NR			
		0h	4h	12h	24h
MT1M	metallothionein 1M	-1,04			
MYBL1	v-myb myeloblastosis viral oncogene homolog -like 1			-1,02	
NKG7	natural killer cell group 7 sequence			-1,20	
NMUR1	neuromedin U receptor 1		-1,12	-1,29	
PDGFRB	platelet-derived growth factor receptor, beta polypeptide			-1,00	
PDXDC2P	pyridoxal-dependent decarboxylase domain containing 2, pseudogene			-1,02	
PLXNA3	plexin A3			-1,00	
POM121L2	POM121 transmembrane nucleoporin-like 2		-1,86		
PRF1	perforin 1 (pore forming protein)			-1,09	
PRSS23	protease, serine, 23			-1,02	
PTGDS	prostaglandin D2 synthase 21kDa (brain)		-1,28	-1,00	
RNA18S5	RNA, 18S ribosomal 5			-1,22	
RPS4Y1	ribosomal protein S4, Y-linked 1	-2,64	-2,52	-2,59	-2,82
RPS4Y2	ribosomal protein S4, Y-linked 2	-2,62	-2,57	-2,57	-2,55
SCARNA17	small Cajal body-specific RNA 17			-1,19	
SIGLEC1	sialic acid binding Ig-like lectin 1, sialoadhesin	-1,01			
SLC1A7	solute carrier family 1 (glutamate transporter), member 7	-1,13	-1,61	-1,86	-1,30
SPON2	spondin 2, extracellular matrix protein		-1,10	-1,22	
TARP	TCR gamma alternate reading frame protein		-1,10	-1,11	
TBX21	T-box 21		-1,00	-1,22	
TCL1A	T-cell leukemia/lymphoma 1A	-1,40	-1,22	-1,19	-1,50
TCL1B	T-cell leukemia/lymphoma 1B	-1,05			-1,23
TMEM176A	transmembrane protein 176A	-1,77	-1,80	-2,07	-2,15
TMEM176B	transmembrane protein 176B	-2,16	-2,30	-2,45	-2,50
TTC16	tetratricopeptide repeat domain 16			-1,36	-0,88
TUBB2A	tubulin, beta 2A class IIa	-1,78	-1,50	-1,38	-1,33
TXLNG2P	taxilin gamma 2, pseudogene	-1,16	-1,35	-1,52	-1,20
USP9Y	ubiquitin specific peptidase 9, Y-linked	-1,32	-1,46	-1,28	-1,19
VIT	vitron		-1,06	-1,11	-1,00
VPREB3	pre-B lymphocyte 3				-1,19
WDR63	WD repeat domain 63				-2,94
ZNF683	zinc finger protein 683		-1,35	-1,33	-1,02

Tabla 20. Lista de genes que presentan una expresión al menos dos veces superior en el grupo de pacientes No Respondedores comparado con el de Respondedores al tratamiento con IFN β , justo antes y tras 4, 12 y 24 horas de la administración de este fármaco. Log₂FC: logaritmo en base 2 del *Fold Change* (Tasa de cambio). Valores de p ajustados <0.05.

Al observar los datos de Log₂ FC R/NR de ambos grupos representados en mapas de calor (figura 52), incluyendo las comparaciones en los cuatro tiempos, además de los valores de las Tablas 19 y 20, se advierte que hay 28 genes que se expresan significativamente y de forma más intensa en los pacientes R y 69 genes que se expresan más en NR.

Como se observa en la Tabla 19, hay 28 genes que se expresan significativamente y de forma más intensa en los pacientes Respondedores, 17 de ellos a nivel basal. De los 17 genes sobreexpresados “a tiempo cero”, 9 de ellos (ALPL, BTNL8, CBS, LOC10050632, MADCAM1, PAQR6, PI3, PROK2 y VNN3) pierden la expresión diferencial tras la inyección sistémica del interferón. Estos genes están implicados en el metabolismo de proteínas y en el sistema inmune. Por el contrario, los 8 genes restantes (S100P, XIST, FAM3B, DEFA3, DEFA4, ELANE, ORM1 y ORM2) mantienen estas diferencias de expresión en el tiempo hasta las 12 o 24 horas. Estos genes mayoritariamente están implicados en el sistema inmune. Adicionalmente, otros 11 genes implicados en el sistema inmune, el metabolismo y la señalización a través de receptores acoplados a proteínas G, no se encuentran diferencialmente expresados entre ambos grupos de pacientes a nivel basal; no obstante, su expresión aumenta al menos dos veces en pacientes R con respecto a los NR en alguno de los tiempos tras la administración del IFN β : a las 4, 12 y 24 horas (CEACAM8, CHRM4, CTSG, y RNF182), a las 12 y 24h (OLFM4), a las 12h (CD274, CES1, CLEC4F, DDX58, LPAR1) ó a las 24h (ZFP57) tras la administración del fármaco, como puede observarse en la Figura 52.

Por otra parte, se encontraron 69 genes con mayor expresión en el grupo de pacientes NR que en el grupo de los R en alguno de los tiempos, 19 de esos genes con mayor expresión a nivel basal, como se puede observar en la tabla 20 y Figura 52. De estos 19 genes, 3 presentaban estas diferencias de expresión sólo basalmente ((MT1M, SIGLEC1 y TCL1B, aunque TCL1B también lo hacía 24 h tras la administración del IFN β) y los 16 restantes mantenían una expresión mayoritaria en NR en todas las determinaciones temporales (DDX3Y, DSP, EIF1AY, KDM5D, KRT72, LAIR2, MDGA1, RPS4Y1, RPS4Y2, SLC1A7, TCL1A, TMEM176A, TMEM176B, TUBB2A, TXLNG2P y USP9Y). Entre ellos encontramos genes implicados en la cascada de señalización PI3K/Atk, en el metabolismo proteico (proteínas ribosómicas o peptidasas) y en el sistema inmune. Adicionalmente, de los 50 genes sin diferencias de expresión entre ambos grupos basalmente, 8 genes se

expresaban mayoritariamente en NR a las 4, 12 y 24h de la administración del fármaco (FCRL6, FGF2P2, KIR2DL2, KIR2DS2, KIR2DS3, KIR2DS4, VIT y ZNF683). Entre ellos predominaban los genes de los receptores KIR, característicos de las células NK y TNK. Los 42 genes restantes lo hacían en una o dos de las determinaciones temporales. Entre ellos, se encontraban genes implicados en el sistema inmune como los genes de la perforina 1, granulicina y las granzimas A, B y H (proteínas de los gránulos citotóxicos de las células NK) y genes específicos de células B (CD22 y BLK). También aparecen genes que codifican diferentes receptores de membrana (GPR56, CX3CR1, NMUR1, PDGFRB y FOLR3), así como canales de calcio (CACNG6 y CACNA2D2) y potasio (KCNG1).

Al realizar el análisis de enriquecimiento de términos de ontología de genes en clústeres, pudimos observar que los genes que al menos duplicaban su expresión en R respecto a NR en alguno de los tiempos, podían anotarse de forma significativa a los siguientes términos: "Respuesta defensiva a hongos" (*CTSG*, *DEFA3*, *DEFA4* y *ELANE*), "Respuesta humoral antibacteriana" (*CTSG*, *DEFA3*, *DEFA4* y *ELANE*), y "Degranulación de neutrófilos" (*ORM1*, *CTSG*, *CEACAM8*, *DEFA4*, *S100P*, *OLFM4*, *ORM2* y *ELANE*). Los genes que duplicaban su expresión en NR respecto a R en alguno de los tiempos podían anotarse significativamente a los siguientes términos: "Citólisis" (*GZMA*, *GZMB*, *GZMH* y *PRF1*) y "Respuesta Inmune" (*CTSW*, *VPREB3*, *GZMA*, *GNL4*, *PRF1*, *DESP*, *BLK*, *SPON2*, *GZMB*, *ZNF683*, *KIR2DS4*, *KLRD1*, *CX3CR1*, *KDM5D*, *GZMH*, *FOLR3*, *KIR2DS2* y *HDC*).

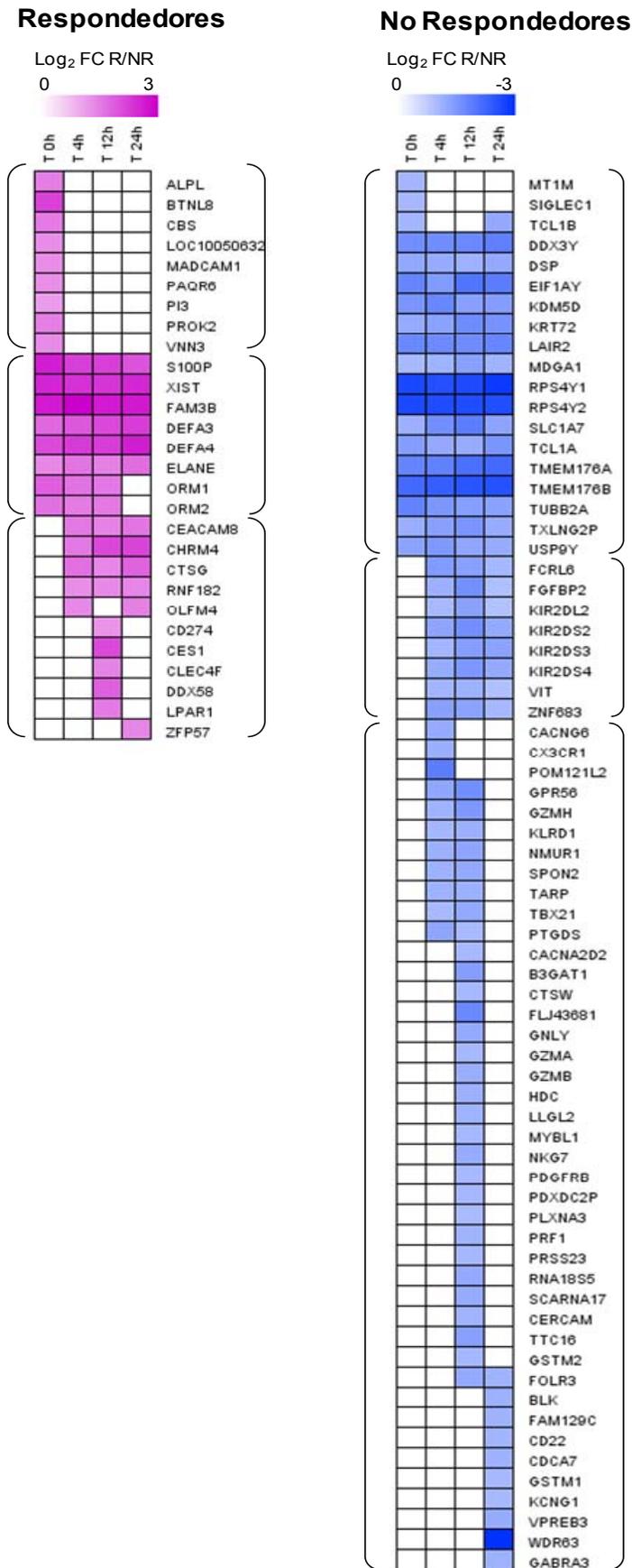


Figura 52. Mapas de calor donde se muestran los genes sobreexpresados en pacientes R comparados con NR (mapa de calor rosa) y los genes sobreexpresados en NR comparados con los R (mapa de calor azul), justo antes y/o tras 4, 12 y 24 horas de la administración del IFN β . El Log₂ FC R/NR indica las diferencias de expresión génica entre pacientes R y NR para cada uno de los tiempos. Las diferencias de expresión se representan en una escala de color, indicando mayor expresión a mayor intensidad de color. Log₂FC: logaritmo en base 2 del *Fold Change* (Tasa de cambio). Los valores positivos indican sobreexpresión en pacientes R, y los negativos, sobreexpresión en NR.

5.3.4.2.2 Cinética de la expresión génica en el tiempo por el tratamiento con IFN β para cada grupo de pacientes

Se analizaron los cambios en la expresión génica a las 4, 12 y 24h tras la administración sistémica de este fármaco comparados con su expresión basal, en cada grupo de pacientes. Inicialmente, se realizó una primera aproximación mediante análisis T test, encontrando que, a las 4h, se modificó la expresión de 319 genes: 7 genes exclusivamente en los NR, 89 genes exclusivamente en R y 223 genes en ambos grupos. La lista completa de estos genes se encuentra como tablas suplementarias A4 a A9 en Anexos, en el apartado 8.2.1. A las 12h, se encontraron cambios en la expresión de 422 genes: 12 genes exclusivamente en NR, 231 genes exclusivamente en R y 179 genes en ambos grupos. A las 24h, a pesar de que el ACP mostró una distribución diferente en respondedores y no-respondedores, ninguno de los genes modificó su expresión con una tasa de cambio mayor de dos y una p ajustada ≤ 0.05 , tal y como se observa en los diagramas de Venn de la figura 53.

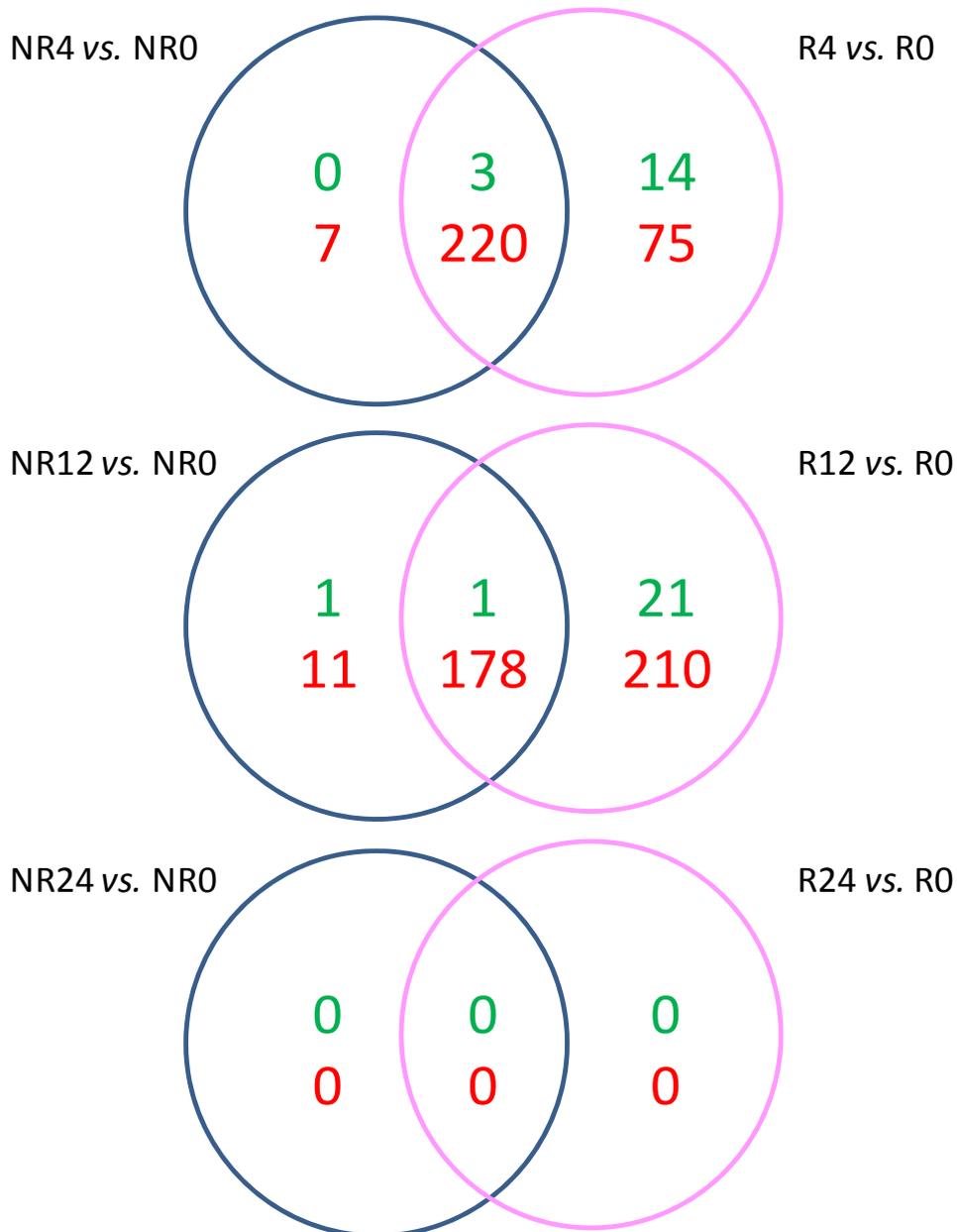


Figura 53. Diagrama de Venn con el número de genes diferencialmente expresados detectados por la prueba T-test a las 4, 12 y 24 h tras la administración del IFN β en función de la respuesta clínica a este fármaco. Los genes regulados al alza en comparación con la expresión basal se muestran en rojo, y los regulados a la baja, en verde.

Los mismos datos se sometieron a un segundo análisis mediante el Rank-product, análisis más adecuado porque logra un equilibrio entre la "tasa de falsos descubrimientos" de genes debido a variación aleatoria, y la tasa de no descubrimiento de genes realmente expresados de forma diferencial.

Como puede observarse en la figura 54, se modificó ligeramente el número de DEG en cada grupo de pacientes. La lista completa de estos genes se encuentra como tablas suplementarias A10 a A18 en el anexo, en el apartado 8.2.2.

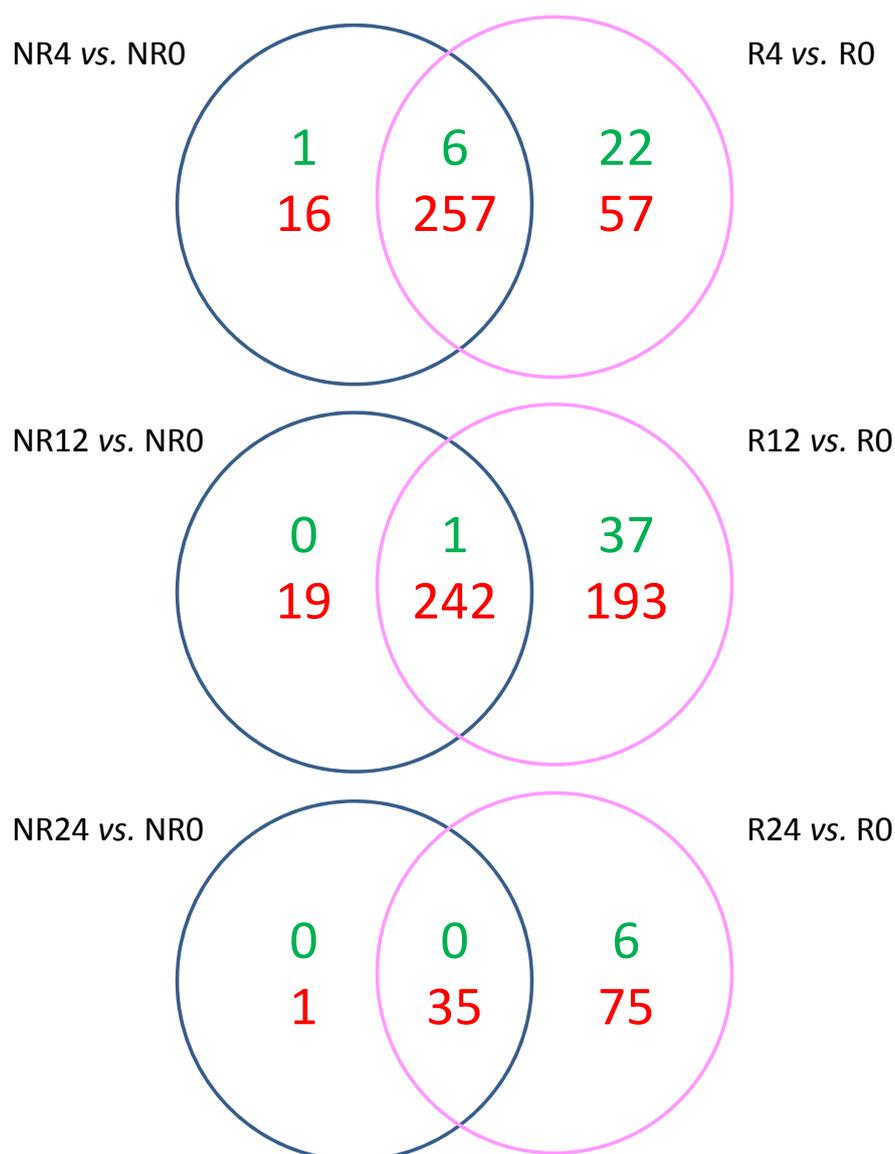


Figura 54. Diagrama de Venn con el número de genes diferencialmente expresados detectados por la prueba Rank-product a las 4, 12 y 24 h tras la administración del IFN β en función de la respuesta clínica a este fármaco. Los genes regulados al alza en comparación con la expresión basal se muestran en rojo, y los regulados a la baja, en verde.

A las 4h, se modificó la expresión de 359 genes: 17 exclusivamente en los NR, 79 exclusivamente en R y 263 genes comunes a ambos grupos. A las 12h, se encontraron cambios en la expresión de 492 genes: 19 exclusivamente en NR, 230 exclusivamente en R y 243 genes en ambos grupos. A las 24h tras la administración del IFN β , se modificaron 117 genes: un gen exclusivamente en el grupo de NR, 81 genes en el grupo de R y 35 genes comunes a ambos grupos.

Podemos observar que las 12 horas tras la administración sistémica del IFN β es el punto temporal en el que se modifica la expresión de un mayor número de genes. Además, en todos los tiempos, el grupo de respondedores al IFN β modifica la expresión de un mayor número de genes respecto a la basal.

Un total de 265 genes fueron modificados en ambos grupos de pacientes (respondedores y no respondedores) (91 genes a las 4h, 45 genes a las 12h y 129 en ambos tiempos), pero con mayores tasas de cambio en el 95% de los genes en el grupo de los respondedores.

Muchos de los genes sobreexpresados en la zona común por ambos grupos de pacientes a las 12 horas, se encuentran expresados diferencialmente exclusivamente en el grupo de pacientes Respondedores a las 4 y 24h, lo que nos induce a pensar que el IFN β es capaz de inducir en este grupo de pacientes una expresión génica más precoz y más prolongada que en los No respondedores.

5.3.4.3 Asignación de los genes diferencialmente expresados a los términos de la Ontología Génica (GO): término funcional Procesos Biológicos (BP).

Los genes diferencialmente expresados mediante el análisis de *Rank product* en cada grupo de pacientes fueron evaluados en cada tiempo mediante enriquecimiento de términos de ontología de genes en clústeres, para ver su anotación funcional a aquellos procesos biológicos sobrerrepresentados en cada grupo.

En la Tabla 21 se muestran los términos del GO más representados a las 4 horas de la administración del IFN β , exclusivamente en pacientes respondedores (R) exclusivamente en pacientes no respondedores (NR), o en ambos grupos (C). Los términos del GO más representados a las 4 horas de la administración del IFN β son

relativos a la "Respuesta Inmune Innata", "Respuesta celular a virus", "Regulación de la respuesta defensiva a virus por el huésped", "Regulación del ciclo de vida viral" y "Regulación negativa de la replicación genómica viral". Otro gran grupo de términos enriquecidos es el de las vías de señalización mediadas por citocinas y quimioquinas, especialmente por los interferones tipo I y II, así como los relativos a la regulación en la producción de interferones alpha y beta, y a la respuesta a los interferones alpha, beta y gamma. La mayor parte de los genes anotados a estos términos se expresan tanto en R como en NR; sin embargo, los R expresan adicionalmente un mayor número de genes de forma exclusiva.

Así mismo, se encuentran enriquecidos términos como la "Respuesta al zinc" en similar medida por R y NR, la "Regulación negativa de la locomoción", con un enriquecimiento génico en los R, y la "Trimerización protéica" con un enriquecimiento génico en el grupo de NR. Adicionalmente, es de destacar que en el grupo de NR, a las 4 horas hay un enriquecimiento de la vía GO:0005515 "Protein binding" dentro de la ontología MOLECULAR FUNCTION, que no es objeto de este análisis: (*FCGR1B*, *EIF2AK2*, *BMF*, *AP5B1*, *GRIN3A*, *NCF1*).

A las 12h, como puede observarse en la tabla 22, tras la administración del fármaco, se encuentran enriquecidos prácticamente los mismos términos que a las 4h: "respuesta inmune innata", "respuesta defensiva a virus", "regulación del ciclo de vida viral", "regulación de la replicación genómica viral", "regulación de la entrada viral en la célula huésped", "transporte intracelular de las proteínas virales", "vías de señalización por los IFN tipo I", "regulación de la producción de interferón alpha", "regulación de la producción de IFN beta", "respuesta a IFN alpha", "respuesta a IFN beta", "respuesta a IFN gamma" y "respuesta al zinc", sólo que con un mayor número de genes diferencialmente expresados dentro de cada término, y con un número de DEG muy superior en los R que en los NR. Es de destacar que la "regulación de la producción de IFN beta" sólo resulte significativa en el grupo de R.

Adicionalmente, en esta determinación a las 12h de la administración del IFN β sistémico, hay una serie de términos del GO que sólo se encuentran significativamente enriquecidos en el grupo de los R: "Regulación negativa de los procesos metabólicos protéicos celulares", "Vías de señalización de receptores de reconocimiento de patrones", "Regulación positiva de la señalización de I-kappaB quinasa / NF-kappaB", "Regulación de la migración celular", "Regulación negativa de la locomoción", "Regulación de la actividad hidrolasa", "Quimiotaxis linfocitaria", y "Respuesta a los ácidos grasos". También existe un término "Conjugación a la proteína ISG15" que sólo se encuentra enriquecido en los NR.

Es llamativo que un gen como ADAR se encontrase diferencialmente expresado a las 4h en el grupo de R y, sin embargo, a las 12h, se encuentre diferencialmente expresado en el grupo de NR. Es probable que las cinéticas de expresión génica en ambos grupos de pacientes difieran en su velocidad.

Por último, a las 24h (tabla 23) tras la administración del IFN β sistémico, disminuye radicalmente el número de genes diferencialmente expresados con respecto al tiempo 0, probablemente porque la expresión de la mayoría de los genes ya ha empezado a declinar. Los términos enriquecidos son los mismos que en las anteriores determinaciones temporales, sólo que con un menor número de genes implicados y con ningún DEG en el grupo de los NR que se pueda anotar a un término del GO Biological Process.

Es de destacar que muchos de los genes que aparecen como exclusivamente diferenciados en el grupo de los R a las 24h, se encontraban diferenciados en ambos grupos de pacientes (zona común) a las 12h. Esto nos inclina a pensar que la expresión de muchos de estos genes es más duradera en el tiempo en el grupo de los R.

ANÁLISIS DE ENRIQUECIMIENTO DE GENE ONTOLOGY: 4 HORAS								
GO BIOLOGICAL PROCESS	Status	Frec	Exp	FE	P	Exclusivos RESPONDEDORES	COMUNES	Exclusivos NO RESPONDEDORES
GO:0006954 Inflammatory response	R	28/455	7.27	3.85	1.78E-05	APOL2, CXCR6, FAS, IL8, TNFRSF8	AIM2, CCL1, CCL2, CCL7, CCL8, CXCL1, CXCL10, CXCL11, DEFB1, FFAR3, GBP5, IDO1, IFI16, IL1RN, IL27, IL27, LGALS9, NMI, NOD1, PLSCR1, SIGLEC1, TLR7, TNFAIP6	FFAR2,
	NR	24/455	5.94	4.04	9.77E-05			
GO:0002252 Immune effector process	R	59/1003	16.02	3.68	5.54E-14	DDIT4, SPON2, SAMHD1, BST2, MB21D1, KLRD1, MICA, ADAR, APOBEC3F, CX3CR1, FAS	HPSE, CXCL1, DDX58, STAT1, GBP3, TAT2, DDX60, IFI44L, CXCL10, IRF7, TRIM25, IFIH1, TLR7, TRIM5, MICB, TRIM56, MX2, IFI16, IFIT5, HSPA1B, DHX58, TRIM22, ZC3HAV1, CEACAM1, TNFAIP6, UNC93B1, IFIT2, GBP1, IFIT3, OAS3, OAS2, APOBEC3A, MX1, OAS1, HERC5, OASL, SERPING1, RSAD2, PLSCR1, ISG20, IRF5, IFIT1, JUP, STBD1, DYNLT1, ISG15, APOBEC3B, PML,	TRIM34, MB21D1, EIF2AK2, CLEC4D
	NR	52/1003	13.10	3.97	1.81E-13			
GO:0045087 Innate immune response	R	70/659	10.51	6.66	2.39E-32	ADAR, APOBEC3F, BST2, KLRD1, MICA, SAMHD1, SPON2, TRIM26, TRIM38	AIM2, APOBEC3A, APOBEC3B, APOL1, CCL1, CCL2, CCL7, CCL8, DDX58, DDX60, DEFB1, DHX58, GBP1, GBP5, GCH1, HERC5, IFI16, IFI35, IFI6, IFIH1, IFIT1, IFIT2, IFIT3, IFIT5, IL27, IRF2, IRF5, IRF7, ISG15, ISG20, LGALS9, MB21D1, MICB, MT2A, MX1, MX2, NCF1, NMI, NOD1, NUB1, OAS1, OAS2, OAS3, OASL, PML, RSAD2, SERPING1, SIGLEC16, SP100, STAT1, STAT2, TLR7, TRIM14, TRIM21, TRIM22, TRIM25, TRIM5, TRIM56, UNC93B1, XAF1, ZBP1, ZC3HAV1	CLEC4D, EIF2AK2, FCGR1B, TRIM34
	NR	66/659	8.61	7.67	2.27E-34			
GO:0045088 Regulation of innate immune response	R	32/399	6.37	5.02	1.39E-09	TRAFD1, SAMHD1, MICA, ADAR	PARP9, DDX58, STAT1, TRIM6, STAT2, DDX60, IRF7, IFIH1, TLR7, TRIM5, USP18, LGALS9, IFI16, HSPA1B, DHX58, SOCS1, ZC3HAV1, NMI, CEACAM1, UNC93B1, MB21D1, NOD1, GBP5, MAP2K6, SERPING1, RSAD2, PLSCR1, AIM2	FFAR2, CLEC4D
	NR	30/399	5.21	5.75	2.18E-10			
GO:0098542 Defense response to other organism	R	51/446	7.12	7.16	7.74E-24	ADAR, APOBEC3F, BST2, CD160, DDIT4, MICA, SAMHD1, SPON2	APOBEC3A, APOBEC3B, BATF2, CXCL10, DDX58, DDX60, DEFB1, DHX58, GBP1, GBP3, HERC5, IFI16, IFI44L, IFIH1, IFIT1, IFIT2, IFIT3, IFIT5, IRF5, IRF7, ISG15, ISG20, LGALS8, MB21D1, MX1, MX2, NOD1, OAS1, OAS2, OAS3, OASL, PLSCR1, PML, RSAD2, STAT1, STAT2, TLR7, TRIM22, TRIM25, TRIM5, TRIM56, UNC93B1, ZC3HAV1	CLEC4D, EIF2AK2, TRIM34
	NR	46/446	5.83	7.89	3.79E-23			

ANÁLISIS DE ENRIQUECIMIENTO DE GENE ONTOLOGY: 4 HORAS

GO BIOLOGICAL PROCESS	Status	Frec	Exp	FE	P	Exclusivos RESPONDEDORES	COMUNES	Exclusivos NO RESPONDEDORES
GO:0051607 Defense response to virus	R	46/170	2.72	16.94	5.48E-37	ADAR, APOBEC3F, BST2, DDIT4, MICA, SAMHD1, SPON2	APOBEC3A, APOBEC3B, CXCL10, DDX58, DDX60, DHX58, GBP1, GBP3, HERC5, IFI16, IFI44L, IFIH1, IFIT1, IFIT2, IFIT3, IFIT5, IRF5, IRF7, ISG15, ISG20, MB21D1, MX1, MX2, OAS1, OAS2, OAS3, OASL, PLSCR1, PML, RSAD2, STAT1, STAT2, TLR7, TRIM22, TRIM25, TRIM5, TRIM56, UNC93B1, ZC3HAV1,	EIF2AK2, TRIM34
	NR	41/170	2.22	18.46	2.76E-34			
GO:0098586 Cellular response to virus	R	7/26	0.42	16.85	2.36E-03	ADAR,	DDX58, IFIH1, IRF7, LGALS8, LGALS9, TRIM6	-
	NR	6/26	0.34	17.66	1.29E-02			
GO:0002230 Positive regulation of defense response to virus by host	R	7/22	0.35	19.92	7.74E-04	APOBEC3F,	AIM2, DDX58, IL27, MB21D1, PML, TRIM6	-
	NR	6/22	0.29	20.87	4.94E-03			
GO:1903900 Regulation of viral life cycle	R	27/130	2.08	13.00	1.56E-17	ADAR, APOBEC3F, BST2, TRIM26, TRIM38, IL8	PARP10, TRIM6, TRIM25, TRIM5, LAMP3, LGALS9, IFI16, IFIT5, ZC3HAV1, TRIM21, APOBEC3A, MX1, OAS1, OASL, RSAD2, PLSCR1, ISG20, IFIT1, ISG15, PML, OAS3	EIF2AK2
	NR	22/130	1.70	12.95	8.19E-14			
GO:0045071 Negative regulation of viral genome replication	R	18/52	0.83	21.67	1.40E-14	ADAR, APOBEC3F, BST2	APOBEC3A, IFI16, IFIT1, IFIT5, ISG15, ISG20, MX1, OAS1, OAS3, OASL, PARP10, PLSCR1, RSAD2, TRIM6, ZC3HAV1	EIF2AK2
	NR	16/52	0.68	23.55	2.92E-13			

ANÁLISIS DE ENRIQUECIMIENTO DE GENE ONTOLOGY: 4 HORAS								
GO BIOLOGICAL PROCESS	Status	Frec	Exp	FE	P	Exclusivos RESPONDEDORES	COMUNES	Exclusivos NO RESPONDEDORES
GO:0019221 Cytokine-mediated signaling pathway	R	53/478	7.64	6.94	2.71E-24	ADAR, BST2, CXCR6, FAS, IL8, SAMHD1, TNFRSF12A, TNFRSF8, TRIM26, TRIM38	AIM2, CCL1, CCL2, CCL7, CCL8, CEACAM1, CXCL1, CXCL10, CXCL11, GBP1, IFI35, IFI6, IFIT1, IFIT2, IFIT3, IL15RA, IRF2, IRF5, IRF7, ISG15, ISG20, LRRC3, MT2A, MX1, MX2, NMI, OAS1, OAS2, OAS3, OASL, PML, RSAD2, SOCS1, SP100, STAT1, STAT2, TNFSF13B, TRIM21, TRIM22, TRIM25, TRIM5, XAF1	FCGR1B, TRIM34,
	NR	44/478	6.25	7.05	4.72E-20			
GO:0060337 Type I interferon signaling pathway	R	24/65	1.04	23.11	5.73E-21	ADAR, BST2, SAMHD1	IFI35, IFI6, IFIT1, IFIT2, IFIT3, IRF2, IRF5, IRF7, ISG15, ISG20, MX1, MX2, OAS1, OAS2, OAS3, OASL, RSAD2, SP100, STAT1, STAT2, XAF1	-
	NR	21/65	0.85	24.73	1.15E-18			
GO:0070098 Chemokine-mediated signaling pathway	R	10/74	1.18	8.46	3.84E-03	CX3CR1, CXCR6, IL8	CCL1, CCL2, CCL7, CCL8, CXCL1, CXCL10, CXCL11	-
	NR	7/74	0.97	7.24	NS			
Regulation of type I interferon production (GO:0032479)	R	19/120	1.92	9.91	1.74E-09	TRIM38	DDX58, DHX58, HERC5, IFI16, IFIH1, IRF5, IRF7, ISG15, MB21D1, NMI, TLR7, TREX1, TRIM21, TRIM25, TRIM56, UBE2L6, ZBP1, ZC3HAV1	-
	NR	18/120	1.57	11.48	6.12E-10			
GO:0032647 Regulation of interferon-alpha production	R	7/24	0.38	18.26	1.39E-03	-	DDX58, IFIH1, IRF5, IRF7, NMI, TLR7, ZC3HAV1	-
	NR	7/24	0.31	22.32	3.56E-04			
GO:0032648 Regulation of interferon-beta production	R	8/47	0.75	10.66	1.02E-02	TRIM38,	DDX58, IFIH1, IRF5, IRF7, NMI, TLR7, ZC3HAV1	-
	NR	7/47	0.61	11.40	3.04E-02			
GO:0034340 Response to type I interferon	R	25/69	1.10	22.68	9.31E-22	ADAR, BST2, SAMHD1	IFI35, IFI6, IFIT1, IFIT2, IFIT3, IRF2, IRF5, IRF7, ISG15, ISG20, MX1, MX2, OAS1, OAS2, OAS3, OASL, RSAD2, SP100, STAT1, STAT2, TRIM56, XAF1	-
	NR	22/69	0.90	24.40	1.46E-19			

ANÁLISIS DE ENRIQUECIMIENTO DE GENE ONTOLOGY: 4 HORAS								
GO BIOLOGICAL PROCESS	Status	Frec	Exp	FE	P	Exclusivos RESPONDEDORES	COMUNES	Exclusivos NO RESPONDEDORES
GO:0035455 Response to interferon-alpha	R	7/20	0.32	21.91	4.08E-04	ADAR, BST2	IFIT2, IFIT3, LAMP3, MX2, OAS1	EIF2AK2,
	NR	6/20	0.26	22.96	2.85E-03			
Response to interferon-beta GO:0035456	R	7/23	0.37	19.05	1.04E-03	BST2,	AIM2, PLSCR1, PNPT1, STAT1, TRIM6, XAF1	-
	NR	6/23	0.30	19.97	6.38E-03			
GO:0034341 Response to interferon-gamma	R	28/147	2.35	11.92	2.61E-17	BST2, TRIM26, TRIM38	CCL1, CCL2, CCL7, CCL8, GBP1, GBP5, GCH1, IRF2, IRF5, IRF7, LGALS9, MT2A, NMI, NUB1, OAS1, OAS2, OAS3, OASL, PML, SP100, STAT1, TRIM21, TRIM22, TRIM25, TRIM5	FCGR1B, TRIM34,
	NR	27/147	1.92	14.06	1.75E-18			
GO:0060333 Interferon-gamma-mediated signaling pathway	R	19/71	1.13	16.75	1.64E-13	TRIM26, TRIM38,	GBP1, IRF2, IRF5, IRF7, MT2A, NMI, OAS1, OAS2, OAS3, OASL, PML, SP100, STAT1, TRIM21, TRIM22, TRIM25, TRIM5	FCGR1B, TRIM34,
	NR	19/71	0.93	20.48	3.88E-15			
GO:0071294 Cellular response to zinc ion	R	7/19	0.30	23.06	2.89E-04	-	MT1A, MT1B, MT1E, MT1H, MT1L, MT1X, MT2A	-
	NR	7/19	0.25	28.20	7.32E-05			
GO:0040013 Negative regulation of locomotion	R	18/263	4.20	4.28	3.20E-03	BST2, CLIC4, CX3CR1, GPR56, MIA3, TRIM26	CCL2, PML, PTPRU, SP100, SRGAP2, SRGAP2B, SRGAP2C, TACSTD2, TRIM21, TRIM25, TRIM5	-
	NR	12/263	3.44	3.49	NS			
GO:0070206 Protein trimerization	R	7/49	0.78	8.94	NS	-	MLKL, PKD2L1, PNPT1, TRIM21, TRIM22, TRIM5, TRIM6	TRIM34,
	NR	8/49	0.64	12.50	3.08E-03			

Tabla 21. Lista de términos enriquecidos de la Ontología de Genes, con los genes diferencialmente expresados en cada grupo de pacientes a las 4h tras la administración del IFN β en comparación con su expresión basal. Se indican los genes modificados diferencialmente exclusivamente en cada grupo y los genes modificados diferencialmente comunes en pacientes R y NR. *Frec*: número de DEG asignados a cada término GO del total de genes de dicho término. *Exp*: valor esperado, número de genes esperado para cada categoría de los DEG, basado en la lista de referencia. *FE*: (Frec/Exp) "Fold Enrichment", enriquecimiento de genes observados con respecto a los esperados. *P*: p-value, probabilidad de que el número de genes observado en esta categoría ocurriese debido al azar (p ajustada ≤ 0.05). *NS*: no significativo.

ANÁLISIS DE ENRIQUECIMIENTO DE GENE ONTOLOGY: 12 HORAS								
GO BIOLOGICAL PROCESS	Status	Frec	Exp	FE	P	Exclusivos RESPONDEDORES	COMUNES	Exclusivos NO RESPONDEDORES
GO:0006954 Inflammatory response	R	32/455	10.07	3.28	4.11E-05	APOL2, APOL3, C5, CCRL2, CXCL1, CXCL11, CXCR3, FAS, FFAR3, IFI16, IL8, NMI, NOD1, VNN1	AIM2, CCL1, CCL2, CCL8, CCR1, CXCL10, DEFB1, FFAR2, FPR3, GBP5, IDO1, IL1RN, IL27, LGALS9, PLSR1, SIGLEC1, TLR7, TNFAIP6	-
	NR	18/455	5.66	3.36	4.86E-02			
GO:0002252 Immune effector process	R	79/1003	22.19	3.56	1.55E-18	PRKCE, CXCL1, C5, FGL2, SRC, FRMPD3, MICB, CTSZ, FAM111A, LILRB1, SPON2, PTPRN2, IFI16, VNN1, NBN, SAMHD1, SELL, MB21D1, KLRD1, APOBEC3G, PMAIP1, TCN1, FAS, ANXA2	DDIT4, HPSE, IFITM3, DDX58, STAT1, C2, CFB, GBP3, STAT2, DDX60, IFI44L, CXCL10, IRF7, IFIH1, TLR7, TRIM5, C1QB, PLAC8, MX2, SIGLEC14, IFIT5, HSPA1B, DHX58, TRIM22, ZC3HAV1, CEACAM1, TNFAIP6, UNC93B1, BST2, IFIT2, EIF2AK2, GBP1, IFIT3, APOBEC3A, MX1, GPR84, OAS1, APOBEC3F, HERC5, OASL, SERPING1, RSAD2, PLSR1, ISG20, IRF5, IFIT1, C1QA, JUP, DYNLT1, IFITM1, ISG15, APOBEC3B, PML, OAS3, OAS2	HSPA6, LILRA3, RAB24, ADAR
	NR	59/1003	12.48	4.73	1.45E-19			
GO:0045087 Innate immune response	R	84/659	14.58	5.76	3.06E-34	C5, IFI30, SRC, MICB, TRIM38, SPON2, IFI16, VNN1, TRIM26, APOL1, SAMHD1, FCGR1B, TRIM21, NMI, MB21D1, SP100, KLRD1, NOD1, KYNU, APOBEC3G	IFI30, DDX58, STAT1, C2, CFB, NUB1, MT2A, JAK2, DEFB1, CCL1, STAT2, DDX60, MARCO, IRF7, IFIH1, TLR7, TRIM5, CD300E, C1QB, ZBP1, MX2, SIGLEC14, LGALS9, IFIT5, IL27, DHX58, TRIM22, ZC3HAV1, UNC93B1, GCH1, BST2, XAF1, IFIT2, EIF2AK2, GBP1, IFIT3, SIGLEC16, IFI35, IRF2, CCL8, GBP5, CCL2, APOBEC3A, MX1, OAS1, APOBEC3F, HERC5, OASL, SERPING1, RSAD2, ISG20, IRF5, TRIM14, IFIT1, C1QA, IFI6, NCF1, IFITM1, ISG15, AIM2, APOBEC3B, PML, OAS3, OAS2	ADAR
	NR	65/659	8.20	7.93	8.99E-35			
GO:0045088 Regulation of innate immune response	R	43/399	8.33	4.87	3.34E-13	CTSL1, IFI16, LILRB1, MB21D1, NMI, NOD1, PIK3AP1, PRKCE, PSMA4, PSMB9, PSME2, PVRL2, SAMHD1, SRC, WDFY1	AIM2, CEACAM1, DDX58, DDX60, DHX58, FFAR2, GBP5, HSPA1B, IFIH1, IRF7, JAK2, LAG3, LGALS9, MAP2K6, MARCO, PARP9, PLSR1, RSAD2, SERPING1, SOCS1, STAT1, STAT2, TLR7, TRIM5, TRIM6, UNC93B1, USP18, ZC3HAV1	ADAR
	NR	29/399	4.93	5.89	3.25E-10			

ANÁLISIS DE ENRIQUECIMIENTO DE GENE ONTOLOGY: 12 HORAS								
GO BIOLOGICAL PROCESS	Status	Frec	Exp	FE	P	Exclusivos RESPONDEDORES	COMUNES	Exclusivos NO RESPONDEDORES
GO:0098542 Defense response to other organism	R	55/446	9.87	5.57	2.07E-20	APOBEC3G, FAM111A,GNLY, IFI16, LGALS8, LILRB1, MB21D1, NOD1, SAMHD1, SPON2	APOBEC3A, APOBEC3B, APOBEC3F, BATF2, BST2, CXCL10, DDIT4, DDX58, DDX60, DEFB1, DHX58, EIF2AK2, GBP1, GBP3, HERC5, IFI44L, IFIH1, IFIT1, IFIT2,IFIT3, IFIT5, IFITM1, IFITM3, IRF5, IRF7, ISG15, ISG20, MX1, MX2, OAS1, OAS2, OAS3, OASL, PLAC8, PLSCR1, PML, RSAD2, STAT1, STAT2, TLR7, TRIM22, TRIM5, UNC93B1, ZC3HAV1	ADAR
	NR	45/446	5.55	8.11	4.23E-23			
GO:0051607 Defense response to virus	R	49/170	3.76	13.03	3.29E-13	APOBEC3G, FAM111A, IFI16, IFIT5, LILRB1, MB21D1, SAMHD1, SPON2	APOBEC3A, APOBEC3B, APOBEC3F, BST2, CXCL10, DDIT4, DDX58, DDX60, DHX58, EIF2AK2, GBP1, GBP3, HERC5, IFI44L, IFIH1, IFIT1, IFIT2, IFIT3, IFIT5, IFITM1, IFITM3, IRF5, IRF7, ISG15, ISG20, MX1, MX2, OAS1, OAS2, OAS3, OASL, LSCR1, PML, RSAD2, STAT1, STAT2, TLR7, TRIM22, TRIM5, UNC93B1, ZC3HAV1	ADAR
	NR	42/170	2.12	19.85	1.51E-36			
GO:0098586 Cellular response to virus	R	6/26	0.32	18.54	9.73E-03	LGALS8,	DDX58, IFIH1, IRF7, LGALS9, TRIM6	ADAR
	NR	6/26	0.58	10.43	NS			
GO:0002230 Positive regulation of defense response to virus by host	R	9/22	0.49	18.49	2.16E-05	APOBEC3G, LILRB1, MB21D1,	AIM2, APOBEC3F, DDX58, IL27, PML, TRIM6	-
	NR	6/22	0.27	21.91	3.72E-03			
GO:1903900 Regulation of viral life cycle	R	31/130	2.88	10.78	4.58E-18	APOBEC3G, FAM111A, IFI16, IL8, TRIM21, TRIM26, TRIM38	APOBEC3A, APOBEC3F, BST2, EIF2AK2, IFIT1, IFIT5, IFITM1, IFITM3, ISG15, ISG20, LAMP3, LGALS9, MX1, OAS1, OAS3, OASL, PARP10, PLSCR1, PML, RSAD2, TRIM5, TRIM6, ZC3HAV1	ADAR
	NR	24/130	1.62	14.83	1.16E-16			
GO:0045071 Negative regulation of viral genome replication	R	22/52	1.15	19.12	3.48E-17	APOBEC3G, FAM111A, IFI16,	APOBEC3A, APOBEC3F, BST2, EIF2AK2, IFIT1, IFIT5, IFITM1, IFITM3, ISG15, ISG20, MX1, OAS1, OAS3, OASL, PARP10, PLSCR1, RSAD2, TRIM6, ZC3HAV1	ADAR
	NR	20/52	0.65	30.9	1.55E-19			
GO:0046596 Regulation of viral entry into host cell	R	8/31	0.69	11.66	5.33E-03	PVRL2, TRIM21, TRIM26, TRIM38,	IFITM1, IFITM3, LGALS9, TRIM5	-
	NR	4/31	0.38	10.45	NS			

ANÁLISIS DE ENRIQUECIMIENTO DE GENE ONTOLOGY: 12 HORAS								
GO BIOLOGICAL PROCESS	Status	Frec	Exp	FE	P	Exclusivos RESPONDEDORES	COMUNES	Exclusivos NO RESPONDEDORES
GO:0019060 Intracellular transport of viral protein in host cell	R	4/5	0.11	36.16	4.78E-02	TAP1, TAP2	DYNLT1, IFIT1	-
	NR	2/5	0.06	32.39	NS			
GO:0019221 Cytokine-mediated signaling pathway	R	58/478	10.58	5.48	2.30E-21	CCRL2, CXCL1, CXCL11, CXCR3, FAS, FCGR1B, IFI30, IL15RA, IL3RA, IL8, LRRC3, NMI, PSMA4, PSMB9, PSME2, SAMHD1, SP100, TRIM21, TRIM26, TRIM38	AIM2, BST2, CCL1, CCL2, CCL8, CCR1, CEACAM1, CXCL10, GBP1, IFI35, IFI6, IFIT1, IFIT2, IFIT3, IFITM1, IFITM3, IRF2, IRF5, IRF7, ISG15, ISG20, JAK2, MT2A, MX1, MX2, OAS1, OAS2, OAS3, OASL, PML, RSAD2, SOCS1, STAT1, STAT2, TNFSF13B, TRIM22, TRIM5, XAF1	ADAR
	NR	39/478	5.95	6.56	2.29E-16			
GO:0001959 Regulation of cytokine-mediated signaling pathway	R	11/146	3.23	3.41	NS	-	GAS6, HSPA1B, IL1RN, IRF7, JAK2, RBCK1, SOCS1, STAT1, STAT2, TRIM6, USP18	ADAR
	NR	12/146	1.82	6.6	3.59E-03			
GO:0060337 Type I interferon signaling pathway	R	25/65	1.44	17.38	6.73E-19	SAMHD1, SP100,	BST2, IFI35, IFI6, IFIT1, IFIT2, IFIT3, IFITM1, IFITM3, IRF2, IRF5, IRF7, ISG15, ISG20, MX1, MX2, OAS1, OAS2, OAS3, OASL, RSAD2, STAT1, STAT2, XAF1	ADAR,
	NR	24/65	0.81	29.67	1.40E-25			
Regulation of type I interferon production (GO:0032479)	R	18/120	2.65	6.78	3.65E-06	LILRB1, NMI,	DDX58, DHX58, HERC5, IFIH1, ISG15, UBE2L6	UBA7
	NR	13/120	1.49	8.70	4.96E-05			
GO:0032647 Regulation of interferon-alpha production	R	7/24	0.53	13.18	1.21E-02	NMI	DDX58, IRF7, IFIH1, TLR7, ZC3HAV1, IRF5	-
	NR	6/24	0.30	20.09	6.16E-03			
GO:0032648 Regulation of interferon-beta production	R	9/47	1.04	8.65	1.23E-02	LILRB1, NMI, TRIM38,	DDX58, IFIH1, IRF5, IRF7, TLR7, ZC3HAV1	-
	NR	6/47	0.58	10.34	NS			
GO:0001818 Negative regulation of cytokine production	R	19/226	5	3.8	9.69E-03	CD2AP, LILRB1, NMI, TRIB2,	BST2, CD274, CEACAM1, DDX58, DHX58, GAS6, GBP1, HERC5, IDO1, IFIH1, ISG15, LAG3, LGALS9, PML, , UBE2L6	UBA7
	NR	16/226	2.79	5.73	2.91E-04			
GO:0035455 Response to interferon-alpha	R	10/20	0.44	22.6	4.11E-07	IFITM,	BST2, EIF2AK2, GAS6, IFIT2, IFIT3, IFITM3, LAMP3, MX2, OAS1	ADAR, FITM1,
	NR	11/20	0.25	44.19	3.13E-11			

ANÁLISIS DE ENRIQUECIMIENTO DE GENE ONTOLOGY: 12 HORAS								
GO BIOLOGICAL PROCESS	Status	Frec	Exp	FE	P	Exclusivos RESPONDEDORES	COMUNES	Exclusivos NO RESPONDEDORES
GO:0035456 Response to interferon-beta	R	9/23	0.51	17.69	3.16E-05	-	AIM2, BST2, IFITM1, IFITM3, PLSCR1, PNPT1, STAT1, TRIM6, XAF1	-
	NR	9/23	0.29	31.44	2.04E-07			
GO:0034341 Response to interferon-gamma	R	32/147	3.25	9.84	1.40E-17	IFI30, TRIM38, TRIM26, FCGR1B, TRIM21, NMI, SP100, KYNU	IFITM3, STAT1, NUB1, MT2A, JAK2, CCL1, IRF7, TRIM5, LGALS9, TRIM22, GCH1, BST2, GBP1, IRF2, CCL8, GBP5, CCL2, OAS1, OASL, IRF5, IFITM1, PML, OAS3, OAS2	-
	NR	24/147	1.83	13.12	1.84E-15			
GO:0060333 Interferon-gamma-mediated signaling pathway	R	21/71	1.57	13.37	3.29E-13	FCGR1B, IFI30, NMI, SP100, TRIM21, TRIM26, TRIM38	GBP1, IRF2, IRF5, IRF7, JAK2, MT2A, OAS1, OAS2, OAS3, OASL, PML, STAT1, TRIM22, TRIM5	-
	NR	14/71	0.88	15.84	5.53E-09			
GO:0032269 Negative regulation of cellular protein metabolic process	R	47/1023	22.63	2.08	2.17E-02	C5, CARD16, CPEB3, CTSZ, DNAJA1, GADD45B, HHEX, IFI16, LRRC3, MASTL, PER1, PI3, PRKAG2, PRKCE, PSMA4, PSMB9, PSME2, SRC, TRIB2, TRIM21, WFDC3, XRN1,	ATF3, BST2, CARD17, CDKN1C, CEACAM1, DDIT4, DUSP5, EIF2AK2, FAP, GAS6, GBP1, HSPA1B, HSPB1, IFI6, ISG15, LAMP3, MOV10, NCOA7, PARP10, PML, SAMD4A, SERPING1, SOCS1, WARS, ZBP1	ADAR,
	NR	26/1023	12.63	2.06	NS			
GO:0002221 Pattern recognition receptor signaling pathway	R	13/121	2.68	4.86	3.76E-02	CTSL1, NOD1, PIK3AP1, PRKCE,	DDX58, FFAR2, IFIH1, IRF7, MAP2K6, MARCO, TLR7, TRIM5, UNC93B1	-
	NR	9/121	0.49	6.02	NS			
GO:0043123 Positive regulation of I-kappaB kinase/NF-kappaB signaling	R	16/182	4.03	3.97	3.88E-02	APOL3, CASP1, CASP10, NOD1, PRKCE, SECTM1, TRIM38,	BST2, IFIT5, LGALS9, RBCK1, TLR7, TNFSF10, TRIM22, TRIM5, ZC3HAV1	-
	NR	9/182	2.25	4	NS			
GO:0030334 Regulation of cell migration	R	39/693	15.33	2.54	1.36E-03	C5, CLIC4, CXCL1, CXCL11, CXCR3, GPR56, IDH2, IL8, IRS2, MIA3, PHLDA2, PRKCE, PTP4A1, RHOB, SGK1, SP100, ZNF703	BST2, CCL1, CCL2, CCR1, CD274, CEACAM1, CXCL10, DDX58, DOCK4, GAS6, IFITM1, JAK2, LGALS9, NEXN, P2RY6, PTPRU, SRC, SRGAP2, SRGAP2B, SRGAP2C, TNFAIP6,	-
	NR	22/693	8.56	2.57	NS			
GO:0040013 Negative regulation of locomotion	R	20/263	5.82	3.44	2.28E-02	C5, CLIC4, GPR56, IDH2, MIA3, PTPRU, RHOB, SP100, TRIM21, TRIM26,	BST2, CCL2, IFITM1, PML, PTPRU, SRGAP2, SRGAP2B, SRGAP2C, TRIM5	-
	NR	10/263	3.25	3.08	NS			

ANÁLISIS DE ENRIQUECIMIENTO DE GENE ONTOLOGY: 12 HORAS								
GO BIOLOGICAL PROCESS	Status	Frec	Exp	FE	P	Exclusivos RESPONDEDORES	COMUNES	Exclusivos NO RESPONDEDORES
GO:0051336 Regulation of hydrolase activity	R	57/1379	30.51	1.87	4.38E-02	ARHGEF10L, C5, CARD16, CASP1, CASP7, CDC42EP2, DNAJA1, FAS, GZMA, IFI16, IL3RA, IQSEC2IRS2, MASTL, NMUR1, NOD1, PI3, PMAIP1, PRKCE, PSMB9, PSME2, PTPRN2, RABGAP1L, RASGRP3, RGS1, SIPA1L2, SRC, WFDC3	AGRN, AIM2, BST2, CARD17, CCL1, CCL2, CCL8, DOCK4, DYNLT1, GAS6, IFI6, IFIT1, JAK2, LAMP3, LGALS9, OAS1, OAS3, PLSCR1, PML, RASGEF1B, RGL1, RIN2, SCARB2, SERPING1, SRGAP2, SRGAP2, SRGAP2B, SRGAP2C, TNFSF10	-
	NR	29/1379	17.03	1.7	NS			
GO:0032020 ISG15-protein conjugation	R	3/6	0.13	22.6	NS		HERC5, ISG15, UBE2L6	UBA7
	NR	4/6	0.07	53.57	1.01E-02			
GO:0048247 Lymphocyte chemotaxis	R	8/42	0.93	8.61	4.90E-02	CXCL11, CXCR3,	CCL1, CCL2, CCL8, CH25H, CXCL10, GAS6	-
	NR	6/42	0.52	11.57	NS			
GO:0071398 Cellular response to fatty acid	R	9/55	1.22	7.4	4.34E-02	AKR1C3, DGAT2, FFAR3, LDLR, PRKCE, SRC	CCL2, FFAR2, P2RY6	-
	NR	3/55	0.68	4.42	NS			
GO:0071294 Cellular response to zinc ion	R	7/19	0.42	16.65	2.60E-03	-	MT1L, MT2A, MT1H, MT1X, MT1B, MT1E, MT1A	-
	NR	7/19	0.24	29.6	5.24E-05			

Tabla 22. Lista de términos enriquecidos de la Ontología de Genes, con los genes diferencialmente expresados en cada grupo de pacientes a las 12h tras la administración del IFN β en comparación con su expresión basal. Se indican los genes modificados diferencialmente exclusivamente en cada grupo y los genes modificados diferencialmente comunes en pacientes R y NR. *Frec*: número de DEG asignados a cada término GO del total de genes de dicho término. *Exp*: valor esperado, número de genes esperado para cada categoría de los DEG, basado en la lista de referencia. *FE*: (Frec/Exp) "Fold Enrichment", enriquecimiento de genes observados con respecto a los esperados. *P*: p-value, probabilidad de que el número de genes observado en esta categoría ocurriese debido al azar (p ajustada ≤ 0.05). *NS*: no significativo.

