


UNIVERSITAT DE VIC
UNIVERSITAT CENTRAL
DE CATALUNYA



 Universitat de Vic
Escola Politècnica
Superior

Treball Final de Grau

Anàlisi dels immunofenotips dels NKR de les cèl·lules Natural Killer en pacients amb Esclerosi Múltiple (MS).

Meritxell Pintó Juncà

Grau en Biotecnologia

Tutor: Josep Bau i Macià

Avalador: Jose Enrique Martínez- Rodríguez.

Vic, Juny 2014

Índex

Resum Català.....	3
Resum Anglès.....	4
Introducció.....	5
Objectius.....	6
Hipòtesi.....	6
Receptors d'estudi.....	7
Variables clíniques.....	8
Tipus MS.....	8
Tractaments.....	9
Estudi.....	11
Materials i mètodes.....	11
Pacients.....	11
Extracció PBMC.....	12
Cistometria de flux.....	13
Recollida de dades.....	16
Anàlisis estadístic.....	16
Resultats i discussió.....	18
Anàlisis descriptiu.....	18
Resultats Hipòtesi.....	21
Qüestió 1 (Acció CMV).....	23
Qüestió 2 (Acció tractament).....	26
Qüestió 3 (Acció CMV/Tractament).....	27
Conclusions.....	32
Agraïments.....	34
Bibliografia.....	35

Títol: Anàlisi dels immunofenotips dels NKR de les cèl·lules Natural Killer en pacients amb Esclerosi Múltiple (MS).

Paraules clau: Esclerosi Múltiple (MS), NK, CD56bright, ILT2, NKG2A.

Autora: Meritxell Pintó Juncà **Grau en :** Biotecnologia.

Tutors: Dr. Jose Enrique Martínez-Rodríguez(IMIM) Dr. Josep Bau (UVic) **Data:** Juny de 2014

La MS és una malaltia autoimmunitària les causes de la qual són encara desconegudes. Entre altres efectes, els pacients d'aquesta malaltia veuen reduït el nombre de limfòcits, així com el percentatge d'aquests ocupats pel compartiment NK.

Tot i que molts estudis es centren en investigar aquesta malaltia, el motiu d'aquesta reducció, continua essent un misteri.

En el present estudi s'ha plantejat una hipòtesi, la qual apunta a què aquesta reducció, pugui venir causada pel fet que les cèl·lules NK s'hagin vist eliminades de la circulació; a la qual cosa s'esperaria trobar una població de NK més joves per aquells pacients que tinguessin en un percentatge menor de NK, ja que aquesta pèrdua s'hauria hagut de compensar amb cèl·lules NK de nova formació.

Per tal de determinar l'antiguitat de les cèl·lules NK s'analitzen els receptors ILT2 (present en cèl·lules més antigues, ja que s'acumula amb el temps), NKG2A (molt present en cèl·lules NK joves), i en la subpoblació CD56bright, (estat de maduració precoç, ja que aquestes amb el temps esdevindran CD56dim).

Després de molts anàlisis, s'ha pogut comprovar com la presència de CMV influeix en els receptors de les cèl·lules NK, igual que també influeix la presència de tractament amb immunomoduladors.

Però a part d'aquestes influències les quals ja s'havien descrit en altres estudis previs, s'ha pogut trobar que aquells pacients CMV- sense tractament, presenten una correlació significativament negativa entre el percentatge de les cèl·lules CD56bright respecte al total del compartiment NK, la qual al no estar sota la influència de CMV ni de tractament, està causada per algun factor estrictament lligat a la malaltia, fet del qual no se'n havien presentat evidències significatives fins ara.

Tot i que aquests resultats, a la vegada de ser molt interessants, recolzen la hipòtesi base, no s'han trobat resultats significatius per a NKG2A i els resultats per a ILT2 són significatius però no concloents. Igualment però, aquests resultats són molt prometedors, i pensem que seria interessant continuar treballant en aquestes troballes.

Abstract

Title: Analysis of immunophenotype of NKR of natural killer cells in patients with multiple sclerosis (MS).

Keywords: Multiple Sclerosis (MS), NK, CD56bright, ILT2, NKG2A.

Author: Meritxell Pintó Juncà **Career:** Biotecnology

Tutors: Dr. Jose Enrique Martínez-Rodríguez(IMIM) DR.Josep Bau (UVic) **Date:** June 2014

MS is an autoimmune disease which causes are still unknown.

One of the effects of this disease is a reduced number of lymphocytes and the percentage of those occupied by the NK compartment. Although many studies focus on investigate this disease, the reason for this reduction remains a mystery.

In this study a hypothesis has been proposed. It suggests that this reduction might be caused by the fact that NK cells have been removed from circulation; this means that it is expected to find a younger population of NK cells for patients who had a lower percentage of NK, as this loss should have been compensated with NK cells of new formation.

To determine the age of the NK cells, the receptors that has been used are: ILT2 (present in older cells, as it accumulates over time), NKG2A (very present in young NK cells) and CD56bright in the subpopulation (early maturing state, as these will become CD56dim).

After many tests, it has been shown that the presence of CMV affects receptors of NK cells, as also influences the presence of treatment with immunomodulators.

But in addition to these influences, which had already been described in previous studies, it has been found that CMVnegative untreated patients have a significantly negative correlation between the percentage of CD56bright cells in relation to the total NK compartment. Since they are not under the influence of CMV or treatment, this correlation might be caused by some factor strictly linked to the disease, fact for which there was not presented any conclusive evidence to date.

Although these results, at the same time are very interesting and support the basic hypothesis of this study, no significant results for NKG2A had been found, and significant but inconclusive results for ILT2 receptors. This are, therefore, very promising results and we think it would be worth to continue investigating these initial findings.

Introducció

L'esclerosi múltiple (MS) és una malaltia inflamatòria autoimmunitària la qual es creu que pot venir provocada com a conseqüència de la interacció entre la susceptibilitat genètica (Stephen Sawcer, 2014) i alguns factors ambientals (Aura Muntasell, 2013), tot i que encara no se'n coneixen del cert les causes.

Diversos estudis han suggerit que pot existir una associació amb el virus d'Epstein - Barr (EBV) el qual està present en un 99% dels casos, i sembla tenir un paper patogènic en la MS (E. Waubant, 2011), a més els estudis seroepidemiològics mostren nivells elevats d'anticòs contra EBV en els pacients amb MS.

També sembla existir una relació entre la malaltia i el citomegalovirus, (CMV) el qual es creu que pot tenir algun tipus d'efecte sobre el sistema immunitari (Mazen Almejadi, 2014; E. Sundqvist, 2013), tot i que no és present en tots els casos de la malaltia, sinó que més aviat l'estaria modulant o influint sobre la susceptibilitat a desenvolupar-la (E. Waubant, 2011; J.E. Martínez-Rodríguez, 2013).

La majoria dels estudis dedicats a estudiar aquesta malaltia, s'havien centrat durant molt de temps en els Limfòcits-T i Limfòcits-B, però a mesura que es va anar coneixent més aquesta patologia, es va començar a pensar que les cèl·lules NK, les quals també anaven cobrant reconeixement en el món de la immunologia, podien estar jugant un paper clau en aquesta malaltia (Aurelie Poli, 2008; J.E. Martínez-Rodríguez, 2010; J.E. Martínez-Rodríguez, 2011).

Les cèl·lules NK són un tipus cel·lular que formen part del sistema immunitari innat, les quals presenten una forta funció citotòxica. Són les encarregades de la primera línia de defensa del cos contra organismes externs, cèl·lules tumorals o cèl·lules infectades per virus.

S'ha reportat que la presència de noves lesions detectades a la mielina per ressonància magnètica en pacients de MS, són sovint precedides per una reducció de la presència i l'activitat funcional d'aquestes cèl·lules, així com també es creu, a partir d'estudis realitzats sobre el model animal d'aquesta malaltia, que les cèl·lules

NK poden estar regulant la funció d'alguns Limfòcits-T dependents d'antigen (Kazuya Takahashi, 2004)

Les funcions de les cèl·lules NK són controlades per un equilibri entre els senyals positius i negatius rebuts des dels seus múltiples receptors de membrana, uns d'activadors i uns altres d'inhibidors.

El conjunt de receptors de les cèl·lules NK anomenat NKR poden ser molt variats, canviant entre diferents subtipus de NK, tot i que la majoria de NKR s'expressen també per algunes subpoblacions de limfòcits-T.

Es creu que el CMV pot influir directament en el tipus i quantitat de NKR expressats per les NK (Aura Muntasell, 2013)

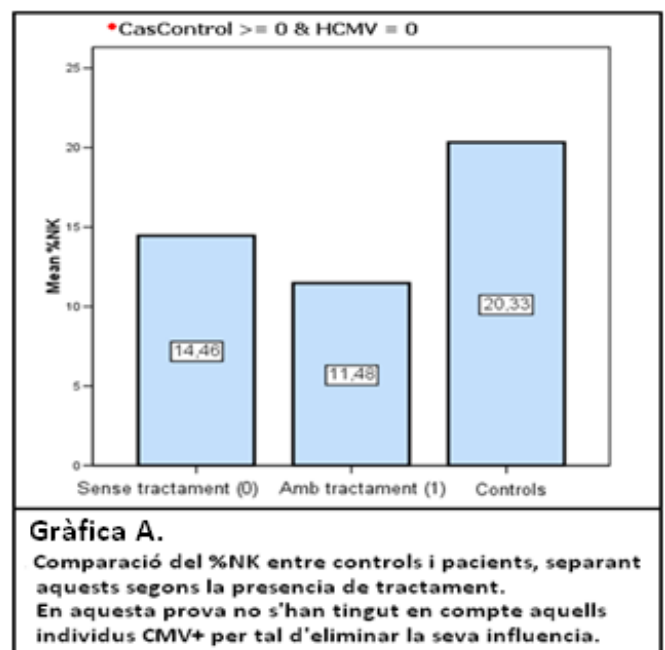
Objectius.

