



Universitat Autònoma de Barcelona

ADVERTIMENT. L'accés als continguts d'aquesta tesi queda condicionat a l'acceptació de les condicions d'ús establertes per la següent llicència Creative Commons:  http://cat.creativecommons.org/?page_id=184

ADVERTENCIA. El acceso a los contenidos de esta tesis queda condicionado a la aceptación de las condiciones de uso establecidas por la siguiente licencia Creative Commons:  <http://es.creativecommons.org/blog/licencias/>

WARNING. The access to the contents of this doctoral thesis it is limited to the acceptance of the use conditions set by the following Creative Commons license:  <https://creativecommons.org/licenses/?lang=en>

Departament de Biologia Cel·lular, Fisiologia i Immunologia
Universitat Autònoma de Barcelona

**SUBPOBLACIONS CEL·LULARS MINORITÀRIES COM A
MARCADOR BIOLÒGIC EN EL DIAGNÒSTIC I
SEGUIMENT DE MALALTIES AUTOIMMUNITÀRIES
ORGANOESPECÍFIQUES**

AINA TENIENTE SERRA

Directora: Eva M. Martínez Cáceres

Servei d'Immunologia
Institut d'Investigació Germans Trias i Pujol
Hospital Germans Trias i Pujol

Tesi presentada per a obtenir el grau en Doctor en Immunologia per la
Universitat Autònoma de Barcelona

Badalona 2016

La Dra. Eva María Martínez-Cáceres com a directora de la tesi

Certifica:

Que Aina Teniente Serra ha realitzat el treball d'investigació corresponent a la tesi doctoral titulada: "Subpoblacions cel·lulars minoritàries com a marcador biològic en el diagnòstic i seguiment de malalties autoimmunitàries organoespecífiques" la qual s'ha desenvolupat en el Departament de Biologia Cel·lular, Fisiologia i Immunologia de la Universitat Autònoma de Barcelona.

I per tal que en quedi constància, signa aquest document a Badalona, 21 de setembre del 2016.

Dra. Eva M. Martínez-Cáceres

ABREVIATURES

AmCyan	Fluorocrom derivat de <i>Anemonia majano</i>
Ac	Anticòs
AITD	Malalties autoimmunitàries de la tiroides
APC	Fluorocrom alocianina
APC-H7	Fluorocrom que combina APC i cianina
BCR	Receptor de les cèl·lules B
BHE	Barrera hematoencefàlica
Bregs	Subpoblació de limfòcits B reguladors
CBA	<i>Cytometric bead array</i>
CCRx	Receptor de quimiocines tipus C-C
CD	Grup de diferenciació
CIS	Síndrome clínica aïllada
cTEC	Cèl·lules medul·lars de l'epiteli tímic
DC	Cèl·lula dendrítica
DN	Limfòcits T doble negatiu (CD4 ⁻ CD8 ⁻)
DNA	Àcid desoxiribonucleic
DP	Limfòcits T doble positiu (CD4 ⁺ CD8 ⁺)
EDSS	Expanded Disability Status Scale
ELISA	<i>Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay</i>
EM	Esclerosi Múltiple
FCS	Forward Scatter light
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
FITC	Fluorocrom Fluoresceïna
FMO	Control <i>fluorescence minus one</i>
Foxp3	<i>Forkhead box P3</i>
GALT	Teixit limfàtic de l'aparell digestiu
GD	Malaltia de Graves-Basedow
GWAS	Estudi d'associació de genoma complet
HLA	Antígen Humà Limfocitari
HT	Tiroiditis de Hashimoto

IFNβ	Interferó beta
IFNγ	Interferó gamma
IL	Interleuquina
LB	Limfòcits B
LCR	Líquid cefaloraquidi
LT	Limfòcits T
MHC	Complex major d'histocompatibilitat
miRNA	microRNA
MRI	Imatge per Ressonància Magnètica
mRNA	RNA missatger
mTEC	Cèl·lules corticals de l'epiteli tímic
NIH	<i>National Institutes of Health</i>
NK	Cèl·lula natural killer
NMO	Neuromielitis òptica
PBMCs	Cèl·lules mononuclears de sang perifèrica
PE	Fluorocrom Ficoeritrina
PECy7	Fluorocrom amb combinació de Ficoeritrina i Cianina
PerCP	Fluorocrom Peridinin-clorofil·la
PerCP-Cy5.5	Fluorocrom amb combinació de PerCP i Cianina
RNA	Àcid ribonucleic
RTEs	Emigrants recents del timus
S1P	Esfingosina 1-fosfat
S1P1R	Receptor 1 de l'esfingosina 1-fosfat
SNC	Sistema nerviós central
SNPs	<i>Segonal Nucleotide Polimorphisms</i>
SP	Limfòcits T simple positius (CD4 ⁺ o CD8 ⁺)
SSC	Side Scatter light
TCR	Receptor de les cèl·lules T
TEMRA	Sub població de limfòcits T efectors o de memòria revertida

Abreviatures

Tg	Tioglobulina
Th	Limfòcits T helper
TNF-α	Factor de necrosi tumoral
TPO	Tiroperoxidasa tiroïdal
TRECs	Cercles d'escissió del TCR
Treg	Subpoblació de limfòcits T reguladors
TSH	Tirotropina
TSHR	Receptor de la tirotropina
VIH	Virus de la Immunodeficiència Humana

TAULA DE CONTINGUTS

ABREVIATURES	V
TAULA DE CONTINGUTS	XI
1. RESUM.....	I
2. INTRODUCCIÓ.....	3
2.1. BIOMARCADORS.....	5
2.1.1. <i>Conceptes.....</i>	5
Què és un biomarcador?	5
Quina és la diferència amb les variables subrogades?	7
2.1.2. <i>Fonts dels biomarcadors</i>	8
Biòpsia de teixit	8
Orina	8
Saliva i llàgrimes	8
LCR.....	8
Sang perifèrica.....	8
2.1.3. <i>Tipus de marcadors en sang perifèrica en malalties immunomediades</i>	9
Marcadors genètics	9
Marcadors proteics	11
Marcadors cel·lulars	14
2.1.4. <i>La citometria de flux com a eina diagnòstica</i>	14
Història de la citometria	15
Aplicacions de la citometria de flux.....	16
Els punts febles de la citometria de flux.....	17
Iniciatives internacionals	19
2.1.5. <i>La citometria de masses, el futur de la citometria de flux?</i>	23
2.2. SUBPOBLACIONS DE LIMFÒCITS T.....	24
2.2.1. <i>Maduració tímica.....</i>	24
2.2.2. <i>Subpoblacions del limfòcit T en perifèria.....</i>	25
2.2.3. <i>Els recents emigrants tímics (RTEs).....</i>	26
2.2.4. <i>Marcadors fenotípics dels limfòcits T.....</i>	27
2.3. SUBPOBLACIONS DE LIMFÒCITS B	32
2.3.1. <i>Maduració dels limfòcits B en la medul·la òssia</i>	32
2.3.2. <i>Subpoblacions de limfòcits B en sang perifèrica</i>	33
2.3.3. <i>Marcadors fenotípics dels limfòcits B</i>	33
2.4. AUTOIMMUNITAT	35
2.4.1. <i>Les malalties autoimmunitàries.....</i>	35
2.4.2. <i>El concepte de Tolerància immunològica.....</i>	36
2.4.3. <i>Tolerància central</i>	36
2.4.4. <i>Tolerància perifèrica</i>	38
2.4.5. <i>Tolerància en els limfòcits B.....</i>	39
2.5. LA MALALTIA DE GRAVES-BASEDOW	40

Taula de continguts

2.5.1. Immunopatogènia.....	41
2.5.2. Etiologia	42
2.5.3. Epidemiologia	42
2.5.4. Marcadors diagnòstics.....	42
2.5.5. Les subpoblacions limfocitàries en sang perifèrica en la malaltia de Graves	43
2.5.6. Tractament.....	44
2.6. L'ESCLEROSI MÚLTIPLE	47
2.6.1. Epidemiologia	47
2.6.2. Manifestacions clíniques.....	47
2.6.3. Etiologia	48
2.6.4. Els biomarcadors en l'EM.....	50
2.6.5. Tractaments per l'EM.....	52
2.6.6. Les subpoblacions limfocitàries en sang perifèrica en l'Esclerosi Múltiple ..	56
2.6.7. Efecte dels tractaments per a l'EM sobre les subpoblacions limfocitàries..	57
3. HIPÒTESI	61
4. OBJECTIUS	65
5. MATERIALS I MÈTODES	69
5.1. DISSENY DE L'ESTUDI:.....	71
5.2. IMMUNOFENOTIPATGE PER CITOMETRIA DE FLUX.....	75
5.2.1. Procediment de la tinció superfície de les mostres de sang perifèrica.....	77
5.2.2. Protocol de comptatge amb PerfectCount:.....	77
5.3. ADQUISICIÓ CITOMÈTRICA.....	79
5.4. ANÀLISI CITOMÈTRIC	79
5.4.1. Anàlisi de la subpoblacions de limfòcits T:.....	80
5.4.2. Anàlisi de la subpoblació Th17:.....	80
5.4.3. Anàlisi de limfòcits T reguladors	80
5.4.4. Anàlisi de subpoblacions de limfòcits B transicionals, plasmablasts i limfòcits Breg	86
5.4.5. Anàlisi de subpoblacions de limfòcits B naïve i memòria.....	86
5.5. ANÀLISI ESTADÍSTIC.....	86
6. RESULTATS	89
6.1. CAPÍTOL 1: DISTINCT PATTERN OF PERIPHERAL LYMPHOCYTE SUBPOPULATIONS IN GRAVES' DISEASE PATIENTS WITH PERSISTENCY OF ANTI-TSHR AUTOANTIBODIES	91
6.2. CAPÍTOL 2: MULTIPARAMETRIC FLOW CYTOMETRIC ANALYSIS OF WHOLE BLOOD REVEALS CHANGES IN MINOR LYMPHOCYTE SUBPOPULATIONS OF MULTIPLE SCLEROSIS PATIENTS.....	115
6.3. CAPÍTOL 3: BASELINE DIFFERENCES IN MINOR LYMPHOCYTE SUBPOPULATIONS MAY PREDICT RESPONSE TO FINGOLIMOD IN RELAPSING–REMITTING MULTIPLE SCLEROSIS PATIENTS. 127	

Taula de continguts

TENIENTE-SERRA A, HERVÁS JV, QUIRANT-SÁNCHEZ B, MANSILLA MJ, GRAU-LÓPEZ L, RAMO-TELLO C, MARTÍNEZ-CÁCERES EM. CNS NEUROSCI THER. 2016 JUL;22(7):584-92	127
7. DISCUSSIÓ GENERAL.....	147
8. CONCLUSIONS	161
9. BIBLIOGRAFIA.....	165

1. RESUM

En els darrers anys hi hagut un important desenvolupament en el camp de la recerca biomèdica que ha portat a la necessitat de definir nous biomarcadors tant de diagnòstic, pronòstic com de seguiment de les malalties i de resposta terapèutica.

La citometria de flux multiparamètrica s'ha posicionat com una de les tecnologies més útils per al monitoratge de les malalties immunomediades, permeten un anàlisi detallat i exhaustiu de les subpoblacions limfocitàries minoritàries en sang perifèrica.

En aquest treball s'ha abordat l'estudi de les subpoblacions limfocitàries minoritàries com a marcadors en sang perifèrica en malalties autoimmunitàries organoespecífiques, en concret en la malaltia de Graves-Basedow i en l'Esclerosi múltiple.

En pacients amb malaltia de Graves-Basedow s'ha buscat quin patró de subpoblacions limfocitàries diferenciava aquells pacients en els que tot i estar clínicament estable es manté la presència d'autoanticossos, d'aquells pacients en què els autoanticossos han negativitzat.

En l'Esclerosi Múltiple, s'han analitzat els canvis en les subpoblacions limfocitàries en sang perifèrica de pacients amb Esclerosi Múltiple Remitent Recurrent sense tractament i amb formes progressives, comparat amb donants sans. També s'ha realitzat un estudi observacional en el que s'ha analitzat la influència dels tractament immunomoduladors sobre les subpoblacions limfocitàries.

A més, s'ha fet un seguiment longitudinal durant 12 mesos en un subgrup de pacients amb Esclerosi Múltiple que iniciaven tractament amb fingolimod, un agonista del receptor de l'esfingosina-1P que reté els limfòcits en els ganglis limfàtics. S'ha identificat els patrons limfocitaris a temps basal que diferencien els pacients que han fet bona resposta al tractament dels que no.

Es resultats recolzen que la caracterització fenotípica de subpoblacions limfocitàries minoritàries en sang perifèrica per citometria de flux és una eina útil que permet identificar possibles biomarcadors per al diagnòstic i resposta al tractament de les malalties autoimmunitàries organoespecífiques i, per extensió, d'altres malalties immunomediades.

2. INTRODUCCIÓ

2.1. BIOMARCADORS

El gran avenç en el coneixement dels mecanismes patogènics involucrats en les malalties immuno-mediades que s'ha produït en els darrers anys ha portat al desenvolupament de noves teràpies biològiques que actuen de manera selectiva sobre components del sistema immunitari. A més, ha esdevingut evident el fet que pacients amb el mateix diagnòstic poden diferenciar-se en diferents fenotips tant pel que fa a la presentació clínica de la malaltia com en la progressió i resposta a la teràpia.¹

Poder disposar de marcadors biològics que permetin estratificar els diferents individus afectats per aquestes les malalties i poder escollir de manera personalitzada la millor estratègia terapèutica per a cada pacient s'ha convertit en un dels objectius principals en el camp de la recerca biomèdica.²

2.1.1. Conceptes

Tot aquest desenvolupament en la recerca translacional enfocat a trobar biomarcadors per a estudis clínics, ha portat a la necessitat de definir la terminologia utilitzada en aquest camp. Per això el 2015 es va crear el grup "Biomarkers, EndpointS, and other Tools (BEST)" format per membres del NIH i la FDA. Aquest grup de treball ha publicat un glossari amb la finalitat de definir la terminologia a emprar en la recerca biomèdica i la pràctica clínica:³

Què és un biomarcador?

Un biomarcador és una característica definida que es pot mesurar com a indicador de processos biològics normals, processos patogènics o resposta a una exposició o intervenció (incloent intervencions terapèutiques). Els biomarcadors poden ser característiques moleculars, histològiques,

radiològiques o fisiològiques. No són indicadors de com un individu se sent, funciona o viu.⁴

El grup de treball BEST en el seu glossari defineix diferents **categories de biomarcadors**:⁴

- **Biomarcadors de risc o susceptibilitat**: indiquen el potencial de desenvolupar una malaltia o afecció mèdica o sensibilitat a una exposició, en un individu sense una malaltia o afecció mèdica clínicament evident.
- **Biomarcadors diagnòstics**: s'utilitzen per a identificar individus amb una malaltia, o condició d'interès, o per a definir un subgrup d'una malaltia.
- **Biomarcadors de monitoratge**: es mesuren seriadament i s'utilitzen per a detectar canvis en el grau o extensió d'una malaltia. També es poden utilitzar per a indicar toxicitat o estudiar seguretat, o bé per a evidenciar una exposició, incloent l'exposició a productes mèdics.
- **Biomarcadors de pronòstic**: s'utilitzen per a identificar la probabilitat d'un esdeveniment clínic, una recaiguda o la progressió d'una malaltia.
- **Biomarcadors predictius**: s'utilitzen per a identificar entre individus similars aquells que experimentaran un efecte favorable o desfavorable com a conseqüència d'una exposició o intervenció.

- **Biomarcadors de resposta o farmacodinàmics:** s'utilitzen per a mostrar una resposta biològica que s'ha produït en un individu que ha rebut una intervenció o exposició.
- **Biomarcadors de seguretat:** s'utilitzen per a indicar la presència o abast d'una toxicitat relacionada amb una intervenció o exposició.

Quina és la diferència amb les variables subrogades?

Els **surrogate endpoints** o **variables subrogades** són criteris de valoració que s'utilitzen en els assaigs clínics com a substituïts de la mesura directa de com un individu se sent, funciona o viu. No mesuren el benefici clínic de principal interès en sí, però s'espera que pugui predir el benefici o dany basat en evidències epidemiològiques, terapèutiques, patofisiològiques o altres.⁴

Es classifiquen pel seu grau de validació clínica en:

- Variables subrogades validades
- Variables subrogades amb probabilitat raonable
- Variables subrogades candidates

En la pràctica, els biomarcadors inclouen diferents eines i tecnologies que ajuden en la predicció, causa, diagnòstic, progressió, regressió o evolució d'un tractament o d'una malaltia. La identificació de nous biomarcadors pot arribar a portar a descriure noves entitats amb presentacions clíniques similars i ser de gran utilitat, no tan sols en el diagnòstic i prognòstic d'una malaltia, sinó també en la predicció o monitoratge de la resposta al tractament dels pacients.¹

2.1.2. Fonts dels biomarcadors

Biòpsia de teixit: Poder estudiar directament el teixit afectat és la manera més directa de veure què és el que està passant i obtenir biomarcadors útils. Malauradament, la biòpsia és el procediment més invasiu per al pacient, fet que fa necessari buscar altres fonts de biomarcadors que donin informació i siguin menys invasives. Una excepció són la pell i mucoses que són teixits de fàcil accés pel que seguiran sent fonts útils de biomarcadors.^{1, 5}

Orina: és la mostra més fàcil i menys invasiva de recollir, i té un potencial important per a la identificació de biomarcadors renals. L'inconvenient de l'orina és que la seva producció, en quant a volum i concentració, és molt variable i per això dificulta molt poder obtenir biomarcadors quantificables.⁵

Saliva i llàgrimes: són fluids més fàcils d'obtenir de forma poc invasiva, però es produeixen en quantitats petites i limitades i això fa que no siguin una bona font d'obtenció de biomarcadors.⁵

LCR: aporta molta informació en les malalties neurològiques, com és l'Esclerosi Múltiple, però s'obté per punció lumbar que és un procediment invasiu i amb possibles efectes adversos per al pacient.

Sang perifèrica: la sang perifèrica és una mostra poc invasiva i permet poder mesurar els seus components de una forma més o menys fàcil i amb poca variabilitat en el seu volum i concentració.^{1-2, 5} Tot i això s'ha de tenir en compte que la seva composició no és la mateixa durant tot el dia sinó que certs components, com són els leucòcits, varien amb el ritme circadiari.⁶

En aquest sentit, pel que fa a les malalties immunomediades la inaccessibilitat al teixits afectats, en la majoria d'elles, fa que sigui difícil monitoritzar la

progressió de la malaltia i la resposta del pacient a la teràpia. L'estudi per imatge de les lesions patològiques seria, en molts dels casos, una de les opcions que donaria més informació per a la monitorització de l'òrgan diana d'aquestes malalties, però el fet de que es tracti de tècniques cares i, en alguns casos, amb ús de radioactivitat fa que el seu ús sigui poc factible en la pràctica clínica. Aquesta limitació ha fet que moltes vegades la forma més senzilla i menys invasiva per al pacient sigui estudiar els diferents components de sang perifèrica que podrien actuar com a marcadors indirectes de la patologia en l'òrgan diana.¹⁻²

Taula 1. Tipus de biomarcadors, tècniques, fonts i aplicacions²

Tipus de biomarcador	Tècniques de detecció	Font del biomarcador	Aplicació
Patrons d'expressió gènica	Arrays gènics o de proteïnes	Teixit malalt o afectat	Prognòstic
Epigenètica	RT-PCR	Teixit limforeticular	Predictiu
SNPs	Seqüenciació	Sang perifèrica	Diagnòstic
mRNAs	ELISA	(PBMcs, sèrum o plasma)	Classificació malaltia
miRNAs	Microscopia	Orina	Monitoratge
RNA no codificant	Imatge	LCR	Orientació tractament
Metagenòmica	Citometria de flux	Líquid sinovial	Monitoratge terapèutic
Proteïnes		Líquid pleural	Variables subrogades
Proteòmica		Saliva	
Metabòlits			
Citocines			
Marcadors cel·lulars			
Marcadors histològics			

2.1.3. Tipus de marcadors en sang perifèrica en malalties immunomediades

Marcadors genètics

En estudis realitzats en famílies s'ha vist que l'associació en germans bessons monozigots és més forta que en els dizigots o altres germans i han donat la noció de que els factors genètics tenen un paper en el desenvolupament de les malalties immunomediades.⁷⁻⁹ Tot i això, se sap que independentment d'aquesta susceptibilitat genètica, les malalties immunomediades es donen

sempre en el context d'una interacció complexa entre el sistema immunitari, factors ambientals i, de vegades, factors microbiològics.

Gens HLA

L'associació genètica més forta s'ha trobat en els gens del complex major d'histocompatibilitat (MHC), que es troba en el cromossoma 6p21, i en concret en la regió HLA.¹⁰⁻¹² Per exemple, més del 90% dels pacients amb espondilitis anquilosant són HLA-B27 i més del 90% dels pacients celíacs són HLA-DQ2.⁷

Gens no HLA

Els gens CTLA-4 i PTPN22, són els gens no-HLA que més fortament s'han associat amb susceptibilitat a patir malalties autoimmunitàries. Tot i que el seu paper pot semblar contradictori, podent ser tant protector com de predisposició, segons la patologia.⁷⁻⁸

Existeixen diferents estratègies per a la recerca de biomarcadors genètics:⁵

Microarrays d'expressió gènica

És la tècnica més utilitzada ja que permeten analitzar centenars de gens, identificant aquells que poden ser potencials biomarcadors (ja que s'expressen de manera diferenciada en un grup d'individus) i que després es podran quantificar per altres tècniques, com pot ser la RT-PCR.¹³

Perfils de miRNA

Els microRNAs (miRNA) són RNA de petit tamany, cadena simple, no codificants que regulen l'expressió gènica.¹⁴ Són reguladors post-transcripcionals d'alguns RNA missatgers.¹⁵ S'han identificat com a reguladors del desenvolupament de les cèl·lules del sistema immunitari i s'ha vist que es troben involucrats en la patogènia de malalties immunomediades.¹⁴ Els miRNA

es troben en sang perifèrica en quantitats suficients per a poder-los mesurar i es postulen com a possibles biomarcadors.²

Estudis d'associació genòmica (GWAS) permeten identificar SNPs en petites quantitats de DNA. La identificació d'aquests polimorfismes que s'associïn a un grup d'individus en concret ha permès la identificació d'un elevat nombre de possibles biomarcadors en diferents malalties immunomediades.⁷

Totes aquestes estratègies i el desenvolupament tecnològic que s'ha produït en aquest camp en els últims anys, ha portat a identificar potencials biomarcadors però que encara requereixen d'estudis posteriors que confirmin la seva utilitat clínica. Un altre dels punts febles dels marcadors genètics és que l'expressió d'un gen no sempre es relaciona amb la de la proteïna.^{2, 16}

Marcadors proteics

Les proteïnes juguen un paper molt important en els processos fisiològics i patològics i fins al moment han sigut les molècules més utilitzades com a biomarcadors.

Les famílies de proteïnes amb un paper important en la resposta immunològica i per tant, possibles biomarcadors per a les malalties immunomediades són:

Anticossos

Moltes de les malalties autoimmunitàries, com són el lupus eritematós sistèmic, l'artritis reumatoide o la malaltia mixta del teixit connectiu, inclouen en els seus criteris diagnòstics la detecció d'autoanticossos. Tenen un paper molt important en les malalties autoimmunitàries com a biomarcadors per al

Taula 2. Autoanticossos utilitzats en el diagnòstic de malalties autoimmunitàries ¹⁷

Autoantibody	Disease	Sensitivity (%) / Specificity (%)	Assay
dsDNA	SLE DIL*	45–60/80–90	IIF, ELISA, IP
Sm (U2-U4-6 RNP)	SLE	10–20/95	ELISA, ID, IP
U1RNP	MCTD	90/90–95	ELISA, ID, IP
	SLE	40/30	
SS-A/Ro 60	SjS	50–70/80	ELISA, ID, IP
	SLE	45/25	
SS-B/La	SjS	40/70–90	ELISA, ID, IP
	SLE	15/10	
Histone/chromatin	SLE	70/20	ELISA, IB
	DIL	80/20	
Topoisomerase I/Scl-70	SSc	20/90	ELISA, IB, IP
U3 RNP/fibrillarin	SSc	15/95	IIF, IP
Centromere	SSc	50–60/90	IIF, ELISA, IB
Jo-1/histidyl tRNA synthetase	PM/DM	20–30/90–95	ELISA, IB
Citrullinated peptides and proteins	RA	65–85/85–95	ELISA
Proteinase 3	Wegener's granulomatosis	60–70/90–95	ELISA, IB, IIF (cANCA)
Myeloperoxidase	MPA	65/80	ELISA, IIF (pANCA)
Pyruvate dehydrogenase complex (M2)	PBC	75–80/85	IIF, IB, ELISA, IP
Smooth muscle F-actin	Chronic active hepatitis	70/25	IIF, ELISA
Intrinsic factor	Pernicious anemia	90/70	IIF, ELISA
Human tissue transglutaminase	Celiac disease	85/90	IIF, ELISA
Cardiolipin complex	APS	80/50	ELISA
β2-glycoprotein I	APS	80/90	ELISA
Basement membrane (α3 domain of type IV collagen)	Anti-GBM disease (Goodpasture syndrome)	80/80	IIF, ELISA
Acetylcholine receptor	Myasthenia gravis	80/90	ELISA, IB
Thyroid microsomes (thyroid peroxidase)	Hashimoto's thyroiditis	90/75	IIF, ELISA
Cadherins	Pemphigus vulgaris	90/90	IIF
Skin basement membrane zone	Bullous pemphigoid	80/80	IIF
Yo/Purkinje cell	PCD	70/95	IIF, IB
Hu	PEM	70/90	IIF, IB, IP

APS, antiphospholipid syndrome; cANCA and pANCA, cytoplasmic and perinuclear antineutrophil cytoplasmic antibodies; DIL, drug-induced lupus; ELISA, enzyme-linked immunoassay; IB, immunoblot; IIF, indirect immunofluorescence; IP, immunoprecipitation; MCTD, mixed connective tissue disease; MPA, microscopic polyangiitis; PBC, primary biliary cirrhosis; PCD, paraneoplastic cerebellar degeneration; PEM, paraneoplastic encephalomyelitis; PM, polymyositis; RNP, ribonucleoprotein; SjS, Sjögren syndrome; SLE, systemic lupus erythematosus; SSc, systemic sclerosis; TNF, tumor necrosis factor.

*Some RA patients treated with anti-TNF or sulfasalazine develop features of drug-induced lupus and anti-dsDNA antibodies.

diagnòstic, pronòstic o de seguiment de la malaltia. L'espectre d'autoanticossos descrits com a biomarcadors és molt ampli i està en continu desenvolupament. A la taula 2 es mostren alguns dels autoanticossos més utilitzats en la pràctica clínica.¹⁷ Les tècniques més utilitzades per a la detecció i/o quantificació d'aquests autoanticossos són la immunofluorescència indirecta, els immunoblots, els ELISAs i recentment també la quimioluminiscència. Tot i que són tècniques comercialitzades i que cada

vegada es troben més estandarditzades i automatitzades encara existeix una elevada variabilitat entre elles.

Citocines

Són proteïnes solubles de baix pes molecular que són secretades per cèl·lules, tant del sistema immunitari com no immunitàries. Tenen un efecte molt potent ja que posen en marxa moltes cascades d'activació, desencadenant tant processos inflamatoris com anti-inflamatoris, trobant-se implicades en molts processos patològics. Poden actuar tant a nivell autocrí com paracrí, i algunes vegades endocrí. Al actuar a nivell de l'ambient extracel·lular es troben en baixes concentracions i això fa que la seva quantificació en sang perifèrica moltes vegades sigui complicada.¹⁸⁻¹⁹

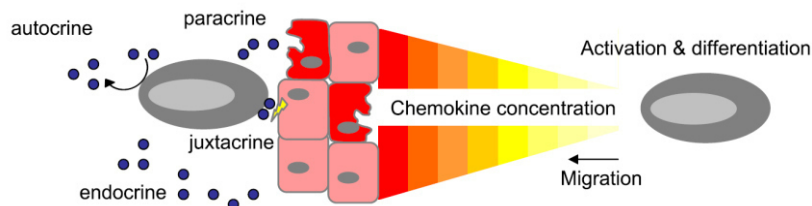


Figura 1. Funció general de les citocines. Les citocines quan són secretades poden actuar a nivell autocrí, paracrí, endocrí i juxtacrí. També poden actuar induïnt la migració, activació i diferenciació cel·lular del teixit danyat o inflammat. (Font: Keustermans et al. Methods, 2013²⁰)

Les diferents plataformes tecnològiques que existeixen actualment en el mercat per a la detecció de citocines en sèrum (Luminex, CBA o ELISA) presenten una elevada variabilitat, tant entre plataformes, com entre

laboratoris.¹⁸ A més, s'ha vist que canvis mínims en el procés preanalític de les mostres com són el tipus d'anticoagulant que tingui el tub de recollida de mostra, el temps que passa fins que es processa la mostra i el temps i condicions d'emmagatzematge generen variabilitat en els resultats.²⁰

Per tant, fins que no es desenvolupin tecnologies capaces de detectar amb millor precisió les citocines en sang perifèrica, la seva utilització com a biomarcadors s'ha d'interpretar amb molta cura.

Marcadors cel·lulars

Els biomarcadors cel·lulars és un altre dels camps en continua expansió i desenvolupament dins de la recerca translacional. Les cèl·lules que trobem en sang perifèrica són moltes vegades un indicador del que està passant en els teixits diana o de quins processos patològics s'estan donant lloc en una malaltia. La citometria de flux ha esdevingut una eina crucial en el descobriment i definició de subpoblacions limfocitàries minoritàries, que han permès augmentar notablement el nostre coneixement dels processos patològics, i es postulen com uns dels biomarcadors en sang perifèrica per a immunomonitoritzar aquestes patologies.^{2, 5} Un exemple de biomarcador de gran utilitat en la pràctica clínica és el monitoratge dels limfòcits T CD4⁺ en els pacients infectats pel virus del VIH.

2.1.4. La citometria de flux com a eina diagnòstica

En els últims anys el desenvolupament de la citometria de flux ha permès que es transformés en una de les eines més utilitzades en els laboratoris diagnòstics i d'investigació arreu del món.²¹

Història de la citometria

La citometria de flux va néixer de la necessitat de tenir un sistema de comptatge de cèl·lules més automatitzat que la microscòpia. Els primers comptadors automatitzats van aparèixer entre els anys 1930 i 1940. Va ser el 1949 quan W. Coulter va desenvolupar el primer comptador cel·lular basat en la mesura del canvi de potencial que es produeix quan les cèl·lules passen per un orifici.²² En el principi Coulter és en el que encara es basen els actuals comptadors hematològics que existeixen en el mercat. El 1953, Crossland-Taylor va introduir l'ús de la càmera de flux, basat en les teories de flux de Reynolds, que van permetre un millor flux de les cèl·lules per els capil·lars.²³

Va ser en els anys 1960 quan van aparèixer els primers citòmetres de flux. El desenvolupament que es va produir en les següents dècades amb els primers citòmetres comercials als anys 1970 i l'arribada dels Ac monoclonals el 1975, va permetre que als anys 1980 la citometria de flux estigués implementada en la majoria de laboratoris.²⁴

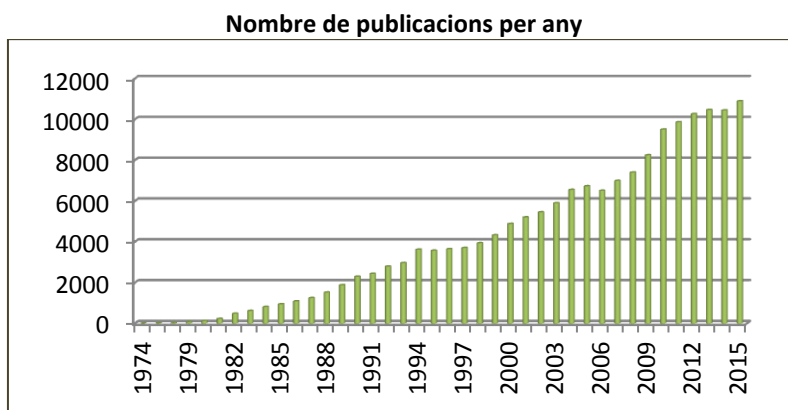


Figura 2. El desenvolupament de la citometria de flux. El desenvolupament tecnològic que s'ha produït en la citometria de flux s'ha vist reflectit en un increment en el nombre de publicacions a l'any. Dades extretes de PubMed.gov.