ANÁLISIS DE ENRIQUECIMIENTO DE GENE ONTOLOGY: 24 HORAS								
GO BIOLOGICAL PROCESS	Status	Frec	Exp	FE	P	Exclusivos RESPONDEDORES	COMUNES	Exclusivos NO RESPONDEDORES
GO:0002252 Immune effector process	R	33/1003	5.60	5.92	5.85E-13	-	C1QA, C1QB, C2, CXCL10, IFI44L, IFIT1, IFIT3, IRF7, ISG15, MX1, OAS2, OAS3, OASL, SERPING1	-
	NR	14/1003	1.72	8.13	3.88E-06			
GO:0045087 Innate immune response	R	37/659	3.68	10.06	7.14E-23	APOBEC3A, BST2, CD300E, DDX58, DDX60, DHX58, GBP1, HERC5, IFI27, IFIH1, IFIT2, IL27, ISG20, MARCO, MT2A, OAS1, PML, RSAD2, TLR7, XAF1, ZBP1	C1QA, C1QB, C2, CCL2, CCL8, IFI35, IFI6, IFIT1, IFIT3, IRF7, ISG15, MX1, OAS2, OAS3, OASL, SERPING1	-
	NR	16/659	1.13	14.14	3.08E-11			
GO:0098542 Defense response to other organism	R	27/446	2.49	10.85	2.28E-16	APOBEC3A, BATF2, BST2, DDX58, DDX60, DHX58, GBP1, HERC5, IFIH1, IFIT2, ISG20, OAS1, PLAC8, PLSCR1, PML, RSAD2, TLR7	CXCL10, IFI44L, IFIT1, IFIT3, IRF7, ISG15, MX1, OAS2, OAS3, OASL	-
	NR	10/446	0.77	13.06	2.46E-05			
GO:0009615 Response to virus	R	29/253	1.41	20.55	1.69E-25	APOBEC3A, BATF3, BST2, DDX58, DDX60, DHX58, GBP1, HERC5, IFI44, IFIH1, IFIT2, ISG20, MME, OAS1, PLSCR1, PML, RSAD2, TLR7	CCL8, CXCL10, IFI44L, IFIT1, IFIT3, IRF7, ISG15, MX1, OAS2, OAS3, OASL	-
	NR	11/253	0.43	25.33	3.04E-09			
GO:0051607 Defense response to virus	R	25/170	0.95	26.36	4.46E-24	APOBEC3A, BST2, DDX58, DDX60, DHX58, GBP1, HERC5, IFIH1, IFIT2, ISG20, OAS1, PLSCR1, PML, RSAD2, TLR7	CXCL10, IFI44L, IFIT1, IFIT3, IRF7, ISG15, MX1, OAS2, OAS3, OASL	-
	NR	10/170	0.29	34.27	2.18E-09			
GO:0050691 Regulation of defense response to virus by host	R	5/34	0.19	26.36	1.37E-02	DDX58, IL27, MME, PML	IFIT1	-
	NR	1/34	0.06	14.64	NS			
GO:0045071 Negative regulation of viral genome replication	R	11/52	0.29	37.92	1.26E-10	APOBEC3A, BST2, ISG20, OAS1, PLSCR1, RSAD2	IFIT1, ISG15, MX1, OAS3, OASL	-
	NR	5/52	0.09	56.01	2.81E-04			

ANÁLISIS DE ENRIQUECIMIENTO DE GENE ONTOLOGY: 24 HORAS								
GO BIOLOGICAL PROCESS	Status	Frec	Exp	FE	P	Exclusivos RESPONDEDORES	COMUNES	Exclusivos NO RESPONDEDORES
GO:0071345 Cellular response to cytokine stimulus	R	26/651	3.63	7.16	2.42E-11	BST2, GBP1, IFI27, IFIT2, ISG20, MME, MT1X, MT2A, OAS1, PML, PNPT1, RSAD2, XAF1	CCL2, CCL8, CXCL10, IFI35, IFI6, IFIT1, IFIT3, IRF7, ISG15, MX1, OAS2, OAS3, OASL	-
	NR	13/651	1.12	11.63	2.49E-07			
GO:0019221 Cytokine-mediated signaling pathway	R	23/478	2.67	8.62	2.56E-11	BST2, GBP1, IFI27, IFIT2, ISG20, MT2A, OAS1, PML, RSAD2, XAF1	CCL2, CCL8, CXCL10, IFI35, IFI6, IFIT1, IFIT3, IRF7, ISG15, MX1, OAS2, OAS3, OASL	-
	NR	13/478	0.82	15.84	5.38E-09			
GO:0060337 Type I interferon signaling pathway	R	17/65	0.36	46.88	1.70E-19	BST2, IFI27, IFIT2, ISG20, OAS1, RSAD2, XAF1	IFI35, IFI6, IFIT1, IFIT3, IRF7, ISG15, MX1, OAS2, OAS3, OASL	-
	NR	10/65	0.11	89.62	1.64E-13			
GO:0001817 Regulation of cytokine production	R	19/592	3.30	6.06	1.06E-06	BST2, DDX58, DDX60, DHX58, GBP1, HERC5, IDO1, IFIH1, IL27, MME, ORM1, PML, RSAD2, TLR7, TREX1, ZBP1, ZBP1	IRF7, ISG15	-
	NR	2/592	1.02	2.95	NS			
GO:0001818 Negative regulation of cytokine production	R	10/226	1.26	7.93	5.59E-03	BST2, DDX58, DHX58, GBP1, HERC5, IDO1, IFIH1, ISG15, ORM1, PML	ISG15	-
	NR	1/226	0.39	2.58	NS			
GO:0071357 Cellular response to type I interferon	R	17/65	0.36	46.88	1.70E-19	BST2, IFI27, IFIT2, ISG20, OAS1, RSAD2, XAF1	IFI35, IFI6, IFIT1, IFIT3, IRF7, ISG15, MX1, OAS2, OAS3, OASL	-
	NR	10/65	0.11	89.62	1.64E-13			
GO:0035455 Response to interferon-alpha	R	5/20	0.11	44.81	1.02E-03	BST2, IFIT2, OAS1	IFIT3, LAMP3	-
	NR	2/20	0.03	58.26	NS			
GO:0035456 Response to interferon-beta	R	0/23	0.04	< 0.2	NS	-	-	-
	NR	0/23	0.04	< 0.2	NS			

ANÁLISIS DE ENRIQUECIMIENTO DE GENE ONTOLOGY: 24 HORAS								
GO BIOLOGICAL PROCESS	Status	Frec	Exp	FE	P	Exclusivos RESPONDEDORES	COMUNES	Exclusivos NO RESPONDEDORES
GO:0032479 Regulation of type I interferon production	R	10/120	0.66	15.19	1.39E-05	DDX58, DHX58, HERC5, IFIH1, MME, TLR7, TREX1, ZBP1	ISG15, IRF7	-
	NR	2/120	0.12	8.09	NS			
GO:0032727 Positive regulation of interferon-alpha production	R	5/18	0.10	49.79	6.10E-04	DDX58, IFIH1, MME, TLR7	IRF7	-
	NR	1/18	0.03	32.36	NS			
GO:0060333 Interferon-gamma-mediated signaling pathway	R	8/71	0.40	20.20	7.19E-05	GBP1, MT2A, OAS1, PML	IRF7, OAS2, OAS3, OASL	-
	NR	4/71	0.12	32.82	6.01E-02			
GO:0034341 Response to interferon-gamma	R	11/147	0.82	13.41	7.48E-06	BST2, GBP1, MT2A, OAS1, PML	CCL2, CCL8, IRF7, OAS2, OAS3, OASL	-
	NR	6/147	0.25	23.78	1.64E-03			
GO:0045926 Negative regulation of growth	R	13/231	1.29	10.09	6.35E-06	BST2, MT1A, MT1E, MT1H, MT1L, MT1M, MT1M, MT1X, MT2A, PLAC8, PML, PNPT1	MT1B	-
	NR	1/231	0.40	2.52	NS			
GO:0071294 Cellular response to zinc ion	R	9/19	0.11	84.91	2.64E-11	MT1L, MT2A, MT1H, MT1X, MT1E, MT1M, MT1A, MT1M	MT1B	-
	NR	1/19	0.03	30.66	NS			
GO:0071276 Cellular response to cadmium ion	R	5/31	0.17	28.91	8.73E-03	MT1A, MT1E, MT1H, MT1M, MT1X,	-	-
	NR	0/31	0.05	< 0.2	NS			

Tabla 23. Lista de términos enriquecidos de la Ontología de Genes, con los genes diferencialmente expresados en cada grupo de pacientes a las 4h tras la administración del IFN β en comparación con su expresión basal. Se indican los genes modificados diferencialmente exclusivamente en cada grupo y los genes modificados diferencialmente comunes en pacientes R y NR. *Frec*: número de DEG asignados a cada término GO del total de genes de dicho término. *Exp*: valor esperado, número de genes esperado para cada categoría de los DEG, basado en la lista de referencia. *FE*: (Frec/Exp) "Fold Enrichment", enriquecimiento de genes observados con respecto a los esperados. *P*: p-value, probabilidad de que el número de genes observado en esta categoría ocurriese debido al azar (p ajustada ≤ 0.05). *NS*: no significativo.

En general, se puede observar que los genes de la mayoría de las vías se expresan en ambos grupos de pacientes R y NR. No obstante, los R son capaces de modificar un mayor número de genes de forma exclusiva.

Además, alguno de los genes expresados por ambos grupos a las 12 horas, se expresan exclusivamente en el grupo de R a las 4 y 24 h, lo que nos indica que la expresión génica en este grupo se inicia de forma más precoz y es más duradera en el tiempo que en el grupo de NR.

5.3.5 Replicación de los datos de microarrays por PCR a tiempo real

La replicación de los genes diferencialmente expresados en los microarrays se realizó determinando la expresión de los genes mediante la técnica de PCR cuantitativa a tiempo real (qRT-PCR). Se realizó una cuantificación relativa de los genes utilizando el gen constitutivo GAPDH (Gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa), en las mismas muestras donde se realizó el array. Los datos fueron analizados con el método delta delta CT, como se detalla en el apartado de material y métodos

Se seleccionaron a tal efecto cinco genes implicados en la vía de señalización del IFN β de los cuales, STAT1, STAT2 y OAS1 se encontraron diferencialmente expresados en respondedores y no respondedores a las 4 y 12 horas tras la administración del IFN β , con un FC \geq 2. OAS1 mantuvo adicionalmente una expresión con un FC $>$ 2, a las 24h, en el grupo de los respondedores. IRF9 y TyK2 no se encontraron diferenciados en ninguna de las comparaciones realizadas con un FC \geq 2 (Tabla 24).

Genes	4H				12H				24H			
	R		NR		R		NR		R		NR	
	Log ₂ FC	P _{qwert}	Log ₂ FC	P _{qwert}	Log ₂ FC	P _{qwert}	Log ₂ FC	P _{qwert}	Log ₂ FC	P _{qwert}	Log ₂ FC	P _{qwert}
STAT1	1,95	<1 · 10 ⁻⁵	1,62	<1 · 10 ⁻⁵	1,83	<1 · 10 ⁻⁵	1,37	<1 · 10 ⁻⁵	1	NS	0,69	NS
STAT2	1,72	<1 · 10 ⁻⁵	1,46	<1 · 10 ⁻⁵	2,13	<1 · 10 ⁻⁵	1,55	<1 · 10 ⁻⁵	1,1	NS	0,57	NS
IRF9	0,9	0,002	0,7	0,02	0,84	0,009	0,6	NS	0,4	NS	0,37	NS
OAS1	2,28	<1 · 10 ⁻⁵	1,8	<1 · 10 ⁻⁵	2,67	<1 · 10 ⁻⁵	1,81	<1 · 10 ⁻⁵	1,86	<1 · 10 ⁻⁵	1,14	NS
TyK2	0,16	NS	0,22	NS	-0,2	NS	0,2	NS	-0,24	NS	0,12	NS

Tabla 24. Cambios en la expresión de los genes seleccionados a los diferentes tiempos en comparación con la expresión basal en Respondedores (R) y No Respondedores (NR).

A continuación se analizaron los datos de expresión obtenidos mediante PCR a tiempo real en los pacientes respondedores, no respondedores y en ambos grupos de forma conjunta, para cada uno de los genes seleccionados:

- TyK2

El análisis de muestras relacionadas, no mostró cambios significativos en la expresión de Tyk2 a 4 y 12 horas respecto al basal ni en respondedores ni en no respondedores (figura 63), replicándose los datos obtenidos en el array de expresión.

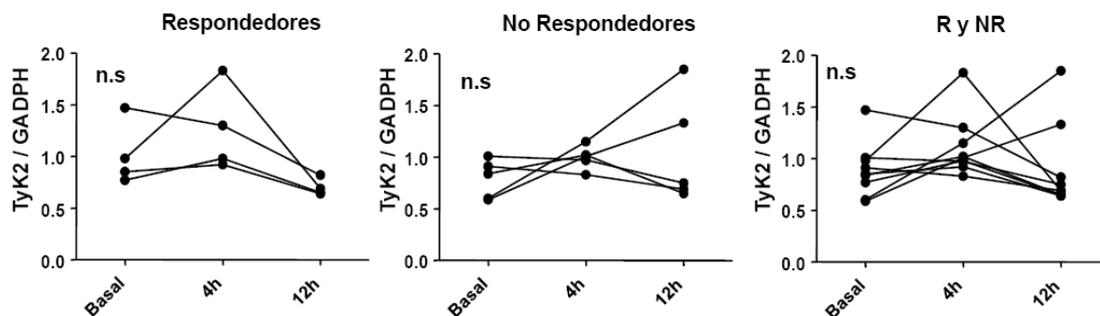


Figura 55. Expresión relativa de TyK2 mediante PCR a tiempo real (TyK2/GADPH) en pacientes respondedores y no respondedores.

- **STAT1**

La expresión de STAT1 aumentó a las 4 y 12 horas de la inyección de interferón beta respecto al basal, siendo significativo el cambio en pacientes no respondedores ($p=0.043$) (figura 64). En pacientes respondedores no se alcanza la significación, aunque existe una tendencia a aumentar la expresión a 4 y 12 horas ($p=0.063$). Al analizar la expresión conjunta en pacientes respondedores y no respondedores, se observa un aumento de la expresión de STAT1 a 4 y 12 horas, replicándose los datos obtenidos en el array de expresión.

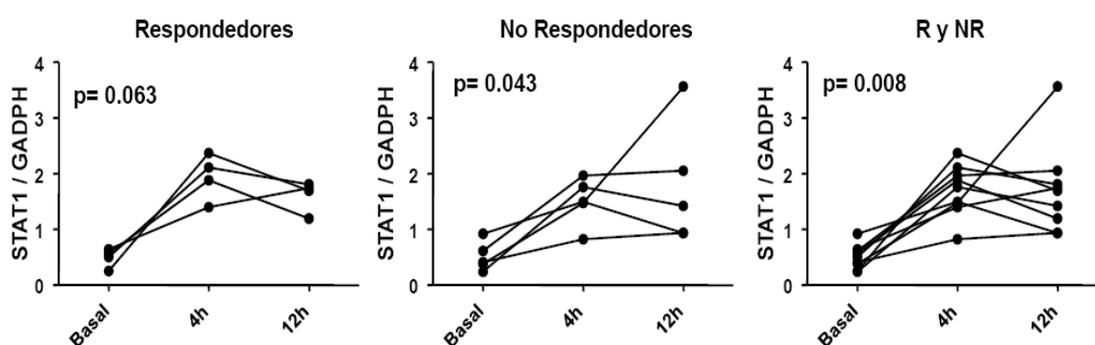


Figura 56. Expresión relativa de STAT1 mediante PCR a tiempo real (STAT1/GADPH) en pacientes respondedores y no respondedores.

- **STAT2**

Al igual que STAT1, la expresión de STAT2 aumentó a las 4 y 12 horas de la inyección de interferón beta respecto al basal, siendo significativo el cambio en pacientes no respondedores ($p=0.043$) (figura 65). En pacientes no respondedores no se alcanza la significación, aunque existe una tendencia a aumentar la expresión a 4 y 12 horas ($p=0.063$). Al analizar la expresión conjunta en pacientes respondedores y no respondedores, se observa un aumento de la expresión de STAT1 a 4 y 12 horas, replicándose los datos obtenidos en el array de expresión.

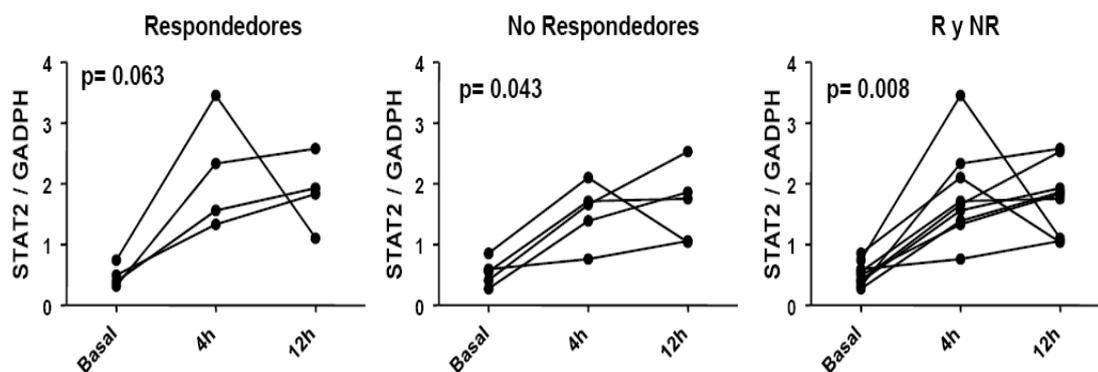


Figura 57. Expresión relativa de STAT2 mediante PCR a tiempo real (STAT2/GADPH) en pacientes respondedores y no respondedores.

- **OAS1**

El gen OAS1 se encontró diferenciado a 4 y 12 horas en ambos grupos de pacientes en el array. En los resultados de PCR a tiempo real, en el grupo de respondedores no se alcanza la significación estadística debido al tamaño muestral pero los cuatro pacientes aumentaron la expresión de IRF9 a 12 horas, existiendo una clara tendencia (p=0.068) (figura 66). En el grupo de no respondedores tampoco se encontraron diferencias significativas siendo diferente la tendencia de cada paciente (cuatro aumentaron su expresión y uno no modificó dicha expresión). Al analizar la expresión conjunta en pacientes respondedores y no respondedores, se observa un aumento de la expresión de OAS a 12 horas.

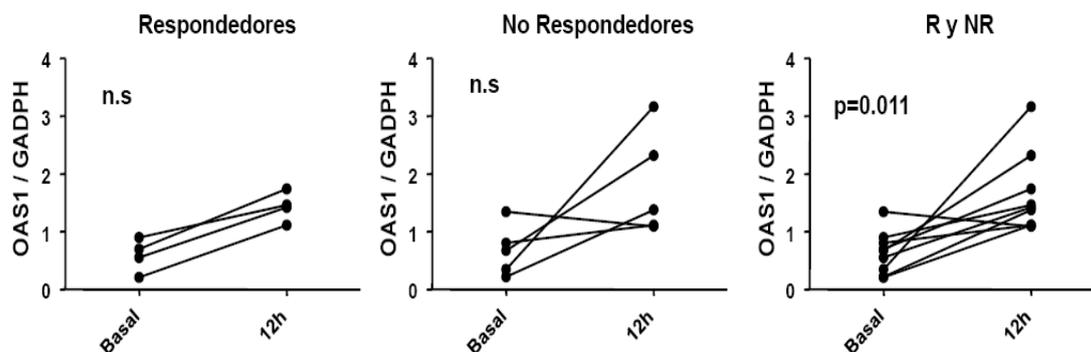


Figura 58. Expresión relativa de OAS1 mediante PCR a tiempo real (OAS1/GADPH) en pacientes respondedores y no respondedores.

- IRF9

El gen IRF9 no se encontró diferenciado con un $FC \geq 2$ a las 12 horas en ninguno de los grupos de pacientes en el análisis de transcriptoma. En el análisis por tiempo real no se ha encontrado un incremento significativo de la expresión de este gen en ninguno de los grupos de pacientes (figura 67).

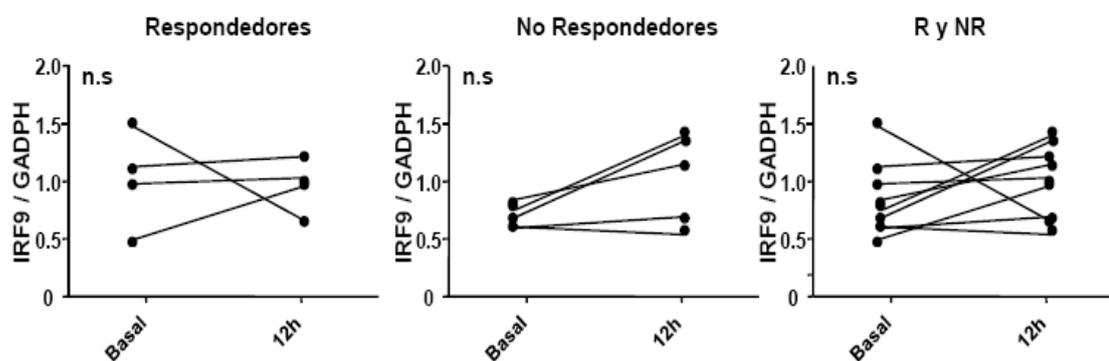


Figura 59. Expresión relativa de IRF9 mediante PCR a tiempo real (IRF9/GADPH) en pacientes respondedores y no respondedores.



DISCUSIÓN



6. DISCUSIÓN

6.1 Objetivo I

El uso terapéutico del IFN β reduce en muchos pacientes con EMRR la actividad clínica y retrasa la progresión de la discapacidad, permitiendo en algunos de ellos un "estado libre de enfermedad". Por este motivo nace un nuevo término llamado NEDA (del inglés: "*Not Evidence of Disease Activity*"), que equivale a que el paciente no tiene datos de actividad de la enfermedad ni en forma de brotes, ni de progresión de la discapacidad neurológica, ni aparecen nuevas lesiones ni aumento de las ya existentes en la resonancia magnética (Giovannoni et al. 2015).

Como en la EM están implicados varios mecanismos inmunopatológicos, cabe esperar que un determinado fármaco modificador de la enfermedad sea más eficaz en algunos pacientes que en otros. Existe por tanto, un número importante de pacientes en los que, a pesar de recibir el tratamiento con IFN β , la EM continua activa. Por ello, es de gran importancia en la clínica, la identificación de los pacientes que muestran una respuesta subóptima, con el fin de racionalizar el tratamiento y ofrecerles soluciones terapéuticas alternativas disponibles en la actualidad frente a la EM (Río et al. 2006). Ello hace imprescindible la búsqueda de biomarcadores de respuesta temprana al IFN β , complementarios a la actividad y a la clínica del paciente, que ayuden a la identificación de estos pacientes no respondedores (Sormani et al. 2016)

A día de hoy, no se conoce totalmente el mecanismo de acción del tratamiento con IFN β en la EMRR, aunque sí es sabido que éste comienza su acción en las células al interaccionar con su receptor IFNAR, formado por dos subunidades, IFNAR1 e IFNAR2. Esta interacción conduce a la activación de la vía JAK-STAT, transmitiéndose la señal al interior celular a través de la activación por fosforilación de las proteínas JAK y STAT (Platanias 2005).

La evaluación de los niveles de las subunidades que conforman el receptor (IFNAR1 y 2), y de las formas fosforiladas de las proteínas de la vía, justo tras la estimulación con IFN β -1a, nos permite caracterizar la activación a corto plazo de la vía de señalización JAK-STAT. En este sentido, la hipótesis de partida del estudio que ha dado lugar a esta tesis doctoral, postula que la heterogeneidad en la respuesta

terapéutica al IFN β podría explicarse por diferencias en la activación de la vía de señalización del IFN β , por lo que hemos tratado de identificar perfiles de activación asociados a un fenotipo de buena respuesta.

Previamente, se analizaron las diferencias en la activación de esta vía entre controles sanos y pacientes con EM no tratados, no encontrándose diferencias en los niveles de expresión de las proteínas de la vía JAK-STAT a nivel basal. Sin embargo, tras la estimulación *in vitro* con IFN β , los pacientes sin tratamiento presentaban mayores niveles de pSTAT1 y pSTAT2 en monocitos que los controles y mayores niveles de IFNAR1 en los linfocitos T CD4+. Ello indica una mayor respuesta al estímulo *in vitro* con IFN β de las células de pacientes con EM que las células de controles. Se ha descrito que la síntesis de IFN β endógeno en pacientes con EM es deficitaria respecto a los controles (Wandinger et al. 1998) lo que podría explicar que las células de los pacientes, al tener menos estimulación de la vía por el IFN β endógeno, tengan más capacidad de reaccionar frente a un estímulo adicional exógeno.

En los últimos años, la vía JAK-STAT está siendo una diana terapéutica importante y se han desarrollado fármacos inhibidores, conocidos como *Jakinibs*, para controlar las respuestas aberrantes de dicha vía en numerosas enfermedades autoinmunes como artritis reumatoide y lupus (Schwartz et al. 2015), siendo también una estrategia utilizada para el tratamiento de la EM (Gold et al. 2013) (Giovannoni et al. 2014).

Para analizar el efecto del tratamiento prolongado en la activación de la vía de señalización JAK-STAT, se analizaron los cambios de las proteínas a nivel basal y tras la estimulación con IFN β , en pacientes con EM sin tratamiento y tratados con IFN β .

Entre las distintas subpoblaciones celulares que se analizaron, los monocitos mostraron una mayor respuesta a la estimulación *in vitro* con IFN β que las células T CD4+ y CD8+, por lo que la estimulación con IFN β parece desencadenar respuestas específicas según el tipo celular, como ya se había descrito con anterioridad en pacientes de EM (Zula et al. 2011).

En los individuos analizados en nuestro estudio, los niveles de expresión de las subunidades del receptor mostraron una variabilidad considerable al comparar individualmente unos sujetos con otros, lo que no es de extrañar si consideramos que los niveles de expresión fisiológica tanto de IFNAR1 como de IFNAR2 son muy bajos

(Cohen et al. 1995) y que, como en el caso de otras proteínas que expresan un bajo número de copias, muestran una gran variación en las concentraciones de ambas subunidades a nivel individual (Cai et al. 2006) (Raj & van Oudenaarden 2008).

Los monocitos y las células T de los pacientes con tratamiento prolongado con IFN β mostraron unos niveles basales mayores de IFNAR1 y pSTAT1, pero experimentaron una respuesta menor ante la exposición *in vitro* con IFN β . Por el contrario, los pacientes con EM sin tratamiento, que presentaron un estatus de activación basal menor, mostraron una capacidad mayor de activación de la vía a corto plazo tras el estímulo *in vitro* con IFN β . Estos resultados sugieren un fenómeno de desensibilización de la vía en los pacientes previamente tratados como consecuencia de la exposición continua al tratamiento con IFN β (François-Newton et al. 2011) (Sandler et al. 2014).

En el caso concreto de STAT1 y 2, estas proteínas no se encontraban completamente activadas de forma constitutiva, ya que la estimulación *in vitro* con IFN β incrementaba su activación en ambos grupos de pacientes. Sin embargo, la capacidad de monocitos y linfocitos T de responder al IFN β mediante la fosforilación de las STATs estaba ligeramente reducida en los pacientes previamente tratados, muy posiblemente por la desensibilización de las células al tratamiento sistémico y continuo con IFN β (Pertsovskaya et al. 2013).

Niveles de proteínas de la vía JAK-STAT en pacientes de EM según su respuesta al tratamiento con IFN β .

En cuanto a la evaluación de la vía JAK-STAT en función de la respuesta al tratamiento, los pacientes respondedores y no respondedores, no mostraron diferencias en la expresión de ninguno de los marcadores analizados en condiciones basales. Sin embargo, cuando se analizaron los niveles tras la estimulación *in vitro* con IFN β , los respondedores fueron los pacientes que reflejaron mejor la modulación de la respuesta biológica a la estimulación *in vitro* con IFN β . En este sentido, observamos que los monocitos de los pacientes respondedores experimentaron una rápida modulación a la baja de IFNAR1 en la superficie celular y una regulación al alza de la subunidad IFNAR2. Este hecho no se constató en los monocitos de los pacientes no respondedores, lo que sugiere que, en estos últimos podría producirse una desensibilización más acusada de la vía JAK-STAT como consecuencia del tratamiento prolongado con IFN β (François-Newton et al. 2011) (Sandler et al. 2014).

Esta podría ser una de las causas que justifique la ausencia de respuesta con una importante base científica, pero para confirmarla deberá ser investigada en una cohorte mayor de pacientes.

La modificación de los niveles celulares de IFNAR1 e IFNAR2 es uno de los principales mecanismos reguladores de la duración y de la intensidad de la capacidad de respuesta celular al IFN β . En este sentido, varios estudios han demostrado que el IFN β induce la endocitosis y degradación lisosomal de IFNAR1, consiguiendo así regular la señalización intracelular (Suresh Kumar et al. 2004)(Suresh Kumar et al. 2007) (Ivashkiv & Donlin 2013). Se ha descrito que, tan solo 30 minutos tras la estimulación con IFN β , se produce una regulación a la baja de IFNAR1 en algunas líneas celulares, mientras que la expresión de IFNAR2 presenta una endocitosis y degradación mucho menor y más lenta, y la magnitud de su modulación a la baja se reduce a medida que disminuye la expresión de IFNAR1 en la superficie celular (Marijanovic et al. 2007).

Además, aunque IFNAR2 es la subunidad de unión, IFNAR1 también puede interactuar con IFN β , y el complejo formado es capaz de transmitir señales al interior celular e inducir genes independientemente de IFNAR2 (de Weerd et al. 2013), un hecho relevante que podría explicar las diferencias en la respuesta al tratamiento con IFN β .

En nuestro estudio, los monocitos de los pacientes respondedores, tras la estimulación *in vitro* con IFN β , disminuyen la expresión de IFNAR1 en la superficie celular mientras que aumentan la expresión de IFNAR2. Estos datos sugieren que en los pacientes respondedores se produce una regulación diferencial de las dos subunidades del receptor. De esta forma, el aumento de la expresión de IFNAR2 en superficie podría compensar la regulación a la baja de IFNAR1 inducida por la exposición continua al IFN β , en un esfuerzo por mantener la activación de la vía de señalización JAK-STAT, lo que resultará en una activación o inhibición de los genes regulados por el IFN β .

Posteriormente, los datos obtenidos por citometría de flujo de los cambios del receptor en la superficie celular y en las fosfoproteínas justo después de la estimulación *in vitro* con IFN β , se usaron para determinar si los pacientes podrían ser agrupados según un patrón de activación de la vía de señalización JAK-STAT, para lo que se usó un análisis de agrupación jerárquico de vinculación promedio. Ello permitió

identificar en monocitos un patrón común que estaba presente en el 68.4% de los pacientes respondedores. Este patrón estaba basado en la similitud de los niveles del receptor en la superficie celular y en la expresión de las fosfoproteínas. El patrón significativamente asociado al fenotipo de buena respuesta al tratamiento con IFN β se caracterizaba por una disminución en los niveles de IFNAR1 y un aumento en los niveles de IFNAR2, pSTAT1 y pSTAT2, tras la estimulación con IFN β . En el análisis de agrupación, solo dos pacientes no respondedores se agruparon en el patrón respondedor, por lo que la ausencia de respuesta en estos dos pacientes, parece no estar relacionada directamente con la vía de señalización JAK-STAT, ni con la presencia de NAb, ya que todos los pacientes incluidos en el estudio eran negativos para NAb.

En lo relativo a la respuesta al IFN β , previamente a nuestro estudio se describió que antes de comenzar el tratamiento, a nivel basal, aquellos pacientes que posteriormente serían no respondedores, mostraban una mayor expresión de genes inducidos por el IFN β que aquellos que responderían satisfactoriamente. Sin embargo, durante el tratamiento con IFN β , la expresión de genes inducidos por el IFN β no se alteró en no respondedores, y en cambio, dichos genes estuvieron sobreexpresados en pacientes respondedores (Comabella et al. 2009) (Bustamante et al. 2011). En este mismo trabajo comprobaron que, previamente al inicio del tratamiento, los no respondedores presentaban niveles mayores de IFNAR1 y pSTAT1 en monocitos. Sin embargo, en nuestro estudio realizado con pacientes tratados, los monocitos de pacientes respondedores muestran una mayor modulación al IFN β que los monocitos de los pacientes no respondedores.

Por último, realizamos una análisis de correlación de los niveles de expresión de IFNAR1, IFNAR2, pSTAT1 y pSTAT2 con los niveles de los otros tres marcadores en células en condiciones basales y tras la estimulación *in vitro* con IFN β .

Correlaciones entre los niveles de los diferentes marcadores a nivel basal

En cuanto a las correlaciones de los niveles de proteínas a nivel basal, en controles sanos se encontró una correlación positiva entre el nivel de expresión de cada uno de los marcadores con los niveles de los otros tres en las tres subpoblaciones, menos en los niveles de pSTAT1 que no se correlacionaban con los de IFNAR1, IFNAR2 y pSTAT2 en los linfocitos CD8 $^{+}$ y tampoco hubo correlación entre los niveles de IFNAR1 y pSTAT2 e IFNAR2 y pSTAT1 en los monocitos. El

hecho de no encontrar correlaciones en algunos de los marcadores, podría deberse a un tamaño muestral demasiado pequeño para alcanzar significación (n=12). Por el contrario, en la cohorte de pacientes de EM sin tratamiento, los niveles basales de todos los marcadores correlacionaron fuertemente y de forma positiva con la expresión de los otros marcadores en las tres subpoblaciones celulares. Sorprendentemente, en el grupo de pacientes tratados con IFN β , muchas de esas correlaciones perdieron la significación, ya que en ninguna de las subpoblaciones los niveles de IFNAR1 se correlacionaron con niveles de IFNAR2 y tampoco se correlacionaron los niveles de IFNAR1 con los de pSTAT1 o pSTAT2. Esta pérdida de correlación sugiere que el tratamiento con IFN β estaría modificando los niveles basales de esos marcadores o alterando el equilibrio de los niveles de expresión. En este sentido, se ha descrito que la unión de los interferones tipo I con su receptor, induce la internalización y degradación de IFNAR1 mediante la proteólisis lisosomal del receptor (Constantinescu et al. 1994) (Fantuzzi et al. 1997) (Gauzzi et al. 2002) (Marijanovic et al. 2007) (Liu et al. 2008), mientras que la expresión de IFNAR2 muestra a nivel basal una internalización y degradación más lenta (Marijanovic et al. 2007).

Según la respuesta terapéutica al IFN β , tanto en pacientes respondedores como en los no respondedores, los niveles de pSTAT1 se correlacionaron con los de pSTAT2 en las tres subpoblaciones a nivel basal, y los niveles de IFNAR1 se correlacionaron con los niveles de pSTAT1 y pSTAT2 en las células T.

Correlaciones entre los niveles de los diferentes marcadores tras estimulación con IFN β .

Tras analizar las correlaciones a nivel basal, evaluamos las correlaciones existentes tras la activación *in vitro* con IFN β . Las correlaciones entre los niveles de IFNAR1, IFNAR2, pSTAT1 y pSTAT2 con los niveles de los otros tres marcadores se perdieron en gran medida en las células estimuladas en comparación con las células a nivel basal, este hecho se produjo tanto en el grupo de controles sanos, como en el de los pacientes de EM sin tratamiento y tratados.

Brevemente, la correlación más consistente y reproducible entre los diferentes grupos tras el estímulo *in vitro* con IFN β fue la de los niveles de IFNAR1 con IFNAR2: en los controles sanos se mantuvo en los linfocitos CD4+; en los pacientes no

tratados en las tres poblaciones celulares; y en los pacientes tratados, en ambas subpoblaciones de linfocitos T CD4+ y CD8+.

Cuando se analizaron las correlaciones en las células estimuladas en función de la respuesta terapéutica se reprodujo la correlación de la expresión de IFNAR1 e IFNAR2 en las células T CD4+ de los pacientes respondedores.

Así pues, los datos obtenidos en el primer objetivo de esta tesis sugieren que, al menos parcialmente, la ausencia de respuesta terapéutica al IFN β podría explicarse por una activación diferencial de la vía JAK-STAT entre los pacientes respondedores y los no respondedores. Sin embargo, la señalización de la vía JAK-STAT por sí sola no sería suficiente para explicar todos los efectos biológicos de los interferones tipo I. Debemos tener en cuenta que los mecanismos moleculares involucrados en la respuesta terapéutica al IFN β aún no están aclarados en su totalidad, y en este sentido, sería interesante continuar estudiando otras quinasas alternativas u otros factores de transcripción involucrados en las vías de señalización y de regulación del IFN β .

Con todo ello, no parece evidente poder establecer un biomarcador único de respuesta al tratamiento con IFN β , debido a la propia complejidad patológica de la EM y a la heterogeneidad de los pacientes en la respuesta a la terapia. El enfoque llevado a cabo en este estudio ha permitido asociar un fenotipo clínico de buena respuesta al tratamiento con IFN β con un "patrón funcional de la vía de señalización" en monocitos. La realización de un estudio incluyendo un número mayor de pacientes y un número mayor de elementos de la vía, incluyendo los inhibidores, permitiría diseccionar con más detalle el papel de la vía de señalización JAK-STAT en la respuesta terapéutica al IFN β .

6.2 Objetivo II

Como ya se ha mencionado con anterioridad, el funcionamiento correcto de la cascada de señalización JAK-STAT tras la interacción del IFN β con su receptor es fundamental para iniciar la transcripción de los genes inducibles por IFN β . Así, en algunos pacientes con EM tratados con IFN β , la vía de señalización JAK-STAT puede ser interrumpida por el desarrollo de anticuerpos neutralizantes (NAbs), al tratarse de fármacos que pueden ser inmunogénicos. Estos anticuerpos está dirigidos frente a

residuos concretos utilizados por el interferón para interactuar con su receptor, bloquean dicha unión e impiden que éste ejerza su función biológica, reflejándose en un fracaso terapéutico (Govindappa et al. 2015).

Numerosos ensayos clínicos han demostrado que el desarrollo de NAbs se asocia con una disminución en la biodisponibilidad del IFN β y una disminución en la inducción de sus genes de respuesta (Deisenhammer 2009), así como en una menor respuesta clínica determinada por RM o progresión de la enfermedad (Namaka et al. 2006) (Noronha 2007). De hecho, los intentos por verificar si la administración repetida de altas dosis de IFN β -1b intravenoso en pacientes con EM y presencia de NAbs era capaz de inducir tolerancia y restaurar la biodisponibilidad del fármaco no han sido satisfactorios puesto que, aunque se logró mejorar la biodisponibilidad con 4 inyecciones semanales, no se indujo tolerancia hacia el IFN β y los títulos de NAbs no se modificaron (H. Hegen et al. 2014).

Aunque existe cierta controversia sobre su utilización en la práctica clínica y su análisis no se realiza de rutina, la detección de NAbs es uno de los biomarcadores más aceptados para la monitorización de la respuesta al tratamiento con IFN β (Comabella & Montalban 2014). Es por ello que el segundo objetivo de esta tesis Doctoral consistía en evaluar la implicación de los NAbs en la activación de vía de señalización JAK-STAT.

Existe un alto grado de reactividad cruzada entre los anticuerpos neutralizantes anti-IFN β -1a y anti-IFN β -1b, de forma que los NAbs generados frente a una molécula concreta de IFN β pueden reconocer y neutralizar las moléculas de las otras preparaciones de IFN β (Kivisäkk et al. 2000).

En este sentido, la existencia de un banco de sueros de pacientes con EM, con datos de anticuerpos neutralizantes frente a las diferentes moléculas de IFN β , disponible en nuestro instituto, nos ha permitido realizar un estudio donde evaluamos la reactividad cruzada de los NAbs frente a distintas preparaciones de IFN β , y si esta se asociaba o no al título de anticuerpos neutralizantes. Para ello se clasificaron los sueros según su título de NAbs como altos, intermedios y bajos, y se evaluó cuántos de ellos presentaban reactividad cruzada. Así observamos que existe una relación directa entre la reactividad cruzada y el título de anticuerpos, ya que la totalidad de los pacientes que tenían títulos altos de NAbs presentaron reactividad cruzada, mientras que este hecho solo ocurrió en el 37% de los pacientes con títulos bajos. Mediante un

análisis de regresión logística, se comprobó que los pacientes con títulos medios-altos tienen un riesgo significativo 77,54 veces mayor de presentar reactividad cruzada que los pacientes con títulos bajos.

Este hecho tiene su importancia en la clínica ante una eventual decisión de cambio terapéutico. Nuestros datos demuestran que los anticuerpos generados por un paciente frente a una molécula son capaces de neutralizar las otras moléculas de interferón. Por tanto, si un paciente tiene títulos altos de NAbs, no se recomienda el cambio de tratamiento de un interferón por otro, ni el aumento de dosis. Estos datos apoyan las recomendaciones o guías consenso publicadas sobre el uso clínico de NAbs en el tratamiento con IFN β , en las que no se aconseja el cambio de un tipo de IFN β por otro cuando los NAbs están presentes (Polman et al. 2010) y contradicen los estudios que niegan la existencia de reactividad cruzada en los NAbs (Myhr et al. 2000).

Existen numerosas publicaciones que describen el desarrollo de NAbs en pacientes con EM. Sin embargo, hay escasos trabajos publicados donde se evalúe la reactividad cruzada de los NAbs (Khan & Dhib-Jalbut 1998) (Antonelli et al. 1999) (Bertolotto et al. 2000). Incluso estudios más recientes evalúan esta reactividad cruzada mediante la detección de los anticuerpos de unión al IFN β (BAbs) en lugar de analizar los anticuerpos neutralizantes (NAbs) que son los que realmente impiden la actividad biológica del IFN β (Zare et al. 2013; Wencel-Warot et al. 2016). El estudio de reactividad cruzada de los NAbs realizado en esta tesis doctoral es el que incluye un mayor número de muestras analizadas (con más de 900 sueros de los que 88 tenían NAbs), proporcionando la consiguiente relevancia a nuestros resultados.

A continuación, demostramos que la presencia de NAbs inhibía específicamente la fosforilación de STAT1 y por tanto la vía JAK-STAT en monocitos, linfocitos T CD4+ y CD8+. Los anticuerpos generados frente a una molécula de IFN β , inhibieron la fosforilación que se produjo tras la estimulación *in vitro* con otras moléculas de IFN β , lo que corrobora los datos de reactividad cruzada obtenidos por el bioensayo, en el que el 100% de los sueros con títulos altos de NAbs presentaban reactividad cruzada. En el experimento *in vitro* todos los pacientes que tenían anticuerpos generados frente a la molécula de IFN β con la que estaban siendo tratados, neutralizaron la activación inducida por las otras moléculas de IFN β utilizadas en el ensayo. Como era de esperar, este hecho no se observó en presencia de un suero heterólogo sin NAbs.

En este sentido, es necesario comentar que, previo a la realización de los estudios *in vitro* con NAbs que se presentan en esta tesis, se realizaron experimentos adicionales utilizando sueros heterólogos de pacientes con NAbs y sin NAbs. Con ello comprobamos que un suero heterólogo con anticuerpos era capaz de inhibir la activación de STAT1 en células de un paciente diferente, hecho que no se producía con un suero heterólogo sin NAbs.

Los bioensayos detectan la presencia de los NAbs en el suero de los pacientes con EM, pero no revelan los efectos inmunogénicos de los NAbs en el paciente en particular, hecho que sí se consigue en el ensayo *in vitro* de inhibición de pSTAT1 (Gavasso et al. 2012). La realización del estudio *in vitro* evidencia claramente que la presencia de NAbs bloquea la vía del IFN β e impide que este ejerza su actividad biológica, por lo que los NAbs pueden contribuir al fallo terapéutico en los pacientes que desarrollan estos anticuerpos.

Para evaluar la inhibición de la fosforilación de STAT1 *in vitro* según el título de NAbs, se realizó un experimento posterior donde se utilizaron diluciones de un suero autólogo con títulos altos de NAbs, de forma que se evaluó la activación de STAT1 en presencia de títulos altos, medios y bajos de NAbs en las tres subpoblaciones celulares y con tres concentraciones de IFN β diferentes. Analizando los cuatro pacientes de forma conjunta, la tendencia es muy clara, disminuyendo los niveles de pSTAT1 en presencia de títulos altos y medios de NAbs en las tres subpoblaciones y en las tres concentraciones de IFN β aunque no se alcance la significación estadística por el escaso tamaño muestral.

Además, es en los monocitos donde se observa la mayor inhibición de pSTAT1 en presencia de NAbs, encontrándose diferencias significativas entre el porcentaje de inhibición obtenido con títulos altos de anticuerpos respecto al porcentaje de inhibición obtenido con títulos bajos. En consonancia con los resultados del primer objetivo de esta tesis doctoral, los monocitos alcanzan una mayor respuesta a la estimulación *in vitro* con IFN β que las células T CD4+ y CD8+, y es también en los monocitos donde mejor se observa la inhibición de la vía JAK-STAT en presencia de NAbs.

Por último, se realizó una curva de activación de STAT1 en presencia de diluciones seriadas de NAbs, demostrando que la activación de STAT1 es inversamente proporcional al título de anticuerpos, de forma que esta es menor en presencia de títulos altos de anticuerpos y encontramos una correlación negativa

entre el porcentaje de células positivas para pSTAT1 y el título de NAbs en monocitos, pero también en los linfocitos T CD4+.

Con todo lo expuesto anteriormente, podemos afirmar que los NAbs neutralizan la acción del IFN β inhibiendo la activación de la vía de señalización JAK-STAT, entre otras posibles. Por tanto, los NAbs generados en aquellos pacientes tratados con IFN β , pueden contribuir a una respuesta subóptima al tratamiento. Este estudio apoya las recomendaciones de algunos autores a monitorizar la presencia de NAbs desde el comienzo del tratamiento con IFN β , aún cuando no existan evidencias clínicas de actividad en los pacientes (Creeke & Farrell 2013), y no sólo cuando se obtengan indicios de una falta de respuesta tras 12 meses de tratamiento, como proponen otros autores (Bertolotto 2015). Por ello, sería recomendable proponer una alternativa terapéutica dentro del amplio abanico existente en la actualidad para la EM, a aquellos pacientes que desarrollen NAbs, evitando el riesgo a ser tratados durante meses o años con un fármaco que va a presentar escasa biodisponibilidad y una eficacia limitada ya que los anticuerpos neutralizantes generados van a inhibir las principales vías de señalización del IFN β .

En este sentido, la detección de NAbs, no solo es importante por la disminución de la eficacia del tratamiento con IFN β exógeno, sino que también puede neutralizar la acción del IFN β endógeno. Tal y como se ha demostrado en un estudio reciente donde muestran que las propiedades antivirales del IFN β endógeno se ven afectadas por la presencia de NAbs, mediante la inhibición de vías de señalización endógenas (Fine et al. 2015).

Finalmente, en cuanto a la metodología, como se explica en el apartado de introducción, la OMS recomienda el uso del test del efecto citopático (CPE) o bioensayo, siendo el método de referencia con el que comparar los otros métodos. Sin embargo, este tiene algunos detractores puesto que se trata de una metodología compleja, que requiere personal cualificado y la utilización de virus. Es por ello que se han propuesto otros métodos alternativos basados en la inducción de proteína A (MxA) por el IFN β , en el que la expresión del gen se cuantifica por reacción en cadena de la polimerasa (PCR) a tiempo real (Bertolotto et al. 2007). Otro método es el llamado ensayo del gen informador (del inglés "The reporter gene assay") (Farrell et al. 2008) que utiliza una línea celular transfectada con el gen de la luciferasa, que se

expresa en presencia de IFN β . La luciferasa producida se cuantifica por la quimioluminiscencia producida, que se vería reducida en presencia de NAbs.

Además, en el estudio realizado por Gavasso et al. proponen la cuantificación de pSTAT1 para detectar NAbs debido a que los niveles de pSTAT1 obtenidos por citometría de flujo presentan una menor variabilidad que los datos de expresión génica de MxA, prediciendo mejor el impacto de los NAbs (Gavasso et al. 2014). Por nuestra experiencia, consideramos que el bioensayo debe continuar como el método de referencia para la detección de NAbs. Aunque, los resultados del estudio *in vitro* donde demostramos que la activación de pSTAT1 es inversamente proporcional al título de anticuerpos, nos lleva a considerar esta metodología como una alternativa al bioensayo para la detección de NAbs. Por supuesto, para llevarla a la práctica de clínica, previamente habría que realizar una validación analítica de la técnica y realizar el estudio incluyendo un número mayor de pacientes, pero los resultados obtenidos en este trabajo son concluyentes en cuanto a que la presencia de NAbs inhibe la activación de pSTAT1, sobre todo en monocitos.

6.3 Objetivo III

El tercer objetivo de esta tesis doctoral consistió en la identificación de perfiles de expresión génica diferenciales asociados a respuesta clínica al tratamiento con IFN β . Para ello se realizó un análisis mediante microarrays de expresión del genoma completo en pacientes con EM, a diferentes tiempos tras la administración del IFN β , lo cual permitió la identificación de un gran número de genes expresados diferencialmente entre pacientes respondedores y no respondedores a este fármaco.

Con el fin de maximizar la homogeneidad de los resultados, se consideraron varias cuestiones. Los 9 pacientes reclutados fueron cuidadosamente seleccionados tras una exhaustiva revisión de historias clínicas, para obtener una población lo más homogénea posible desde un punto de vista demográfico y clínico, diferenciándose exclusivamente por la respuesta terapéutica al IFN β . La respuesta se evaluó al año del inicio de tratamiento, momento en el que se realizó también la extracción de las muestras. Se tuvo la precaución de recoger la sangre en tubos específicos que evitaran la degradación del muy lábil ARNm mediante la inhibición de ARNsas (Thach et al. 2003). Además, lo más destacable del estudio, teniendo en cuenta que el

transcriptoma está muy influenciado por las condiciones fisiológicas y por el medio ambiente (Van Den Elsen et al. 2014), fue su diseño, que se concibió para analizar los cambios de expresión de los genes justo antes de la administración del fármaco y en un intervalo de tiempo muy corto tras su administración (4, 12 y 24 horas), permitiendo atribuir los cambios observables casi exclusivamente a la acción del IFN β . Aunque varios estudios han analizado el efecto del tratamiento con IFN β a largo plazo (Malhotra et al. 2011) (Hecker et al. 2013) pocos evalúan su efecto a corto plazo, como en el trabajo que aquí mostramos.

Para evaluar la cinética de expresión temporal de los genes tras la administración de IFN β sistémico, la primera aproximación realizada fue un análisis no supervisado de componentes principales, en el que se determinó cómo se agrupaban los pacientes entre sí, sin indicar previamente a qué grupo estaban asignados. Este análisis mostró, analizando todos los tiempos a la vez, una separación relativa de los pacientes respondedores y no respondedores. Al realizar un análisis más discriminativo en cada tiempo, se observó una separación mayor entre ambos grupos de pacientes a las 12 horas, que se mantuvo 24 horas tras la administración del IFN β sistémico. Esto confirmaba una expresión génica diferencial en función de la respuesta al IFN β , que se hacía más evidente transcurridas 12 horas de la administración del IFN β sistémico.