Dins del marc de l'estudi "Clinical-immunological implications of chronic cytomegalovirus infection in MS", a part de les tasques de col·laboració en l'estudi que estan realitzant al meu grup d'acollida, he tingut l'oportunitat d'elaborar un petit estudi científic complet, partint del plantejament d'una hipòtesi, recollint les dades i extraient-ne uns resultats.

- **Hipòtesi**

Està descrit a la literatura el fet que els pacients de MS tenen una disminució en el nombre de NK. Aquesta afectació està associada a la malaltia en si, així com al tractament amb immunoreguladors (Gurman Kaur, 2013), fets que han estat també comprovats en el present estudi (Gràfica A.)

Però així com se sap que les NK es veuen afectades per la malaltia, disminuint en el seu nombre, fins al moment no es té idea de quin pot ser el motiu que causa aquesta disminució



Partint de la informació existent, podríem atribuir aquesta reducció a dos possibles escenaris: o bé la síntesi de les NK s'ha vist limitada per algun motiu, o bé han estat eliminades.

Per a intentar profunditzar una mica més en aquest fet, la hipòtesi que s'ha plantejat ha estat:

Disminueix el nombre d'NK en sang perifèrica, perquè han estat eliminades de la circulació?

Si aquesta hipòtesi fos certa, esperaríem veure que, aquells pacients amb un menor percentatge de cèl·lules NK, tindrien a la vegada una població d'aquestes més joves (menys madures), ja que s'han agut de recuperar part de les que s'havien eliminat, deixant una població més nova. Cosa que veuríem reflectida en una expressió diferencial dels NKR, pròpia de cèl·lules en estadis de diferenciació més immadurs.

- **Receptors d'estudi**

Per tal de visualitzar l'estat de maduració de cèl·lules presents a les mostres, s'han escollit tres dels receptors que utilitzen en el grup d'acollida per a l'estudi que desenvolupen.

ILT2 → *Immunoglobulin like transcript 2*, codificat pel gen LILRB1 és un receptor inhibidor expressat per cèl·lules NK i limfòcits-T. Pertany a la família dels *leukocyte limmunoglobulin-like receptors*, codificat a la regió cromosòmica 19q13.42 (OMIM: 604811 Uniprot: Q8NHL6). (Gurman Kaur, 2013)

Aquest receptor conta amb quatre motius ITIM citoplasmàtics. Està descrit que aquest receptor interactua amb el MHC de classe I, enviant un senyal negatiu que inhibeix l'estimulació d'una resposta immune. Alguns articles han apuntat a que aquest receptor presenta una acumulació amb el temps, cosa que permetrà determinar aquelles cèl·lules amb poc ILT2 com a cèl·lules joves.

NKG2A → Aquest receptor codificat pel gen KLRD1 pertany a la família dels *lectin-like receptors* i està codificat a la regió cromosòmica 12p13.2 (Omim: 161555 UniProt: P26715). La seva funció és reconèixer i interaccionar amb HLA-E, juntament amb la molècula CD94, com a heterodimer. És molt present en el subtipus

de NK CD56bright, essent molt més escàs en les CD56dim, per aquest motiu determinarem les cèl·lules amb més NKG2A, com a cèl·lules més joves. (Rafael Solana, 2014)

CD56bright NKsubset. → Aquesta cèl·lules conformen una subpoblació de cèl·lules NK. Són grans productores de citoquines, però són poc citotòxiques abans de l'activació. Aquesta subpoblació d'NK són numèricament inferiors a la subpoblació CD56dim en sang perifèrica, però constitueixen la majoria NK presents en els teixits limfoides secundaris. (Rafael Solana, 2014)

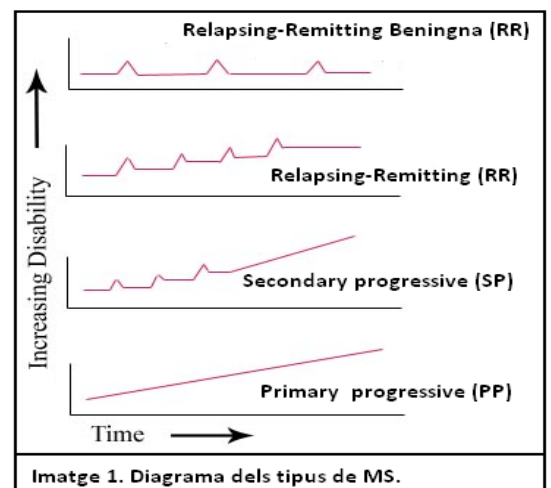
Alguns estudis suggereixen que sota certes condicions, aquestes poden tenir propietats immunoreguladores (Kazuya Takahashi, 2004), i les posicionen com a precursors immediates de les cèl·lules NKCD56dim (Aurelie Poli, 2008). Classificarem les cèl·lules CD56bright com a cèl·lules joves.

Variables clíniques.

• Tipus MS

Actualment la MS és classifica en tres tipus (Imatge1):

- 1) Relapsing-remiting (RR)
- 2) Secondary progressive (SP)
- 3) Primary progressive (PP)



La forma més comú de MS és la **Relapsing-Remiting** (RR). Els símptomes es presenten en forma de brots que apareixen durant un període de temps –dies, setmanes o, mesos– i després milloren parcialment o totalment . En alguna ocasió, queden seqüeles neurològiques després dels brots.

Un altre tipus de MS és la **Primary progressive** (PP) que pateixen entre un 10% i un 15% de les persones amb MS. Aquesta forma es sol diagnosticar quan els pacients són més grans, principalment a partir del 40 anys. A diferència de la MS RR, aquesta no va associada a l'aparició de brots, sinó que es produeix des del inici un deteriorament progressius,

Algunes persones amb MS RR, amb el pas dels anys, desenvolupen un empitjorament neurològic progressiu, relacionat o no amb els brots. És el que s'anomena forma **Secondary progressive (SP)** i constitueix un tipus diferent de la malaltia.

Altres malalts, però, es mantindran estables durant molts anys sense entrar mai en aquesta fase progressiva.

- **Tractaments**

Tal com s'ha comentat abans, actualment no existeix una cura definitiva per a la MS.

Per al tipus Relapsing-Remitting (RR) de la MS es poden tractar de manera independent els brots aguts quan apareixen, o administrar un tractament crònic per tal de prevenir noves lesions.

Per tal de tractar els brots aguts i disminuir-ne la durada i la intensitat dels símptomes, el tractament més emparat són els corticoides, administrats per via oral o intravenosa segons el lloc d'afectació del brot.

El fet de rebre o no tractament amb corticoides, pot accelerar la recuperació de l'estat normal, però no està demostrat que modifiqui la recuperació a llarg termini (Agius, 2014).

Els tractaments crònics d'aquesta malaltia tenen com a objectiu reduir la freqüència i la severitat dels brots (atacs clínics). D'aquests tractaments se n'espera també que disminueixen l'acumulació de les lesions. (Radu Tanasescu, 2014)

Els fàrmacs de tractament crònic, es poden classificar en dues línies:

- **Fàrmacs de primera línia**
- **Fàrmacs de segona línia.**

Els fàrmacs de primera línia són aquells aprovats per la FDA i la EMA com a tractaments per als pacients als qual se'ls diagnostica MS. Aquests són Avonex® Betaferon®, Rebif® i Copaxone® principalment.

Principi actiu	Nom comercial	Freqüència i via administració	Any aprovació (EMA)
Fàrmacs de primera línia			
Interferó beta	Avonex®	Intramuscular 1 vegada/ setmana	1997
	Betaferon®	Subcutani Cada 48h	1995
	Rebif®	Subcutani 3 vegades/ semana	1998
	Extavia®	Subcutani Cada 48 hores	2008
Acetato de glatirámero	Copaxone®	Subcutani Cada dia	1997
Fàrmacs de segona línia			
Natalizumab	Tysabri®	Endovenoso 1 vegada/ mes	2006
Fingolimod	Gilenya®	Oral Cada dia	2011
Taula 1 : Tractaments Actuals. Observatori esclerosis multiple. http://observatorioesclerosismultiple.com/			

Aquests fàrmacs actuen com a immunomoduladors, ja que modulen la resposta immune, però no la disminueixen ni la suprimeixen.

Els efectes secundaris que provoquen tots els tractaments que contenen com a principi actiu l'interferó- β són semblants a un quadre pseudogripal.

Quan aquest tractament és receptat a un pacient i la seva tolerància no és bona, o l'agressivitat de la seva malaltia és molt alta i no es veu cap millora en el seu curs, és quan entren en joc els fàrmacs de segona línia.

Aquests només s'administren quan els de primera línia no funcionen, ja que aquests segons, molt més agressius, són principalment immunosupressors.

Els tractaments actuals per a la forma primària progressiva (PP) de la MS són molt més limitats, i per al moment no hi ha cap fàrmac aprovat per tractar la MS primària progressiva. Per a secundària progressiva s'utilitza el Betaferon i el Rebif 44 sempre i quan hi hagi brots, si no restaran sense tractament.

En el present estudi només s'han incorporat per al grup de pacients en tractament, aquells que rebien immunomoduladors, majoritàriament tots sota l'interfero- β , excepte dos amb copaxone®.

Estudi

Material i mètodes

- **Pacients**

Les mostres s'han obtingut a partir de pacients amb MS, que han estat reclutats gràcies principalment al registre de pacients de L'Hospital del Mar-IMIM, Barcelona. Tots ells eren majors de 18 anys en el moment d'adquirir la mostra, així com tots els pacients han firmat el *consentiment informat*. El reclutament de les dades per a estudi ha estat aprovat pel IMIM Ethics Committee.

Es va extreure una mostra de sang perifèrica de 165 pacients i 54 controls sans, amb proporcions similars en gènere i edat (Veure Taula 2, Anàlisis descriptiu).

D'aquests pacients es va determinar que 110 pacients patien una MS tipus 1 (RR), 38 pacients de tipus 2 (SP), i 16 pacients patien una MS de tipus 3 (PP).