Els primers citòmetres permetien l'anàlisi de 2 paràmetres a la vegada, la millora tecnològica va permetre el pas a anàlisis de 4 fluorocroms, i ja en la última dècada, l'aparició de citòmetres amb 3 o més làsers permeten l'anàlisi de més de 18 paràmetres a la vegada. Aquest avenços tecnològics s'han anat produint en paral·lel amb la detecció i caracterització de noves subpoblacions leucocitàries minoritàries en sang perifèrica que fins fa pocs anys eren pràcticament desconegudes.²⁵

Aplicacions de la citometria de flux

La citometria de flux permet mesurar múltiples paràmetres, tant de fenotip com de funcionalitat, en un elevat nombre de cèl·lules a nivell individual. Aquest fet fa que sigui una tècnica amb diverses utilitats, incloent el monitoratge del sistema immunitari i recerca de biomarcadors.²⁶ Alguns exemples de les moltes aplicacions per a les que s'utilitza la citometria de flux, a part de l'estudi de fenotips per marcatge de proteïnes de superfície, són:

- Identificació de limfòcits T antígen-específiques amb tetràmers.²⁷
- Tinció intracel·lular de citocines o de factors de transcripció.
- Mesura de la proliferació cel·lular en sang total ²⁸ o bé en PBMCs mitjançant la mesura de colorants vitals com el CFSE.²⁹
- Altres proves funcionals per al diagnòstic per exemple d'immunodeficiències primàries, com la capacitat oxidativa de fagòcits per a la malaltia granulomatosa crònica,³⁰ o de reaccions d'hipersensibilitat tipus I amb el test d'activació de basòfils.³¹

Els punts febles de la citometria de flux

Hi ha diferents punts en els estudis de citometria de flux que poden ser font d'una elevada variabilitat en els resultats i poden dificultar l'extrapolació dels resultats obtinguts en diferents estudis.

El tipus de mostra, és important tenir en compte que l'expressió de molts marcadors varia si s'utilitza sang total, PBMCs frescos o criopreservats.²⁶

El tipus de molècula que es vol estudiar, variarà de si es tracta d'una marcador de superfície o intracel·lular, i del grau d'expressió que tingui.

S'ha de tenir també molt en compte la temperatura i el temps de conservació de la mostra des de l'extracció fins al seu processament ja que afecten a l'estabilitat de la mostra.³²

El processament de la mostra també és una font de variabilitat. És una tècnica molt manual la qual cosa fa que es produeixi moltes variabilitat entre operadors.³³

Elecció dels reactius. Un dels punts claus a l'hora de definir un panell de citometria és valorar els millors reactius, seleccionant la millor clona i millor fluorocrom per a cadascun dels marcadors que volem estudiar.²⁶

Posada a punt de l'equip. El citòmetre ha de tenir els voltatges i calibracions adequades, que ens permetin diferenciar amb la millor resolució les subpoblacions a estudi.³³

L'anàlisi de les mostres és manual i per tant amb un alt grau de subjectivitat. Per a això és important que si es realitza l'anàlisi manual el realitzi una persona amb expertesa en l'àrea i en aquells marcadors més conflictius utilitzar controls de positivitat (fluorescence minus one -FMO- o amb poblacions internes de referència).³³

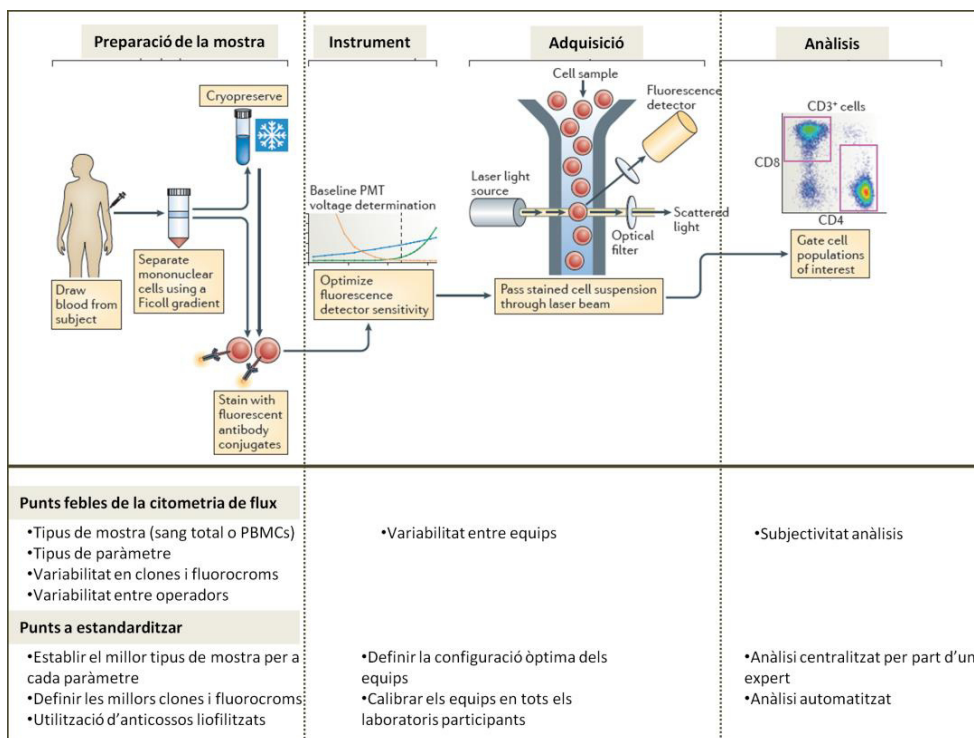


Figura 3. Esquema del protocol d'anàlisi per citometria de flux. Existeixen diferents

punts febles durant el protocol d'anàlisi d'una mostra per citometria de flux. L'objectiu de moltes iniciatives internacionals és estandarditzar els protocols per a millorar-los. Adaptat de Maecker et al, Nat Rev Immunol 2012 ²⁶

Tots aquests inconvenients han portat a la necessitat estandardització de tots els punts del procés. Algunes de les solucions que es plantegen i s'estan començant a posar en marxa en els laboratoris per a aquests problemes són:

Sempre tenir en compte la millor mostra per als marcadors que volem estudiar.

Per a eliminar la variabilitat per al processament de mostres es poden utilitzar reactius liofilitzats.³⁴ Es tracten de plaques o tubs comercialitzats que contenen liofilitzats els anticossos i fluorocroms que volem estudiar.

Posada a punt de l'equip. És molt important que els citòmetres es trobin en habitacions amb temperatures estables. Canvis bruscos en l'entorn de l'equip poden generar variabilitat en els resultats. L'estandardització dels citòmetres actuals és relativament fàcil de portar a terme. Existeixen diferents reactius comercials que serveixen per a calibrar l'equip, establir els voltatges i compensacions amb què s'ha de treballar, així com controls de qualitat diaris que ens indiquen que l'equip treballa en les condicions adequades.^{25, 33}

Anàlisis automatitzats. S'estan desenvolupant eines bioinformàtiques per fer un anàlisi computacional dels estudis multiparamètrics per citometria de flux. Aquestes eines informàtiques s'estan començant a utilitzar en alguns estudis multicèntrics, moltes vegades comparant els resultats amb els anàlisis manuals. Aquests programes apliquen diferents algorismes matemàtics i els apliquen a la hora d'interpretar la positivitat sobre els diferents fluorocroms. Actualment, els programes que existeixen són en llenguatges informàtics (tipus R, Java o Matlab). Probablement aquest és major impediment que fa que encara no s'utilitzin de forma rutinària en la majoria de laboratoris.^{24, 33, 35}

Iniciatives internacionals

La utilitat de la citometria de flux en els laboratoris de diagnòstic està clarament instaurada en els seguiment d'infecció per VIH i en l'immunofenotipatge de leucèmies i limfomes, però en els darrers anys està emergint també com una eina molt útil en la monitorització de malalties immunomediades, tant el diagnòstic com en el seguiment de tractaments.²¹ En aquest sentit han aparegut diferents iniciatives a nivells internacional per tal

d'estandarditzar el que s'ha denominat *l'immunotip humà*. La principal finalitat d'aquestes iniciatives és aconseguir un consens en la definició i caracterització de les subpoblacions limfocitàries que es troben en sang perifèrica de manera que els resultats obtinguts en diferents laboratoris es puguin extrapolar permetent una millor monitorització dels pacients.^{26, 36-38} A la taula 3 es mostren les característiques metodològiques de les principals iniciatives internacionals que tenen com a objectiu l'estandardització de la citometria de flux.

L'exemple clar de consorci que porta anys treballant és **Euroflow** (<http://www.euroflow.org/usr/pub/pub.php>). Aquest és un consorci d'experts en citometria, dins del ESLHO (European Scientific foundation for Laboratory HematoOncology). El principal objectiu en els anys que porten treballant junts és el desenvolupament i estandardització de tècniques per citometria de flux ràpides, precises i amb elevada sensibilitat per al diagnòstic i pronòstic de malalties hematològiques malignes així com per a l'avaluació de l'efectivitat dels tractaments.³⁹⁻⁴⁰ Actualment, també estan treballant en definir un algoritme per al diagnòstic de les immunodeficiències primàries.

Human ImmunoPhenotyping Consortium (HIPC) és un projecte desenvolupat per la Federation of Clinical Immunology Societies (FOCIS). El seu objectiu és promoure l'estandardització en estudis clínics de l'immunofenotipatge per citometria de flux. Han dissenyat una sèrie de panells multiparamètrics que permetin avaluar la majoria de les subpoblacions limfocitàries (en PBMCs criopreservades) i han treballat en l'estandardització de tot el procés per tal d'avaluar la reproductibilitat entre laboratoris.^{26, 41}

Dintre de la xarxa de centres FOCIS a nivell europeu, es va establir l'acció COST **European Network for Translational Immunology Research and Education (ENTIRE; <http://entire-net.eu/>)**. Els objectius d'aquesta iniciativa es centren en

definir un panell de paràmetres que permetin analitzar el perfil immunològic (basat en el de l'HIPC però en aquest cas es realitza en sang total), estudiar aquests paràmetres en una cohort de donants sans per a establir rangs de referència i poder aplicar aquests panells en el seguiment de diferents malalties i estudis clínics.³⁷

The ONE Study Consortium (<http://www.onestudy.org/>) és un projecte per a avaluar en estudis multicèntrics l'eficàcia de la teràpia cel·lular en la inducció de tolerància en transplantament renal, com a adjuvant de les teràpies immunosupressores convencionals. Amb aquest objectiu han dissenyat i estandarditzat uns panells per a fenotipar les subpoblacions limfocitàries en sang perifèrica, que serviran per al monitoratge d'aquests pacients.³⁸

The Milieu Intérieur Consortium (<http://www.milieuinterieur.fr/en>) és un projecte francès que té per a objectiu determinar la variabilitat immunològica i poder establir quins són els valors de normalitat per una persona "sana". S'han inclòs 1000 voluntaris, 500 dels quals se'ls ha realitzat recollida de mostres en dues visites separades entre 14 i 42 dies. Es va recollir mostres de sang total, orina, femta, exsudat nasal i en alguns casos es va realitzar biòpsia cutània. L'objectiu ha sigut realitzar estudis genòmics, de caracterització fenotípica per citometria de flux, producció de citocines i anàlisis metagenòmics de les poblacions bacterianes, fúngiques i víriques en femta i exsudats nasals.⁴²⁻⁴⁵

The Immunotolerance Network (ITN; <https://www.immunetolerance.org/>) està formada per els instituts d'al·lèrgologia i malalties infeccioses del NIH. El seu objectiu és entendre i aconseguir establir un estat de tolerància immunològica en les malalties immunomediades i treballen en la recerca de biomarcadors per a aconseguir-ho. Han establert diferents protocols estandarditzats⁴⁶ per a la valoració de paràmetres immunològics, entre els quals es troben estudis per citometria de flux.

Taula 3. Principals iniciatives internacionals per a l'estandardització de la citometria de flux

Iniciativa	Característiques	Subpoblacions estudiades	Marcadors utilitzats
The ONE Study	Estudi multicèntric	Perfil leucocitari	CD45/CD3/CD4/CD8/CD19/CD16/CD56/CD14/CD64
	Mostra: sang total	Subpoblacions T αβ/Tyδ	CD45/CD3/CD4/CD8/CD45RO/TCRαβ/TCRγδ
	Tècnica: local Ac liofilitzats	Activació limfòcits T	CD45/CD3/CD4/CD8/CD45RA/CD27/CD28/CD57/HLA-DR
	Anàlisi: manual centralitzat	Limfòcits T memòria i reguladors	CD45/CD3/CD4/CD8/CD45RA/CD62L/CCR7/CD25/CD127
		Subpoblacions limfòcits B*	CD45/CD19/IgD/IgM/CD27/CD21/CD24/CD38
The <i>Milieu Intérieur</i> Consortium		Cèl·lules dendrítiques	CD45/LIN/CD16/CD11c/CD123/BDCA2/BDCA3/HLA-DR
	Estudi unicèntric	Llinatge	CD45/CD3/CD4/CD8b/CD19/CD14/CD56/CD16
	Mostra: sang total	Polimorfonuclears	CD62L/FVD/FCeR1a/CDw125/CD16/CD32/CD203c
	Tècnica: semiautomatitzada	Limfòcits T	CD3/CD4/CD8a/CD8b/CD27/CCR7/HLA-DR/CD45RA
	Anàlisi: automatitzat	Cèl·lules dendrítiques	CD3/CD19/CD14/FVD/CD1c/CD301/HLA-DR/CD86/CD304/CD141
Human Immunophenotyping Consortium (HIPC)	Estudi multicèntric	Limfòcits T [?]	CD3/CD4/CD8/CD45RA/CCR7/CD38/HLA-DR
	Mostra: PBMCs congelats	T reguladors [?]	CD3/CD4/CD127/CD25/CD45RO/CCR4/HLA-DR
	Tècnica: local Ac liofilitzats	Limfòcits B [?]	CD19/CD20/CD3/IgD/CD27/CD24/CD38
	Anàlisi: manual centralitzat	DC/mono/NK [?]	CD3/CD19/CD20/CD16/CD56/CD14/HLA-DR/CD123/CD11c
	vs automatitzat	Th1/Th2/Th17 [?]	CD3/CD4/CD8/CXCR3/CCR6/CD38/HLA-DR
European Network for Translational Immunology Research Education (ENTIRE)	Estudi multicèntric	Limfòcits T	CD45/CD3/CD4/CD8/CD45RA/CCR7/CD38/HLA-DR/CXCR3/CCR6
	Mostra: sang total	T reguladors	CD45/CD3/CD4/CD127/CD25/CD45RO/CCR4/HLA-DR
	Tècnica: local Ac liofilitzats	Limfòcits B	CD45/CD19/CD20/CD3/IgD/CD27/CD24/CD38
	Anàlisi: manual centralitzat	DC/mono/NK	CD45/CD3/CD19/CD16/CD56/CD14/HLA-DR/CD123/CD11c/Slan

* rentat sang per a eliminar IgD i IgM; [?] marcatge de viabilitat

2.1.5. La citometria de masses, el futur de la citometria de flux?

En els darrers anys s'ha desenvolupat una nova plataforma tecnològica que fusiona la citometria de flux i l'espectrometria de masses. El funcionament és molt similar al d'un citòmetre de flux actual. La principal diferència és que els anticossos es troben conjugats a polímers que porten units isòtops del grup de metalls de les terres rares (freqüentment lantànids). Les cèl·lules tenyides són nebulitzades en gotes que contenen una sola cèl·lula i introduïdes en el plasma que les ionitza i l'espectròmetre de masses quantifica les partícules ionitzades.

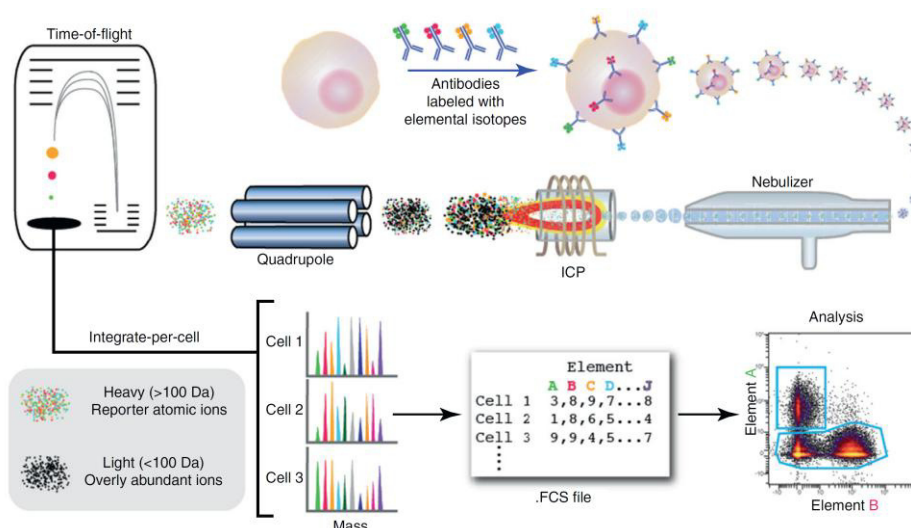


Figura 4. Esquema de funcionament d'un citòmetre de masses. Els anticossos marcats amb isòtops de metalls pesats s'uneixen a les cèl·lules, les quals s'introdueixen en el plasma per a quantificar els isòtops per espectrometria de masses. Les senyals de cada element es correlacionen amb el marcador corresponent i s'analitzen en les plataformes de citometria convencionals (Font: Bendall et al. Trends in Immunology, 2012 ⁴⁷)

Actualment existeix un equip en el mercat (desenvolupat per la Universitat de Toronto i comercialitzat per DVS Sciences) que és el CyTOF, el qual permet la detecció simultània de més de 30 marcadors (potencialment podria fins a >100).⁴⁷⁻⁴⁸

La citometria de masses té una alta sensibilitat (ja que al ser metalls que no es troben en el nostre medi, es disminueix molt la senyal de fons), i la gran avantatge respecte a la citometria de flux convencional és que la senyal que genera no es sobreposa, evitant així un dels grans problemes dels fluorocroms, i per tant, no fa falta compensar el citòmetre.²⁵

Al poder quantificar tants paràmetres a la vegada es poden fer marcatges de superfície a la vegada que intracel·lulars, com per exemple de fosforil·lació de proteïnes. D'aquesta manera permet l'anàlisi en un sol tub de totes les subpoblacions cel·lulars minoritàries i a la vegada, de cadascuna d'aquestes, analitzar una gran quantitat de proteïnes intracel·lulars que podran definir l'estat d'activació d'aquella cèl·lula.⁴⁸ Però el fet que porti poc temps al mercat fa que encara hi hagi poca experiència en aquest camp i presenta un elevat cost econòmic, fets que actualment fan difícil la translació d'aquesta tecnologia a la pràctica clínica.

2.2. SUBPOBLACIONS DE LIMFÒCITS T

2.2.1. Maduració tímica

Els precursors hematopoètics multipotencials entren en el timus on reben senyals per a diferenciar-se a llinatge T. En l'estadi més indiferenciat (DN) pateixen diferents divisions fet que suposa una important expansió dels precursors de limfòcits T dels quals només un 5% sobreviuran al procés de selecció que transcorre en el timus i sortiran la perifèria. El primer punt de

selecció es produeix en funció de la senyal del pre-TCR (format per una cadena substitutiva i una cadena β) de manera que s'assegura que progressaran a $CD4^+CD8^+$ (DP) aquells timòcits DN que hagin reordenat correctament el locus β del TCR. Quan els timòcits ja són DP i han reordenat el locus α del TCR, les següents decisions es regeixen per la interacció entre el TCR i el pèptid o lligands de les cèl·lules estromals del timus. En la selecció positiva, els timòcits DP interaccionaran amb les cèl·lules tímiques epitelials corticals (cTEC), les que siguin capaces de reconèixer el MHC propi amb una avidesa intermèdia passaran a timòcits $CD4^+$ o $CD8^+$ (SP). En la medul·la del timus, les cèl·lules dendrítiques i les cèl·lules medul·lars (mTEC) seran les encarregades de presentar autoantígens als timòcits SP. En la selecció negativa aquells timòcits que reconeguin autoantígens amb alta avidesa patiran apoptosi.⁴⁹⁻⁵⁰

2.2.2. Subpoblacions del limfòcits T en perifèria

D'aquesta manera els limfòcits T naïve surten del timus i entren a la circulació. Aquests es troben en contínua recirculació entre els òrgans limfoides secundaris, la sang i la limfa per tal de poder entrar en contacte amb l'antigen. Si un limfòcit T naïve reconeix l'antigen presentat per les cèl·lules presentadores d'antigen s'activarà i proliferarà, generant una clona de cèl·lules T antigen-específiques. Aquestes cèl·lules es podran diferenciar a cèl·lules efectores o cèl·lules memòria.⁵¹

Les cèl·lules efectores tindran unes funcions especialitzades com pot ser l'activitat citotòxica en els limfòcits T $CD8^+$, o en el cas dels $CD4^+$, la secreció de diferents citocines per a col·laborar en la resposta immunitària amb altres cèl·lules com són els limfòcits B. Els limfòcits T $CD4^+$ efectors es classifiquen en diferents subpoblacions (Th1, Th2, Th17, Treg) en funció de les citocines que produeixen.⁵² Entre aquestes subpoblacions efectores existeix una gran plasticitat en funció de les citocines secretades pel microambient que

dirigeixen cap al tipus de resposta immunitària que interessa en cada moment.⁵³⁻⁵⁴

La població de cèl·lules T memòria es forma a partir de cèl·lules naïve, que s'han activat al entrar en contacte amb l'antigen, i de cèl·lules efectores després d'activar-se i diferenciar-se. Les cèl·lules T memòria, igual que les naïve, es troben en estat de repòs i al contactar amb l'antigen en els òrgans limfoides secundaris donen pas a una ràpida resposta secundària migrant als teixits diana. Aquestes cèl·lules memòria tenen una vida mitja més llarga que les efectores i poden persistir tant en els òrgans limfoides com en les mucoses.^{51, 55-56}

2.2.3. Els recents emigrants tímics (RTEs)

Als timòcits que han patit els processos de selecció tímica i surten a la perifèria se'ls denomina emigrants recents tímics (Recent Thymic Emigrants, RTEs). Aquests es caracteritzen molecularment pel seu alt contingut en TRECs, que són fragments de DNA circular producte de la recombinació intratímica dels segments V(D)J del TCR. Fenotípicament s'ha considerat el CD31⁺ com a marcador de superfície dels RTEs. El CD31 o PECAM-1 és una molècula d'adhesió de la superfamília de les immunoglobulines que s'expressa en diferents tipus cel·lulars com són els limfòcits T, els mastòcits, les cèl·lules NK, monòcits, granulòcits i cèl·lules endotelials i intervé per adhesió homotípica en la diapedesi (sortida dels limfòcits cap al parènquima). Tot i que el CD31 s'expressa en moltes cèl·lules s'ha vist que els limfòcits T CD4⁺CD31⁺ presenten nivells elevats de TRECs.⁵⁷ A més cal remarcar que no tots els limfòcits CD31⁺ són RTEs, però sí que la majoria de RTEs són CD31⁺. És per això que es continuen fent estudis que permetin obtenir un millor marcador de

superfície per als RTEs. Haines et al. han descrit recentment un nou marcador de RTEs la proteïna tirosina quinasa 7 (PTK7). En el seu treball s'observa que els limfòcits naïve CD31⁺PTK7⁺ presenten un major contingut en TRECs que els CD31⁺ PTK7⁻, per això postulen la PTK7 com a un nou marcador de superfície més específic pels RTEs.⁵⁸ Pel que fa als limfòcits T CD8⁺ s'ha vist que en donants sans l'expressió de CD31 també correlaciona amb el contingut de TRECs, indicant que també podria ser utilitzat com a marcador de RTEs en limfòcits T CD8⁺, tot i que s'ha de tenir en compte que en pacients amb VIH no s'ha observat correlació entre l'expressió de CD31 en limfòcits T CD8 i els nivells de TRECs.⁵⁹

2.2.4. Marcadors fenotípics dels limfòcits T

Fenotípicament les cèl·lules T es poden classificar en diferents subpoblacions que corresponen als diferents **estadis de maduració** en funció de l'expressió en superfície dels marcadors CD45RA, CCR7, CD27 i CD28. Els estudis realitzats fins a l'aparició aquesta última dècada dels citòmetres de flux que permeten un anàlisi multiparamètric, definien les subpoblacions naïve, memòria i/o efectores en base a l'expressió d'aquests marcadors per separat com CD45RA i CD27⁶⁰ o CD45RA i CCR7⁶¹ o de CD27 i CD28.⁶² L'aparició d'aquesta nova tecnologia ha permès poder estudiar l'expressió d'aquestes molècules en una mateixa cèl·lula i arribar un cert consens a l'hora de definir les subpoblacions de limfòcits T en base al seu fenotip.^{36, 63-64} Les cèl·lules T naïve són per definició CD45RA⁺CCR7⁺CD27⁺CD28⁺. A mesura que entren en contacte amb l'antigen l'expressió d'aquests marcadors va variant. D'aquesta manera, l'expressió del receptor de quimiocines CCR7, que permet als limfòcits T migrar als òrgans limfoides secundaris, diferencia les subpoblacions en memòria central, que expressen CCR7 (CD45RA⁻CCR7⁺CD27⁺CD28⁺), de la memòria efectora, quan es perd l'expressió de CCR7. Dintre d'aquesta subpoblació

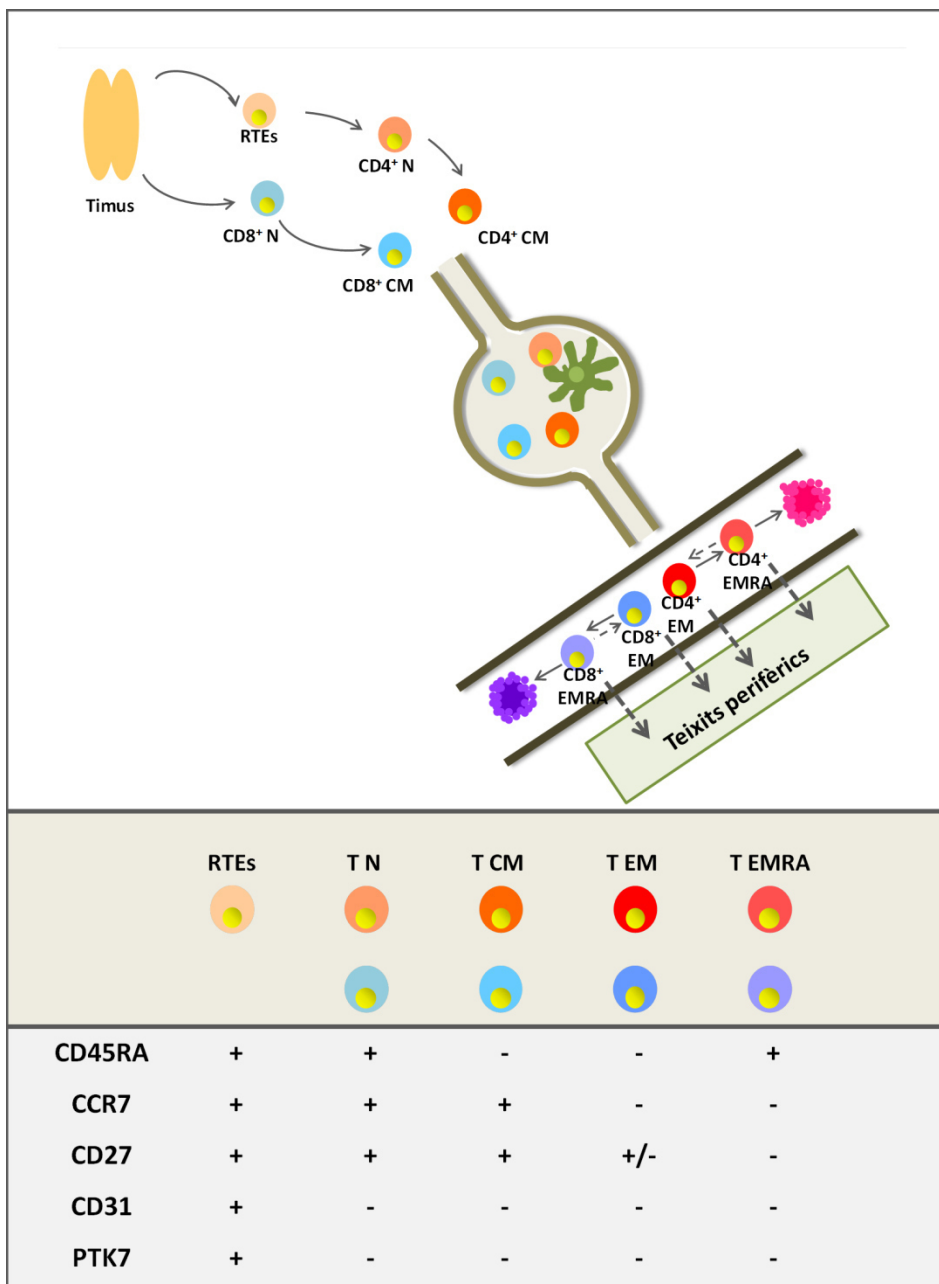


Figura 5. Maduració dels limfòcits T i marcadors fenotípics. Els limfòcits T naïve surten del timus a sang perifèrica on es troben en constant circulació. En els òrgans limfoides secundaris els limfòcits T naïve i memòria central (CM) entren en contacte amb l'antigen i s'activen diferenciant-se a cèl·lules memòria efectores (EM) i efectores (EMRA) que són les que migren als teixits diana on exerceixen la seva funció.

memòria efectora CCR7⁻ s'hi engloben moltes subpoblacions minoritàries amb diferents capacitats efectores, que l'estudi amb citometria de flux multiparamètrica ha permès diferenciar i estudiar. Tot i que la nomenclatura per a definir aquestes subpoblacions encara no està ben consensuada, considerant la diferenciació com a un procés linear de maduració i en base a l'expressió de CD27 i CD28, es poden classificar com a "early effector memory" aquelles cèl·lules menys diferenciades (CD45RA⁻CCR7⁻CD27⁺CD28^{-/+}), "late effector memory" o més diferenciades (CD45RA⁻CCR7⁻CD27⁻CD28^{+/+}) i efectores o memòria revertida (T_{EMRA}), aquelles que expressen el CD45RA (CD45RA⁺CCR7⁻CD27⁻CD28^{-/+}).