Posteriormente, se realizó un análisis supervisado, incluyendo la totalidad de los pacientes (independientemente de la respuesta al tratamiento), y estableciendo unos criterios de aceptación de tasa de cambio (Fold Change) ≥ 2 en la expresión del gen a un determinado tiempo con respecto a la expresión basal de ese mismo gen, con una *p* ajustada para comparaciones múltiples ≤ 0.05 , de forma que pudiéramos identificar aquellos genes cuya expresión hubiera experimentado un mayor cambio de forma significativa. Con este análisis se identificaron 1315 genes expresados diferencialmente (DEG). A las 4 horas tras la inyección ya se observó un número importante de DEG con respecto a la determinación basal, obteniéndose el máximo de expresión diferencial a las 12 horas tras la administración del fármaco y reduciéndose el número de DEG radicalmente a las 24 horas. Esta cinética de expresión concuerda con los resultados obtenidos en varones sanos, publicados en un estudio previo donde se observaron niveles máximos de expresión génica tras 6-12 horas de una única inyección de IFN β -1b, revertiendo al nivel basal a las 48 horas (Hilpert et al. 2008). Aunque la comparación de datos de expresión génica entre

estudios es complicada, debido a los diferentes diseños seguidos, se sabe que la administración del IFN β desencadena un inicio rápido en la expresión génica. En este sentido, los estudios que han evaluado el efecto a corto plazo tras la inyección en pacientes de EM, también han encontrado que el pico de los DEG se produce entre las 6 y 18 horas (Croze et al. 2013).

Recientemente, en un trabajo realizado en una cohorte de 228 pacientes con EM se ha identificado una "firma" con los 25 genes con mayor expresión diferencial tras la administración de IFN β [*IFI44L*, *RSAD2*, *IFI27*, *OAS3*, *IFIT1*, *IFI44*, *EPSTI1*, *HERC5*, *OAS1*, *MX1*, *OAS2*, *USP18*, *SPATS2L*, *IFIT3*, *OASL*, *DDX60*, *LY6E*, *IFI6*, *LAMP3*, *RTP4*, *HERC6*, *SERPING1*, *CMPK2*, *CXCL10* e *IFIT2*] (Harari et al. 2015). De estos 25 genes, en nuestro estudio, el gen *IFI27* no se encontró diferencialmente expresado con un FC>2 en ninguno de los tiempos, 5 genes se encontraron diferencialmente expresados a las 4, 12 y 24 horas (*OAS2*, *IFI6*, *LAMP3*, *HERC6* y *SERPING1*), y los 20 restantes a las 4 y 12 horas.

Los 1315 genes diferencialmente expresados incluían genes implicados en la respuesta inmune como antígenos de superficie leucocitaria (*CD14*, *CD164*, *CD247*, *CD274*, *CD2AP*, *CD300A*, *CD300C*, *CD300E*, *CD38*, *CD40*, *CD68*, *CD82*, *CD97*, *LILRA4*, *LILRA5*, *LILRB1*, *LILRB2*, *LILRB3*, *LILRB4* y *LILRB5*), proteínas transportadoras de antígeno (TAP1), citoquinas (*IL15*, *IL1B*, *IL23A*, *IL27*, *IL411* y *IL8*), quimioquinas (*CCL1*, *CCL2*, *CCL7*, *CCL8*, *CXCL1*, *CXCL10*, *CXCL11*, *CXCL16* y *CXCL6*), y receptores de ambas (*IL11RA*, *IL15RA*, *IL1RN*, *IL3RA*, *IL7R*, *IFNGR1*, *CXCR4*, *CXCR6*, *CCR1*, *CCR2*, *CCRL2*, *CMKLR1*, *CXCR2P1* y *CXCR3*), así como genes implicados en la defensa antiviral (*BST2*, *DDIT4*, *APOBE3A*, *APOBE3F*, *TRIM38*, *ZC3HVA1*, *OAS1*, *OAS2*, *OAS3* y *OASL*), genes proapoptóticos (*TNFSF10*, *FAS* y *BCL2L14*), caspasas (*CASP1*, *CASP10*, *CASP4*, *CASP5* y *CASP7*) y proteínas reclutadoras de caspasas (*CARD16*, *CARD17* y *CARD6*). También se encontraron genes que expresaban proteínas de choque térmico (*HSPA1A*, *HSPA1B*, *HSPA6*, *HSPB1* y *HSPB9*), y genes implicados en la ubiquitinación de proteínas o reguladores de la misma (*ISG15*, *RIPK1*, *MARCH1*, *NUB1*, *RNF138*, *UBA7*, *UBE2L6*, *UBE2S*, *UBFD1*, *UBQLNL*, *USP15*, *USP18* y *USP25*). Como era de esperar, entre estos 1315 DEG también se encontraban gran parte de los genes que regulan la cascada de señalización mediada por los IFN tipo I (*ZBP1*, *STAT1*, *STAT2*, *SOCS1*, *USP18*, *SAMHD1*, *SP100*, *IRF1*, *IRF2*, *IRF7*, *IRF9*, *IFI16*, *IFI30*, *IFI35*, *IFI44*, *IFI44L*, *IFI6*,

IFIH1, IFIT1, IFIT2, IFIT3, IFIT5, IFITM1, IFITM2, IFITM3, IFITM4P, MX1, MX2, OAS1, OAS2, OAS3, OASL y XAF1)

Muchos de estos genes han sido encontrados diferencialmente expresados en respuesta a la administración del IFN β en otros estudios, aunque la metodología de los trabajos los hace difícilmente comparables entre sí porque, o bien difieren en la subpoblación celular elegida para la determinación de la expresión génica (sangre total vs. células mononucleares de sangre periférica), en la exposición al IFN β (*in vivo* vs. *in vitro*), o en la franja temporal en la que se realiza la determinación tras la exposición al IFN β (Wandinger et al. 2001)(Stürzebecher et al. 2003)(Weinstock-Guttman et al. 2003) (Rivett & Hearn 2004) (Fernald et al. 2007) (Singh et al. 2007) (Riedl & Salvesen 2007) (Rani et al. 2007).

En una segunda fase, realizamos un análisis para ver aquellos genes que al menos duplicaran su expresión entre el grupo de R y NR, o viceversa, en cada uno de los tiempos, encontrando 28 genes que duplicaban su expresión en R y 69 que lo hacían en NR para alguno de los tiempos. Observamos que, basalmente, antes de la administración del IFN β sistémico, los R duplicaban la expresión de 17 genes y los NR de 19 genes. En el caso de los R, 8/17 genes (*S100P, XIST, FAM3B, DEFA3, DEFA4, ELANE, ORM1* y *ORM2*) seguían duplicando la expresión con respecto a los NR a las 12 y/o 24h. Estos genes mayoritariamente están implicados en el sistema inmune. En el caso de los NR, 16/19 genes (*DDX3Y, DSP, EIF1AY, KDM5D, KRT72, LAIR2, MDGA1, RPS4Y1, RPS4Y2, SLC1A7, TCL1A, TMEM176A, TMEM176B, TUBB2A, TXLNG2P* y *USP9Y*) mantenían la expresión duplicada con respecto a los R a las 4, 12 y 24h. Entre ellos encontramos genes implicados en la cascada de señalización PI3K/Atk, en el metabolismo proteico (proteínas ribosómicas o peptidasas) y en el sistema inmune. De replicarse estos datos con un mayor tamaño muestral, estos 24 genes podrían formar parte de una firma genómica que nos permitiera diferenciar a aquellos pacientes que van a responder de forma óptima al tratamiento con IFN β de los que no lo van a hacer, ya que su expresión se modifica de forma reproducible en el tiempo independientemente de la presencia o no del tratamiento.

Otros 11 genes (*CEACAM8, CHRM4, CTSG, RNF182, OLFM4, CD274, CES1, CLEC4F, DDX58, LPAR1* y *ZFP57*) implicados en el sistema inmune, el metabolismo y la señalización a través de receptores acoplados a proteínas G, duplicaban su

expresión en R con respecto a los NR en alguno de los tiempos tras la administración del IFN β .

De los genes que duplicaban su expresión en NR respecto a R tras la administración del IFN β sistémico, son de destacar los genes relacionados con la citólisis y el sistema inmune como los receptores KIR (*KIR2DL2*, *KIR2DS2*, *KIR2DS3*, *KIR2DS4*), la *perforina 1*, *granulisina* y las *granzimas A*, *B* y *H* (proteínas de los gránulos citotóxicos de las células NK) y genes específicos de células B (*CD22* y *BLK*).

Es difícil aventurar por qué unos pacientes regulan al alza un grupo de genes y otros no. Los resultados encontrados deben administrarse con cautela hasta que sean replicados en una cohorte mayor, pero es probable que nos permitan definir un perfil de expresión génica capaz de discriminar entre R y NR al tratamiento con IFN β .

Posteriormente, se analizaron los genes en cada grupo de pacientes a lo largo del tiempo, para ver cómo modificaban su expresión con respecto a la expresión basal. Primero se realizó un análisis T-test para dos muestras y, posteriormente, debido al pequeño tamaño muestral se consideró más adecuado utilizar el análisis de *rank-products*.

Observando los diagramas de Venn del análisis de Rank Product podemos extraer numerosas conclusiones. En primer lugar, la mayoría de los genes sufren una regulación al alza de su expresión tras la administración del IFN β (330, 454 y 111 genes a las 4, 12 y 24 horas, respectivamente, frente a 29 genes regulados a la baja a las 4 horas, 38 a las 12 horas y 6 a las 24 horas). La segunda es que, para cada tiempo, en el grupo de los respondedores se modifica un mayor número de genes que en el de los no respondedores (a las 4 horas: 342 vs. 280; a las 12 horas: 473 vs. 262; y a las 24 horas: 116 vs. 36). En tercer lugar, podemos observar que es en la zona común (DEG tanto en respondedores como en no respondedores) donde se acumulan el mayor número de genes diferencialmente expresados, y que lo hacen de forma temprana, ya que hay 263 DEG a las 4h, 243 a las 12 horas y 35 a las 24 horas. Los pacientes no respondedores apenas expresan unas decenas de genes exclusivos: 17 a las 4 horas, 19 a las 12 horas y 1 a las 24 horas, mientras que los pacientes respondedores fueron capaces de expresar de forma exclusiva un mayor número de genes: 79 a las 4 horas, 230 a las 12 horas y 81 a las 24 horas. Entre los 79 genes DEG a las 4 horas, y los 81 DEG a las 24 horas en el grupo de los

respondedores, se encuentran muchos de los genes que a las 12 horas estaban en la zona común, lo que nos está indicando que los pacientes con una respuesta óptima al IFN β son capaces de modificar la expresión génica de una forma más temprana y más duradera en el tiempo.

Entre los genes diferencialmente expresados en la zona común a las 4 y 12 horas cabe destacar los del grupo de proteínas antivirales: *Mx1*, *Mx2*, *OAS1*, *OAS2*, *OAS3* y *OASL*; metalotioneinas: *MT1A*, *MT1B*, *MT1E*, *MT1H*, *MT1L*, *MT1X* y *MT2A*; quimioquinas: *CCL1*, *CCL2*, *CCL8* y *CXCL10*; citoquinas y receptores: *IL27*, *IL411*, *IL1RN* y *TNFSF10*; y proteínas implicadas en la vía de señalización de interferones tipo I: *USP18*, *MX2*, *IFIT1*, *IFIT3*, *IFI6*, *IFI35* e *ISG15* (exclusivamente a las 12 horas: *STAT1*, *STAT2*, *SOCS1*, *MX1*, *OAS*, *1ISG20*, *OAS2*, *OAS3*, *OASL*, *IFIT2*, *IRF2*, *IRF5*, *IRF7*, *IFITM1*, y *XAF1*); efectores de la respuesta inmune innata (*AIM2*, *APOBEC3A*, *APOBEC3B*, *APOBEC3F*, *APOL1*, *BST2*, *C1QA*, *C1QB*, *C2*, *CCL1*, *CCL2*, *CCL7*, *CCL8*, *CD300E*, *CFB*, *DDX58*, *DDX60*, *DEFB1*, *DHX58*, *EIF2AK2*, *GBP1*, *GBP5*, *GCH1*, *HERC5*, *IFI16*, *IFI35*, *IFI6*, *IFIH1*, *IFIT1*, *IFIT2*, *IFIT3*, *IFIT5*, *IFITM1*, *IFITM3*, *IL27*, *IRF2*, *IRF5*, *IRF7*, *ISG15*, *ISG20*, *JAK2*, *LGALS9*, *MARCO*, *MB21D1*, *MICB*, *MT2A*, *MX1*, *MX2*, *NCF1*, *NMI*, *NOD1*, *NUB1*, *OAS1*, *OAS2*, *OAS3*, *OASL*, *PML*, *RSAD2*, *SERPING1*, *SIGLEC14*, *SIGLEC16*, *SP100*, *STAT1*, *STAT2*, *TLR7*, *TRIM14*, *TRIM21*, *TRIM22*, *TRIM25*, *TRIM5*, *TRIM56*, *UNC93B1*, *XAF1*, *ZBP1*, *ZC3HAV1*). Aunque estos genes se expresaron diferencialmente en ambos grupos con respecto a las determinaciones basales, la tasa de cambio fue mayor en los pacientes respondedores que en los no respondedores, lo que sugiere que ambos grupos de pacientes activan las vías clásicas inducidas por IFN β , pero las diferencias en la respuesta al tratamiento podrían deberse a la transcripción de los genes a diferentes niveles, lo que se traduciría probablemente en diferentes concentraciones de proteínas efectoras.

La mayoría de los estudios de transcriptómica a gran escala muestran que los pacientes no respondedores presentan una expresión alterada de los genes de respuesta al IFN β , tanto antes del inicio del tratamiento, como tras un tratamiento continuado (van Baarsen et al. 2008) (Comabella et al. 2009) (Rudick et al. 2011) (Ratzer et al. 2013). Algunos de estos estudios muestran diferencias, en la expresión de los genes de la vía de señalización del IFN β , y de la vía de señalización de los receptores tipo Toll en los monocitos de los no respondedores (Bustamante et al. 2011) (Bustamante et al. 2013). En concreto, Bustamante et al. encontraron una

disminución en la expresión basal de *IRAK3*, un regulador negativo de la señalización por *TLR4* en respondedores. A diferencia de nuestro trabajo, éstos se realizaron en pacientes con EM que no habían iniciado el tratamiento con IFN β , mientras que nuestra cohorte de pacientes llevaba un año de tratamiento, por lo que los resultados no son comparables. En nuestro estudio, el gen *IRAK3* no se encontró diferencialmente expresado, pero otros genes de la cascada de señalización de los receptores tipo Toll como *TLR7*, *UNC93B1*, *IRF7*, *RSAD2* y *MAP2K6* se encontraban diferencialmente expresados en ambos grupos de pacientes a las 4 y 12 horas, y *NOD1* exclusivamente en respondedores a las 12 horas.

Recientemente, en un estudio de transcriptoma de sangre total por secuenciación de ARN de nueva generación, en pacientes con EM tratados con IFN β , se validó un único marcador. Este marcador era la proteína ribosómica S6, cuya expresión se encontraba disminuida en respondedores (definidos por su capacidad para inducir la expresión de *MxA*) (Parnell et al. 2014). En nuestro trabajo, no hemos encontrado diferencialmente expresado este gen. Sin embargo, antes de aplicar el estímulo con el IFN β sistémico, los respondedores presentaban una expresión disminuida del gen de la proteína ribosómica S4, asociada a Y tipo1 (*RPS4Y1*) y tipo 2 (*RPS4Y2*) en comparación con los no respondedores. Tras el tratamiento sistémico con IFN β , el gen de la proteína ribosómica L28 (*RPL28*) aumentaba su expresión a las 4 y 12 horas de la administración del IFN β en respondedores, y el gen de la proteína ribosómica del ARN 18S (*RNA18S5*) aumentaba su expresión también de forma exclusiva en los respondedores a las 12 y 24 horas de administración del fármaco.

Otros autores han investigado el papel de la expresión génica de inflamomas como *AIM2*, *NLRC4*, *NLRP1* y *NLRP3*, y citoquinas relacionadas (*IL1B*, *IL10* e *IL18*) en la respuesta al IFN β en pacientes con EMRR. En estos estudios observaron que los niveles de expresión génica de *NLRP3* e *IL1B*, antes de iniciar el tratamiento con IFN β , se encontraban elevados significativamente en PBMC de aquellos pacientes que serían no respondedores, en cambio los niveles de *NLRP3* e *IL1B* aumentaban exclusivamente en los pacientes que posteriormente serían respondedores al tratamiento (Malhotra et al. 2015). Aunque los diseños de los estudios no son comparables, en nuestro trabajo, el gen *AIM2* aparece diferencialmente expresado tanto en respondedores como en no respondedores a las 4 y 12 horas de administrar el IFN β , la expresión de *IL8* está diferencialmente disminuida de forma exclusiva en

respondedores a las 4 y 12 horas, y los genes *NLRC4*, *NLRP1*, *NLRP3*, *IL1B* e *IL10* no superan la tasa de cambio ≥ 2 .

En otros trabajos se identificaron *IFI27*, *CCL2* y *CXCL10* como los biomarcadores más sensibles de respuesta al IFN β (Sellebjerg et al. 2009). En nuestro estudio, el gen *IFI27* se encontró diferencialmente expresado en respondedores a las 24 horas, mientras que *CCL2* y *CXCL10* se expresaron en la zona común en los 3 tiempos.

Como hemos comentado anteriormente, es tarea casi imposible comparar los marcadores validados en cada trabajo, ya que los diseños de los diferentes estudios son completamente diferentes y haría falta una estandarización en los estímulos y tiempos de recogida de muestras tras los mismos, así como en los criterios de respuesta al tratamiento.

Tras analizar funcionalmente los DEG mediante la ontología de genes (GO), se observó que las diferencias en la cinética de expresión génica entre respondedores y no respondedores se traducían también en la inducción de diferentes procesos biológicos. Como era de esperar, los pacientes respondedores modificaban un mayor número de términos GO, principalmente a las 12 horas. En este tiempo, se identifican numerosos términos GO modificados conjuntamente en ambos grupos de pacientes, pero en los que los respondedores expresan adicionalmente un grupo de genes exclusivos de ellos, es decir, en general, son capaces de expresar de forma diferencial un mayor número de genes de cada proceso biológico. Algunos términos GO con mayor número de DEG en los pacientes respondedores fueron la respuesta inflamatoria (GO: 0006954), respuesta inmune innata (GO: 0045087), procesos inmunes efectoros (GO: 0002252), respuesta defensiva a virus (GO: 0051607), respuesta celular a virus (GO: 0098586) o vía de señalización del IFN γ (GO: 0060333) y respuesta al IFN γ (GO:0034341). Además, como era de esperar, se modificó la expresión de genes relacionados con los términos del GO relativos a la producción, señalización y respuesta a IFN α e IFN β . Son términos lógicos si pensamos en la actividad inmunomoduladora y antiviral inducida por el IFN β . Si nos centramos en la vía de señalización mediada por interferones tipo I (GO: 0060337), que viene siendo objeto de estudio en esta tesis doctoral, a las 12 horas se modificaron diferencialmente 23 genes tanto en los pacientes respondedores como en los no respondedores, 2 exclusivamente en respondedores y solo uno en los no respondedores.

En general, a todos los tiempos tras la administración del IFN β , los pacientes respondedores fueron capaces de modificar la expresión de un mayor número de genes en comparación con la expresión basal y, además, con mayor intensidad.

Hasta la fecha, se ha realizado la replicación de los datos del microarray por PCR a tiempo real, que es la metodología más comúnmente utilizada para su replicación (Morey et al. 2006). A tal efecto se seleccionaron cinco genes implicados en la vía de señalización del IFN β y se determinó por PCR a tiempo real su expresión, en las mismas muestras donde se realizó el array. La expresión de STAT1 y STAT2 aumentó significativamente en respondedores y no respondedores mientras que la expresión de TyK2 no se modificó, presentando por tanto, el mismo patrón obtenido en el array. Igualmente, el gen IRF9 en el array, aumentó su expresión pero no superó el FC>2 en ninguno de los grupos de pacientes. Este patrón se replicó por PCR a tiempo real aumentando su expresión tras la inyección con IFN β pero no alcanzando la significación en ningún grupo. Por su parte, el gen OAS1 que se encontró diferenciado a las 4 y 12 horas en ambos grupos de pacientes en el array, no alcanzó la significación ni en respondedores ni en no respondedores.

Una vez concluido el análisis de los datos del array de expresión es imprescindible la realización de un estudio de validación en una cohorte mayor de pacientes, que está pendiente de realización. Para ello se seleccionará un panel de genes, de entre los más diferenciados expresados entre respondedores y no respondedores, y se realizará una extracción a las 12 horas de la inyección del fármaco para comprobar si mantienen las diferencias.

CONCLUSIONES



7. CONCLUSIONES

1. La exposición continuada al tratamiento sistémico con IFN β produce una desensibilización de la vía JAK-STAT, de forma que los pacientes tratados presentan una menor respuesta de los monocitos y células T al estímulo in vitro con IFN β que los no tratados, a pesar de tener mayores niveles de activación basal de IFNAR1 y pSTAT1.

2. La evaluación de la vía JAK-STAT no muestra diferencias en condiciones basales en función de la respuesta al tratamiento. Sin embargo, tras la estimulación in vitro con IFN β , los monocitos de los pacientes respondedores experimentan una rápida modulación a la baja de IFNAR1 y al alza de IFNAR2 en la superficie celular. Este hecho no se reproduce en los pacientes no respondedores lo que sugiere que, en estos últimos podría tener lugar una desensibilización más acusada de la vía JAK-STAT como consecuencia del tratamiento prolongado con IFN β .

3. El abordaje de este estudio ha permitido asociar un "fenotipo clínico de buena respuesta al tratamiento con IFN β " con un "patrón funcional de la vía de señalización" en monocitos, caracterizado por una disminución en los niveles de IFNAR1 y un aumento en los niveles de IFNAR2, pSTAT1 y pSTAT2 tras la estimulación con IFN β . En consecuencia, la ausencia de respuesta terapéutica al IFN β podría explicarse, al menos parcialmente, por una activación diferencial de la vía JAK-STAT entre los pacientes respondedores y los no respondedores.

4. Existe una relación directa entre la reactividad cruzada que presentan los anticuerpos neutralizantes frente a IFN β y el título de los mismos, de forma que los pacientes con títulos medios-altos tienen un riesgo 77 veces mayor de presentar reactividad cruzada que los pacientes con títulos bajos.

5. La presencia de NAbs inhibe la activación por fosforilación de STAT1 in vitro, siendo ésta inversamente proporcional al título de anticuerpos. Esta correlación

negativa entre el porcentaje de células positivas para pSTAT1 y el título de NAbs se evidencia fundamentalmente en monocitos y linfocitos T CD4+.

6. La demostración de que la activación de pSTAT1 es inversamente proporcional al título de anticuerpos, sugiere que su determinación por citometría de flujo podría ser una herramienta alternativa al bioensayo para la detección de NAbs.

7. El tiempo en el que se modifica la expresión de un mayor número de genes en comparación con la expresión basal es a las 12 horas de la administración del IFN β , predominando la regulación al alza.

8. Existe un perfil transcriptómico diferencial entre pacientes respondedores y no respondedores antes de la administración del IFN β . Muchos de los genes de este perfil mantienen su expresión diferencial en las 24 horas siguientes tras la administración del fármaco. La administración del IFN β induce una segunda huella transcriptómica que discrimina los pacientes en función de la respuesta terapéutica a este fármaco.

9. La administración sistémica del IFN β modifica en pacientes respondedores la expresión de un mayor número de genes en todos los tiempos respecto a la expresión basal. Adicionalmente, estos pacientes son capaces de modificar la expresión génica de una forma más temprana y más duradera en el tiempo.

10. La mayor parte de los genes modificados tras la administración del IFN β con respecto a la expresión basal pertenecen a términos del Gene Ontology relacionados con “Producción, regulación y vías de señalización de los interferones tipo I”, “Respuesta defensiva a virus”, “Respuesta inflamatoria”, y “Regulación de la Respuesta inmune”.





ANEXOS



8. ANEXOS

8.1 Microarray. Controles de calidad, normalización y estadística de los datos.

8.1.1 Evaluación de la cantidad y calidad del ARN.

En primer lugar, se comprobó que la cantidad y calidad del ARN extraído cumpliera los requisitos necesarios (concentración >40 ng/ μ L y RIN ≥ 7). Todas las muestras mostraron unos niveles adecuados de integridad, concentración y pureza (Tabla A1).

Nº	Name	RIN	Chip	Conc. Nano (ng/ul)	A260/280	A260/230
1	NR1 T0	8	RNA Nano	134,2	2,07	2,04
2	NR1 T4	8,2	RNA Nano	117,7	2,13	2,26
3	NR1 T12	8,8	RNA Nano	87	2,05	2,28
4	NR1 T24	8,2	RNA Nano	80,4	2,14	2,31
5	NR2 T0	8	RNA Nano	140,5	2,15	2,28
6	NR2 T4	8,5	RNA Nano	111,9	2,04	2,27
7	NR2 T12	8,6	RNA Nano	134,8	2,1	2,28
8	NR2 T24	8,7	RNA Nano	115,7	2,1	2,28
9	R1 T0	8,2	RNA Nano	87,3	2,07	2,32
10	R1 T4	8,3	RNA Nano	105,7	2,01	2,28
11	R1 T12	8,8	RNA Nano	90,5	2,05	2,31
12	R1 T24	8,9	RNA Nano	81	2,03	1,93
13	NR3 T0	8,4	RNA Nano	189,5	2,06	2,25
14	NR3 T4	8,3	RNA Nano	165	2,08	2,27
15	NR3 T12	8,8	RNA Nano	163,2	2,05	2,25
16	NR3 T24	9,3	RNA Nano	122,8	2,07	2,28
17	R2 T0	8,1	RNA Nano	117,3	2,13	2,34
18	R2 T4	7,8	RNA Nano	92,8	2,19	2,42
19	R2 T12	7.1 / 7.2 / 8.1	RNA Nano	104,6	2,17	2,34
20	R2 T24	7 / 7.7 / 8.5	RNA Nano	96,6	2,12	2,26
21	NR4 T0	8.8 / 8.7	RNA Nano	80,2	2,12	2,34
22	NR4 T4	9.0 / 9.3 / 9.4	RNA Nano	61,1	2,35	2,47
23	NR4 T12	7.9 / 8.3	RNA Nano	63,8	2,14	2,33
24	NR4 T24	9.1 / 9.3	RNA Nano	109,1	2,13	2,33
25	R3 T0	8,5	RNA Nano	178,51	2,16	2,28
26	R3 T4	8,8	RNA Nano	165,67	2,08	2,28
27	R3 T12	8,8	RNA Nano	172,8	2,12	2,3
28	R3 T24	8,4	RNA Nano	154,64	2,14	2,31
29	R4 T0	9.3 - 9.4	RNA Nano	72,95	2,13	2,44
30	R4 T4	9.4 - 9.4	RNA Nano	64,38	2,11	2,46
31	R4 T12	9.3 - 9.4	RNA Nano	84,33	2,11	2,43
32	R4 T24	9.5 - 9.4	RNA Nano	78,34	2,13	2,42
33	NR5 T0	7,7	RNA Nano	221,74	2,04	1,85
34	NR5 T4	8,4	RNA Nano	169,17	2,06	1,82
35	NR5 T12	9	RNA Nano	247,89	2,04	1,09
36	NR5 T24	8,3	RNA Nano	197,98	2,06	1,87

Tabla A1. Valores de integridad (RIN), concentración y pureza de las muestras empleadas.

8.1.2 Generación del microarray. Análisis de calidad y obtención de los valores cuantitativos.

Antes de iniciar el proceso de hibridación se procedió al marcaje de las muestras, consiguiendo un nivel adecuado en todas ellas, como puede observarse en la tabla A2.

Nº	Name	Starting Qty. (ug)	ng/ul	Cy3 pmol/ul	RNA ratio (260/280)	Yield (ug)	Spec. Act. Cy3
1	NR1 T0	0,2	125,26	2,17	2,24	3,76	17,32
2	NR1 T4	0,2	179,92	3,22	2,21	5,4	17,9
3	NR1 T12	0,2	204,68	3,88	2,25	6,14	18,96
4	NR1 T24	0,2	191,02	3,23	2,27	5,73	16,91
5	NR2 T0	0,2	137,85	2,02	2,12	4,14	14,65
6	NR2 T4	0,2	153,74	2,44	2,21	4,61	15,87
7	NR2 T12	0,2	165,13	2,55	2,14	4,95	15,44
8	NR2 T24	0,2	155,82	2,6	2,22	4,67	16,69
9	R1 T0	0,2	168,44	2,89	2,2	5,05	17,16
10	R1 T4	0,2	126,84	1,97	2,17	3,81	15,53
11	R1 T12	0,2	117,07	1,82	2,16	3,51	15,55
12	R1 T24	0,2	186,16	2,85	2,19	5,58	15,31
13	NR3 T0	0,2	220,42	4,34	2,19	6,61	19,69
14	NR3 T4	0,2	231,83	4,27	2,23	6,95	18,42
15	NR3 T12	0,2	151,75	2,44	2,25	4,55	16,08
16	NR3 T24	0,2	164,39	2,49	2,17	4,93	15,15
17	R2 T0	0,2	148,78	2,53	2,19	4,46	17
18	R2 T4	0,2	261,33	5,64	2,28	7,84	21,58
19	R2 T12	0,2	186,53	3,58	2,22	5,6	19,19
20	R2 T24	0,2	209,79	4,2	2,26	6,29	20,02
21	NR4 T0	0,2	158,71	2,58	2,2	4,76	16,26
22	NR4 T4	0,2	117,64	1,84	2,19	3,53	15,64
23	NR4 T12	0,2	116,43	2,05	2,21	3,49	17,61
24	NR4 T24	0,2	122,82	1,88	2,1	3,68	15,31
25	R3 T0	0,2	259,86	5,62	2,35	7,8	21,63
26	R3 T4	0,2	228,88	4,81	2,26	6,87	21,02
27	R3 T12	0,2	199,39	3,71	2,21	5,98	18,61
28	R3 T24	0,2	206,9	3,96	2,28	6,21	19,14
29	R4 T0	0,2	201,28	3,76	2,22	6,04	18,68
30	R4 T4	0,2	192,47	3,51	2,26	5,77	18,24
31	R4 T12	0,2	167,84	3,21	2,2	5,04	19,13
32	R4 T24	0,2	133,97	2,53	2,25	4,02	18,88
33	NR5 T0	0,2	191,99	3,94	2,24	5,76	20,52
34	NR5 T4	0,2	224,79	4,27	2,25	6,74	19
35	NR5 T12	0,2	136,82	1,85	2,22	4,1	13,52
36	NR5 T24	0,2	210,58	3,93	2,18	6,32	18,66

Tabla A2. Niveles de marcaje de las muestras empleadas.

Los microarrays se montaron siguiendo el esquema que se detalle en la tabla A3.

Nº	Position	Cy3	Bar Code
A	A	NR1 T0	252800414946_2_1
B	B	NR1 T4	252800414946_2_2
C	C	NR1 T12	252800414946_2_3
D	D	NR1 T24	252800414946_2_4
E	E	NR2 T0	252800414946_1_1
F	F	NR2 T4	252800414946_1_2
G	G	NR2 T12	252800414946_1_3
H	H	NR2 T24	252800414946_1_4
I	I	R1 T0	252800416537_2_1
J	J	R1 T4	252800416537_2_2
K	K	R1 T12	252800416537_2_3
L	L	R1 T24	252800416537_2_4
M	M	NR3 T0	252800416537_1_1
N	N	NR3 T4	252800416537_1_2
O	O	NR3 T12	252800416537_1_3
P	P	NR3 T24	252800416537_1_4
Q	Q	R2 T0	252800416538_2_1
R	R	R2 T4	252800416538_2_2
S	S	R2 T12	252800416538_2_3
T	T	R2 T24	252800416538_2_4
U	U	NR4 T0	252800416538_1_1
V	V	NR4 T4	252800416538_1_2
X	X	NR4 T12	252800416538_1_3
Y	Y	NR4 T24	252800416538_1_4
AA	AA	R3 T0	252800418368_2_1
AB	AB	R3 T4	252800418368_2_2
AC	AC	R3 T12	252800418368_2_3
AD	AD	R3 T24	252800418368_2_4
AE	AE	R4 T0	252800418368_1_1
AF	AF	R4 T4	252800418368_1_2
AG	AG	R4 T12	252800418368_1_3
AH	AH	R4 T24	252800418368_1_4
AI	AI	NR5 T0	252800418369_2_1
AJ	AJ	NR 5T4	252800418369_2_2
AK	AK	NR5 T12	252800418369_2_3
AL	AL	NR5 T24	252800418369_2_4

Tabla A3. Esquema seguido para el montaje de los microarrays.

El proceso de preparación de la mezcla de hibridación para la generación de los microarrays se detalla en el apartado “material y métodos”. Una vez hibridados y obtenidas las imágenes de fluorescencia de cada uno de ellos, se procedió al

procesamiento y análisis de los datos. El primer paso consistió en la confirmación de la calidad global de hibridación, que se realizó mediante representación en diagrama de densidades, que nos proporciona una idea de la distribución de señales en el chip. Todos los arrays deberían tener una distribución similar. En este caso, al representar el gráfico de densidades para todos los arrays (teniendo en cuenta la intensidad de los puntos sin normalizar), obtuvimos la figura A1.

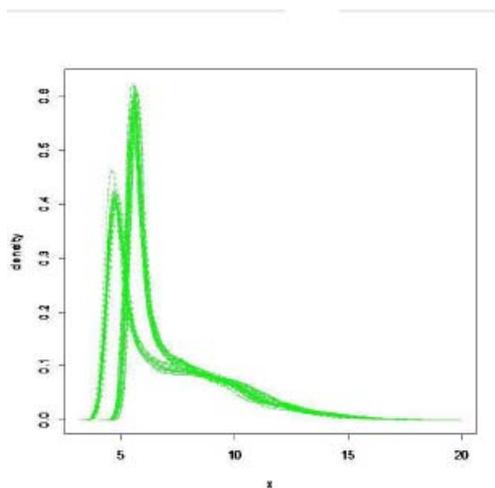


Figura A1. Diagramas de densidades de los arrays.

Como se observaban dos poblaciones de arrays, la desviación fue corregida mediante normalización. A continuación, se analizó cada array individualmente, evaluando el fondo del array y el gráfico MA. Un ejemplo de ello se muestra en la figura A2.

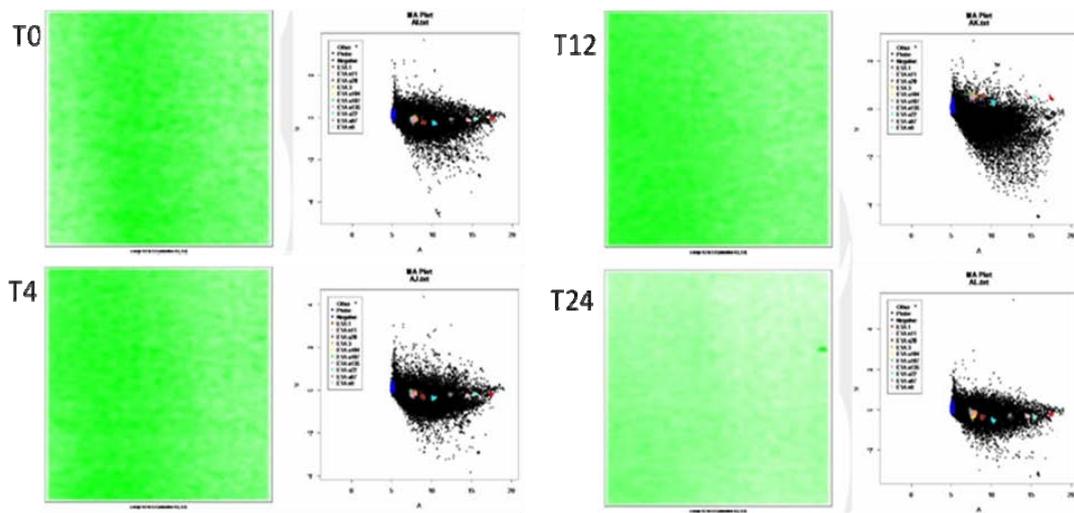


Figura A2. Ejemplo representativo del fondo del array y del gráfico MA del paciente NR5 a nivel basal y a las 4, 12 y 24h tras la administración del IFN β .

El fondo del array y los gráficos MA fueron aceptables en todos los pacientes y en todas las series temporales.

Los valores M reflejan el error estándar sin escala normalizado para cada set de sondas a partir de los valores de intensidad de cada sonda en el set. Estos valores de M se representaron en la figura A3. La comparación entre todos los valores de M de los arrays puso de manifiesto la necesidad de normalizar, si bien todas las cajas eran bastante homogéneas.

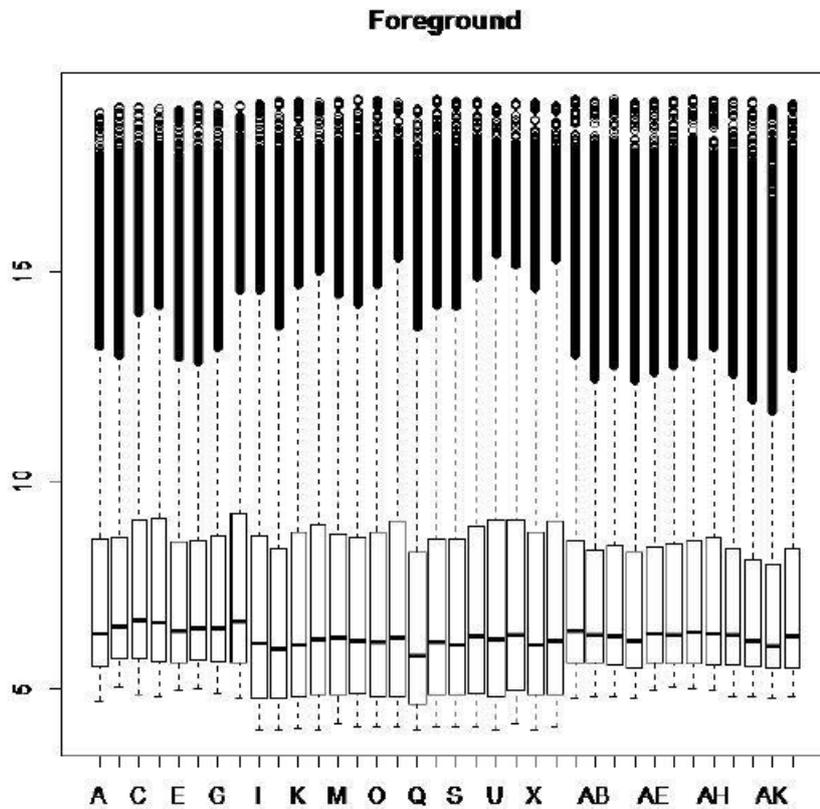


Figura A3. Distribución en cajas de todos los valores M de los 36 arrays representando el error estándar de cada sonda en cada uno de los arrays.

En cuanto al fondo, resultó bastante homogéneo en los arrays, indicando que el proceso de lavado había sido correcto, tal y como se muestra en la figura A4, si bien se aprecian diferencias en las medias de los fondos de los arrays, por diferencias en los lotes de los portas. Estas diferencias se corrigieron mediante normalización.

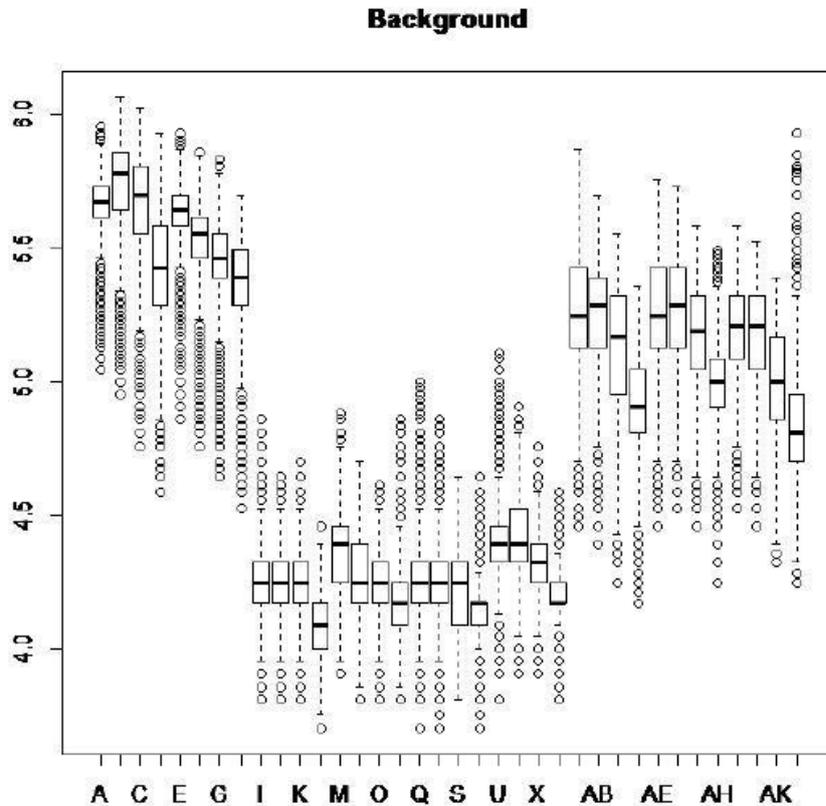


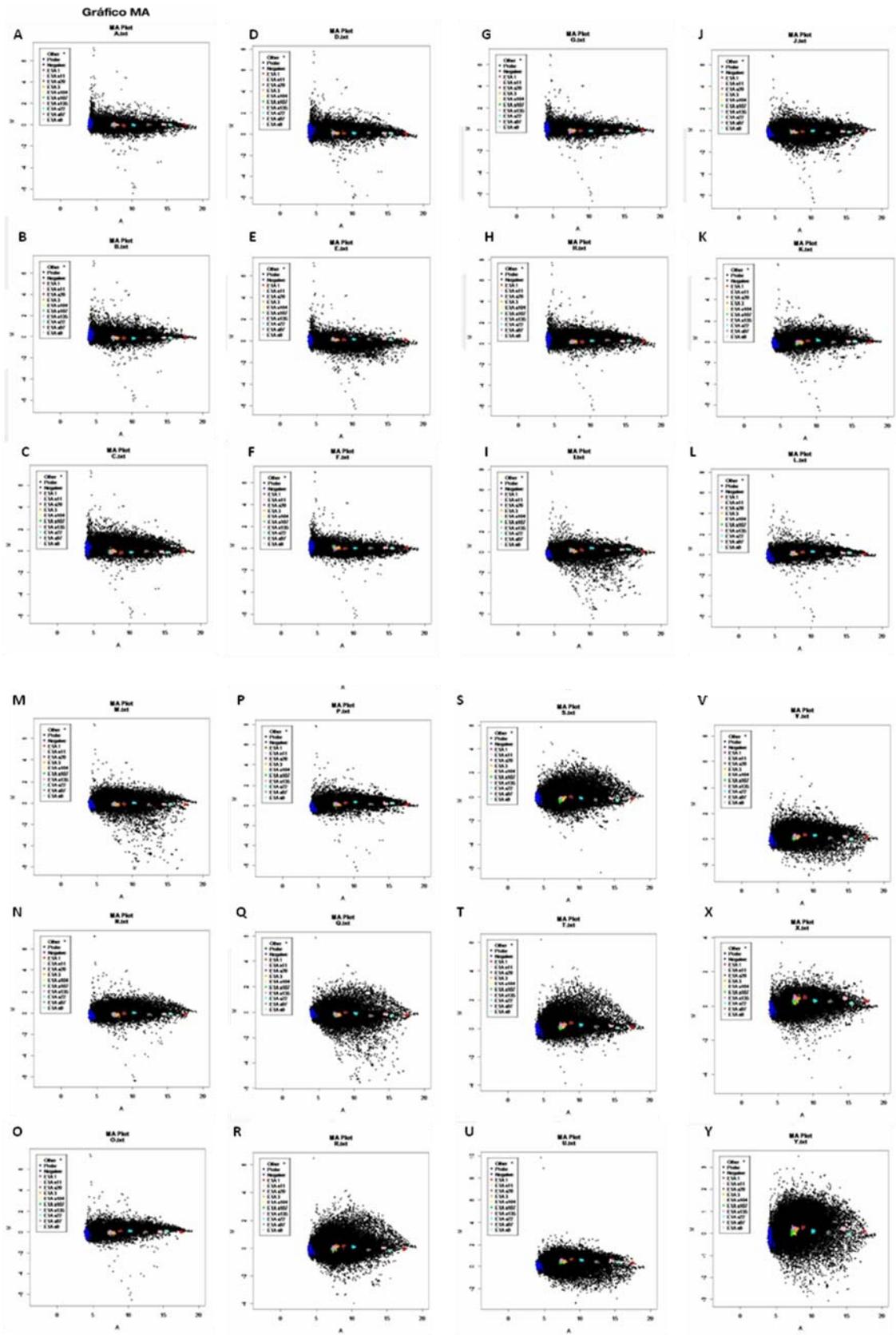
Figura A4. Distribución del fondo de los 36 arrays.

8.1.3 Análisis estadístico de los datos.

El análisis estadístico se realizó siguiendo tres pasos: A) Sustracción del fondo, B) Normalización Interarray y C) Ajuste a un modelo lineal.

A. Sustracción del fondo.

Para la sustracción del fondo se utilizó el método *normexp* con *offset=10*. A continuación, en la figura A5 se muestran los gráficos *MA* para cada array.



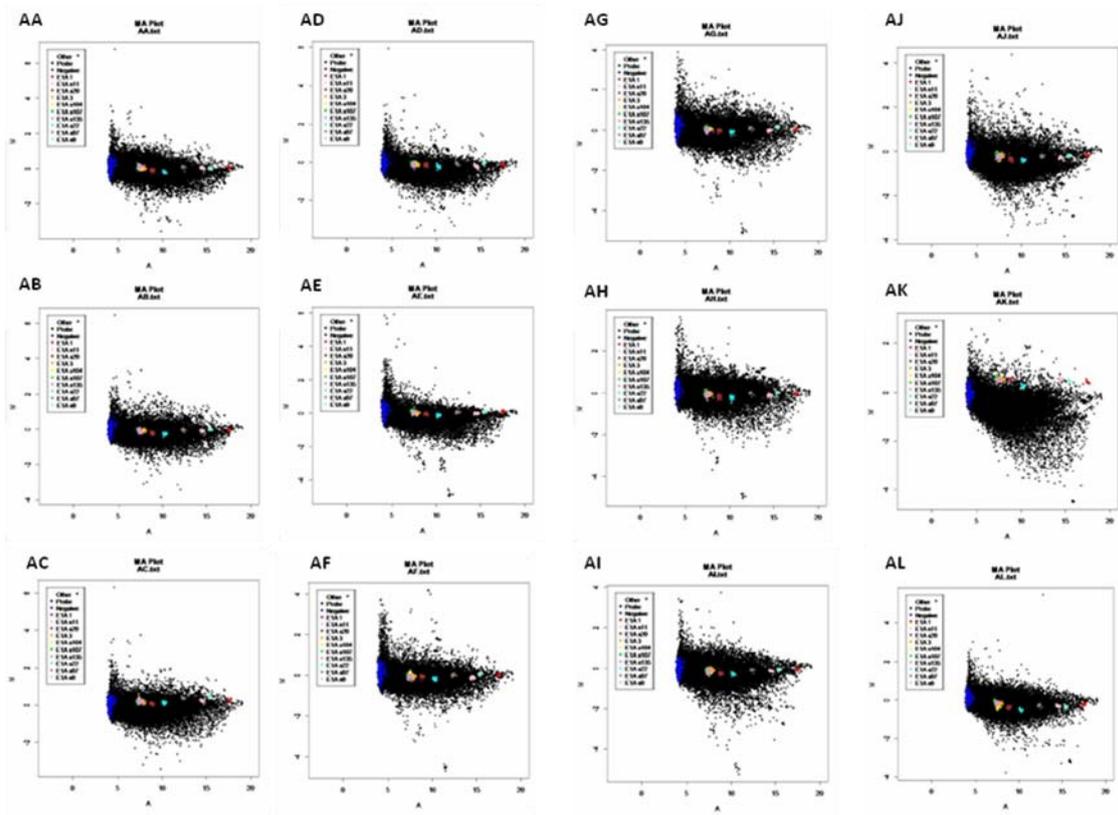


Figura A5. Gráficos MA para cada uno de los 36 arrays tras la sustracción de fondo.

En ningún caso se observó una gran variabilidad entre los arrays antes y después de la sustracción de fondo, lo que descartó la presencia de problemas técnicos en la hibridación y/o lavado. En la figura A6 se muestran los valores M para todos los arrays, demostrando una buena homogeneidad entre ellos.

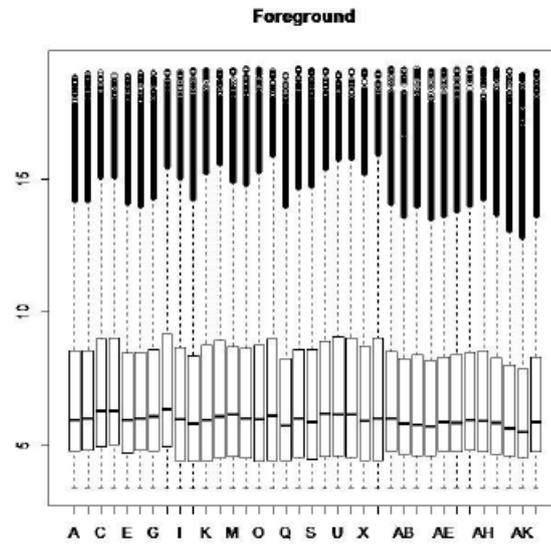


Figura A6. Valores de M para todos los arrays tras la sustracción del fondo.

Una vez sustraído el fondo, el gráfico de densidades de todos los arrays muestra una corrección en las poblaciones (figura A7), que siguen manteniendo su homogeneidad en cuanto al marcaje.

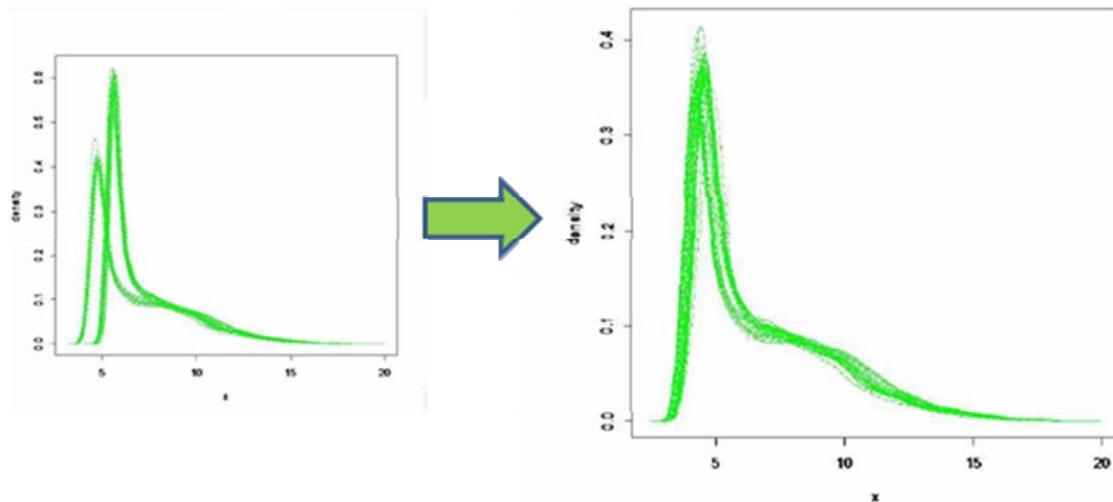


Figura A7. Diagrama de densidades de los arrays tras sustracción de fondo.

B. Normalización inter-Array.

El proceso de normalización permite minimizar la variabilidad experimental (debida a las muestras) y sistemática (debida al procesado) que puede asociarse a un experimento de estas características. De esta forma es posible medir la expresión génica de forma precisa y fiable, y comparar los niveles de expresión en el conjunto de los microarrays estudiados. Tras procesar y normalizar los valores de intensidad de cada gen mediante el método RMA (Robust Multichip Average), se realizó un primer filtrado de los datos que eliminó las secuencias control y las secuencias con señal de hibridación cercana al fondo. A continuación, los datos se sometieron a una normalización entre todos los arrays, a fin de hacer todos los datos comparables mediante el método cuantiles, de forma que los datos fueran perfectamente comparables entre sí (figura A8).

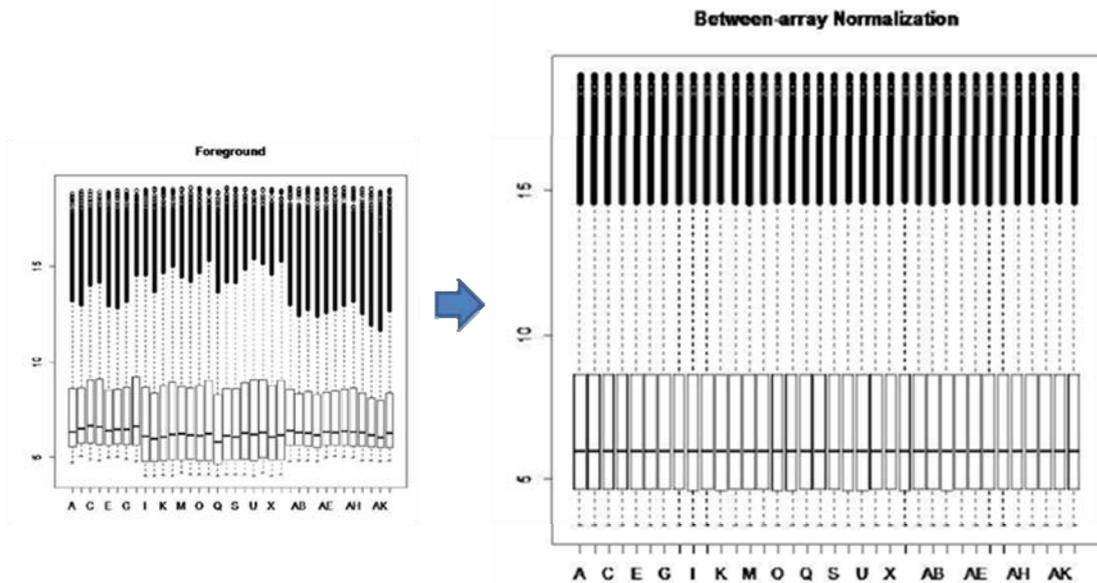


Figura A8. Distribución de cajas de los valores M tras normalización interarrays.

Esta normalización permitió que todos los arrays tuvieran una misma distribución de densidades, como puede observarse en la figura A9.

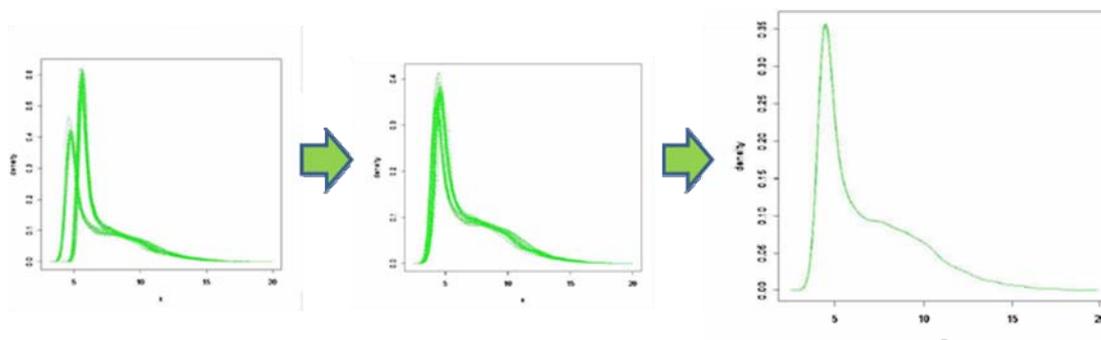


Figura A9. Diagrama de densidades de los arrays tras normalización interarrays.