En el moment de l'extracció de la mostra, 85 pacients seguien un tractament amb immunomoduladors (INF- β o copaxone) i 80 restaven sense tractament. (n= 165)

Els casos de pacients no tractats inclouen els analitzats abans de començar el tractament amb immunomoduladors, reclutats poc després d'un diagnòstic recent de MS, els que van rebutjar el tractament, aquells que després de sotmeteres a tractament no van tenir una bona acceptació i va ser retirat, i aquells pacients amb una MS de tipus 3 (PP) no-activa, ja que no disposen de tractament.

Cap pacient inclòs havia rebut un tractament amb corticoides, duran el mes anterior a l'estudi.

Per tal de poder avaluar la possible influència de la infecció asimptomàtica per CMV en l'expressió dels NKR, es va utilitzar una prova de diagnòstic per analitzar mostres de sèrum de pacients i controls, per a detectar IgG específiques contra CMV. (bioMérieux).

- **Extracció PBMC**

Les mostres de sang perifèrica es van obtenir mitjançant una punció intravenosa.

D'aquestes mostres se'n van aïllar les PBMC (Peripheral blood mononuclear cells) mitjançant centrifugació en gradient de FICOLL, una tècnica que permet separar les mostres de sang mitjançant una centrifugació per gradient de densitat.

El Ficoll és un polisacàrid hidrofílic de gran pes molecular i altament ramificat que permet la separació de la sang en els seus components (eritrocits, leucocits, etc.).

En primer lloc és extremadament important dispensar la mostra de sang sobre el FICOLL amb molta cura i precaució per a què els dos líquids quedin separats en dues fases, ja que si es barregen els dos components abans de la centrifugació no es podrà dur a terme la separació de manera correcta.

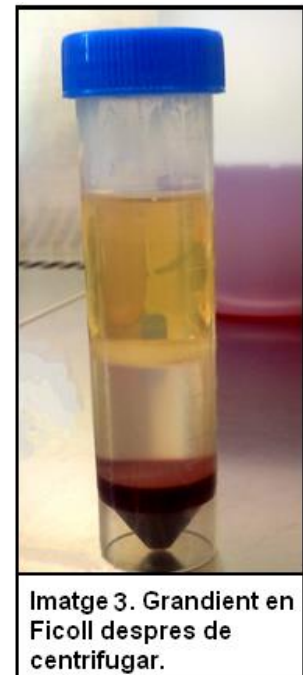
En el recipient utilitzat es podran diferenciar clarament dues seccions separades, amb el Ficoll a baix i la sang a la part superior (Imatge 2.).

Gràcies a aquest procediment, obtindrem un gradient de densitat on trobarem, de dalt a baix:

El plasma i altres components, seguit d'un petit anell blanc i espès, on es troben aïllades les cèl·lules mononuclears, anomenada capa leucocitària (PBMC), (les quals són les que posteriorment s'analitzaran per Citometria), seguida d'una capa de FICOLL i per últim els eritròcits i granulòcits (Imatge 3.).



Imatge 2. Separació entre Ficoll i sang abans de centrifugar.



Imatge 3. Gradient en Ficoll després de centrifugar.

- **Citometria de flux**

La citometria de flux és una tècnica àmpliament utilitzada en diverses disciplines que permet comptar, classificar, i distingir diferents cèl·lules, les quals es troben suspeses en un fluid.

El citòmetre de Flux utilitzat en aquest experiment és un LSR II (Imatge 4.) amb el qual s'utilitzen 8 canals de lectura totals, és a dir, detectarem 8 senyals de fluorescència diferents, provinents de la nostra mostra.



Imatge 4. Citòmetre LRSII on es van processar les mostres.

Per a la tinció d'immunofluorescència indirecta, les PBMC van ser prèviament tractades amb una concentració d'Ig humanes saturades per a bloquejar així el receptor de la cadena pesada del Ac. (FcγR)

La mostra és separada en 7 seccions independents, i cada una va ser incubada amb un anticòs monoclonal primari diferent i amb l'anticòs anti-Myc (MYC) i els ISOTIPS com a controls negatius (Imatge 5.).

MYC	ILT2	XX	KIR	161	2A	ISOS
-----	------	----	-----	-----	----	------

Després aquestes seccions van ser rentades i incubades amb un anticòs secundari, que va reconèixer els Ac. primaris prèviament incubats. Aquest Ac secundari està marcat amb Phycoeritrina (PE), el qual és detectat al citòmetre a una longitud d'ona de 572 ± 25 nm.

Per últim es va afegir a les diferents seccions la mescla d'anticòsos corresponents, els qual permetran discriminar entre diferents poblacions de PBMC (L-B, L-T, NK, ...).



Imatge 5. Tapa placa Multi-well on es processaven les incubacions amb anticòsos de les mostres de PBMCs.

Els anticossos de la tinció directe, i els seus canals de lectura són:

Molècula	Canal de lectura
CD3	PerCP-Cy5
CD4	FITC
CD14	Am-Cyan
CD16	Pacific Blue
CD19	PE-Cy7
CD56	APC
CD69	APC-Cy-7

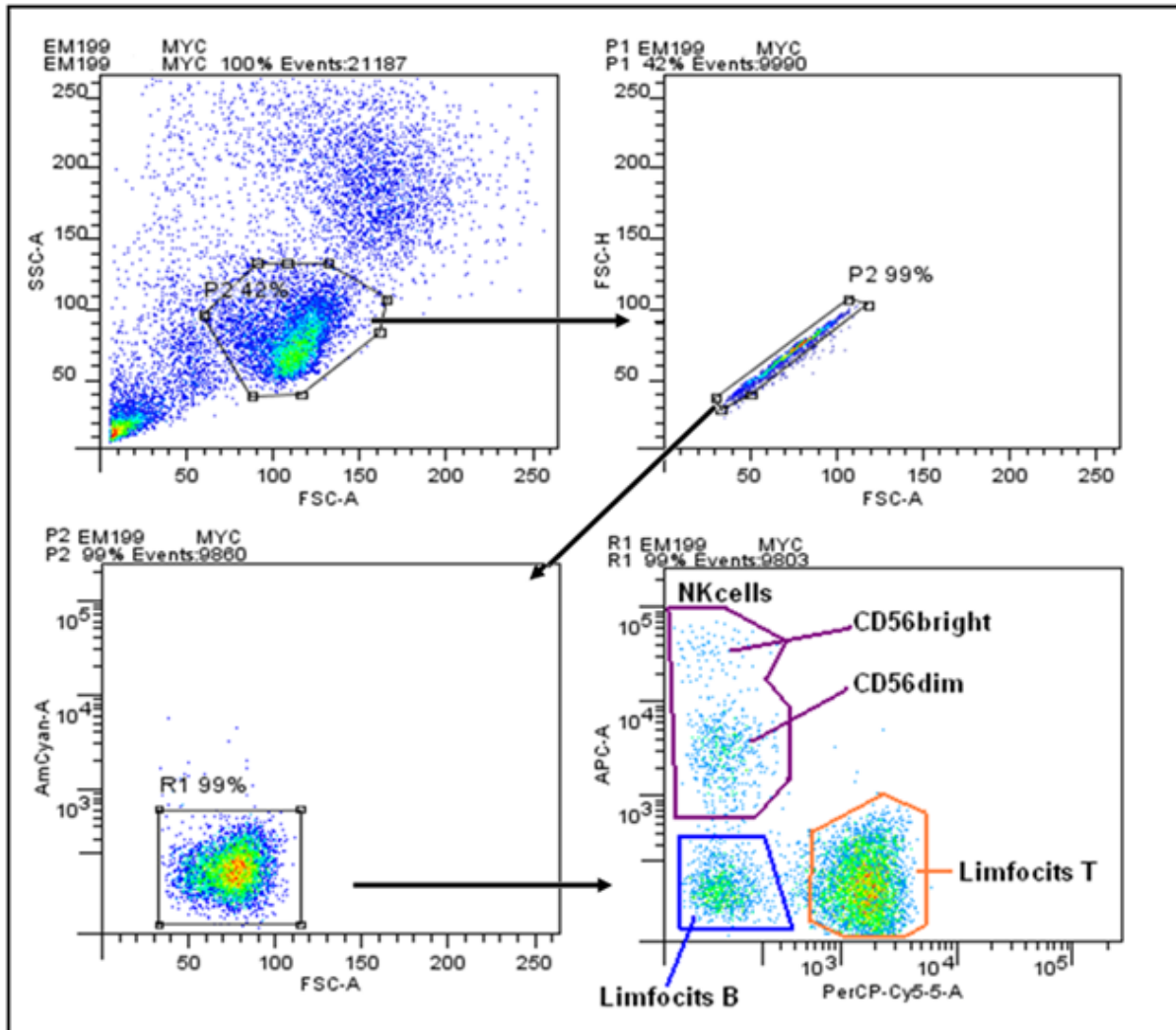
Les set seccions separades per a la tinció amb l'anticòs primari, específic per als receptors d'estudi, seran analitzades per separat, ja que tots són detectats pel canal de la Phycoeritrina on, juntament amb els 7 anticossos directes, componen els 8 colors resultants.

Les dades generades pel citòmetre de flux en aquest experiment, són analitzades en un primer pas amb el software DIVA, el qual permet una previsualització directe dels percentatges de les cèl·lules processades i del nombre d'events estudiats.

Posteriorment i amb més profunditat, es va analitzar també amb el software GateLogic, programa que et permet desenvolupar una estratègia de *gating*, per tal de poder separar les poblacions segons la seva senyal emesa.

A la imatge 6, es pot veure l'estratègia del *gating* per a la determinació del patró, fins al *gate* corresponent a la separació de les tres grans poblacions: cèl·lules NK, limfòcits T i limfòcits B.

Aquest programa permet treballar amb cada una d'aquestes poblacions per separat, permetent així calcular els percentatges ocupats per cada tipus cel·lular, així com el percentatge de cèl·lules expressant un receptor concret.