Un dels punts que encara no està ben definit és si la via de diferenciació/maduració dels limfòcits T CD4⁺ i CD8⁺ és linear o no, i si és en una sola direcció o reversible.⁶⁵⁻⁶⁶ Estudis de la llargada de telòmers donen suport a que es tracti d'una via linear de diferenciació.⁶⁷ Tot i això, hi ha estudis que recolzarien que hi pugui haver també una via de diferenciació no linear com a conseqüència d'estimulacions per alguns patògens. En aquest sentit, s'ha postulat que els limfòcits T de la subpoblació TEMRA (cèl·lules memòria que expressen el CD45RA) sembla que podrien tenir orígens diferents: les cèl·lules tornen a expressar el CD45RA com a conseqüència d'una reestimulació antigènica, o bé que procedeixin directament de la subpoblació naïve degut a una forta estimulació rebuda en un moment donat en resposta a un estímul determinat.⁶⁵

La relació entre el fenotip i la eficàcia o funcionalitat dels limfòcits T no està ben establerta. S'ha vist que en limfòcits T CD8⁺ els patrons de citocines que secreten les diferents subpoblacions varia, així s'ha vist que la IL-2 és secretada sobretot per limfòcits naïve, i que les subpoblacions memòria són les que secreten sobretot IFN γ i TNF- α , de manera que a mesura que maduren els

limfòcits T deixen de secretar IL-2 i augmenta la seva capacitat de secreció de granzims, perforines i IFN γ , adquirint així un paper més efector en la resposta immunitària. D'altra banda està demostrat que en resposta a certs estímuls o bé en diferents infeccions predomina una subpoblació sobre les altres i que són específiques del virus en concret. Aquest és el cas de limfòcits T CD8⁺ específics de citomegalovirus (CCR7⁻CD27⁻CD28⁻) que secreten més nivells de granzima B, en contrast amb limfòcits T CD8⁺ específics de virus d'Epstein Barr (CCR7⁻CD27⁺CD28⁺) en què hi ha una major secreció de granzima K. Els estudis publicats fins al moment semblen indicar que hi ha una correlació entre el fenotip i la resposta de qualitat per part del limfòcits T, però falten estudis clínics que corroborin aquests resultats.³⁶

En contrast amb els limfòcits T CD8⁺ en què les seves subpoblacions han estat àmpliament caracteritzades, l'estudi de les subpoblacions CD4 s'ha centrat en la caracterització de les subpoblacions helper (Th1, Th2 i Th17) així com de les subpoblacions reguladores (Tregs). Tot i això s'ha descrit que la diferenciació de subpoblacions aplicada en els limfòcits T CD8⁺ basada en l'expressió de CD45RA, CCR7, CD27 i CD28 també es pot aplicar en els limfòcits T CD4⁺ i que de fet les subpoblacions minoritàries de limfòcits T CD4⁺ i CD8⁺ basades en l'expressió d'aquests marcadors tenen moltes similituds pel que fa a la seva funcionalitat, la relació amb la llargada de telòmers i en l'expressió gènica. Curiosament, a més s'ha descrit que la subpoblació T CD4⁺ CD45RA⁻CCR7⁻CD27⁻CD28⁻ té funcionalitat citolítica, i que apareix sobretot en resposta a infeccions com citomegalovirus i VIH.³⁶

Tot i l'intent de crear un consens en la utilització de marcadors per a definir aquestes subpoblacions, existeixen molts estudis utilitzant altres marcadors, com pot ser el CD62L i CD27 per a definir les subpoblacions naïve/memòria en limfòcits T. És veritat que molts dels marcadors utilitzats es comporten de

manera similar, fins a cert punt equivalent, com són l'expressió del CCR7 i el CD62L, tot i això, no es pot extrapolar amb tota seguretat i tranquil·litat que les subpoblacions estudiades amb un marcador o l'altre siguin les mateixes. En aquest sentit el CD62L té la desavantatge enfront al CCR7, que la seva expressió es veu alterada en processos com són l'aïllament de cèl·lules mononuclears o la criopreservació d'aquestes.²⁶

Com s'ha comentat anteriorment, la majoria de treballs que han estudiat la funcionalitat dels limfòcits T CD4⁺ s'han basat en estudiar la divisió "helper", és a dir Th1, Th2 i Th17, així com en caracteritzar la subpoblació reguladora (Tregs).⁵⁴ Com es pot veure en la taula 1, aquestes subpoblacions funcionals es caracteritzen per el patró de citocines que secreten i es poden estudiar també en funció de l'expressió de receptors de quimiocines. Així, l'expressió de CCR5 i CXCR3 discrimina la subpoblació Th1, mentre que CCR3 i CCR4 identifiquen la Th2 i l'expressió de CCR6 i CCR4 a la Th17. L'expressió de CXCR3 i CCR6 engloba la subpoblació de limfòcits Th1 que secreten tant IFN-γ com IL-17.^{36,}

52, 68

En quant als limfòcits Treg, encara no s'ha descrit un marcador de superfície exclusiu d'aquestes cèl·lules. Clàssicament s'ha caracteritzat segons el fenotip CD4⁺CD25^{hi}CD127⁻ i dintre d'aquesta subpoblació la que intracel·lularment són positives per al factor de transcripció Foxp3. Dins dels projectes de la Federació de Societats d'immunologia (FOCIS) HIPC i ENTIRE per a establir un immunotip normal, s'ha proposat la classificació de les cèl·lules Treg com a CD4⁺CD25^{hi}CD127^{-/low}CD45RO⁺CCR4⁺, evitant així fer un marcatge intracel·lular.²⁶ De fet, en estudis realitzats en el nostre laboratori hem vist que existeix una molt bona correlació en la determinació de limfòcits Treg entre els dos tipus de tincions.

Taula 4. Principals subpoblacions funcionals dels limfòcits T CD4⁺

	Th1	Th2	Th17	Treg
Factor de transcripció	T-Bet	GATA-3	ROR γ t	Foxp3
Principals citocines secretades	IFN- γ , IL-2, TNF- α	IL-4, IL-5, IL-6, IL-13	IL-17A, IL-17F, IL-22, IL-23	IL-10
Marcadors de superfície	CCR5 ⁺ CXCR3 ⁺	CCR3 ⁺ CCR4 ⁺	CCR6 ⁺ CCR4 ⁺	CD25 ^{hi} CD127 ⁻

2.3. SUBPOBLACIONS DE LIMFÒCITS B

2.3.1. Maduració dels limfòcits B en la medul·la òssia

La diferenciació dels limfòcits B transcorre en el moll d'os i es troba regulat bàsicament per les immunoglobulines que expressen en superfície. Els progenitors hematopoètics multipotencials passen als estadis de cèl·lules pro-B i pre-B en els quals es produeix el reordenament dels locus de les cadenes pesada i lleugera de les immunoglobulines. En l'estadi pre-B les cèl·lules expressen en la seva superfície el pre-BCR, format per una cadena lleugera substitutiva (heterodímer compost per les proteïnes $\lambda 5$ i VpreB) i la cadena pesada μ . En el pas de pre-B a cèl·lules B immadures la cèl·lules pateixen el reordenament de la cadena lleugera expressant d'aquesta manera en la seva superfície un BCR IgM funcional, capaç d'unir-se a antígens específics. Abans de sortir a la perifèria les cèl·lules B immadures passen per un procés de selecció negativa evitant-se d'aquesta manera que cèl·lules autoreactives d'alta avidesa surtin a la perifèria. D'aquesta manera els limfòcits B immadurs surten a la perifèria com a limfòcits B transicionals on continuarà el procés de maduració.⁶⁹⁻⁷⁰

2.3.2. Subpoblacions de limfòcits B en sang perifèrica

Els limfòcits B transicionals, quan es troben en la circulació perifèrica, poden respondre a dos tipus d'estímuls: als **antígens T-independents** (com poden ser els lipopolisacàrids) o bé poden ser transportats a través de la circulació a la melsa on es desenvolupen a limfòcits B madurs de vida llarga.⁶⁹ Aquestes cèl·lules es troben en recirculació entre els fol·licles limfoides de la melsa i els ganglis limfàtics, on respondran a **antígens T-dependents** (a través de la interacció dels limfòcits Th), proliferaran i es diferenciaran o a cèl·lules plasmàtiques o bé formaran els centres germinals en els ganglis. En aquests es produirà el canvi de d'isotip d'immunoglobulina i hipermutació somàtica per tal de madurar l'afinitat de l'anticòs, diferenciant-se de nou una part de les cèl·lules a cèl·lules plasmàtiques efectores i passant una altra part a ser limfòcits B memòria capaços de produir una resposta secundària ràpida a l'antigen, que es diferenciaran finalment també a cèl·lula plasmàtica.^{69, 71}

Tant les cèl·lules plasmàtiques produïdes en la resposta primària com les produïdes en la secundària migraran al moll d'os on formaran nínxols productors d'anticossos.⁶⁹

2.3.3. Marcadors fenotípics dels limfòcits B

La diferenciació de les subpoblacions de limfòcits B es basen bàsicament en l'expressió dels marcadors CD19, IgD, CD27 i CD38. En funció de l'expressió d'aquests 4 marcadors s'han definit dos esquemes per a caracteritzar-les, bé en funció de l'expressió d'IgD i CD38, o bé de IgD i CD27. **L'expressió dels marcadors IgD i CD38** permet la classificació Bm1-Bm5 que defineix les subpoblacions de limfòcits B en amígdals humanes. La classificació Bm1-Bm5 es pot aplicar també en sang perifèrica d'humans, excepte la subpoblació GC.⁷²

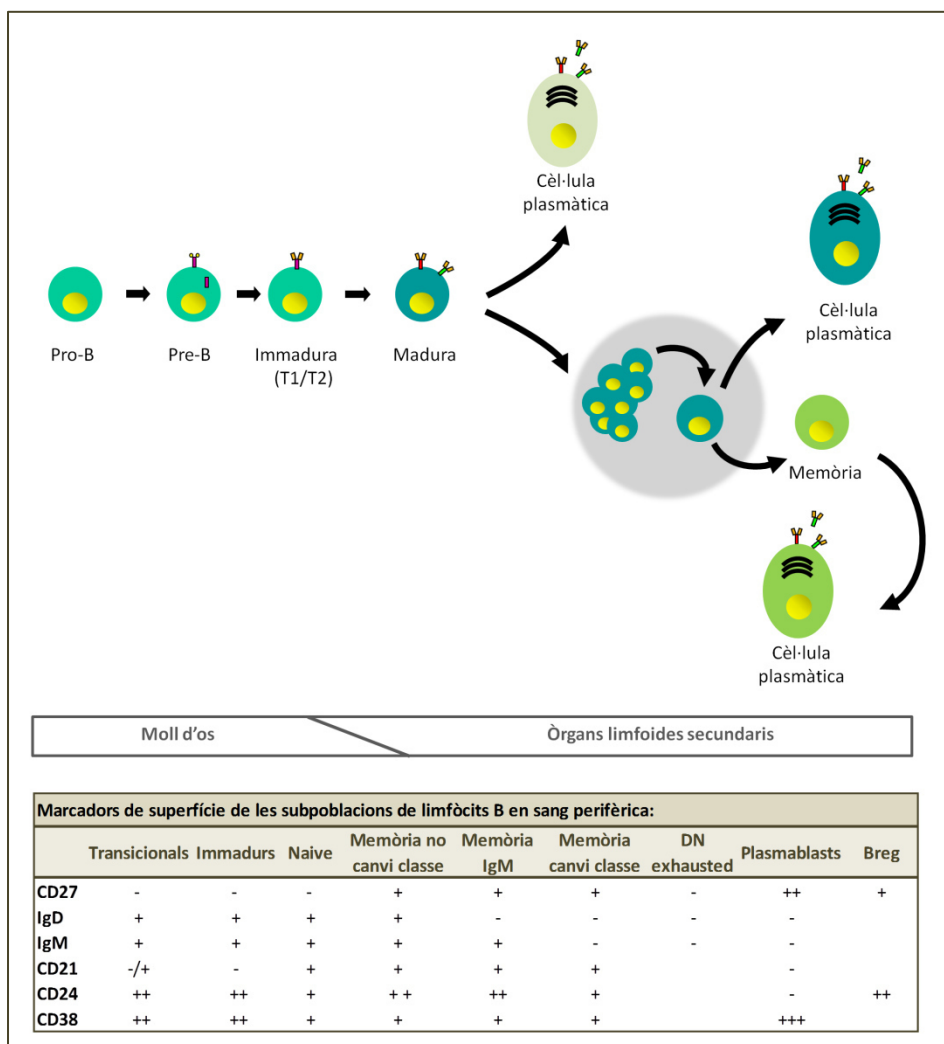


Figura 6. Maduració dels limfòcits B. Els limfòcits B surten de la medul·la òssia a sang perifèrica on entraran en contacte amb l'antígen i es diferenciaran a cèl·lules memòria o a cèl·lules plasmàtiques.

La caracterització de limfòcits B en funció de l'expressió de **IgD** i **CD27**, es basa en la utilització del CD27 com a marcador de subpoblacions memòria ($CD27^+$) i naïve ($CD27^-IgD^+$).⁷³ Dintre de les subpoblacions memòria, es diferencien les que són IgD^+ ("unswitched" o que no han fet el canvi de classe) i les IgD^-

(“switched” o que ja han fet el canvi de classe cap a IgG o IgA).⁷² La incorporació d’altres marcadors com la IgM, el CD21 o el CD24 permet l’anàlisi de subpoblacions minoritàries com dintre de la subpoblació naïve (CD27⁺IgD⁺) els limfòcits immadurs (CD21⁻) o els limfòcits B transicionals (que es caracteritzen per l’alta expressió de CD24 i CD38), així com diferenciar dins de les subpoblacions memòria dues subpoblacions que expressen IgM: CD27⁻IgM⁺IgD⁺ i les CD27⁻IgM⁺IgD^{low}.^{70, 72, 74-80}

La publicació d’estudis en els últims anys indicant que existeix una subpoblació memòria CD27⁻IgD⁻, amb un repertori diferent al de les altres subpoblacions B memòria, i que es podria trobar augmentada en pacients amb lupus, en casos d’infecció o també en la immunosenescència, és el major inconvenient en aquesta classificació, sobretot en el fet de classificar categòricament els limfòcits B memòria en funció de l’expressió de CD27.^{72, 74, 81}

2.4. AUTOIMMUNITAT

En el control de la resposta immunitària és molt important l’equilibri entre la resposta enfront als patògens i la tolerància enfront els autoantígens. Una resposta inapropiada pot acabar desencadenant problemes de salut, tant per defecte (immunodeficiència) com per excés o pèrdua de tolerància (autoimmunitat o al·lèrgia).

2.4.1. Les malalties autoimmunitàries

Les malalties autoimmunitàries tenen una prevalença del 3-5% de la població tot i que la seva incidència varia bastant segons cada malaltia. Segons el grau d’afectació tissular es poden diferenciar en organoespecífiques, quan afecten a

un teixit o òrgan específic (com són el cas de la malaltia de Graves o l'Esclerosi Múltiple), o en sistèmiques quan afecten múltiples teixits o òrgans (com és el cas del Lupus eritematós sistèmic).^{17, 82}

2.4.2. El concepte de Tolerància immunològica

La tolerància és una característica que adquireix el sistema immunològic durant el seu desenvolupament per la qual no respon a ho propi o “no perillós”.⁸² Un trencament o desregulació dels mecanismes de tolerància poden portar a una resposta autoimmunitària.

Existeixen **dos nivells de regulació** de la tolerància; el primer és una selecció del repertori de limfòcits T i B a nivell dels òrgans limfoides centrals, el timus en el cas dels limfòcits T i la medul·la òssia en els limfòcits B (**Tolerància central**) i el segon es basa en la generació de tolerància en els òrgans secundaris limfoides i no limfoides (**Tolerància perifèrica**).^{50, 83-86}

2.4.3. Tolerància central

La inducció de la tolerància central en els **limfòcits T**, es porta a terme en el **timus** on les cèl·lules presentadores d'antigen (principalment mTECs i cèl·lules dendrítiques) presentaran un ampli repertori d'autoantígens, tant d'antígens ubicuus com també d'antígens restringits a teixits de la perifèria. Aquest fenomen és el que s'ha anomenat com **expressió promiscua d'autoantígens** d'òrgans de la perifèria i es presenten, entre d'altres, antígens de la tiroglobulina, TSHR, pèptids de la mielina i insulina.^{50, 87-88} Aquests antígens propis expressats per les mTEC representen virtualment tot l'espectre d'antígens propis que es poden trobar en la perifèria, prevenint així la possible trobada en perifèria de limfòcits T autoreactius amb aquests antígens. Aquesta expressió promiscua es troba regulada en gran part pel factor de transcripció

AIRE, i pel més recentment descrit FEZF2.⁸⁹ El dèficit genètic d'aquest factor, desencadena en una malaltia autoimmunitària poliglandular d'herència autosòmica recessiva, anomenada APECED.^{50, 90}

Com s'ha explicat prèviament, durant la maduració tímica la selecció en el timus dels limfòcits T es porta a terme en funció del grau d'afinitat de la unió TCR-pèptid-MHC. Els timòcits sense o amb molt baixa afinitat per a pèptids propis pateixen apoptosi en el que s'anomena **"mort per negligència"**. Aquells timòcits que reconeixen amb alta afinitat els pèptids propis, també moren per apoptosi, en el procés que es coneix com a **"selecció negativa"**. Només aquells timòcits que reconeguin els pèptids propis amb una afinitat intermèdia són els que rebran estímuls de diferenciació i supervivència, en el que es coneix com a **"selecció positiva"**.⁴⁹ Aquests TCRs seran els que sortiran del timus i formaran el repertori de limfòcits T en perifèria.

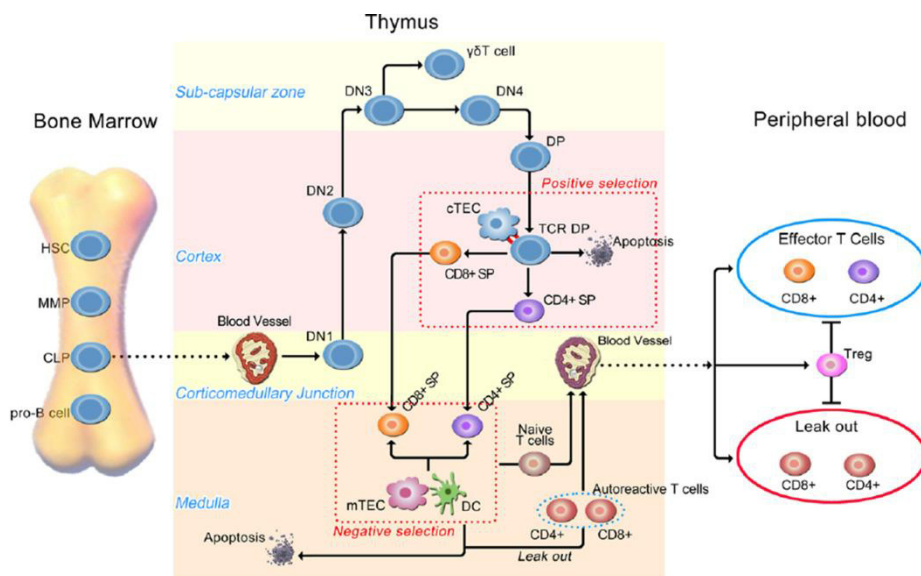


Figura 7. Processos de selecció positiva i negativa en el timus.

Font: Wang et al. Journal of Internal Medicine 2015 ⁸²

2.4.4. Tolerància perifèrica

Tot i els mecanismes de tolerància central, en individus sans també s'han trobat limfòcits autoreactius en perifèria, indicant que a part existeixen altres mecanismes de control que són els que formen part de la tolerància perifèrica. Aquests mecanismes poden ser intrínsecs dels limfòcits T però també n'hi ha que involucren altres tipus cel·lulars com les cèl·lules dendrítiques o els limfòcits reguladors.^{84-86, 91}

Inducció d'anèrgia: La interacció del limfòcit T a través de les molècules CTLA4 o PD1, amb els seus receptors B7.1 (CD80) i B7.2 (CD86) o PDL1 i PDL2, genera a la cèl·lula un estat d'inactivació funcional, frenant així la resposta.⁸⁴

Desviació immunològica: En el cas que el limfòcit T interaccioni amb un autoantigen i s'activi, el **patró de citocines i quimiocines** que expressi el limfòcit T quan entri en contacte amb l'antigen marcarà el tipus de resposta que es produirà. Com és la desviació de la resposta Th1 i Th17 (implicada en els mecanisme d'autoimmunitat) cap a una resposta Th2, o expressant quimiocines que canviïn els patrons de migració de les cèl·lules.⁹²

Apoptosi: La interacció del limfòcit T amb un autoantigen pot portar també a una activació de la mort cel·lular programada, en el que hi ha una regulació del lligand de Fas, que s'uneix al receptor de mort cel·lular Fas, desencadenant el procés de mort cel·lular.⁸⁴

Cèl·lules dendrítiques tolerògenes: es caracteritzen per presentar una baixa expressió de molècules coestimuladores, una baixa capacitat d'induir proliferació de limfòcits T i generar possiblement la inducció de limfòcits T reguladors, ajudant així a mantenir la tolerància a nivell dels teixits perifèrics.

Cèl·lules reguladores: Els **limfòcits T CD4⁺ reguladors** poden tenir diferents orígens. Per una banda els Tregs naturals (nTreg) que es generen en el timus i són específics d'antigen. En perifèria també poden generar/induir limfòcits T reguladors (iT_r), com són les Tr1, que es caracteritzen l'expressió dels marcadors CD49b i LAG-3.⁹³ Les Treg controlen el manteniment de la tolerància per diferents mecanismes com són la secreció de IL-10, de TGF-β, la degradació d'ATP a través de ectonucleotidases o la disminució de interleucines que intervenen en la proliferació de limfòcits T, com és la IL-2.^{86, 91-92}

En la subpoblació de **limfòcits CD8⁺** sembla que podrien existir també subpoblacions minoritàries amb un paper **regulador**, però encara no estan ben definides ni funcionalment ni fenotípicament.⁹⁴

Pel que fa als **limfòcits B reguladors**, tot i que també existeix molta controvèrsia sobre la seva existència, recentment s'ha descrit que existeixen subpoblacions de limfòcits B productors de IL-10 i que inhibeixen la proliferació de limfòcits T, i que expressen els marcadors CD19⁺CD24^{hi}CD38^{hi} i CD19⁺CD27⁺CD24^{hi}.⁹⁵⁻⁹⁸

2.4.5. Tolerància en els limfòcits B

Pel que fa als mecanismes de tolerància dels **limfòcits B** es poden donar a 3 nivells del seu desenvolupament: a nivell central, a perifèria en els centres germinals i en estadis avançats del seu desenvolupament. Tot i que aquests mecanismes s'han estudiat amb profunditat en models animals alguns s'han descrit també en humans. Els principals mecanismes centrals i a nivell de centre germinal són els següents:

Parada de la maduració i exclusió fol·licular que porta a mort cel·lular prematura i deleció clonal.⁹⁹

En l'edició del receptor (BCR) s'elimina el BCR autorreactiu i es produeix un segon reordenament de una nova cadena lleugera.¹⁰⁰

La dilució del receptor és conseqüència de l'expressió de les dues cadenes lleugeres degut al procés d'inclusió al·lèlica. Mitjançant aquest mecanisme disminueix parcialment l'expressió del receptor autoreactiu.⁹⁹

Els limfòcits B autorreactius també sembla pateixen anergia com a mecanisme de tolerància, a nivell central i sembla que també en alguns casos a nivell dels centres germinals.⁹⁹

A nivell de centres germinals s'ha vist que poden patir un procés de mort cel·lular induïda per FasL o per unió a autoantígens, no diferenciació a cèl·lules plasmàtiques a través de la senyalització del BCR, interacció no efectiva amb els limfòcits T helper fol·liculars i atenuació de l'autoreactivitat mitjançant hipermutació somàtica i l'edició del BCR.^{83-84, 99}

Els mecanismes involucrats en estadis avançats de la diferenciació de limfòcits B i en la producció d'anticossos, tot i que es creu que participen en la tolerància perifèrica dels limfòcits B, són menys coneguts pel que fa al seu funcionament i localització.^{83-84, 99, 101}

2.5. LA MALALTIA DE GRAVES-BASEDOW

Les **malalties autoimmunitàries de la glàndula tiroides (AITD)** són unes de les malalties autoimmunitàries òrgan-específiques més freqüents, inclou varies formes clíniques de tiroïditis autoimmunitària com és la malaltia de Graves-Basedow (GD) i la tiroïditis de Hashimoto (HT). Les AITD es caracteritzen per la producció d'autoanticossos contra almenys un dels autoantígens majors

específics de tiroides, com són la tiroglobulina (Tg), la tiroperoxidasa (TPO) i el receptor de la tirotròpina (TSHR), així com per la infiltració de la glàndula tiroïdal per part de limfòcits T i B.¹⁰²⁻¹⁰⁴

La **malaltia de Graves-Basedow** té com a característica principal la producció d'autoanticossos patogènics contra el receptor de la TSH que acaba desencadenant en una sobreproducció de hormones tiroidees (hipertiroidisme) i una hiperplàsia de la glàndula tiroidea (goll).

2.5.1. Immunopatogènia

Els autoanticossos circulants mimetitzen l'efecte de la TSH, unint-se i activen el seu receptor (TSHR). Això resulta en un increment de la síntesis i alliberament d'hormones tiroidees, generant un estat d'hipertiroidisme, i una hipertrofia de les cèl·lules fol·liculars de la tiroides causant el goll.^{102, 104}

En la patogènia de la malaltia hi juguen un paper important els limfòcits que infiltren la glàndula i que és on es desencadena la resposta autoimmunitària.¹⁰²

Els infiltrats de la glàndula tiroïdal en la malaltia de Graves-Basedow són predominantment de limfòcits T CD4⁺, que podrien estar-hi cooperant amb els limfòcits B en la producció d'autoanticossos.¹⁰⁵⁻¹⁰⁶ A més, encara que en menors proporcions, també s'ha vist una infiltració de limfòcits T CD8⁺.¹⁰⁷ Els estudis publicats fins el moment semblen indicar que aquests limfòcits T que infiltren la glàndula tenen un fenotip de memòria (expressen el marcador CD45RO) i activat (HLA-DR⁺).^{103-104, 107-109}

També, s'ha proposat com a un possible mecanisme patològic un increment del eflux de cèl·lules autoreactives del timus a la perifèria. S'ha vist que en estadis inicial de la malaltia els pacients presentaven major concentració de

TRECs i percentatge de limfòcits DP i de RTEs (CD4⁺CD45RA⁺CD31⁺) en sang perifèrica.^{108, 110}

2.5.2. Etiologia

Tot i que la seva etiologia encara no és ben coneguda i sembla que pot ser multifactorial, s'ha vist que factors ambientals com el tabac, algunes infeccions o la ingesta de iode, podrien estar relacionats amb la malaltia. Des del punt de vist genètic s'ha descrit una major incidència de la malaltia en persona amb els grups al·lèlics DRB1*0301 i DQA1*0501, així com amb alguns polimorfismes dels gens CTLA-4 i PTPN22, però amb associacions febles, amb un baix risc relatiu de patir la malaltia.^{17, 103-104, 111}

2.5.3. Epidemiologia

La malaltia de Graves és una de les malalties autoimmunitàries més freqüents. Té una incidència anual aproximada de 14 casos per 100.000, essent 5 vegades més freqüent en dones que en homes.^{17, 104}

2.5.4. Marcadors diagnòstics

Els marcadors diagnòstics de laboratori per a la malaltia de Graves-Basedow es centren en la detecció en sèrum d'autoanticossos i nivells d'hormones tiroidees.

La presència d'autoanticossos contra el TSHR és patognomònic de la malaltia de Graves-Basedow i es troben en més del 90% de pacients amb la malaltia.¹⁰³

Els nivells elevats de les hormones tiroidees T3 i T4 lliures, associades a nivells indetectables de TSH, són característics de la malaltia de Graves-Basedow.¹⁰⁴

La determinació dels autoanticossos anti-TPO i anti-Tg, tot i que es troben elevats en la majoria de casos, no són d'utilitat per sí sols en el diagnòstic ja que no són específics de la malaltia.^{17, 102, 104}

2.5.5. Les subpoblacions limfocitàries en sang perifèrica en la malaltia de Graves

En comparació amb els estudis de que existeixen de la glàndula tiroïdal, el **paper de les subpoblacions limfocitàries en sang perifèrica** de pacients amb Graves-Basedow encara no està ben caracteritzat.

La majoria d'estudis que existeixen fins el moment no inclouen estudis multiparamètrics de subpoblacions minoritàries, en aquest sentit, s'ha observat que la relació entre els **limfòcits T** CD4⁺ i CD8⁺ es troba alterat, produint-se en alguns casos una inversió de l'índex CD4/CD8, però en els treballs en els que s'han analitzat les subpoblacions T naïve i memòria, els resultats són contradictoris, probablement degut a l'heterogeneïtat entre els grups de pacients estudiats, i els marcadors fenotípics utilitzats.^{103, 105, 108-109, 112}

Ens els darrers anys, la majoria d'estudis en citometria de flux publicats, s'han centrat en estudiar les subpoblacions funcionals de limfòcits T CD4 sobretot Th17 i Tregs. Molts d'aquests treballs s'han fet en pacients amb AITD, sense diferenciar els tipus de pacients o bé els que diferencien els subgrups clínics són amb tamanys mostrals petits. Dels estudis sobre limfòcits Th17 en AITD, sembla que en HT hi ha un increment d'aquesta subpoblació però els resultats obtinguts en pacients en malaltia de Graves-Basedow són contradictoris, a més cal destacar que pràcticament la majoria d'ells s'han realitzat analitzant PBMCs estimulats in vitro (a la taula 6 es resumeixen els treballs més destacats).¹¹³⁻¹¹⁵ Tampoc hi ha consens en els treballs publicats de limfòcits Tregs pel que fa a les proporcions en sang perifèrica, tot i que sí que coincideixen en què la

funcionalitat dels limfòcits Tregs es troba alterada en els pacients amb Graves-Basedow (veure taula 7).¹¹⁶⁻¹²¹

Pel que fa als **limfòcits B** en pacients amb Graves-Basedow hi ha molts pocs treballs que s'hagin centrat en estudiar aquestes subpoblacions limfocitàries. Fins al moment s'ha descrit un increment dels limfòcits B naïve, així com nivells baixos de la subpoblació CD19+CD24hiCD27+, recentment descrita com a productora de IL-10 i per tant, possible subpoblació de limfòcits B reguladors.¹²²⁻¹²³

2.5.6. Tractament

Generalment, el **tractament** inicial recomanat en aquests pacients és amb **fàrmacs antitiroïdals** amb l'objectiu terapèutic d'aconseguir restablir una situació eutiroida. En malalts de llarga evolució l'estratègia terapèutica varia, en funció de la mida del goll i la presència d'oftalmopatia, de tractament farmacològic anti-tiroïdal, **tractament amb radioiode** o **tiroïdectomia**.¹⁰⁴ En els pacients en tractament amb fàrmacs anti-tiroïdals, la concentració de autoanticossos contra el receptor de la TSH tendeix a disminuir en el tractament. En els pacients que tractament amb radioiode, la concentració autoanticossos disminueix gradualment i normalment persisteix durant anys després del tractament. En el cas dels pacients tractats amb cirurgia, els autoanticossos disminueixen després de la tiroïdectomia i en el 70-80% dels casos als 18 mesos postintervenció han negativitzat.¹²⁴

Taula 6. Principals estudis de caracterització de limfòcits Th17 en malaltia de Graves-Basedow

Referència	Tipus pacients	Medició	Mostra	Fenotip estudiat	Resultats
Figuerola-Vega et al. (2010)	18 AITD: (13 HT+5GD) 10 HD	Th17	PBMC+ PMA/Io	CD3+CD8-IL17/IL22	↑ % Th17 en HT vs HD/GD
		mRNA IL-17			↑ CD3+CD8-IL22+ HT vs HD/GD
		IL-17 en sèrum			m RNA IL-17 ↑ HT i ↓ GD/HD
		IL-22 en sèrum			IL-17 en sèrum indetectable
		Teixits: glàndula			↑ IL-22 HT vs GD/HD
Nanba et al. (2009)	17 HT sever 17 HT moderat 18 GD persistència TRAB 17 GD en remissió 10 HD	Th1	PBMC+ PMA/Io	Th1: CD4+IFNγ+IL4-IL17- Th2: CD4+IFNγ-IL4+IL17- Th17: CD4+IFNγ-IL4-IL17+	Th1 ↑ HT severa vs moderada // GD no diferències Th2 ↓ HT severa vs moderada // GD no diferències Th17 ↑ en HT i GD vs controls // GD TRAB+ > GD en remissió
		Th2			
		Th17			
					tractament no altera % sub poblacions
Di Peng et al. (2013)	27 GD debut 27 HD	Th17	PBMC+ PMA/Io	CD4+IFNγ/IL17/IL22	↑ Th17/Th22
		Th22			↑ IL17/IL22 plasma
		IL17			els canvis correlacionen amb nivells d'Ac TRAB però no amb els nivells d'hormones
		IL22			
Qui Qin et al. (2012)	20 GD 16 HT 15 controls	immunohistoquímica	PBMCs i teixit		no diferències expressió GD vs ctls
		IL17A/IFNγ			↑ IL17A i IFNγ en HT vs ctls
		mRNA de IL17A/IFNγ			
Van der Weerd et al. (2013)	5 GD debut 4 GD en tractament 7 GD recurrences	Th1	PBMC+ PMA/Io	Th1:CD4+IFNγ+ Th2:CD4+IL4+ Th17:CD4+IL17A+	no diferències en Th1/Th2/Th17
		Th2	congelades		no diferències en nivells en sèrum IFNγ/IL4/IL17
		Th17			
		IFNγ/IL4/IL17	sèrum		

Taula 7. Principals estudis de caracterització de limfòcits Tregs en malaltia de Graves-Basedow

Referència	Típus pacients	Mostra	Fenotip estudiat	Resultats
Bossowski et al. (2013)	Estudi en pacients pediàtrics: 24 GD debut 12 GD següiment tractament 30 HT debut 16 HT següiment tractament	Sang total	CD4+CD25hi CD4+Foxp3+ CD4+CD25+CD127lowFoxp3+	En GD: ↓ CD4+CD25hi ↓ CD4+Foxp3+ CD4+CD25+CD127lowFoxp3+ No diferències
Fountoulakis et al. (2008)	70 debuts AITD: 40 HT subclínic 15 HT amb hipotiroidisme 15 GD 20 controls sans	Sang total	CD4+CD25+ CD4+CD25high CD4+CD25+HLA-DR+ CD4+CD25highHLA-DR+	No diferències en CD4+CD25+ i CD4+CD25high ↑ CD4+CD25highHLA-DR+ en HT vs controls No diferències en GD
Mao et al. (2011)	77 GD no tractats 13GD eutiroidesos 15 HT 74 controls	PBMCs	CD4+CD25+Foxp3+	↓ Tregs en GD sense tractament No diferències en GD eutiroidesos ni HT No alterada la funcionalitat
Marazuela et al. (2006)	20 AITD: 12 GD 8 HT	Teixit tiroidal PBMCs	CD4+GITR+Foxp3+IL10+TGFb+CD69+	↑ % Tregs ↓ funcionalitat supressora
Nakano et al. (2007)	20 AITD: 15 GD 5 HT 10 controls sans	Teixit tiroidal PBMCs	CD4+CD25+ CD4+CD25+Foxp3+	CD4+CD25+ intratirodals < sang perifèrica CD4+CD25+Foxp3+ intratirodals < sang perifèrica En sang perifèrica no diferències en AITD vs controls
Pan et al. (2009)	19 GD actius pretractament 9 GD en tractament (¹³¹ I) 30 controls	PBMCs	CD4+CD25int-hiCD127lo	En % de sub poblacions no diferències entre grups En recompte: GD actius > GD en tractament
Van der Weerd et al. (2013)	5 GD debut 4 GD en tractament 7 GD recurrents	PBMCs congelades	CD4+CD25+Foxp3+	No diferències

2.6. L'ESCLEROSI MÚLTIPLE

L'Esclerosi Múltiple (EM) és una malaltia crònica inflamatòria i autoimmunitària del sistema nerviós central (SNC) que es caracteritza per la presència d'infiltrats perivenulars de limfòcits T i macròfags, que causen inflamació, amb pèrdua de mielina (desmielinització), gliosis i degeneració axonal, causant un trastorn de la senyalització neuronal.¹²⁵⁻¹²⁶

2.6.1. Epidemiologia

És una de les malalties neurològiques més freqüents i una de les principals causes de discapacitat en persones joves, afectant al voltant de 2,5 milions de persones al món.¹²⁶ A Espanya representa la segona causa de discapacitat en persones joves després dels accidents de trànsit, amb una incidència de 4-10 casos/100.000 habitants/any.