8.2 Listas de genes diferencialmente expresados

8.2.1 Listas de genes diferencialmente expresados tras la administración del IFN β . Análisis mediante T-test.

Genes exclusivos en No Respondedores a 4h: 7 genes (T-test)		
Símbolo del gen	Descripción del gen	Log ₂ FC
<i>C1orf173</i>	chromosome 1 open reading frame 173	1,86
<i>KIAA0895L</i>	KIAA0895-like	1,23
<i>LINC00537</i>	long intergenic non-protein coding RNA 537	1,76
<i>TOR1B</i>	torsin family 1, member B (torsin B)	1,95
<i>TRIM21</i>	tripartite motif containing 21	1,32
<i>TRIM22</i>	tripartite motif containing 22	1,25
<i>TRIM25</i>	tripartite motif containing 25	1,33

Tabla A4. Lista de genes diferencialmente expresados exclusivamente en No Respondedores a las 4h tras la administración del IFN β . La tasa de cambio "Fold change" (FC) indica las diferencias de expresión génica entre los valores encontrados a las 4h tras la administración del IFN β y su expresión basal. Los valores positivos indican un incremento en la expresión con respecto a los valores basales. Valores de p ajustados <0.05.

Genes exclusivos en Respondedores a 4h: 89 genes (T-test)		
Símbolo del gen	Descripción del gen	Log₂ FC
<i>CEBPA</i>	CCAAT/enhancer binding protein (C/EBP), alpha	-1,03
<i>CXCL1</i>	chemokine (C-X-C motif) ligand 1	-1,68
<i>DDIT4</i>	DNA-damage-inducible transcript 4	-1,43
<i>DUSP1</i>	dual specificity phosphatase 1	-1,18
<i>FADS1</i>	fatty acid desaturase 1	-1,16
<i>GPER</i>	G protein-coupled estrogen receptor 1	-1,75
<i>HIVEP3</i>	human immunodeficiency virus type I enhancer binding protein 3	-1,32
<i>IER3</i>	immediate early response 3	-1,27
<i>IL8</i>	interleukin 8	-1,49
<i>PER1</i>	period homolog 1 (Drosophila)	-1,48
<i>SLC16A6</i>	solute carrier family 16, member 6 (monocarboxylic acid transporter 7)	-1,02
<i>THBD</i>	thrombomodulin	-1,89
<i>TNFRSF12A</i>	tumor necrosis factor receptor superfamily, member 12A	-1,30
<i>TNFRSF8</i>	tumor necrosis factor receptor superfamily, member 8	-1,10
<i>ABCD1</i>	ATP-binding cassette, sub-family D (ALD), member 1	1,16
<i>ACOT9</i>	acyl-CoA thioesterase 9	1,14
<i>ADAR</i>	adenosine deaminase, RNA-specific	1,13
<i>AGRN</i>	agrin	1,15
<i>AMOTL2</i>	angiominin like 2	1,37
<i>APOBEC3A</i>	apolipoprotein B mRNA editing enzyme, catalytic polypeptide-like 3A	1,54
<i>APOL2</i>	apolipoprotein L, 2	1,14
<i>ARL5B</i>	ADP-ribosylation factor-like 5B	1,05
<i>ATF5</i>	activating transcription factor 5	1,41
<i>BATF3</i>	basic leucine zipper transcription factor, ATF-like 3	1,39
<i>BST2</i>	bone marrow stromal cell antigen 2	1,31
<i>CHRNB1</i>	cholinergic receptor, nicotinic, beta 1 (muscle)	1,20
<i>CLIC4</i>	chloride intracellular channel 4	1,08
<i>CPEB2</i>	cytoplasmic polyadenylation element binding protein 2	1,25
<i>DBF4B</i>	DBF4 homolog B (S. cerevisiae)	1,00
<i>DNAJA1P5</i>	DnaJ (Hsp40) homolog, subfamily A, member 1 pseudogene 5	1,27
<i>DRAP1</i>	DR1-associated protein 1 (negative cofactor 2 alpha)	1,19
<i>ENPP2</i>	ectonucleotide pyrophosphatase/phosphodiesterase 2	1,17
<i>EREG</i>	epiregulin	1,02
<i>ETV7</i>	ets variant 7	2,82
<i>EXT1</i>	exostosin 1	1,17
<i>FAM125B</i>	family with sequence similarity 125, member B	1,02
<i>FTSJD2</i>	FtsJ methyltransferase domain containing 2	1,07
<i>GADD45B</i>	growth arrest and DNA-damage-inducible, beta	1,10
<i>GORASP1</i>	golgi reassembly stacking protein 1, 65kDa	1,07
<i>GPD2</i>	glycerol-3-phosphate dehydrogenase 2 (mitochondrial)	1,00
<i>GPR141</i>	G protein-coupled receptor 141	1,05
<i>GTF2B</i>	general transcription factor IIB	1,15
<i>HYMAI</i>	hydatidiform mole associated and imprinted (non-protein coding)	1,36
<i>IRF1</i>	interferon regulatory factor 1	1,02
<i>ISG15</i>	ISG15 ubiquitin-like modifier	2,95
<i>JUP</i>	junction plakoglobin	2,19
<i>KIAA1958</i>	KIAA1958	1,39
<i>LACTB</i>	lactamase, beta	1,03
<i>LGALS9C</i>	lectin, galactoside-binding, soluble, 9C	1,30
<i>LHFPL2</i>	lipoma HMGIC fusion partner-like 2	1,10
<i>LIF</i>	leukemia inhibitory factor	1,07
<i>LOC100188947</i>	uncharacterized LOC100188947	1,06
<i>LOC729305</i>	uncharacterized LOC729305	1,02

Genes exclusivos en Respondedores a 4h: 89 genes (T-test)		
Símbolo del gen	Descripción del gen	Log ₂ FC
<i>MAK</i>	male germ cell-associated kinase	1,05
<i>MBP</i>	myelin basic protein	1,03
<i>MIA3</i>	melanoma inhibitory activity family, member 3	1,18
<i>MT2A</i>	metallothionein 2A	2,18
<i>NPVF</i>	neuropeptide VF precursor	1,02
<i>OAS1</i>	2'-5'-oligoadenylate synthetase 1, 40/46kDa	2,28
<i>OGFR</i>	opioid growth factor receptor	1,01
<i>PCGF5</i>	polycomb group ring finger 5	1,03
<i>PIK3AP1</i>	phosphoinositide-3-kinase adaptor protein 1	1,06
<i>PLSCR1</i>	phospholipid scramblase 1	1,63
<i>PRKD2</i>	protein kinase D2	1,06
<i>PTP4A1</i>	protein tyrosine phosphatase type IVA, member 1	1,14
<i>RHBDF2</i>	rhomboid 5 homolog 2 (Drosophila)	1,11
<i>RIF1</i>	RAP1 interacting factor homolog (yeast)	1,07
<i>RIPK1</i>	receptor (TNFRSF)-interacting serine-threonine kinase 1	1,00
<i>RSAD2</i>	radical S-adenosyl methionine domain containing 2	3,07
<i>RSPH9</i>	radial spoke head 9 homolog (Chlamydomonas)	1,18
<i>SAMHD1</i>	SAM domain and HD domain 1	1,08
<i>SEC24D</i>	SEC24 family, member D (S. cerevisiae)	1,28
<i>SLC25A28</i>	solute carrier family 25 (mitochondrial iron transporter), member 28	1,05
<i>SLC35E1</i>	solute carrier family 35, member E1	1,10
<i>SPATA13</i>	spermatogenesis associated 13	1,10
<i>SPSB1</i>	splA/ryanodine receptor domain and SOCS box containing 1	1,12
<i>SSB</i>	Sjogren syndrome antigen B (autoantigen La)	1,10
<i>STAP1</i>	signal transducing adaptor family member 1	1,04
<i>STOML1</i>	stomatin (EPB72)-like 1	1,05
<i>TAP1</i>	transporter 1, ATP-binding cassette, sub-family B (MDR/TAP)	1,16
<i>TCF4</i>	transcription factor 4	1,27
<i>TNK2</i>	tyrosine kinase, non-receptor, 2	1,02
<i>TRAFD1</i>	TRAF-type zinc finger domain containing 1	1,12
<i>TRIM26</i>	tripartite motif containing 26	1,35
<i>TRIM38</i>	tripartite motif containing 38	1,24
<i>TRIM78P</i>	tripartite motif containing 78, pseudogene	1,09
<i>USPL1</i>	ubiquitin specific peptidase like 1	1,25
<i>XAF1</i>	XIAP associated factor 1	1,86
<i>XRN1</i>	5'-3' exoribonuclease 1	1,11

Tabla A5. Lista de genes diferencialmente expresados a las 4h tras la administración del IFN β exclusivamente en Respondedores. La tasa de cambio "Fold change" (FC) indica las diferencias de expresión génica entre los valores encontrados a las 4h tras la administración del IFN β y su expresión basal. Los valores positivos indican un incremento en la expresión y los negativos una disminución con respecto a los valores basales. Valores de p ajustados <0.05.

Genes comunes en Respondedores y No Respondedores a 4h: 223 genes (T-test)			
Símbolo del gen	Descripción del gen	Log 2 FC	
		NR	R
BMF	Bcl2 modifying factor	-1,06	-1,05
MYCL1	v-myc myelocytomatosis viral oncogene homolog 1,	-1,16	-1,33
SGK1	serum/glucocorticoid regulated kinase 1	-1,41	-1,85
ABTB2	ankyrin repeat and BTB (POZ) domain containing 2	2,26	2,68
ADPRHL2	ADP-ribosylhydrolase like 2	1,04	1,26
AFF1	AF4/FMR2 family, member 1	1,07	1,36
ANKFY1	ankyrin repeat and FYVE domain containing 1	1,79	2,06
ANKMY1	ankyrin repeat and MYND domain containing 1	1,31	1,42
ANKRD22	ankyrin repeat domain 22	1,94	2,39
APOBEC3B	apolipoprotein B mRNA editing enzyme, catalytic polypeptide-like 3B	1,39	1,51
APOL1	apolipoprotein L, 1	1,05	1,26
APOL6	apolipoprotein L, 6	1,55	2,07
ATF3	activating transcription factor 3	3,24	3,65
BATF2	basic leucine zipper transcription factor, ATF-like 2	2,66	3,32
BAZ1A	bromodomain adjacent to zinc finger domain, 1A	1,03	1,25
C1GALT1	core1 synthase, glycoprotein-N-acetylgalactosamine 3 β galact,1	1,11	1,46
C22orf28	chromosome 22 open reading frame 28	1,08	1,25
C5orf56	chromosome 5 open reading frame 56	1,63	1,90
C9orf91	chromosome 9 open reading frame 91	1,39	1,68
CACNA1A	calcium channel, voltage-dependent, P/Q type, alpha 1A subunit	1,98	2,36
CBR1	carbonyl reductase 1	1,17	1,40
CBWD5	COBW domain containing 5	1,17	1,13
CCL1	chemokine (C-C motif) ligand 1	1,14	1,50
CCL2	chemokine (C-C motif) ligand 2	4,43	5,49
CCL7	chemokine (C-C motif) ligand 7	1,13	1,38
CCL8	chemokine (C-C motif) ligand 8	4,80	5,82
CD274	CD274 molecule	2,41	2,67
CD69	CD69 molecule	1,45	1,37
CEACAM1	carcinoembryonic antigen-related cell adhesion molecule 1	1,99	2,23
CH25H	cholesterol 25-hydroxylase	1,91	1,89
CLDN23	claudin 23	1,38	1,52
CMPK2	cytidine monophosphate (UMP-CMP) kinase 2, mitochondrial	2,46	2,96
CNP	2',3'-cyclic nucleotide 3' phosphodiesterase	1,59	1,84
CSRNP1	cysteine-serine-rich nuclear protein 1	1,71	2,01
CXCL10	chemokine (C-X-C motif) ligand 10	5,79	6,80
CXCL11	chemokine (C-X-C motif) ligand 11	1,47	1,60
CXorf21	chromosome X open reading frame 21	1,17	1,35
CYP2J2	cytochrome P450, family 2, subfamily J, polypeptide 2	1,54	1,80
DAPP1	dual adaptor of phosphotyrosine and 3-phosphoinositides	1,14	1,16
DDX58	DEAD (Asp-Glu-Ala-Asp) box polypeptide 58	2,03	2,73
DDX60	DEAD (Asp-Glu-Ala-Asp) box polypeptide 60	1,48	1,91
DDX60L	DEAD (Asp-Glu-Ala-Asp) box polypeptide 60-like	1,56	1,95
DEFB1	defensin, beta 1	3,16	3,58
DHX58	DEXH (Asp-Glu-X-His) box polypeptide 58	1,91	2,39
DNAJA1	DnaJ (Hsp40) homolog, subfamily A, member 1	1,06	1,30
DTX3L	deltex 3-like (Drosophila)	1,24	1,61
DUSP5	dual specificity phosphatase 5	1,35	1,86
DYNLT1	dynein, light chain, Tctex-type 1	1,35	1,38
EHD4	EH-domain containing 4	1,05	1,18
EIF2AK2	eukaryotic translation initiation factor 2-alpha kinase 2	1,82	2,07
ELF1	E74-like factor 1 (ets domain transcription factor)	1,05	1,10
EXOC3L1	exocyst complex component 3-like 1	1,44	1,88

Genes comunes en Respondedores y No Respondedores a 4h: 223 genes (T-test)			
Símbolo del gen	Descripción del gen	Log 2 FC	
		NR	R
EXOSC9	exosome component 9	1,19	1,89
FAM122C	family with sequence similarity 122C	1,17	1,30
FAM46A	family with sequence similarity 46, member A	1,92	2,24
FAM72A	family with sequence similarity 72, member A	1,36	1,45
FAM72D	family with sequence similarity 72, member D	1,23	1,36
FAM81a	family with sequence similarity 8, member A1	1,05	1,16
FANCA	Fanconi anemia, complementation group A	1,27	1,55
FAS	Fas (TNF receptor superfamily, member 6)	1,00	1,03
FBXO6	F-box protein 6	1,46	1,70
FUT4	fucosyltransferase 4 (alpha (1,3) fucosyltransferase, myeloid-specific)	1,16	1,19
GALM	galactose mutarotase (aldose 1-epimerase)	1,74	2,22
GBP1	guanylate binding protein 1, interferon-inducible	2,21	2,53
GBP1P1	guanylate binding protein 1, interferon-inducible pseudogene 1	1,48	1,46
GBP4	guanylate binding protein 4	1,43	1,83
GCH1	GTP cyclohydrolase 1	1,63	1,86
GNB4	guanine nucleotide binding protein (G protein), beta polypeptide 4	1,31	1,63
GPR155	G protein-coupled receptor 155	1,22	1,49
GRAMD1B	GRAM domain containing 1B	1,52	1,73
GTPBP1	GTP binding protein 1	1,05	1,31
HERC5	HECT and RLD domain containing E3 ubiquitin protein ligase 5	2,79	3,53
HERC6	HECT and RLD domain containing E3 ubiquitin protein ligase 6	2,29	2,67
HESX1	HESX homeobox 1	3,01	3,55
HHEX	hematopoietically expressed homeobox	1,02	1,28
HNRPLL	heterogeneous nuclear ribonucleoprotein L-like	1,77	2,10
HPSE	heparanase	1,25	1,34
HSH2D	hematopoietic SH2 domain containing	1,26	1,37
IDO1	indoleamine 2,3-dioxygenase 1	2,64	3,11
IFI16	interferon, gamma-inducible protein 16	1,27	1,53
IFI35	interferon-induced protein 35	1,59	2,07
IFIH1	interferon induced with helicase C domain 1	2,14	2,76
IFIT1	interferon-induced protein with tetratricopeptide repeats 1	2,78	3,36
IFIT2	interferon-induced protein with tetratricopeptide repeats 2	2,88	3,24
IFIT3	interferon-induced protein with tetratricopeptide repeats 3	2,24	2,78
IFIT5	interferon-induced protein with tetratricopeptide repeats 5	1,53	2,05
IL15RA	interleukin 15 receptor, alpha	1,07	1,20
IL1RN	interleukin 1 receptor antagonist	2,27	2,69
IL27	interleukin 27	2,08	2,36
IL4I1	interleukin 4 induced 1	1,86	2,56
IRF7	interferon regulatory factor 7	1,75	2,21
ISG20	interferon stimulated exonuclease gene 20kDa	1,22	1,57
KIAA0226	KIAA0226	1,12	1,31
KIAA0319L	KIAA0319-like	1,68	1,92
KIF23	kinesin family member 23	1,16	1,22
KLF5	Kruppel-like factor 5 (intestinal)	1,64	1,77
KPTN	kaptin (actin binding protein)	1,16	1,48
LAMP3	lysosomal-associated membrane protein 3	2,72	3,68
LAP3	leucine aminopeptidase 3	1,68	2,24
LGALS8	lectin, galactoside-binding, soluble, 8	1,11	1,22
LGALS9	lectin, galactoside-binding, soluble, 9	1,18	1,48
LMO2	LIM domain only 2 (rhombotin-like 1)	1,70	1,91
LOC100128242	uncharacterized LOC100128242	1,30	1,65
LOC100128338	uncharacterized LOC100128338	1,23	1,57
LOC100129363	uncharacterized LOC100129363	1,64	1,30

Genes comunes en Respondedores y No Respondedores a 4h: 223 genes (T-test)			
Símbolo del gen	Descripción del gen	Log 2 FC	
		NR	R
LOC100132966	uncharacterized LOC100132966	1,16	1,39
LOC153684	uncharacterized LOC153684	1,41	1,39
LRRC3	leucine rich repeat containing 3	1,03	1,21
LYSMD2	LysM, putative peptidoglycan-binding, domain containing 2	1,11	1,37
MAP2K6	mitogen-activated protein kinase kinase 6	1,77	2,10
MASTL	microtubule associated serine/threonine kinase-like	1,33	1,83
MB21D1	Mab-21 domain containing 1	1,10	1,33
MICB	MHC class I polypeptide-related sequence B	1,01	1,27
MLKL	mixed lineage kinase domain-like	1,24	1,28
MOB3C	MOB kinase activator 3C	1,03	1,30
MOV10	Mov10, Moloney leukemia virus 10, homolog (mouse)	1,51	1,58
MT1A	metallothionein 1A	1,38	1,66
MT1B	metallothionein 1B	1,73	2,23
MT1E	metallothionein 1E	1,53	2,09
MT1H	metallothionein 1H	1,62	2,09
MT1L	metallothionein 1L (gene/pseudogene)	1,68	2,25
MT1X	metallothionein 1X	1,62	2,08
MX1	myxovirus resistance 1, interferon-inducible protein p78 (mouse)	2,35	3,06
MX2	myxovirus (influenza virus) resistance 2 (mouse)	1,59	1,93
NCOA7	nuclear receptor coactivator 7	1,89	2,30
NEXN	nexilin (F actin binding protein)	1,93	2,18
NFIL3	nuclear factor, interleukin 3 regulated	1,67	1,65
NLRC5	NLR family, CARD domain containing 5	1,00	1,09
NMI	N-myc (and STAT) interactor	1,08	1,20
NOD1	nucleotide-binding oligomerization domain containing 1	1,03	1,25
NT5C3	5'-nucleotidase, cytosolic III	1,71	1,95
NUB1	negative regulator of ubiquitin-like proteins 1	1,26	1,55
OAS2	2'-5'-oligoadenylate synthetase 2, 69/71kDa	1,87	2,04
OAS3	2'-5'-oligoadenylate synthetase 3, 100kDa	1,95	2,43
OASL	2'-5'-oligoadenylate synthetase-like	2,30	2,97
OR52K2	olfactory receptor, family 52, subfamily K, member 2	1,25	1,47
P2RY6	pyrimidinergic receptor P2Y, G-protein coupled, 6	1,67	1,76
PARP10	poly (ADP-ribose) polymerase family, member 10	1,45	1,66
PARP12	poly (ADP-ribose) polymerase family, member 12	1,73	2,25
PARP14	poly (ADP-ribose) polymerase family, member 14	1,44	1,92
PARP9	poly (ADP-ribose) polymerase family, member 9	1,38	1,60
PATL1	protein associated with topoisomerase II homolog 1 (yeast)	1,13	1,40
PDGFRL	platelet-derived growth factor receptor-like	1,57	1,72
PGAP1	post-GPI attachment to proteins 1	1,25	1,19
PHF11	PHD finger protein 11	1,15	1,51
PI4K2B	phosphatidylinositol 4-kinase type 2 beta	2,14	2,38
PIWIL4	piwi-like 4 (Drosophila)	1,08	1,03
PKD2L1	polycystic kidney disease 2-like 1	1,99	2,27
PML	promyelocytic leukemia	1,79	2,38
PNPT1	polyribonucleotide nucleotidyltransferase 1	2,31	2,88
PPM1K	protein phosphatase, Mg ²⁺ /Mn ²⁺ dependent, 1K	1,46	1,74
PRIC285	peroxisomal proliferator-activated receptor A interacting complex 285	1,85	2,33
PRKAG2	protein kinase, AMP-activated, gamma 2 non-catalytic subunit	1,04	1,42
PTPRU	protein tyrosine phosphatase, receptor type, U	1,23	1,41
RABGAP1L	RAB GTPase activating protein 1-like	1,11	1,29
RASGEF1B	RasGEF domain family, member 1B	1,41	1,54
RASGRP3	RAS guanyl releasing protein 3 (calcium and DAG-regulated)	1,06	1,49
RBCK1	RanBP-type and C3HC4-type zinc finger containing 1	1,28	1,32

Genes comunes en Respondedores y No Respondedores a 4h: 223 genes (T-test)			
Símbolo del gen	Descripción del gen	Log 2 FC	
		NR	R
RBM20	RNA binding motif protein 20	1,00	1,43
RBM43	RNA binding motif protein 43	1,27	1,74
RGL1	ral guanine nucleotide dissociation stimulator-like 1	2,27	2,66
RGS1	regulator of G-protein signaling 1	1,86	2,84
RIN2	Ras and Rab interactor 2	1,81	2,07
RNF213	ring finger protein 213	1,13	1,64
RPL28	ribosomal protein L28	1,26	1,20
SAMD4A	sterile alpha motif domain containing 4A	1,76	2,31
SAMD9	sterile alpha motif domain containing 9	1,73	1,93
SAMD9L	sterile alpha motif domain containing 9-like	1,89	2,19
SAT1	spermidine/spermine N1-acetyltransferase 1	1,15	1,23
SCARB2	scavenger receptor class B, member 2	1,09	1,37
SEP4	septin 4	1,12	1,14
SERPING1	serpin peptidase inhibitor, clade G (C1 inhibitor), member 1	1,42	1,98
SFT2D2	SFT2 domain containing 2	1,06	1,23
SIGLEC16	sialic acid binding Ig-like lectin 16 (gene/pseudogene)	1,23	1,38
SIPA1L2	signal-induced proliferation-associated 1 like 2	1,29	1,30
SLC1A3	solute carrier family 1, member 3	1,17	1,17
SLC22A16	solute carrier family 22, member 16	1,58	1,46
SLC27A3	solute carrier family 27 (fatty acid transporter), member 3	1,32	1,51
SLFN12	schlafen family member 12	1,42	1,73
SOBP	sine oculis binding protein homolog (Drosophila)	1,51	1,63
SOCS1	suppressor of cytokine signaling 1	2,62	2,91
SP100	SP100 nuclear antigen	1,05	1,30
SP110	SP110 nuclear body protein	1,10	1,26
SP140	SP140 nuclear body protein	1,41	1,75
SP140L	SP140 nuclear body protein-like	1,07	1,37
SRGAP2	SLIT-ROBO Rho GTPase activating protein 2	1,48	1,79
SRGAP2B	SLIT-ROBO Rho GTPase activating protein 2B (pseudogene)	1,58	1,89
SRGAP2C	SLIT-ROBO Rho GTPase activating protein 2C	1,37	1,67
SSTR2	somatostatin receptor 2	1,00	1,27
STAT1	signal transducer and activator of transcription 1, 91kDa	1,62	1,95
STAT2	signal transducer and activator of transcription 2, 113kDa	1,46	1,72
STX11	syntaxin 11	1,61	1,92
TDRD7	tudor domain containing 7	1,74	2,14
TFEC	transcription factor EC	1,79	2,03
TGM1	transglutaminase 1 (protein-glutamine-gamma-glutamyltransferase)	2,14	2,59
TLR7	toll-like receptor 7	1,37	1,69
TMEM140	transmembrane protein 140	1,09	1,07
TMEM62	transmembrane protein 62	1,56	1,85
TNFSF10	tumor necrosis factor (ligand) superfamily, member 10	2,16	2,55
TNFSF13B	tumor necrosis factor (ligand) superfamily, member 13b	1,39	1,79
TOR1B	torsin family 1, member B (torsin B)	1,95	2,28
TRANK1	tetratricopeptide repeat and ankyrin repeat containing 1	1,17	1,57
TREX1	three prime repair exonuclease 1	1,56	2,12
TRIM14	tripartite motif containing 14	1,28	1,71
TRIM21	tripartite motif containing 21	1,32	1,53
TRIM22	tripartite motif containing 22	1,25	1,43
TRIM25	tripartite motif containing 25	1,33	1,24
TRIM34	tripartite motif containing 34	1,05	1,02
TRIM5	tripartite motif containing 5	1,62	2,01
TRIM56	tripartite motif containing 56	1,09	1,23
TTC21A	tetratricopeptide repeat domain 21A	2,13	2,87

Genes comunes en Respondedores y No Respondedores a 4h: 223 genes (T-test)			
Símbolo del gen	Descripción del gen	Log 2 FC	
		NR	R
<i>TTC26</i>	tetratricopeptide repeat domain 26	1,04	1,60
<i>UBE2L6</i>	ubiquitin-conjugating enzyme E2L 6	1,30	1,70
<i>UBE2S</i>	ubiquitin-conjugating enzyme E2S	1,59	2,04
<i>UNC93B1</i>	unc-93 homolog B1 (C. elegans)	1,14	1,41
<i>USP18</i>	ubiquitin specific peptidase 18	3,17	3,95
<i>USP25</i>	ubiquitin specific peptidase 25	1,06	1,20
<i>ZBP1</i>	Z-DNA binding protein 1	2,10	2,35
<i>ZC3HAV1</i>	zinc finger CCCH-type, antiviral 1	1,48	1,84
<i>ZNF366</i>	zinc finger protein 366	1,13	1,11
<i>ZNF618</i>	zinc finger protein 618	1,07	1,15
<i>ZNF684</i>	zinc finger protein 684	1,56	1,86
<i>ZNFX1</i>	zinc finger, NFX1-type containing 1	1,63	1,75

Tabla A6. Lista de genes diferencialmente expresados a las 4h tras la administración del IFN β tanto en Respondedores como en No respondedores. La tasa de cambio "Fold change" (FC) indica las diferencias de expresión génica entre los valores encontrados a las 4h tras la administración del IFN β y su expresión basal. Los valores positivos indican un incremento en la expresión y los negativos una disminución con respecto a los valores basales. Valores de p ajustados <0.05.

Genes exclusivos en No Respondedores a 12h: 12 genes (T-test)		
Símbolo del gen	Descripción del gen	Log ₂ FC
<i>RBM3</i>	RNA binding motif (RNP1, RRM) protein 3	-1,00
<i>GTPBP2</i>	GTP binding protein 2	1,02
<i>HSPA1A</i>	heat shock 70kDa protein 1A	1,00
<i>HSPA6</i>	heat shock 70kDa protein 6 (HSP70B')	1,05
<i>HSPB1</i>	heat shock 27kDa protein 1	1,08
<i>LILRB5</i>	leukocyte immunoglobulin-like receptor, subfamily B, member 5	1,36
<i>LOC100129363</i>	uncharacterized LOC100129363	1,16
<i>LOC284837</i>	uncharacterized LOC284837	1,28
<i>RAB24</i>	RAB24, member RAS oncogene family	1,10
<i>RBM3</i>	RNA binding motif (RNP1, RRM) protein 3	-1,00
<i>TMEM140</i>	transmembrane protein 140	1,13
<i>UAB7</i>	ubiquitin-like modifier activating enzyme 7	1,08

Tabla A7. Lista de genes diferencialmente expresados exclusivamente en No Respondedores a las 12h tras la administración del IFN β . La tasa de cambio "Fold change" (FC) indica las diferencias de expresión génica entre los valores encontrados a las 12h tras la administración del IFN β y su expresión basal. Los valores positivos indican un incremento en la expresión y los negativos una disminución con respecto a los valores basales. Valores de p ajustados <0.05.

Genes exclusivos en Respondedores a 12h: 231 genes (T-test)		
Símbolo del gen	Descripción del gen	Log₂ FC
ABCC5	ATP-binding cassette, sub-family C (CFTR/MRP), member 5	-1,16
ADAMTS10	ADAM metallopeptidase with thrombospondin type 1 motif, 10	-1,35
CBX7	chromobox homolog 7	-1,06
CEP78	centrosomal protein 78kDa	-1,04
CTSF	cathepsin F	-1,25
DLEC1	deleted in lung and esophageal cancer 1	-1,04
EEPD1	endonuclease/exonuclease/phosphatase family domain containing 1	-1,01
FAM101B	family with sequence similarity 101, member B	-1,31
FGFBP2	fibroblast growth factor binding protein 2	-1,67
IL23A	interleukin 23, alpha subunit p19	-1,00
IL8	interleukin 8	-1,27
IRS2	insulin receptor substrate 2	-1,54
KLRB1	killer cell lectin-like receptor subfamily B, member 1	-1,21
LOC100505585	uncharacterized LOC100505585	-1,05
PER1	period homolog 1 (Drosophila)	-1,25
PIK3IP1	phosphoinositide-3-kinase interacting protein 1	-1,16
PTGDR	prostaglandin D2 receptor (DP)	-1,09
SGK1	serum/glucocorticoid regulated kinase 1	-1,44
SLC26A11	solute carrier family 26, member 11	-1,02
UPB1	ureidopropionase, beta	-1,14
ZBTB16	zinc finger and BTB domain containing 16	-1,13
ABCD1	ATP-binding cassette, sub-family D (ALD), member 1	1,27
ADAP2	ArfGAP with dual PH domains 2	1,02
ADPRH	ADP-ribosylarginine hydrolase	1,32
ADPRHL2	ADP-ribosylhydrolase like 2	1,06
AFF1	AF4/FMR2 family, member 1	1,34
AGPAT3	1-acylglycerol-3-phosphate O-acyltransferase 3	1,08
ANXA5	annexin A5	1,29
APOBEC3F	apolipoprotein B mRNA editing enzyme, catalytic polypeptide-like 3F	1,49
APOL1	apolipoprotein L, 1	1,30
APOL2	apolipoprotein L, 2	1,33
APOL4	apolipoprotein L, 4	1,20
ARHGEF10L	Rho guanine nucleotide exchange factor (GEF) 10-like	1,15
ARL5B	ADP-ribosylation factor-like 5B	1,33
AZI2	5-azacytidine induced 2	1,01
BAZ1A	bromodomain adjacent to zinc finger domain, 1A	1,06
BLVRA	biliverdin reductase A	1,52
BRCA2	breast cancer 2, early onset	1,00
C1GALT1	core 1 synthase, glycoprotein-N-acetylgalactosamine 3 β galactransf1	1,38
C1orf226	chromosome 1 open reading frame 226	1,06
C22orf28	chromosome 22 open reading frame 28	1,10
C4orf32	chromosome 4 open reading frame 32	1,05
C5	complement component 5	1,44
CARD16	caspase recruitment domain family, member 16	1,29
CASP1	caspase 1, apoptosis-related cysteine peptidase	1,11
CASP10	caspase 10, apoptosis-related cysteine peptidase	1,11
CBR1	carbonyl reductase 1	1,62
CCR1	chemokine (C-C motif) receptor 1	1,11
CCRL2	chemokine (C-C motif) receptor-like 2	1,44
CD164	CD164 molecule, sialomucin	1,06
CD2AP	CD2-associated protein	1,07
CD300E	CD300e molecule	1,55
CDC42EP2	CDC42 effector protein (Rho GTPase binding) 2	1,26

Genes exclusivos en Respondedores a 12h: 231 genes (T-test)		
Símbolo del gen	Descripción del gen	Log₂ FC
CH25H	cholesterol 25-hydroxylase	1,46
CHRNB1	cholinergic receptor, nicotinic, beta 1 (muscle)	1,03
CLDN23	claudin 23	1,34
CLIC4	chloride intracellular channel 4	1,02
CMC2	COX assembly mitochondrial protein 2 homolog (S. cerevisiae)	1,11
CMPK2	cytidine monophosphate (UMP-CMP) kinase 2, mitochondrial	2,96
CPEB3	cytoplasmic polyadenylation element binding protein 3	1,14
CXCL11	chemokine (C-X-C motif) ligand 11	1,78
CYP2J2	cytochrome P450, family 2, subfamily J, polypeptide 2	1,32
DAPP1	dual adaptor of phosphotyrosine and 3-phosphoinositides	1,07
DHRX	dehydrogenase/reductase (SDR family) X-linked	1,15
DISC1	disrupted in schizophrenia 1	1,27
DNAJA1	DnaJ (Hsp40) homolog, subfamily A, member 1	1,13
DNAJA1P5	DnaJ (Hsp40) homolog, subfamily A, member 1 pseudogene 5	1,13
DOCK4	dedicator of cytokinesis 4	1,90
DRAP1	DR1-associated protein 1 (negative cofactor 2 alpha)	1,45
DUSP5	dual specificity phosphatase 5	1,68
DZIP1L	DAZ interacting protein 1-like	2,28
EIF4G3	eukaryotic translation initiation factor 4 gamma, 3	1,09
ENHO	energy homeostasis associated	1,19
EPAS1	endothelial PAS domain protein 1	2,09
EPST1	epithelial stromal interaction 1 (breast)	1,87
EXOSC9	exosome component 9	1,74
FAM111A	family with sequence similarity 111, member A	1,03
FAM70A	family with sequence similarity 70, member A	1,22
FAM72A	family with sequence similarity 72, member A	1,47
FAM72D	family with sequence similarity 72, member D	1,36
FAM8A1	family with sequence similarity 8, member A1	1,15
FAS	Fas (TNF receptor superfamily, member 6)	1,26
FGL2	fibrinogen-like 2	1,24
FLJ32255	uncharacterized LOC643977	1,06
FMNL2	formin-like 2	1,18
FOXN3-AS1	FOXN3 antisense RNA 1	1,14
FRMPD3	FERM and PDZ domain containing 3	1,19
FUT4	fucosyltransferase 4	1,04
FXYD6	FXYD domain containing ion transport regulator 6	1,12
GADD45B	growth arrest and DNA-damage-inducible, beta	1,15
GALNT3	UDP-N-acetyl- α -D-galactosamine:polypeptide N-galactosyltransferase 3	1,19
GBP1P1	guanylate binding protein 1, interferon-inducible pseudogene 1	1,19
GBP5	guanylate binding protein 5	1,88
GORASP1	golgi reassembly stacking protein 1, 65kDa	1,12
GPD2	glycerol-3-phosphate dehydrogenase 2 (mitochondrial)	1,37
GPR155	G protein-coupled receptor 155	1,34
GTPBP1	GTP binding protein 1	1,16
HHEX	hematopoietically expressed homeobox	1,05
HORMAD1	HORMA domain containing 1	1,05
IDH2	isocitrate dehydrogenase 2 (NADP+), mitochondrial	1,16
IFI16	interferon, gamma-inducible protein 16	1,60
IFI44	interferon-induced protein 44	2,25
IFIT5	interferon-induced protein with tetratricopeptide repeats 5	1,94
IL15RA	interleukin 15 receptor, alpha	1,17
IL3RA	interleukin 3 receptor, alpha (low affinity)	1,13
IQSEC2	IQ motif and Sec7 domain 2	1,64

Genes exclusivos en Respondedores a 12h: 231 genes (T-test)		
Símbolo del gen	Descripción del gen	Log₂ FC
<i>ITPRIPL2</i>	inositol 1,4,5-trisphosphate receptor interacting protein-like 2	1,01
<i>JUP</i>	junction plakoglobin	2,25
<i>KCTD14</i>	potassium channel tetramerisation domain containing 14	1,01
<i>KIAA0226</i>	KIAA0226	1,45
<i>KIAA1109</i>	KIAA1109	1,23
<i>KIAA1522</i>	KIAA1522	1,38
<i>KIAA1958</i>	KIAA1958	1,54
<i>KLF5</i>	Kruppel-like factor 5 (intestinal)	1,62
<i>KLHDC7B</i>	kelch domain containing 7B	1,42
<i>KMO</i>	kynurenine 3-monooxygenase (kynurenine 3-hydroxylase)	1,31
<i>KRT78</i>	keratin 78	1,27
<i>LDLR</i>	low density lipoprotein receptor	1,28
<i>LGALS8</i>	lectin, galactoside-binding, soluble, 8	1,29
<i>LHFPL2</i>	lipoma HMGIC fusion partner-like 2	1,05
<i>LILRB1</i>	leukocyte immunoglobulin-like receptor, subfamily B, member 1	1,22
<i>LILRB4</i>	leukocyte immunoglobulin-like receptor, subfamily B, member 4	1,36
<i>LINC00487</i>	long intergenic non-protein coding RNA 487	1,82
<i>LOC100128242</i>	uncharacterized LOC100128242	1,75
<i>LOC100128338</i>	uncharacterized LOC100128338	1,37
<i>LOC100133669</i>	uncharacterized LOC100133669	1,50
<i>LOC100188947</i>	uncharacterized LOC100188947	1,19
<i>LOC439914</i>	uncharacterized LOC439914	1,07
<i>LRRC3</i>	leucine rich repeat containing 3	1,27
<i>LY6E</i>	lymphocyte antigen 6 complex, locus E	2,33
<i>MAFB</i>	v-maf musculoaponeurotic fibrosarcoma oncogene homolog B	1,53
<i>MAP2K6</i>	mitogen-activated protein kinase kinase 6	1,62
<i>MASTL</i>	microtubule associated serine/threonine kinase-like	1,61
<i>MB21D1</i>	Mab-21 domain containing 1	1,17
<i>MGC39372</i>	serpin peptidase inhibitor, clade B, member 9 pseudogene	1,39
<i>MIA3</i>	melanoma inhibitory activity family, member 3	1,30
<i>MICB</i>	MHC class I polypeptide-related sequence B	1,34
<i>MR1</i>	major histocompatibility complex, class I-related	1,00
<i>MRPL44</i>	mitochondrial ribosomal protein L44	1,09
<i>MS4A6A</i>	membrane-spanning 4-domains, subfamily A, member 6A	1,17
<i>MSR1</i>	macrophage scavenger receptor 1	1,69
<i>NAGK</i>	N-acetylglucosamine kinase	1,12
<i>NAPA</i>	N-ethylmaleimide-sensitive factor attachment protein, alpha	1,19
<i>NBN</i>	nibrin	1,06
<i>NFKBIE</i>	nuclear factor of κ light polyp gene enhancer in B-cells inhibitor, ϵ	1,04
<i>NHLRC4</i>	NHL repeat containing 4	1,30
<i>NLRC5</i>	NLR family, CARD domain containing 5	1,00
<i>NME8</i>	NME/NM23 family member 8	1,15
<i>NMI</i>	N-myc (and STAT) interactor	1,38
<i>NOD1</i>	nucleotide-binding oligomerization domain containing 1	1,36
<i>NRIP1</i>	nuclear receptor interacting protein 1	1,00
<i>OAS1</i>	2'-5'-oligoadenylate synthetase 1, 40/46kDa	2,67
<i>P2RY14</i>	purinergic receptor P2Y, G-protein coupled, 14	1,55
<i>PARP11</i>	poly (ADP-ribose) polymerase family, member 11	1,37
<i>PATL1</i>	protein associated with topoisomerase II homolog 1 (yeast)	1,14
<i>PCGF5</i>	polycomb group ring finger 5	1,26
<i>PHACTR2</i>	phosphatase and actin regulator 2	1,48
<i>PHF11</i>	PHD finger protein 11	1,50
<i>PHLDA2</i>	pleckstrin homology-like domain, family A, member 2	1,42

Genes exclusivos en Respondedores a 12h: 231 genes (T-test)		
Símbolo del gen	Descripción del gen	Log₂ FC
PI4K2B	phosphatidylinositol 4-kinase type 2 beta	1,83
PIK3AP1	phosphoinositide-3-kinase adaptor protein 1	1,50
PIWIL4	piwi-like 4 (Drosophila)	1,09
PLSCR4	phospholipid scramblase 4	1,01
PMAIP1	phorbol-12-myristate-13-acetate-induced protein 1	1,01
PPM1K	protein phosphatase, Mg ²⁺ /Mn ²⁺ dependent, 1K	1,24
PRKAG2	protein kinase, AMP-activated, gamma 2 non-catalytic subunit	1,15
PRKCE	protein kinase C, epsilon	1,21
PRKD2	protein kinase D2	1,00
PSMA4	proteasome (prosome, macropain) subunit, alpha type, 4	1,06
PSMB9	proteasome (prosome, macropain) subunit, beta type, 9	1,07
PSME2	proteasome (prosome, macropain) activator subunit 2 (PA28 beta)	1,38
PTP4A1	protein tyrosine phosphatase type IVA, member 1	1,29
PTPRU	protein tyrosine phosphatase, receptor type, U	1,93
RABGAP1L	RAB GTPase activating protein 1-like	1,37
RASGEF1B	RasGEF domain family, member 1B	1,57
RASGRP3	RAS guanyl releasing protein 3 (calcium and DAG-regulated)	1,49
RBM20	RNA binding motif protein 20	1,44
RBM43	RNA binding motif protein 43	1,52
RHBDF2	rhomboid 5 homolog 2 (Drosophila)	1,18
RNF19B	ring finger protein 19B	1,00
RPAP3	RNA polymerase II associated protein 3	1,01
RSAD2	radical S-adenosyl methionine domain containing 2	3,38
RTP4	receptor (chemosensory) transporter protein 4	2,32
SAMHD1	SAM domain and HD domain 1	1,13
SCARB2	scavenger receptor class B, member 2	1,55
SCIMP	SLP adaptor and CSK interacting membrane protein	1,50
SDSL	serine dehydratase-like	1,16
SEC24D	SEC24 family, member D (S. cerevisiae)	1,30
SECTM1	secreted and transmembrane 1	1,37
SELL	selectin L	1,01
SFT2D2	SFT2 domain containing 2	1,18
SIGLEC1	sialic acid binding Ig-like lectin 1, sialoadhesin	3,40
SIPA1L2	signal-induced proliferation-associated 1 like 2	1,18
SLC24A1	solute carrier family 24 member 1	1,07
SLC6A12	solute carrier family 6 member 12	1,04
SLFN12	schlafen family member 12	1,66
SMCHD1	structural maintenance of chromosomes flexible hinge domain 1	1,09
SNTB1	syntrophin, beta 1	1,05
SP100	SP100 nuclear antigen	1,30
SP110	SP110 nuclear body protein	1,26
SP140L	SP140 nuclear body protein-like	1,57
SQRDL	sulfide quinone reductase-like (yeast)	1,12
SRC	v-src sarcoma (Schmidt-Ruppin A-2) viral oncogene homolog (avian)	1,07
ST3GAL5	ST3 beta-galactoside alpha-2,3-sialyltransferase 5	1,15
STAC3	SH3 and cysteine rich domain 3	1,57
STOML1	stomatin (EPB72)-like 1	1,05
TAP1	transporter 1, ATP-binding cassette, sub-family B (MDR/TAP)	1,25
TAP2	transporter 2, ATP-binding cassette, sub-family B (MDR/TAP)	1,10
TCN1	transcobalamin I (vitamin B12 binding protein, R binder family)	1,06
TCN2	transcobalamin II	1,89
TGM1	transglutaminase 1	2,72
TMEM110	transmembrane protein 110	1,47

Genes exclusivos en Respondedores a 12h: 231 genes (T-test)		
Símbolo del gen	Descripción del gen	Log ₂ FC
<i>TMEM123</i>	transmembrane protein 123	1,57
<i>TMEM229B</i>	transmembrane protein 229B	1,15
<i>TMEM51</i>	transmembrane protein 51	1,68
<i>TMEM62</i>	transmembrane protein 62	1,50
<i>TNK2</i>	tyrosine kinase, non-receptor, 2	1,03
<i>TRAFD1</i>	TRAF-type zinc finger domain containing 1	1,02
<i>TRIM21</i>	tripartite motif containing 21	1,27
<i>TRIM26</i>	tripartite motif containing 26	1,20
<i>TRIM38</i>	tripartite motif containing 38	1,32
<i>TTC26</i>	tetratricopeptide repeat domain 26	1,80
<i>USP25</i>	ubiquitin specific peptidase 25	1,27
<i>USP30-AS1</i>	USP30 antisense RNA 1	1,31
<i>USPL1</i>	ubiquitin specific peptidase like 1	1,07
<i>WARS</i>	tryptophanyl-tRNA synthetase	1,92
<i>WFDC3</i>	WAP four-disulfide core domain 3	1,37
<i>XRN1</i>	5'-3' exoribonuclease 1	1,65
<i>XXYL1</i>	xyloside xylosyltransferase 1	1,58
<i>ZFYVE26</i>	zinc finger, FYVE domain containing 26	1,24
<i>ZNF366</i>	zinc finger protein 366	1,13

Tabla A8. Lista de genes diferencialmente expresados exclusivamente en Respondedores a las 12h tras la administración del IFN β . La tasa de cambio "Fold change" (FC) indica las diferencias de expresión génica entre los valores encontrados a las 12h tras la administración del IFN β y su expresión basal. Los valores positivos indican un incremento en la expresión y los negativos una disminución con respecto a los valores basales. Valores de p ajustados <0.05.

Genes comunes en Respondedores y No Respondedores a 12h: 179 genes (T-test)			
Símbolo del gen	Descripción del gen	Log 2 FC	
		NR	R
DDIT4	DNA-damage-inducible transcript 4	-1,42	-1,88
ABTB2	ankyrin repeat and BTB (POZ) domain containing 2	2,02	2,85
ACOT9	acyl-CoA thioesterase 9	1,16	1,47
ADAR	adenosine deaminase, RNA-specific	1,02	1,04
AGRN	agrin	1,45	1,63
AIM2	absent in melanoma 2	1,77	2,12
ANKRD22	ankyrin repeat domain 22	1,25	2,18
APOBEC3A	apolipoprotein B mRNA editing enzyme, catalytic polypeptide-like 3A	1,50	1,85
APOBEC3B	apolipoprotein B mRNA editing enzyme, catalytic polypeptide-like 3B	1,67	1,89
APOL6	apolipoprotein L, 6	1,30	1,96
ATF3	activating transcription factor 3	2,72	3,76
ATF5	activating transcription factor 5	1,24	1,70
BATF2	basic leucine zipper transcription factor, ATF-like 2	2,31	3,14
BATF3	basic leucine zipper transcription factor, ATF-like 3	1,26	1,84
BST2	bone marrow stromal cell antigen 2	1,42	2,00
C15orf48	chromosome 15 open reading frame 48	1,58	2,53
C5orf56	chromosome 5 open reading frame 56	1,24	1,46
C9orf91	chromosome 9 open reading frame 91	1,35	1,88
CACNA1A	calcium channel, voltage-dependent, P/Q type, alpha 1A subunit	1,48	2,10
CARD17	caspase recruitment domain family, member 17	1,11	1,30
CBWD5	COBW domain containing 5	1,19	1,46
CCL1	chemokine (C-C motif) ligand 1	1,09	1,47
CCL2	chemokine (C-C motif) ligand 2	4,03	4,94
CCL8	chemokine (C-C motif) ligand 8	3,50	4,56
CD274	CD274 molecule	2,00	2,71
CEACAM1	carcinoembryonic antigen-related cell adhesion molecule 1	2,07	2,52
CFB	complement factor B	1,19	1,80
CHMP5	charged multivesicular body protein 5	1,06	1,46
CNP	2',3'-cyclic nucleotide 3' phosphodiesterase	1,28	1,81
CSRNP1	cysteine-serine-rich nuclear protein 1	1,37	1,70
CXCL10	chemokine (C-X-C motif) ligand 10	3,51	5,10
CXorf21	chromosome X open reading frame 21	1,19	1,45
DDX58	DEAD (Asp-Glu-Ala-Asp) box polypeptide 58	1,88	2,85
DDX60	DEAD (Asp-Glu-Ala-Asp) box polypeptide 60	1,46	2,12
DDX60L	DEAD (Asp-Glu-Ala-Asp) box polypeptide 60-like	1,47	2,04
DEFB1	defensin, beta 1	2,54	3,29
DHRS9	dehydrogenase/reductase (SDR family) member 9	1,51	1,56
DHX58	DEXH (Asp-Glu-X-His) box polypeptide 58	1,77	2,57
DTX3L	deltex 3-like (Drosophila)	1,07	1,56
DYNLT1	dynein, light chain, Tctex-type 1	1,34	1,73
EIF2AK2	eukaryotic translation initiation factor 2-alpha kinase 2	1,48	1,95
ETV7	ets variant 7	2,28	3,39
EXOC3L1	exocyst complex component 3-like 1	1,55	1,92
FAM122C	family with sequence similarity 122C	1,17	1,52
FAM46A	family with sequence similarity 46, member A	1,37	2,03
FANCA	Fanconi anemia, complementation group A	1,29	1,66
FAP	fibroblast activation protein, alpha	1,30	1,84
FAR2	fatty acyl CoA reductase 2	1,44	2,05
FBXO6	F-box protein 6	1,46	1,80
FRMD3	FERM domain containing 3	1,89	2,37
FTSJ2	FtsJ methyltransferase domain containing 2	1,04	1,81
GALM	galactose mutarotase (aldose 1-epimerase)	2,03	2,63
GAS6	growth arrest-specific 6	1,07	1,32

Genes comunes en Respondedores y No Respondedores a 12h: 179 genes (T-test)			
Símbolo del gen	Descripción del gen	Log 2 FC	
		NR	R
GBP1	guanylate binding protein 1, interferon-inducible	1,90	2,52
GBP4	guanylate binding protein 4	1,58	2,49
GCH1	GTP cyclohydrolase 1	1,29	1,88
GNB4	guanine nucleotide binding protein (G protein), beta polypeptide 4	1,12	1,46
GPR141	G protein-coupled receptor 141	1,07	1,37
GPR84	G protein-coupled receptor 84	1,21	1,55
GRAMD1B	GRAM domain containing 1B	1,97	2,56
HERC5	HECT and RLD domain containing E3 ubiquitin protein ligase 5	2,41	3,30
HERC6	HECT and RLD domain containing E3 ubiquitin protein ligase fam m 6	1,74	2,27
HES4	hairy and enhancer of split 4 (Drosophila)	2,86	3,70
HESX1	HESX homeobox 1	2,87	4,00
HNRPLL	heterogeneous nuclear ribonucleoprotein L-like	1,50	2,05
HPSE	heparanase	1,30	1,52
HSH2D	hematopoietic SH2 domain containing	1,19	1,23
HSPB9	heat shock protein, alpha-crystallin-related, B9	1,03	1,26
IDO1	indoleamine 2,3-dioxygenase 1	2,69	4,26
IFI35	interferon-induced protein 35	1,80	2,55
IFI6	interferon, alpha-inducible protein 6	2,31	2,94
IFIH1	interferon induced with helicase C domain 1	1,85	2,72
IFIT1	interferon-induced protein with tetratricopeptide repeats 1	2,54	3,19
IFIT2	interferon-induced protein with tetratricopeptide repeats 2	2,24	2,91
IFIT3	interferon-induced protein with tetratricopeptide repeats 3	2,23	2,78
IFITM1	interferon induced transmembrane protein 1	1,13	1,63
IFITM3	interferon induced transmembrane protein 3	1,06	1,20
IFITM4P	interferon induced transmembrane protein 4 pseudogene	1,12	1,20
IL1RN	interleukin 1 receptor antagonist	1,99	2,78
IL27	interleukin 27	1,68	2,15
IL411	interleukin 4 induced 1	1,82	2,70
IRF7	interferon regulatory factor 7	1,91	2,47
ISG15	ISG15 ubiquitin-like modifier	2,47	3,43
ISG20	interferon stimulated exonuclease gene 20kDa	1,41	2,12
ITPK1	inositol-tetrakisphosphate 1-kinase	1,00	1,07
JAK2	Janus kinase 2	1,00	1,13
KIAA0319L	KIAA0319-like	1,86	2,11
KIAA0895L	KIAA0895-like	1,88	2,01
KPTN	kaptin (actin binding protein)	1,42	1,60
LAMP3	lysosomal-associated membrane protein 3	3,28	4,83
LAP3	leucine aminopeptidase 3	1,79	2,68
LGALS9	lectin, galactoside-binding, soluble, 9	1,34	1,54
LGALS9C	lectin, galactoside-binding, soluble, 9C	1,15	1,54
LMO2	LIM domain only 2 (rhombotin-like 1)	1,48	1,81
LYSMD2	LysM, putative peptidoglycan-binding, domain containing 2	1,02	1,47
MLKL	mixed lineage kinase domain-like	1,10	1,17
MOV10	Mov10, Moloney leukemia virus 10, homolog (mouse)	1,85	2,33
MT1A	metallothionein 1A	1,80	2,41
MT1B	metallothionein 1B	2,17	3,01
MT1E	metallothionein 1E	1,96	2,83
MT1H	metallothionein 1H	2,06	2,89
MT1L	metallothionein 1L (gene/pseudogene)	2,10	3,07
MT1X	metallothionein 1X	2,05	2,86
MT2A	metallothionein 2A	1,99	3,04
MX1	myxovirus resistance 1, interferon-inducible protein p78 (mouse)	2,35	2,97
MX2	myxovirus (influenza virus) resistance 2 (mouse)	1,50	2,03

Genes comunes en Respondedores y No Respondedores a 12h: 179 genes (T-test)			
Símbolo del gen	Descripción del gen	Log 2 FC	
		NR	R
<i>MYOF</i>	myoferlin	1,16	1,70
<i>NADK</i>	NAD kinase	1,13	1,12
<i>NCF1</i>	neutrophil cytosolic factor 1	1,71	1,65
<i>NCOA7</i>	nuclear receptor coactivator 7	1,72	2,49
<i>NEXN</i>	nexilin (F actin binding protein)	1,54	2,05
<i>NT5C3</i>	5'-nucleotidase, cytosolic III	1,45	2,22
<i>NTNG2</i>	netrin G2	1,59	1,74
<i>NUB1</i>	negative regulator of ubiquitin-like proteins 1	1,34	1,81
<i>OAS2</i>	2'-5'-oligoadenylate synthetase 2, 69/71kDa	2,03	2,64
<i>OAS3</i>	2'-5'-oligoadenylate synthetase 3, 100kDa	2,33	2,99
<i>OASL</i>	2'-5'-oligoadenylate synthetase-like	2,30	3,11
<i>P2RY6</i>	pyrimidineric receptor P2Y, G-protein coupled, 6	1,57	1,96
<i>PARP10</i>	poly (ADP-ribose) polymerase family, member 10	1,52	1,90
<i>PARP12</i>	poly (ADP-ribose) polymerase family, member 12	1,71	2,23
<i>PARP14</i>	poly (ADP-ribose) polymerase family, member 14	1,39	2,02
<i>PARP9</i>	poly (ADP-ribose) polymerase family, member 9	1,45	1,70
<i>PKD2L1</i>	polycystic kidney disease 2-like 1	1,49	2,39
<i>PLSCR1</i>	phospholipid scramblase 1	1,50	2,23
<i>PML</i>	promyelocytic leukemia	1,78	2,39
<i>PNPT1</i>	polyribonucleotide nucleotidyltransferase 1	2,10	2,92
<i>PRIC285</i>	peroxisomal proliferator-activated receptor A interacting complex 285	1,54	2,10
<i>RBCK1</i>	RanBP-type and C3HC4-type zinc finger containing 1	1,43	1,50
<i>RGL1</i>	ral guanine nucleotide dissociation stimulator-like 1	1,66	2,47
<i>RIN2</i>	Ras and Rab interactor 2	1,72	2,27
<i>RNF213</i>	ring finger protein 213	1,36	1,84
<i>RSPH9</i>	radial spoke head 9 homolog (Chlamydomonas)	1,07	1,52
<i>RUFY4</i>	RUN and FYVE domain containing 4	1,45	1,52
<i>SAMD4A</i>	sterile alpha motif domain containing 4A	2,23	2,90
<i>SAMD9</i>	sterile alpha motif domain containing 9	1,64	2,16
<i>SAMD9L</i>	sterile alpha motif domain containing 9-like	1,89	2,42
<i>SAT1</i>	spermidine/spermine N1-acetyltransferase 1	1,28	1,57
<i>SCO2</i>	SCO cytochrome oxidase deficient homolog 2 (yeast)	1,80	1,65
<i>SEPT04</i>	septin 4	1,65	2,08
<i>SERPING1</i>	serpin peptidase inhibitor, clade G (C1 inhibitor), member 1	2,57	3,39
<i>SIGLEC14</i>	sialic acid binding Ig-like lectin 14	1,08	1,34
<i>SIGLEC16</i>	sialic acid binding Ig-like lectin 16 (gene/pseudogene)	1,05	1,29
<i>SLC27A3</i>	solute carrier family 27 (fatty acid transporter), member 3	1,47	1,77
<i>SLC35E1</i>	solute carrier family 35, member E1	1,13	1,28
<i>SOCS1</i>	suppressor of cytokine signaling 1	1,44	2,36
<i>SP140</i>	SP140 nuclear body protein	1,20	1,97
<i>SPATS2L</i>	spermatogenesis associated, serine-rich 2-like	2,30	3,20
<i>SRGAP2</i>	SLIT-ROBO Rho GTPase activating protein 2	1,58	2,18
<i>SRGAP2B</i>	SLIT-ROBO Rho GTPase activating protein 2B (pseudogene)	1,19	1,75
<i>SRGAP2C</i>	SLIT-ROBO Rho GTPase activating protein 2C	1,23	1,92
<i>STAT1</i>	signal transducer and activator of transcription 1, 91kDa	1,37	1,83
<i>STAT2</i>	signal transducer and activator of transcription 2, 113kDa	1,55	2,13
<i>STX11</i>	syntaxin 11	1,35	1,71
<i>TDRD7</i>	tudor domain containing 7	1,36	1,91
<i>TFEC</i>	transcription factor EC	2,04	2,90
<i>TLR7</i>	toll-like receptor 7	1,48	2,04
<i>TMEM106A</i>	transmembrane protein 106A	1,06	1,03
<i>TNFAIP6</i>	tumor necrosis factor, alpha-induced protein 6	1,88	2,50
<i>TNFSF10</i>	tumor necrosis factor (ligand) superfamily, member 10	2,17	2,78

Genes comunes en Respondedores y No Respondedores a 12h: 179 genes (T-test)			
Símbolo del gen	Descripción del gen	Log 2 FC	
		NR	R
<i>TNFSF13B</i>	tumor necrosis factor (ligand) superfamily, member 13b	1,42	2,06
<i>TOR1B</i>	torsin family 1, member B (torsin B)	1,78	2,07
<i>TRANK1</i>	tetratricopeptide repeat and ankyrin repeat containing 1	1,25	1,68
<i>TREX1</i>	three prime repair exonuclease 1	1,30	1,97
<i>TRIM14</i>	tripartite motif containing 14	1,05	1,43
<i>TRIM22</i>	tripartite motif containing 22	1,30	1,81
<i>TRIM5</i>	tripartite motif containing 5	1,41	1,89
<i>TRIM6</i>	tripartite motif containing 6	1,36	1,39
<i>TTC21A</i>	tetratricopeptide repeat domain 21A	1,97	3,08
<i>UBE2L6</i>	ubiquitin-conjugating enzyme E2L 6	1,49	2,05
<i>UBE2S</i>	ubiquitin-conjugating enzyme E2S	1,20	1,83
<i>UBQLNL</i>	ubiquilin-like	1,20	1,51
<i>UNC93B1</i>	unc-93 homolog B1 (C. elegans)	1,18	1,41
<i>USP18</i>	ubiquitin specific peptidase 18	2,79	4,00
<i>VAMP5</i>	vesicle-associated membrane protein 5 (myobrevin)	1,36	1,96
<i>XAF1</i>	XIAP associated factor 1	1,74	2,36
<i>ZBP1</i>	Z-DNA binding protein 1	1,93	2,44
<i>ZC3HAV1</i>	zinc finger CCCH-type, antiviral 1	1,15	1,84
<i>ZNF684</i>	zinc finger protein 684	1,22	1,98
<i>ZNFX1</i>	zinc finger, NFX1-type containing 1	1,04	1,54

Tabla A9. Lista de genes diferencialmente expresados en Respondedores y No Respondedores a las 12h tras la administración del IFN β . La tasa de cambio "Fold change" (FC) indica las diferencias de expresión génica entre los valores encontrados a las 12h tras la administración del IFN β y su expresión basal. Los valores positivos indican un incremento en la expresión y los negativos una disminución con respecto a los valores basales. Valores de p ajustados <0.05.