Imatge 6. Foto obtinguda del programa Gatlógic en la primera etapa de selecció de les poblacions. En el primer quadrant, es seleccionen aquelles cèl·lules en bon estat, descartant les cèl·lules apoptotiques, pre-apoptotiques, i el soroll de fons.

En el quadrant P1 eliminem els agregats cèl·lulars que hagin pogut quedar, ja que els eixos ens permeten analitzar l'alçada contra l'amplada de la senyal rebuda.

En el quadrant P2, amb la senyal de AmCyan-A ens permet descartar els monocits que quedin a la nostra mostra.

Per últim, en el quadrant R1 amb els eixos APC-A (marca CD56+) i PerCP-Cy5-5-A (marca CD3+) ens permet determinar les següents poblacions:

Cèl·lules NK (CD56+/CD3-), Limfòcits B (CD56-/CD3-) i limfòcits T (CD56-/CD3+).
Igualment cada una d'aquests grups contenen d'un control paral·lel de selecció.

- **Recollida de dades:**

Amb les dades provinents del citòmetre, a partir de la senyal rebuda dels Ac. directes, es poden determinar diferents poblacions cel·lulars segons aquests criteris:

Molècula	Criteri de marcatge.
CD3	Marcador de Limfòcits T.
CD4	Marcador de Limfòcit T. (Thymic Differentiation)
CD14	Marcador de Macrofags i monocits-activats.
CD16	Marcador de Limfòcits-T i NK Activades
CD19	Marcador de macrofags i monocits.
CD56	Marcador de cèl·lules NK ,
CD69	Marcador de Limfòcits-B

En un primer pas, es van calibrar els patrons, utilitzant el control negatiu Myc, el qual no mostrava senyal per l'anticòs indirecte, però mantenia igualment tots els Ab directes. Gràcies a aquest podíem determinar les poblacions bases, com són L-B, L-T i NK. Partint d'aquests gates principals, canviant el canal de lectura dels eixos, aconseguíem analitzar la senyal de cada un dels receptors, gràcies a la tinció d'Ab. Indirectes.

Els percentatges i valors de les poblacions obtinguts amb el programa GateLogic van ser exportats al Spss, creant una nova base de dades, que combinava les dades recollides en el marc del present treball amb les dades prèvies del grup d'acollida.

- **Anàlisi estadístic.**

Per a l'anàlisi estadístic s'ha determinat les següents variables:

%NK → Correspon als valors dels percentatges de limfòcits, ocupats pel compartiment NK.

%NKILT2 → Correspon al percentatge de cèl·lules NK que es troben expressant el receptor ILT2.

%NKNKG2A → Correspon al percentatge de cèl·lules NK que es troben expressant el receptor NKG2A.

%CD56bright → Correspon als valors obtinguts per al percentatge de NK ocupat per la subpoblació CD56bright.

També s'han analitzats els valors absoluts d'aquests receptors (el nombre de cèl·lules o events processats) en les variables NK_AN, ILT2_AN, NKG2A_AN i CD56bright_AN.

Les significances entre grups per a les variables paramètriques van ser analitzades amb *T-Student test* i *Fisher-Xsqr*t, mentre que per a les no paramètriques es va utilitzar la prova *U Mann-Whitney* i *Xsqr*t.

Tant el percentatge d'NK com %NK_ILT2 i %NK_NKG2A, mantenien un comportament paramètric, i per aquest motiu van ser estudiades amb correlacions de *Pearson*. La variable %CD56bright, mantenia un comportament ambigü, determinat com a paramètric, però analitzat amb proves d'*Spearman* en l'anàlisi d'"n" inferior a 30.

En tots els casos es van considerar estadísticament significatius els valors inferiors a $p=0.05$.

Resultats i Discussió

Amb la intenció de trobar resposta a la hipòtesi plantejada, es necessari determinar l'estat de maduració de les cèl·lules.

Per a fer-ho, s'utilitzaran els receptors ILT2 i NKG2A, així com la subpoblació d'NK, CD56bright.

L'ILT2 és un receptor que s'expressa en les NKs més madures, produint-se una acumulació amb el temps, per aquest motiu les cèl·lules més antigues mostraran una major expressió d'aquest receptor (Aurelie Poli et al., 2008).

NKG2A és un receptor de membrana expressat en cèl·lules poc madures (joves), principalment en les cèl·lules CD56bright. (Aurelie Poli et al., 2008).

Les cèl·lules CD56bright o (*CD56^{hi}*) com ja s'ha exposat prèviament, són una subpoblació de cèl·lules NK. Aquestes quan són joves presenten una alta expressió del marcador CD56, la qual perdran a mesura que envelleixin, (perdent l'expressió *bright* (brillant) de CD56 i esdevindran cèl·lules CD56dim) (Aurelie Poli et al, 2008; Chiara Romagnani et al, 2014; Gurman Kaur et al., 2013)

- **Anàlisis descriptiu.**

S'ha analitzat per citometria de flux l'expressió dels receptors ILT2 i NKG2A així com la subpoblació CD56bright a partir de les cèl·lules NK obtingudes de pacients amb MS (n = 165) i de controls sans (n = 51).

A la taula descriptiva (Taula 2) es mostra el nombre de casos per a cada variable, així com el seu percentatge dins del grup i el valor de la significança, per tal d'avaluar si les diferències entre els dos grups són significatives. S'han analitzat les principals variables utilitzades en el present estudi, on s'han contemplat només els casos que finalment s'han inclòs en el estudi, podent-ne destacar la homogeneïtat tant de la variable SEXE com de la variable CMV,(la qual contempla la presència o

absència d'infecció per citomegalovirus), ja que les diferències d'aquestes no són significatives.

Per al grup Pacients s'han analitzat també les dades corresponents als receptors d'estudi, per a determinar si les diferències entre els casos i els controls eren significatives.

A la Taula 3. es veu com la mitjana dels nombres absoluts dels receptors NK_ILT2 i NK_NKG2A per als pacients, es inferior que en els controls, així com una proporció més baixa de %CD56bright per part del grup Control, diferències les quals són significatives.

Taula descriptiva

	Control (n=51)	MS (n=165)	p-val.	Total
CMV-	16 (38%)	50 (30%)	0,476	66
CMV+	32 (62%)	114 (69%)		146
Dones	36 (71%)	114 (69%)	0,681	150
Homes	15 (29%)	51 (31%)		66
TipuRR	-	110		
TipusSP	-	38		
Tipus PP	-	17		
Tractament	-	85		
No Tractament	-	80		

Taula 2. Descripció dels casos inclosos en l'estudi.

	Controls ± SD	MS ± SD	p-val
Mean %NK	17,58 ±7,99	13,48 ±7,02	0,317
Mean NK_AN	344,1 ±209,6	232,82 ±143,91	0,099
Mean ILT2	40,1 ±18,67	37,8 ±17,09	0,303
Mean ILT2_AN	148,21 ±115,91	91,43 ±81,94	0,002*
Mean NKG2A	48,71 ±14,99	55,95 ±15,65	0,0603
Mean NKG2A_AN	166,7 ±132,6	126,81 ±78,4	0,018*
Mean %CD56bright	7,06 ±4,54	12,99 ±10,19	0,001*
Mean CD56bright_AN	22,3 ±14,65	29,59 ±18,56	0,211

Taula 3. Anàlisi de les dades per als nostres receptors d'estudi, comparant el grup Pacients i el grup Control, per a determinar la significança de les diferències.

Al analitzar la correlació d'ILT2 i NKG2A no es van observar diferències quan es va relacionar amb diferents variables clíniques (Dades no mostrades). Tot i que CD56bright sembla mantenir una lleu correlació amb el nombre de brots, per a pacients amb un temps d'evolució màxim de 10 anys. (Dades no mostrades)

Un cop conegudes les variables, es va prosseguir amb l'anàlisi estadístic per tal de respondre a les preguntes.

- **Resultats hipòtesi:**

- ❖ **Disminueix el nombre d'NK en sang perifèrica, perquè s'han eliminat de la circulació?**

Per tal de respondre aquesta pregunta, es va començar elaborant un primer anàlisi general, on s'observava quin tipus de correlació mantenien els nostres receptors i subpoblacions d'estudi, respecte al compartiment NK.

Aquest estudi, incloïa dins del grup "Pacients" tots aquells casos detectats de MS, independentment de la seva serologia per CMV o de la presència/absència de tractament.

Per als anàlisis s'ha començat sempre analitzant el receptor ILT2, seguit del receptor NKG2A i finalment la subpoblació d'NK CD56bright.

-Al analitzar la correlació entre **%NK_ILT2** i **%NK** per al grup dels **Pacients**, es va trobar que presentaven una lleu correlació positiva, la qual era estadísticament significativa, ($r=0.249, p=0.002, n=155$) a l'igual que per als seus nombres absoluts (NA) ($r=0.797, p=0.001, n=136$)

Per al grup **Control** en canvi, no existeix una correlació significativa per als percentatges d'ILT2 respecte al percentatge de NK, però sí una forta significança en avaluar els seus nombres absoluts ($r=0.790, p=0.001, n=39$).

-En **Pacients**, en el cas del receptor NKG2A, no apareix una correlació significativa entre **%NK_NKG2A** i **%NK** però sí que es troba significança per als NA. ($r=0.483, p=0.001, n=137$).

En **Controls**, tampoc es troba cap significança entre les dues variables, però es manté per als seus nombres absoluts ($r=0.914, p=0.001, n=39$).

-En **Pacients**, per a la subpoblació CD56bright, apareix una correlació significativa en avaluar el **%NK** i **%CD56bright**, ($r=-0.519, p=0.001, n=156$), però per als nombres absoluts no es troba significança.

Per a la subpoblació CD56bright del grup **Control**, apareix també una correlació negativa força significativa, ($r=-0.477, p=0.005, n=50$) però tampoc apareix per als nombres absoluts.

En resum, al estudiar els Pacients de MS, es pot veure com el receptor NK_ILT2 i la subpoblació CD56bright mantenen el comportament que esperàriem trobar si la nostra hipòtesi fors certa, tenint per a ILT2 una correlació positiva, i una de negativa per a la subpoblació CD56bright.