2.6.2. Manifestacions clíniques

La seva presentació clínica és molt heterogènia i pot incloure alteracions tant visuals com sensorials, deficiència motora, cansament, dolor i defectes cognitius.¹²⁶ A nivell clínic, la seva forma més freqüent és la remitent-recurrent (EMRR) que s'associa a períodes d'exacerbació (brot) alternant amb períodes de recuperació (remissió). Un elevat percentatge dels pacients amb EMRR evolucionarà en el temps a una forma secundàriament progressiva (EMSP), amb un increment de la discapacitat amb/sense brots afegits. Existeix una forma menys freqüent d'EM, denominada EM primàriament progressiva (EMPP) en la que des del inici progressa la discapacitat, sense brots, i es postula que patogènicament és diferent a l'EMRR. En la última revisió de *Lublin et al.* dels fenotips clínics de la EM, s'ha inclòs la síndrome clínica aïllada (CIS)

com a la primera presentació clínica que reflecteix una desmielinització inflamatòria que podria ser una EM però encara no aconsegueix tots els criteris clínics.¹²⁶⁻¹²⁷

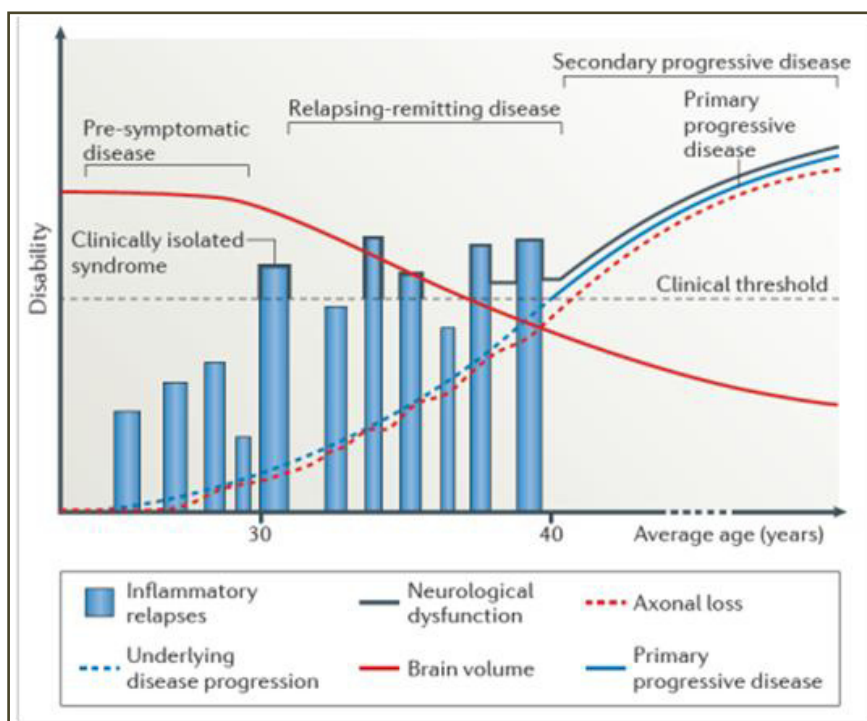


Figura 8. Presentacions clíniques i evolució en el temps de l'esclerosi múltiple.

Font: Dendrou et al. Nature Reviews- Immunology 2015 ¹²⁶.

2.6.3. Etiologia

Tot i que l'etiologia de l'EM és desconeguda, es considera que el dany del SNC és degut a un atac autoimmunitari selectiu, la diana del qual són autoantígens de la mielina. No obstant, i com en la majoria de les malalties autoimmunitàries, es desconeixen els desencadenants del procés, que s'ha

relacionat amb factors ambientals i genètics. La concordança entre bessons monozigots és del 40% i s'ha vist una certa associació amb els al·lels HLA-DRB1*1501 i DQB1*0602.^{126, 128}

El que es coneix fins al moment fa pensar que l'EM és una malaltia autoimmunitària mediada per limfòcits T autoreactius. El fet que la resposta autoimmunitària en l'EM sigui contra la mielina, els antigens derivats de la mielina s'han postulat com les possibles dianes autoreactives. S'ha vist que alguns pacients amb EM tenen limfòcits T CD4+ amb reactivitat contra la proteïna bàsica de la mielina (MBP), la proteïna proteolípidica (PLP) i la glicoproteïna mielínica dels oligodendrocits (MOG).¹²⁹ Aquests limfòcits autoreactius, encara que no són d'alta afinitat, tenen una elevada avidesa biològica i són específics per a determinats pèptids de la mielina, estant incrementats en pacients amb EM. A partir de models matemàtics s'ha pogut establir que els pèptids enfront als que es dirigeixen aquests LT presenten una dèbil capacitat d'unió als principals al·lels HLA-DR associats a l'EM, pel que es postula que no patirien els processos de selecció negativa plenament eficients en el timus, passant a sang perifèrica on s'activarien i migrarien al SNC on podrien ocasionar l'atac autoimmunitari.¹³⁰ L'absència en aquesta resposta autoimmunitària d'un autoantigen majoritari s'ha postulat que podria ser degut a la falta de poder disposar d'una tecnologia el suficientment sensible com per a detectar-los o bé també a que s'estigui produint un fenomen de "epitope spreading".¹²⁶

En estudis en el model animal d'EM, encefalitis autoimmunitària experimental (EAE), s'ha vist que les subpoblacions Th1, Th17 i T CD4⁺ efectores contribueixen en la patogènia de la malaltia.¹³¹⁻¹³³ Aquestes subpoblacions s'han trobat també augmentades en el SNC de pacients amb EM, sobretot en els líquid cefaloraquidi i en l'espai perivascular, tot i que no s'ha pogut veure

que una d'elles tingui un paper preponderant en la patogènia de la malaltia.^{126, 134} Per altra banda, s'han descrit expansions oligoclonals de limfòcits T CD8⁺ activats en lesions del SNC de pacients amb EM, suggerint la seva participació en el dany al SNC.¹³⁵⁻¹³⁹

A més, en els últims anys, cada vegada està quedant més clara també la participació dels limfòcits B en la patogènia de l'EM, a través de la producció d'anticossos (que es poden detectar en LCR i tenen valor diagnòstic), així com contribuint a la inducció, manteniment i reactivació dels limfòcits CD4⁺, tant actuant com a cèl·lules presentadores d'antigen com a través de la producció de citokines.¹⁴⁰⁻¹⁴²

2.6.4. Els biomarcadors en l'EM

Com s'ha comentat l'EM és una malaltia clínicament i patogènicament complexa i heterogènia. Això ha portat a la necessitat de disposar de diferents tipus de biomarcadors.¹⁴³⁻¹⁴⁶

- **Biomarcadors diagnòstics i predictius.** Que permetin poder identificar en aquelles persones que tenen un primer episodi de neuritis òptica o CIS quins tenen més risc de desenvolupar una EM o una altra malaltia neurològica. I també, poder tenir marcadors predictius que permetessin identificar aquells familiars de primer grau amb major risc de patir la malaltia.
- **Biomarcadors d'activitat de la malaltia** que permetin diferenciar quins pacients tindran un curs més benigne de la malaltia, d'aquells que

tindran un curs més agressiu, en els quals un inici de tractament precoç al actual, probablement portaria a una millor evolució.

- **Biomarcadors de resposta al tractament** que ens permetin identificar aquells pacients que tindran una resposta pobre a un fàrmac en concret o que tinguin major risc de patir algun efecte advers.

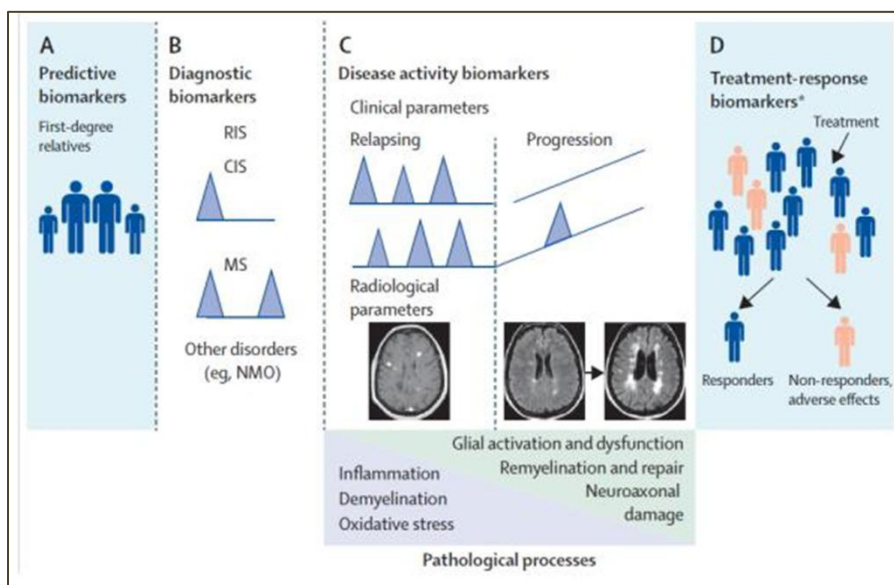


Figura 9. Tipus de biomarcadors en l'Esclerosi Múltiple. A) Els biomarcadors predictius permeten diferenciar els familiars de primer grau amb més risc de tenir EM. B) Els biomarcadors diagnòstics per a diferenciar pacients amb CIS, EM o altres malalties neurodegeneratives. C) Els biomarcadors d'activitat indiquen progressió de la malaltia. D) Els biomarcadors de resposta al tractament són útils per a diferenciar als pacients responedors dels que no. (Font Comabella et al. Lancet Neurol 2014¹⁴³)

La majoria de biomarcadors que s'han descrit fins al moment són tant en sang perifèrica com en LCR. A la taula 8 es mostra un resum dels principals biomarcadors descrits fins el moment. Actualment molts d'ells encara són potencials biomarcadors i s'està validant la seva utilitat i per tant encara no s'utilitzen de manera rutinària en la practica clínica.

Taula 8. Resum dels biomarcadors descrits en l'Esclerosi Múltiple (adaptat de Teunissen, CE et al. Nature Rev Neurol, 2015 ¹⁴⁵)

Tipus de biomarcador		Biomarcador	Mostra	Implementat diagnòstic rutina	Referència
Diagnòstics i predictius	Diagnòstic MS	Bandes oligoclonals IgG	LCR	Sí	147
		IgG específica per MRZ	LCR	No	148
		Cadenes lleugeres lambda	LCR	En alguns centres	149
		miR-20a-5p	Sang	No	150
		miR-22-5p	Sang	No	150
	Diagnòstic diferencial				
	Conversió CIS-MS	Bandes oligoclonals IgG	LCR	Sí	151
		Bandes oligoclonals IgM	LCR	En alguns centres	152
		CXCL13	LCR	No	153
		CHI3L1	LCR	No	154
		Neurofilament cadena lleugera	LCR	No	155-156
	NMO	Ac IgG anti-Aquaporina 4	Sang	Sí	157
		Ac IgG anti-MOG	Sang	En alguns centres	158-160
		Haptoglobina	LCR	No	161
Activitat malaltia	Subtipus MS	Bandes oligoclonals IgM	LCR	En alguns centres	162
		miR-223	Sang	No	163
		miR-15b	Sang	No	163
	Prognòstic de la malaltia	Neurofilament cadena lleugera	Sang	No	164
		Bandes oligoclonals IgM	LCR	En alguns centres	165
De resposta	Predicció resposta	Ac neutralitzants anti-IFN β	Sang	Sí	166
		Ac neutralitzants anti-natalizumab	Sang	En alguns centres	167
		miRNAs (família miR-29)	Sang	No	168-169
	Predicció ef. adversos	Ac anti-virus JC i índex JCV	Sang	Sí	170

2.6.5. Tractaments per l'EM

Tot i que en els darrers anys s'han desenvolupat un elevat nombre de fàrmacs per a l'EM, actualment no existeix cap tractament que curi la malaltia. Els tractaments que es troben actualment en el mercat disminueixen en molts casos la freqüència dels brots i disminueixen el nivell d'inflamació, però no

tenen pràcticament cap efecte en la neurodegeneració del dany ja causat per la malaltia.

Existeixen diferents tipus de tractaments, pel tractament dels brots, en aquest cas s'utilitzen megadosis de corticoides (Metilprednisolona) en el moment del brot, i els tractaments moduladors de la malaltia (MDM), que es divideixen en tractaments de primera i de segona línia. Aquests tractaments tenen com a mecanisme d'acció actuar en diferents punts de la immunopatogènia de l'EM (representats a la figura 4).¹⁷¹⁻¹⁷⁴

Tractaments de primera línia

Interferons β (1a i 1b): Va ser el primer tractament aprovat per l'EM. S'ha vist que disminueix el nombre de brots, la progressió de la discapacitat i l'activitat de la malaltia per MRI. El mecanisme d'acció de l'interferó β no es coneix bé, sí que sembla que produeix una certa disminució de l'activació i proliferació dels limfòcits, una reducció en la producció de citokines proinflamatòries i augment de les antiinflamatòries. L'interferó β s'administra per via subcutània o intramuscular. Els principals efectes adversos són inflamació en el lloc d'injecció, maldecap, símptomes tipus grip, fatiga i possible depressió.¹²⁸

Acetat de glatiràmer o copolímer 1: és un polímer dels aminoàcids més comuns que formen la proteïna bàsica de la mielina. El seu mecanisme d'acció tampoc és del tot conegut. S'administra per via intravenosa.¹²⁸

Dimetil fumarat: és un éster de l'àcid fumàric. El seu mecanisme d'acció no és del tot conegut. Sembla que podria actuar sobre la via d'activació mediada per Nfr2 (disminuint la inflamació), sobre el factor de transcripció NF- κ B (produint una immunomodulació de la producció de citocines) i una disminució del dany

cel·lular per una disminució de l'estrés oxidatiu causat per la via Nrf2. S'administra per via oral. L'efecte advers més freqüent és el flushing, seguit de molèsties gastrointestinals.¹⁷⁴ Produeix una important limfopènia als pacients i en els darrers mesos s'han reportat alguns casos de LMP per infecció per virus JC en pacients amb aquest tractament¹⁷⁵⁻¹⁷⁶.

Alemtuzumab: és un anticòs monoclonal humanitzat contra la molècula CD52, recentment aprovat per al tractament de l'EM (anteriorment ja aprovat per al tractament de leucèmies). Provoca una ràpida depleció de limfòcits T, B, NK, monòcits i alguns granulòcits. S'administra per via intravenosa.^{128, 174}

Tractaments de segona línia

Natalizumab: es tracta d'un anticòs monoclonal contra la molècula CD49d (subunitat $\alpha 4$ del receptor VLA-4). La interacció de VLA-4 la VCAM-1 de l'endoteli permet als leucòcits creuar la BHE i entrar en el SNC. La unió del natalizumab al CD49d impedeix el pas dels leucòcits a través de la BHE. És un tractament amb una clara disminució del nombre de brots, progressió de la malaltia i activitat per MRI. El principal efecte advers del natalizumab és el risc a patir leucoencefalopatia multifocal progressiva (LMP), com a conseqüència d'infecció pel virus JC, la qual està associada a una elevada taxa de mortalitat.

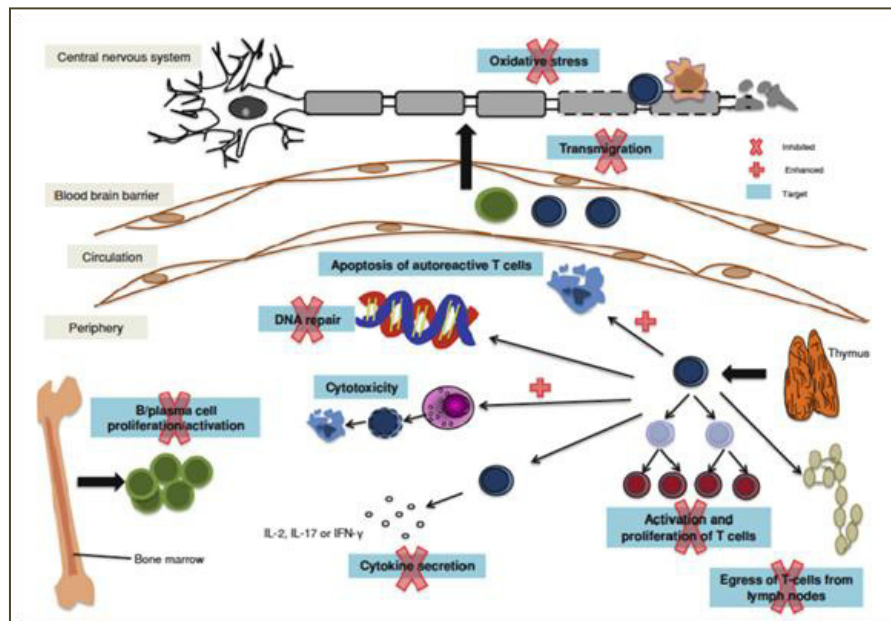


Figura 10. Mecanismes d'acció de les diferents teràpies modificadores de la malaltia que existeixen actualment.

Font: Grigoriadis et al. Eur J Neurology, 2015 ¹⁷³.

Fingolimod: és el primer fàrmac per via oral que es va aprovar per l'EM. Es tracta d'un agonista del receptor 1 de l'esfingosina-1-fosfat (S1P1). La unió de la S1P amb el seu receptor limfocític S1P1 permet als limfòcits sortir dels ganglis limfàtics. La unió del fingolimod al receptor S1P1 causa una internalització del receptor i com a conseqüència els limfòcits queden retinguts en el gangli limfàtic i no poden sortir a perifèria.

Teriflunomida: és un derivat de la leflunomida (fàrmac utilitzat com immunomodulador per al tractament d'altres malalties autoimmunitàries). S'uneix a la dihidro-orotat-deshidrogenasa, provocant una inhibició de la síntesi de pirimidines en cèl·lules que es divideixen ràpidament, dins de les quals hi trobem els limfòcits T i B, especialment aquells en estat d'activació o

proliferació. El seu mecanisme d'acció fa que sigui un fàrmac amb un efecte immunomodulador poc específic sobre una subpoblació limfocitària concreta. S'administra per via oral.

2.6.6. Les subpoblacions limfocitàries en sang perifèrica en l'Esclerosi

Múltiple

En els estudis en sang perifèrica de les subpoblacions memòria minoritàries T CD4⁺ i CD8⁺, els resultats fins el moment no són concloents, probablement degut a la heterogeneïtat entre els estudis publicats pel que fa a tipologia de pacients i metodologia i marcadors utilitzats per a l'estudi de les subpoblacions limfocitàries. En general, es descriu la presència de limfòcits T CD4⁺ i CD8⁺ memòria en LCR, però en sang perifèrica hi ha molta heterogeneïtat en els resultats observats sobretot en les subpoblacions de limfòcits T memòria central i memòria efectora.¹⁷⁷⁻¹⁸⁰

Pel que fa als limfòcits Th17 el seu increment en sang perifèrica està clarament descrit, no tant sols en el model animal, sinó també en pacients amb EM, concordant així amb el paper patogènic que juga en la malaltia.¹³³⁻¹³⁴ A més, s'han associat alteracions en el ratio dels limfòcits Th17/Treg amb moments d'activitat i amb major severitat de la malaltia.¹⁸¹⁻¹⁸²

Respecte a les subpoblacions de limfòcits B hi ha molts pocs estudis realitzats en pacients amb EM.¹⁴¹⁻¹⁴² La majoria dels estudis realitzats es centren en aquestes subpoblacions com a marcadors de resposta a tractaments.¹⁸³⁻¹⁸⁴

2.6.7. Efecte dels tractaments per a l'EM sobre les subpoblacions

limfocitàries

A la taula 3 es resumeixen els principals canvis sobre les subpoblacions limfocitàries en sang perifèrica que produeixen els diferents tractaments aprovats per a l'EM. A continuació es descriuen amb major detall aquells canvis descrits en els tractaments que s'estudiaran en aquest treball.

Interferó β

Els interferons tenen un efecte immunomodulador inespecífic sobre diferents components del sistema immunològic, així com també sembla que podria tenir un paper interferint en la migració dels leucòcits a través de la BHE. S'ha descrit que el tractament amb IFN- β indueix una lleugera leucopènia, un augment de **IL10** que s'ha associat tant a un increment de limfòcits T CD4⁺ i CD8⁺ reguladors com de la subpoblació de limfòcits NK CD56^{bright}.¹⁸⁵⁻¹⁸⁷ A més, diferents estudis apunten a un decrement en la producció de **IL17** i de la subpoblació **Th17** en sang perifèrica de pacients en tractament en IFN- β .¹⁸⁸⁻¹⁸⁹ Aquest efecte immunomodulador porta a una disminució de les subpoblacions de limfòcits T activats i memòria.^{187, 190} D'altra banda, s'ha vist que el tractament amb IFN- β genera un increment en la producció de limfòcits B (observant-se un increment en la concentració de KRECs).¹⁹¹ En canvi, l'efecte sobre la generació de RTEs a nivell tímic és contradictori, però sembla que de tenir algun efecte seria una disminució de RTEs i TRECs en sang perifèrica.¹⁹¹⁻¹⁹²

Natalizumab

El natalizumab, al ser un Ac monoclonal anti-CD49d, s'uneix a la subunitat $\alpha 4$ de la integrina $\alpha 4\beta 1$, bloquejant la seva interacció amb la molècula VCAM de l'endoteli, i inhibeix el pas de les cèl·lules a través de la BHE. Com a conseqüència, en els pacients amb tractament amb natalizumab s'observa un

important increment en el recompte tant de limfòcits B, T CD4⁺, T CD8⁺ (sense veure's alteracions en el índex CD4/CD8) i cèl·lules NK en sang perifèrica.¹⁹³⁻¹⁹⁵

L'efecte del natalizumab sobre les subpoblacions minoritàries de limfòcits T i B no està ben definit, tot i que sembla que les subpoblacions de limfòcits T efectores quedarien retingudes en sang perifèrica i que podria induir canvis en les subpoblacions de limfòcits B memòria.¹⁹⁵⁻¹⁹⁷ A més, s'ha vist que el fàrmac interfereix en la retenció dels progenitors hematopoètics en medul·la òssia observant-se en sang perifèrica un augment tant de cèl·lules CD34⁺, i en concret aquelles de llinatge limfoide, com de les subpoblacions més immadures de limfòcits B, com són els limfòcits B transicionals.^{196, 198-202}

Fingolimod

El principal efecte del fingolimod sobre les subpoblacions limfocitàries en sang perifèrica, com a conseqüència del seu mecanisme d'acció, és la retenció en els ganglis limfàtics de les cèl·lules que expressen **CCR7**. Aquest efecte en els limfòcits T es tradueix en una disminució dels percentatges en sang perifèrica de les subpoblacions naïve i memòria central tant en CD4⁺ com en CD8⁺.²⁰³⁻²⁰⁶

El que fa als limfòcits B, l'expressió de CCR7 no es troba tant limitada a unes subpoblacions definides. Aquest fet es tradueix en la disminució del percentatge dels limfòcits B en general, però no s'observa un efecte clar sobre cap de les seves subpoblacions i els pocs treballs publicats fins al moment són contradictoris.²⁰⁷⁻²⁰⁸

Independentment del seu efecte sobre les cèl·lules CCR7⁺ s'han descrit altres canvis induïts pel fingolimod sobre les subpoblacions limfocitàries conseqüència d'altres mecanismes d'acció encara no ben definits. S'ha vist, tant en models *in vitro* com *in vivo*, que el tractament amb fingolimod induïx una producció de **limfòcits T reguladors**.²⁰⁹⁻²¹¹ A més s'ha observat un augment dels percentatges d'aquesta subpoblació en sang perifèrica de

pacients en tractament amb aquest fàrmac.^{205, 208, 212-215} Els resultats publicats fins el moment sobre l'efecte del fingolimod sobre els **limfòcits Th17** no són concloents i, fins i tot, en alguns casos contradictoris.^{205, 213, 216} Pel que fa a les subpoblacions de limfòcits B, s'ha descrit un augment dels **limfòcits B transicionals** o immadurs^{207, 217} i que aquestes cèl·lules podrien estar exercint un paper regulador, produint IL-10.^{207, 218}

Taula 9. Principals canvis que produeixen el tractament per a l'Esclerosi Múltiple sobre les subpoblacions limfocitàries

Fàrmac	recompte limfòcits	LT	LT CD4+	LT CD8+	Estadis maduració LT	RTEs	Th17	Tregs	LB	Estadis maduració LB	B transicionals/ B regs immadurs
Interferó β	↓	↓			↓ memòria i actius	NC/↓	↓	↑			↑
Acetat de glatiràmer		Promou la diferenciació dels LT cap a un fenotip Th2									
Natalizumab	↑	↑	↑	↑	NC	↑	=	NC	↑	↓ naive	↑
										↓ memòria	
Fingolimod	↓	↓	↓	↑	↓ naive	↑	↑	↑	↓	NC	↑
					↓ CM						
					↑ EM						
					↑ TEMRA						
Tecfidera	↓	Promou la diferenciació dels LT cap a un fenotip Th2									
Alemtuzumab	↓	↓	↓	↓	↑ EM	↓	↓	↓	↓	↓	↓
					↑ TEMRA						
Teriflunomida	↓	inhibició de la síntesi de novo d'aquells limfòcits amb major estat d'activació/proliferació									

3. HIPÒTESI

En les malalties autoimmunitàries es produeixen alteracions en la regulació del sistema immunitari, tant en els mecanismes de tolerància central com en els de la tolerància perifèrica, que es veuen reflectits en canvis en les subpoblacions limfocitàries en sang perifèrica

L'estudi de les subpoblacions limfocitàries minoritàries per citometria de flux permet definir potencials biomarcadors en sang perifèrica per al diagnòstic i pronòstic de les malalties autoimmunitàries organoespecífiques així com de la resposta a teràpies immunomoduladores.

4. OBJECTIUS

4.1. Dissenyar un panell de citometria de flux que permeti identificar canvis en les subpoblacions limfocitàries minoritàries en sang perifèrica en pacients amb malalties autoimmunitàries organoespecífiques, en concret en pacients amb malaltia de Graves-Basedow i Esclerosi Múltiple, en comparació amb un grup de donants sans.

4.2. Definir biomarcadors en sang perifèrica de resposta terapèutica en pacients amb Esclerosi Múltiple en tractament amb fingolimod que permetin diferenciar aquells pacients responedors a la teràpia.

5. MATERIALS I MÈTODES

5.1. DISSENY DE L'ESTUDI:

OBJECTIU 1

Estudi observacional en el que es van incloure donants sans, pacients amb malaltia de Graves-Basedow i pacients amb Esclerosi Múltiple.

Donants sans

Com a grup control es van incloure 40 donants sans del Banc de Sang i Teixits de Badalona (Hospital Germans Trias i Pujol). Dels quals 17 eren dones i 23 homes, i la mitjana d'edat de 42,85 anys (Desviació estàndard: 10,83).

Pacients amb malaltia de Graves Basedow

Els pacients amb malaltia de Graves-Basedow es van incloure en el Servei d'Endocrinologia de l'Hospital Germans Trias i Pujol. Es van incloure 26 pacients (23 dones, 3 homes; d'edat entre els 21 i 76 anys). El diagnòstic de malaltia de Graves es realitza en base a la simptomatologia clínica, la funció tiroïdea i la presència d'Ac anti-TSHR. Tots els pacients inclosos es trobaven clínicament estables en el moment de l'estudi. L'estabilitat clínica es va definir com una funció tiroïdal normal mantinguda després de la finalització del tractament. Tots els pacients havien rebut tractament previ, 7 havien estat tractats amb tiroïdectomia total, 10 amb tractament radioiode amb I^{131} i 9 amb fàrmacs antitiroïdals, però cap havia rebut tractament com a mínim en els darrers 4 mesos (mitjana de mesos sense tractament: 27,85; Desviació estàndard: 16,04 mesos). Les característiques clíniques i de laboratori del pacients amb malaltia de Graves inclosos es detallen a la taula 4.