8.2.2 Listas de genes diferencialmente expresados a las 4h, 12h y 24h tras la administración del IFN β . Análisis mediante *rank product*.

Genes exclusivos en No Respondedores a 4h: 17 genes (Rank product)		
Símbolo del gen	Descripción del gen	Log ₂ FC
AP5B1	adaptor-related protein complex 5, beta 1 subunit	1,10
BMF	Bcl2 modifying factor	-1,06
C15orf48	chromosome 15 open reading frame 48	1,03
CLEC4D	C-type lectin domain family 4, member D	1,03
EIF2AK2	eukaryotic translation initiation factor 2-alpha kinase 2	1,82
FCGR1B	Fc fragment of IgG, high affinity Ib, receptor (CD64)	1,01
FFAR2	free fatty acid receptor 2	1,19
GPR180	G protein-coupled receptor 180	1,00
GRIN3A	glutamate receptor, ionotropic, N-methyl-D-aspartate 3A	1,13
LOC728769	uncharacterized LOC728769	1,01
NCF1	neutrophil cytosolic factor 1	1,04
NTNG2	netrin G2	1,04
PIWIL4	piwi-like 4 (Drosophila)	1,08
POM121L2	POM121 transmembrane nucleoporin-like 2	1,77
SCO2	SCO cytochrome oxidase deficient homolog 2 (yeast)	1,07
TMEM140	transmembrane protein 140	1,09
TRIM34	tripartite motif containing 34	1,05

Tabla A10. Lista de genes diferencialmente expresados exclusivamente en No Respondedores a las 4h tras la administración del IFN β mediante Rank product. La tasa de cambio "Fold change" (FC) indica las diferencias de expresión génica entre los valores encontrados a las 4h tras la administración del IFN β y su expresión basal. Los valores positivos indican un incremento en la expresión y los negativos una disminución con respecto a los valores basales. Valores de p ajustados <0.05.

Genes exclusivos en Respondedores a 4h: 79 genes (Rank product)		
Símbolo del gen	Descripción del gen	Log₂ FC
<i>ABCD1</i>	ATP-binding cassette, sub-family D (ALD), member 1	1,16
<i>ACOT9</i>	acyl-CoA thioesterase 9	1,14
<i>ADAR</i>	adenosine deaminase, RNA-specific	1,13
<i>AGRN</i>	agrin	1,15
<i>AMOTL2</i>	angiomin like 2	1,37
<i>APOBEC3F</i>	apolipoprotein B mRNA editing enzyme, catalytic polypeptide-like 3F	1,17
<i>APOL2</i>	apolipoprotein L, 2	1,14
<i>BST2</i>	bone marrow stromal cell antigen 2	1,31
<i>CD160</i>	CD160 molecule	-1,12
<i>CHRNB1</i>	cholinergic receptor, nicotinic, beta 1 (muscle)	1,20
<i>CLIC4</i>	chloride intracellular channel 4	1,08
<i>CPEB2</i>	cytoplasmic polyadenylation element binding protein 2	1,25
<i>CX3CR1</i>	chemokine (C-X3-C motif) receptor 1	-1,38
<i>CXCR6</i>	chemokine (C-X-C motif) receptor 6	-1,21
<i>DDIT4</i>	DNA-damage-inducible transcript 4	-1,43
<i>DNAJA1P5</i>	DnaJ (Hsp40) homolog, subfamily A, member 1 pseudogene 5	1,27
<i>DRAP1</i>	DR1-associated protein 1 (negative cofactor 2 alpha)	1,19
<i>DUSP1</i>	dual specificity phosphatase 1	-1,18
<i>DZIP1L</i>	DAZ interacting protein 1-like	1,31
<i>ENPP2</i>	ectonucleotide pyrophosphatase/phosphodiesterase 2	1,17
<i>EXT1</i>	exostosin 1	1,17
<i>FADS1</i>	fatty acid desaturase 1	-1,16
<i>FAS</i>	Fas (TNF receptor superfamily, member 6)	1,03
<i>GADD45B</i>	growth arrest and DNA-damage-inducible, beta	1,10
<i>GORASP1</i>	golgi reassembly stacking protein 1, 65kDa	1,07
<i>GPER</i>	G protein-coupled estrogen receptor 1	-1,18
<i>GPR141</i>	G protein-coupled receptor 141	1,05
<i>GPR56</i>	G protein-coupled receptor 56	-1,21
<i>GTF2B</i>	general transcription factor IIB	1,15
<i>HIVEP3</i>	human immunodeficiency virus type I enhancer binding protein 3	-1,32
<i>HOPX</i>	HOP homeobox	-1,13
<i>IER3</i>	immediate early response 3	-1,23
<i>IL8</i>	interleukin 8	-1,49
<i>IRS2</i>	insulin receptor substrate 2	-1,21
<i>KIAA1958</i>	KIAA1958	1,39
<i>KLRC1</i>	killer cell lectin-like receptor subfamily C, member 1	-1,06
<i>KLRD1</i>	killer cell lectin-like receptor subfamily D, member 1	-1,14
<i>KLRF1</i>	killer cell lectin-like receptor subfamily F, member 1	-1,32
<i>LGALS9C</i>	lectin, galactoside-binding, soluble, 9C	1,30
<i>LHFPL2</i>	lipoma HMGIC fusion partner-like 2	1,10
<i>LIF</i>	leukemia inhibitory factor	1,07
<i>LOC100188947</i>	uncharacterized LOC100188947	1,06
<i>LY6E</i>	lymphocyte antigen 6 complex, locus E	1,41
<i>MIA3</i>	melanoma inhibitory activity family, member 3	1,18
<i>MICA</i>	MHC class I polypeptide-related sequence A	1,19
<i>NMUR1</i>	neuromedin U receptor 1	-1,34
<i>NPVF</i>	neuropeptide VF precursor	1,02
<i>OLIG1</i>	oligodendrocyte transcription factor 1	-1,19
<i>PAPLN</i>	papilin, proteoglycan-like sulfated glycoprotein	1,09
<i>PER1</i>	period homolog 1 (Drosophila)	-1,48
<i>PRSS30P</i>	protease, serine, 30 homolog (mouse), pseudogene	-1,19

Genes exclusivos en Respondedores a 4h: 79 genes (Rank product)		
Símbolo del gen	Descripción del gen	Log₂ FC
<i>PTP4A1</i>	protein tyrosine phosphatase type IVA, member 1	1,14
<i>RGS1</i>	regulator of G-protein signaling 1	2,84
<i>RGS2</i>	regulator of G-protein signaling 2, 24kDa	-1,28
<i>RHBDF2</i>	rhomboid 5 homolog 2 (Drosophila)	1,11
<i>RIF1</i>	RAP1 interacting factor homolog (yeast)	1,07
<i>RPL28</i>	ribosomal protein L28	1,20
<i>RSPH9</i>	radial spoke head 9 homolog (Chlamydomonas)	1,18
<i>SAMHD1</i>	SAM domain and HD domain 1	1,08
<i>SEC24D</i>	SEC24 family, member D (S. cerevisiae)	1,28
<i>SLC25A28</i>	solute carrier family 25 (mitochondrial iron transporter), member 28	1,05
<i>SLC35E1</i>	solute carrier family 35, member E1	1,10
<i>SPATA13</i>	spermatogenesis associated 13	1,10
<i>SPON2</i>	spondin 2, extracellular matrix protein	-1,17
<i>SPSB1</i>	splA/ryanodine receptor domain and SOCS box containing 1	1,12
<i>SSB</i>	Sjogren syndrome antigen B (autoantigen La)	1,10
<i>SSTR2</i>	somatostatin receptor 2	1,27
<i>TAP1</i>	transporter 1, ATP-binding cassette, sub-family B (MDR/TAP)	1,16
<i>TCF4</i>	transcription factor 4	1,27
<i>TMEM110</i>	transmembrane protein 110	1,22
<i>TNFRSF12A</i>	tumor necrosis factor receptor superfamily, member 12A	-1,30
<i>TNFRSF8</i>	tumor necrosis factor receptor superfamily, member 8	-1,10
<i>TRAFD1</i>	TRAF-type zinc finger domain containing 1	1,12
<i>TRIB2</i>	tribbles homolog 2 (Drosophila)	1,21
<i>TRIM26</i>	tripartite motif containing 26	1,35
<i>TRIM38</i>	tripartite motif containing 38	1,24
<i>TRIM78P</i>	tripartite motif containing 78, pseudogene	1,09
<i>USPL1</i>	ubiquitin specific peptidase like 1	1,25
<i>XRN1</i>	5'-3' exoribonuclease 1	1,11

Tabla A11. Lista de genes diferencialmente expresados exclusivamente en Respondedores a las 4h tras la administración del IFN β mediante Rank product. La tasa de cambio "Fold change" (FC) indica las diferencias de expresión génica entre los valores encontrados a las 4h tras la administración del IFN β y su expresión basal. Los valores positivos indican un incremento en la expresión y los negativos una disminución con respecto a los valores basales. Valores de p ajustados <0.05.

Genes comunes en Respondedores y No Respondedores a 4h: 263 genes (Rank product)			
Símbolo del gen	Descripción del gen	Log 2 FC	
		NR	R
ABTB2	ankyrin repeat and BTB (POZ) domain containing 2	2,26	2,68
ADPRHL2	ADP-ribosylhydrolase like 2	1,04	1,26
AFF1	AF4/FMR2 family, member 1	1,07	1,36
AIM2	absent in melanoma 2	1,66	1,81
AKAP2	A kinase (PRKA) anchor protein 2	1,17	1,18
ANKFY1	ankyrin repeat and FYVE domain containing 1	1,79	2,06
ANKMY1	ankyrin repeat and MYND domain containing 1	1,31	1,42
ANKRD22	ankyrin repeat domain 22	1,94	2,39
APOBEC3A	apolipoprotein B mRNA editing enzyme, catalytic polypeptide-like 3A	1,25	1,54
APOBEC3B	apolipoprotein B mRNA editing enzyme, catalytic polypeptide-like 3B	1,39	1,51
APOL1	apolipoprotein L, 1	1,05	1,26
APOL6	apolipoprotein L, 6	1,65	2,07
ATF3	activating transcription factor 3	3,24	3,65
ATF5	activating transcription factor 5	1,16	1,41
BATF2	basic leucine zipper transcription factor, ATF-like 2	2,66	3,32
BATF3	basic leucine zipper transcription factor, ATF-like 3	1,18	1,39
BAZ1A	bromodomain adjacent to zinc finger domain, 1A core 1 synthase, glycoprotein-N-acetylgalactosamine 3-beta-galactosyltransferase, 1	1,03	1,25
C1GALT1	chromosome 1 open reading frame 173	1,11	1,46
C1orf173	chromosome 22 open reading frame 28	1,86	1,59
C22orf28	chromosome 5 open reading frame 56	1,08	1,25
C5orf56	chromosome 9 open reading frame 91	1,63	1,90
C9orf91	calcium channel, voltage-dependent, P/Q type, alpha 1A subunit	1,39	1,68
CACNA1A	carbonyl reductase 1	1,98	2,36
CBR1	COBW domain containing 5	1,17	1,40
CBWD5	chemokine (C-C motif) ligand 1	1,17	1,13
CCL1	chemokine (C-C motif) ligand 2	1,14	1,50
CCL2	chemokine (C-C motif) ligand 7	4,43	5,49
CCL7	chemokine (C-C motif) ligand 8	1,13	1,38
CCL8	CD274 molecule	4,80	5,82
CD274	CD38 molecule	2,41	2,67
CD38	CD69 molecule	1,23	1,21
CD69	carcinoembryonic antigen-related cell adhesion molecule 1	1,45	1,37
CEACAM1	cholesterol 25-hydroxylase	1,99	2,23
CH25H	claudin 23	1,91	1,89
CLDN23	cytidine monophosphate (UMP-CMP) kinase 2, mitochondrial	1,38	1,52
CMPK2	2',3'-cyclic nucleotide 3' phosphodiesterase	2,46	2,96
CNP	cysteine-serine-rich nuclear protein 1	1,59	1,84
CSRNP1	chemokine (C-X-C motif) ligand 1	1,71	2,01
CXCL1	chemokine (C-X-C motif) ligand 10	-1,09	-1,68
CXCL10	chemokine (C-X-C motif) ligand 11	5,79	6,80
CXCL11	chromosome X open reading frame 21	1,47	1,60
CXorf21	cytochrome P450, family 2, subfamily J, polypeptide 2	1,17	1,35
CYP2J2	dual adaptor of phosphotyrosine and 3-phosphoinositides	1,54	1,80
DAPP1	DEAD (Asp-Glu-Ala-Asp) box polypeptide 58	1,14	1,16
DDX58	DEAD (Asp-Glu-Ala-Asp) box polypeptide 60	2,02	2,73
DDX60	DEAD (Asp-Glu-Ala-Asp) box polypeptide 60-like	1,48	1,91
DDX60L	defensin, beta 1	1,56	1,95
DEFB1	DEXH (Asp-Glu-X-His) box polypeptide 58	3,16	3,58
DHX58	DnaJ (Hsp40) homolog, subfamily A, member 1	1,91	2,39
DNAJA1	deltex 3-like (Drosophila)	1,06	1,30
DTX3L	dual specificity phosphatase 5	1,24	1,61
DUSP5		1,35	1,86

Genes comunes en Respondedores y No Respondedores a 4h: 263 genes (Rank product)			
Símbolo del gen	Descripción del gen	Log 2 FC	
		NR	R
DYNLT1	dynein, light chain, Tctex-type 1	1,35	1,38
EHD4	EH-domain containing 4	1,05	1,18
ELF1	E74-like factor 1 (ets domain transcription factor)	1,05	1,10
EMP1	epithelial membrane protein 1	1,42	1,45
EPAS1	endothelial PAS domain protein 1	1,64	1,85
EPSTI1	epithelial stromal interaction 1 (breast)	1,38	1,66
ETV7	ets variant 7	2,07	2,82
EXOC3L1	exocyst complex component 3-like 1	1,44	1,88
EXOSC9	exosome component 9	1,19	1,89
FAM122C	family with sequence similarity 122C	1,17	1,30
FAM46A	family with sequence similarity 46, member A	1,92	2,24
FAM72A	family with sequence similarity 72, member A	1,36	1,45
FAM72D	family with sequence similarity 72, member D	1,23	1,36
FAM8A1	family with sequence similarity 8, member A1	1,05	1,19
FANCA	Fanconi anemia, complementation group A	1,27	1,55
FBXO6	F-box protein 6	1,46	1,70
FFAR3	free fatty acid receptor 3	1,10	1,65
FTSJD2	FtsJ methyltransferase domain containing 2	1,25	1,51
FUT4	fucosyltransferase 4 (alpha (1,3) fucosyltransferase, myeloid-specific)	1,16	1,19
GALM	galactose mutarotase (aldose 1-epimerase)	1,74	2,22
GBP1	guanylate binding protein 1, interferon-inducible	2,21	2,53
GBP1P1	guanylate binding protein 1, interferon-inducible pseudogene 1	1,48	1,46
GBP3	guanylate binding protein 3	1,50	1,62
GBP4	guanylate binding protein 4	1,43	1,83
GBP5	guanylate binding protein 5	1,30	1,45
GCH1	GTP cyclohydrolase 1	1,63	1,86
GNB4	guanine nucleotide binding protein (G protein), beta polypeptide 4	1,31	1,63
GPR155	G protein-coupled receptor 155	1,22	1,49
GRAMD1B	GRAM domain containing 1B	1,52	1,73
GTPBP1	GTP binding protein 1	1,05	1,31
HERC5	HECT and RLD domain containing E3 ubiquitin protein ligase 5	2,79	3,53
HERC6	HECT and RLD domain containing E3 ubiquitin protein ligase f m 6	2,29	2,67
HES4	hairy and enhancer of split 4 (Drosophila)	1,87	2,43
HESX1	HESX homeobox 1	3,01	3,55
HHEX	hematopoietically expressed homeobox	1,02	1,28
HNRPLL	heterogeneous nuclear ribonucleoprotein L-like	1,77	2,10
HPSE	heparanase	1,25	1,34
HSH2D	hematopoietic SH2 domain containing	1,26	1,37
HSPA1B	heat shock 70kDa protein 1B	1,13	1,35
HYMAI	hydatidiform mole associated and imprinted (non-protein coding)	1,13	1,36
IDO1	indoleamine 2,3-dioxygenase 1	2,64	3,11
IFI16	interferon, gamma-inducible protein 16	1,27	1,53
IFI35	interferon-induced protein 35	1,59	2,07
IFI44	interferon-induced protein 44	1,80	2,01
IFI44L	interferon-induced protein 44-like	1,96	2,37
IFI6	interferon, alpha-inducible protein 6	1,53	2,05
IFIH1	interferon induced with helicase C domain 1	2,14	2,76
IFIT1	interferon-induced protein with tetratricopeptide repeats 1	2,78	3,36
IFIT2	interferon-induced protein with tetratricopeptide repeats 2	2,88	3,24
IFIT3	interferon-induced protein with tetratricopeptide repeats 3	2,24	2,78
IFIT5	interferon-induced protein with tetratricopeptide repeats 5	1,53	2,05
IL15RA	interleukin 15 receptor, alpha	1,07	1,20
IL1RN	interleukin 1 receptor antagonist	2,27	2,69

Genes comunes en Respondedores y No Respondedores a 4h: 263 genes (Rank product)			
Símbolo del gen	Descripción del gen	Log 2 FC	
		NR	R
<i>IL27</i>	interleukin 27	2,08	2,36
<i>IL4I1</i>	interleukin 4 induced 1	1,86	2,56
<i>IRF2</i>	interferon regulatory factor 2	1,20	1,34
<i>IRF5</i>	interferon regulatory factor 5	1,01	1,21
<i>IRF7</i>	interferon regulatory factor 7	1,75	2,21
<i>ISG15</i>	ISG15 ubiquitin-like modifier	2,20	2,95
<i>ISG20</i>	interferon stimulated exonuclease gene 20kDa	1,22	1,57
<i>JUP</i>	junction plakoglobin	1,56	2,19
<i>KIAA0226</i>	KIAA0226	1,12	1,31
<i>KIAA0319L</i>	KIAA0319-like	1,68	1,92
<i>KIAA0895L</i>	KIAA0895-like	1,23	1,14
<i>KIF23</i>	kinesin family member 23	1,16	1,22
<i>KLF5</i>	Kruppel-like factor 5 (intestinal)	1,64	1,77
<i>KPTN</i>	kaptin (actin binding protein)	1,16	1,48
<i>LAMP3</i>	lysosomal-associated membrane protein 3	2,72	3,68
<i>LAP3</i>	leucine aminopeptidase 3	1,68	2,24
<i>LGALS8</i>	lectin, galactoside-binding, soluble, 8	1,11	1,21
<i>LGALS9</i>	lectin, galactoside-binding, soluble, 9	1,18	1,48
<i>LINC00537</i>	long intergenic non-protein coding RNA 537	1,76	1,57
<i>LMNB1</i>	lamin B1	1,04	1,17
<i>LMO2</i>	LIM domain only 2 (rhombotin-like 1)	1,70	1,91
<i>LOC100128242</i>	uncharacterized LOC100128242	1,30	1,65
<i>LOC100128338</i>	uncharacterized LOC100128338	1,23	1,57
<i>LOC100129363</i>	uncharacterized LOC100129363	1,64	1,30
<i>LOC100132966</i>	uncharacterized LOC100132966	1,16	1,02
<i>LOC153684</i>	uncharacterized LOC153684	1,41	1,39
<i>LOC731424</i>	uncharacterized LOC731424	1,11	1,16
<i>LRRC3</i>	leucine rich repeat containing 3	1,03	1,21
<i>LYSMD2</i>	LysM, putative peptidoglycan-binding, domain containing 2	1,11	1,37
<i>MAFB</i>	v-maf musculoaponeurotic fibrosarcoma oncogene homolog B (avian)	1,19	1,24
<i>MAP2K6</i>	mitogen-activated protein kinase kinase 6	1,77	2,10
<i>MASTL</i>	microtubule associated serine/threonine kinase-like	1,33	1,83
<i>MB21D1</i>	Mab-21 domain containing 1	1,10	1,33
<i>MICB</i>	MHC class I polypeptide-related sequence B	1,01	1,27
<i>MLKL</i>	mixed lineage kinase domain-like	1,24	1,28
<i>MOB3C</i>	MOB kinase activator 3C	1,03	1,30
<i>MOV10</i>	Mov10, Moloney leukemia virus 10, homolog (mouse)	1,51	1,58
<i>MS4A4A</i>	membrane-spanning 4-domains, subfamily A, member 4A	1,02	1,19
<i>MSR1</i>	macrophage scavenger receptor 1	1,31	1,37
<i>MT1A</i>	metallothionein 1A	1,38	1,66
<i>MT1B</i>	metallothionein 1B	1,73	2,23
<i>MT1E</i>	metallothionein 1E	1,53	2,09
<i>MT1H</i>	metallothionein 1H	1,62	2,09
<i>MT1L</i>	metallothionein 1L (gene/pseudogene)	1,68	2,25
<i>MT1X</i>	metallothionein 1X	1,62	2,08
<i>MT2A</i>	metallothionein 2A	1,51	2,18
<i>MX1</i>	myxovirus resistance 1, interferon-inducible protein p78 (mouse)	2,35	3,06
<i>MX2</i>	myxovirus (influenza virus) resistance 2 (mouse)	1,59	1,93
<i>MYCL1</i>	v-myc myelocytomatosis viral oncogene homolog 1	-1,16	-1,33
<i>NCOA7</i>	nuclear receptor coactivator 7	1,89	2,30
<i>NEXN</i>	nexilin (F actin binding protein)	1,93	2,18
<i>NFIL3</i>	nuclear factor, interleukin 3 regulated	1,67	1,65
<i>NMI</i>	N-myc (and STAT) interactor	1,08	1,20

Genes comunes en Respondedores y No Respondedores a 4h: 263 genes (Rank product)			
Símbolo del gen	Descripción del gen	Log 2 FC	
		NR	R
NOD1	nucleotide-binding oligomerization domain containing 1	1,03	1,25
NT5C3	5'-nucleotidase, cytosolic III	1,71	1,99
NUB1	negative regulator of ubiquitin-like proteins 1	1,26	1,55
OAS1	2'-5'-oligoadenylate synthetase 1, 40/46kDa	1,80	2,28
OAS2	2'-5'-oligoadenylate synthetase 2, 69/71kDa	1,87	2,39
OAS3	2'-5'-oligoadenylate synthetase 3, 100kDa	1,96	2,43
OASL	2'-5'-oligoadenylate synthetase-like	2,30	2,97
OR52K2	olfactory receptor, family 52, subfamily K, member 2	1,25	1,47
P2RY6	pyrimidineric receptor P2Y, G-protein coupled, 6	1,67	1,76
PACIN1	protein kinase C and casein kinase substrate in neurons 1	-1,04	-1,28
PARP10	poly (ADP-ribose) polymerase family, member 10	1,45	1,66
PARP12	poly (ADP-ribose) polymerase family, member 12	1,73	2,25
PARP14	poly (ADP-ribose) polymerase family, member 14	1,44	1,92
PARP9	poly (ADP-ribose) polymerase family, member 9	1,38	1,60
PATL1	protein associated with topoisomerase II homolog 1 (yeast)	1,13	1,40
PDGFRL	platelet-derived growth factor receptor-like	1,57	1,72
PDK4	pyruvate dehydrogenase kinase, isozyme 4	-1,13	-1,49
PGAP1	post-GPI attachment to proteins 1	1,25	1,19
PHF11	PHD finger protein 11	1,15	1,51
PI4K2B	phosphatidylinositol 4-kinase type 2 beta	2,14	2,38
PKD2L1	polycystic kidney disease 2-like 1	1,99	2,27
PLSCR1	phospholipid scramblase 1	1,45	1,63
PML	promyelocytic leukemia	1,79	2,38
PNPT1	polyribonucleotide nucleotidyltransferase 1	2,31	2,88
PPM1K	protein phosphatase, Mg ²⁺ /Mn ²⁺ dependent, 1K	1,46	1,74
PRIC285	peroxisomal proliferator-activated receptor A interacting complex 285	1,85	2,33
PRKAG2	protein kinase, AMP-activated, gamma 2 non-catalytic subunit	1,04	1,42
PTPRU	protein tyrosine phosphatase, receptor type, U	1,23	1,41
RABGAP1L	RAB GTPase activating protein 1-like	1,11	1,29
RASGEF1B	RasGEF domain family, member 1B	1,41	1,54
RASGRP3	RAS guanyl releasing protein 3 (calcium and DAG-regulated)	1,06	1,49
RBCK1	RanBP-type and C3HC4-type zinc finger containing 1	1,28	1,32
RBM20	RNA binding motif protein 20	1,00	1,43
RBM43	RNA binding motif protein 43	1,27	1,74
RIN2	Ras and Rab interactor 2	1,81	2,07
RMI2	RMI2, RecQ mediated genome instability 2, homolog (S. cerevisiae)	1,03	1,10
RNF213	ring finger protein 213	1,13	1,64
RSAD2	radical S-adenosyl methionine domain containing 2	2,38	3,07
RTP4	receptor (chemosensory) transporter protein 4	1,80	2,07
SAMD4A	sterile alpha motif domain containing 4A	1,76	2,31
SAMD9	sterile alpha motif domain containing 9	1,73	1,93
SAMD9L	sterile alpha motif domain containing 9-like	1,89	2,19
SAT1	spermidine/spermine N1-acetyltransferase 1	1,15	1,23
SCARB2	scavenger receptor class B, member 2	1,09	1,37
SEP4	septin 4	1,12	1,14
SERPING1	serpin peptidase inhibitor, clade G (C1 inhibitor), member 1	1,54	1,98
SFT2D2	SFT2 domain containing 2	1,06	1,23
SGK1	serum/glucocorticoid regulated kinase 1	-1,41	-1,85
SIGLEC1	sialic acid binding Ig-like lectin 1, sialoadhesin	1,71	2,18
SIGLEC16	sialic acid binding Ig-like lectin 16 (gene/pseudogene)	1,23	1,38
SIPA1L2	signal-induced proliferation-associated 1 like 2	1,29	1,30
SLC1A3	solute carrier family 1 member 3	1,17	1,17
SLC22A16	solute carrier family 22 member 16	1,58	1,46

Genes comunes en Respondedores y No Respondedores a 4h: 263 genes (Rank product)			
Símbolo del gen	Descripción del gen	Log 2 FC	
		NR	R
SLC27A3	solute carrier family 27 (fatty acid transporter), member 3	1,32	1,51
SLFN12	schlafen family member 12	1,42	1,73
SOBP	sine oculis binding protein homolog (Drosophila)	1,51	1,63
SOCS1	suppressor of cytokine signaling 1	2,62	2,91
SP100	SP100 nuclear antigen	1,05	1,30
SP110	SP110 nuclear body protein	1,10	1,26
SP140	SP140 nuclear body protein	1,41	1,75
SP140L	SP140 nuclear body protein-like	1,07	1,37
SPATS2L	spermatogenesis associated, serine-rich 2-like	1,59	1,93
SRGAP2	SLIT-ROBO Rho GTPase activating protein 2	1,48	1,79
SRGAP2B	SLIT-ROBO Rho GTPase activating protein 2B (pseudogene)	1,58	1,89
SRGAP2C	SLIT-ROBO Rho GTPase activating protein 2C	1,37	1,67
STAT1	signal transducer and activator of transcription 1, 91kDa	1,62	1,95
STAT2	signal transducer and activator of transcription 2, 113kDa	1,46	1,72
STBD1	starch binding domain 1	1,03	1,21
STX11	syntaxin 11	1,61	1,92
TACSTD2	tumor-associated calcium signal transducer 2	1,81	1,52
TDRD7	tudor domain containing 7	1,74	2,14
TFEC	transcription factor EC	1,79	2,03
TGM1	transglutaminase 1	2,14	2,59
THBD	thrombomodulin	-1,53	-1,89
TLR7	toll-like receptor 7	1,37	1,69
TMEM51	transmembrane protein 51	1,20	1,11
TMEM62	transmembrane protein 62	1,56	1,85
TNFAIP6	tumor necrosis factor, alpha-induced protein 6	1,46	1,69
TNFSF10	tumor necrosis factor (ligand) superfamily, member 10	2,16	2,55
TNFSF13B	tumor necrosis factor (ligand) superfamily, member 13b	1,39	1,79
TOR1B	torsin family 1, member B (torsin B)	1,95	2,28
TRANK1	tetratricopeptide repeat and ankyrin repeat containing 1	1,17	1,57
TREX1	three prime repair exonuclease 1	1,56	2,12
TRIM14	tripartite motif containing 14	1,28	1,71
TRIM21	tripartite motif containing 21	1,32	1,53
TRIM22	tripartite motif containing 22	1,25	1,43
TRIM25	tripartite motif containing 25	1,33	1,24
TRIM5	tripartite motif containing 5	1,62	2,01
TRIM56	tripartite motif containing 56	1,09	1,23
TRIM6	tripartite motif containing 6	1,15	1,31
TTC21A	tetratricopeptide repeat domain 21A	2,13	2,87
TTC26	tetratricopeptide repeat domain 26	1,04	1,60
UBE2L6	ubiquitin-conjugating enzyme E2L 6	1,30	1,70
UBE2S	ubiquitin-conjugating enzyme E2S	1,59	2,04
UNC93B1	unc-93 homolog B1 (C. elegans)	1,14	1,41
USP18	ubiquitin specific peptidase 18	3,17	3,95
USP25	ubiquitin specific peptidase 25	1,06	1,20
XAF1	XIAP associated factor 1	1,49	1,86
ZBP1	Z-DNA binding protein 1	2,10	2,56
ZC3HAV1	zinc finger CCCH-type, antiviral 1	1,48	1,84
ZCCHC2	zinc finger, CCHC domain containing 2	1,48	1,69
ZNF366	zinc finger protein 366	1,13	1,11
ZNF618	zinc finger protein 618	1,07	1,15

Genes comunes en Respondedores y No Respondedores a 4h: 263 genes (Rank product)			
Símbolo del gen	Descripción del gen	Log ₂ FC	
		NR	R
<i>ZNF684</i>	zinc finger protein 684	1,56	1,86
<i>ZNFX1</i>	zinc finger, NFX1-type containing 1	1,63	1,75

Tabla A12. Lista de genes diferencialmente expresados en Respondedores y No Respondedores a las 4h tras la administración del IFN β mediante Rank product. La tasa de cambio "Fold change" (FC) indica las diferencias de expresión génica entre los valores encontrados a las 4h tras la administración del IFN β y su expresión basal. Los valores positivos indican un incremento en la expresión y los negativos una disminución con respecto a los valores basales. Valores de p ajustados <0.05.

Genes exclusivos en No respondedores a 12h: 19 genes (Rank product)		
Símbolo del gen	Descripción del gen	Log ₂ FC
<i>ADAR</i>	adenosine deaminase, RNA-specific	1,02
<i>CXCR2P1</i>	chemokine (C-X-C motif) receptor 2 pseudogene 1	1,02
<i>DYSF</i>	dysferlin, limb girdle muscular dystrophy 2B (autosomal recessive)	1,14
<i>GTPBP2</i>	GTP binding protein 2	1,02
<i>HCG9</i>	HLA complex group 9 (non-protein coding)	2,75
<i>HIST2H2BF</i>	histone cluster 2, H2bf	1,00
<i>HSPA6</i>	heat shock 70kDa protein 6 (HSP70B')	1,05
<i>HSPB1</i>	heat shock 27kDa protein 1	1,08
<i>LILRA3</i>	leukocyte immunoglobulin-like receptor, subfamily A, member 3	1,00
<i>LILRB5</i>	leukocyte immunoglobulin-like receptor, subfamily B, member 5	1,36
<i>LOC100129363</i>	uncharacterized LOC100129363	1,16
<i>LOC284837</i>	uncharacterized LOC284837	1,28
<i>LOC731424</i>	uncharacterized LOC731424	1,01
<i>MXD3</i>	MAX dimerization protein 3	1,02
<i>OTOF</i>	otoferlin	1,23
<i>RAB24</i>	RAB24, member RAS oncogene family	1,10
<i>TMEM106A</i>	transmembrane protein 106A	1,06
<i>TMEM140</i>	transmembrane protein 140	1,13
<i>UBA7</i>	ubiquitin-like modifier activating enzyme 7	1,08

Tabla A13. Lista de genes diferencialmente expresados exclusivamente en No Respondedores a las 12h tras la administración del IFN β mediante Rank product. La tasa de cambio "Fold change" (FC) indica las diferencias de expresión génica entre los valores encontrados a las 12h tras la administración del IFN β y su expresión basal. Los valores positivos indican un incremento en la expresión con respecto a los valores basales. Valores de p ajustados <0.05.

Genes exclusivos en Respondedores a 12h: 230 genes (Rank product)		
Símbolo del gen	Descripción del gen	Log₂ FC
ABCC5	ATP-binding cassette, sub-family C (CFTR/MRP), member 5	-1,16
ABCD1	ATP-binding cassette, sub-family D (ALD), member 1	1,27
ACCSL	1-aminocyclopropane-1-carboxylate synthase homolog (Arabidopsis)(non-functional)-like	1,25
ACTA2	actin, alpha 2, smooth muscle, aorta	1,21
ADAMTS10	ADAM metalloproteinase with thrombospondin type 1 motif, 10	-1,35
ADPRH	ADP-ribosylarginine hydrolase	1,32
AFF1	AF4/FMR2 family, member 1	1,34
AGPAT3	1-acylglycerol-3-phosphate O-acyltransferase 3	1,08
AKR1C3	aldo-keto reductase family 1, member C3	-1,32
ANKMY1	ankyrin repeat and MYND domain containing 1	1,15
ANXA2	annexin A2	1,10
ANXA5	annexin A5	1,29
APOBEC3G	apolipoprotein B mRNA editing enzyme, catalytic polypeptide-like 3G	1,06
APOL1	apolipoprotein L, 1	1,30
APOL2	apolipoprotein L, 2	1,33
APOL3	apolipoprotein L, 3	1,17
APOL4	apolipoprotein L, 4	1,20
ARHGEF10L	Rho guanine nucleotide exchange factor (GEF) 10-like	1,15
ARL5B	ADP-ribosylation factor-like 5B	1,33
AZI2	5-azacytidine induced 2	1,01
BAZ1A	bromodomain adjacent to zinc finger domain, 1A	1,06
BRCA2	breast cancer 2, early onset	1,00
C1GALT1	core 1 synthase, glycoprotein-N-acetylgalactosamine 3-beta-galactosyltransferase, 1	1,38
C1orf226	chromosome 1 open reading frame 226	1,06
C22orf28	chromosome 22 open reading frame 28	1,10
C4orf32	chromosome 4 open reading frame 32	1,05
C5	complement component 5	1,44
CARD16	caspase recruitment domain family, member 16	1,29
CASP1	caspase 1, apoptosis-related cysteine peptidase	1,11
CASP10	caspase 10, apoptosis-related cysteine peptidase	1,11
CASP7	caspase 7, apoptosis-related cysteine peptidase	1,10
CBR1	carbonyl reductase 1	1,62
CBS	cystathionine-beta-synthase	-1,37
CCRL2	chemokine (C-C motif) receptor-like 2	1,44
CD164	CD164 molecule, sialomucin	1,06
CD2AP	CD2-associated protein	1,07
CDC42EP2	CDC42 effector protein (Rho GTPase binding) 2	1,26
CHRM4	cholinergic receptor, muscarinic 4	1,26
CHRNB1	cholinergic receptor, nicotinic, beta 1 (muscle)	1,03
CLDN23	claudin 23	1,34
CLIC4	chloride intracellular channel 4	1,02
CMC2	COX assembly mitochondrial protein 2 homolog (S. cerevisiae)	1,11
CNR1	cannabinoid receptor 1 (brain)	1,17
CPEB3	cytoplasmic polyadenylation element binding protein 3	1,14
CTSF	cathepsin F	-1,25
CTSL1	cathepsin L1	1,41
CTSZ	cathepsin Z	1,11
CXCL1	chemokine (C-X-C motif) ligand 1	-1,28
CXCL11	chemokine (C-X-C motif) ligand 11	1,78
CXCR3	chemokine (C-X-C motif) receptor 3	1,19
CYP2J2	cytochrome P450, family 2, subfamily J, polypeptide 2	1,32
DAPP1	dual adaptor of phosphotyrosine and 3-phosphoinositides	1,07
DGAT2	diacylglycerol O-acyltransferase 2	-1,33
DHRSX	dehydrogenase/reductase (SDR family) X-linked	1,15
DISC1	disrupted in schizophrenia 1	1,27
DNAJA1	DnaJ (Hsp40) homolog, subfamily A, member 1	1,13

Genes exclusivos en Respondedores a 12h: 230 genes (Rank product)		
Símbolo del gen	Descripción del gen	Log ₂ FC
DNAJA1P5	DnaJ (Hsp40) homolog, subfamily A, member 1 pseudogene 5	1,13
DRAP1	DR1-associated protein 1 (negative cofactor 2 alpha)	1,45
EIF4G3	eukaryotic translation initiation factor 4 gamma, 3	1,09
ENHO	energy homeostasis associated	1,19
EPB41L3	erythrocyte membrane protein band 4.1-like 3	1,12
EPHB2	EPH receptor B2	1,18
EXOSC9	exosome component 9	1,74
FAM101B	family with sequence similarity 101, member B	-1,31
FAM111A	family with sequence similarity 111, member A	1,03
FAM225A	family with sequence similarity 225, member A (non-protein coding)	1,30
FAM225B	family with sequence similarity 225, member B (non-protein coding)	1,39
FAM70A	family with sequence similarity 70, member A	1,22
FAM72A	family with sequence similarity 72, member A	1,47
FAM72D	family with sequence similarity 72, member D	1,36
FAM8A1	family with sequence similarity 8, member A1	1,15
FAS	Fas (TNF receptor superfamily, member 6)	1,26
FCGR1B	Fc fragment of IgG, high affinity Ib, receptor (CD64)	1,23
FFAR3	free fatty acid receptor 3	2,03
FGFBP2	fibroblast growth factor binding protein 2	-1,67
FGL2	fibrinogen-like 2	1,24
FLJ32255	uncharacterized LOC643977	1,06
FMNL2	formin-like 2	1,18
FOXN3-AS1	FOXN3 antisense RNA 1	1,14
FRMPD3	FERM and PDZ domain containing 3	1,19
FUT4	fucosyltransferase 4 (alpha (1,3) fucosyltransferase, myeloid-specific)	1,04
FXYP6	FXYP domain containing ion transport regulator 6	1,12
GADD45B	growth arrest and DNA-damage-inducible, beta	1,15
GALNT3	UDP-N-acetyl-alpha-D-galactosamine:polypeptide N-acetylgalactosaminyltransferase 3 (GalNAc-T3)	1,19
GBP1P1	guanylate binding protein 1, interferon-inducible pseudogene 1	1,19
GNLY	granulysin	-1,46
GORASP1	golgi reassembly stacking protein 1, 65kDa	1,12
GPD2	glycerol-3-phosphate dehydrogenase 2 (mitochondrial)	1,37
GPR56	G protein-coupled receptor 56	-1,40
GRAMD1C	GRAM domain containing 1C	-1,52
GTPBP1	GTP binding protein 1	1,16
GZMA	granzyme A	-1,26
GZMH	granzyme H (cathepsin G-like 2, protein h-CCPX)	-1,17
HHEX	hematopoietically expressed homeobox	1,05
HOPX	HOP homeobox	-1,42
IDH2	isocitrate dehydrogenase 2 (NADP+), mitochondrial	1,16
IFI16	interferon, gamma-inducible protein 16	1,60
IFI30	interferon, gamma-inducible protein 30	1,18
IL15RA	interleukin 15 receptor, alpha	1,17
IL3RA	interleukin 3 receptor, alpha (low affinity)	1,13
IL8	interleukin 8	-1,27
IQSEC2	IQ motif and Sec7 domain 2	1,64
IRS2	insulin receptor substrate 2	-1,54
ITPR1L2	inositol 1,4,5-trisphosphate receptor interacting protein-like 2	1,01
KCTD14	potassium channel tetramerisation domain containing 14	1,01
KIAA1109	KIAA1109	1,23
KIAA1522	KIAA1522	1,38
KIAA1958	KIAA1958	1,54
KLF5	Kruppel-like factor 5 (intestinal)	1,62
KLRB1	killer cell lectin-like receptor subfamily B, member 1	-1,21
KLRC1	killer cell lectin-like receptor subfamily C, member 1	-1,54
KLRC3	killer cell lectin-like receptor subfamily C, member 3	-1,13
KLRC4	killer cell lectin-like receptor subfamily C, member 4	-1,30

Genes exclusivos en Respondedores a 12h: 230 genes (Rank product)		
Símbolo del gen	Descripción del gen	Log₂ FC
<i>KLRD1</i>	killer cell lectin-like receptor subfamily D, member 1	-1,32
<i>KLRF1</i>	killer cell lectin-like receptor subfamily F, member 1	-1,67
<i>KMO</i>	kynurenine 3-monooxygenase (kynurenine 3-hydroxylase)	1,31
<i>KRT78</i>	keratin 78	1,27
<i>KYNU</i>	kynureninase	1,11
<i>LDLR</i>	low density lipoprotein receptor	1,28
<i>LGALS8</i>	lectin, galactoside-binding, soluble, 8	1,29
<i>LGSN</i>	lengsin, lens protein with glutamine synthetase domain	1,30
<i>LILRB1</i>	leukocyte immunoglobulin-like receptor, subfamily B member 1	1,22
<i>LOC100128242</i>	uncharacterized LOC100128242	1,75
<i>LOC100133669</i>	uncharacterized LOC100133669	1,50
<i>LOC100188947</i>	uncharacterized LOC100188947	1,19
<i>LOC439914</i>	uncharacterized LOC439914	1,07
<i>LRRC3</i>	leucine rich repeat containing 3	1,27
<i>MASTL</i>	microtubule associated serine/threonine kinase-like	1,61
<i>MB21D1</i>	Mab-21 domain containing 1	1,17
<i>MGC39372</i>	serpin peptidase inhibitor, clade B (ovalbumin), member 9 pseudogene	1,39
<i>MIA3</i>	melanoma inhibitory activity family, member 3	1,30
<i>MIAT</i>	myocardial infarction associated transcript (non-protein coding)	-1,22
<i>MICB</i>	MHC class I polypeptide-related sequence B	1,34
<i>MRPL44</i>	mitochondrial ribosomal protein L44	1,09
<i>NAPA</i>	N-ethylmaleimide-sensitive factor attachment protein, alpha	1,19
<i>NBN</i>	nibrin	1,06
<i>NFKBIE</i>	nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells inhibitor, epsilon	1,04
<i>NHLRC4</i>	NHL repeat containing 4	1,30
<i>NME8</i>	NME/NM23 family member 8	1,15
<i>NMI</i>	N-myc (and STAT) interactor	1,38
<i>NMUR1</i>	neuromedin U receptor 1	-1,41
<i>NOD1</i>	nucleotide-binding oligomerization domain containing 1	1,36
<i>NRIP1</i>	nuclear receptor interacting protein 1	1,00
<i>P2RY14</i>	purinergic receptor P2Y, G-protein coupled, 14	1,55
<i>PARP11</i>	poly (ADP-ribose) polymerase family, member 11	1,37
<i>PATL1</i>	protein associated with topoisomerase II homolog 1 (yeast)	1,14
<i>PCGF5</i>	polycomb group ring finger 5	1,26
<i>PDGFRL</i>	platelet-derived growth factor receptor-like	1,06
<i>PER1</i>	period homolog 1 (Drosophila)	-1,25
<i>PHACTR2</i>	phosphatase and actin regulator 2	1,48
<i>PHF11</i>	PHD finger protein 11	1,50
<i>PHLDA2</i>	pleckstrin homology-like domain, family A, member 2	1,42
<i>PI3</i>	peptidase inhibitor 3, skin-derived	-1,25
<i>PIK3AP1</i>	phosphoinositide-3-kinase adaptor protein 1	1,50
<i>PIK3IP1</i>	phosphoinositide-3-kinase interacting protein 1	-1,16
<i>PIWIL4</i>	piwi-like 4 (Drosophila)	1,09
<i>PLAGL2</i>	pleiomorphic adenoma gene-like 2	1,02
<i>PLSCR4</i>	phospholipid scramblase 4	1,01
<i>PMAIP1</i>	phorbol-12-myristate-13-acetate-induced protein 1	1,01
<i>PPM1K</i>	protein phosphatase, Mg ²⁺ /Mn ²⁺ dependent, 1K	1,24
<i>PRKAG2</i>	protein kinase, AMP-activated, gamma 2 non-catalytic subunit	1,15
<i>PRKCE</i>	protein kinase C, epsilon	1,21
<i>PRSS23</i>	protease, serine, 23	-1,23
<i>PSMA4</i>	proteasome (prosome, macropain) subunit, alpha type, 4	1,06
<i>PSMB9</i>	proteasome (prosome, macropain) subunit, beta type, 9	1,07
<i>PSME2</i>	proteasome (prosome, macropain) activator subunit 2 (PA28 beta)	1,38
<i>PTP4A1</i>	protein tyrosine phosphatase type IVA, member 1	1,29
<i>PTPRN2</i>	protein tyrosine phosphatase, receptor type, N polypeptide 2	1,07
<i>PTPRO</i>	protein tyrosine phosphatase, receptor type, O	1,23
<i>PVRL2</i>	poliovirus receptor-related 2 (herpesvirus entry mediator B)	1,60

Genes exclusivos en Respondedores a 12h: 230 genes (Rank product)		
Símbolo del gen	Descripción del gen	Log ₂ FC
RABGAP1L	RAB GTPase activating protein 1-like	1,37
RASGRP3	RAS guanyl releasing protein 3 (calcium and DAG-regulated)	1,49
RBM20	RNA binding motif protein 20	1,44
RBM43	RNA binding motif protein 43	1,52
RGS1	regulator of G-protein signaling 1	1,53
RHBDF2	rhomboid 5 homolog 2 (Drosophila)	1,18
RHOB	ras homolog family member B	1,05
RMI2	RMI2, RecQ mediated genome instability 2, homolog (S. cerevisiae)	1,25
RNA18S5	RNA, 18S ribosomal 5	-1,49
RNF19B	ring finger protein 19B	1,00
RPAP3	RNA polymerase II associated protein 3	1,01
SAMHD1	SAM domain and HD domain 1	1,13
SCARNA17	small Cajal body-specific RNA 17	-1,24
SDSL	serine dehydratase-like	1,16
SEC24D	SEC24 family, member D (S. cerevisiae)	1,30
SECTM1	secreted and transmembrane 1	1,37
SELL	selectin L	1,01
SFT2D2	SFT2 domain containing 2	1,18
SGK1	serum/glucocorticoid regulated kinase 1	-1,44
SIGLEC17P	sialic acid binding Ig-like lectin 17, pseudogene	-1,40
SIPA1L2	signal-induced proliferation-associated 1 like 2	1,18
SLC24A1	solute carrier family 24 (sodium/potassium/calciumexchanger), m1	1,07
SLC6A12	solute carrier family 6 (neurotransmitter transporter, betaine/GABA), m12	1,04
SLFN12	schlafen family member 12	1,66
SMCHD1	structural maintenance of chr flexible hinge domain containing 1	1,09
SNTB1	syntrophin, beta 1 (dystrophin-associated protein A1, basic comp 1)	1,05
SP100	SP100 nuclear antigen	1,30
SP110	SP110 nuclear body protein	1,26
SP140L	SP140 nuclear body protein-like	1,57
SPON2	spondin 2, extracellular matrix protein	-1,21
SQLE	squalene epoxidase	1,04
SQRDL	sulfide quinone reductase-like (yeast)	1,12
SRC	v-src sarcoma (Schmidt-Ruppin A-2) viral oncogene homolog (avian)	1,07
ST3GAL5	ST3 beta-galactoside alpha-2,3-sialyltransferase 5	1,15
STAC3	SH3 and cysteine rich domain 3	1,57
TAP1	transporter 1, ATP-binding cassette, sub-family B (MDR/TAP)	1,25
TAP2	transporter 2, ATP-binding cassette, sub-family B (MDR/TAP)	1,10
TCN1	transcobalamin I (vitamin B12 binding protein, R binder family)	1,06
TMEM110	transmembrane protein 110	1,47
TMEM123	transmembrane protein 123	1,57
TMEM229B	transmembrane protein 229B	1,15
TMEM62	transmembrane protein 62	1,50
TRIB2	tribbles homolog 2 (Drosophila)	1,08
TRIM21	tripartite motif containing 21	1,27
TRIM26	tripartite motif containing 26	1,20
TRIM38	tripartite motif containing 38	1,32
TTC26	tetratricopeptide repeat domain 26	1,80
UPB1	ureidopropionase, beta	-1,14
USP25	ubiquitin specific peptidase 25	1,27
USP30-AS1	USP30 antisense RNA 1	1,31
USPL1	ubiquitin specific peptidase like 1	1,07
VNN1	vanin 1	-1,40
WDFY1	WD repeat and FYVE domain containing 1	1,15
WFDC3	WAP four-disulfide core domain 3	1,37
XRN1	5'-3' exoribonuclease 1	1,65
XXYL1	xyloside xylosyltransferase 1	1,58
ZBTB16	zinc finger and BTB domain containing 16	-1,13

Genes exclusivos en Respondedores a 12h: 230 genes (Rank product)		
Símbolo del gen	Descripción del gen	Log ₂ FC
ZFYVE26	zinc finger, FYVE domain containing 26	1,24
ZNF366	zinc finger protein 366	1,13
ZNF703	zinc finger protein 703	1,01

Tabla A14. Lista de genes diferencialmente expresados exclusivamente en Respondedores a las 12h tras la administración del IFN β mediante Rank product. La tasa de cambio "Fold change" (FC) indica las diferencias de expresión génica entre los valores encontrados a las 12h tras la administración del IFN β y su expresión basal. Los valores positivos indican un incremento en la expresión y los negativos una disminución con respecto a los valores basales. Valores de p ajustados <0.05.