Però a l'analitzar els resultats per al grup Control, aquests mostren que, la correlació inversa trobada en la subpoblació CD56bright, pot estar sent causada per algun factor no lligat a la malaltia, ja que continua apareixent al analitzar els controls. Per altra banda, el receptor ILT2, presenta una correlació que sembla estar lligada a la variable malaltia, ja que no es troba significança per als Controls.

Donat que el nombre total de limfòcits pot ser molt variat entre persones, i pot estar influït per les condicions del moment de l'extracció o altres factors, s'analitzaran principalment les dades obtingudes per als percentatges.

Com s'ha exposat abans, existeixen 3 tipus de MS diferents, per aquests motiu s'han analitzat també els receptors per a cada tipus de MS, per evaluar el comportament dels receptors en aquests tipus.

S'ha trobat que per a ILT2, es perd la correlació en aquells pacients de Tipus 1 i 3, tot i que apareix una forta correlació per als de Tipus2. NKG2A és mante sense significança, mentre que per la subpoblació CD56bright es mante la correlació negativa per als pacients de Tipus 1 i 2, però no per als de Tipus3 (Dades no mostrades)

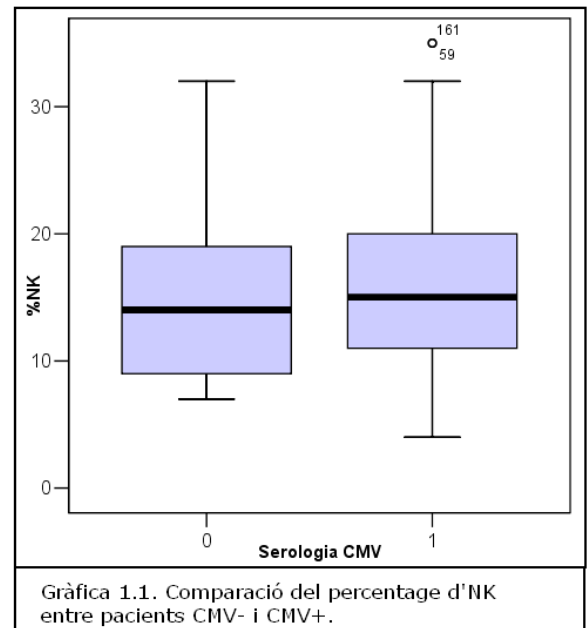
Tenint en compte que el tractament amb interferons i la presència de CMV poden estar influït en l'expressió dels NKR (J.E.Martínez-Rodríguez et al. 2010; J.E. Martínez-Rodríguez et al., 2011; Aura Muntasell et al., 2013; M. Almejadi, et al. 2014) i que en aquests primers anàlisis s'han tingut en compte tots els pacients independentment d'aquestes variables, caldrà analitzar la influència d'aquests altres factors per separat.

Per a fer-ho, s'han plantejat una sèrie de preguntes derivades de la hipòtesi base, per tal d'intentar-la respondre amb la màxima precisió.

❖ **Qüestió 1: Pot estar influent la variable CMV en els resultats anteriors?**

Per veure si la presència de Citomegalovirus (CMV) pot tenir alguna implicació en la correlació entre el %NK i el percentatge dels nostres receptors d'estudi, s'analitzaran els donants segons la seva serologia.

Abans però, a la gràfica 1.1, es pot veure com la presència de la infecció per CMV no influeix de manera significativa en el %NK.



-Per al grup **Pacients**, la correlació entre %NK_ILT2 i %NK només existeix per als individus CMV+ (CMV-: noSig ; CMV+:

$r=0.367$, $p=0.000$ $n=108$;). Però per als NA es manté la forta correlació per a tots dos casos (Dades no mostrades).

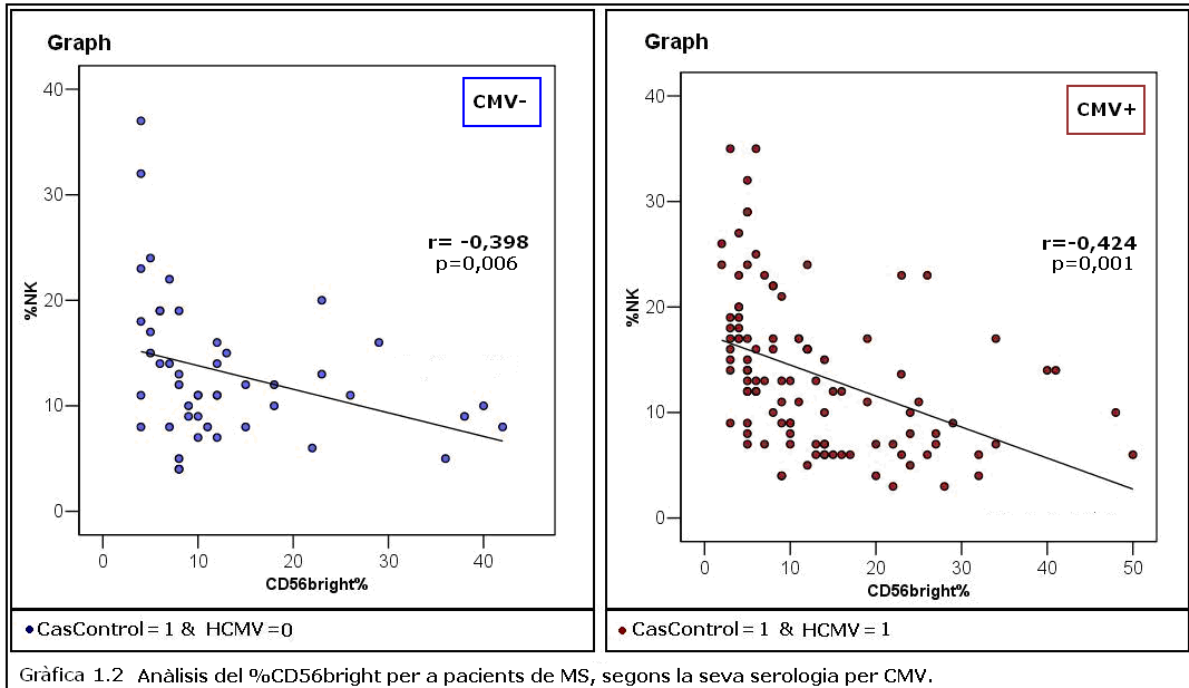
En canvi, el grup **Control**, continua sense presentar cap correlació significativa, ni CMV+ ni CMV-, cosa que podria indicar una possible influència mútua del CMV i del "factor" malaltia, per a què es produeixi aquesta correlació. Per als seus nombres absoluts es troba significança per tots dos grups, essent més forta en CMV+. (CMV: $r=0.678$, $p=0.015$; CMV+: $r=0.845$, $p=0.000$;).

-Per a %NK_NKG2A i %NK continua sense existir cap correlació, ni per a CMV+ ni CMV- tant en el grup **Control**, com per als **Pacients**.

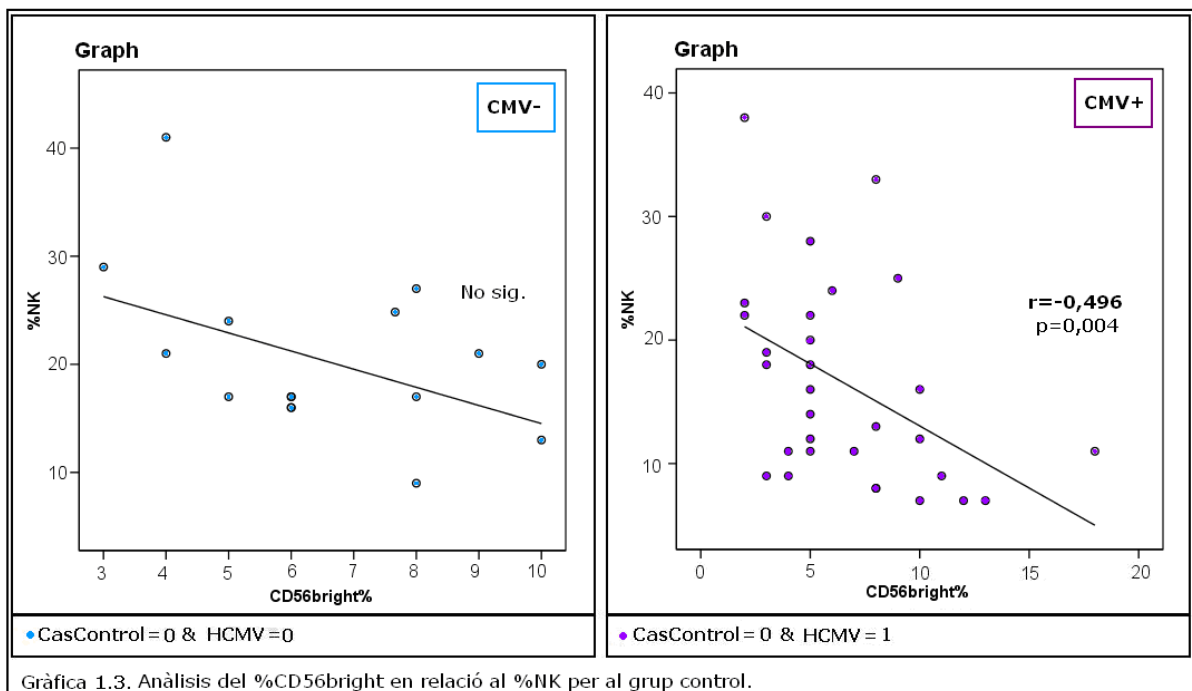
-En pacients, la correlació negativa entre el %CD56bright i %NK, sota l'efecte del CMV es manté en tots dos casos, tant en CMV+ com CMV-, (CMV-: $r= -0,398$, $p=0.006$ $n=47$; CMV+: $r= -0,424$, $p=0.001$ $n=108$;.) (Gràfica 1.2.)