Taula 10. Característiques clíniques i de laboratori dels pacients amb malaltia de Graves-Basedow inclosos en l'estudi

Codi	Sexe	Edat (anys)	Evolució			mesos sense Ac anti-TPO		Ac anti-Tg		Ac anti-TSHR		Tractament	Ofthalmopatia en		Ofthalmopatia en	Tabaquisme
			(anys)	(anys)	tractament	(IU/ml)	(IU/ml)	(IU/ml)	(IU/ml)	(IU/ml)	(IU/ml)		hipertiroidisme	estabilitat clínica		
GB01	F	39	6	63		<5	1,3	0				fàrmacs anti-tiroidals	NO			NO
GB02	M	56	6	48		<5	4,6	0				tiroidectomia	SI			NO
GB03	F	62	6	12		<5	2,6	0,2				tiroidectomia	SI	NO		NO
GB04	F	51	6	27		12,4	97,9	2,01				¹³¹ I	NO			NO (extabaquisme)
GB05	F	34	3	4		<5	4,3	0				fàrmacs anti-tiroidals	SI			NO
GB06	F	30	4	24		14,3	66,1	2,42				tiroidectomia	SI	NO		NO (extabaquisme)
GB07	F	30	6	60		9,6	61,9	0				¹³¹ I	NO			NO
GB08	F	57	5	21		126,1	69,5	0				fàrmacs anti-tiroidals	SI	NO		NO (extabaquisme)
GB09	F	52	4	14		<5	22,1	1,63				¹³¹ I	NO			NO
GB10	F	35	3	20		<5	1,9	1,17				tiroidectomia	SI			NO
GB11	F	68	5	37		161	1,1	0,35				fàrmacs anti-tiroidals	SI	SI		NO
GB12	M	35	4	32		5,3	1	0				fàrmacs anti-tiroidals	NO			NO
GB13	F	21	4	18		77,2	542,3	28,26				¹³¹ I	NO			NO
GB14	F	43	5	39		21,8	28,2	1,77				¹³¹ I	NO			SI
GB15	F	26	3	16		27,3	18,4	1,23				¹³¹ I	NO			NO
GB16	F	46	4	30		24,7	46,7	0,16				tiroidectomia	NO			NO
GB17	F	56	4	19		289,1	>2000	1,45				fàrmacs anti-tiroidals	NO			NO
GB18	F	52	4	33		5,8	3,3	1,54				fàrmacs anti-tiroidals	NO			NO
GB19	F	28	4	46		<5	9,5	0,46				tiroidectomia	NO			NO
GB20	F	50	4	21		205,9	1000	0				fàrmacs anti-tiroidals	NO			NO (extabaquisme)
GB21	F	54	2	24		16,3	310	0				fàrmacs anti-tiroidals	NO			NO
GB22	F	43	4	14		<5	208,3	1,26				¹³¹ I	NO			SI
GB23	M	51	3	19		22,9	65,3	4,66				tiroidectomia	SI	NO		SI
GB24	F	61	5	58		<5	63,6	0,35				¹³¹ I	NO			SI
GB25	F	60	2	11		515,1	9	15,88				¹³¹ I	NO			NO
GB26	F	76	3	14		29	821,7	2,57				¹³¹ I	NO			NO

Pacients amb Esclerosi Múltiple

Seixanta-sis pacients d'EM de la Unitat d'Esclerosi Múltiple del Departament de Neurociències es van incloure en l'estudi. Tots els pacients complien els criteris de 2005 de Mc Donald²¹⁹ per al diagnòstic d'EM. Es van incloure 23 pacients amb EMRR sense tractament modificador de la malaltia, 27 pacients en tractament amb medicaments modificadors de la malaltia (16 en tractament amb IFN- β i 11 en tractament amb natalizumab), i 16 pacients amb formes progressives de la malaltia (8 EMPP i 8 EMSP). El 71% (n=47) dels pacients eren dones i la mitjana d'edat va ser de 41 anys (Desviació estàndard: 6,7). Les característiques clíniques dels pacients amb EM inclosos es detallen a la taula 5.

Taula 11. Característiques clíniques dels pacients amb EM estudiats

Codi	Tipus EM	Tractament	Edat	Sexe	EDSS basal	Anys evolució	Nº brots previs
EM01	EMRR	No	45	dona	3	12	6
EM02	EMRR	No	58	dona	4	12	4
EM03	EMRR	No	44	dona	4,5	14	6
EM04	EMRR	No	37	dona	4	3	3
EM05	EMRR	No	33	dona	4	3	3
EM06	EMRR	No	68	home	3	29	16
EM07	EMRR	No	57	home	3	16	3
EM08	EMRR	No	37	dona	2	8	4
EM09	EMRR	No	60	dona	2,5	4	4
EM10	EMRR	No	44	home	3	19	7
EM11	EMRR	No	43	dona	2	5	3
EM12	EMRR	No	29	home	1,5	5	3
EM13	EMRR	No	22	home	3,5	22	5
EM14	EMRR	No	47	dona	1	6	3
EM15	EMRR	No	52	dona	2	11	3
EM16	EMRR	No	40	dona	3,5	10	9
EM17	EMRR	No	45	dona	2	1	2
EM18	EMRR	No	63	home	1,5	3	3
EM19	EMRR	No	40	dona	4	11	5
EM20	EMRR	No	44	dona	4	12	7
EM21	EMRR	No	34	home	3,5	2	2
EM22	EMRR	No	53	dona	6	5	2
EM23	EMRR	No	33	dona	2	7	3
EM24	EMPP	No	44	dona	3,5	22	-
EM25	EMPP	No	45	home	6,5	15	-
EM26	EMPP	No	46	dona	4	6	-
EM27	EMPP	No	51	dona	5	4	-
EM28	EMPP	No	56	dona	3,5	11	-
EM29	EMPP	No	43	dona	3	11	-

Materials i mètodes

EM30	EMPP	No	30	home	3,5	17	-
EM31	EMPP	No	53	dona	1	4	-
EM32	EMSP	No	32	home	6	15	6
EM33	EMSP	No	47	dona	4	13	8
EM34	EMSP	No	38	dona	6,5	23	16
EM35	EMSP	No	52	dona	8	14	14
EM36	EMSP	No	39	home	6	20	7
EM37	EMSP	No	61	home	1	16	4
EM38	EMSP	No	49	home	4,5	10	1
EM39	EMSP	No	45	dona	5	18	3
EM40	EMRR	Natalizumab	40	dona	7	10	5
EM41	EMRR	Natalizumab	56	home	3,5	8	13
EM42	EMRR	Natalizumab	37	dona	4	4	3
EM43	EMRR	Natalizumab	43	dona	6,5		
EM44	EMRR	Natalizumab	41	dona	2,5	2	5
EM45	EMRR	Natalizumab	32	home	3	8	13
EM46	EMRR	Natalizumab	44	home	4	96	5
EM47	EMRR	Natalizumab	42	dona	4,5	4	3
EM48	EMRR	Natalizumab	51	home	6	10	1
EM49	EMRR	Natalizumab	45	dona	3	22	5
EM50	EMRR	Natalizumab	68	dona	6,5	11	.
EM51	EMRR	IFN- β			1	10	2
EM52	EMRR	IFN- β	66	home	1	4	2
EM53	EMRR	IFN- β	25	dona	1	3	4
EM54	EMRR	IFN- β	41	dona	2	11	3
EM55	EMRR	IFN- β	40	dona	4	15	7
EM56	EMRR	IFN- β	30	dona	4	2	4
EM57	EMRR	IFN- β	44	dona	4	10	3
EM58	EMRR	IFN- β	44	dona	2	10	4
EM59	EMRR	IFN- β	43	dona	2,5	12	6
EM60	EMRR	IFN- β	62	dona	1,5	4	2
EM61	EMRR	IFN- β	48		3,5	3	3
EM62	EMRR	IFN- β	57		2,5	10	3
EM63	EMRR	IFN- β	42		3		5
EM64	EMRR	IFN- β	50		6	22	5
EM65	EMRR	IFN- β	43		2,5	10	4

Els donants sans que acudien al Banc de Sang i Teixits de Badalona eren informats de l'estudi. Als que estaven interessats en participar i firmaven el consentiment informat se'ls extreien 10ml de sang.

Els pacients d'EM i malaltia de Graves-Basedow que realitzaven seguiment en la Unitat d'Esclerosi Múltiple del Departament de Neurosciències o en el Servei d'Endocrinologia de l'Hospital Germans Trias i Pujol van ser seleccionats i informats de l'estudi. Els que complien els criteris d'inclusió i firmaven el consentiment se'ls extreia 10 ml de sang.

OBJECTIU 2

Estudi prospectiu d'un any de durada en pacients diagnosticats de EMRR que iniciaven tractament amb fingolimod. Els criteris d'inclusió varen ser diagnòstic de EMRR (segons els criteris de McDonald revisats el 2010²²⁰), inici de tractament amb fingolimod (0,5 mg/dia), edat compresa entre els 18 i 59 anys i grau de discapacitat, en el moment basal, mesurada amb l'escala EDSS de 0-6,0. Per als pacients inclosos que havien rebut tractament previ es va establir un període de rentat mínim de 24 hores per interferó- β i acetat de glatiràmer i de 2 mesos per a natalizumab o altres tractaments.

Als subjectes que complien els criteris de l'estudi (n=14) se'ls va realitzar una avaluació neurològica estandarditzada i del grau de discapacitat amb l'escala EDSS en el moment basal, i als mesos 1, 3, 6 i 12 de tractament. Tots els efectes adversos i brots es van reportar durant el seguiment. Tant en el moment basal com als 12 mesos del inici del tractament es va realitzar una MRI cerebral seguint el protocol estàndard per tal d'avaluar l'aparició de noves lesions o de lesions de major mida clínicament silents.

L'extracció de sang perifèrica per l'estudi del fenotip de les subpoblacions limfocitàries es va realitzar a temps basal i als mesos 1, 3, 6, 9 i 12 després del inici del tractament amb fingolimod.

5.2. IMMUNOFENOTIPATGE PER CITOMETRIA DE FLUX

Mitjançant citometria de flux amb un citòmetre de tres làsers (FACS Canto II) es va realitzar l'anàlisi fenotípic de les subpoblacions limfocitàries en sang perifèrica, podent analitzar d'aquesta manera fins a vuit marcadors diferents per a cada

Taula 12. Panells d'anticossos utilitzats amb el marcatge corresponent i la quantitat a utilitzar

	Anticòs	Fluorocrom	Clona	Casa comercial	Referència	Quantitat
Panell 1	CD3	AmCyan	SK7	BD Biosciences	339186	1 µl
	CD4	APC-H7	SK3	BD Biosciences	641398	1 µl
	CD8	V450	RPA-T8	BD Horizon	560348	5 µl
	CD27	PerCP-Cy5.5	M-T271	BD Pharmingen	560612	2 µl
	CD45RA	FITC	L48	BD Biosciences	335039	5 µl
	CCR7	PECy7	3D12	BD Pharmingen	557648	1 µl
	CD31	Alexa 647	M89D3	BD Pharmingen	558094	2 µl
	PTK7	PE	188B	Miltenyi Biotec	130-091-364	5 µl
Panell 2	CD4	V450	RPA-T4	BD Horizon	560345	5 µl
	CCR7	PECy7	3D12	BD Pharmingen	557648	5 µl
	CCR6	PE	11A9	BD Pharmingen	559562	1 µl
	CCR4	Alexa 647	1G1	BD Pharmingen	557863	5 µl
Panell 3	CD45	FITC	2D1	BD Biosciences	345808	2,5 µl
	CD3	V450	UCHT1	BD Biosciences	561812	2,5 µl
	CD4	PerCP-Cy5.5	RPA-T4	BD Pharmingen	560650	1,25 µl
	CD25	PE	M-A251	BD Pharmingen	555432	5 µl
	CD127	Alexa 647	HIL-7R-M2	BD Pharmingen	558598	10 µl
	CD45RO	APC-H7	UCHL1	BD Pharmingen	561137	2,5 µl
	CCR4	PE-Cy7	1G1	BD Pharmingen	557864	2,5 µl
	HLA-DR	V500	G46-6	BD Horizon	561224	2,5 µl
Panell 4	CD19	PerCP-Cy5.5	SJ25C1	BD Biosciences	332780	5 µl
	CD24	FITC	ML5	BD Pharmingen	555427	5 µl
	CD38	PE	HIT2	BD Pharmingen	555460	3 µl
	CD27	APC	L128	BD Biosciences	337169	3 µl
Panell 5	CD19	V500	HIB19	BD Horizon	561121	1 µl
	CD27	APC	L128	BD Biosciences	337169	3 µl
	IgD	FITC	IA6-2	BD Pharmingen	555778	10 µl
	IgM	PerCP-Cy5.5	G20-127	BD Pharmingen	561285	5 µl
	CD21	PE	B-ly4	BD Pharmingen	555422	5 µl

marcatge. Els diferents anticossos es van validar i titular amb l'objectiu d'establir la concentració idònia de cada anticòs de manera que s'obtingués la major relació entre la senyal de les cèl·lules positives i les negatives. Així van quedar establerts els panells d'anticossos descrits a la Taula 6.

Es van analitzar les diferents subpoblacions limfocitàries descrites a la Taula 7. Per tal de poder establir el criteri de positivitat per a cadascun dels anticossos es van aplicar controls FMO (Fluorescence Minus One), que consisteixen en realitzar la tinció de tots els anticossos menys en el que desitgem col·locar el criteri de positivitat. Es van definir controls FMO per al marcatge amb PTK7 per a la subpoblació de RTEs i per al marcatge amb CCR7 per a la subpoblació de Th17. També es van utilitzar com a controls de positivitat poblacions internes de referència per al anàlisi de CCR7 vs CD45RA en els limfòcits T, CD45RO vs CCR4 i CD45RO vs HLA-DR en Tregs, CCR4 vs CCR7 en les Th17, CD27 vs CD24 en Bregs i CD19 vs CD21 en els limfòcits B immadurs.

Adicionalment, per a totes les mostres es va realitzar un comptatge amb Perfect Count Beads (Cytognos) per tal d'obtenir el nombre absolut de limfòcits i poder quantificar cadascuna de les subpoblacions limfocitàries estudiades.

5.2.1. Procediment de la tinció superfície de les mostres de sang perifèrica

Per a la tinció de superfície de les mostres es van incubar 100µl de sang total juntament amb la mescla d'anticossos detallats a la taula 6 durant 15 minuts a temperatura ambient i protegits de la llum. Es van afegir 2 ml de solució de lisi (BD FACS Lysing Solution) que es van incubar 7 minuts a temperatura ambient i protegits de la llum. Seguidament es va centrifugar a 1200 rpm 5 minuts, es van decantar les mostres. Es va fer un rentat amb 3 ml de Tampó de rentat i van tornar a centrifugar a 1200 rpm 5 minuts. Es van decantar els sobrenedants i es van afegir 200 µl de Tampó de rentat. En el panell 5 es va realitzar un rentat previ de la sang amb PBS per a eliminar la IgD i IgM del plasma.

5.2.2. Protocol de comptatge amb PerfectCount:

De totes les mostres es va fer un marcatge de 25 µL sang total amb l'anticòs monoclonal CD45-PerCP (BD Biosciences) que es va incubar 15 minuts a temperatura ambient i protegit de la llum. Per tal de lliurar la mostra es van afegir

450 µl de solució de lisis (BD FACS Lysing Solution) i es va incubar 10 minuts a temperatura ambient i protegit de la llum. Es van afegir 25 µl de Perfect Count beads (Cytognos).

Taula 13. Caracterització fenotípica de les subpoblacions estudiades

Subpoblació limfocitària	Fenotip
Panell 1:	
Estadis de limfòcits T	
RTEs	CD3+CD4+CD27+CCR7+CD45RA+CD31+PTK7+ CD3+CD8+CD27+CCR7+CD45RA+CD31+PTK7+
Naive	CD3+CD4+CD27+CCR7+CD45RA+ CD3+CD8+CD27+CCR7+CD45RA+
Memòria Central	CD3+CD4+CD27+CCR7+CD45RA- CD3+CD8+CD27+CCR7+CD45RA-
Memòria efectora	CD3+CD4+CD27+CCR7-CD45RA- CD3+CD8+CD27+CCR7-CD45RA-
Memòria efectora ben diferenciada	CD3+CD4+CD27-CCR7-CD45RA- CD3+CD8+CD27-CCR7-CD45RA-
Efectores (T_{EMRA})	CD3+CD4+CD27-CCR7-CD45RA+ CD3+CD8+CD27-CCR7-CD45RA+
Limfòcits dobles positius (CD4+CD8+)	CD3+CD4+CD8+CD27+CCR7+CD45RA+ CD3+CD4+CD8+CD27+CCR7+CD45RA- CD3+CD4+CD8+CD27+CCR7-CD45RA- CD3+CD4+CD8+CD27-CCR7-CD45RA- CD3+CD4+CD8+CD27-CCR7-CD45RA+
Panell 2:	
Th17	CD4+CCR7-CCR4+CCR6+
Panell 3:	
LT reguladors	CD4+CD127 ^{low} CD25+CCR4+CD45RO+HLADR+
Panell 4:	
Estadis de limfòcits B	
Naive	CD19+CD27-IgM+IgD+
Memòria sense canvi de classe	CD19+CD27+IgD+IgM+
IgM memòria	CD19+CD27+IgD-IgM+
Memòria amb canvi de classe	CD19+CD27+IgD-IgM-
Immadurs	CD19+CD27-IgM+IgD+CD21-
Panell 5:	
LB transicionals	CD19+CD24 ^{hi} CD38 ^{hi} CD27-
Plasmablasts	CD19+CD38 ^{hi} CD27+
B reguladores	CD19+CD24 ^{hi} CD27+

5.3. ADQUISICIÓ CITOMÈTRICA

L'adquisició citomètrica es va realitzar en un citòmetre FACSCanto II (BD Biosciences), utilitzant el software FACSDiva (BD Biosciences). Es van adquirir 100.000 limfòcits per a cada tub dels de caracterització fenotípica. Per als tubs de comptatge, es van adquirir 5.000 boletes (beads).

5.4. ANÀLISI CITOMÈTRIC

L'anàlisi de les subpoblacions limfocitàries es va fer utilitzant els software FACSDiva (BD Biosciences).

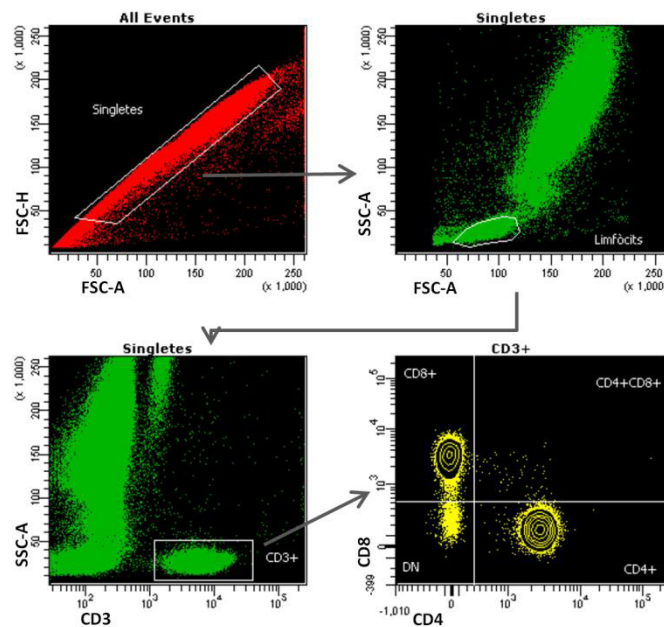


Figura 11. Exemple de l'esquema d'anàlisi de subpoblacions en limfòcits T CD4+, CD8+, dobles positius (CD4+CD8+) i dobles negatius (DN)

5.4.1. Anàlisi de la subpoblacions de limfòcits T:

L'estratègia seguida a l'hora d'analitzar les poblacions T ($CD4^+$, $CD8^+$ i DP) va ser diferenciar-les segons el grau de maduresa a partir dels marcadors CD27, CCR7 i CD45RA. Dintre d'aquestes subpoblacions es va estudiar l'expressió de CD31 i de PTK7 per tal de valorar els RTEs.

L'esquema seguit al fer l'anàlisi va ser, després d'eliminar les impureses i restes cel·lulars ("dobletes") a partir dels "singletes" es van seleccionar els limfòcits i d'aquests els que eren $CD3^+CD4^+$, $CD3^+CD8^+$ i els limfòcits doble positius ($CD3^+CD4^+CD8^+$). Tant en els limfòcits $CD3^+CD4^+$ com en els $CD3^+CD8^+$ es va analitzar l'expressió de CD45RA, CCR7, CD27, CD31 i PTK7. En la subpoblació de limfòcits doble positius, degut a que es tracta d'una subpoblació molt minoritària en sang perifèrica, es va analitzar l'expressió de CD45RA, CCR7 i CD27, sempre que s'hagués adquirit un mínim de 200 events en la regió de limfòcits dobles positius.

5.4.2. Anàlisi de la subpoblació Th17:

En l'anàlisi dels limfòcits Th17 ($CD4^+$ $CCR7^-$ $CCR4^+$ $CCR6^+$) a partir dels limfòcits totals es van seleccionar els $CD4^+$, d'aquests els $CCR7^-$, i a partir d'aquests es va seleccionar la subpoblació $CCR6^+CCR4^+$. Es van utilitzar un control FMO per a la positivitat de CCR7 i la subpoblació de limfòcits $CD4^-$ con a població interna de referència per a la positivitat de CCR4 i CCR6.

5.4.3. Anàlisi de limfòcits T reguladors

Els limfòcits T reguladors es van definir dintre dels limfòcits $CD3^+CD4^+$ en base a l'expressió en superfície dels marcadors CD127, CD25, CCR4, CD45RO. Dins d'aquests es van analitzar aquells que expressaven en superfície HLA-DR. Com a població interna de referència per a la positivitat de CD45RO i CCR4 es va utilitzar $CD3^+CD4^+$ i per a la positivitat per a HLA-DR, la població $CD3^+CD4^+$.

81

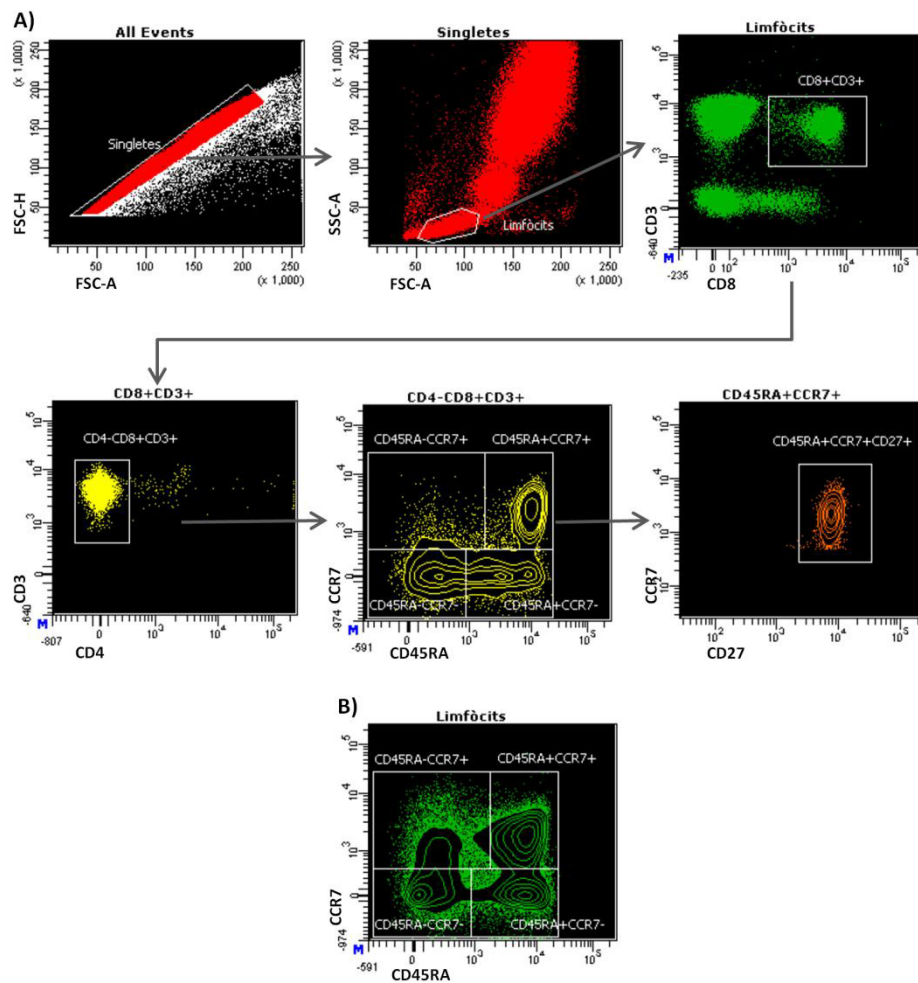


Figura 13. Estratègia d'anàlisi dels estadis de maduració de limfòcits T $CD8^+$ en funció de l'expressió de CD45RA, CCR7 i CD27. B) Control de positivitat per a CCR7vsCD45RA a partir de limfòcits com a població interna de referència.

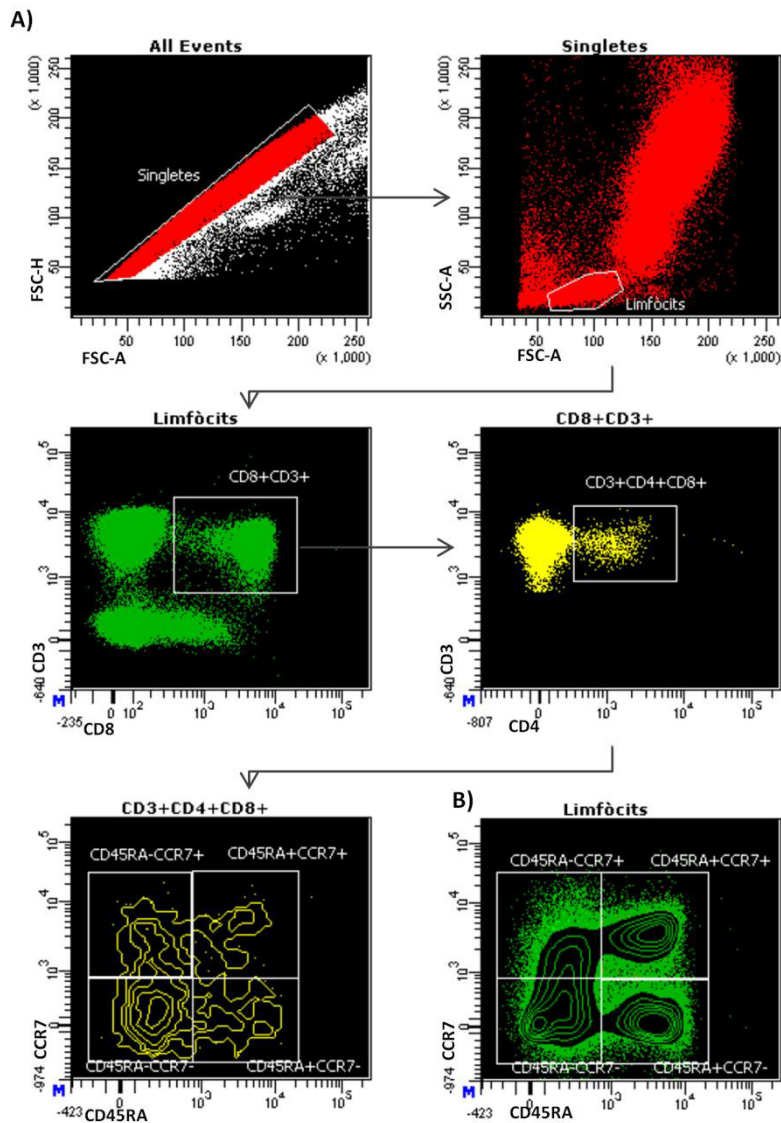


Figura 14. Estratègia d'anàlisi dels estadis de maduració de limfòcits T $CD4^+CD8^+$ en funció de l'expressió de CD45RA, CCR7 i CD27. B) Control de positivitat per a CCR7vsCD45RA a partir de limfòcits com a població interna de referència.

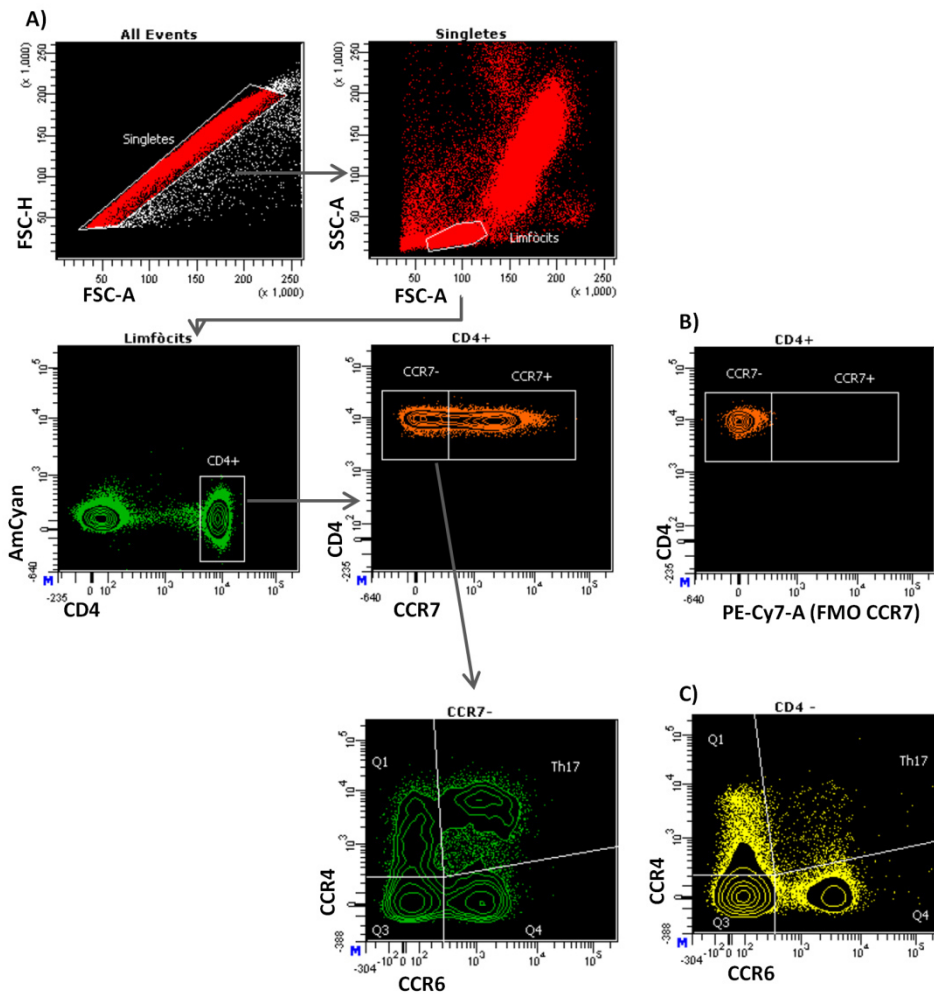


Figura 15. Estratègia d'anàlisi dels limfòcits Th17 en base a l'expressió de CD4, CCR7, CCR4 i CCR6. B) Control FMO per a CCR7. C) Control de positivitat per a CCR4vsCCR6 a partir de limfòcits CD4⁺ com a població interna de referència.

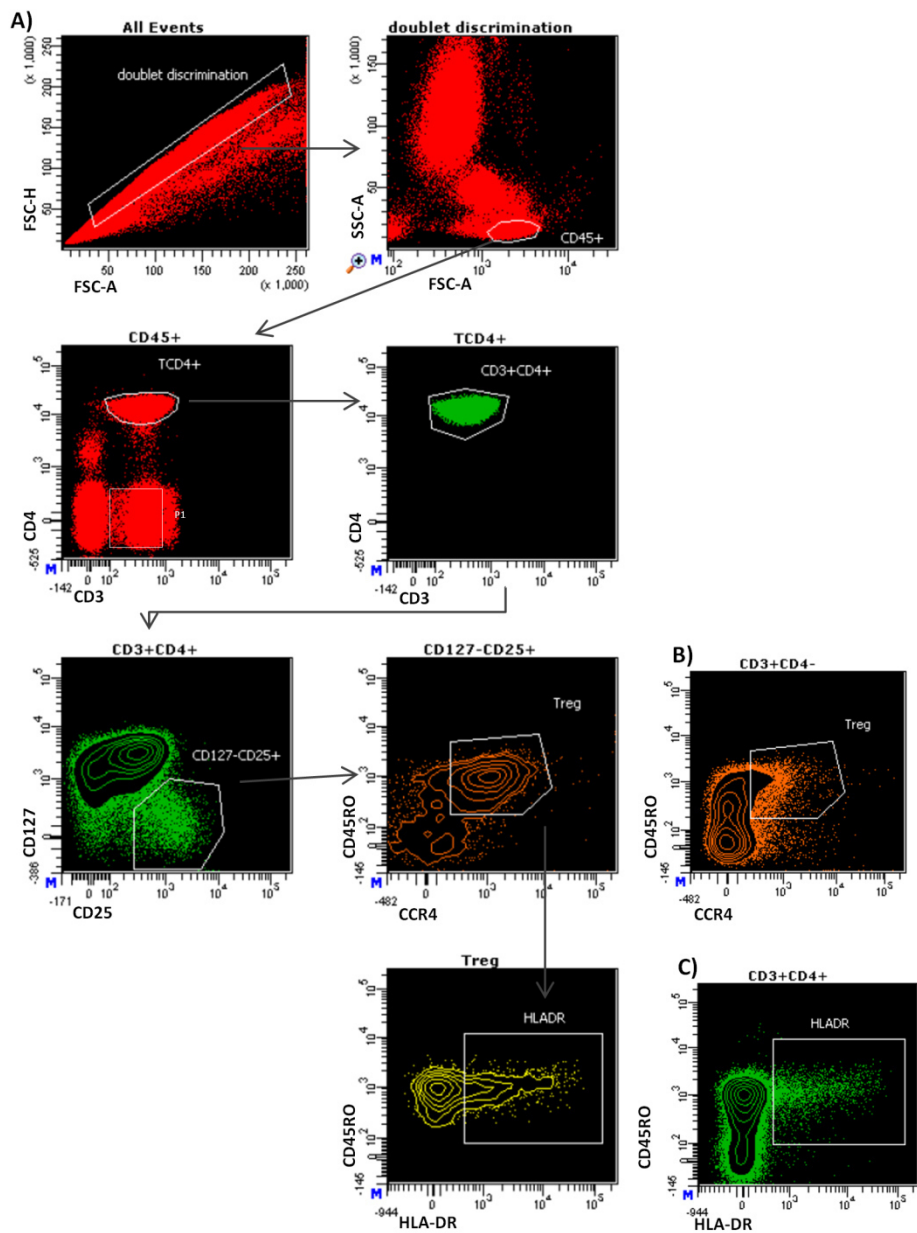


Figura 16. A) Estratègia d'anàlisi dels limfòcits Treg. B) Control de positivitat per a CD45ROvsCCR4 a partir de limfòcits CD4⁻ com a població interna de referència. C) Control de positivitat per a CD45RO vs HLA-DR a partir de limfòcits CD4⁺ com a població interna de referència.