Genes comunes en Respondedores y No respondedores a 12h: 243 genes (Rank product)			
Símbolo del gen	Descripción del gen	Log ₂ FC	
		NR	R
ABTB2	ankyrin repeat and BTB (POZ) domain containing 2	2,02	2,85
ACOT9	acyl-CoA thioesterase 9	1,16	1,31
AGRN	agnin	1,45	1,63
AIM2	absent in melanoma 2	1,77	2,12
ANKFY1	ankyrin repeat and FYVE domain containing 1	1,04	1,23
ANKRD22	ankyrin repeat domain 22	1,25	2,18
APOBEC3A	apolipoprotein B mRNA editing enzyme, catalytic polypeptide-like 3A	1,50	1,85
APOBEC3B	apolipoprotein B mRNA editing enzyme, catalytic polypeptide-like 3B	1,67	1,89
APOBEC3F	apolipoprotein B mRNA editing enzyme, catalytic polypeptide-like 3F	1,03	1,49
APOL6	apolipoprotein L, 6	1,34	1,96
ATF3	activating transcription factor 3	2,72	3,76
ATF5	activating transcription factor 5	1,24	1,70
BATF2	basic leucine zipper transcription factor, ATF-like 2	2,31	3,14
BATF3	basic leucine zipper transcription factor, ATF-like 3	1,26	1,84
BLVRA	biliverdin reductase A	1,07	1,52
BST2	bone marrow stromal cell antigen 2	1,42	2,00
C15orf48	chromosome 15 open reading frame 48	1,58	2,53
C1orf173	chromosome 1 open reading frame 173	1,51	1,14
C1QA	complement component 1, q subcomponent, A chain	1,18	1,14
C1QB	complement component 1, q subcomponent, B chain	1,58	1,59
C2	complement component 2	1,08	1,51
C5orf56	chromosome 5 open reading frame 56	1,24	1,46
C9orf91	chromosome 9 open reading frame 91	1,35	1,88
CACNA1A	calcium channel, voltage-dependent, P/Q type, alpha 1A subunit	1,48	2,10
CARD17	caspase recruitment domain family, member 17	1,11	1,30
CBWD5	COBW domain containing 5	1,19	1,46
CCL1	chemokine (C-C motif) ligand 1	1,09	1,47
CCL2	chemokine (C-C motif) ligand 2	4,03	4,94
CCL8	chemokine (C-C motif) ligand 8	3,50	4,56
CCR1	chemokine (C-C motif) receptor 1	0,99	1,11
CD274	CD274 molecule	2,00	2,71
CD300E	CD300e molecule	1,33	1,55

Genes comunes en Respondedores y No respondedores a 12h: 243 genes (Rank product)			
Símbolo del gen	Descripción del gen	Log 2 FC	
		NR	R
CD38	CD38 molecule	1,08	1,39
CDKN1C	cyclin-dependent kinase inhibitor 1C (p57, Kip2)	1,29	1,42
CEACAM1	carcinoembryonic antigen-related cell adhesion molecule 1	2,07	2,52
CFB	complement factor B	1,19	1,80
CH25H	cholesterol 25-hydroxylase	1,00	1,46
CHMP5	charged multivesicular body protein 5	1,06	1,46
CMPK2	cytidine monophosphate (UMP-CMP) kinase 2, mitochondrial	2,17	2,96
CNP	2',3'-cyclic nucleotide 3' phosphodiesterase	1,28	1,81
CSRNP1	cysteine-serine-rich nuclear protein 1	1,37	1,70
CXCL10	chemokine (C-X-C motif) ligand 10	3,51	5,10
CXorf21	chromosome X open reading frame 21	1,19	1,45
DDIT4	DNA-damage-inducible transcript 4	-1,42	-1,88
DDX58	DEAD (Asp-Glu-Ala-Asp) box polypeptide 58	1,88	2,85
DDX60	DEAD (Asp-Glu-Ala-Asp) box polypeptide 60	1,46	2,12
DDX60L	DEAD (Asp-Glu-Ala-Asp) box polypeptide 60-like	1,47	2,04
DEFB1	defensin, beta 1	2,54	3,29
DHRS9	dehydrogenase/reductase (SDR family) member 9	1,51	1,56
DHX58	DEXH (Asp-Glu-X-His) box polypeptide 58	1,77	2,57
DOCK4	dedicator of cytokinesis 4	1,40	1,90
DTX3L	deltex 3-like (Drosophila)	1,07	1,56
DUSP5	dual specificity phosphatase 5	1,05	1,68
DYNLT1	dynein, light chain, Tctex-type 1	1,34	1,73
DZIP1L	DAZ interacting protein 1-like	1,34	2,28
EIF2AK2	eukaryotic translation initiation factor 2-alpha kinase 2	1,48	1,95
EMP1	epithelial membrane protein 1	1,10	1,71
EPAS1	endothelial PAS domain protein 1	1,49	2,09
EPSTI1	epithelial stromal interaction 1 (breast)	1,20	1,87
ETV7	ets variant 7	2,28	3,39
EXOC3L1	exocyst complex component 3-like 1	1,55	1,92
FAM122C	family with sequence similarity 122C	1,17	1,52
FAM26F	family with sequence similarity 26, member F	1,03	1,49
FAM46A	family with sequence similarity 46, member A	1,37	2,03
FANCA	Fanconi anemia, complementation group A	1,29	1,66
FAP	fibroblast activation protein, alpha	1,30	1,84
FAR2	fatty acyl CoA reductase 2	1,44	2,05
FBXO6	F-box protein 6	1,46	1,80
FCGR2B	Fc fragment of IgG, low affinity IIb, receptor (CD32)	1,15	1,36
FFAR2	free fatty acid receptor 2	1,44	1,17
FPR3	formyl peptide receptor 3	1,34	1,64
FRMD3	FERM domain containing 3	1,89	2,37
FTSJD2	FtsJ methyltransferase domain containing 2	1,38	1,81
GALM	galactose mutarotase (aldose 1-epimerase)	2,03	2,63
GAS6	growth arrest-specific 6	1,07	1,32
GBP1	guanylate binding protein 1, interferon-inducible	1,90	2,52
GBP3	guanylate binding protein 3	1,26	1,86
GBP4	guanylate binding protein 4	1,58	2,49
GBP5	guanylate binding protein 5	1,16	1,88
GCH1	GTP cyclohydrolase 1	1,29	1,88
GNB4	guanine nucleotide binding protein (G protein), beta polypeptide 4	1,12	1,46
GPBAR1	G protein-coupled bile acid receptor 1	1,13	1,27
GPR141	G protein-coupled receptor 141	1,07	1,37
GPR155	G protein-coupled receptor 155	1,07	1,34
GPR84	G protein-coupled receptor 84	1,21	1,55

Genes comunes en Respondedores y No respondedores a 12h: 243 genes (Rank product)			
Símbolo del gen	Descripción del gen	Log 2 FC	
		NR	R
GRAMD1B	GRAM domain containing 1B	1,97	2,56
HERC5	HECT and RLD domain containing E3 ubiquitin protein ligase 5	2,41	3,30
HERC6	HECT and RLD domain containing E3 ubiquitin protein ligase family 6	1,74	2,27
HES4	hairy and enhancer of split 4 (Drosophila)	2,86	3,70
HESX1	HESX homeobox 1	2,87	4,00
HNRPLL	heterogeneous nuclear ribonucleoprotein L-like	1,50	2,05
HORMAD1	HORMA domain containing 1	1,09	1,05
HPSE	heparanase	1,30	1,52
HSH2D	hematopoietic SH2 domain containing	1,19	1,23
HSPA1B	heat shock 70kDa protein 1B	1,14	1,09
HSPB9	heat shock protein, alpha-crystallin-related, B9	1,03	1,26
IDO1	indoleamine 2,3-dioxygenase 1	2,69	4,26
IFI35	interferon-induced protein 35	1,80	2,55
IFI44	interferon-induced protein 44	1,82	2,25
IFI44L	interferon-induced protein 44-like	2,32	2,86
IFI6	interferon, alpha-inducible protein 6	2,31	2,94
IFIH1	interferon induced with helicase C domain 1	1,85	2,72
IFIT1	interferon-induced protein with tetratricopeptide repeats 1	2,54	3,19
IFIT2	interferon-induced protein with tetratricopeptide repeats 2	2,24	2,91
IFIT3	interferon-induced protein with tetratricopeptide repeats 3	2,23	2,78
IFIT5	interferon-induced protein with tetratricopeptide repeats 5	1,39	1,94
IFITM1	interferon induced transmembrane protein 1	1,13	1,63
IFITM3	interferon induced transmembrane protein 3	1,06	1,20
IFITM4P	interferon induced transmembrane protein 4 pseudogene	1,12	1,20
IL1RN	interleukin 1 receptor antagonist	1,99	2,78
IL27	interleukin 27	1,68	2,15
IL4I1	interleukin 4 induced 1	1,82	2,70
IRF2	interferon regulatory factor 2	1,02	1,29
IRF5	interferon regulatory factor 5	1,00	1,27
IRF7	interferon regulatory factor 7	1,91	2,47
ISG15	ISG15 ubiquitin-like modifier	2,47	3,43
ISG20	interferon stimulated exonuclease gene 20kDa	1,41	2,12
ITPK1	inositol-tetrakisphosphate 1-kinase	0,99	1,07
JAK2	Janus kinase 2	0,99	1,13
JUP	junction plakoglobin	1,61	2,25
KIAA0226	KIAA0226	0,99	1,45
KIAA0319L	KIAA0319-like	1,86	2,11
KIAA0895L	KIAA0895-like	1,88	2,01
KLHDC7B	kelch domain containing 7B	1,17	1,62
KPTN	kaptin (actin binding protein)	1,42	1,60
LAG3	lymphocyte-activation gene 3	1,09	1,19
LAMP3	lysosomal-associated membrane protein 3	3,28	4,83
LAP3	leucine aminopeptidase 3	1,79	2,68
LGALS9	lectin, galactoside-binding, soluble, 9	1,34	1,54
LGALS9C	lectin, galactoside-binding, soluble, 9C	1,15	1,54
LILRB4	leukocyte immunoglobulin-like receptor, subfamily B, member 4	1,06	1,36
LINC00487	long intergenic non-protein coding RNA 487	1,43	1,82
LINC00537	long intergenic non-protein coding RNA 537	1,48	1,41
LMO2	LIM domain only 2 (rhombotin-like 1)	1,48	1,81
LOC100128338	uncharacterized LOC100128338	1,16	1,37
LY6E	lymphocyte antigen 6 complex, locus E	1,57	2,33

Genes comunes en Respondedores y No respondedores a 12h: 243 genes (Rank product)			
Símbolo del gen	Descripción del gen	Log 2 FC	
		NR	R
LYSMD2	LysM, putative peptidoglycan-binding, domain containing 2	1,02	1,47
MAFB	v-maf musculoaponeurotic fibrosarcoma oncogene homolog B (avian)	1,28	1,53
MAP2K6	mitogen-activated protein kinase kinase 6	1,07	1,62
MARCO	macrophage receptor with collagenous structure	1,00	1,34
MLKL	mixed lineage kinase domain-like	1,10	1,17
MOV10	Mov10, Moloney leukemia virus 10, homolog (mouse)	1,85	2,33
MS4A4A	membrane-spanning 4-domains, subfamily A, member 4A	1,41	1,97
MSR1	macrophage scavenger receptor 1	1,13	1,69
MT1A	metallothionein 1A	1,80	2,41
MT1B	metallothionein 1B	2,17	3,01
MT1E	metallothionein 1E	1,96	2,83
MT1H	metallothionein 1H	2,06	2,89
MT1L	metallothionein 1L (gene/pseudogene)	2,10	3,07
MT1X	metallothionein 1X	2,05	2,86
MT2A	metallothionein 2A	1,99	3,04
MX1	myxovirus (influenza v resistance 1, IFN-inducible protein p78 (mouse)	2,35	2,97
MX2	myxovirus (influenza virus) resistance 2 (mouse)	1,50	2,03
MYOF	myoferlin	1,34	1,70
NADK	NAD kinase	1,13	1,12
NAGK	N-acetylglucosamine kinase	1,03	1,12
NCF1	neutrophil cytosolic factor 1	1,71	1,65
NCOA7	nuclear receptor coactivator 7	1,72	2,49
NEXN	nexilin (F actin binding protein)	1,54	2,05
NFIL3	nuclear factor, interleukin 3 regulated	1,06	1,12
NT5C3	5'-nucleotidase, cytosolic III	1,45	2,22
NTNG2	netrin G2	1,59	1,74
NUB1	negative regulator of ubiquitin-like proteins 1	1,34	1,81
OAS1	2'-5'-oligoadenylate synthetase 1, 40/46kDa	1,81	2,67
OAS2	2'-5'-oligoadenylate synthetase 2, 69/71kDa	2,03	2,64
OAS3	2'-5'-oligoadenylate synthetase 3, 100kDa	2,33	2,99
OASL	2'-5'-oligoadenylate synthetase-like	2,30	3,11
P2RY6	pyrimidinergic receptor P2Y, G-protein coupled, 6	1,57	1,96
PARP10	poly (ADP-ribose) polymerase family, member 10	1,52	1,90
PARP12	poly (ADP-ribose) polymerase family, member 12	1,71	2,23
PARP14	poly (ADP-ribose) polymerase family, member 14	1,39	2,02
PARP9	poly (ADP-ribose) polymerase family, member 9	1,45	1,70
PI4K2B	phosphatidylinositol 4-kinase type 2 beta	1,07	1,83
PKD2L1	polycystic kidney disease 2-like 1	1,49	2,39
PLAC8	placenta-specific 8	1,06	1,41
PLSCR1	phospholipid scramblase 1	1,50	2,23
PML	promyelocytic leukemia	1,78	2,39
PNPT1	polyribonucleotide nucleotidyltransferase 1	2,10	2,92
PRIC285	peroxisomal proliferator-activated receptor A interacting complex 285	1,54	2,10
PTPRU	protein tyrosine phosphatase, receptor type, U	1,19	1,93
RASGEF1B	RasGEF domain family, member 1B	1,04	1,57
RBCK1	RanBP-type and C3HC4-type zinc finger containing 1	1,43	1,50
RGAG4	retrotransposon gag domain containing 4	1,16	1,82
RGL1	ral guanine nucleotide dissociation stimulator-like 1	1,66	2,47
RIN2	Ras and Rab interactor 2	1,72	2,27
RNF213	ring finger protein 213	1,36	1,84
RSAD2	radical S-adenosyl methionine domain containing 2	2,40	3,38

Genes comunes en Respondedores y No respondedores a 12h: 243 genes (Rank product)			
Símbolo del gen	Descripción del gen	Log 2 FC	
		NR	R
<i>RSPH9</i>	radial spoke head 9 homolog (Chlamydomonas)	1,07	1,52
<i>RTP4</i>	receptor (chemosensory) transporter protein 4	1,70	2,32
<i>RUFY4</i>	RUN and FYVE domain containing 4	1,45	1,52
<i>SAMD4A</i>	sterile alpha motif domain containing 4A	2,23	2,90
<i>SAMD9</i>	sterile alpha motif domain containing 9	1,64	2,16
<i>SAMD9L</i>	sterile alpha motif domain containing 9-like	1,89	2,42
<i>SAT1</i>	spermidine/spermine N1-acetyltransferase 1	1,28	1,57
<i>SCARB2</i>	scavenger receptor class B, member 2	1,03	1,55
<i>SCIMP</i>	SLP adaptor and CSK interacting membrane protein	1,08	1,50
<i>SCO2</i>	SCO cytochrome oxidase deficient homolog 2 (yeast)	1,80	1,65
<i>sep04</i>	septin 4	1,65	2,08
<i>SERPING1</i>	serpin peptidase inhibitor, clade G (C1 inhibitor), member 1	2,57	3,39
<i>SIGLEC1</i>	sialic acid binding Ig-like lectin 1, sialoadhesin	2,64	3,40
<i>SIGLEC14</i>	sialic acid binding Ig-like lectin 14	1,08	1,34
<i>SIGLEC16</i>	sialic acid binding Ig-like lectin 16 (gene/pseudogene)	1,05	1,29
<i>SLC27A3</i>	solute carrier family 27 (fatty acid transporter), member 3	1,47	1,77
<i>SLC35E1</i>	solute carrier family 35, member E1	1,13	1,28
<i>SOCS1</i>	suppressor of cytokine signaling 1	1,44	2,36
<i>SP140</i>	SP140 nuclear body protein	1,20	1,97
<i>SPATS2L</i>	spermatogenesis associated, serine-rich 2-like	2,30	3,20
<i>SRGAP2</i>	SLIT-ROBO Rho GTPase activating protein 2	1,58	2,18
<i>SRGAP2B</i>	SLIT-ROBO Rho GTPase activating protein 2B (pseudogene)	1,19	1,75
<i>SRGAP2C</i>	SLIT-ROBO Rho GTPase activating protein 2C	1,23	1,92
<i>STAT1</i>	signal transducer and activator of transcription 1, 91kDa	1,37	1,83
<i>STAT2</i>	signal transducer and activator of transcription 2, 113kDa	1,55	2,13
<i>STX11</i>	syntaxin 11	1,35	1,71
<i>TCN2</i>	transcobalamin II	1,56	1,89
<i>TDRD7</i>	tudor domain containing 7	1,36	1,91
<i>TFEC</i>	transcription factor EC	2,04	2,90
<i>TGM1</i>	transglutaminase 1	1,71	2,72
<i>TLR7</i>	toll-like receptor 7	1,48	2,04
<i>TMEM51</i>	transmembrane protein 51	1,38	1,68
<i>TNFAIP6</i>	tumor necrosis factor, alpha-induced protein 6	1,88	2,50
<i>TNFSF10</i>	tumor necrosis factor (ligand) superfamily, member 10	2,17	2,78
<i>TNFSF13B</i>	tumor necrosis factor (ligand) superfamily, member 13b	1,42	2,06
<i>TOR1B</i>	torsin family 1, member B (torsin B)	1,78	2,07
<i>TRANK1</i>	tetratricopeptide repeat and ankyrin repeat containing 1	1,25	1,68
<i>TREX1</i>	three prime repair exonuclease 1	1,30	1,97
<i>TRIM14</i>	tripartite motif containing 14	1,05	1,43
<i>TRIM22</i>	tripartite motif containing 22	1,30	1,81
<i>TRIM5</i>	tripartite motif containing 5	1,41	1,89
<i>TRIM6</i>	tripartite motif containing 6	1,36	1,39
<i>TTC21A</i>	tetratricopeptide repeat domain 21A	1,97	3,08
<i>UBE2L6</i>	ubiquitin-conjugating enzyme E2L 6	1,49	2,05
<i>UBE2S</i>	ubiquitin-conjugating enzyme E2S	1,20	1,83
<i>UBQLNL</i>	ubiquilin-like	1,20	1,51
<i>UNC93B1</i>	unc-93 homolog B1 (C. elegans)	1,18	1,41
<i>USP18</i>	ubiquitin specific peptidase 18	2,79	4,00
<i>VAMP5</i>	vesicle-associated membrane protein 5 (myobrevin)	1,36	1,96
<i>WARS</i>	tryptophanyl-tRNA synthetase	1,33	1,92
<i>XAF1</i>	XIAP associated factor 1	1,74	2,36
<i>ZBP1</i>	Z-DNA binding protein 1	1,93	2,44

Genes comunes en Respondedores y No respondedores a 12h: 243 genes (Rank product)			
Símbolo del gen	Descripción del gen	Log ₂ FC	
		NR	R
ZC3HAV1	zinc finger CCCH-type, antiviral 1	1,15	1,84
ZCCHC2	zinc finger, CCHC domain containing 2	1,23	1,56
ZNF684	zinc finger protein 684	1,22	1,98
ZNFX1	zinc finger, NFX1-type containing 1	1,04	1,54

Tabla A15. Lista de genes diferencialmente expresados en Respondedores y No Respondedores a las 12h tras la administración del IFN β mediante Rank product. La tasa de cambio "Fold change" (FC) indica las diferencias de expresión génica entre los valores encontrados a las 12h tras la administración del IFN β y su expresión basal. Los valores positivos indican un incremento en la expresión y los negativos una disminución con respecto a los valores basales. Valores de p ajustados <0.05.

Genes exclusivos en No Respondedores a 24h: 1 gen (Rank product)		
Símbolo del gen	Descripción del gen	Log ₂ FC
C1orf173	chromosome 1 open reading frame 173	1,03

Tabla A16. Lista de genes diferencialmente expresados exclusivamente en No Respondedores a las 24h tras la administración del IFN β mediante Rank product. La tasa de cambio "Fold change" (FC) indica las diferencias de expresión génica entre los valores encontrados a las 24h tras la administración del IFN β y su expresión basal. Los valores positivos indican un incremento en la expresión respecto a los valores basales. Valores de p ajustados <0.05.

Genes exclusivos en Respondedores a 24h: 81 genes (Rank product)		
Símbolo del gen	Descripción del gen	Log₂ FC
ANKRD22	ankyrin repeat domain 22	1,04
APOBEC3A	apolipoprotein B mRNA editing enzyme, catalytic polypeptide-like 3A	1,12
BATF2	basic leucine zipper transcription factor, ATF-like 2	1,62
BATF3	basic leucine zipper transcription factor, ATF-like 3	1,10
BST2	bone marrow stromal cell antigen 2	1,24
C15orf48	chromosome 15 open reading frame 48	1,60
CA4	carbonic anhydrase IV	-1,39
CBR1	carbonyl reductase 1	1,08
CD300E	CD300e molecule	1,41
CDKN1C	cyclin-dependent kinase inhibitor 1C (p57, Kip2)	1,34
CMPK2	cytidine monophosphate (UMP-CMP) kinase 2, mitochondrial	2,02
CNTNAP3	contactin associated protein-like 3	-1,36
CTSL1	cathepsin L1	1,38
DDX58	DEAD (Asp-Glu-Ala-Asp) box polypeptide 58	1,31
DDX60	DEAD (Asp-Glu-Ala-Asp) box polypeptide 60	1,40
DHX58	DEXH (Asp-Glu-X-His) box polypeptide 58	1,49
ETV7	ets variant 7	1,72
FAM225A	family with sequence similarity 225, member A (non-protein coding)	1,25
FAM225B	family with sequence similarity 225, member B (non-protein coding)	1,15
FAM46A	family with sequence similarity 46, member A	1,12
GALM	galactose mutarotase (aldose 1-epimerase)	1,18
GBP1	guanylate binding protein 1, interferon-inducible	1,23
GBP4	guanylate binding protein 4	1,37
GPBAR1	G protein-coupled bile acid receptor 1	1,12
GRAMD1C	GRAM domain containing 1C	-1,34
HERC5	HECT and RLD domain containing E3 ubiquitin protein ligase 5	1,93
IDO1	indoleamine 2,3-dioxygenase 1	1,98
IFI27	interferon, alpha-inducible protein 27	1,16
IFI44	interferon-induced protein 44	1,85
IFIH1	interferon induced with helicase C domain 1	1,41
IFIT2	interferon-induced protein with tetratricopeptide repeats 2	1,59
IL1RN	interleukin 1 receptor antagonist	1,32
IL27	interleukin 27	1,14
IQSEC2	IQ motif and Sec7 domain 2	1,20
ISG20	interferon stimulated exonuclease gene 20kDa	1,13
JUP	junction plakoglobin	1,44
KMO	kynurenine 3-monooxygenase (kynurenine 3-hydroxylase)	1,11
LAP3	leucine aminopeptidase 3	1,70
LINC00487	long intergenic non-protein coding RNA 487	1,52
LOC100133669	uncharacterized LOC100133669	1,13
MAFB	v-maf musculoaponeurotic fibrosarcoma oncogene homolog B (avian)	1,21
MARCO	macrophage receptor with collagenous structure	1,14
MME	membrane metallo-endopeptidase	-1,37
MSR1	macrophage scavenger receptor 1	1,03
MT1A	metallothionein 1A	1,36
MT1E	metallothionein 1E	1,73
MT1H	metallothionein 1H	1,83
MT1L	metallothionein 1L (gene/pseudogene)	1,93
MT1M	metallothionein 1M	1,02
MT1X	metallothionein 1X	1,75
MT2A	metallothionein 2A	1,96
NCOA7	nuclear receptor coactivator 7	1,35
NEXN	nexilin (F actin binding protein)	1,10
OAS1	2'-5'-oligoadenylate synthetase 1, 40/46kDa	1,86
ORM1	orosomucoid 1	-1,48
PARP12	poly (ADP-ribose) polymerase family, member 12	1,26
PLAC8	placenta-specific 8	1,10
PLSCR1	phospholipid scramblase 1	1,54

Genes exclusivos en Respondedores a 24h: 81 genes (Rank product)		
Símbolo del gen	Descripción del gen	Log ₂ FC
<i>PML</i>	promyelocytic leukemia	1,28
<i>PNPT1</i>	polyribonucleotide nucleotidyltransferase 1	1,46
<i>PTPRU</i>	protein tyrosine phosphatase, receptor type, U	1,20
<i>RGL1</i>	ral guanine nucleotide dissociation stimulator-like 1	1,45
<i>RIN2</i>	Ras and Rab interactor 2	1,34
<i>RNA18S5</i>	RNA, 18S ribosomal 5	-1,32
<i>RSAD2</i>	radical S-adenosyl methionine domain containing 2	2,22
<i>RTP4</i>	receptor (chemosensory) transporter protein 4	1,72
<i>SAMD9L</i>	sterile alpha motif domain containing 9-like	1,47
<i>SCIMP</i>	SLP adaptor and CSK interacting membrane protein	1,14
<i>SP140</i>	SP140 nuclear body protein	1,12
<i>SRGAP2</i>	SLIT-ROBO Rho GTPase activating protein 2	1,18
<i>STAC3</i>	SH3 and cysteine rich domain 3	1,32
<i>TFEC</i>	transcription factor EC	1,65
<i>TGM1</i>	transglutaminase 1	1,53
<i>TLR7</i>	toll-like receptor 7	1,28
<i>TMEM151B</i>	transmembrane protein 151B	1,22
<i>TMEM51</i>	transmembrane protein 51	1,22
<i>TOR1B</i>	torsin family 1, member B (torsin B)	1,17
<i>TREX1</i>	three prime repair exonuclease 1	1,30
<i>TTC21A</i>	tetratricopeptide repeat domain 21A	1,63
<i>XAF1</i>	XIAP associated factor 1	1,75
<i>ZBP1</i>	Z-DNA binding protein 1	1,35

Tabla A17. Lista de genes diferencialmente expresados exclusivamente en Respondedores a las 24h tras la administración del IFN β mediante Rank product. La tasa de cambio "Fold change" (FC) indica las diferencias de expresión génica entre los valores encontrados a las 24h tras la administración del IFN β y su expresión basal. Los valores positivos indican un incremento en la expresión y los negativos una disminución con respecto a los valores basales. Valores de p ajustados <0.05.

Genes comunes en Respondedores y No Respondedores a 24h: 35 genes (Rank product)			
Símbolo del gen	Descripción del gen	Log 2 FC	
		NR	R
<i>ATF3</i>	activating transcription factor 3	1,07	1,76
<i>C1QA</i>	complement component 1, q subcomponent, A chain	1,21	1,36
<i>C1QB</i>	complement component 1, q subcomponent, B chain	1,54	2,09
<i>C2</i>	complement component 2	1,03	1,51
<i>CCL2</i>	chemokine (C-C motif) ligand 2	2,18	3,39
<i>CCL8</i>	chemokine (C-C motif) ligand 8	1,09	1,75
<i>CXCL10</i>	chemokine (C-X-C motif) ligand 10	1,83	2,71
<i>HERC6</i>	HECT and RLD domain containing E3 ubiquitin protein ligase family 6	1,04	1,49
<i>HES4</i>	hairy and enhancer of split 4 (Drosophila)	1,47	2,35
<i>HESX1</i>	HESX homeobox 1	1,37	2,25
<i>IFI35</i>	interferon-induced protein 35	1,01	1,53
<i>IFI44L</i>	interferon-induced protein 44-like	1,62	2,37
<i>IFI6</i>	interferon, alpha-inducible protein 6	1,56	2,18
<i>IFIT1</i>	interferon-induced protein with tetratricopeptide repeats 1	1,56	2,22
<i>IFIT3</i>	interferon-induced protein with tetratricopeptide repeats 3	1,32	1,87
<i>IL4I1</i>	interleukin 4 induced 1	1,07	1,76
<i>IRF7</i>	interferon regulatory factor 7	1,12	1,64
<i>ISG15</i>	ISG15 ubiquitin-like modifier	1,51	2,42
<i>KLHDC7B</i>	kelch domain containing 7B	1,03	1,40
<i>LAMP3</i>	lysosomal-associated membrane protein 3	1,44	2,64
<i>LY6E</i>	lymphocyte antigen 6 complex, locus E	1,21	1,93
<i>MS4A4A</i>	membrane-spanning 4-domains, subfamily A, member 4A	1,12	1,74
<i>MT1B</i>	metallothionein 1B	1,01	1,89
<i>MX1</i>	myxovirus (influenza v resistance 1, IFN-inducible protein p78 (mouse)	1,29	1,97
<i>OAS2</i>	2'-5'-oligoadenylate synthetase 2, 69/71kDa	1,22	1,78
<i>OAS3</i>	2'-5'-oligoadenylate synthetase 3, 100kDa	1,23	1,89
<i>OASL</i>	2'-5'-oligoadenylate synthetase-like	1,20	1,79
<i>P2RY6</i>	pyrimidinergic receptor P2Y, G-protein coupled, 6	1,03	1,23
<i>SAMD4A</i>	sterile alpha motif domain containing 4A	1,26	1,99
<i>SERPING1</i>	serpin peptidase inhibitor, clade G (C1 inhibitor), member 1	1,53	2,22
<i>SIGLEC1</i>	sialic acid binding Ig-like lectin 1, sialoadhesin	1,91	2,84
<i>SPATS2L</i>	spermatogenesis associated, serine-rich 2-like	1,41	2,26
<i>TCN2</i>	transcobalamin II	1,50	1,88
<i>TNFSF10</i>	tumor necrosis factor (ligand) superfamily, member 10	1,04	1,43
<i>USP18</i>	ubiquitin specific peptidase 18	1,60	2,57

Tabla A18. Lista de genes diferencialmente expresados en Respondedores y No Respondedores a las 24h tras la administración del IFN β mediante Rank product. La tasa de cambio "Fold change" (FC) indica las diferencias de expresión génica entre los valores encontrados a las 24h tras la administración del IFN β y su expresión basal. Los valores positivos indican un incremento en la expresión y los negativos una disminución con respecto a los valores basales. Valores de p ajustados <0.05.

8.3 Publicaciones de los resultados

Los resultados de esta tesis doctoral han sido publicados en revistas científicas de impacto y se han presentado en congresos internacionales y nacionales:

- Hurtado-Guerrero, I., Pinto Medel MJ., Urbaneja P., Rodríguez- Bada JL., León A., Guerrero M., Fernández O., Leyva L. and Oliver-Martos B. Activation of the JAK-STAT signaling pathway after in vitro stimulation with IFN β in multiple sclerosis patients according to the therapeutic response to IFN β . *PlosONE* en prensa.
- Hurtado Guerrero I., Pinto Medel MJ. Órpez Zafra T., Arnáiz Urrutia C., Rodríguez Bada JL., Fernández L., Fernández Ó., Oliver Martos B. Activación de la vía de señalización del IFN β en pacientes de esclerosis múltiple: Implicación en la respuesta al tratamiento con IFN β . LXVI Reunión anual Sociedad Española Neurología. Valencia; Noviembre de 2014. Comunicación oral.
- Hurtado Guerrero I., Oliver B., García Trujillo L., López Gómez C., García León JA., Marín Bañasco C., Rodríguez Bada JL; Fernández O. Activation state of proteins involved in IFN β signaling in multiple sclerosis patients according to the response to the treatment. 29th Congress of the European Committee for Treatment and Research in Multiple Sclerosis (ECTRIMS). Copenague; Octubre 2013. Comunicación en formato póster.
- Hurtado-Guerrero I; Pinto Medel MJ., Marín Bañasco C., Gallardo A., Diez de Baldeón F., Fernández O., Oliver Martos B. Cross-reactivity of anti-interferon beta antibodies against different interferons beta and interference of their presence in the JAK-STAT signalling pathway in multiple sclerosis patients. 31st Congress of the European Committee for Treatment and Research in Multiple Sclerosis (ECTRIMS). Barcelona; Octubre 2015. Comunicación en formato póster.
- Hurtado Guerrero I., Leyva L., Arnaiz C., Pinto Medel MJ., Marín Bañasco C., Fernandez O., Oliver Martos B. Estado de activación de la vía del IFN beta en pacientes de esclerosis múltiple: efectos del tratamiento en implicación en la

respuesta terapéutica. XXXVII Reunión anual de la sociedad andaluza de Neurología. Málaga; Octubre 2014. Comunicación en formato póster.

- Oliver Martos B., Arnaiz C., Pinto Medel MJ., Hurtado Guerrero I., Marín Bañasco C., Díez de Balderón F., Leyva L., Fernandez O. Análisis del transcriptoma de paciente con esclerosis múltiple en las primeras 24 horas tras la administración de IFN beta, en función de la respuesta al tratamiento. XXXVII Reunión anual de la sociedad andaluza de Neurología. Málaga; Octubre 2014. Comunicación en formato póster.
- Oliver Martos B., Arnaiz C., Pinto Medel MJ., Hurtado Guerrero I., Garcia Leon JA., Hurtado Guerrero I., Díez de Balderón F., Leyva L., Fernandez O. Análisis del transcriptoma de pacientes con esclerosis múltiple en las primeras 24 horas tras la administración de IFN beta, en función de la respuesta al tratamiento. LXV Reunión anual Sociedad Española Neurología. Barcelona; Noviembre de 2013. Comunicación en formato póster.

RESEARCH ARTICLE

Activation of the JAK-STAT Signaling Pathway after *In Vitro* Stimulation with IFN β in Multiple Sclerosis Patients According to the Therapeutic Response to IFN β

Isaac Hurtado-Guerrero, María Jesús Pinto-Medel, Patricia Urbaneja, Jose Luis Rodríguez-Bada, Antonio León, Miguel Guerrero, Óscar Fernández, Laura Leyva^{✉*}, Begoña Oliver-Martos^{✉*}

Unidad de Gestión Clínica de Neurociencias, Instituto de Investigación Biomédica de Málaga (IBIMA), Hospital Regional Universitario de Málaga, Universidad de Málaga, Málaga, Spain

✉ These authors contributed equally to this work.

* begoliver@gmail.com (BOM); leyvafer@gmail.com (LL)



OPEN ACCESS

Citation: Hurtado-Guerrero I, Pinto-Medel MJ, Urbaneja P, Rodríguez-Bada JL, León A, Guerrero M, et al. (2017) Activation of the JAK-STAT Signaling Pathway after *In Vitro* Stimulation with IFN β in Multiple Sclerosis Patients According to the Therapeutic Response to IFN β . PLoS ONE 12(1): e0170031. doi:10.1371/journal.pone.0170031

Editor: Laurel L Lenz, University of Colorado Denver School of Medicine, UNITED STATES

Received: October 6, 2016

Accepted: December 26, 2016

Published: January 19, 2017

Copyright: © 2017 Hurtado-Guerrero et al. This is an open access article distributed under the terms of the [Creative Commons Attribution License](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Data Availability Statement: All relevant data are within the paper and its Supporting Information files.

Funding: This work was supported by CTS-7670/11, Consejería de Economía y Conocimiento and co-funded by Fondo Europeo de Desarrollo Regional (FEDER), “Andalucía se mueve con Europa”; PI: Laura Leyva.

Competing Interests: O. Fernández has received honoraria as a consultant in advisory boards, and

Abstract

Interferon beta (IFN β) is a common treatment used for multiple sclerosis (MS) which acts through the activation of the JAK-STAT pathway. However, this therapy is not always effective and currently there are no reliable biomarkers to predict therapeutic response. We postulate that the heterogeneity in the response to IFN β therapy could be related to differential activation patterns of the JAK-STAT signaling pathway. Our aim was to evaluate the basal levels and the short term activation of this pathway after IFN β stimulation in untreated and IFN β treated patients, as well as according to therapeutic response. Therefore, cell surface levels of IFNAR subunits (IFNAR1 and IFNAR2) and the activated forms of STAT1 and STAT2 were assessed in peripheral blood mononuclear cells from MS patients by flow cytometry. Basal levels of each of the markers strongly correlated with the expression of the others in untreated patients, but many of these correlations lost significance in treated patients and after short term activation with IFN β . Patients who had undergone IFN β treatment showed higher basal levels of IFNAR1 and pSTAT1, but a reduced response to *in vitro* exposure to IFN β . Conversely, untreated patients, with lower basal levels, showed a greater ability of short term activation of this pathway. Monocytes from responder patients had lower IFNAR1 levels ($p = 0.039$) and higher IFNAR2 levels ($p = 0.035$) than non-responders just after IFN β stimulation. A cluster analysis showed that levels of IFNAR1, IFNAR2 and pSTAT1-2 in monocytes grouped 13 out of 19 responder patients with a similar expression pattern, showing an association of this pattern with the phenotype of good response to IFN β ($p = 0.013$). Our findings suggest that an activation pattern of the IFN β signaling pathway in monocytes could be associated with a clinical phenotype of good response to IFN β treatment and that a differential modulation of the IFNAR subunits in monocytes could be related with treatment effectiveness.

as a chairman or lecturer in meetings, and has also participated in clinical trials and other research projects promoted by Biogen-Idec, Bayer-Schering; Merck-Serono, Teva, Novartis, Almirall and Allergan. The other authors have declared that no competing interests exist. This does not alter our adherence to PLOS ONE policies on sharing data and materials.

Introduction

Multiple sclerosis (MS) is a chronic, inflammatory, demyelinating and presumably autoimmune disease of the central nervous system. It is characterized by the presence of multifocal lesions with variable axonal degeneration that result in progressive neurological disability [1]. Interferon beta (IFN β) is a common treatment used for patients with relapsing-onset MS [2]; however there is a large percentage of patients in which the IFN β therapy fails to reduce the relapse rate and the disability progression [3]. Clinicians should identify these non responder patients as early as possible, in order to offer other alternative therapies that are currently available. However, although several efforts have been made, at the moment there is no reliable biomarker to predict the response to IFN β treatment and only neutralizing antibodies (NABs) are considered to be a biomarker of IFN β bioactivity that might affect clinical decision making [4].

IFN β exerts its biological activity through interaction with a heterodimeric type I interferon receptor (IFNAR), composed of the IFNAR1 and IFNAR2 subunits [5] and through activation of the JAK-STAT signaling pathway [6]. This interaction results in the phosphorylation of IFNAR1 and IFNAR2 in tyrosine residues by Janus kinases, Tyk2 and JAK1, that subsequently result in the phosphorylation of critical residues of the transcriptional factors of the STAT family, mainly STAT1 (tyrosine 701) and STAT2 (tyrosine 689), leading to the formation of a heterodimer. This heterodimer associates with a third subunit, interferon regulatory factor 9 (IRF9/p48), to form the transcriptional complex IFN-stimulated gene factor 3 (ISGF3), which in turn, translocates to the nucleus to activate genes containing the IFN-stimulated response elements (ISRE) [7–10].

The JAK-STAT pathway is utilized by many other cytokines for signaling, and its activation is critical for the orchestration of immune responses [11]. The dysregulation of this pathway has pathological implications in autoimmune diseases such as rheumatoid arthritis, lupus erythematosus and psoriasis [12–15]. Accordingly, in the last years, therapies targeting the JAK-STAT signaling pathway have emerged for rheumatoid arthritis and other inflammatory diseases [16].

In MS patients, alterations in the JAK-STAT signaling pathway have also been described. The different leukocyte subsets showed a differential activation of STATs in response to systemic injection of IFN β 1a or *in vitro* stimulation [17]. Furthermore, the activation of this pathway in MS has been related with different clinical issues. Phosphorylated STAT1 (pSTAT1) has been proposed as a marker of disease activity since an up-regulation of pSTAT1 in peripheral blood mononuclear cells (PBMC) was observed in the active phase of the disease [18]. Moreover, those patients who subsequently became non-responders showed a greater activation in the JAK-STAT signaling pathway before the onset of IFN β therapy, with an elevation of IFNAR1 and pSTAT1 levels in monocytes [19].

The aim of the present study was to assess the levels of some proteins of the JAK-STAT pathway at baseline and after short term activation with IFN β , in untreated and IFN β -treated patients and to determine whether the activation patterns of those proteins discriminated responders from non-responders to IFN β therapy.

Materials and Methods

Subjects

This cross-sectional study enrolled forty eight patients with clinically definite relapsing remitting MS [20,21] from the Multiple Sclerosis Unit at Regional University Hospital in Málaga (Spain). Among them, 17 patients were treatment-naïve for at least 6 months, and 31 patients were treated with IFN β 1a or 1b, for 12–14 months. None of them had received corticosteroids



in the three months prior to blood sampling. All the patients were sampled during remissions and, in the case of treated patients after 12–14 months of IFN β therapy, within 10–12 hours post-injection.

The presence of neutralizing antibodies (NABs) against IFN β in serum samples of treated patients was tested by the cytopathic effect test following the WHO recommendations, as previously described [22]. The NABs were tested in the serum samples collected at the same time point as the blood used for isolating PBMC to avoid any possible influence on the activation of the Jak-STAT signaling pathway. Only those patients who were NABs negative were included in the study.

After 12 months of IFN β therapy, patients were classified according to their clinical and MRI activity [23]. Each patient could be positive for relapses, progression or MRI activity. Those patients exhibiting at least one relapse during the first year of therapy were considered positive for relapses; those who showed a progression of disability in the Expanded Disability Status Scale (EDSS) score of at least one point during the first year of therapy (confirmed at 6 months) were considered positive for progression; finally, those developing three or more active lesions (either new or enlarging T2 lesions compared with baseline MRI scan or gadolinium-enhancing lesions) on the MRI performed after 1 year of therapy were classified as positive for MRI activity.

Patients were considered non-responders according to the occurrence of two or three positive variables during the first year of therapy, otherwise they were considered responders.

The samples were provided by the Biobank of the Andalusian Public Health System. All patients participating in the study gave their written informed consent and protocols were approved by institutional ethical committees (CEI Málaga Nordeste).

The demographic and clinical characteristics of the subjects are summarized in Table 1.

Sample collection

Fresh lithium heparinised blood was obtained by venipuncture from clinically stable MS patients. PBMC were isolated using a ficoll-hypaque gradient, as described in the supplier's

Table 1. Demographic and clinical characteristics of multiple sclerosis patients.

	Untreated	IFN β Treated	p-Value (a)	Responders	Non-responders	p-Value (b)
Number of subjects	17	31		19	12	
Female/male	10/7	19/12	n.s.	12/7	6/6	n.s.
Age (years)	37 \pm 11	36 \pm 10	n.s.	36 \pm 10	35 \pm 11	n.s.
MS duration (years)	6.5 \pm 5.4	6.9 \pm 5.4	n.s.	6.4 \pm 5.6	7.7 \pm 5.2	n.s.
EDSS at baseline	1 (0 \pm 3.75)	1 (0 \pm 1.5)	n.s.	0 (0 \pm 1)	1 (0 \pm 2.5)	n.s.
EDSS after a year of therapy	-	1 (0 \pm 1.5)		0 (0 \pm 1)	1.75 (1 \pm 2.875)	0.003
Number of relapses before treatment onset	1 (0 \pm 1.5)	1 (0 \pm 1)	n.s.	1(1 \pm 1)	1(0 \pm 2)	n.s.
Number of relapses in the 1st year of therapy	-	0 (0 \pm 1)		0(0 \pm 0)	1(1 \pm 1)	9 x 10 ⁻⁶
Number of patients with MRI activity before interferon onset	-	-		6/19	10/12	<0.005
Number of patients with MRI activity after 1 year of IFN β therapy	-	-		1/19	9/12	<0.00005

Quantitative data are presented as mean \pm standard deviation (age and MS duration) or as median (inter-quartile range) for EDSS and number of relapses. (a) P-values obtained between untreated and treated patients by chi-square test (gender), T-test (age, duration) or Mann-Whitney test (EDSS and number of relapses).

(b) P-values obtained between responder and non responder patients by chi-square test (gender, MRI activity), T-test (age, duration) or Mann-Whitney test (EDSS and number of relapses).

n.s non significant, MS multiple sclerosis, EDSS expanded disability status scale, IFN β interferon beta.

doi:10.1371/journal.pone.0170031.t001

protocol (ICN Biomedicals Inc., OH, USA). After that, cells were cryopreserved in RPMI-1640 medium (BioWhittaker), 40% heat-inactivated fetal calf serum (FBS) (BioWhittaker) and 10% DMSO (Sigma), until use.

IFN β stimulation and flow cytometry

A panel of four markers was selected including the two subunits of IFNAR (IFNAR1 and IFNAR2) and the activated forms of STAT (pSTAT1 and pSTAT2), to cluster patients based on signaling profiles.

PBMC from untreated and treated MS patients were thawed and suspended in pre-warmed RPMI-1640 medium (BioWhittaker), supplemented with 2 mM L-glutamine (ICN Biomedicals), 20% FBS (BioWhittaker) and 0.032 mg/ml gentamicin (Normon). PBMC were washed by centrifugation, re-suspended in the same medium without FBS (1 million /ml) and incubated at 37°C for 90 min, in order to obtain the lowest level of activation.

We first analyzed early kinetics of STAT phosphorylation induced by a single dose of 1000 IU/ml IFN β 1a (Avonex, Biogen, Inc.) in Jurkat cells. Then, the preliminary experiments with PBMC from MS patients showed that within 30 min of stimulation, phosphorylation of STAT1 and STAT2 was close to maximum levels, so we chose this time and dose for cell stimulation in the study (data not shown).

Cells from each subject were stimulated either with 1000 IU/ml IFN β 1a to allow the signal transduction and the phosphorylation of the proteins or with RPMI-1640 medium without FBS during 30 minutes at 37°C (unstimulated cells considered as basal levels of activation).

Following stimulation, the cells were fixed with Cytfix (BD Biosciences) at 37°C for 10 min, washed twice with Perm/Wash Buffer (BD Biosciences) and permeabilized with Perm-Buffer III (BD Biosciences) at 4°C for 20 min. After two additional washes, the cells were stained for 30 min in the dark, at room temperature with fluorescein isothiocyanate, phycoerythrin, phycoerythrin-cyanine, peridinin chlorophyll protein, Alexa Fluor-488 and allophycocyanin labelled specific monoclonal antibodies (MAb) for the following molecules: IFNAR1 (R&D, FAB245F), IFNAR2 (PBL 21385–3), phospho-STAT1 (Y⁷⁰¹) (BD Biosciences 612596), phospho-STAT2 (Y⁶⁸⁹) (R&D IC2890F), CD3 (BD Biosciences 345766), CD8 (BD Biosciences 560917) and CD14 (BD Biosciences 555399) [S1 Table](#). Previously, the antibodies were titrated for optimal separation and staining. Four or five colour stainings with different combinations of MAb were performed in order to evaluate the expression of the IFNAR subunits and the activation of STATs in the different cell populations. Isotype-matched controls were used to verify the staining specificity of the antibodies.

Cells were washed and acquired in a FACSCanto II™ flow cytometer (BD Biosciences) using the FACSDiva software (BD Biosciences). At least 50,000 events were acquired from each sample. The gating strategy is shown in [Fig 1](#). The expression of IFNAR1, IFNAR2, pSTAT1 and pSTAT2 was determined in unstimulated and IFN β -stimulated CD4⁺, CD8⁺ T cells and monocytes, and the data were analyzed as geometric mean fluorescent intensities (MFI) for each marker within each cell subpopulation.

Statistical analysis

Expression of each variable was tested for distribution using the Kolmogorov–Smirnov test. Distribution of the quantitative variables following a normal distribution (age and MS duration) in the patient subgroups were analyzed by the T test. In the case of variables that did not follow a normal distribution (EDSS and number of relapses), non-parametric tests were applied.

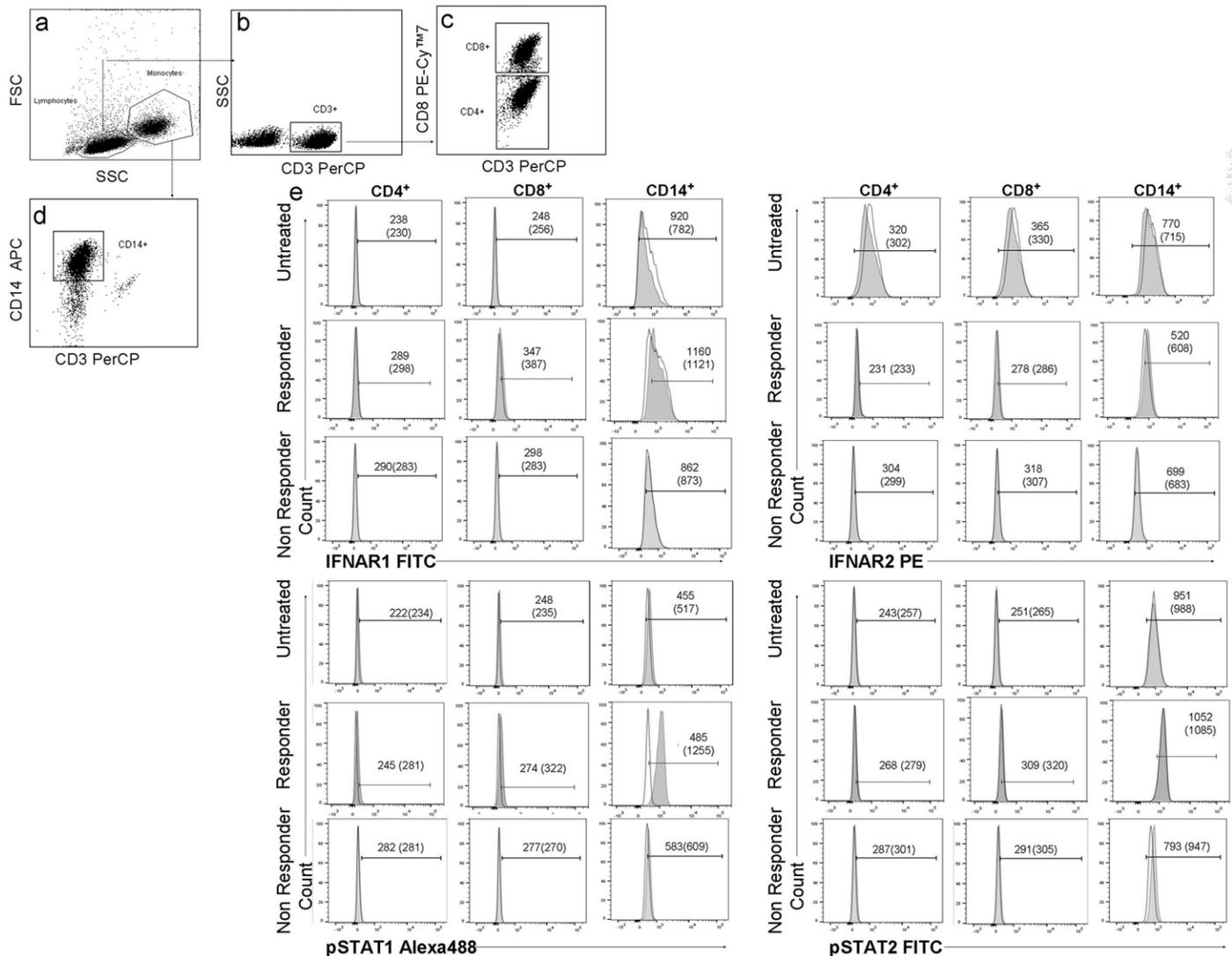


Fig 1. Gating strategy to determine IFNAR1, IFNAR2, pSTAT1 and pSTAT2 expression on different lymphocyte subsets. First, based on the combination of FSC (size) and SSC (granularity) attributes of the acquired events, lymphocyte and monocyte gates were selected (a). T lymphocytes were identified by gating on CD3+ cells (b), then they were transferred to a new dot plot and were analyzed by a specific antibody against CD8. T CD8+ lymphocytes were identified as CD3+ and CD8+ cells and T CD4+ lymphocytes as CD3+ and CD8- cells (c). Monocytes were identified as CD14+ and CD3- (d). Overlay histograms from a representative patient of each study group that depict the MFI of unstimulated (open histograms) and IFN β -stimulated (1000UI/mL, 30 min) (filled histograms) cells expressing IFNAR1, IFNAR2, pSTAT1 and pSTAT2 in CD4+, CD8+ T lymphocytes and monocytes. The numbers next to each of the histograms indicate the MFI values for unstimulated and stimulated cells (in brackets) (e). *FSC*: forward scatter, *SSC*: side scatter, *FITC*: fluorescein isothiocyanate, *PE*: phycoerythrin, *PE-Cy7*: phycoerythrin-cyanine, *PerCP*: peridinin chlorophyll protein, *Alexa488*: Alexa Fluor-488, *APC*: allophycocyanin.

doi:10.1371/journal.pone.0170031.g001

Basal levels of expression in unstimulated cells were analyzed as MFI, and the Mann-Whitney U test was used for the comparisons between two groups. Changes in IFNAR1, IFNAR2, pSTAT1 and pSTAT2 after *in vitro* stimulation with IFN β were analyzed as the following ratio: MFI of stimulated cells / MFI of unstimulated cells (MFI_s/MFI_{us}) using the Mann-Whitney U test. For the heat map representation, log₂ was applied to this ratio [24]. Statistical significance was set at p ≤ 0.05. The correlation between the expression of the different markers in MS patients was assessed using the Pearson correlation coefficient.

Four parameters (IFNAR1, IFNAR2, pSTAT1 and pSTAT2) were included as variables in an unsupervised average linkage hierarchical clustering, executed with Genesis software [25] to search for a specific pattern related to therapeutic response to IFN β . After that, the variable "presence or absence of the pattern identified by the clustering" was associated with the response to IFN β therapy by the chi-square test.

Results

Correlations of protein levels

Baseline correlation. Untreated patients showed a strong positive correlation between the expression levels of each of the markers with the levels of the other three markers in the three unstimulated cell subsets (Fig 2A). However, in IFN β treated patients, IFNAR1 levels did not correlate with IFNAR2 levels in any of the cell subsets. Additionally, IFNAR1 levels did not correlate with STAT1 or STAT2 levels in monocytes, and IFNAR2 levels did not correlate with STAT1 in CD8+ T cells or with STAT2 levels in CD8+ T cells and monocytes, as observed in Fig 2B.

Correlation after short-term *in vitro* stimulation with IFN β . Correlations between the expression levels of each of the markers with the levels of the other three markers in the three cell subsets were lost after *in vitro* activation with IFN β . In untreated patients, only IFNAR1 expression correlated with IFNAR2 expression in the 3 cell subsets. This correlation was replicated in the treated patients in the T cell subsets, but was lost in the stimulated monocytes, in which the only correlations observed were between IFNAR1-STAT2 levels and IFNAR2-STAT1 levels (Fig 3).