En canvi en analitzar el %CD56bright en **Controls** sota l'efecte del CMV, es veu com per als Controls CMV- aquesta correlació no existeix, però sí que es troba en CMV+, (CMV-: No Sig; CMV+: $r = -0,496$, $p = 0,004$, $n = 30$) (Gràfica 1.3.) . Al mirar el NA de CD56bright, no existeix correlació en cap de les situacions anteriors.

Pacients



Controls



Per a analitzar un grup de manera més específica, s'han repetit l'anàlisi, restringint només a aquells pacients de tipus 1, ja que és la forma més comuna d'aquesta malaltia, i també de la que disposem de més casos. D'aquesta manera eliminem possibles influències que podrien estar exercint els altres dos tipus.

En aquets veiem un patró similar amb l'anàlisi generals on per al grup **Pacients**, aquells Tipus 1 i CMV+ són els únics que presenten una correlació significativa entre **%NKILT2** i **%NK** (CMV-: noSig ; CMV+: $r=0.234$, $p=0.050$ $n=71$);). De la mateixa manera que per als anàlisis anteriors, no es troba res per al **%NK_NKG2A**, i per a la correlació **%CD56bright** i **%NK**, trobem que tant CMV+ com CMV- apareix una correlació negativa (CMV-: $r=-0,398$, $p=0.006$ $n=47$; CMV+: $r=-0,555$, $p=0.001$ $n=108$;))

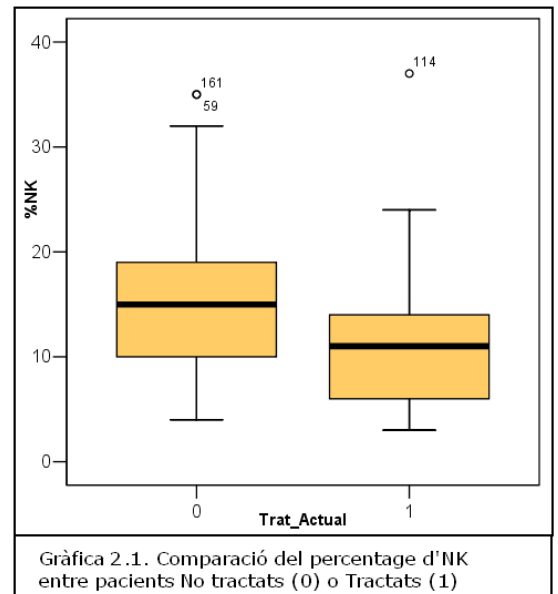
Tots aquests resultats aboquen una mica més de llum sobre la nostra hipòtesi, ja que es pot veure com la correlació positiva trobada per **%NKILT2** i **%NK** en pacients, està subjecte a la presència d'infecció per CMV, ja que en CMV⁻ desapareix. A més però, sembla ser necessària una interacció entre la presència de CMV i la presència de la malaltia per a què aparegui aquesta correlació, ja que no es troba en el grup Control, ni per als CMV⁺ ni CMV⁻.

De la mateixa manera, al mirar el **%CD56bright** respecte al **%NK**, es veu com la correlació trobada abans en els controls, es causada estrictament per la presència de CMV, ja que en absència de la seva infecció, desapareix la correlació. En canvi, per als pacients la correlació negativa es manté tan per als CMV⁺, com per aquells CMV⁻, indicant que a part de la influència que pugui estar exercint el CMV, hi ha algun altre factor que provoca aquesta correlació negativa entre **%CD56bright** i **%NK**, lligat al fet de patir la malaltia.

❖ **Qüestió 2: Pot estar influïent la variable Tractament en els resultats anteriors?**

Donat que el grup Control no es troba sota tractament, i que per al Tipus 3 (PP) actualment no es disposa de cap, com ja s'ha exposat abans, s'exclouran de l'anàlisi.

A la gràfica 2.1, es pot veure com la presència del tractament amb immunomoduladors, influeix lleugerament en el %NK, reduint-lo en aquells pacients sota tractament.



Gràfica 2.1. Comparació del percentage d'NK entre pacients No tractats (0) o Tractats (1)

-Al analitzar la correlació entre **%NK_ILT2** i **%NK**

sota la influència dels immunomoduladors, es pot veure com en aquells pacients sota tractament, no es presenta cap tipus de correlació. En canvi, aquells pacients no tractats en el moment de l'extracció, sí que presenten una lleu correlació entre el %NK_ILT2 i el %NK. (Tract: No Sig; NoTract: $r = 0,2366$, $p = 0,041$, $n = 71$).

-**%NK_NKG2A** continua sense mostrar significança.

-Per a la correlació entre **%CD56bright** i **%NK**, es pot veure com aquells pacients en tractament, no presenten cap correlació significativa, mentre que els pacients sense tractament, mostren una forta correlació. (Tract: No Sig; NoTract.: $r = -0,603$, $p = 0,001$, $n = 40$).

Aquests resultats evidencien la influència de la variable tractament sobre l'expressió d'aquests NKR, eliminant les correlacions existents entre **%NK_ILT2 - %NK** i **%CD56bright - %NK**. Sembla ser que el tractament, provoca una expansió de les cèl·lules CD56bright en tots els pacients tractats, cosa que trenca la correlació negativa trobada per a les CD56bright (M. Saraste, 2007), a la vegada que provoca una disminució en l'expressió d'ILT2, trencant així la correlació positiva que mantenia aquest receptor. (J.E. Martínez-Rodríguez, 2011).

Donat que l'objectiu és poder estudiar les correlacions d'aquests receptors per si sols, és a dir, sense estar influenciats per factors externs o ambientals, cal plantejar un tercer escenari.

❖ **Qüestió 3: Poden les variables CMV i Tractament estar influïnt conjuntament?**

En els següents anàlisis es pot estudiar com funcionen aquestes variables de manera independent, ja que permeten aïllar un grup de pacients els quals no presenten ni infecció per *CMV* ni estan sota la influència del *Tractament*, els quals permetran avaluar la influència de la malaltia sola, així com també els casos +/- (CMV/Tract o CMV+/NoTract.)

-Ens aquests estudis, s'observa una lleu correlació entre el **%NK_ILT2** i **%NK** per a pacients Tipus1/CMV+ quan aquests no són tractats, cosa que permet analitzar la influència sola del CMV. Per als tractats, es perd la correlació. (Tipus1/CMV+/No Tract: $r = 0,319$, $p = 0,020$, $n = 49$; Tipus1/CMV+/Tract: NoSig.).

Tanmateix per a aquells pacients CMV- no trobem correlació, independentment de la presència o no de tractament.

-L'absència de significança al analitzar **NKG2A** es manté per a totes les combinacions.

-Per al **%CD56bright** respecte al **%NK**, aquells pacients del Grup CMV- i No tractament, grup que ens permet estudiar l'efecte de la malaltia sola sobre aquest receptor, es veu una forta correlació negativa entre %NK i %CD56 (CMV-/NoTract: $r = -0,657$, $p = 0,004$ $n = 17$), molt superior a les anteriorment trobades. Per aquells CMV- en tractament, es perd la correlació.

Per al grup CMV+/Tractament, la correlació no arriba a ser significativa mentre que per a la parella CMV+/No tractament, es torna a recuperar la correlació negativa. (CMV+/Tract: No Sig; CMV+/No tract.: $r = -0,599$, $p = 0,003$, $n = 23$).

Aquests anàlisis són els més importants, ja que són els que permeten treballar amb uns grups més aïllats i específics, els quals mostren que:

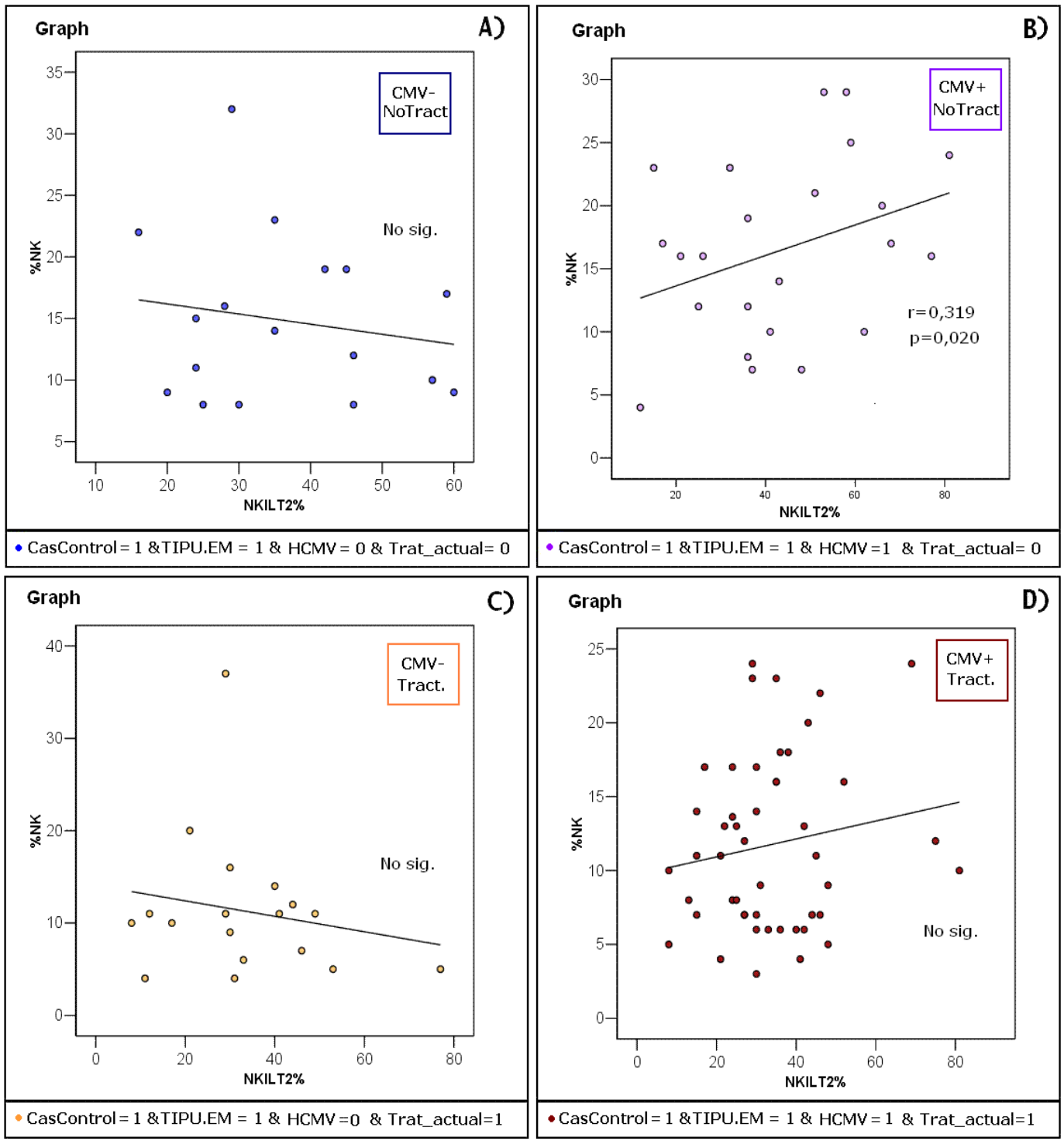
Per al cas del receptor ILT2, aquells pacients CMV⁺ en tractament, perden totalment la correlació, indicant que la influència del tractament, és més forta que l'exercida pel CMV, mentre que els individus CMV⁺ sense tractament, presenten una correlació positiva significativa, produïda per la presència de CMV, combinat amb algun factor lligat a la malaltia, tal com s'havia predit abans. A més es pot veure com en pacients CMV⁻ no existeix correlació ni per a Tractats ni per a no Tractats.