5.4.4. Anàlisi de subpoblacions de limfòcits B transicionals, plasmablasts i limfòcits Breg

A l'hora d'analitzar els limfòcits B es van seleccionar els limfòcits totals i d'aquests els que eren CD19⁺. Dintre d'aquesta població es van seleccionar els CD27⁺, i d'aquests es van obtenir els valors de limfòcits B transicionals (CD24⁺CD38⁺) i en funció de la intensitat de positivitat es van diferenciar les subpoblacions de limfòcits B transicionals T1 i T2. A partir dels limfòcits CD19⁺ també es van analitzar els limfòcits Breg que es van definir com a CD19⁺CD24^{hi}CD27⁺ i els plasmablasts CD19⁺CD27^{hi}CD38^{hi}.

5.4.5. Anàlisi de subpoblacions de limfòcits B naïve i memòria

Els estadis de maduració dels limfòcits B es van analitzar en base a l'expressió en superfície de CD19 i dintre d'aquests es van analitzar en funció de l'expressió de CD27 (que diferencia els LB naïve, dels memòria), IgD i IgM (per diferenciar els que han fet canvi de classe dels que no).

5.5. ANÀLISI ESTADÍSTIC

Els resultats obtinguts en les diferents subpoblacions s'han comparat mitjançant un test t de student considerant significatives les diferències $p < 0.05$ utilitzant el paquet estadístic SPSS 18.0 i se'ls ha aplicat la correcció de Bonferroni per a comparacions múltiples.

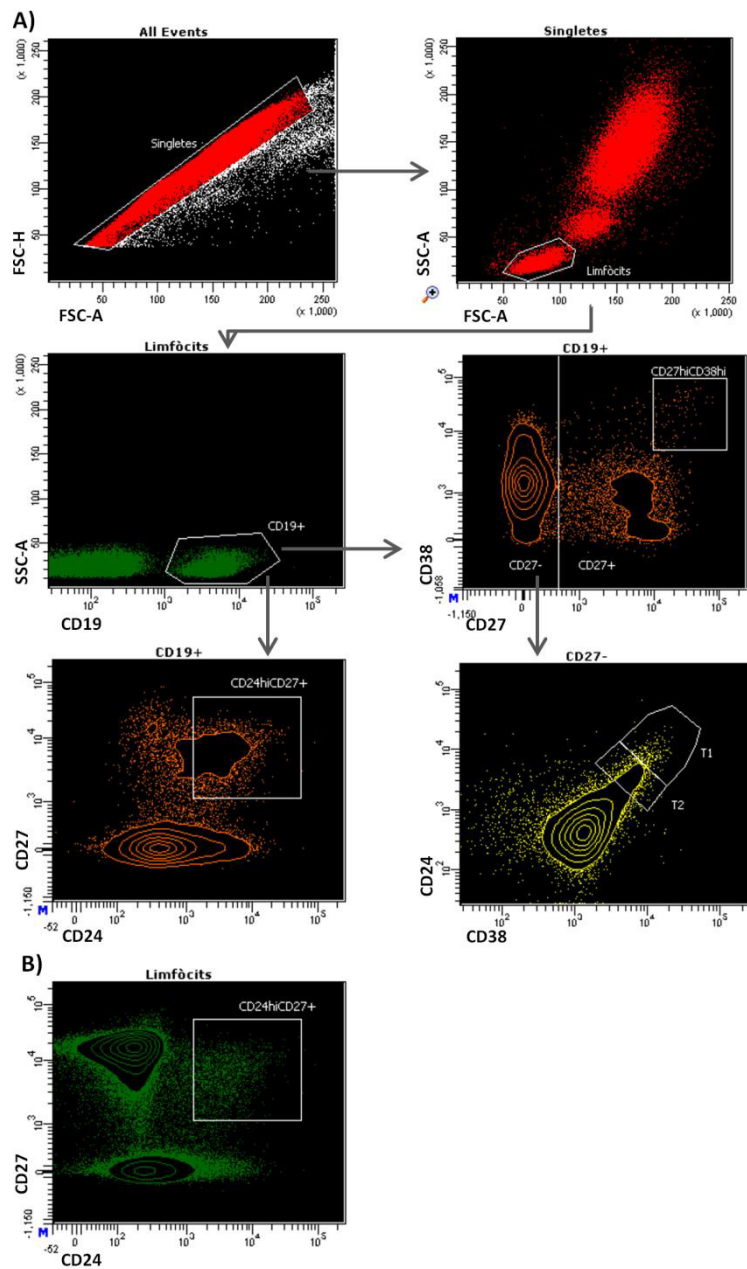


Figura 17. A) Estratègia d'anàlisi dels limfòcits B transicionals, plasmablasts i Breg. B)
Control de positivitat per a CD27 vs CD24 a partir de la població de limfòcits com a
població interna de referència

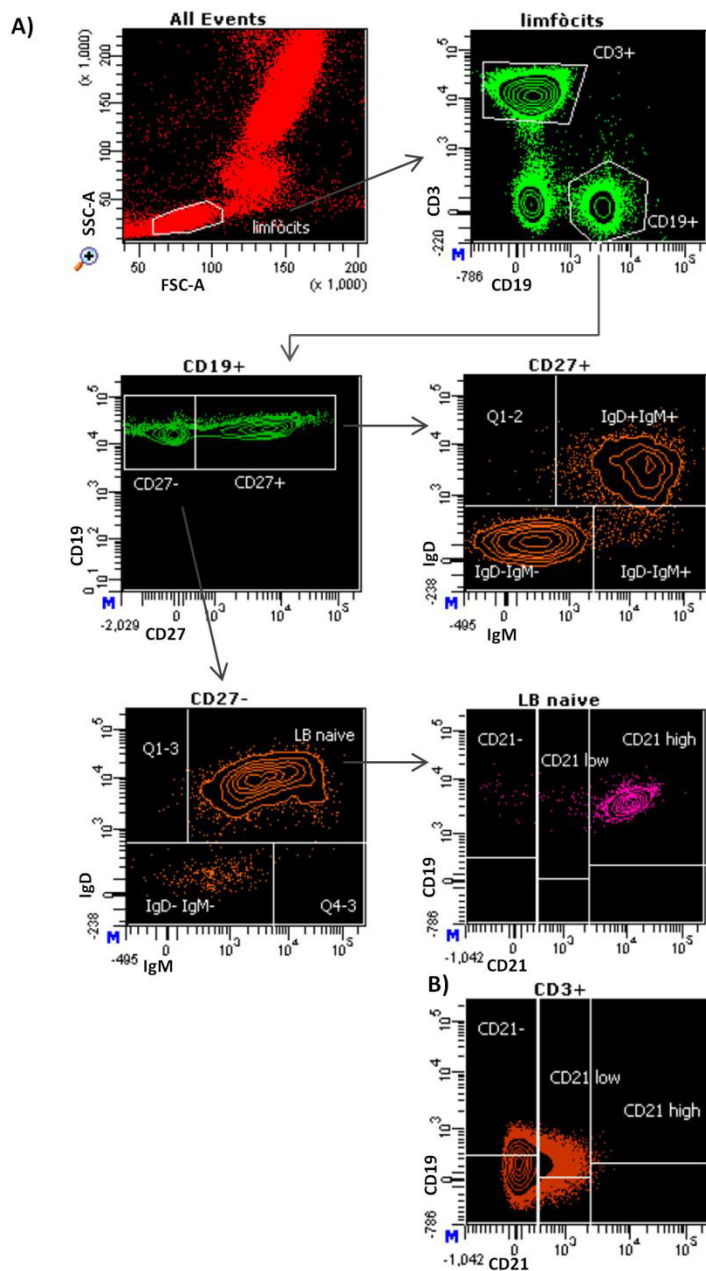


Figura 18. A) Estratègia d'anàlisi dels estadis de maduració dels limfòcits B. B) Control de positivitat per a CD19 vs CD21 a partir de la població de limfòcits CD3+ com a població interna de referència

6. RESULTATS

Els resultats d'aquest treball es presenten com un compendi de dos manuscrits publicats i un tercer actualment en revisió que tracten de la immunomonitorització de subpoblacions limfocitàries minoritàries per a la seva valoració com a potencials biomarcadors tant en el diagnòstic i pronòstic de malalties autoimmunitàries com en el seguiment de teràpiques immunomoduladores. A continuació es detalla un resum d'aquestes publicacions:

6.1. CAPÍTULO 1: Distinct Pattern of Peripheral Lymphocyte Subpopulations in Graves' Disease Patients with Persistency of Anti-TSHR Autoantibodies

Teniente-Serra A, Soldevila B, Quirant-Sánchez B, Fernández MA, Ester Condins A, Puig-Domingo M, Pujol-Borrell R, Martínez-Cáceres EM. (submitted)

La malaltia de Graves-Basedow és una malaltia autoimmunitària organoespecífica mediada per anticossos (Ac contra el receptor de la TSH). En aquest treball es van analitzar mostres de sang perifèrica de pacients amb Graves-Basedow clínicament estables amb l'objectiu d'identificar patró de subpoblacions limfocitàries que diferencia els pacients que els Ac contra el receptor de la TSH persistien d'aquells pacients en què ja no es detectaven aquests Ac i de donants sans.

Els resultats obtinguts en aquest treball indiquen que en els pacients clínicament estables en els que es manté la presència d'Ac contra el receptor de la TSH existeix una perpetuació de la resposta autoimmunitària perifèrica en la que es troben involucrades els limfòcits T CD8+ i T reguladors. En canvi, en aquest estadi de la malaltia, no hi ha un increment de la sortida tímica.

ABSTRACT

Background: Graves' disease (GD) is characterized by the production of autoantibodies against the TSHR (TRAbs). With long term treatment serum concentrations of TRAbs declines but in some patients, despite being clinically stable, TRAbs persist for many years.

Objective: To investigate whether GD patients with persistence of TRAbs constitute a subset of patients that could be identified by the extensive phenotypic analysis of circulating lymphocytes this suggesting disease heterogeneity.

Material and methods: Extensive lymphocyte subpopulations flowcytometric analysis of peripheral whole blood in a cross sectional observational study, including naïve, memory and effector T and B cells, Th17, regulatory T cells (Treg), recent thymic emigrants (RTEs) and double positive CD4⁺CD8⁺ (DP) T cells, was analysed in 25 clinically stable GD patients and 40 healthy donors (HD).

Results: GD patients with persistence of TRAbs showed a lower percentage of Treg and lower absolute numbers of central and effector memory CD8⁺ T cells. No differences in RTEs were found in peripheral blood from GD patients compared to HD but stable GD patients had higher percentage of DP cells of effector phenotype.

Conclusions: Using extensive phenotypic analysis of lymphocyte subpopulations it is possible to detect changes that help to identify patients with persistent TSHR antibodies and may contribute to understand why immune response is maintained in them.

INTRODUCTION

Graves' disease (GD) is one of the most common organ-specific autoimmune disorder - In its typical presentation main features are thyrotoxicosis, goiter and ophthalmopathy (1). Its etiology remains unclear and appears to be multifactorial (1-3).

Peripheral blood lymphocytes constitute only the 5% of the total lymphocyte population but because they are in continuous exchange with the lymphoid organs, it is assumed that they reflect their activity. In autoimmune diseases there is continuous activation on the immune response that is reflected in changes in the subsets of circulating lymphocytes, but they are not always easy to detect. In the case of GD, many studies have been conducted over the years but interference by the increased levels of the thyroid hormones and lack of standardization of the protocols has precluded reaching consistent results. (4-6)

In the last decade several efforts have been made to better define the subsets of lymphocytes using lineage, activation, homing and effector markers, this leading to improved phenotyping protocols that take advantage of polychromatic flowcytometers (7). We have recently participated in one attempt to normalize and improve the reproducibility of lymphocyte subset measurement.(8) Inspired by this type of protocols and trying to answer questions raised in previous projects we have investigated phenotypical changes in the circulating lymphocytes of Graves' patients in relation with TSHR Antibodies (TRAb) levels and clinical variables. In particular, we have also tried to elucidate whether there is an increase in recent thymic emigrants (RTES) as previous results suggested (9).

MATERIALS AND METHODS

Patients and healthy controls

Patients with GD were recruited from the outpatient clinic of the Division of Endocrinology of the Hospital Universitari Germans Trias i Pujol (Badalona, Spain). Twenty-five patients with GD (22 female, 3 male; age range 21-76 years) were included in the study. Diagnosis of GD was based on clinical symptoms, thyroid function tests and presence of TRAb. Serum TSH, FT4 and TT3 (Modular Analytics E-170; Roche Diagnostics, Indianapolis, USA), TgAb and TPOAb (LIAISON® Diasorin S.p.A., Italy) and TRAb (IASONTRAb® e.3rd; IASON GmbH, Graz) were measured. All patients were clinically stable at the time of the study. Clinical stabilization was defined as maintained normal thyroid function after discontinuation of treatment. Seven patients were treated by thyroidectomy, 10 with ¹³¹I administration and 8 with antithyroidal drugs, but none had received treatment for at least 4 months (average = 27.85 ± 16.04 months) prior to the time of study. The clinical data are shown in Table 1. Blood samples of 40 healthy blood donors (HD) (17 female, 23 male; age range 23-64 years) from the blood bank of Catalonia (Banc de Sang i Tèxtils, BST) were used as controls. Cord blood samples (n=10) were also from BST and thymic samples (n=3) were obtained with informed parental consent from paediatric patients undergoing corrective cardiac surgery. The Institutional Ethics Committee approved the study and written informed consent was obtained from all patients and controls.

Cell sources, preparation and surface staining

One hundred µl of peripheral blood were incubated with appropriate amounts of monoclonal antibodies. Erythrocytes were removed using lysis buffer (BD

FACS™ Lysing Solution, Beckton Dickinson (BD) Biosciences, San José, CA, USA). Samples were then washed and resuspended in PBS. To calculate the absolute number of lymphocyte subpopulations, 25 µl of the same samples were incubated with CD45-PerCP (BD Biosciences; 2D1) and analysed in parallel in a lyse-no wash protocol. Erythrocytes were removed by lysis buffer (BD Biosciences) and 25 µl of Perfect-Count Microspheres™ (Cytognos SL, Salamanca, Spain) were added. Surface staining of cord blood samples followed the same protocol as for peripheral blood.

Disperse preparation of thymocytes was obtained by finely mincing fresh thymus fragments, removing large aggregates and collecting the supernatant. This cell suspension was filtered through a 70 µm cell strainer and the filtrate containing thymocytes was washed. 10^6 cells were incubated with monoclonal antibodies. Samples were then washed and resuspended in PBS.

Lymphocyte subpopulations were defined using the markers specified in Table 2 using several combinations of the following monoclonal antibodies anti-: CD3-AmCyan (SK7), CD4-V450 (RPA-T4), CCR6 (CD196)-phycoerythrin (PE; 11A9), CCR4 (CD194)-AlexaFluor 647 (1G1), CD4- allophycocyanin (APC)-H7 (SK3), CD8-V450 (RPA-T8), CD45RA-fluorescein isothiocyanate (FITC; L48), CCR7 (CD197)-PE-Cy7 (3D12), CD27 PerCP-Cy5.5 (M-T271), CD31-AlexaFluor 647 (M89D3), CD3-V450 (UCHT1), CCR4-PE-Cy7 (1G1), CD45RO-APC-H7 (UCHL1), CD45 FITC (2D1), CD4 PerCp-Cy5.5 (RPA-T4), CD25-PE (M-A251), CD127-AF647 (HIL-7R-M21), HLADR-V500 (G46-6), CD19-PerCP-Cy5.5 (SJ25C1), CD27-APC (L128), CD24-FITC (ML5), CD38-PE (HIT2), CD19 V500 (HIB19), CD21 PE (B-ly4), IgD-FITC (IA6-2) all from BD Biosciences and PTK7-PE (188B; Milteny Biotec, Bergisch Gladbach, Germany).

A total of 100,000 lymphocytes (or thymocytes) were acquired in a multiparameter flow cytometer (FACSCanto II; BD Biosciences) and analyzed

using FACSDiva software (BD Biosciences). The desired lymphocyte subpopulations were gated using doublet discrimination and forward and side scatter, and their relative percentages were determined. The gating strategy for T-cell subsets in peripheral blood is shown in Figure 1. Fluorescence minus one (FMO) controls were used to define gating boundaries for CCR7 expression in the Th17 subpopulation and PTK7 expression in the RTEs subpopulation. Blood was analysed in the first 4 hours after venipuncture, with viability of the cells in all cases >99%.

Statistical analysis

Differences between groups were tested by one-way ANOVA with Bonferroni's correction for multiple comparisons. Results were expressed as medians (interquartile range). $P < 0.05$ was considered statistically significant. Statistical analyses were performed using the Statistical Package for Social Sciences (SPSS/Windows version 15.0; SPSS Inc, Chicago, IL, USA) and GraphPad Prism (5.0 version; GraphPad, La Jolla; CA, USA).

RESULTS

TRAb+ GD patients show lower levels of Treg and effector memory CD8 T cells in peripheral blood

Since in GD patients there is a progressive lymphocytic infiltration of the thyroid gland we performed an exhaustive analysis of lymphocyte subpopulations including naïve, central memory, effector memory and effector T cells in peripheral blood in search of minor changes that may reflect intrathyroidal populations.

GD patients with TRAb+ had lower absolute count of central memory CD8⁺ T cells and lower percentage and absolute count of early effector memory CD8⁺ T cells compared to HD (Figure 2; supplementary table 1). GD patients with TRAb+ also had lower percentage of Treg cells than HD in peripheral blood (TRAb+ GD: 2.80 (2.10 – 3.80) %, TRAb- GD: 3.85 (2.25 – 5.08) % and HD: 4.85 (3.40 – 5.98) %; TRAb+ GD vs HD: p=0.028 and TRAb- GD vs HD: p=ns; Figure 3A). Furthermore, the percentage of activated Treg cells (CD3⁺CD4⁺CD127^{low}CD25⁺CCR4⁺CD45RO⁺HLA-DR⁺) was lower in GD patients with TRAb+ than in HD (TRAb+ GD: 1.20 (0.80 – 1.60) %, TRAb- GD: 1.40 (0.80 – 2.05) % and HD: 1.95 (1.25 – 2.78) %; TRAb+ GD vs HD: p=0.034 and TRAb- GD vs HD: p=ns; Figure 3B).

No differences were found in all the other lymphocyte subsets analyzed (data not shown).

PTK7 expression in peripheral blood is similar between HD and GD patients

In order to investigate whether there is an increase in recent thymic emigrants (RTEs) in GD we have measured the expression of PTK7 in selected populations of GDs peripheral blood lymphocytes as this kinase has been described as a surface marker in human CD4⁺ CD31⁺ RTEs(10). The expression pattern was also analyzed in thymocytes, cord blood and peripheral blood lymphocytes of HD as reference populations in which the expression pattern is well established.

As expected, more than 80% of thymocytes were PTK7⁺ [double positive: 94.30 (85.00 – 96.40) %, double negative: 83.60 (82.30 – 88.60) %, single positive CD4⁺: 80.10 (55.20 – 88.40) % and single positive CD8⁺ thymocytes: 92.10 (82.90 – 95.50) %; n=3]. In cord blood samples (n=10), naïve CD4⁺ T cells

(CD45RA⁺CCR7⁺CD27⁺) were 94.40 (91.30 – 96.55) % of the CD4⁺ T cells, and from those, 23.10 (19.65 – 44.05) % were CD31⁺PTK7⁺. In peripheral blood from HD, a 31.35 (26.27 – 40.20) % of CD4⁺ T cells were naïve, and from those 2.8 (2.1 – 4.3) % were CD31⁺PTK7⁺ (RTEs). No differences were observed in PTK7 expression in peripheral blood of GD patients compared to HD. Further analysis of patients in relation to the presence of TSAb confirmed these results (TSAb +: 3.45 (2.7 – 3.8) % and 9 (6-16) cells/μl; TSAb - : 3.5 (2.9 – 4.35) % and 9 (5 – 14) cells/μl; HD: 2.8 (2.1 – 4.3) % and 7 (5-15) cells/μl; p=ns).

Double positive (CD4⁺CD8⁺) T cells in GD are not naïve

In our previous work (9) we found a small but significant expansion of double positive T cells in GD peripheral blood lymphocytes, but we could not establish whether they were RTEs or revertants. In this study we confirmed the previous results as we found that GD patients had higher percentage of DP cells than HD (1.3 [0.75 - 2.05] vs 0.8 [0.4-1.1] %; p=0.0009). However, only 9.45 (7.53 – 17) % of these DP cells had a naïve phenotype (CD45RA⁺CCR7⁺CD27⁺) and this proportion was similar to HD (11.08 (6.7 – 18) %, p=ns). In fact, GD patients had a higher percentage of DP cells with an effector phenotype (CD3⁺CD4⁺CD8⁺CD45RA⁺CCR7⁺CD27⁺) compared to HD [TRAb+ GD: 16.00 (8.68 – 30.18)%, TRAb- GD: 16.45 (11.63-35.90) and HD: 6.2 (4.40-10.53)%; TRAb+ GD vs HD: p=0.072 and TRAb- GD vs HD: p=0.006; (Figure 4D and F)]. These results support that DP cells increased in GD patients are not RTEs but revertant single positive T cells.

DISCUSSION

By using a small but very well characterized group of GD patients and by applying extensive standardized phenotypic analysis on whole blood instead of PBMC we believe it is possible to obtain relevant results in autoimmune disease patients and overcome the inconsistent results obtained in past studies. This study demonstrates that in fact it is possible to identify small but probably physiopathologically significant, changes in lymphocyte subpopulations in GD patients.

Treatment of GD patients usually leads to a decline in TRAb levels but there is a subgroup of patients that in spite of being clinically stable present detectable TRAb in serum. One of the aims of the present study was to investigate whether these patients showed differences in circulating lymphocyte subpopulations that may help to understand why the humoral response is maintained.

CD8⁺ T cells have been previously analyzed in GD (2, 11-13) showing a reduction in periphery and clear presence of CD8⁺ T cells in the intrathyroidal infiltrates (2, 11-12) with a memory phenotype (CD45RO⁺) (9). In addition, a negative correlation between TRAb and CD8⁺ T cells in peripheral blood had been described (2). In the present study, we found that GD patients with persistence of TRAb have reduction of central and early effector memory CD8⁺ T cells, plausibly because these cells migrate to the thyroid gland. In the same line, lymphocytic infiltration of the thyroid gland has been related to autoantibodies production (12, 14).

The reduction in CD8 effector lymphocyte subpopulations observed in our study supports the role of peripheral lymphocyte in the chronic persistent immune response of GD patients. An involvement of memory and effector

peripheral T cells has been described in the pathogenesis of autoimmune diseases such as multiple sclerosis and type 1 diabetes mellitus(15-19). The involvement of peripheral blood lymphocytes in thyroid autoimmunity is further suggested by the striking high percentage of patients treated with alemtuzumab, a monoclonal antibody anti-CD52, that develop thyroid autoimmunity including GD ². As this monoclonal induces a almost complete depletion of peripheral lymphocytes, the repertoire is replenished from the residual peripheral cells by a forced homeostatic proliferation, which in this circumstances favors the expansion of thyroid specific T cells perhaps from the thyroid gland itself. (20)

Our previous finding of an expansion of DP T lymphocytes (9) suggested an increased efflux of immature thymocytes to the periphery which did fit well with the increase in TRECS and of CD45RA+ in circulating lymphocytes also detected in that work but required further analysis. In the present report we found that these DP T cells are indeed expanded but they show an effector phenotype (CD4⁺CD8⁺CD45RA⁺CCR7⁺CD27⁺) and therefore probably result from the expansion in periphery of mature cells that re-express either CD4 or CD8 as reported by several authors (21-23).We analyzed also whether there was an increased thymic output or a peripheral homeostatic lymphocyte proliferation. By using a recently identified biomarker for RTEs (PTK7) ¹⁴ we could not detect differences in the percentage of RTEs (CD4⁺CD45RA⁺CCR7⁺CD27⁺CD31⁺PTK7⁺) in the peripheral blood of clinically stable GD patients. These results do not contradict however our original finding of an influx into the thyroid of T cells recently egressed from the thymus as demonstrated as assessed by TREC levels but it does contradict the findings in periphery. We are dealing here however with a different group of patients with a longer mean duration of the disease and this may explain the difference.

A reduction of Tregs in peripheral blood of GD patients has already been reported (24-25), but are in conflict with other studies that failed to confirm any differences (6, 26-28) (6, 26-28). One potential reason for this discrepancy may be the differences with respect to the markers used to define Tregs in the different studies. Although a better characterization of Treg cells in GD is still needed, most studies point to an impairment in Treg percentages and/or function in this disease (25, 29).

Altogether the results of the present study suggest that in GD patients with TRAb, despite being clinically stable, there is a maintained autoimmune response, in which memory CD8⁺ T cells probably infiltrating the thyroid gland contribute to the persistence of thyroiditis and TRAb production. In contrast, unlike what it has been described in early phases of the disease, in this stage there is not an involvement of RTEs.

ACKNOWLEDGEMENTS

This work has been supported by positive discussion through ENTIRE network (BM0907; www.entire-net.eu). We thank Dr. Roger Colobran and Dra Paula Correa for helping in the procurement of the thymus tissue. We also thank Amanda Rus and Aroa Pardell for technical assistance. The authors are members of a consolidated group (2014 SGR 1365) as recognized by the Agency for Management of University and Research Grants (AGAUR) of the Generalitat of Catalonia. The work was supported in part by project 14/00848 of the Instituto Carlos III (RPB).

Author's Contribution: ATS designed the research, performed most of the experiments, analyzed and interpreted the results, and drafted the manuscript; BS participated in the design of the study, interpretation of data

and helped in writing the manuscript. BQS participated in the interpretation of data and helped in writing the manuscript. MAF participated in the design and analysis of flow cytometry experiments. AEC provided HD samples; BS and MPD provided patient samples. MPD and RPB participated in the design and analysis of the study and revised the manuscript. EMC conceptualized and designed the study, supervised the research and revised the manuscript; and all authors commented on the manuscript.

CONFLICT OF INTEREST: The authors have nothing to disclosure.

REFERENCES

1. Menconi F, Marcocci C, Marino M. Diagnosis and classification of Graves' disease. *Autoimmun Rev.* 2014 Apr-May;13(4-5):398-402.
2. Bossowski A, Urban M, Stasiak-Barmuta A. Analysis of changes in the percentage of B (CD19) and T (CD3) lymphocytes, subsets CD4, CD8 and their memory (CD45RO), and naive (CD45RA) T cells in children with immune and non-immune thyroid diseases. *J Pediatr Endocrinol Metab.* 2003 Jan;16(1):63-70.
3. Zha B, Wang L, Liu X, Liu J, Chen Z, Xu J, et al. Decrease in proportion of CD19+ CD24(hi) CD27+ B cells and impairment of their suppressive function in Graves' disease. *PLoS One.* 2012;7(11):e49835.
4. van der Weerd K, Van Hagen PM, Schrijver B, Kwekkeboom DJ, de Herder WW, Ten Broek MR, et al. The peripheral blood compartment in patient with Graves' disease: activated T lymphocytes and increased

transitional and pre-naive mature B lymphocytes. Clin Exp Immunol. 2013 Jul 31.

5. Horie I, Abiru N, Saitoh O, Ichikawa T, Iwakura Y, Eguchi K, et al. Distinct role of T helper Type 17 immune response for Graves' hyperthyroidism in mice with different genetic backgrounds. Autoimmunity. 2011 Mar;44(2):159-65.

6. Pan D, Shin YH, Gopalakrishnan G, Hennessey J, De Groot LJ. Regulatory T cells in Graves' disease. Clin Endocrinol (Oxf). 2009 Oct;71(4):587-93.

7. Appay V, van Lier RA, Sallusto F, Roederer M. Phenotype and function of human T lymphocyte subsets: consensus and issues. Cytometry A. 2008 Nov;73(11):975-83.

8. Popadic D, Anegón I, Baeten D, Eibel H, Giese T, Marits P, et al. Predictive immunomonitoring -- the COST ENTIRE initiative. Clin Immunol. 2013 Apr;147(1):23-6.

9. Armengol MP, Sabater L, Fernandez M, Ruiz M, Alonso N, Otero MJ, et al. Influx of recent thymic emigrants into autoimmune thyroid disease glands in humans. Clin Exp Immunol. 2008 Sep;153(3):338-50.

10. Haines CJ, Giffon TD, Lu LS, Lu X, Tessier-Lavigne M, Ross DT, et al. Human CD4+ T cell recent thymic emigrants are identified by protein tyrosine kinase 7 and have reduced immune function. J Exp Med. 2009 Feb 16;206(2):275-85.

11. Fujikawa M, Okamura K, Sato K, Mizokami T, Tanabe S, Ikenoue H, et al. Usefulness of surface phenotype study of intrathyroidal lymphocytes obtained by fine needle aspiration cytology in autoimmune thyroid disease

and malignant lymphoma of the thyroid. Clin Endocrinol (Oxf). 1998 Aug;49(2):191-6.

12. Iwatani Y, Hidaka Y, Matsuzuka F, Kuma K, Amino N. Intrathyroidal lymphocyte subsets, including unusual CD4⁺ CD8⁺ cells and CD3^{lo}TCR alpha beta^{lo}/CD4⁻CD8⁻ cells, in autoimmune thyroid disease. Clin Exp Immunol. 1993 Sep;93(3):430-6.

13. Uchimura K, Itoh M, Yamamoto K, Imamura S, Makino M, Kato T, et al. The effects of CD40⁻ and interleukin (IL-4)-activated CD23⁺ cells on the production of IL-10 by mononuclear cells in Graves' disease: the role of CD8⁺ cells. Clin Exp Immunol. 2002 May;128(2):308-12.

14. Tomer Y. Genetic susceptibility to autoimmune thyroid disease: past, present, and future. Thyroid. 2010 Jul;20(7):715-25.

15. Teniente-Serra A, Grau-Lopez L, Mansilla MJ, Fernandez-Sanmartin M, Ester Condins A, Ramo-Tello C, et al. Multiparametric flow cytometric analysis of whole blood reveals changes in minor lymphocyte subpopulations of multiple sclerosis patients. Autoimmunity. 2016 Feb 1:1-10.

16. Jilek S, Schluep M, Rossetti AO, Guignard L, Le Goff G, Pantaleo G, et al. CSF enrichment of highly differentiated CD8⁺ T cells in early multiple sclerosis. Clin Immunol. 2007 Apr;123(1):105-13.

17. Pender MP, Csurhes PA, Pfluger CM, Burrows SR. Deficiency of CD8⁺ effector memory T cells is an early and persistent feature of multiple sclerosis. Mult Scler. 2014 May 19.