JAK-STAT signaling pathway in unstimulated cells and after short term IFN β stimulation. Comparisons between untreated and treated patients

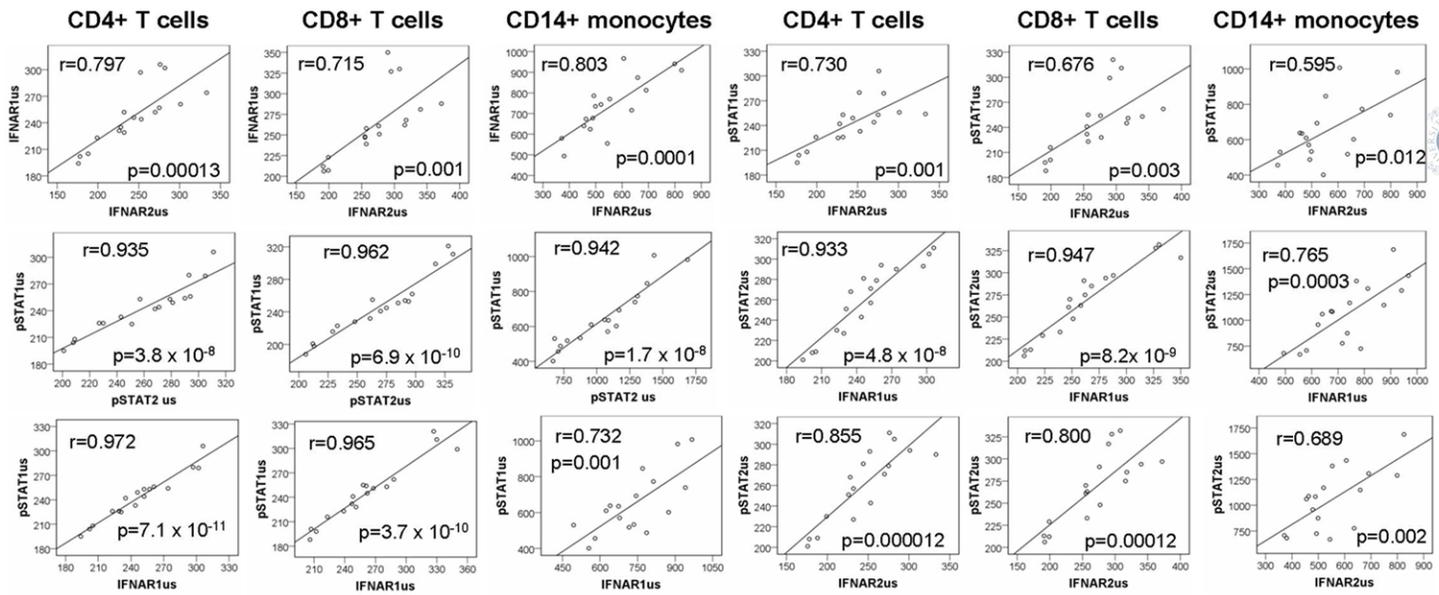
Baseline expression. Before evaluating the effects of IFN β stimulation, the expression of the steady-state levels of each of the markers of the JAK-STAT signaling pathway was assessed in three cellular subsets (CD4+ T cells, CD8+ T cells, and CD14+ monocytes) in untreated and treated MS patients. Among all the subsets, the monocytes showed the highest MFI for all the markers in unstimulated conditions, as shown in Table 2.

The differences in the basal levels between untreated and treated patients were assessed by comparing MFI in unstimulated cells from both groups of patients. IFN β treated patients showed significantly higher MFI_{us} of IFNAR1 and pSTAT1 in the CD4+ T cells ($p = 0.019$; $p = 0.020$), CD8+ T cells ($p = 0.001$; $p = 0.026$), and monocytes ($p < 0.0001$; $p = 0.008$) than untreated patients, as observed in Table 2 and Fig 4.

To evaluate the different profiles of the JAK-STAT signaling pathway in unstimulated cells, data of each study group were represented in a heat map. To normalize the data, the average per group of the MFI in unstimulated cells (MFI_{us mean group}) was divided by the average of the MFI from all the patients (MFI_{us mean all}) for a specific marker, in each of the unstimulated cell subsets, and then, the ratios (MFI_{us mean group} / MFI_{us mean all}) for IFNAR1, IFNAR2, pSTAT1, pSTAT2 were log₂ transformed.

These values were represented graphically by colouring log ratios of 0 in black (unchanged proteins), increasingly positive log ratios with yellows of increasing intensity and increasingly negative log ratios with violets of increasing intensity. Long term IFN β -treated patients showed a higher activation pattern in unstimulated conditions than untreated patients, as can be observed in the heat map (Fig 5a).

A) Untreated MS patients



B) IFN β -treated MS patients

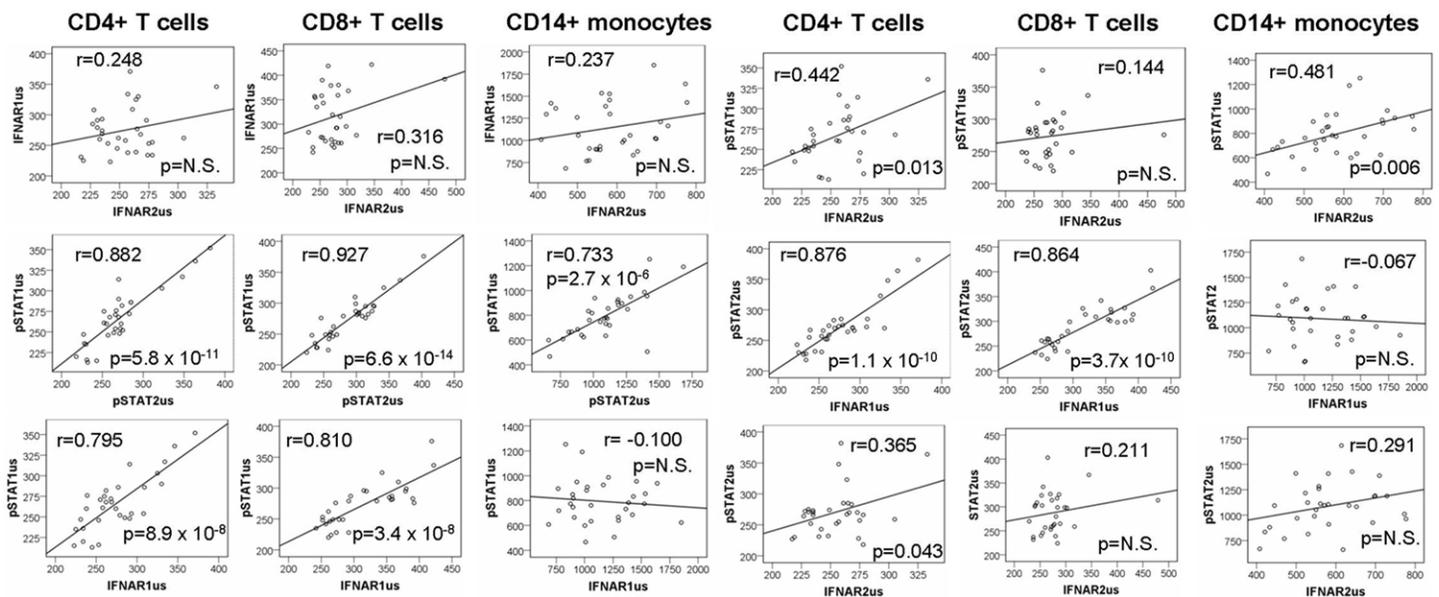


Fig 2. Correlations between the levels of expression of the different markers in the three unstimulated cell subsets (CD4+ T cells, CD8+ T cells, CD14+ monocytes) A) In untreated MS patients; B) In IFN β -treated MS patients. The correlation between the MFI_{us} of the different markers was assessed using the Pearson correlation coefficient. MFI_{us}: mean fluorescence intensity in unstimulated cells

doi:10.1371/journal.pone.0170031.g002

Expression after short-term *in vitro* stimulation with IFN β . The differences of the *in vitro* stimulation with IFN β between untreated and IFN β treated patients were analyzed as the ratio (MFI_s/MFI_{us}) for IFNAR1, IFNAR2, pSTAT1, pSTAT2 in each cell subset. This ratio provided us with information about the activation state of the cells with short term stimulation

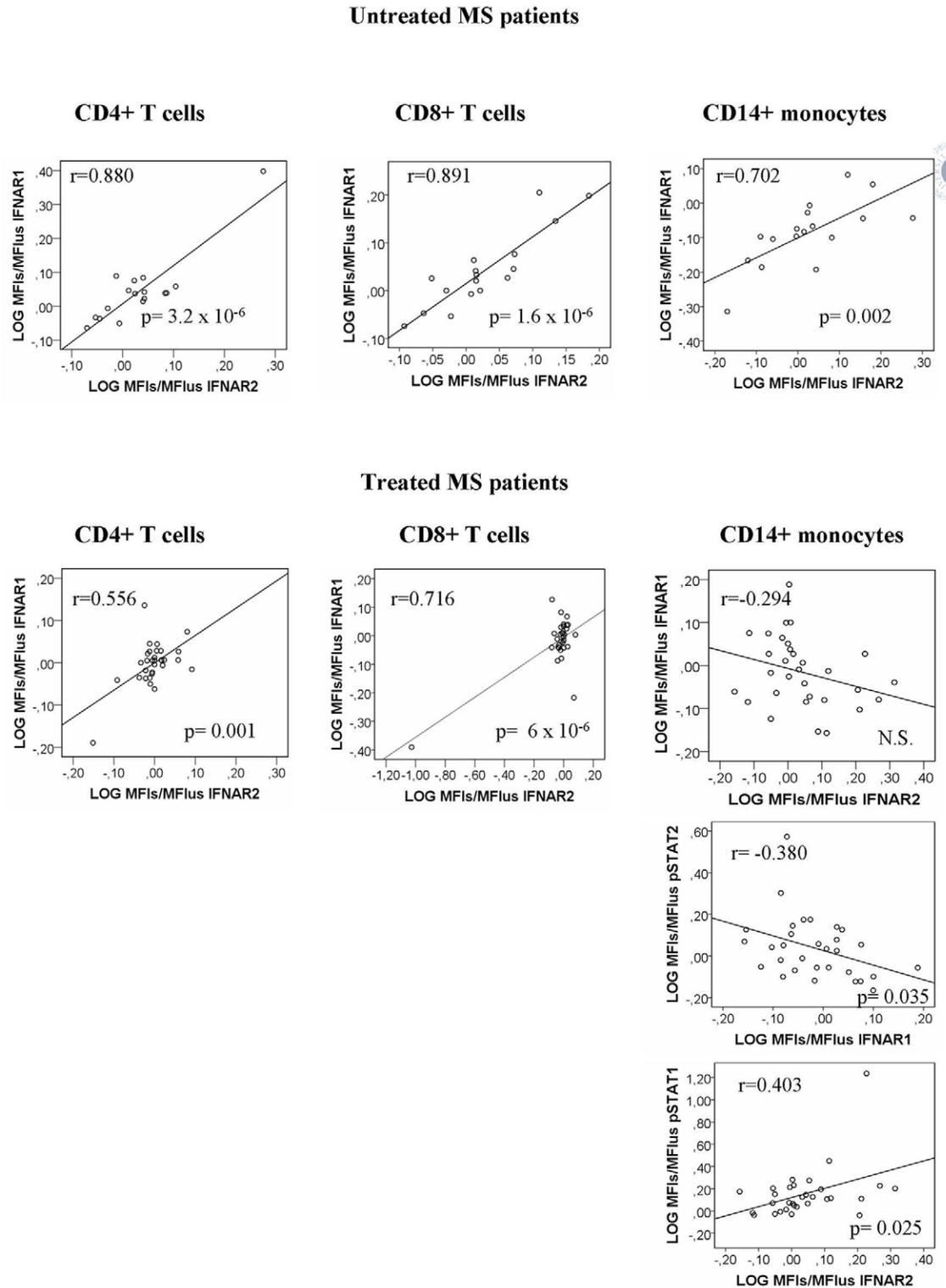


Fig 3. Correlations between levels of expression of the different markers in the three stimulated cell subsets (CD4+ T cells, CD8+ T cells, CD14+ monocytes) in untreated and IFN γ -treated MS patients. The conditions of IFN γ stimulation were 1000UI/mL, 30 min. The correlation between the \log_2 [MFIs/ MFius] of the different markers was assessed using the Pearson correlation coefficient. MFIs: mean fluorescence intensity in IFN γ -stimulated cells MFius: mean fluorescence intensity in unstimulated cells

doi:10.1371/journal.pone.0170031.g003

Table 2. Mean Fluorescence Intensity of IFNAR1, IFNAR2, pSTAT1 and pSTAT2 in unstimulated cells. Comparison between IFN β treated and untreated MS patients.

MFI IN UNSTIMULATED CELLS		Non-treated	Treated	p
CD4	IFNAR1	247.65 \pm 33.52	274.9 \pm 37.79	0,019
	IFNAR2	243.82 \pm 43.61	254.9 \pm 25.10	NS
	pSTAT1	243.12 \pm 28.74	266.52 \pm 33.81	0,020
	pSTAT2	259.88 \pm 35.28	270.71 \pm 38.20	NS
CD8	IFNAR1	262.23 \pm 42.52	315.97 \pm 54.96	0,001
	IFNAR2	270.41 \pm 53.31	277.16 \pm 45.08	NS
	pSTAT1	245.76 \pm 37.75	273.58 \pm 35.16	0,026
	pSTAT2	267.88 \pm 40.08	288.16 \pm 41.94	NS
CD14	IFNAR1	735.36 \pm 136.79	1143.81 \pm 290.34	<0,0001
	IFNAR2	556.59 \pm 130.45	583.29 \pm 100.18	NS
	pSTAT1	648.23 \pm 173.80	794.48 \pm 176.49	0,008
	pSTAT2	1061.18 \pm 298.78	1090.29 \pm 232.95	NS

Data are expressed as mean values \pm standard deviation

doi:10.1371/journal.pone.0170031.t002

with IFN β and, therefore, indirectly, about the functionality of the IFN β signaling pathway. With IFN β stimulation, monocytes from untreated patients showed lower IFNAR1 expression ($p = 0.012$) and higher STAT2 expression ($p = 0.027$) than those from treated patients, but showed no differences in IFNAR2 and pSTAT1 levels between both groups. Conversely, in both T cell subsets, *in vitro* stimulation with IFN β slightly increased IFNAR1 levels to a higher extent in untreated patients than in those patients previously treated with IFN β ($p = 0.044$ and $p = 0.040$, respectively in CD4+ and CD8+ T cells), as shown in Fig 6.

To look for different profiles of activation of the JAK-STAT signaling pathway after *in vitro* IFN β stimulation, the averages of MFI_s/MFI_{us} for IFNAR1, IFNAR2, pSTAT1, pSTAT2 of each study group were log₂ transformed and represented in a heat map, as explained before. Overall, the heat map revealed that untreated patients showed a higher activation pattern after stimulation with IFN β than patients previously treated with prolonged systemic IFN β therapy (Fig 5b).

JAK-STAT signaling pathway in responder and sub-optimal responder patients

Baseline expression. Basal levels of the JAK-STAT signaling pathway markers in treated patients according to the therapeutic response to IFN β were assessed in unstimulated cells. No significant differences in the MFI_{us} of IFNAR1, IFNAR2, pSTAT1 and pSTAT2 in the three cell subsets were observed between responder and sub-optimal responder patients, as shown in Table 3. As mentioned before, the highest MFI for all the markers were observed in the monocyte subset.

At baseline, levels of IFNAR1 correlated with levels of STAT1 and STAT2 in both T cell subsets, both in responders and non-responders. Additionally, STAT1 expression correlated with STAT2 expression in the three cell subsets in both groups, as shown in Table 4.

To construct the heat map in unstimulated cells, the data of each marker were normalized as follows: log₂ (MFI_{us mean group} / MFI_{us mean all}). Although some differences can be seen between both groups, they did not reach statistical significance (Fig 5c).

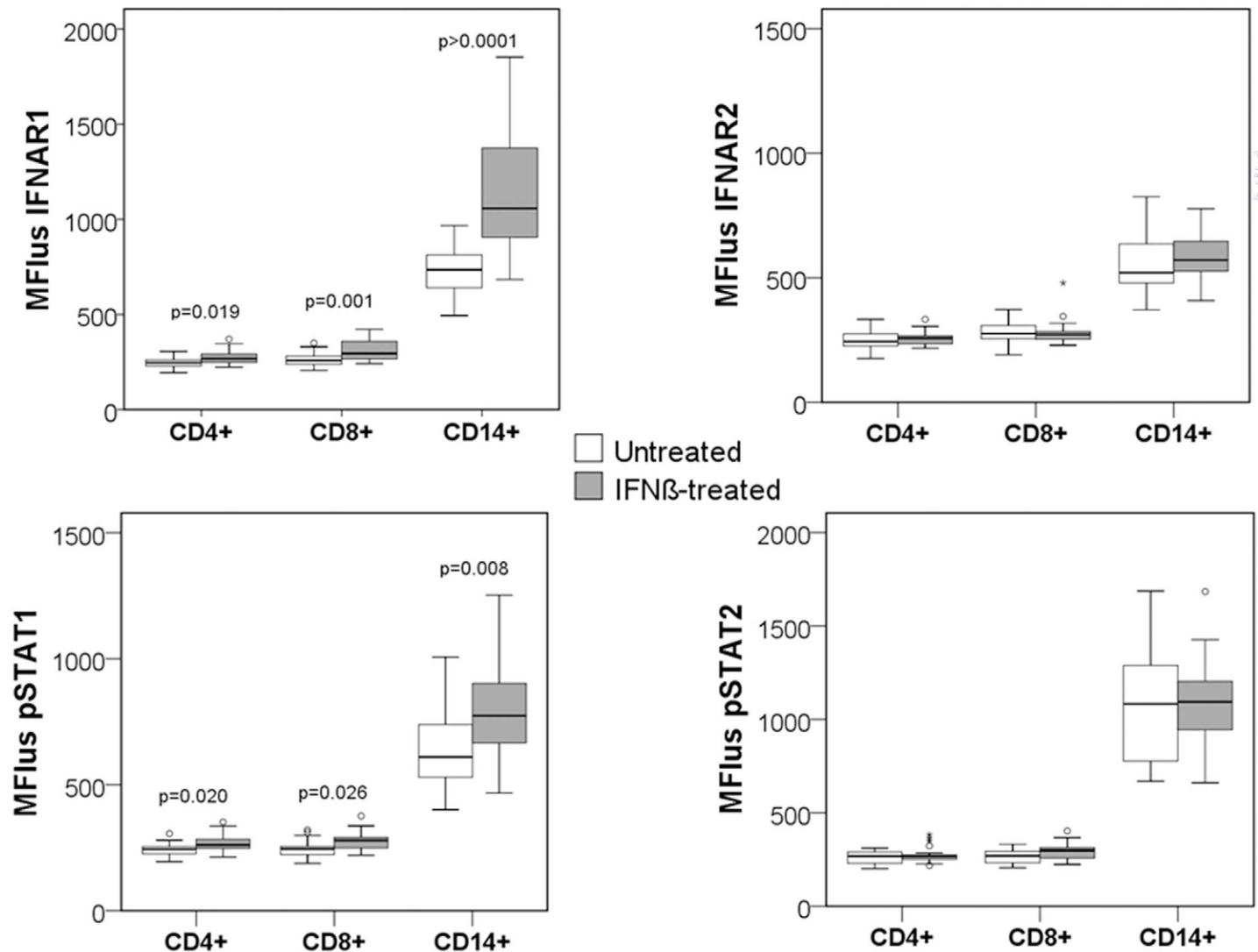


Fig 4. Differences in the expression of IFNAR1, IFNAR2, pSTAT1 and pSTAT2 in unstimulated cells between untreated and treated patients. MFI_{us} of IFNAR1, IFNAR2, pSTAT1 and pSTAT2 in CD4+, CD8+ and CD14+ subsets from untreated and treated patients. The Mann-Whitney U test was used for the comparison between two groups.

doi:10.1371/journal.pone.0170031.g004

Expression after short-term *in vitro* stimulation with IFN β . The differences in the activation of the signaling cascade after stimulation with IFN β between responders and sub-optimal responders were analyzed as the ratio (MFI_s/MFI_{us}) for each of the four markers, [S2 Table](#). Monocytes from responder patients showed slightly lower IFNAR1 levels (p = 0.039) and higher IFNAR2 levels (p = 0.035) than monocytes from non-responders ([Fig 7](#)). However, differences between responders and non responders in the ability to activate STAT proteins (assessed by tyrosine phosphorylation) after IFN β stimulation were subtle and did not reach statistical significance.

After short term *in vitro* activation with IFN β , the changes in the levels of IFNAR1 and IFNAR2 correlated significantly in CD4+ (r = 0.583; p = 0.009) and CD8+ T cells from responders exclusively (r = 0.726; p = 0.00043), a correlation that was not found in monocytes ([Fig 8](#)).

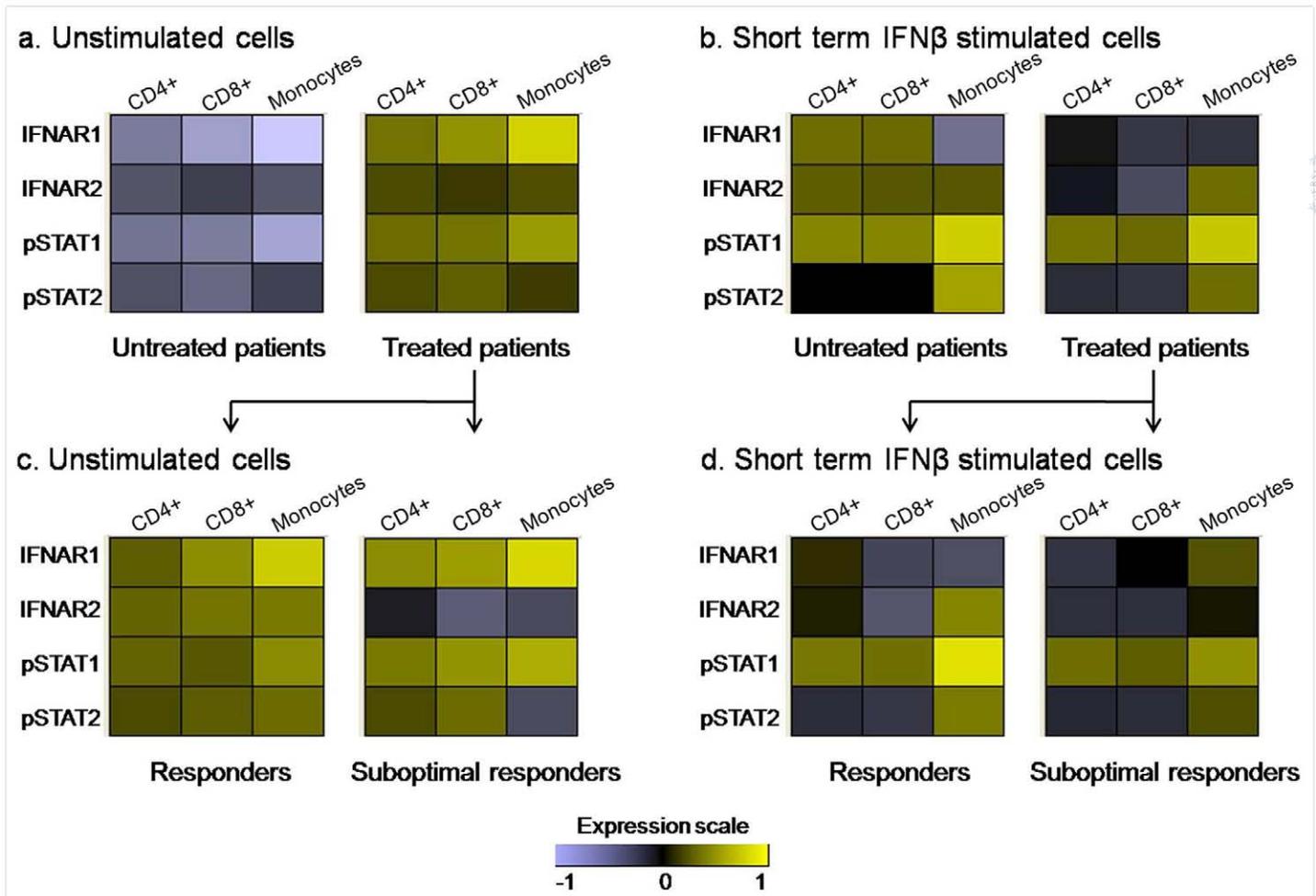


Fig 5. Heat maps showing different profiles of the JAK-STAT signaling pathway in unstimulated cells and after short term IFN β stimulation. The logarithmic transformation of MFI of IFNAR1, IFNAR2, pSTAT1 and pSTAT2 has been represented for each sub-population in: a) Untreated and treated patients in unstimulated conditions $\log_2 (MFI_{US \text{ mean group}} / MFI_{US \text{ mean all}})$. b) Untreated and treated patients after short term IFN β stimulation (1000UI/mL, 30 min) $\log_2 (MFI_s / MFI_{us})$. c) Responders and sub-optimal responders in unstimulated conditions $\log_2 (MFI_{US \text{ mean group}} / MFI_{US \text{ mean all}})$. d) Responders and sub-optimal responders after short term IFN β stimulation (1000UI/mL, 30 min) $\log_2 (MFI_s / MFI_{us})$. In unstimulated cell heat maps (Fig a and c), the data were normalized as follows: the average per group of the MFI in unstimulated cells ($MFI_{US \text{ mean group}}$) was divided by the average of MFI ($MFI_{US \text{ mean all}}$) from all the patients, for a specific marker. Then, the ratios ($MFI_{US \text{ mean group}} / MFI_{US \text{ mean all}}$) were \log_2 transformed. In the condition of short term IFN β stimulation cells (Fig b and d), for each patient, the data were normalized by the MFI of unstimulated cells (MFI_s / MFI_{us}). For the representation in the heat maps, the average of the ratio of MFIs/ MFI_{us} in each study group was calculated and then was \log_2 transformed. Unchanged proteins are displayed in black, up-regulated proteins are displayed in yellow while the down-regulated proteins are depicted in violet.

doi:10.1371/journal.pone.0170031.g005

Different patterns of JAK-STAT signaling pathway after *in vitro* stimulation according to therapeutic response. As in the other conditions, the average of $\log_2 (MFI_s / MFI_{us})$ of responders and non-responders was represented in a heat map (Fig 5d), where some differences could be observed. In order to identify the different functional patterns in the IFN β signaling pathway related to the therapeutic response to IFN β , the $\log_2 (MFI_s / MFI_{us})$ of each patient was further represented in a heat map (Fig 9). The unsupervised average linkage hierarchical clustering showed that the levels of IFNAR1, IFNAR2, pSTAT1 and pSTAT2 in monocytes were able to group 13 out of 19 (68%) responders with a similar expression pattern. This "responder" pattern in monocytes was characterized by a decrease in IFNAR1 levels, and a simultaneous increase in IFNAR2, pSTAT1 and pSTAT2 after *in vitro* stimulation with IFN β .

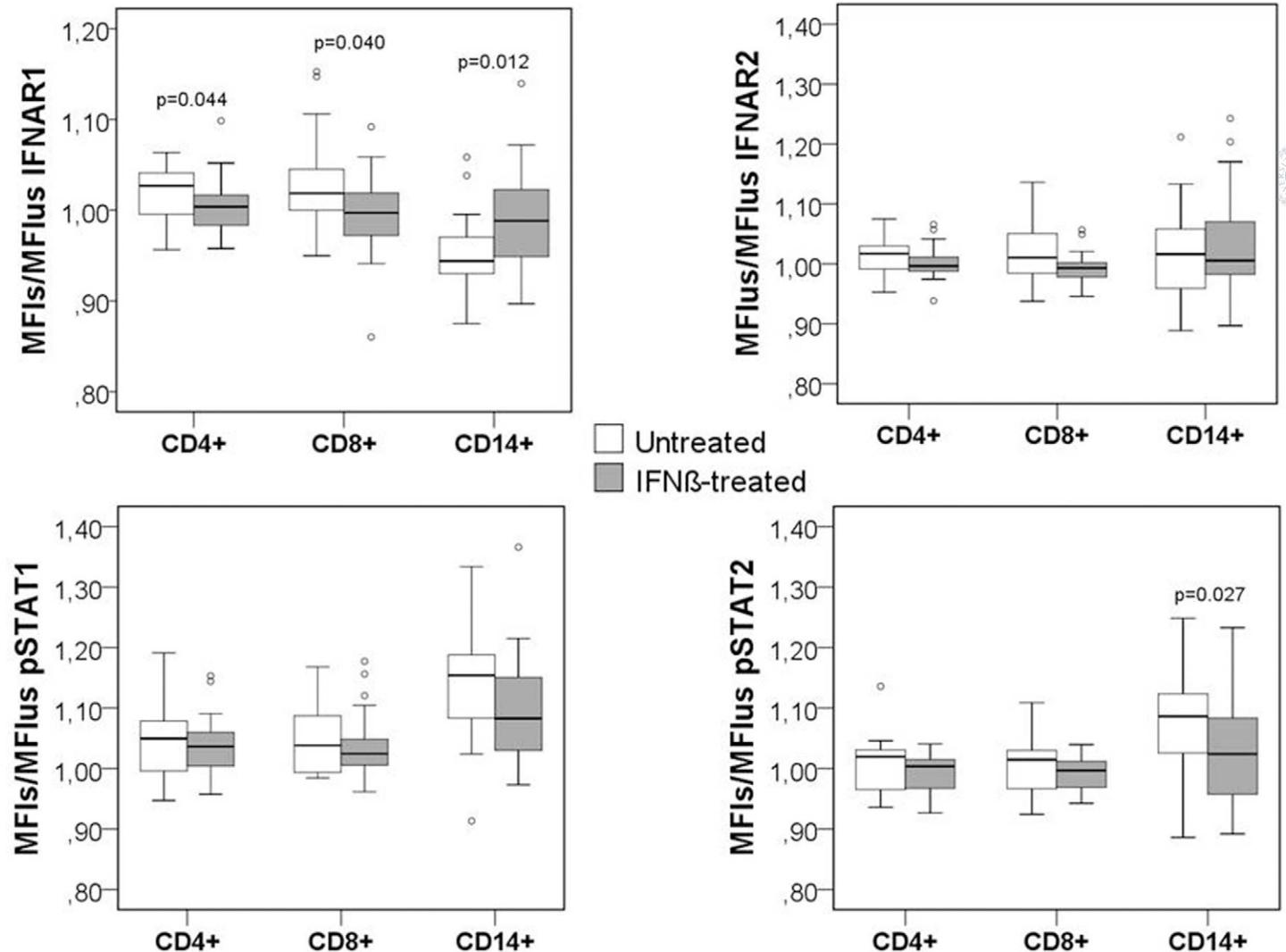


Fig 6. Differences in the expression of IFNAR1, IFNAR2, pSTAT1 and pSTAT2 after short term IFN β stimulation between untreated and IFN β -treated MS patients. Expression is represented as a ratio of the mean fluorescence intensity in stimulated cells (MFI_s) between the MFI of unstimulated cells (MFI_{us}) for IFNAR1, IFNAR2, pSTAT1 and pSTAT2 in CD4+, CD8+ and CD14+ subsets from untreated and treated patients. The conditions of IFN β stimulation were 1000UI/mL, 30 min. The Mann-Whitney U test was used for the comparison between the two groups.

doi:10.1371/journal.pone.0170031.g006

The chi-square test showed an association between the presence of this pattern and the clinical phenotype of good therapeutic response to IFN β ($p = 0.013$). However, this pattern related with the therapeutic response to IFN β could not be identified in CD4⁺ or CD8⁺ T cell sub-populations.

Discussion

The mechanism of IFN β therapy in relapsing-remitting multiple sclerosis is not completely understood, however it is well known that its action starts with the interaction with IFNAR and the activation of the JAK and STAT proteins[26]. The evaluation of the cell surface receptor and the phosphoproteins just after IFN β 1a stimulation allows us to characterise the short term activation of the JAK-STAT signaling pathway. Our hypothesis was that a differential

Table 3. Mean Fluorescence Intensity of IFNAR1, IFNAR2, pSTAT1 and pSTAT2 in unstimulated cells (MFI_{us}). Comparison between responders and sub-optimal responders to IFN β therapy.

MFI IN UNSTIMULATED CELLS				
		Responders	Non responders	p
CD4	IFNAR1	271.32 ± 41.39	280.58 ± 32.15	N.S.
	IFNAR2	257.84 ± 25.64	250.25 ± 24.58	N.S.
	pSTAT1	264.95 ± 36.31	269 ± 30.80	N.S.
	pSTAT2	270.68 ± 43.61	270.75 ± 29.46	N.S.
CD8	IFNAR1	314.21 ± 61.94	318.75 ± 44.10	N.S.
	IFNAR2	285.05 ± 51.87	264.67 ± 29.37	N.S.
	pSTAT1	269 ± 39.80	280.83 ± 26.18	N.S.
	pSTAT2	287.11 ± 48.55	289.83 ± 30.58	N.S.
CD14	IFNAR1	1136.58 ± 281.91	1155.25 ± 315.64	N.S.
	IFNAR2	597.37 ± 71.61	561 ± 134.52	N.S.
	pSTAT1	784.79 ± 159.39	809.83 ± 207.25	N.S.
	pSTAT2	1113.26 ± 229.07	1053.92 ± 244.51	N.S.

Data are expressed as mean values ± standard deviation

doi:10.1371/journal.pone.0170031.t003

activation of this pathway could help to explain differences in responsiveness to IFN β therapy and that patients could be grouped based on signaling profiles.

First of all, the signaling pathway was characterized in untreated and IFN β -treated patients, to evaluate the effect of the prolonged systemic IFN β therapy. Physiological expression levels of IFNAR1 and IFNAR2 are very low [27] and, as other low copy-number proteins, IFNAR1 and IFNAR2 show a large variance in the receptor concentrations of individual cells [28]. Strikingly, in our cohort, basal levels of each of the markers correlated strongly with the expression of the others in untreated patients, but many of these correlations lost significance in previously treated patients, so systemic therapy with IFN β is influencing the basal expression of these markers. Accordingly, it has been described that type I IFN binding to their receptor induces IFNAR1 internalization and degradation via lysosomal receptor proteolysis [29–33], while IFNAR2 expression displays a considerably slower basal turnover [33].

Under unstimulated conditions, levels of IFNAR1 and pSTAT1 were significantly higher in IFN β -treated patients than in untreated patients in the three sub-populations. However, after short term stimulation with IFN β , monocytes from untreated patients had a more prominent response to the stimulus than those from treated patients, showing a higher decrease in the

Table 4. Significant correlations between Mean Fluorescence Intensities of IFNAR1, IFNAR2, pSTAT1 and pSTAT2 in unstimulated cells (MFI_{us}). Comparison between responders and sub-optimal responders to IFN β therapy.

Correlations	Response to IFN β therapy	CD4+		CD8+		CD14+	
		r	p	r	p	r	p
IFNAR1-STAT1	R	0.850	4 x 10 ⁻⁸	0.828	1.2 x 10 ⁻⁵		
	NR	0.662	0.019	0.772	0.003		
IFNAR1-pSTAT2	R	0.926	1.2 x 10 ⁻⁸	0.893	2.7 x 10 ⁻⁷		
	NR	0.752	0.005	0.765	0.004		
pSTAT1-pSTAT2	R	0.933	5.5 x 10 ⁻⁹	0.960	7.1 x 10 ⁻¹¹	0.652	0.002
	NR	0.757	0.004	0.838	0.001	0.873	0.0002

R: responders; NR: non-responders; r: Pearson correlation coef@cient

doi:10.1371/journal.pone.0170031.t004

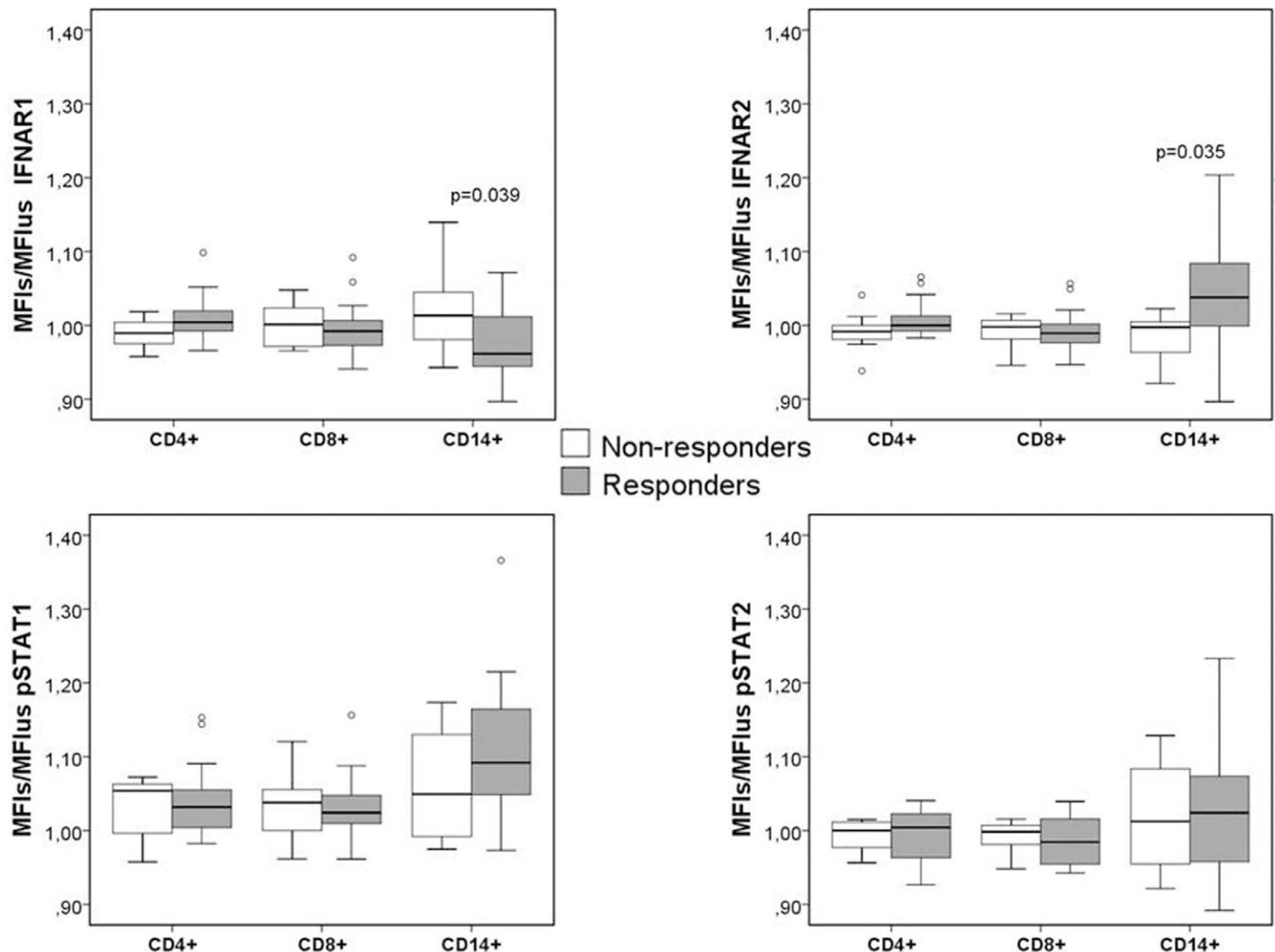


Fig 7. Differences in the expression of IFNAR1, IFNAR2, pSTAT1 and pSTAT2 after short term IFN β stimulation between responders and sub-optimal responders. Expression is represented as the ratio of the mean fluorescence intensity in stimulated cells (MFI_s) between the MFI of unstimulated cells (MFI_{us}) of IFNAR1, IFNAR2, pSTAT1 and pSTAT2 in CD4+, CD8+ and CD14+ subsets from responder and non-responder patients. The conditions of IFN β stimulation were 1000UI/mL, 30 min. The Mann-Whitney U test was used for the comparison between the two groups.

doi:10.1371/journal.pone.0170031.g007

expression of IFNAR1 and a higher activation of pSTAT2. Accordingly, monocytes and T cells from patients with prolonged IFN β treatment showed higher basal levels of IFNAR1 and pSTAT1 but showed a reduced response to *in vitro* exposure to IFN β . Conversely, untreated patients, with a lower activation state under unstimulated conditions, showed a higher ability of short term activation of the pathway after *in vitro* stimulus with IFN β . These results suggest a de-sensitization to the IFN β stimulus in previously treated patients as a consequence of the continued exposure to IFN β treatment [34, 35]. Otherwise, STAT-1, and -2 were not fully constitutively activated in T cells and monocytes, as *in vitro* stimulation with IFN β increased their activation in both untreated and treated patients, although the ability to respond to this cytokine by activating pSTATs was slightly reduced in previously treated patients. Continuous systemic therapy with IFN β may diminish the capacity of these cells to respond to this cytokine through these transduction factors.

IFN β -responder MS patients

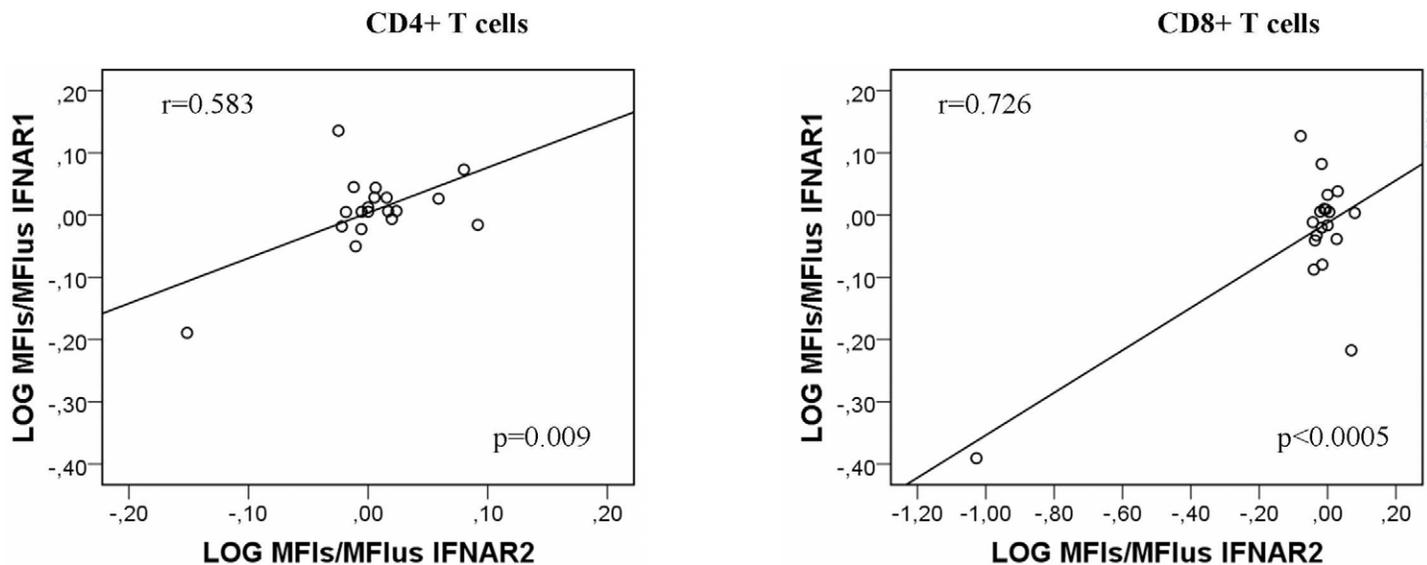


Fig 8. Correlation of IFNAR1 log₂ (MF_I/MF_{Ius}) and IFNAR2 log₂ (MF_I/MF_{Ius}) expression in T cells from responder patients.

doi:10.1371/journal.pone.0170031.g008

Among all the analyzed cell subsets, monocytes showed a higher response to *in vitro* stimulation with IFN β than CD4⁺ and CD8⁺ T cells, so IFN β stimulation seems to trigger cell type specific responses, as has been previously described in MS [17].

Regarding the therapeutic response to IFN β , it has been previously described that before the onset of IFN β therapy, those patients who subsequently became non responders showed higher IFNAR1 and pSTAT1 levels in monocytes than those who responded satisfactorily to this therapy [19], but there is a lack of JAK-STAT pathway data concerning patients undergoing IFN β treatment, as in this study.

We have shown that responders and non-responders showed no differences in the expression of any of the markers under steady-state conditions. However, responders are the group that better reflect the modulation of biological responsiveness to *in vitro* IFN β stimulation. Monocytes from responder patients underwent a rapid down-modulation of the cell surface IFNAR1 and an up-regulation of the IFNAR2 subunit. This observation suggests that, in non-responders a more important de-sensitization of the JAK-STAT pathway could occur as a consequence of the prolonged systemic treatment [34]. This could be a cause that justifies the lack of response with an important biological rationale, that should be investigated in a greater cohort of patients.

We thought that it would be interesting to address whether a differential modulation of the subunits occurs according to the therapeutic response, as the modulation of IFNAR1 and IFNAR2 levels is one of the main regulatory mechanisms of the duration and potency of cell responsiveness to IFN β . Several studies have demonstrated that IFN β induces endocytosis and degradation of IFNAR1 to regulate the cell signaling [36–38] en just 30 minutes after IFN β stimulation, a down-regulation of IFNAR1 has been described in some cell lines, while IFNAR2 expression displayed a considerably slower basal turnover and the extent of its down-regulation diminished as IFNAR1 expression decreased in cells [33]. Additionally, although IFNAR2 is the binding subunit, IFNAR1 can also interact with IFN β and the complex is able

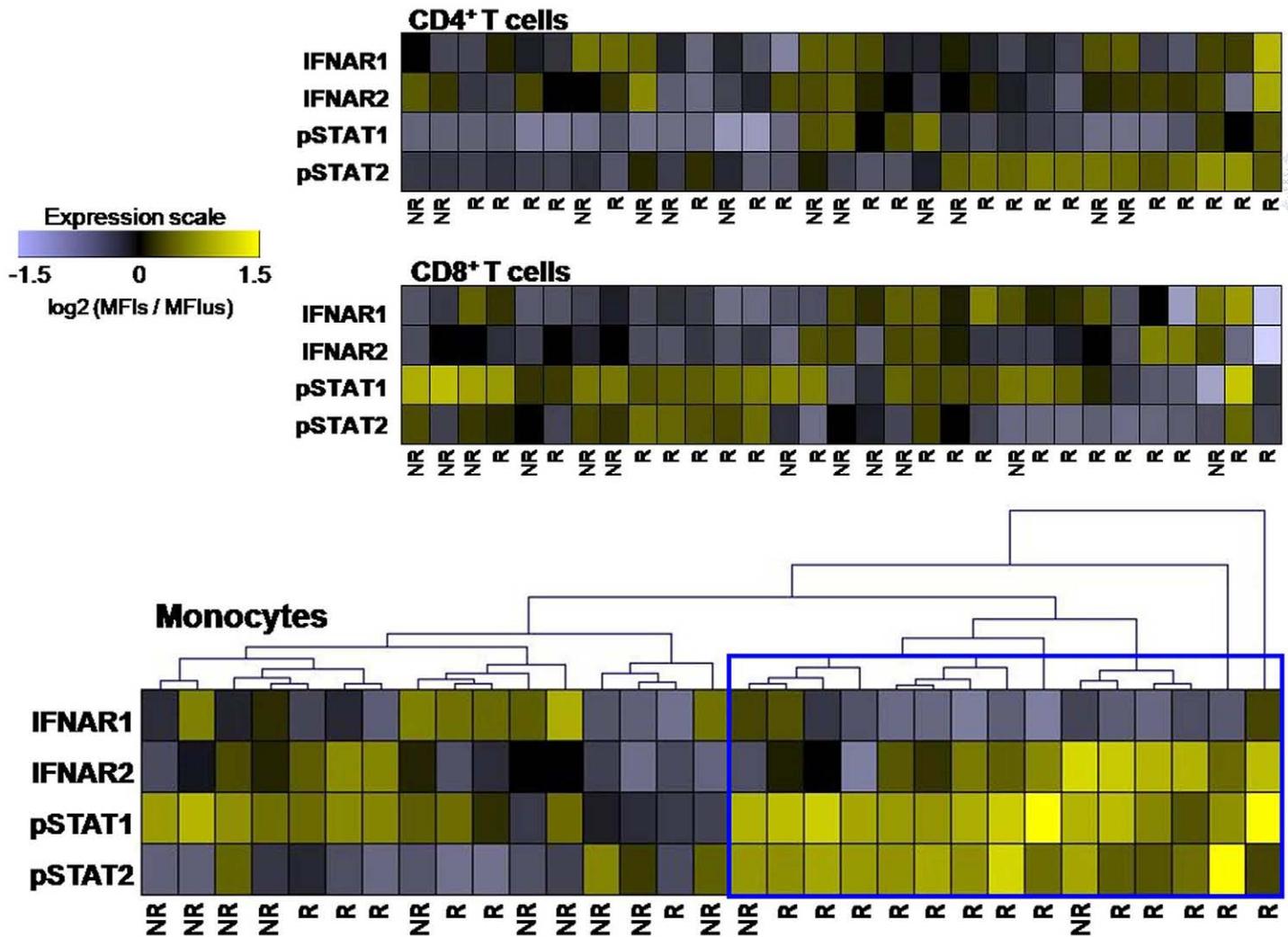


Fig 9. Individual activation pattern of JAK-STAT signaling pathway after IFN β *in vitro* stimulation related with the responsiveness to IFN β therapy. The $\log_2(MFI_s/MFI_{us})$ of IFNAR1, IFNAR2, pSTAT1 and pSTAT2 of each treated patient were represented in a heat map for each of the cellular sub-populations. Unchanged proteins are displayed in black, over-expressed proteins are shown in yellow, while down-regulated proteins are shown in violet. In monocytes, a non-supervised average linkage hierarchical clustering grouped 13 out of 19 of responder patients with a similar expression pattern (blue square). MFI_s mean fluorescence intensity of stimulated cells, MFI_{us} mean fluorescence intensity of unstimulated cells, NR non-responders to IFN β therapy, R responders to IFN β therapy.

doi:10.1371/journal.pone.0170031.g009

to transmit signals to induce genes independently of IFNAR2 [39], a relevant fact that could explain differences in the response to IFN β treatment.

In our study, after *in vitro* stimulation with IFN β , the cell surface expression of IFNAR1 decreased while that of IFNAR2 increased in monocytes from responders. These changes suggest that, in responders, a differential regulation of the two receptor subunits is possible and the increase in IFNAR2 surface expression may compensate the well known IFNAR1 down-regulation induced by continuous exposure to IFN β , in an attempt to maintain the activation of the JAK-STAT signaling pathway that will result in transcriptional activation or repression of interferon-regulated genes.

The changes of the cell surface receptor and the phospho-proteins just after IFN β *in vitro* stimulation were used to address whether the patients could be grouped based on the activation of the JAK-STAT signaling pathway, using an unsupervised linkage hierarchical clustering. It was possible to identify a pattern in monocytes that was present in 68.4% of responder patients based on the similarity of their cell surface receptor levels and the expression of phospho-STAT proteins. This pattern, significantly associated with the phenotype of good responsiveness to IFN β treatment, was characterised by a decrease in IFNAR1 levels and an increase in IFNAR2, pSTAT1 and pSTAT2 levels upon stimulation with IFN β . Only two non-responders were also grouped within this pattern, so that the lack of response in these patients seems not to be directly related with the JAK-STAT signaling pathway, nor with the presence of NABs, as all the patients included in the study were NABs negative. Other factors that have not been considered in the study, such as the lack of compliance could explain this lack of response.

As JAK-STAT signaling alone is not enough to explain all the biological effects of type I IFNs, and the molecular mechanisms of the therapeutic response to IFN β are not yet completely understood, it would be interesting to study other alternative kinases or transcription factors, as well as the inclusion of other downstream markers in the IFN β signalling pathway that could explain why some responder patients did not cluster within the profile of good response and that would have strengthened the study.

Due to the complexity of MS pathology and the heterogeneity in the response to therapy, it might be very difficult to establish a single response biomarker. The approach in this study has allowed us to associate a clinical phenotype of good responsiveness to IFN β treatment with a functional pattern of the IFN β signaling pathway in monocytes, but further investigation is required to elucidate completely the role of the JAK-STAT signaling pathway in the responsiveness to IFN β therapy.

Supporting Information

S1 Table. Detailed information of the antibodies used in flow cytometry.
(DOC)

S2 Table. Data set responder and non-responder patients.
(XLS)

Acknowledgments

We sincerely thank all the patients that participated in this study.

Author Contributions

Conceptualization: LL BOM.

Formal analysis: LL BOM MJPM.

Funding acquisition: LL.

Investigation: IHG MJPM JLRB.

Methodology: LL BOM.

Project administration: OF.

Resources: PU MG AL.

Validation: BOM.

Writing \pm original draft: LL BOM.

Writing \pm review & editing: LL BOM OF.