Però els més importants, són els resultats obtinguts per al %CD56bright respecte al %NK, els quals mostren que els pacients de MS sense influència ni del CMV ni de tractament, presenten una forta correlació inversa entre el %NK i el %CD56bright, indicant que aquells pacients que tenen menor %NK, tenen una població superior d'aquestes integrades per cèl·lules CD56bright. És a dir, el factor "malaltia" sense la influència de les altres dues variables, sembla estar provocant una presència més elevada de cèl·lules NK en estadis més precoços de diferenciació.

A la figura 3.1 es pot veure una representació gràfica de la correlació existent entre el percentatge del receptor ILT2 i el %NK.

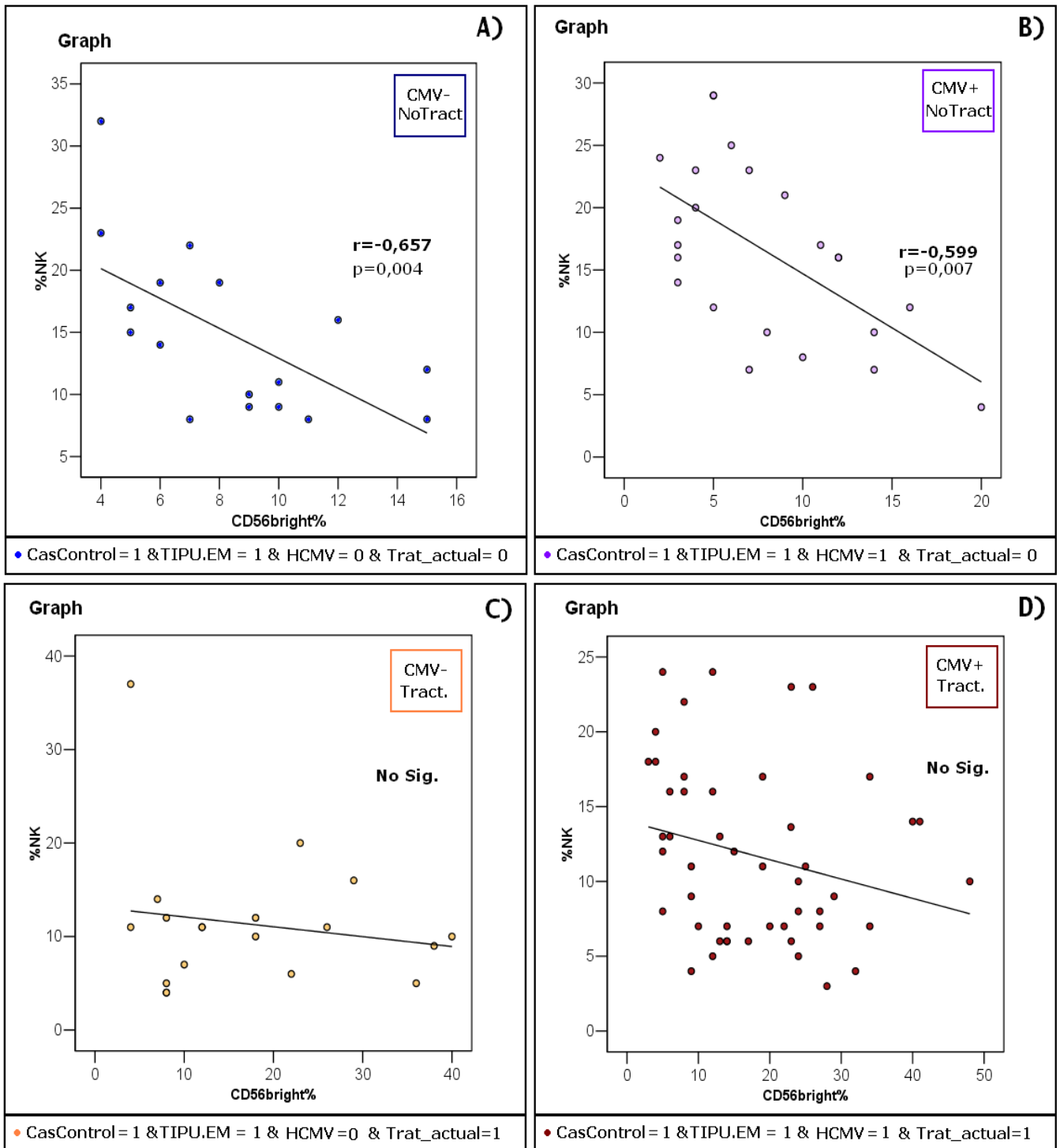
Aquesta representació ens mostra de manera separada els 4 grups de pacients, segons la serologia CMV i la presència de tractament.

De la mateixa manera, a la figura 3.2 es pot veure la representació gràfica de la correlació existent entre el percentatge de cèl·lules CD56bright i el %NK.



Gràfica 3.1) Resultats ILT2. Representació gràfica de les correlacions trobades en analitzar la influència de les variables "CMV" i "Tractament" simultàniament i de manera aïllada.

A) Gràfica resultant de l'anàlisi dels pacients de Tipus1, sense Tractament, i negatius per a CMV. **B)** Gràfica de l'anàlisi en pacients Tipus1, sense Tractament, i positius per a CMV. **C)** Gràfica de l'anàlisi en pacients Tipus1 en Tractament, però negatius per a CMV. **D)** Anàlisi dels pacients Tipus1, en Tractament, i CMV positius.



Gràfica 3.2) Resultats CD56bright. Representació gràfica de les correlacions trobades en analitzar la influència de les variables "CMV" i "Tractament" simultaniament i de manera aïllada.

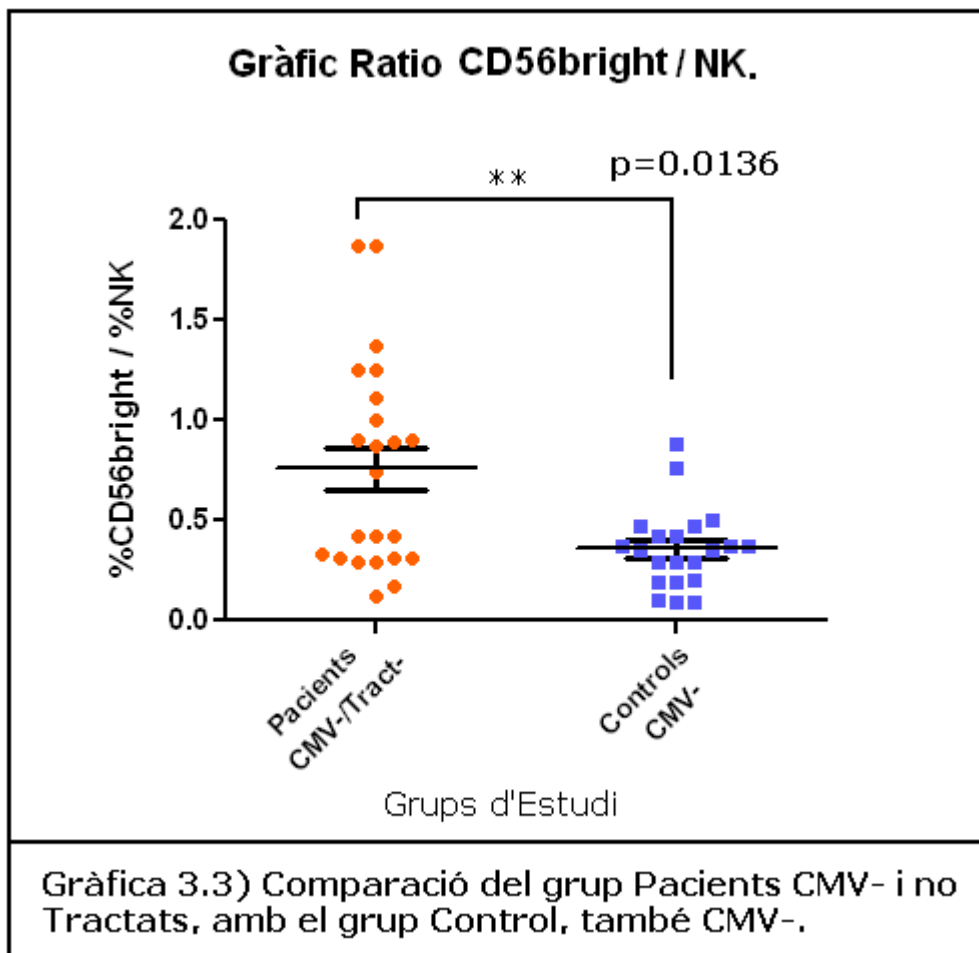
A) Gràfica resultant de l'anàlisi dels pacients de Tipus1, sense Tractament, i negatius per a CMV. **B)** Gràfica de l'anàlisi en pacients Tipus1, sense Tractament, i positius per a CMV. **C)** Gràfica de l'anàlisi en pacients Tipus1 en Tractament, però negatius per a CMV. **D)** Anàlisi dels pacients Tipus1, en Tractament, i CMV positius.