18. Skowera A, Ladell K, McLaren JE, Dolton G, Matthews KK, Gostick E, et al. beta-cell-specific CD8 T cell phenotype in type 1 diabetes reflects chronic autoantigen exposure. Diabetes. 2015 Mar;64(3):916-25.

19. Pender MP. CD8+ T-Cell Deficiency, Epstein-Barr Virus Infection, Vitamin D Deficiency, and Steps to Autoimmunity: A Unifying Hypothesis. *Autoimmune Dis.* 2012;2012:189096.
20. Jones JL, Thompson SA, Loh P, Davies JL, Tuohy OC, Curry AJ, et al. Human autoimmunity after lymphocyte depletion is caused by homeostatic T-cell proliferation. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2013 Dec 10;110(50):20200-5.
21. Parel Y, Chizzolini C. CD4+ CD8+ double positive (DP) T cells in health and disease. *Autoimmun Rev.* 2004 Mar;3(3):215-20.
22. Sala P, Tonutti E, Feruglio C, Florian F, Colombatti A. Persistent expansions of CD4+ CD8+ peripheral blood T cells. *Blood.* 1993 Sep 1;82(5):1546-52.
23. Xie D, Hai B, Xie X, Liu L, Ayello J, Ma X, et al. Peripheral CD4+CD8+cells are the activated T cells expressed granzyme B (GrB), Foxp3, interleukin 17 (IL-17), at higher levels in Th1/Th2 cytokines. *Cell Immunol.* 2009;259(2):157-64.
24. Bossowski A, Moniuszko M, Dabrowska M, Sawicka B, Rusak M, Jeznach M, et al. Lower proportions of CD4+CD25(high) and CD4+FoxP3, but not CD4+CD25+CD127(low) FoxP3(+)T cell levels in children with autoimmune thyroid diseases. *Autoimmunity.* 2013 Jan 22.
25. Mao C, Wang S, Xiao Y, Xu J, Jiang Q, Jin M, et al. Impairment of regulatory capacity of CD4+CD25+ regulatory T cells mediated by dendritic cell polarization and hyperthyroidism in Graves' disease. *J Immunol.* 2011 Apr 15;186(8):4734-43.
26. Fountoulakis S, Vartholomatos G, Kolaitis N, Frilingos S, Philippou G, Tsatsoulis A. HLA-DR expressing peripheral T regulatory cells in newly

diagnosed patients with different forms of autoimmune thyroid disease. *Thyroid*. 2008 Nov;18(11):1195-200.

27. Marazuela M, Garcia-Lopez MA, Figueroa-Vega N, de la Fuente H, Alvarado-Sanchez B, Monsivais-Urenda A, et al. Regulatory T cells in human autoimmune thyroid disease. *J Clin Endocrinol Metab*. 2006 Sep;91(9):3639-46.

28. Nakano A, Watanabe M, Iida T, Kuroda S, Matsuzuka F, Miyauchi A, et al. Apoptosis-induced decrease of intrathyroidal CD4(+)CD25(+) regulatory T cells in autoimmune thyroid diseases. *Thyroid*. 2007 Jan;17(1):25-31.

29. Glick AB, Wodzinski A, Fu P, Levine AD, Wald DN. Impairment of regulatory T-cell function in autoimmune thyroid disease. *Thyroid*. 2013 Jul;23(7):871-8.

Resultats

Table 1. Characteristics of Graves' Disease patients

Code	Gender	Age (years)	TRAb (IU/ml, nr: 0-0.7)	Graves' Ophthalmopathy	Treatment	Definitive post-treatment hypothyroidism
GD01	F	39	0	No	antithyroidal drugs	No
GD02	M	56	0	No	Thyroidectomy	Yes
GD03	F	62	0.2	No	Thyroidectomy	Yes
GD04	F	51	2.01	No	I ¹³¹	No
GD05	F	34	0	Yes	antithyroidal drugs	No
GD06	F	30	2.42	No	Thyroidectomy	Yes
GD07	F	30	0	No	I ¹³¹	Yes
GD08	F	57	0	No	antithyroidal drugs	No
GD09	F	52	1.63	No	I ¹³¹	Yes
GD10	F	35	1.17	No	Thyroidectomy	Yes
GD11	F	68	0.35	Yes	antithyroidal drugs	No
GD12	M	35	0	No	antithyroidal drugs	No
GD13	F	21	28.26	No	I ¹³¹	No
GD14	F	43	1.77	No	I ¹³¹	No
GD15	F	26	1.23	No	I ¹³¹	Yes
GD16	F	46	0.16	No	Thyroidectomy	No
GD17	F	56	1.45	No	antithyroidal drugs	No
GD18	F	28	0.46	No	Thyroidectomy	No
GD19	F	50	0	No	antithyroidal drugs	No
GD20	F	54	0	No	antithyroidal drugs	No
GD21	F	43	1.26	No	I ¹³¹	No
GD22	M	51	4.66	No	Thyroidectomy	Yes
GD23	F	61	0.35	No	I ¹³¹	No
GD24	F	60	15.88	No	I ¹³¹	Yes
GD25	F	76	2.57	No	I ¹³¹	Yes

F: female, M: male, nr: normal range, TRAb: TSH receptor antibodies

Table 2. Lymphocyte subpopulations and phenotype analyzed

Lymphocyte subpopulation	Phenotype
T cells subsets	
Recent thymic emigrants	CD3 ⁺ CD4 ⁺ CD27 ⁺ CCR7 ⁺ CD45RA ⁺ CD31 ⁺ PTK7 ⁺
Naïve	CD3 ⁺ CD4 ⁺ CD27 ⁺ CCR7 ⁺ CD45RA ⁺ CD3 ⁺ CD8 ⁺ CD27 ⁺ CCR7 ⁺ CD45RA ⁺
Central memory (T _{CM})	CD3 ⁺ CD4 ⁺ CD27 ⁺ CCR7 ⁺ CD45RA ⁻ CD3 ⁺ CD8 ⁺ CD27 ⁺ CCR7 ⁺ CD45RA ⁻
Early effector memory (T _{early EM})	CD3 ⁺ CD4 ⁺ CD27 ⁺ CCR7 ⁻ CD45RA ⁻ CD3 ⁺ CD8 ⁺ CD27 ⁺ CCR7 ⁻ CD45RA ⁻
Late effector memory (T _{late EM})	CD3 ⁺ CD4 ⁺ CD27 ⁻ CCR7 ⁻ CD45RA ⁻ CD3 ⁺ CD8 ⁺ CD27 ⁻ CCR7 ⁻ CD45RA ⁻
Terminally differentiated effector cells (T _{EMRA})	CD3 ⁺ CD4 ⁺ CD27 ⁻ CCR7 ⁻ CD45RA ⁺ CD3 ⁺ CD8 ⁺ CD27 ⁻ CCR7 ⁻ CD45RA ⁺
DP lymphocytes (CD4 ⁺ CD8 ⁺)	CD3 ⁺ CD4 ⁺ CD8 ⁺ CD27 ⁺ CCR7 ⁺ CD45RA ⁺ CD3 ⁺ CD4 ⁺ CD8 ⁺ CD27 ⁺ CCR7 ⁺ CD45RA ⁻ CD3 ⁺ CD4 ⁺ CD8 ⁺ CD27 ⁺ CCR7 ⁻ CD45RA ⁻ CD3 ⁺ CD4 ⁺ CD8 ⁺ CD27 ⁻ CCR7 ⁻ CD45RA ⁻ CD3 ⁺ CD4 ⁺ CD8 ⁺ CD27 ⁻ CCR7 ⁻ CD45RA ⁺
Th17	CD4 ⁺ CCR7 ⁻ CCR4 ⁺ CCR6 ⁺
Tregs	CD4 ⁺ CD127 ^{low} CD25 ⁺ CCR4 ⁺ CD45RO ⁺
Activated Tregs	CD4 ⁺ CD127 ^{low} CD25 ⁺ CCR4 ⁺ CD45RO ⁺ HLADR ⁺
B cells subsets	
Naïve	CD19 ⁺ CD27 ⁻ IgD ⁺
Unswitched memory	CD19 ⁺ CD27 ⁺ IgD ⁺
Switched memory	CD19 ⁺ CD27 ⁺ IgD ⁻
Transitional B cells	CD19 ⁺ CD24 ^{hi} CD38 ^{hi} CD27 ⁻
Bregs	CD19 ⁺ CD24 ^{hi} CD27 ⁺

FIGURES AND LEGENDS:

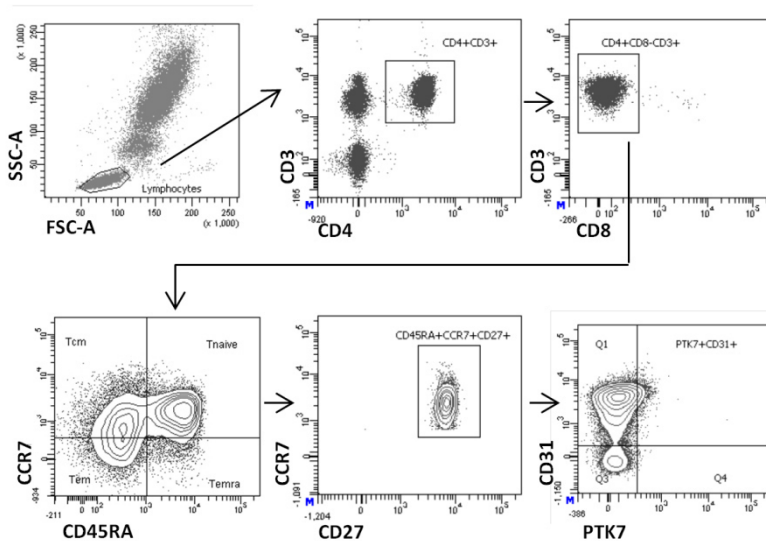


Figure 1. Gating strategy of flow cytometric analysis of CD4⁺ T cell subpopulations. A representative analysis of RTES (CD3⁺CD4⁺CD45RA⁺CCR7⁺CD27⁺CD31⁺PTK7⁺), naïve (CD3⁺CD4⁺CD45RA⁺CCR7⁺CD27⁺), CM (CD3⁺CD4⁺CD45RA⁺CCR7⁺CD27⁺), early EM (CD3⁺CD4⁺CD45RA⁺CCR7⁺CD27⁺), late EM (CD3⁺CD4⁺CD45RA⁺CCR7⁺CD27⁺), TEMRA (CD3⁺CD4⁺CD45RA⁺CCR7⁺CD27⁺) in CD4⁺ T cells is shown. CM= central memory; EM=effector memory; TEMRA=terminally differentiated effector.

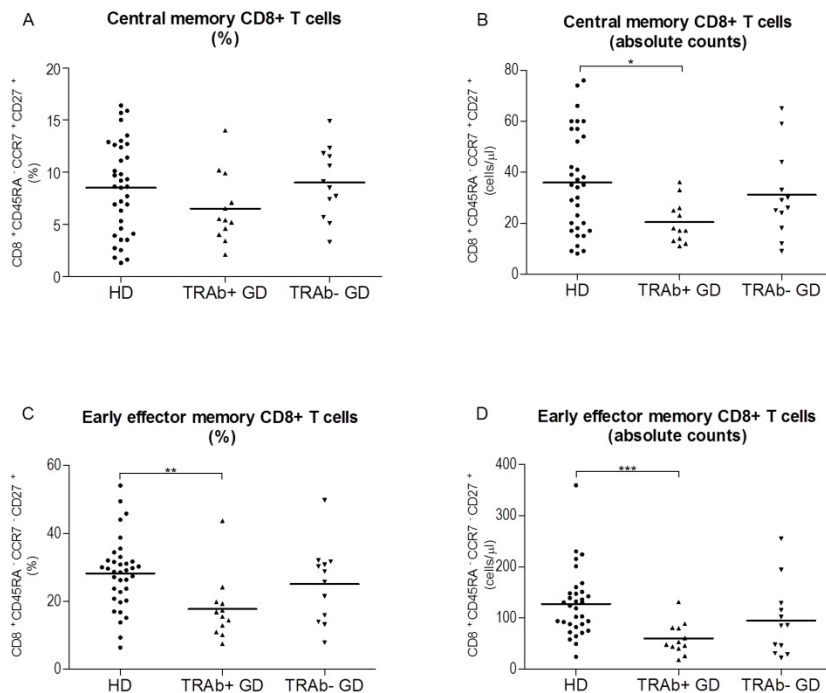


Figure 2. CD8+ early EM cells in GD patients and HD. Percentage (A) and absolute counts (B) of CD8 CM (CD3⁺CD4⁺CD45RA⁻CCR7⁺CD27⁺) and percentage (C) and absolute counts (D) of CD8 early EM (CD3⁺CD4⁺CD45RA⁺CCR7⁻CD27⁻) cells in peripheral blood of HD and GD. HD=healthy donors; GD= Graves' disease; TRAb= TSHR antibodies CM= central memory; EM=effector memory.

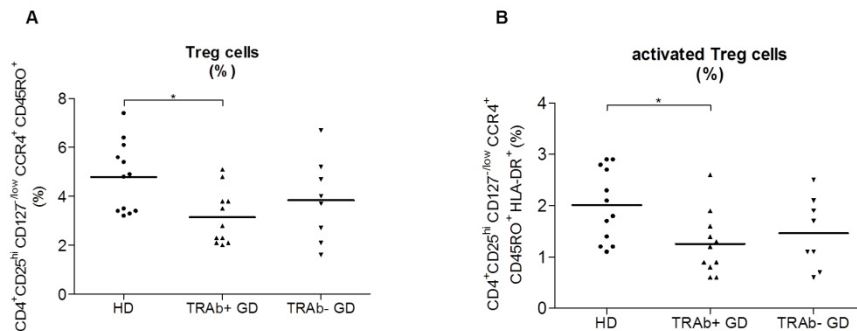


Figure 3. Treg cells in GD patients and HD. Percentage of Treg (CD4⁺CD25^{hi}CD127^{low}CCR4⁺CD45RO⁺) cells (A) and activated (CD4⁺CD25^{hi}CD127^{low}CCR4⁺CD45RO⁺HLA-DR⁺) cells (B) in peripheral blood of HD and GD. HD=healthy donors; GD= Graves' disease; TRAb= TSHR antibodies.

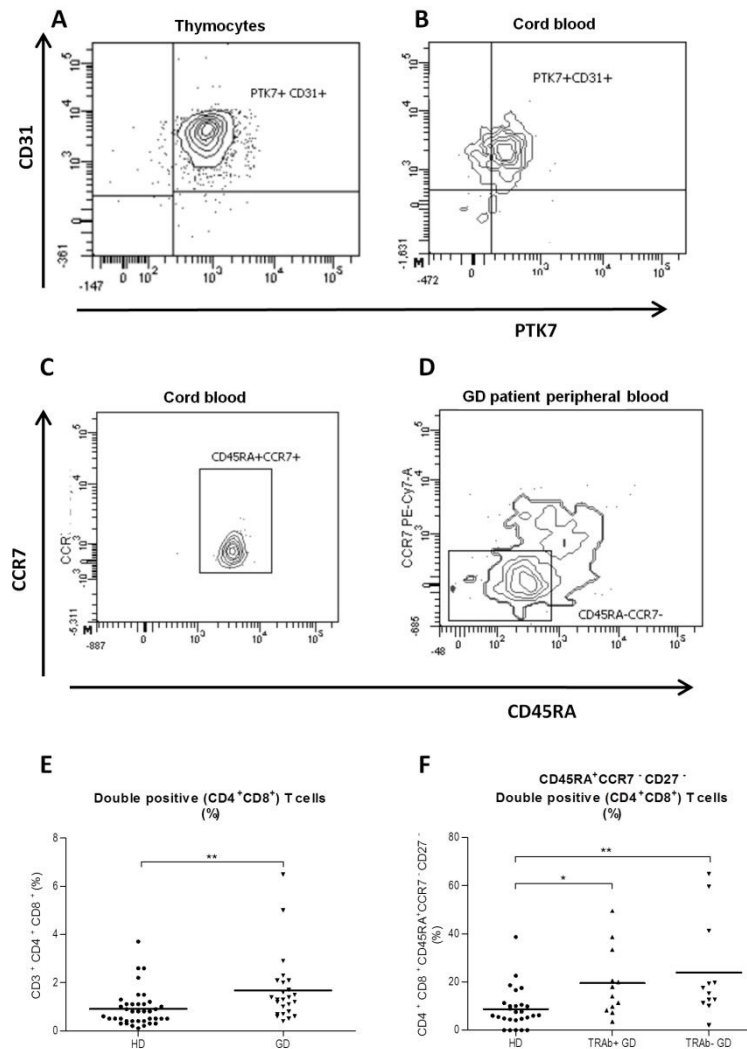


Figure 4. Characterization of double positive cells from thymus, cord blood and peripheral blood. Expression of CD31 and PTK7 in DP (CD3⁺CD4⁺CD8⁺) thymocytes (A) and cord blood (B), DP CD45RA⁺CCR7⁺CD27⁺ cells in cord blood (C) and DP CD45RA⁺CCR7⁺CD27⁺ cells in peripheral blood of GD patients (D).

Percentage of double positive (CD4⁺CD8⁺) T cells (E) and CD4⁺CD8⁺CD45RA⁺CCR7⁺CD27⁺ cells (F) in peripheral blood of HD and GD.

HD=healthy donors; GD= Graves' disease; TRAB= TSHR antibodies

Resultats

Supplementary table 1. Changes in lymphocyte subpopulations in peripheral blood of healthy controls vs TSAb- Graves' disease patients and healthy controls vs TSAb+ Graves' disease patients

	% healthy controls	% TSAb- GD patients	p	% TSAb+ GD patients	p
CD3+ lymphocytes	72.5 (66.1-76.9)	72.35 (63.35-77.5)	ns	72.7 (64.95-75.5)	ns
CD4+ lymphocytes	63.3 (59.5-68.9)	65.7 (61.88-72.18)	ns	67.4 (65.4-71.9)	ns
CD4 naïve	31.35 (26.27-40.20)	33.35 (28.45-40.43)	ns	41.7 (31-46.93)	ns
CD4 central memory	30.32 (24.48-33.26)	27.55 (22.55-31.13)	ns	27.85 (22.5-31.48)	ns
CD4 early EM	21.28 (17.61-28.93)	22.3 (17.23-27.55)	ns	17.9 (14.83-25.58)	ns
CD4 late EM	7.75 (4.85-10.39)	5.6 (3.23-7.28)	ns	5.35 (3.1-8.23)	ns
CD4 TEMRA	0.76 (0.12-2.25)	0.1 (0.03-1.83)	ns	0.1 (0-0.43)	ns
RTE	2.8 (2.1-4.3)	3.5 (2.9-4.35)	ns	3.45 (2.7-3.8)	ns
Th17	4.5 (3.44-6.79)	4.15 (3.15-5.3)	ns	4.6 (3.2-5.3)	ns
Tregs	4.85 (3.4-5.98)	3.85 (2.25-5.08)	ns	2.8 (2.1-3.8)	p<0.05
Tregs HLA-DR+	1.95 (1.25-2.78)	1.4 (0.8-2.05)	ns	1.2 (0.8-1.6)	p<0.05
CD8+ lymphocytes	28.8 (25.5-34.3)	29.15 (23.98-32.45)	ns	27.1 (24.2-31.7)	ns
CD8 naïve	26.35 (18.82-41.6)	29.3 (19.83-44.48)	ns	39.2 (13.68-60.95)	ns
CD8 central memory	8.59 (4.23-12.52)	8.8 (6.13-11.73)	ns	5.45 (4.15-9.2)	ns
CD8 early EM	28.9 (21.3-31.93)	27.25 (14.48-31.48)	ns	16.2 (11.48-19.7)	p<0.05
CD8 late EM	8.3 (5.6-10.99)	6.3 (3.33-8.43)	ns	5.15 (2.95-9.88)	ns
CD8 TEMRA	15.72 (5.97-21.96)	8.8 (4.05-37.05)	ns	16.05 (2.08-28.9)	ns
CD4+CD8+ (DPs)	0.8 (0.4-1.1)	1.4 (0.88-2.7)	p<0.01	1.3 (0.7-1.8)	p<0.01
CD3+CD4+CD8+CD27+CCR7+CD45RA+	9.7 (1.5-16.2)	8.95 (4.2-14.93)	ns	9.95 (8.03-31.18)	ns
CD3+CD4+CD8+CD27+CCR7+CD45RA-	21 (7.7-29.4)	15.4 (9.13-24.33)	ns	17.15 (13.53)	ns
CD3+CD4+CD8+CD27+CCR7-CD45RA-	29.28 (14.7-40.8)	39.35 (14.98-48.7)	ns	32.25 (21.7-37.85)	ns
CD3+CD4+CD8+CD27-CCR7-CD45RA-	1.97 80.2-6.1)	5.6 (1.53-11.93)	ns	2.7 (0.75-6.83)	ns
CD3+CD4+CD8+CD27-CCR7-CD45RA+	6.2 (4.4-10.53)	16.45 (11.63-35.9)	p<0.01	16 (8.68-30.18)	p<0.05
CD19+ cells	8.22 (6.05-10.78)	9.25 (7.68-10.28)	ns	9.2 (5.5-14.05)	ns
Transitional B cells	8.52 (5.61-10.75)	7.65 (4.45-9.9)	ns	5.8 (2.5-11.1)	ns
Naïve	65.25 (50.43-76.35)	66.8 (52.98-70.08)	ns	62.3 (58.3-68.1)	ns
Unswitched memory	8.4 (4.28-14.47)	11.3 (8.15-18.98)	ns	13.3 (9-19.4)	ns
Switched memory	17.6 (10.3-27.13)	18 (10.95-23.68)	ns	17.5 (9.4-21.9)	ns
Bregs	29.7 (21.9-36.33)	17.9 (12.75-25.1)	ns	25.2 (18.15-31.9)	ns

6.2. CAPÍTOL 2: Multiparametric Flow Cytometric Analysis of Whole Blood Reveals Changes in Minor Lymphocyte Subpopulations of Multiple Sclerosis Patients

Teniente-Serra A, Grau-López L, Mansilla MJ, Fernández-Sanmartín M, Ester Condins A, Ramo-Tello C, Martínez-Cáceres E. Autoimmunity. 2016 Jun;49(4):219-28.

En aquest estudi es va realitzar l'anàlisi de subpoblacions limfocitàries minoritàries en 66 pacients amb EM: 23 EMRR que no rebien tractament, 16 EMRR en tractament amb IFN- β , 11 EMRR en tractament amb natalizumab i 16 pacients amb formes progressives (8 EMPP i 8 EMSP) i en 40 controls sans.

Els resultats obtinguts en aquest treball ens van permetre detectar canvis en pacients amb EMRR sense tractaments i amb formes progressives en comparació amb el grup de controls sans. A més, es va posar en evidència que els tractaments immunomoduladors en pacients EMRR generen canvis en les subpoblacions limfocitàries minoritàries que es poden detectar en sang perifèrica mitjançant un anàlisi multiparamètric per citometria de flux, siguent potencials biomarcadors per a la immunomonitorització d'aquestes teràpies.



Multiparametric flow cytometric analysis of whole blood reveals changes in minor lymphocyte subpopulations of multiple sclerosis patients

Aina Teniente-Serra, Laia Grau-López, M José Mansilla, Marco Fernández-Sanmartín, Anna Ester Condins, Cristina Ramo-Tello & Eva Martínez-Cáceres

To cite this article: Aina Teniente-Serra, Laia Grau-López, M José Mansilla, Marco Fernández-Sanmartín, Anna Ester Condins, Cristina Ramo-Tello & Eva Martínez-Cáceres (2016): Multiparametric flow cytometric analysis of whole blood reveals changes in minor lymphocyte subpopulations of multiple sclerosis patients, *Autoimmunity*, DOI: [10.3109/08916934.2016.1138271](https://doi.org/10.3109/08916934.2016.1138271)

To link to this article: <http://dx.doi.org/10.3109/08916934.2016.1138271>



Published online: 01 Feb 2016.



Submit your article to this journal [↗](#)



View related articles [↗](#)



View Crossmark data [↗](#)

ORIGINAL ARTICLE

Multiparametric flow cytometric analysis of whole blood reveals changes in minor lymphocyte subpopulations of multiple sclerosis patients

Aina Teniente-Serra^{1,2}, Laia Grau-López³, M José Mansilla^{1,2}, Marco Fernández-Sanmartín⁴, Anna Ester Condins⁵, Cristina Ramo-Tello³, and Eva Martínez-Cáceres^{1,2}

¹Immunology Division, Germans Trias i Pujol University Hospital and Research Institute (IGTP), Campus Can Ruti, Badalona, Barcelona,

²Department of Cell Biology, Physiology and Immunology, Universitat Autònoma de Barcelona, Bellaterra, Barcelona, ³Multiple Sclerosis Unit, Department of Neurosciences, Germans Trias i Pujol University Hospital, Badalona, Barcelona, and ⁴Flow Cytometry Facility, Germans Trias i Pujol Research Institute (IGTP), Campus Can Ruti, Badalona, Barcelona, and ⁵Blood and Tissue Bank (BST), Barcelona, Spain

Abstract

Objective: The objective of this study is to characterise the functionally relevant minor lymphocyte subpopulations in whole blood of multiple sclerosis (MS) patients and their potential utility as biomarkers for treatment follow up. **Material and methods:** Peripheral blood from 40 healthy donors (HD) and 66 MS patients [23 relapsing–remitting (RRMS) without treatment, 27 RRMS undergoing treatment (16 IFN- β , 11 natalizumab), and 16 progressive forms (eight secondary progressive and eight primary progressive)] was analysed by multiparametric flow cytometry. **Results:** Untreated MS patients showed a decrease in early effector memory (CD45RA⁺CCR7⁺CD27⁺) CD4⁺ and CD8⁺ T cells and an increase in Th17 lymphocytes in peripheral blood compared with HD. Regarding the effect of treatment, whereas no differences in relative percentages of cellular subpopulations were observed in patients under IFN- β treatment, those under treatment with natalizumab had an increased percentage of early effector memory CD4⁺ (CD45RA⁺CCR7⁺CD27⁺), central memory CD8⁺ (CD45RA⁺CCR7⁺CD27⁺) T cells, recent thymic emigrants (CD4⁺CD45RA⁺CCR7⁺CD27⁺CD31⁺PTK7⁺) and transitional B cells (CD19⁺CD27⁺CD24^{hi}CD38^{hi}). **Conclusions:** Multiparametric flow cytometry analysis of whole blood is a robust, reproducible, and sensitive technology to monitor the effect of MS treatments even in minor lymphocyte subpopulations that might represent useful biomarkers of treatment response.

Keywords

Immunomonitoring, interferon- β , lymphocyte subpopulations, multiple sclerosis, natalizumab

History

Received 10 March 2015

Revised 22 November 2015

Accepted 28 December 2015

Published online 29 January 2016

Introduction

Recent advances in the development of multiparametric flow cytometry have made possible an exhaustive and detailed characterisation of lymphocyte subsets in whole blood or isolated peripheral blood mononuclear cells of healthy donors (HD) and patients [1–3] and has been shown as a powerful tool for immunomonitoring of treatments' response.

When naïve T cells contact with an antigen, they go through a developmental pathway that results in several differentiation stages that can be identified phenotypically based on the expression of CD45RA, CCR7, and CD27 surface markers. Naïve T cells can be identified as

CD45RA⁺CCR7⁺CD27⁺. The lymph node homing receptor CCR7 is useful to differentiate “central memory” T cells (CD45RA⁺CCR7⁺CD27⁺) and “effector memory” (EM) T cells which can be in turn subdivided according to the expression of CD27 in “early EM” (CD45RA⁺CCR7⁺CD27⁺) and “late EM” (CD45RA⁺CCR7⁺CD27⁺) T cells. In addition, a terminally differentiated subset (TEMRA) that expresses CD45RA can be defined (CD45RA⁺CCR7⁺CD27⁺) [1,4–6]. On the other hand, the expression of CCR7, CCR4, and CCR6 defines Th17 cells (CD4⁺CCR7⁺CCR6⁺CCR4⁺) [1]. Transitional B cells, which are immature B cells expressing high levels of CD24 and CD38 [2] have been related to autoimmune responses in other autoimmune diseases [7]. The relative expression of CD24 and CD38 made it possible to differentiate T1 transitional B cells (those more immature) and T2 transitional B cells [7].

Multiple sclerosis (MS) is a chronic inflammatory demyelinating autoimmune disease of the CNS characterised

Correspondence: Eva M. Martínez-Cáceres, Immunology Division, Germans Trias i Pujol University Hospital, Institut Recerca Germans Trias i Pujol, 2nd floor, Carretera del Canyet s/n, Camí de les Escoles s/n, 08916 Badalona, Barcelona, Spain. Tel: +34934978666. Fax: +34934978668. E-mail: emmartinez.germanstrias@gencat.cat; evmcaceres@gmail.com

by an infiltration of T lymphocytes, B lymphocytes, macrophages, demyelination, and axonal damage [8].

The existing evidences on the induction and perpetuation of the disease point to an important role of autoreactive CD4⁺ T cells [9]. Studies in the animal model of MS, experimental autoimmune encephalomyelitis have shown that Th1, Th17, and other effector CD4⁺ T subpopulations have a role in the pathogenesis of the disease [10]. These subpopulations are increased in central nervous system (CNS) of patients with MS, mainly in the cerebrospinal fluid (CSF) and perivascular space [10,11]. Moreover, an increase in Th17 cells in peripheral blood of MS patients has widely been reported, supporting their pathogenic role in the disease [12–15].

Besides CD4⁺ T cells subpopulations, CD8⁺ T cells may also play an important role. Oligoclonal expansions of activated CD8⁺ T cells have been found in CNS lesions of MS patients, supporting their participation in CNS damage [16,17] although results are still contradictory [18,19].

In recent years, some authors focussed in the involvement of B lymphocytes in the pathogenesis of MS, not only through the production of antibodies but also how these cells contribute to the induction, maintenance, and reactivation of CD4⁺ T cells, whether acting as antigen-presenting cells or by cytokine production [20], although a full characterisation of B cell subpopulations in peripheral blood of MS patients is still lacking.

Current treatments approved for MS based on immunomodulation attempt to inhibit the proliferation of T cells, as interferon-beta (IFN-β), or act by preventing effector lymphocytes from reaching the CNS as natalizumab or fingolimod. Interferons are naturally occurring cytokines with a wide range of anti-inflammatory properties [21]. In contrast, natalizumab is a monoclonal antibody against CD49d (α4 subunit of α4 integrin) that prevents transmigration of leukocytes across the blood brain barrier by blocking the interaction between α4β1 integrin and vascular cell adhesion molecule-1 [22]. The immunomodulatory effects of these treatments on lymphocyte subpopulations, especially those less represented in peripheral blood, have not clearly been established.

In this study, a comparison of CD4⁺ and CD8⁺ T cells including naïve, central memory, effector memory, TEMRA, Th17, and transitional B cells of untreated RRMS patients versus HD has been performed and the effect of IFN-β and natalizumab treatment on these subpopulations analysed. A decrease in early EM (CD45RA[−]CCR7[−]CD27⁺) CD4⁺ and CD8⁺ T cells and an increase in Th17 cells were observed in untreated patients. Treatment with IFN-β induced a general decrease in lymphocyte numbers, affecting mainly central memory (CD45RA[−]CCR7⁺CD27⁺) and early EM (CD45RA[−]CCR7[−]CD27⁺) either CD4⁺ or CD8⁺ T cells. In contrast, treatment with natalizumab resulted in an increase in early EM CD4⁺ (CD45RA[−]CCR7[−]CD27⁺) and central memory CD8⁺ (CD45RA[−]CCR7⁺CD27⁺) T cells. Furthermore, an increase in recent thymic emigrants (RTEs), characterised as CD3⁺CD4⁺CD45RA⁺CCR7⁺CD27⁺CD31⁺PTK7⁺, and transitional B cells (CD19⁺CD27[−]CD24^{hi}CD38^{hi}) was found in natalizumab-treated patients, supporting the induction of a premature release of immature T and B lymphocytes from primary lymphoid organs.

These results support the relevance of multiparametric flow cytometry as a powerful tool for the diagnosis and follow-up of the immunological status of MS patients undergoing immunomodulatory therapies and highlight the relevance of minor lymphocyte subpopulations in the pathogenesis of the disease.