References

1. McFarland HF, Martin R. Multiple sclerosis: a complicated picture of autoimmunity. *Nat Immunol*. 2007. 8: 913 \pm 9. doi: [10.1038/ni1507](https://doi.org/10.1038/ni1507) PMID: [17712344](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17712344/)
2. Kieseier BC. The mechanism of action of interferon-beta in relapsing multiple sclerosis. *CNS Drugs*. 2011. 25: 491 \pm 502. doi: [10.2165/11591110-000000000-00000](https://doi.org/10.2165/11591110-000000000-00000) PMID: [21649449](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21649449/)
3. Rio J, Nos C, Tintore M, Tellez N, Galan I, Pelayo R, et al. Defining the response to interferon-beta in relapsing-remitting multiple sclerosis patients. *Ann Neurol*. 2006. 59: 344 \pm 52. doi: [10.1002/ana.20740](https://doi.org/10.1002/ana.20740) PMID: [16437558](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16437558/)
4. Comabella M, Montalban X. Body fluid biomarkers in multiple sclerosis. *Lancet Neurol*. 2014. 13: 113 \pm 126. doi: [10.1016/S1474-4422\(13\)70233-3](https://doi.org/10.1016/S1474-4422(13)70233-3) PMID: [24331797](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24331797/)
5. Lutfalla G, Gardiner K, Proud hon D, Vielh E, Uze G. The structure of the human interferon alpha/beta receptor gene. *J Biol Chem*. 1992. 267: 2802 \pm 9. PMID: [1370833](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/1370833/)
6. Stark GR, Darnell JE Jr. The JAK-STAT pathway at twenty. *Immunity*. 2012. 36: 503 \pm 514. doi: [10.1016/j.immuni.2012.03.013](https://doi.org/10.1016/j.immuni.2012.03.013) PMID: [22520844](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22520844/)
7. Velazquez L, Fellous M, Stark GR, Pellegrini S. A protein tyrosine kinase in the interferon alpha/beta signaling pathway. *Cell*. 1992. 70: 313 \pm 22. PMID: [1386289](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/1386289/)
8. Croze E, Russell-Harde D, Wagner TC, Pu H, Pfeffer LM, Perez HD. The human type I interferon receptor. Identification of the interferon beta-specific receptor-associated phosphoprotein. *J Biol Chem*. 1996. 271: 33165 \pm 33168. PMID: [8969169](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/8969169/)
9. van Boxel-Dezaire AH, Rani MR, Stark GR. Complex modulation of cell type-specific signaling in response to type I interferons. *Immunity*. 2006. 25: 361 \pm 372. doi: [10.1016/j.immuni.2006.08.014](https://doi.org/10.1016/j.immuni.2006.08.014) PMID: [16979568](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16979568/)
10. de Weerd NA, Nguyen T. The interferons and their receptors distribution and regulation. *Immunol Cell Biol*. 2012. 90: 483 \pm 491. doi: [10.1038/icb.2012.9](https://doi.org/10.1038/icb.2012.9) PMID: [22410872](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22410872/)
11. O'Shea JJ, Plenge R. JAK and STAT signaling molecules in immunoregulation and immune-mediated disease. *Immunity*. 2012. 36: 542 \pm 550. doi: [10.1016/j.immuni.2012.03.014](https://doi.org/10.1016/j.immuni.2012.03.014) PMID: [22520847](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22520847/)
12. Axtell RC, Raman C. Janus-like effects of type I interferon in autoimmune diseases. *Immunol Rev*. 2012. 248: 23 \pm 35. doi: [10.1111/j.1600-065X.2012.01131.x](https://doi.org/10.1111/j.1600-065X.2012.01131.x) PMID: [22725952](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22725952/)
13. Kasperkovitz PV, Verbeet NL, Smeets TJ, van Rietschoten JG, Kraan MC, van der Pouw Kraan TC, et al. *Ann Rheum Dis*. 2004. 63: 233 \pm 239. doi: [10.1136/ard.2003.013276](https://doi.org/10.1136/ard.2003.013276) PMID: [14962955](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/14962955/)
14. Ramirez-Velez G, Medina F, Ramirez-Montano L, Zarazua-Lozada A, Hernandez R, Llorente L, et al. Constitutive phosphorylation of interferon receptor A-associated signaling proteins in systemic lupus erythematosus. *PLoS One*. 2012. 7: e41414. doi: [10.1371/journal.pone.0041414](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0041414) PMID: [22859983](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22859983/)
15. Hald A, Andre's RM, Salskov-Iversen ML, Kjellerup RB, Iversen L, Johansen C. STAT1 expression and activation is increased in lesional psoriatic skin. *Br J Dermatol*. 2013. 168: 302 \pm 310. doi: [10.1111/bjd.12049](https://doi.org/10.1111/bjd.12049) PMID: [23013371](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23013371/)
16. Schwartz DM, Bonelli M, Gadina M, O'Shea JJ. Type I/II cytokines, JAKs, and new strategies for treating autoimmune diseases. *Nat Rev Rheumatol*. 2016. 12: 25 \pm 36. doi: [10.1038/nrrheum.2015.167](https://doi.org/10.1038/nrrheum.2015.167) PMID: [26633291](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26633291/)
17. Zula JA, Green HC, Ransohoff RM, Rudick RA, Stark GR, van Boxel-Dezaire AH. The role of cell type-specific responses in IFN- β therapy of multiple sclerosis. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2011. 108: 19689 \pm 19694. doi: [10.1073/pnas.1117347108](https://doi.org/10.1073/pnas.1117347108) PMID: [22106296](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22106296/)
18. Frisullo G, Angelucci F, Caggiula M, Nociti V, Iorio R, Patanella AK, et al. pSTAT1, pSTAT3, and T-bet expression in peripheral blood mononuclear cells from relapsing-remitting multiple sclerosis patients correlates with disease activity. *J Neurosci Res*. 2006. 84: 1027 \pm 1036. doi: [10.1002/jnr.20995](https://doi.org/10.1002/jnr.20995) PMID: [16865709](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16865709/)
19. Comabella M, Lunemann JD, Rio J, Sanchez A, Lopez C, Julia E, et al. A type I interferon signature in monocytes is associated with poor response to interferon-beta in multiple sclerosis. *Brain*. 2009. 132: 3353 \pm 65. doi: [10.1093/brain/awp228](https://doi.org/10.1093/brain/awp228) PMID: [19741051](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19741051/)
20. McDonald WI, Compston A, Edan G, Goodkin D, Hartung HP, Lublin FD, et al. Recommended diagnostic criteria for multiple sclerosis: guidelines from the International Panel on the diagnosis of multiple sclerosis. *Ann. Neurol*. 2001. 50: 121 \pm 127. PMID: [11456302](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11456302/)

21. Polman CH, Reingold SC, Banwell B, Clanet M, Cohen JA, Filippi M, et al. Diagnostic criteria for multiple sclerosis: 2010 revisions to the McDonald criteria. *Ann. Neurol.* 2011. 69: 292±302. doi: [10.1002/ana.22366](https://doi.org/10.1002/ana.22366) PMID: [21387374](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21387374/)
22. Oliver B, Orpez T, Mayorga C, Pinto-Medel MJ, Leyva L, López-Gómez C, Marín C, Luque G, Ortega-Pinazo J, Fernández O. Neutralizing antibodies against IFN beta in patients with multiple sclerosis: a comparative study of two cytopathic effect tests (CPE) for their detection. *J Immunol Methods.* 2009 Dec 31; 351(1±2):41±5. doi: [10.1016/j.jim.2009.09.005](https://doi.org/10.1016/j.jim.2009.09.005) PMID: [19786034](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19786034/)
23. Rio J, Castillo J, Rovira A, Tintore M, Sastre-Garriga J, Horga A, et al. Measures in the first year of therapy predict the response to interferon beta in MS. *Mult Scler.* 2009. 15: 848±53. doi: [10.1177/1352458509104591](https://doi.org/10.1177/1352458509104591) PMID: [19542263](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19542263/)
24. Irish JM, Hovland R, Krutzik PO, Perez OD, Bruslerud Ø, Gjertsen BT, et al. Single cell profiling of potentiated phospho-protein networks in cancer cells. *Cell.* 2004. 118: 217±228. doi: [10.1016/j.cell.2004.06.028](https://doi.org/10.1016/j.cell.2004.06.028) PMID: [15260991](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15260991/)
25. Sturn A, Quackenbush J, Trajanoski Z. Genesis: cluster analysis of microarray data. *Bioinformatics.* 2002. 18: 207±208. PMID: [11836235](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11836235/)
26. Platanius LC. Mechanisms of type-I- and type-II-interferon-mediated signalling. *Nat. Rev. Immunol.* 2005. 5: 375±386. doi: [10.1038/nri1604](https://doi.org/10.1038/nri1604) PMID: [15864272](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15864272/)
27. Cohen B et al. Ligand-induced association of the type I interferon receptor components. *Mol Cell Biol* 1995; 15: 4208±4214 PMID: [7623815](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/7623815/)
28. Cai L, Friedman N, and Xie XS. Stochastic protein expression in individual cells at the single molecule level. *Nature* 2006; 440:358±362. doi: [10.1038/nature04599](https://doi.org/10.1038/nature04599) PMID: [16541077](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16541077/)
29. Constantinescu S. N., Croze E., Wang C., Murti A., Basu L., Mullersman J. E., and Pfeffer L. M.. Role of interferon α/β receptor chain 1 in the structure and transmembrane signaling of the interferon α/β receptor complex. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1994; 91:9602; PMID: [7524081](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/7524081/)
30. Fantuzzi L, Eid P, Malorni W, Rainaldi G, Gauzzi MC, Pellegrini S, Belardelli F, Gessani S. Post-translational up-regulation of the cell surface-associated alpha component of the human type I interferon receptor during differentiation of peripheral blood monocytes: role in the biological response to type I interferon. *Eur J Immunol.* 1997; 27(5):1075±81; doi: [10.1002/eji.1830270506](https://doi.org/10.1002/eji.1830270506) PMID: [9174595](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/9174595/)
31. Liu J, Plotnikov A, Banerjee A, Suresh Kumar KG, Ragimbeau J, Marijanovic Z, Baker DP, Pellegrini S, Fuchs SY. Ligand-independent pathway that controls stability of interferon alpha receptor. *Biochem Biophys Res Commun.* 2008 Mar 7; 367(2):388±93. doi: [10.1016/j.bbrc.2007.12.137](https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2007.12.137) PMID: [18166147](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18166147/)
32. Gauzzi MG, Canini I, Eid P, Belardelli F, Gessani S. Loss of type I IFN receptors and impaired IFN responsiveness during terminal maturation of monocyte-derived human dendritic cells. *J Immunol* 2002; 169:3038±3045 PMID: [12218119](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12218119/)
33. Marijanovic Z, Ragimbeau J, van der Heyden J, UzaŕG, Pellegrini S. Comparable potency of IFN α 2 and IFN β on immediate JAK/STAT activation but differential down-regulation of IFNAR2. *Biochem J.* 2007 Oct 1; 407(1):141±51. doi: [10.1042/BJ20070605](https://doi.org/10.1042/BJ20070605) PMID: [17627610](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17627610/)
34. François-Newton V, Magno de Freitas Almeida G, Payelle-Brogard B, Monneron D, Pichard-Garcia L, Piehler J, et al. USP18-based negative feedback control is induced by type I and type III interferons and specifically inactivates interferon α response. *PLoS One.* 2011. 6: e22200. doi: [10.1371/journal.pone.0022200](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0022200) PMID: [21779393](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21779393/)
35. Sandler NG, Bosinger SE, Estes JD, Zhu RT, Sharp GK, Boritz E, et al. Type I interferon responses in rhesus macaques prevent SIV infection and slow disease progression. *Nature.* 2014. 511: 601±605. doi: [10.1038/nature13554](https://doi.org/10.1038/nature13554) PMID: [25043006](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25043006/)
36. Ivashkiv LB, Donlin LT. Regulation of type I interferon responses. *Nat Rev Immunol.* 2014. 14: 36±49. doi: [10.1038/nri3581](https://doi.org/10.1038/nri3581) PMID: [24362405](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24362405/)
37. Kumar KG, Krolewski JJ, Fuchs SY. Phosphorylation and specific ubiquitin acceptor sites are required for ubiquitination and degradation of the IFNAR1 subunit of type I interferon receptor. *J Biol Chem.* 2004. 279: 46614±46620. doi: [10.1074/jbc.M407082200](https://doi.org/10.1074/jbc.M407082200) PMID: [15337770](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15337770/)
38. Kumar KG, Barriere H, Carbone CJ, Liu J, Swaminathan G, Xu P, et al. Site-specific ubiquitination exposes a linear motif to promote interferon-alpha receptor endocytosis. *J Cell Biol.* 2007. 179: 935±50. doi: [10.1083/jcb.200706034](https://doi.org/10.1083/jcb.200706034) PMID: [18056411](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18056411/)
39. de Weerd NA, Vivian JP, Nguyen TK, Mangan NE, Gould JA, Braniff SJ, et al. Structural basis of a unique interferon- α signaling axis mediated via the receptor IFNAR1. *Nat Immunol.* 2013. 14: 901±907. doi: [10.1038/ni.2667](https://doi.org/10.1038/ni.2667) PMID: [23872679](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23872679/)





BIBLIOGRAFÍA



9. BIBIOGRAFÍA

- Achiron, A. et al., 2012. Suppressed RNA-polymerase 1 pathway is associated with benign multiple sclerosis. *PloS one*, 7(10), p.e46871. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23077530>.
- Analysis, T.I.M.S.S.G. and the U. of B.C.M., 1995. Interferon beta-1b in the treatment of multiple sclerosis: final outcome of the randomized controlled trial. The IFNB Multiple Sclerosis Study Group and The University of British Columbia MS/MRI Analysis Group. *Neurology*, 45(7), pp.1277–85. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7617182>.
- Anon, 1993. 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*, 43(4), pp.655–61. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8469318>.
- Anon, 1998. 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 (London, England)*, 352(9139), pp.1498–504. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9820297>.
- Antonelli, G. et al., 1999. 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. *Journal of the Neurological Sciences*, 168(2), pp.131–136.
- Axtell, R.C. & Raman, C., 2012. Janus-like effects of type I interferon in autoimmune diseases. *Immunological reviews*, 248(1), pp.23–35. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22725952>.
- van Baarsen, L.G.M. et al., 2008. Pharmacogenomics of interferon-beta therapy in multiple sclerosis: baseline IFN signature determines pharmacological differences between patients. *PloS one*, 3(4), p.e1927. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2271130&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.
- Bankoti, J. et al., 2014. In multiple sclerosis, oligoclonal bands connect to peripheral B-cell responses. *Annals of neurology*, 75(2), pp.266–76. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24375699>.
- Belbasis, L. et al., 2015. Environmental risk factors and multiple sclerosis: An umbrella review of systematic reviews and meta-analyses. *The Lancet Neurology*.
- Berer, K. et al., 2011. Commensal microbiota and myelin autoantigen cooperate to trigger autoimmune demyelination. *Nature*, 479(7374), pp.538–541. Available at: <http://www.nature.com/doi/10.1038/nature10554>.
- Bertolotto, a et al., 2003. Persistent neutralizing antibodies abolish the interferon beta bioavailability in MS patients. *Neurology*, 60(4), pp.634–639.
- Bertolotto, A. et al., 2007. Development and validation of a real time PCR-based bioassay for quantification of neutralizing antibodies against human interferon-beta. *Journal of immunological methods*, 321(1-2), pp.19–31. Available at: <http://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/1475382042000254364>.

- Bertolotto, A., 2015. Evaluation of the impact of neutralizing antibodies on IFN β response. *Clinica Chimica Acta*, 449, pp.31–36.
- Bertolotto, A. et al., 2000. Interferon β neutralizing antibodies in multiple sclerosis: Neutralizing activity and cross-reactivity with three different preparations. *Immunopharmacology*, 48(2), pp.95–100.
- Bielekova, B. et al., 2000. Encephalitogenic potential of the myelin basic protein peptide (amino acids 83-99) in multiple sclerosis: results of a phase II clinical trial with an altered peptide ligand. *Nature medicine*, 6(10), pp.1167–1175.
- Bitsch, A. et al., 2000. Acute axonal injury in multiple sclerosis. Correlation with demyelination and inflammation. *Brain: a journal of neurology*, 123 (Pt 6, pp.1174–83. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10825356>.
- Bos, S.D. et al., 2016. From genetic associations to functional studies in multiple sclerosis. *European Journal of Neurology*.
- Bos, S.D. et al., 2015. Genome-wide DNA methylation profiles indicate CD8+ T cell hypermethylation in multiple sclerosis. *PLoS ONE*.
- Broadley, S.A. et al., 2015. A new era in the treatment of multiple sclerosis. *The Medical journal of Australia*, 203(3), pp.139–41, 141e.1. Available at: <https://www.mja.com.au/journal/2015/203/3/new-era-treatment-multiple-sclerosis>.
- Browne, P. et al., 2014. Atlas of Multiple Sclerosis 2013: A growing global problem with widespread inequity. *Neurology*, 83(11), pp.1022–4. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25200713>.
- Brucklacher-Waldert, V. et al., 2009. Phenotypical and functional characterization of T helper 17 cells in multiple sclerosis. *Brain: a journal of neurology*, 132(Pt 12), pp.3329–41. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19933767>.
- Buck, D. et al., 2011. Influence of the HLA-DRB1 genotype on antibody development to interferon beta in multiple sclerosis. *Arch Neurol*, 68(4), pp.480–487.
- Burton, J.M. & Costello, F.E., 2015. Vitamin D in Multiple Sclerosis and Central Nervous System Demyelinating Disease—A Review. *Journal of Neuro-Ophthalmology*, 35, pp.194–200.
- Bustamante, M.F. et al., 2013. Baseline Gene Expression Signatures in Monocytes from Multiple Sclerosis Patients Treated with Interferon-beta. *PLoS ONE*, 8(4).
- Bustamante, M.F. et al., 2011. Implication of the toll-like receptor 4 pathway in the response to interferon- β in multiple sclerosis. *Annals of Neurology*, 70(4), pp.634–645. Available at: <http://doi.wiley.com/10.1002/ana.22511>.
- Cai, L., Friedman, N. & Xie, X.S., 2006. Stochastic protein expression in individual cells at the single molecule level. *Nature*, 440(7082), pp.358–62.
- Carrithers, M.D., 2014. Update on disease-modifying treatments for multiple sclerosis. *Clinical therapeutics*, 36(12), pp.1938–45. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25218310>.
- Cénit, M.D.C. et al., 2009. Glypican 5 is an interferon-beta response gene: a replication study. *Multiple sclerosis*, 15(8), pp.913–917.
- Cepok, S. et al., 2005. Short-lived plasma blasts are the main B cell effector subset during the course of multiple sclerosis. *Brain: a journal of neurology*, 128(Pt 7),

- pp.1667–76. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15800022>.
- Charcot, J.-M. & Joffroy, A., 1869. Deux cas d'atrophie musculaire progressive avec lésions de la substance grise et des faisceaux antérolatéraux de la moelle épinière. *Archives de physiologie normale et pathologique*, 2, pp.744–760.
- Cohen, B. et al., 1995. Ligand-induced association of the type I interferon receptor components. *Molecular and cellular biology*, 15(8), pp.4208–14.
- Comabella, M. et al., 2009. A type I interferon signature in monocytes is associated with poor response to interferon- in multiple sclerosis. *Brain*, 132(12), pp.3353–3365. Available at: <http://brain.oxfordjournals.org/>.
- Comabella, M. & Montalban, X., 2014. Body fluid biomarkers in multiple sclerosis. *The Lancet Neurology*, 13(1), pp.113–126.
- Comi, G. et al., 2001. Effect of early interferon treatment on conversion to definite multiple sclerosis: a randomised study. *Lancet (London, England)*, 357(9268), pp.1576–82. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11377645>.
- Comi, G. et al., 2009. Effect of glatiramer acetate on conversion to clinically definite multiple sclerosis in patients with clinically isolated syndrome (PreCISe study): a randomised, double-blind, placebo-controlled trial. *The Lancet*.
- Compston, A. & Coles, A., 2008. Multiple sclerosis. *The Lancet*, 372(9648), pp.1502–1517. Available at: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0140673608616207>.
- Constantinescu, S.N. et al., 1994. Role of interferon alpha/beta receptor chain 1 in the structure and transmembrane signaling of the interferon alpha/beta receptor complex. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 91(20), pp.9602–6. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=44861&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.
- Creeke, P.I. & Farrell, R.A., 2013. Clinical testing for neutralizing antibodies to interferon- β in multiple sclerosis. *Therapeutic advances in neurological disorders*, 6(1), pp.3–17. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23277789>.
- Croze, E. et al., 2013. Interferon-beta-1b-induced short- and long-term signatures of treatment activity in multiple sclerosis. *The Pharmacogenomics Journal*, 13(5), pp.443–451. Available at: <http://www.nature.com/doifinder/10.1038/tpj.2012.27>.
- Deisenhammer, F., 2009. Neutralizing antibodies to interferon-beta and other immunological treatments for multiple sclerosis: prevalence and impact on outcomes. *CNS drugs*, 23(5), pp.379–96.
- Dendrou, C.A., Fugger, L. & Friese, M.A., 2015. Immunopathology of multiple sclerosis. *Nature reviews. Immunology*, 15(9), pp.545–58. Available at: <http://www.nature.com/doifinder/10.1038/nri3871>.
- Dhib-Jalbut, S. et al., 2013. Immune response during interferon beta-1b treatment in patients with multiple sclerosis who experienced relapses and those who were relapse-free in the START study. *Journal of neuroimmunology*, 254(1-2), pp.131–40. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22999187>.
- Dobson, R. et al., 2013. Cerebrospinal fluid oligoclonal bands in multiple sclerosis and clinically isolated syndromes: a meta-analysis of prevalence, prognosis and effect

- of latitude. *Journal of Neurology, Neurosurgery & Psychiatry*, 84(8), pp.909–914. Available at: <http://dx.doi.org/10.1136/>.
- Durelli, L. et al., 2007a. MRI activity and neutralising antibody as predictors of response to interferon treatment in multiple sclerosis. *Journal of Neurology, Neurosurgery & Psychiatry*, 79(6), pp.646–651. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17986500>.
- Durelli, L. et al., 2007b. MRI activity and neutralising antibody as predictors of response to interferon treatment in multiple sclerosis. *Journal of Neurology, Neurosurgery & Psychiatry*, 79(6), pp.646–651. Available at: <http://jnnp.bmj.com/cgi/doi/10.1136/jnnp.2007.130229>.
- Dutta, R. & Trapp, B.D., 2014. Relapsing and progressive forms of multiple sclerosis. *Current Opinion in Neurology*, 27(3), pp.271–278. Available at: <http://content.wkhealth.com/linkback/openurl?sid=WKPTLP:landingpage&an=00019052-201406000-00005>.
- Ebers, G.C., 2001. Natural history of multiple sclerosis. *Journal of neurology, neurosurgery, and psychiatry*, 71 Suppl 2(17), pp.ii16–9. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11701779>.
- Van Den Elsen, P.J. et al., 2014. The epigenetics of multiple sclerosis and other related disorders. *Multiple Sclerosis and Related Disorders*, 3(2), pp.163–175.
- Fantuzzi, L. et al., 1997. Post-translational up-regulation of the cell surface-associated α component of the human type I interferon receptor during differentiation of peripheral blood monocytes: role in the biological response to type I interferon. *European Journal of Immunology*, 27(5), pp.1075–1081. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9174595>.
- Farrell, R. et al., 2008. Neutralizing anti-interferon beta antibodies are associated with reduced side effects and delayed impact on efficacy of Interferon-beta. *Mult Scler*, 14(2), pp.212–218.
- Fernald, G.H. et al., 2007. Genome-Wide Network Analysis Reveals the Global Properties of IFN- Immediate Transcriptional Effects in Humans. *The Journal of Immunology*, 178(8), pp.5076–5085.
- Fernandez O., F.V.E. and G.M., 2011. *Esclerosis Múltiple* McGrawHill-Interamericana, ed., Madrid.
- Files, D.K. et al., 2015. Multiple Sclerosis. *Primary Care - Clinics in Office Practice*.
- Filippi, M. et al., 2012. Association between pathological and MRI findings in multiple sclerosis. *The Lancet Neurology*.
- Fine, D. et al., 2015. Do neutralising antibodies against exogenous interferon-beta inhibit endogenous signalling pathways? *Multiple Sclerosis and Related Disorders*, 4(1), pp.88–91.
- Francois-Newton, V. et al., 2012. USP18 establishes the transcriptional and anti-proliferative interferon α/β differential. *Biochemical Journal*, 446(3), pp.509–516. Available at: <http://biochemj.org/lookup/doi/10.1042/BJ20120541>.
- François-Newton, V. et al., 2011. USP18-Based Negative Feedback Control Is Induced by Type I and Type III Interferons and Specifically Inactivates Interferon α Response K. L. Mossman, ed. *PLoS ONE*, 6(7), p.e22200. Available at:

<http://dx.plos.org/10.1371/journal.pone.0022200>.

- Friese, M.A., Schattling, B. & Fugger, L., 2014. Mechanisms of neurodegeneration and axonal dysfunction in multiple sclerosis. *Nature Publishing Group*, 10(10), pp.225–23837.
- Frischer, J.M. et al., 2009. The relation between inflammation and neurodegeneration in multiple sclerosis brains. *Brain : a journal of neurology*, 132(Pt 5), pp.1175–89. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19339255>.
- Frisullo, G. et al., 2006. pSTAT1, pSTAT3, and T-bet expression in peripheral blood mononuclear cells from relapsing-remitting multiple sclerosis patients correlates with disease activity. *Journal of Neuroscience Research*, 84(5), pp.1027–1036. Available at: <http://doi.wiley.com/10.1002/jnr.20995>.
- Frohman, E.M., Racke, M.K. & Raine, C.S., 2006. Multiple Sclerosis — The Plaque and Its Pathogenesis. *n engl j med*, 3549.
- Gandhi, K.S. et al., 2010. The multiple sclerosis whole blood mRNA transcriptome and genetic associations indicate dysregulation of specific T cell pathways in pathogenesis. *Human molecular genetics*, 19(11), pp.2134–43. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20190274>.
- Gauzzi, M.C. et al., 2002. Loss of type I IFN receptors and impaired IFN responsiveness during terminal maturation of monocyte-derived human dendritic cells. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 169(6), pp.3038–45.
- Gavasso, S. et al., 2014. Deficient phosphorylation of Stat1 in leukocytes identifies neutralizing antibodies in multiple sclerosis patients treated with interferon-beta. *PloS one*, 9(2), p.e88632. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24586361>.
- Gavasso, S. et al., 2012. Immunogenic effects of recombinant interferon-beta therapy disrupt the JAK/STAT pathway in primary immune cells from patients with multiple sclerosis. *Multiple sclerosis (Houndmills, Basingstoke, England)*, 18(8), pp.1116–24. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22287540>.
- Giovannoni, G. et al., 2014. Daclizumab high-yield process in relapsing-remitting multiple sclerosis (SELECTION): A multicentre, randomised, double-blind extension trial. *The Lancet Neurology*, 13(5), pp.472–481.
- Giovannoni, G. et al., 2015. Is it time to target no evident disease activity (NEDA) in multiple sclerosis? *Multiple Sclerosis and Related Disorders*, 4(4), pp.329–333. Available at: www.elsevier.com/locate/msard.
- Gold, R. et al., 2013. Daclizumab high-yield process in relapsing-remitting multiple sclerosis (SELECT): A randomised, double-blind, placebo-controlled trial. *The Lancet*, 381(9884), pp.2167–2175.
- Goodin, D.S. et al., 2012. Neutralizing antibodies to interferon beta-1b multiple sclerosis: a clinico-radiographic paradox in the BEYOND trial. *Mult Scler*, 18(2), pp.181–195.
- Govindappa, K. et al., 2015. Development of interferon beta-neutralising antibodies in multiple sclerosis - A systematic review and meta-analysis. *European Journal of Clinical Pharmacology*, 71(11), pp.1287–1298.
- Graber, J.J. et al., 2007. Cytokine changes during interferon-beta therapy in multiple

- sclerosis: correlations with interferon dose and MRI response. *Journal of neuroimmunology*, 185(1-2), pp.168–74. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17328965>.
- Graves, M.C. et al., 2014. Methylation differences at the HLA-DRB1 locus in CD4+ T-Cells are associated with multiple sclerosis. *Multiple sclerosis (Houndmills, Basingstoke, England)*, 20(8), pp.1033–41. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24336351>.
- Gronseth, G.S. & Ashman, E.J., 2000. Practice parameter: the usefulness of evoked potentials in identifying clinically silent lesions in patients with suspected multiple sclerosis (an evidence-based review): Report of the Quality Standards Subcommittee of the American Academy of Neurology. *Neurology*, 54(9), pp.1720–5. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10802774>.
- Haider, L. et al., 2014. Multiple sclerosis deep grey matter: the relation between demyelination, neurodegeneration, inflammation and iron. Available at: <http://dx.doi.org/10.1136/>.
- Haider, L. et al., 2011. Oxidative damage in multiple sclerosis lesions. *Brain*.
- Hald, A. et al., 2013. STAT1 expression and activation is increased in lesional psoriatic skin. *The British journal of dermatology*, 168(2), pp.302–10. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23013371>.
- Harari, D. et al., 2015. A robust type I interferon gene signature from blood RNA defines quantitative but not qualitative differences between three major IFN drugs in the treatment of multiple sclerosis. *Human Molecular Genetics*, 24(11), pp.3192–3205. Available at: <http://www.hmg.oxfordjournals.org/cgi/doi/10.1093/hmg/ddv071>.
- Hartung, H.P. et al., 2011. Interferon beta-1b-neutralizing antibodies 5 years after clinically isolated syndrome. *Neurology*, 77(9), pp.835–843.
- Hawkins, S.A. & McDonnell, G. V., 1999. Benign multiple sclerosis? Clinical course, long term follow up, and assessment of prognostic factors. *Journal of neurology, neurosurgery, and psychiatry*, 67(2), pp.148–52. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=1736487&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.
- He, C. et al., 2016. SOCS1 Mimetic Peptide Suppresses Chronic Intraocular Inflammatory Disease (Uveitis). *Mediators of inflammation*, 2016, p.2939370. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27703302>.
- Hecker, M. et al., 2013. Interferon-beta therapy in multiple sclerosis: The short-term and long-term effects on the patients' individual gene expression in peripheral blood. *Molecular Neurobiology*.
- Hedström, A., Olsson, T. & Alfredsson, L., 2015. Smoking is a major preventable risk factor for multiple sclerosis. *Multiple Sclerosis Journal*, 61(8), pp.1122–1124.
- Hegen, H. et al., 2014. Early detection of neutralizing antibodies to interferon-beta in multiple sclerosis patients: binding antibodies predict neutralizing antibody development. *Multiple sclerosis (Houndmills, Basingstoke, England)*, 20(5), pp.577–87.
- Hegen, H. et al., 2014. High-dose intravenous interferon-beta in multiple sclerosis patients with high-titer neutralizing antibodies (HINABS II) - A pilot study. *Multiple*

- Sclerosis and Related Disorders*, 3(2), pp.220–226.
- Hegen, H. et al., 2012. Persistency of neutralizing antibodies depends on titer and interferon-beta preparation. *Multiple sclerosis (Houndmills, Basingstoke, England)*, 18(5), pp.610–5.
- Hemmer, B., Kerschensteiner, M. & Korn, T., 2015. Role of the innate and adaptive immune responses in the course of multiple sclerosis. *The Lancet Neurology*, 14(4), pp.406–419. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25792099>.
- Henderson, A.P.D. et al., 2009. Multiple sclerosis: Distribution of inflammatory cells in newly forming lesions. *Annals of Neurology*.
- Hilpert, J. et al., 2008. Biological response genes after single dose administration of interferon beta-1b to healthy male volunteers. *Journal of neuroimmunology*, 199(1-2), pp.115–25.
- Hoffmann, S. et al., 2008. HLA-DRBI*0401 and HLA-DRBI*0408 are strongly associated with the development of antibodies against interferon-beta therapy in multiple sclerosis. *The American Journal of Human Genetics*, 83(2), pp.219–227.
- International Multiple Sclerosis Genetics Consortium., 2016. NR1H3 p.Arg415Gln Is Not Associated to Multiple Sclerosis Risk. *Neuron*, 92(2), pp.333–335. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27764667>.
- Isaacs, A. & Lindenmann, J., 1957. Virus interference. I. The interferon. *Proceedings of the Royal Society of London. Series B, Biological sciences*, 147(927), pp.258–67. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/13465720>.
- Ivashkiv, L.B. & Donlin, L.T., 2013. Regulation of type I interferon responses. *Nature Reviews Immunology*, 14(1), pp.36–49. Available at: <http://www.nature.com/doi/10.1038/nri3581>.
- Jacobs, L.D. et al., 1996. Intramuscular interferon beta-1a for disease progression in relapsing multiple sclerosis. The Multiple Sclerosis Collaborative Research Group (MSCRG). *Annals of neurology*, 39(3), pp.285–294.
- Jacobs, L.D. et al., 2000. Intramuscular interferon beta-1a therapy initiated during a first demyelinating event in multiple sclerosis. CHAMPS Study Group. *The New England journal of medicine*, 343(13), pp.898–904. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11006365>.
- Jacobsen, M. et al., 2002. Oligoclonal expansion of memory CD8+ T cells in cerebrospinal fluid from multiple sclerosis patients. *Brain : a journal of neurology*, 125(Pt 3), pp.538–50. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11872611>.
- Jersild, C., Svejgaard, A. & Fog, T., 1972. HL-A antigens and multiple sclerosis. *Lancet (London, England)*, 1(7762), pp.1240–1. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/4113225>.
- Kamm, C.P., Uitdehaag, B.M. & Polman, C.H., 2014. Multiple sclerosis: Current knowledge and future outlook. *European Neurology*.
- Kappos, L. et al., 2006. Long-term subcutaneous interferon beta-1a therapy in patients with relapsing-remitting MS. *Neurology*, 67(6), pp.944–53. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17000959>.
- Kappos, L. et al., 2005. Neutralizing antibodies and efficacy of interferon beta-1a: a 4-

- year controlled study. *Neurology*, 65(1), pp.40–47.
- Kappos, L. et al., 2006. Treatment with interferon beta-1b delays conversion to clinically definite and McDonald MS in patients with clinically isolated syndromes. *Neurology*, 67(7), pp.1242–9. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16914693>.
- Kasper, L.H. & Reder, A.T., 2014. Immunomodulatory activity of interferon-beta. *Annals of Clinical and Translational Neurology*, 1(8), pp.622–631. Available at: <http://doi.wiley.com/10.1002/acn3.84>.
- Kasperkovitz, P. V, 2004. Activation of the STAT1 pathway in rheumatoid arthritis. *Annals of the Rheumatic Diseases*, 63(3), pp.233–239. Available at: <http://ard.bmj.com/cgi/doi/10.1136/ard.2003.013276>.
- Khan, O. a & Dhib-Jalbut, S.S., 1998. *Neutralizing antibodies to interferon beta-1a and interferon beta-1b in MS patients are cross-reactive.*,
- Kieseier, B.C. et al., 2015. Peginterferon beta-1a in multiple sclerosis: 2-year results from ADVANCE. *Multiple sclerosis (Houndmills, Basingstoke, England)*, 21(8), pp.1025–35. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25432952>.
- Kieseier, B.C., 2011. The mechanism of action of interferon- β in relapsing multiple sclerosis. *CNS drugs*, 25(6), pp.491–502. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21649449>.
- Kivisäkk, P. et al., 2003. Human cerebrospinal fluid central memory CD4+ T cells: evidence for trafficking through choroid plexus and meninges via P-selectin. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 100(14), pp.8389–94. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12829791>.
- Kivisäkk, P. et al., 2000. Neutralizing and binding anti-interferon-beta (IFN-beta) antibodies. A comparison between IFN-beta-1a and IFN-beta-1b treatment in multiple sclerosis. *European journal of neurology: the official journal of the European Federation of Neurological Societies*, 7(1), pp.27–34.
- Koch-Henriksen, N. & Sørensen, P.S., 2010. The changing demographic pattern of multiple sclerosis epidemiology. *The Lancet Neurology*.
- Kurtzke, J.F., 1983. Rating neurologic impairment in multiple sclerosis: an expanded disability status scale (EDSS). *Neurology*, 33(11), pp.1444–52. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6685237>.
- Kutzelnigg, A. et al., 2005. Cortical demyelination and diffuse white matter injury in multiple sclerosis. *Brain: a journal of neurology*, 128(Pt 11), pp.2705–12. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16230320>.
- Langer-Gould, A. et al., 2013. Childhood obesity and risk of pediatric multiple sclerosis and clinically isolated syndrome. *Neurology*, 80(6), pp.548–52. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23365063>.
- Lassmann, H., 2013. Pathology and disease mechanisms in different stages of multiple sclerosis. *Journal of the Neurological Sciences*.
- Lassmann, H., 2004. Recent neuropathological findings in MS--implications for diagnosis and therapy. *Journal of Neurology*, 251(Suppl 4), p.IV/2–V/5.
- Levin, D. et al., 2014. Multifaceted activities of type I interferon are revealed by a

- receptor antagonist. *Science signaling*, 7(327), p.ra50. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24866020>.
- Levin, D., Harari, D. & Schreiber, G., 2011. Stochastic receptor expression determines cell fate upon interferon treatment. *Molecular and cellular biology*, 31(16), pp.3252–66. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3147786&tool=pmcentrez&rendertype=abstract><http://mcb.asm.org/content/31/16/3252.short>.
- Liu, J. et al., 2008. Ligand-independent pathway that controls stability of interferon alpha receptor. *Biochemical and biophysical research communications*, 367(2), pp.388–93.
- Lopez de Lapuente, A. et al., 2015. Cell-specific effects in different immune subsets associated with SOCS1 genotypes in multiple sclerosis. *Mult Scler*.
- Lublin, F.D., 2005. Clinical features and diagnosis of multiple sclerosis. *Neurologic clinics*, 23(1), pp.1–15, v. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15661085>.
- Lublin, F.D. et al., 2014. Defining the clinical course of multiple sclerosis: The 2013 revisions. *Neurology*, 83(3), pp.278–286.
- Lublin, F.D. & Reingold, S.C., 1996. Defining the clinical course of multiple sclerosis: results of an international survey. National Multiple Sclerosis Society (USA) Advisory Committee on Clinical Trials of New Agents in Multiple Sclerosis. *Neurology*, 46(4), pp.907–11. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8780061>.
- Lucchinetti, C.F. et al., 1996. Distinct Patterns of Multiple Sclerosis Pathology Indicates Heterogeneity in Pathogenesis. *Brain Pathology*, 6, pp.259–274.
- MacMicking, J.D., 2012. Interferon-inducible effector mechanisms in cell-autonomous immunity. *Nature reviews. Immunology*, 12(5), pp.367–82. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22531325>.
- Magliozzi, R. et al., 2007. Meningeal B-cell follicles in secondary progressive multiple sclerosis associate with early onset of disease and severe cortical pathology. *Brain: a journal of neurology*, 130(Pt 4), pp.1089–104. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17438020>.
- Magyari, M., 2016. Gender differences in multiple sclerosis epidemiology and treatment response. *Danish medical journal*, 63(3). Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26931196>.
- Malhotra, S. et al., 2015. NLRP3 inflammasome is associated with the response to IFN- β in patients with multiple sclerosis. *Brain: a journal of neurology*, 138(Pt 3), pp.644–52.
- Malhotra, S. et al., 2011. Search for specific biomarkers of IFN β bioactivity in patients with multiple sclerosis. *PloS one*, 6(8), p.e23634.
- Marijanovic, Z. et al., 2007. Comparable potency of IFN α 2 and IFN β on immediate JAK/STAT activation but differential down-regulation of IFNAR2. *Biochem. J*, 407, pp.141–151.
- Marziniak, M. & Meuth, S., 2014. Current perspectives on interferon Beta-1b for the treatment of multiple sclerosis. *Advances in therapy*, 31(9), pp.915–31. Available

at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25182864>.

- Matas, E. et al., 2016. Absence of MxA induction is related to a poor clinical response to interferon beta treatment in multiple sclerosis patients. *Journal of Neurology*, 263(4), pp.722–729.
- Matas, E. et al., 2014. Baseline MxA mRNA expression predicts interferon beta response in multiple sclerosis patients. *PLoS ONE*, 9(11).
- McDonald, W.I. et al., 2001. Recommended diagnostic criteria for multiple sclerosis: Guidelines from the International Panel on the Diagnosis of Multiple Sclerosis. *Annals of Neurology*, 50(1), pp.121–127.
- Miller, D.H., Barkhof, F. & Nauta, J.J., 1993. Gadolinium enhancement increases the sensitivity of MRI in detecting disease activity in multiple sclerosis. *Brain: a journal of neurology*, 116 (Pt 5, pp.1077–94. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8221048>.
- Miron, V.E. et al., 2013. M2 microglia and macrophages drive oligodendrocyte differentiation during CNS remyelination. *Nature neuroscience*, 16(9), pp.1211–8. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23872599>.
- Mohammad, M.G. et al., 2014. Immune cell trafficking from the brain maintains CNS immune tolerance. *The Journal of clinical investigation*, 124(3), pp.1228–41. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24569378>.
- Morey, J.S., Ryan, J.C. & Van Dolah, F.M., 2006. Microarray validation: factors influencing correlation between oligonucleotide microarrays and real-time PCR. *Biological procedures online*, 8(1), pp.175–93.
- Munger, K.L. et al., 2013. Childhood body mass index and multiple sclerosis risk: a long-term cohort study. *Multiple sclerosis (Houndmills, Basingstoke, England)*, 19(10), pp.1323–9. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23549432>.
- Myhr, K.M. et al., 2000. Neutralizing antibodies to interferon (IFN) alpha-2a and IFN beta-1a or IFN beta-1b in MS are not cross-reactive. *Neurology*, 55(10), pp.1569–72. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11094118>.
- Namaka, M. et al., 2006. The clinical importance of neutralizing antibodies in relapsing-remitting multiple sclerosis. *Current Medical Research and Opinion*, 22(2), pp.223–239.
- Nickles, D. et al., 2013. Blood RNA profiling in a large cohort of multiple sclerosis patients and healthy controls. *Human molecular genetics*, 22(20), pp.4194–205. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23748426>.
- Noronha, A., 2007. Neutralizing antibodies to interferon. *Neurology*, 68(24 SUPPL. 4).
- O'Shea, J.J. et al., 2015. The JAK-STAT Pathway: Impact on Human Disease and Therapeutic Intervention. *Annu Rev Med*, 66(1), pp.311–328.
- O'Shea, J.J. & Plenge, R., 2013. JAKs and STATs in Immunoregulation and Immune-Mediated Disease. *Immunity*, 36(4), pp.542–550.
- Obermeier, B. et al., 2008. Matching of oligoclonal immunoglobulin transcriptomes and proteomes of cerebrospinal fluid in multiple sclerosis. *Nature medicine*, 14(6), pp.688–693. Available at: <http://www.nature.com/doi/10.1038/nm1714>.
- Odoardi, F. et al., 2012. T cells become licensed in the lung to enter the central

- nervous system. *Nature*, 488(7413), pp.675–679. Available at: <http://www.nature.com/doi/10.1038/nature11337>.
- Palavra, F. et al., 2016. Obesity and brain inflammation: A focus on multiple sclerosis. *Obesity Reviews*.
- Paolicelli, D. et al., 2016. The role of neutralizing antibodies to interferon- γ as a biomarker of persistent MRI activity in multiple sclerosis: a 7-year observational study. *European Journal of Clinical Pharmacology*, 72(8), pp.1025–1029.
- Parnell, G.P. et al., 2014. Ribosomal protein S6 mRNA is a biomarker upregulated in multiple sclerosis, downregulated by interferon treatment, and affected by season. *Multiple Sclerosis*, 20(6), pp.675–85.
- Pender, M.P., 2011. The essential role of Epstein-Barr virus in the pathogenesis of multiple sclerosis. *The Neuroscientist: a review journal bringing neurobiology, neurology and psychiatry*, 17(4), pp.351–67. Available at: <http://www>.
- Pertsovskaya, I. et al., 2013. Transient oscillatory dynamics of interferon beta signaling in macrophages. *BMC systems biology*, 7, p.59. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23837526>.
- Petkau, A.J. et al., 2004. Longitudinal analyses of the effects of neutralizing antibodies on interferon beta-1b in relapsing-remitting multiple sclerosis. *Multiple Sclerosis*, 10(2), pp.126–138. Available at: <http://msj.sagepub.com/cgi/doi/10.1191/1352458504ms1004oa>.
- Platanias, L.C., 2005. Mechanisms of type-I- and type-II-interferon-mediated signalling. *Nature Reviews Immunology*, 5(5), pp.375–386.
- Polman, C.H. et al., 2005. Diagnostic criteria for multiple sclerosis: 2005 Revisions to the “McDonald Criteria.” *Annals of Neurology*, 58(6), pp.840–846.
- Polman, C.H. et al., 2011. Diagnostic criteria for multiple sclerosis: 2010 Revisions to the McDonald criteria. *Annals of Neurology*, 69(2), pp.292–302.
- Polman, C.H. et al., 2010. Recommendations for clinical use of data on neutralising antibodies to interferon-beta therapy in multiple sclerosis. *The Lancet Neurology*.
- Poser, C.M. et al., 1983. New diagnostic criteria for multiple sclerosis: guidelines for research protocols. *Annals of neurology*, 13(3), pp.227–31. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6847134>.
- PRISMS-4, 2001. PRISMS-4: Long-term efficacy of interferon-beta-1a in relapsing MS. *Neurology*, 56(12), pp.1628–1636.
- Prodinger, C. et al., 2011. CD11c-expressing cells reside in the juxtavascular parenchyma and extend processes into the glia limitans of the mouse nervous system. *Acta neuropathologica*, 121(4), pp.445–58. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21076838>.
- Raj, A. & van Oudenaarden, A., 2008. Nature, Nurture, or Chance: Stochastic Gene Expression and Its Consequences. *Cell*, 135(2), pp.216–226.
- Ramanujam, R. et al., 2015. Effect of Smoking Cessation on Multiple Sclerosis Prognosis. *JAMA Neurology*, 72(10), p.1117.
- Ramírez-Vélez, G. et al., 2012. Constitutive phosphorylation of interferon receptor A-associated signaling proteins in systemic lupus erythematosus. *PloS one*, 7(7),

- p.e41414. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22859983>.
- Rani, M.R.S. et al., 2007. Novel interferon-beta-induced gene expression in peripheral blood cells. *Journal of leukocyte biology*, 82(5), pp.1353–60.
- Ratzer, R. et al., 2013. Gene expression analysis of relapsing-remitting, primary progressive and secondary progressive multiple sclerosis. *Multiple sclerosis (Houndmills, Basingstoke, England)*, 19(14), pp.1841–8.
- Riedl, S.J. & Salvesen, G.S., 2007. The apoptosome: signalling platform of cell death. *Nature reviews. Molecular cell biology*, 8(5), pp.405–413.
- Riise, T. et al., 1992. Early prognostic factors for disability in multiple sclerosis, a European multicenter study. *Acta neurologica Scandinavica*, 85(3), pp.212–8. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1575007>.
- Rio, J. et al., 2009. Measures in the first year of therapy predict the response to interferon in MS. *Multiple Sclerosis*, 15(7), pp.848–853. Available at: <http://msj.sagepub.com>.
- Río, J. et al., 2006. Defining the response to interferon-beta in relapsing-remitting multiple sclerosis patients. *Annals of neurology*, 59(2), pp.344–52. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16437558>.
- Río, J. & Ruiz-Peña, J.L., 2016. Short-term suboptimal response criteria for predicting long-term non-response to first-line disease modifying therapies in multiple sclerosis: A systematic review and meta-analysis. *Journal of the neurological sciences*, 361, pp.158–67. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26810535>.
- Rivett, A.J. & Hearn, A.R., 2004. Proteasome function in antigen presentation: immunoproteasome complexes, Peptide production, and interactions with viral proteins. *Current protein & peptide science*, 5(3), pp.153–161.
- Romeo, M. et al., 2013. Clinical and MRI predictors of response to interferon-beta and glatiramer acetate in relapsing-remitting multiple sclerosis patients. *European Journal of Neurology*, 20(7), pp.1060–1067.
- Rudick, R.A. et al., 2011. Excessive biologic response to IFN β is associated with poor treatment response in patients with multiple sclerosis. *PloS one*, 6(5), p.e19262. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21602934>.
- Rusinova, I. et al., 2013. Interferome v2.0: an updated database of annotated interferon-regulated genes. *Nucleic acids research*, 41(Database issue), pp.D1040–6. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23203888>.
- Samarajiwa, S.A. et al., 2009. INTERFEROME: the database of interferon regulated genes. *Nucleic acids research*, 37(Database issue), pp.D852–7. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18996892>.
- Sandler, N.G. et al., 2014. Type I interferon responses in rhesus macaques prevent SIV infection and slow disease progression. *Nature*, 511(7511), pp.601–605.
- Satoh, J. et al., 2006. T cell gene expression profiling identifies distinct subgroups of Japanese multiple sclerosis patients. *Journal of neuroimmunology*, 174(1-2), pp.108–18.
- Sawcer, S., Franklin, R.J.M. & Ban, M., 2014. Multiple sclerosis genetics. *The Lancet Neurology*, 13(7), pp.700–709. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/S1474->

4422(14)70041-9.

- Schellekens, H., 2005. Factors influencing the immunogenicity of therapeutic proteins. *Nephrology Dialysis Transplantation*, 20(SUPPL. 6), pp.3–9.
- Schreiber, G. & Piehler, J., 2015. The molecular basis for functional plasticity in type I interferon signaling. *Trends in immunology*, 36(3), pp.139–49. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.it.2015.01.002>.
- Schwartz, D.M. et al., 2015. Type I/II cytokines, JAKs, and new strategies for treating autoimmune diseases. *Nature Reviews Rheumatology*, 12(1), pp.25–36. Available at: <http://www.nature.com/doi/10.1038/nrrheum.2015.167>.
- Sellebjerg, F. et al., 2009. Identification of new sensitive biomarkers for the in vivo response to interferon-beta treatment in multiple sclerosis using DNA-array evaluation. *European journal of neurology*, 16(12), pp.1291–8.
- Sharma, R. et al., 2010. Inflammation induced by innate immunity in the central nervous system leads to primary astrocyte dysfunction followed by demyelination. *Acta Neuropathologica*, 120(2), pp.223–236.
- Singh, M.K. et al., 2007. Gene expression changes in peripheral blood mononuclear cells from multiple sclerosis patients undergoing ??-interferon therapy. *Journal of the Neurological Sciences*, 258(1-2), pp.52–59.
- Sorensen, P.S. et al., 2003. Clinical importance of neutralising antibodies against interferon beta in patients with relapsing-remitting multiple sclerosis. *Lancet*, 362(9391), pp.1184–1191.
- Sormani, M.P. et al., 2016. Assessing response to interferon- β in a multicenter dataset of patients with MS. *Neurology*, 87(2), pp.134–40. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27306626>.
- Sormani, M.P. & De Stefano, N., 2013. Defining and scoring response to IFN- β in multiple sclerosis. *Nature reviews. Neurology*, 9(9), pp.504–12. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23897407>.
- Stark, G.R. & Darnell, J.E., 2012. The JAK-STAT pathway at twenty. *Immunity*, 36(4), pp.503–14. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.immuni.2012.03.013>.
- Stewart, N. et al., 2012. Interferon- β and serum 25-hydroxyvitamin D interact to modulate relapse risk in MS. *Neurology*, 79(3), pp.254–60. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22700816>.
- Sturn, A., Quackenbush, J. & Trajanoski, Z., 2002. Genesis: cluster analysis of microarray data. *Bioinformatics (Oxford, England)*, 18(1), pp.207–8. Available at: <http://genome.tugraz.at>.
- Stürzebecher, S. et al., 2003. Expression profiling identifies responder and non-responder phenotypes to interferon-beta in multiple sclerosis. *Brain : a journal of neurology*, 126(Pt 6), pp.1419–1429. Available at: <http://www.brain.oupjournals.org/cgi/doi/10.1093/brain/awg147>
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12764062>.
- Stys, P.K. et al., 2012. Will the real multiple sclerosis please stand up? *Nature Reviews Neuroscience*, 13(7), pp.507–514.
- Suresh Kumar, K.G. et al., 2007. Site-specific ubiquitination exposes a linear motif to promote interferon- α receptor endocytosis. *Journal of Cell Biology*.

- Suresh Kumar, K.G., Krolewski, J.J. & Fuchs, S.Y., 2004. Phosphorylation and specific ubiquitin acceptor sites are required for ubiquitination and degradation of the IFNAR1 subunit of type I interferon receptor. *Journal of Biological Chemistry*, 279(45), pp.46614–46620.
- Thach, D.C. et al., 2003. Assessment of two methods for handling blood in collection tubes with RNA stabilizing agent for surveillance of gene expression profiles with high density microarrays. *Journal of Immunological Methods*, 283(1-2), pp.269–279.
- Trapp, B.D. et al., 1998. Axonal transection in the lesions of multiple sclerosis. *The New England journal of medicine*, 338(5), pp.278–85. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9445407>.
- Versini, M. et al., 2015. Unraveling the Hygiene Hypothesis of helminthes and autoimmunity: origins, pathophysiology, and clinical applications. *BMC medicine*, 13, p.81. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=4396177&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.
- Villar, L.M. et al., 2002. Intrathecal IgM synthesis predicts the onset of new relapses and a worse disease course in MS. *Neurology*, 59(4), pp.555–9. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12196648>.
- Villarino, A. V. et al., 2015. Mechanisms of Jak/STAT signaling in immunity and disease. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 194(1), pp.21–7. Available at: <http://www.jimmunol.org/lookup/doi/10.4049/jimmunol.1401867>.
- Wandinger, K.P. et al., 2001. Complex immunomodulatory effects of interferon-beta in multiple sclerosis include the upregulation of T helper 1-associated marker genes. *Annals of neurology*, 50(3), pp.349–57.
- Wandinger, K.P. et al., 1998. Production of endogenous interferon-alpha and beta in patients with multiple sclerosis. *Journal of neurology, neurosurgery, and psychiatry*, 64(2), pp.277–8. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9489550>.
- Wang, Z. et al., 2016. Nuclear Receptor NR1H3 in Familial Multiple Sclerosis. *Neuron*, 90(5), pp.948–954. Available at: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S089662731630126X>.
- Waubant, E. et al., 2003. Clinical characteristics of responders to interferon therapy for relapsing MS. *Neurology*, 61, pp.184–189.
- Weber, F. et al., 2012. Single-nucleotide polymorphisms in HLA- and non-HLA genes associated with the development of antibodies to interferon- β therapy in multiple sclerosis patients. *The Pharmacogenomics Journal*, 12(3), pp.238–245.
- de Weerd, N. a et al., 2013. Structural basis of a unique interferon-[beta] signaling axis mediated via the receptor IFNAR1. *Nat Immunol*, 14(9), pp.901–907.
- Weinstock-Guttman, B. et al., 2003. Genomic effects of IFN-beta in multiple sclerosis patients. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 171(5), pp.2694–2702.
- Weinstock-Guttman, B. et al., 2008. Genomic effects of once-weekly, intramuscular interferon- β 1a treatment after the first dose and on chronic dosing: Relationships to 5-year clinical outcomes in multiple sclerosis patients. *Journal of Neuroimmunology*, 205(1-2), pp.113–125.

- Weinstock-Guttman, B. et al., 1995. The interferons: biological effects, mechanisms of action, and use in multiple sclerosis. *Annals of neurology*, 37(1), pp.7–15. Available at: www.cellsignal.com.
- Wencel-Warot, A. et al., 2016. The cross-reactivity of binding antibodies with different interferon beta formulations used as disease-modifying drugs in multiple sclerosis patients. *Medicine*, 95(45), p.e5337. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27828855>.
- WHO Expert Committee on Biological Standardisation, 1985. WHO Expert Committee on Biological Standardization. Thirty-fifth report. Technical Report Series, vol. 725. *World Health Organization technical report series*, 858.
- Witte, M.E. et al., 2013. Reduced expression of PGC-1 α partly underlies mitochondrial changes and correlates with neuronal loss in multiple sclerosis cortex. *Acta neuropathologica*, 125(2), pp.231–43. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23073717>.
- Xia, Z. et al., 2016. Genes and Environment in Multiple Sclerosis project: A platform to investigate multiple sclerosis risk. *Annals of Neurology*, 79(2), pp.178–189.
- Yamaguchi, K.D. et al., 2008. IFN-beta-regulated genes show abnormal expression in therapy-naïve relapsing-remitting MS mononuclear cells: gene expression analysis employing all reported protein-protein interactions. *Journal of neuroimmunology*, 195(1-2), pp.116–20. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18279974>.
- Yamasaki, R. et al., 2014. Differential roles of microglia and monocytes in the inflamed central nervous system. *The Journal of experimental medicine*, 211(8), pp.1533–49. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=4113947&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.
- Zare, N. et al., 2013. Antibodies to interferon beta in patients with multiple sclerosis receiving CinnoVex, rebif, and betaferon. *Journal of Korean Medical Science*, 28(12), pp.1801–1806.
- Ziemssen, T. et al., 2015. Optimizing therapy early in multiple sclerosis: An evidence-based view. *Multiple sclerosis and related disorders*, 4(5), pp.460–9. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.msard.2015.07.007>.
- Zula, J.A. et al., 2011. The role of cell type-specific responses in IFN- β therapy of multiple sclerosis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 108(49), pp.19689–94. Available at: <http://www.pnas.org/content/108/49/19689>.
- Zuvich, R.L. et al., 2009. Genetics and pathogenesis of multiple sclerosis. *Seminars in immunology*, 21(6), pp.328–33. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19775910>.