Donat que aquells pacients CMV- no tractats queden en unes condicions similars al grup CMV- dels controls, ja que cap dels dos tenen ni tractament ni CMV i la única diferència es la variable malaltia, seria interessant comparar-los.

Per aquest motiu es compara la ràtio entre %CD56bright / %NK d'aquests dos grups, per tal de veure si les diferències són significatives, i per tant poder atribuir aquesta correlació al factor malaltia.

A la gràfica 3.3, es pot veure com aquesta diferència és significativa.

Aquest fet dóna més pes encara a la idea d'una correlació negativa significativa entre %CD56bright i %NK causada estrictament per la malaltia.



Conclusions

Després de realitzar tota una sèrie d'anàlisis estadístics on analitzàvem principalment les correlacions que mantenien el percentatge de limfòcits corresponents a la població NK, respecte a quin percentatge d'aquestes es trobaven expressant els receptors ILT2, NKG2A, o pertanyents a la subpoblació CD56bright, s'han obtingut uns resultats i una informació, de la qual cal destacar-ne:

D'una banda, l'absència de resultats significatius per part del receptor NKG2A, per al qual només s'han obtingut correlacions significatives en avaluar els seus nombres absoluts. Aquest fet pot ser atribuït al mecanisme de *gating* utilitzat en el grup d'acollida per a recollir les dades, ja que aquests valors s'han extret del compartiment NK sencer, és a dir CD56bright i CD56dim a la vegada. Per aquest motiu, tot i tenir una expressió molt alta d'NKG2A en cèl·lules CD56bright, aquestes com ja s'ha exposat abans, representen una petita part del total del compartiment, cosa que podria haver emmascarat els resultats per a NKG2A .

Per al receptor ILT2 s'ha pogut determinar que, existeix una correlació positiva en aquells pacients els quals, presenten a més infecció per CMV. Aquest fet es pot atribuir a què, en presència d'infecció per CMV, aquest receptor experimenta una expansió, cosa que provoca una correlació positiva entre el %NK_ILT2 i el %NK, tot i que aquest fet només succeeix en aquells malalts detectats de MS. Per aquest motiu caldria indagar més en aquets resultats, els quals poden ser molt interessants. D'igual manera s'ha comprovat que el tractament influeix sobre aquesta correlació, disminuint l'expressió d'ILT2 per part de les cèl·lules NK. Aquesta troballa concorda amb altres estudis els quals estudiaven la influència exercida pel tractament, arribant a conclusions similars a les nostres (J.E.Martínez-Rodríguez et al., 2010).

D'altre banda, el fet que sigui necessària la presència de la malaltia per a què es dongui aquesta correlació, dificulta l'obtenció de conclusions per tal de saber si la hipòtesi base pot ser certa

En canvi, per a la subpoblació CD56bright, s'han trobat uns resultats molt interessants.

En aquests es pot veure com aquells pacients, els quals no estan influenciats per cap de les dos grans factors d'influència (presència de CMV i Tractament), mantenen una correlació negativa significativa.

Aquests resultats són importants, ja que mostren com un altre factor, diferent dels anteriorment exposats, està provocant aquesta correlació. A més aquest factor sembla anar lligat al fet de patir la malaltia.

Donat que la MS és una malaltia inflamatòria autoimmunitària, seria possible pensar que existeixen inflamacions, les quals no tenen per què estar produint un episodi clínic associat, però si estar actives, les quals estarien obligant a mantenir un recanvi del compartiment NK més elevat, (donat a què aquestes cèl·lules poden haver estat eliminades, després de fer alguna funció).

Els resultats de CD56bright, donen força a la nostra hipòtesi, ja que els resultats coincideixen amb el que s'esperava trobar. (a menor percentatge NK, major nombre d'aquestes amb CD56bright)

Però donats els resultats ambigus de ILT2 així com la falta de resultats per a NKG2A, seria necessari realitzar més estudis, ampliant la mida mostral, i avaluant més varietat de receptors, per a poder confirmar les evidències aquí presentades, i assegurar que la hipòtesi base sigui certa.

Fins al moment cap altre estudi ha mostrat evidències significatives per aquest increment.

Com s'ha comentat a l'inici, estudis recents han atribuït a les cèl·lules CD56bright propietats immunoreguladores. Per tant seria necessari continuar investigant respecte a la correlació que mantenen aquesta subpoblació i els factors involucrats en la malaltia, ja que podria aportar nous coneixements transcendentals en l'estudi d'aquesta patologia.

Agraïments:

El present estudi no hauria estat possible sense el Dr. Jose Enrique Martínez-Rodríguez, el qual em va acollir en el seu grup de recerca i va confiar en mi per a fer part de l'anàlisi de dades, així com per ensenyar-me com es construeix un bon article.

A la Raquel Rasal, la qual em va ensenyar tot el que sabia, amb paciència i constància, gràcies per ensenyar-me com treballar amb el major ordre i pulcritud en un laboratori, així com ha entendre les tècniques, més enllà dels protocols.

Als companys del laboratori d'Immunologia, per fer-me de cangur a l'inici de la meva estada, i ensenyar-me els seus projectes, així com per tota l'ajuda prestada en moments d'incertesa.

Al Dr. Josep Bau, per tutoritzar el meu treball, i guiar-me en la seva confecció, i a la Laia Cruz per una lectura crítica del treball.

I sobretot als meus Pares, pels sacrificis fets per a què pogués desenvolupar aquest treball en el millor ambient i poder aprofitar al màxim la meva estada en un centre com el PRBB.

Bibliografia

- A. Saez-Borderias, N. R.-C.-B. (2011). Natural killer cell receptor expression reflects the role of human cytomegalovirus in the pathogenesis of a subset of CD4+ T-cell large granular lymphocytosis. *Human Immunology* , 72: 226–228.
- A. Vandembark, J. H. (2009). Interferon-beta-1a treatment increases CD56bright natural killer cells and CD4+CD25+ Foxp3 expression in subjects with multiple sclerosis. *Journal of Neuroimmunology* , 215: 125–128.
- Agius, R. B. (2014). Mechanisms of action of ACTH in the management of relapsing forms of multiple sclerosis. *The Adv Neurol Disorder*, 83-96.
- Aura Muntasell, C. V.-B. (2013). Adaptive reconfiguration of the human NK-cell compartment in response to cytomegalovirus: A different perspective of the host-pathogen interaction. *Eur. J. Immunol*, 1133–1141.
- Aurelie Poli, T. M. (2008). CD56bright natural killer (NK) cells: an important NK cell subset. *British society for immunology*, 126, 458–465.
- Chiara Romagnani, K. J. (2014). CD56brightCD16- Killer Ig-Like Receptor- NK Cells Display Longer Telomeres and Acquire Features of CD56dim NK Cells upon Activation. *The Journal of Immunology*, 4947-4955.
- E Sundqvist, T. B. (2013). Cytomegalovirus seropositivity is negatively associated with multiple sclerosis. *Mult Scler*, 1-10.
- E. Waubant, E. M. (2011). Common viruses associated with lower pediatric multiple sclerosis risk. *Neurology*, 76: 1989–1995.

- Gurman Kaur, J. T. (2013). Natural killer cells and their receptors in multiple sclerosis. *BRAIN*, 136; 2657–2676.
- J.E. Martínez-Rodríguez, J.-C. R.-B. (2013). Expansion of the NKG2C+ Natural Killer-Cell Subset Is Associated With High-Risk Carotid Atherosclerotic Plaques in Seropositive Patients for Human Cytomegalovirus. *American Heart Association*, 33:2653-2659.
- J.E. Martínez-Rodríguez, M. L.-B. (2011). Natural killer cell phenotype and clinical response to interferon-beta therapy in multiple sclerosis. *Clinical Immunology*, 141, 348–356.
- J.E.Martínez-Rodríguez, A. S.-B.-B. (2010). Natural killer receptors distribution in multiple sclerosis: Relation to clinical course and interferon-beta therapy. *Clinical Immunology*, 137: 41–50.
- Kazuya Takahashi, T. A. (2004). The regulatory role of natural killer cells in multiple sclerosis. *Brain*, 127, 1917–1927.
- M. Almeahadi, B. F. (2014). Increased numbers and functional activity of CD56+ T cells in healthy cytomegalovirus positive subjects. *Immunology*, 258-68.
- M. Saraste, H. I. (2007). Expansion of CD56Bright natural killer cells in the peripheral blood of multiple sclerosis patients treated with interferon-beta. *Neurol Sci*, 28: 121–126.
- Radu Tanasescu, C. I.-J. (2014). Advances in the Treatment of Relapsing – Remitting Multiple. *Biomed J*.
- Rafael Solana, C. C. (2014). Shaping of NK cell subsets by aging. *Current Opinion in Immunology* , 29: 56–61.
- S. Sawcer Robin J. M. Franklin, M. B. (2014). Multiple sclerosis genetics. *The Lancet Neurology*.

Stephen L. Hauser, J. R. (2013). Multiple Sclerosis: Prospects and Promise. *ANN NEUROL*, 74: 317–327.

Vissia Viglietta, C. B.-A. (2004). Loss of Functional Suppression by CD4 CD25 Regulatory T Cells in Patients with Multiple Sclerosis. *The Journal of Experimental Medicine*, 971–979.