Materials and methods

Patients and HD

Patients with MS were recruited from the outpatient clinic of the MS clinic of the Germans Trias i Pujol Universitary Hospital (Badalona, Spain). Sixty-six patients who met the 2005 McDonald criteria [23] were enrolled in the study: 23 relapsing-remitting (RRMS) without treatment with disease modifying drugs (DMD), 27 RRMS under DMD of which 16 were under treatment with IFN-β (Avonex, Biogen Idec, Weston, MA; Betaferon, Bayer Healthcare, Wayne, NJ; Rebif, EMD Serono, Rockland, MA) and 11 under treatment with natalizumab (Tysabri, Biogen Idec) and 16 progressive MS

Table 1. Lymphocyte subpopulations and phenotype analysed.

Lymphocyte subpopulation	Phenotype
T cells stages	
RTEs	CD3 ⁺ CD4 ⁺ CD27 ⁺ CCR7 ⁺ CD45RA ⁺ CD31 ⁺ PTK7 ⁺
Naïve	CD3 ⁺ CD4 ⁺ CD27 ⁺ CCR7 ⁺ CD45RA ⁺
	CD3 ⁺ CD8 ⁺ CD27 ⁺ CCR7 ⁺ CD45RA ⁺
Central memory	CD3 ⁺ CD4 ⁺ CD27 ⁺ CCR7 ⁺ CD45RA [−]
	CD3 ⁺ CD8 ⁺ CD27 ⁺ CCR7 ⁺ CD45RA [−]
Early effector memory	CD3 ⁺ CD4 ⁺ CD27 ⁺ CCR7 [−] CD45RA [−]
	CD3 ⁺ CD8 ⁺ CD27 ⁺ CCR7 [−] CD45RA [−]
Late effector memory	CD3 ⁺ CD4 ⁺ CD27 [−] CCR7 [−] CD45RA [−]
	CD3 ⁺ CD8 ⁺ CD27 [−] CCR7 [−] CD45RA [−]
Terminally differentiated effector cells (TEMRA)	CD3 ⁺ CD4 ⁺ CD27 [−] CCR7 [−] CD45RA ⁺
	CD3 ⁺ CD8 ⁺ CD27 [−] CCR7 [−] CD45RA ⁺
Double positive (DPs) lymphocytes (CD4+CD8+)	CD3 ⁺ CD4 ⁺ CD8 ⁺ CD27 ⁺ CCR7 ⁺ CD45RA ⁺
	CD3 ⁺ CD4 ⁺ CD8 ⁺ CD27 ⁺ CCR7 ⁺ CD45RA [−]
	CD3 ⁺ CD4 ⁺ CD8 ⁺ CD27 ⁺ CCR7 [−] CD45RA [−]
	CD3 ⁺ CD4 ⁺ CD8 ⁺ CD27 [−] CCR7 [−] CD45RA [−]
	CD3 ⁺ CD4 ⁺ CD8 ⁺ CD27 [−] CCR7 [−] CD45RA ⁺
Th17 cells	CD4 ⁺ CCR7 [−] CCR4 ⁺ CCR6 ⁺
Transitional B cells	CD19 ⁺ CD24 ^{hi} CD38 ^{hi} CD27 [−]

without treatment (eight primary progressive MS and eight secondary progressive MS). The mean age was 41 ± 6.7 years and 71% ($n = 47$) of them were women. None of them had received immunomodulatory treatments in the previous 3 months or corticosteroids in the previous month.

Blood samples of 40 HD from the Blood Bank of Catalonia (Spain) were used as controls. Blood was analysed in the first 4 h after venipuncture with viability of the cells in all cases $>99\%$. The study was approved by the local Ethics Committee and written informed consent was obtained from all MS patients and HD.

Quantification of absolute cell numbers

For quantification of lymphocyte numbers, 25 μ l of peripheral blood samples were incubated with CD45-PerCP

(Beckton Dickinson (BD) Biosciences, San José, CA; 2D1) for 15 min at room temperature and protected from the light. Erythrocytes were removed using 450 μ l lysis buffer (BD FACS Lysing Solution, BD Biosciences). 25 μ l of PerfectCount beads (Cytognos SL, Salamanca, Spain) were added to each sample and acquired on an eight-colour multiparameter flow cytometer (FACSCantoII; BD Biosciences). The number of total lymphocytes was expressed in cells per μ l.

Analysis of peripheral lymphocyte subsets

For analysis of cellular subpopulations, 100 μ l of peripheral blood samples were incubated with the appropriate amounts of monoclonal antibodies detailed below for 20 min at room temperature and protected from the light. After erythrocyte

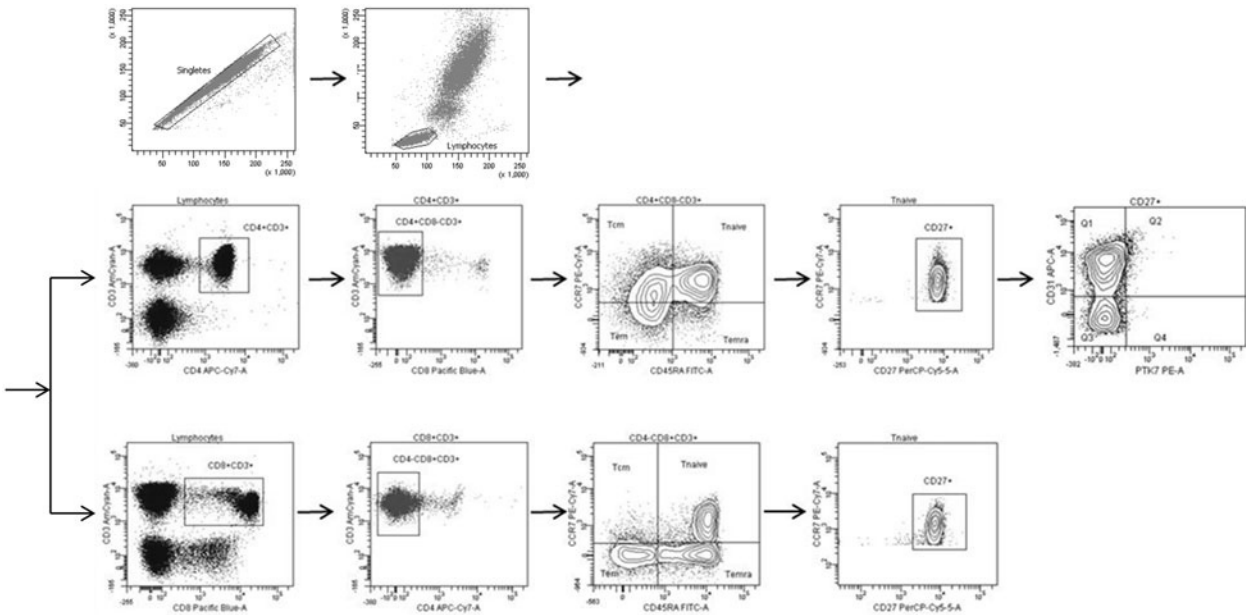


Figure 1. Gating strategy of flow cytometric analysis of CD4 and CD8 T cell subpopulations. A representative analysis of RTEs ($CD3^+CD4^+CD45RA^+CCR7^+CD27^+CD31^+PTK7^+$), T naïve ($CD3^+CD4^+/CD8^+CD45RA^+CCR7^+CD27^+$), TCM ($CD3^+CD4^+/CD8^+CD45RA^-CCR7^+CD27^+$), T early EM ($CD3^+CD4^+/CD8^+CD45RA^-CCR7^-CD27^+$), T late EM ($CD3^+CD4^+/CD8^+CD45RA^-CCR7^-CD27^-$), TEMRA ($CD3^+CD4^+/CD8^+CD45RA^+CCR7^-CD27^-$) in CD4 and CD8 T cells is shown. CM, central memory; EM, effector memory; TEMRA, terminally differentiated effector.

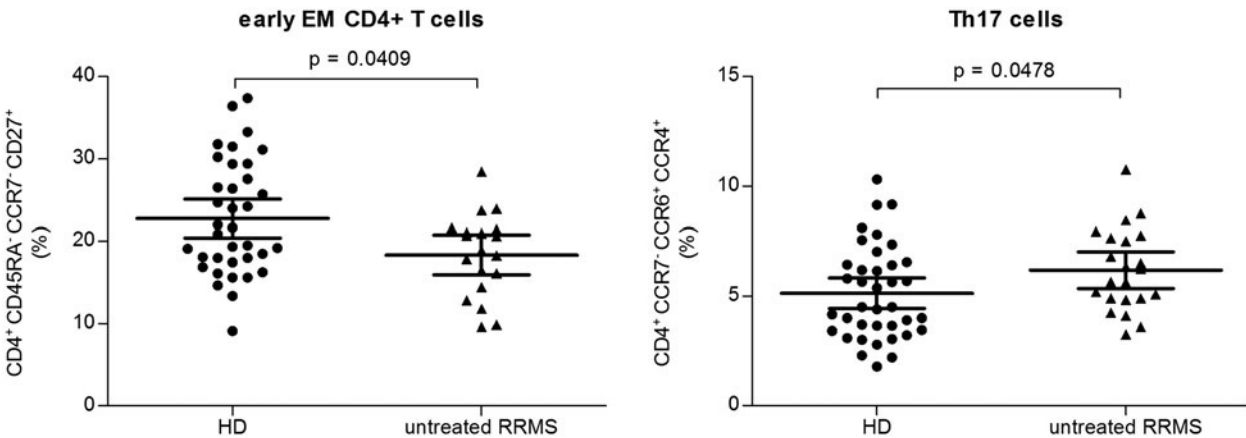


Figure 2. Changes in lymphocyte subpopulations in untreated RRMS patients versus HD. Percentages (%) of $CD4^+$ early effector memory (EM) and Th17 cells were measured by flow cytometry. Each dot represents the value of an individual patient or HD. Medians and interquartile range are shown.

lysis, the samples were washed and a total of 100 000 lymphocytes were acquired on a FACSCantoII flow cytometer (BD).

Lymphocyte subpopulations were defined using the markers specified in Table 1 using several combinations of the following monoclonal antibodies anti-: CD3-AmCyan (SK7), CD4-V450 (RPA-T4), CCR6-phycoerythrin (PE; 11A9), CCR4-AlexaFluor 647 (1G1), CD4-allophycocyanin (APC)-H7 (SK3), CD8-V450 (RPA-T8), CD45RA-fluorescein isothiocyanate (FITC; L48), CCR7-PE-Cy7 (3D12), CD27 PerCP-Cy5.5 (M-T271), CD31-AlexaFluor 647 (M89D3), CD19-PerCP-Cy5.5 (SJ25C1), CD27-APC (L128), CD24-FITC (ML5), CD38-PE (HIT2; BD Biosciences) and PTK7-PE (188B; Milteny Biotec, Bergisch Gladbach, Germany) and analysed with FACSDiva software (BD Biosciences). The desired lymphocyte subpopulations were gated using doublet discrimination and forward and side scatter, and their relative percentages were determined. The gating strategy for T-cell subsets is shown in Figure 1.

Fluorescence minus one controls were used to define CCR7 expression on Th17 subpopulation and PTK7 expression on RTEs subpopulation.

Percentage and absolute counts (number of cells per μl) were analysed for all subpopulations defined in Table 1. Absolute counts were calculated as follows: (%subset/100) $\times$ counts of main subpopulation.

Statistical analysis

Differences between two groups were tested using the non-parametric Mann–Whitney test. Results were expressed as medians (interquartile range). Two-tailed p values <0.05 were considered statistically significant. All statistical analyses were performed using the Statistical Package for Social Sciences (SPSS/Windows version 15.0; SPSS Inc., Chicago, IL) and the software program GraphPad Prism (5.0 version; GraphPad, La Jolla, CA).

Results

Decrease in effector memory cells in untreated MS patients

A decrease in the percentage of early EM CD4⁺ T cells (CD4⁺CD45RA⁺CCR7⁺CD27⁺) and an increase in the percentage of Th17 cells were found in peripheral blood of untreated RRMS patients compared with HD (Figure 2). In addition, lower numbers of early EM CD8⁺ T cells (CD8⁺CD45RA⁺CCR7⁺CD27⁺) were observed in RRMS patients (Table 2).

Regarding progressive MS patients, no differences were found in any of the subpopulations studied when comparing primary progressive MS (PPMS) patients and secondary progressive (SPMS) patients (data not shown). For this reason, PPMS and SPMS patients were studied as a single group (ProgMS patients).

On comparing peripheral blood lymphocytes of ProgMS patients with those of HD (Table 2), an increase in the percentage of Th17 cells was found in ProgMS.

Furthermore, a decrease in absolute counts of early EM CD4⁺ (CD4⁺CD45RA⁺CCR7⁺CD27⁺), late EM CD4⁺

Table 2. Changes in lymphocyte subpopulations in peripheral blood of HD versus RRMS patients untreated and HD versus progressive MS patients (ProgMS) (significant p values in bold).

	Parent	Percentage (%) HD	Percentage (%) RRMS patients		p	Percentage (%) progressive MS patients		p	Counts (cells/μl) HD	Counts (cells/μl) RRMS patients		p	Counts (cells/μl) progressive MS patients		p
			no treated			MS patients				no treated			MS patients		
CD3+ lymphocytes	Lymphocytes	72.50 (66.24–73.07)	74.00 (67.90–75.66)	0.8037	67.55 (67.26–72.75)	0.3737	1449 (1338–1570)	1290 (1149–1601)	977 (743–1255)	0.0005					
CD4+ lymphocytes	T cells	63.30 (60.76–64.97)	68.00 (63.79–69.59)	0.0253	65.95 (59.16–70.93)	0.3688	878 (831–1005)	859 (766–1075)	517 (453–886)	0.0086					
CD4 naïve	T CD4	31.35 (29.42–36.83)	37.30 (31.00 – 41.70)	0.2463	33.36 (26.29–40.99)	0.8864	265 (248–363)	372 (268–427)	209 (99–452)	0.2429					
CD4 central memory	T CD4	30.32 (27.52–31.67)	30.16 (25.70–34.61)	0.7974	30.83 (28.51–36.85)	0.2265	243 (235–297)	255 (212–347)	208 (156–286)	0.2384					
CD4 early EM	T CD4	21.28 (20.41–25.09)	18.93 (15.95–20.78)	0.0409	21.60 (19.88–26.87)	0.5419	202 (180–238)	176 (136–188)	158 (110–186)	0.0168					
CD4 late EM	T CD4	7.75 (6.62–9.02)	5.26 (3.73–13.14)	0.1814	5.95 (4.12–13.86)	0.3796	68 (58–83)	48 (38–100)	32 (27–63)	0.0076					
CD4TEMRA	T CD4	0.76 (0.91–2.83)	0.85 (0.47–1.24)	0.5237	0.60 (0.3–3.62)	0.4074	7 (7–25)	6 (4–12)	3 (1–13)	0.1690					
RTE	T CD4 naïve	2.80 (2.70–4.48)	3.81 (3.17–4.81)	0.1498	3.58 (2.58–4.19)	0.6962	7 (7–13)	14 (10–18)	5 (2–17)	0.2789					
Th17	T CD4	4.50 (4.44–5.84)	6.00 (5.36–7.02)	0.0478	7.60 (5.45–8.39)	0.0146	47 (41–57)	48 (37–66)	39 (31–59)	0.6604					
CD8+ lymphocytes	T cells	28.80 (27.92–31.87)	25.40 (24.79–30.21)	0.1213	27.80 (24.35–33.99)	0.6431	404 (389–482)	311 (300–455)	292 (213–343)	0.0008					
CD8 naïve	T CD8	27.50 (24.34–33.83)	40.30 (29.45–44.98)	0.1237	18.59 (13.65–31.93)	0.0682	106 (93–137)	131 (100–178)	51 (31–100)	0.0058					
CD8 central memory	T CD8	8.59 (7.00–10.01)	6.99 (6.21–8.79)	0.4309	10.08 (6.81–15.75)	0.4142	35 (29–43)	30 (22–32)	20 (16–49)	0.2563					
CD8 early EM	T CD8	28.90 (24.72–31.68)	24.86 (21.06–30.02)	0.2536	26.46 (21.20–32.97)	0.4825	124 (105–151)	89 (74–112)	83 (52–98)	0.0051					
CD8 late EM	T CD8	8.30 (7.18–11.01)	5.58 (4.63–13.49)	0.3347	9.04 (6.12–20.93)	0.3756	34 (28–52)	20 (17–49)	23 (11–70)	0.5072					
CD8 TEMRA	T CD8	15.72 (11.62–20.01)	10.76 (6.99–18.32)	0.3216	20.96 (10.78–27.10)	0.3699	56 (51–105)	32 (21–86)	31 (22–80)	0.3704					
CD4+CD8+ (DPs)	T cells	0.80 (0.66–1.15)	0.70 (0.59–0.98)	0.8876	1.15 (0.95–2.49)	0.0319	9 (9–18)	9 (7–14)	16 (9–22)	0.4516					
CD19+ cells	Lymphocytes	8.22 (7.43–9.67)	8.53 (7.60–12.67)	0.4238	7.04 (6.05–10.74)	0.6832	165 (152–220)	145 (137–261)	103 (79–185)	0.0570					
Transitional B cells	CD19 cells	8.52 (7.33–9.68)	8.02 (6.72–11.21)	0.9301	10.80 (7.54–13.64)	0.1892	12 (12–22)	15 (11–28)	13 (7–24)	0.5724					
T1 Transitional B cells	CD19 cells	2.79 (2.40–3.31)	2.88 (2.03–3.63)	0.9162	3.00 (2.16–4.09)	0.664	4 (4–7)	5 (4–9)	3 (2–6)	0.2317					
T2 Transitional B cells	CD19 cells	5.51 (4.86–6.44)	5.38 (4.51–7.76)	0.7924	7.20 (5.21–9.71)	0.1259	8 (8–15)	11 (7–20)	9 (5–17)	0.6955					

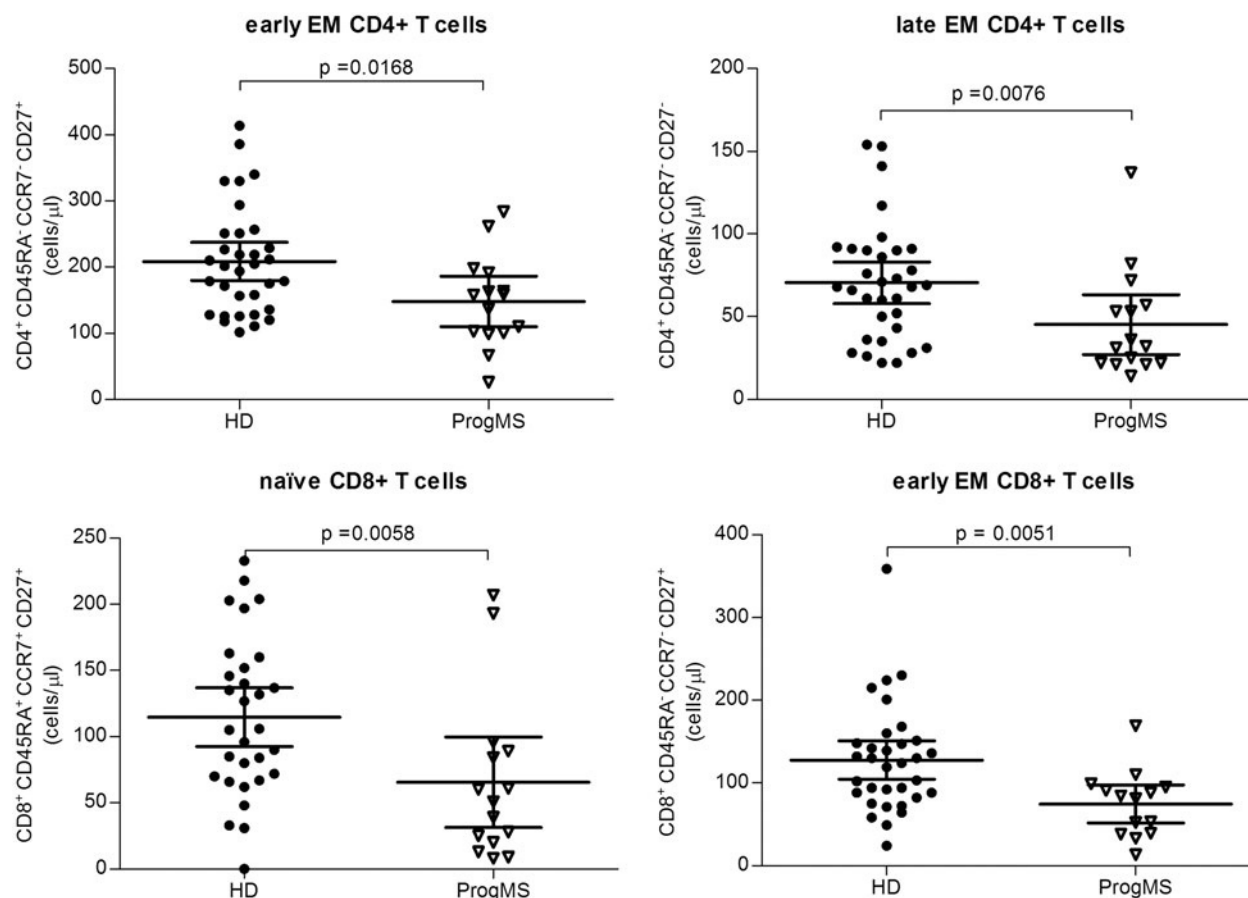


Figure 3. Changes in lymphocyte subpopulations in progressive MS patients (ProgMS) compared with HD. Absolute counts (cells/ μ l) of CD4⁺ early EM, CD4⁺ late EM, CD8⁺ naïve, and CD8⁺ early EM T cells were measured by flow cytometry. Each dot represents the value of an individual patient or HD. Medians and interquartile range are shown.

(CD4⁺CD45RA⁻CCR7⁻CD27⁺), naïve CD8⁺ (CD8⁺CD45RA⁺CCR7⁺CD27⁺) and early EM CD8⁺ (CD8⁺CD45RA⁻CCR7⁻CD27⁺) T cells was found in ProgMS patients (Figure 3).

Central and effector memory CD4⁺ and CD8⁺ T cells are reduced in peripheral blood of patients undergoing IFN- β treatment

The main findings observed in patients undergoing IFN- β treatment when compared with untreated RRMS patients were lower numbers of central memory (CD45RA⁻CCR7⁺CD27⁺) and early EM (CD45RA⁻CCR7⁻CD27⁺) subpopulations of both CD4⁺ and CD8⁺ T cells (Figure 4).

In contrast, an increase in the percentage of transitional B cells in peripheral blood of patients under treatment with IFN- β was observed (Table 3).

Increase in immature T- and B-cells and memory T cells in peripheral blood of MS patients treated with natalizumab

In patients under natalizumab treatment, besides an increase in absolute counts in practically all lymphocyte subsets, an increase in the percentage of early EM CD4⁺ T cells (CD4⁺CD45RA⁻CCR7⁻CD27⁺) and central memory CD8⁺ T cells (CD8⁺CD45RA⁻CCR7⁺CD27⁺) was also observed

compared with untreated patients (Figure 5a and b). In contrast, percentages of naïve (CD4⁺CD45RA⁺CCR7⁺CD27⁺) and TEMRA CD4⁺ T cells (CD4⁺CD45RA⁺CCR7⁻CD27⁻) were lower in patients under this treatment (Table 3).

Interestingly, a higher percentage of RTEs, characterised as CD3⁺CD4⁺CD45RA⁺CCR7⁺CD27⁺CD31⁺PTK7⁺ cells (Figure 5c) and a higher ratio of T1/T2 transitional B cells (Figure 5d–f), was found in RRMS patients treated with natalizumab.

Discussion

MS is characterised by an autoimmune inflammatory response that results in changes in lymphocyte subpopulations in peripheral blood. These changes might be useful surrogate markers for the evaluation of disease activity, progression, and monitoring of therapy response.

T cell subpopulations can be divided into naïve, central memory, effector memory, and effector subsets according to the expression of CD45RA, CCR7, and CD27 [1,2]. The detailed analysis by multiparametric flow cytometry of these minor lymphocyte subpopulations revealed changes not reported previously.

In relation to the phenotype of CD8⁺ subpopulations in peripheral blood of MS patients, results are still under debate. Whereas some authors report an increase in effector CD8⁺

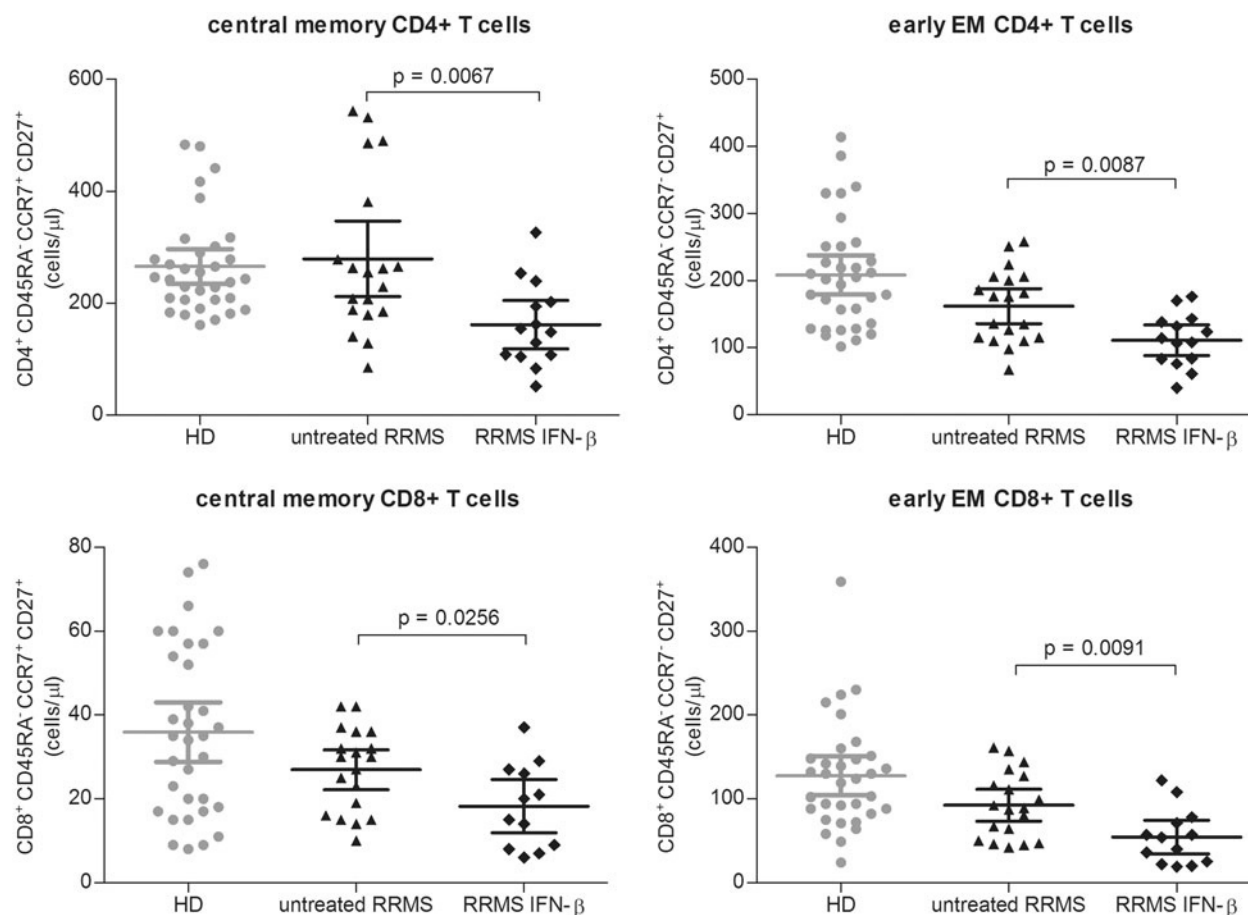


Figure 4. Changes in lymphocyte subpopulations in RRMS patients under treatment with IFN- β compared with RRMS patients without treatment and with HD. Absolute counts (cells/ μ l) of CD4⁺ central memory, CD4⁺ early EM, CD8⁺ central memory, CD8⁺ early EM T cells were measured by flow cytometry. Each dot represents the value of an individual patient. Medians and interquartile range are shown.

cells [18,24], other authors describe a decrease in effector memory and TEMRA CD8⁺ T cells [19]. Moreover, studies of the cellularity of the CNS described enrichment in the number of effector memory and TEMRA CD8⁺ T cells in patients with MS and others inflammatory neurological diseases [25,26]. In these studies, the increase in central memory and effector memory CD8⁺ T cells in peripheral blood and in CSF have been related to active disease or early stages of disease. In contrast to those published data, in this study, analysing in untreated RRMS patients (who were less clinically active than patients undergoing treatment) no changes in central memory CD8⁺ T cells or in the percentages of CD8⁺ early EM were found in peripheral blood. In contrast, a decrease in absolute counts of CD8⁺ early EM T cells was observed, which would suggest that these cells have migrated to the CNS.

The increase in Th17 in the peripheral blood of RRMS patients has widely been reported, and a pathogenic role of these cells postulated [12–15,27]. Interestingly, this study shows that this subpopulation did not decrease in those patients undergoing treatment with IFN- β , suggesting that the mechanism of action of IFN- β is not via a reduction of Th17 numbers as previously postulated by others [28]. One potential reason for this discrepancy may be differences between the studies with respect to the biomarkers used to define Th17 cells.

In RRMS patients undergoing treatment with natalizumab, no changes were observed in the percentage of Th17 cells

whereas an increase in their absolute counts was found. This increase, also found in most of the lymphocyte subpopulations studied in this cohort, may be explained as a consequence of natalizumab's mechanism of action, blocking the entrance of lymphocytes into the CNS.

In peripheral blood in ProgMS patients, an increase in the percentage of Th17 cells was also observed, in line with the study recently published by Christensen et al. [29] supporting the notion that there is also a certain degree of systemic inflammation in progressive forms of MS. However, in this study using PTK7 as a specific marker for RTEs [30] no differences in RTEs nor in naïve subsets in ProgMS patients were found compared with HD, in contrast to other studies where a decrease in these subpopulations was reported [29,31].

It has been described that IFN- β induces an expansion of regulatory CD4⁺ and CD8⁺ T cells with a concomitant decrease in memory CD8⁺ T cells and an inhibition of T-cell proliferation [32–34]. Using multiparametric flow cytometry, a decrease in absolute counts in central memory and early EM in CD4⁺ and CD8⁺ T cells was found in our cohort of patients. In contrast to other studies [35], no differences in RTEs between untreated patients and those undergoing treatment with IFN- β were found in this study. However, an increase in transitional – immature – B cells was observed, in agreement with Zanotti et al. [36] that observed an increase in *k*-deleting recombination excision circle in patients

Table 3. Changes in lymphocyte subpopulations in peripheral blood of RRMS patients untreated versus RRMS patients under treatment with IFN-β and RRMS patients untreated versus RRMS patients under treatment with Natalizumab (significant *p* values in bold).

	Parent	Percentage (%)		p	Percentage (%)		p	Counts (cells/μl)		p	Counts (cells/μl)		p
		no treated	IFN-β		RRMS patients	RRMS patients		patients no treated	RRMS patients		IFN-β	RRMS patients	
CD3+ lymphocytes	Lymphocytes	74.00 (67.90–75.66)	73.75 (66.84–75.38)	0.9077	63.30 (61.43–70.27)	0.0314	1290 (1149–1601)	900 (734–1285)	0.0327	2510 (2144–2721)	0.0002		
CD4+ lymphocytes	T cells	68.00 (63.79–69.59)	65.45 (62.73–70.82)	0.8946	64.70 (55.45–68.98)	0.282	859 (766–1075)	621 (488–853)	0.0301	1424 (1268–1916)	0.0008		
CD4 naïve	T CD4	37.30 (31.00 – 41.70)	40.83 (33.81–47.77)	0.2497	21.60 (19.69–34.12)	0.0201	372 (268–428)	282 (167–410)	0.2195	367 (245–612)	0.6939		
CD4 central memory	T CD4	30.16 (25.70–34.61)	26.42 (23.72–29.83)	0.2512	30.25 (25.02–33.63)	0.7308	255 (212–347)	151 (118–205)	0.0067	442 (382–541)	0.01		
CD4 early EM	T CD4	18.93 (15.95–20.78)	19.75 (16.54–22.11)	0.6101	27.00 (24.39–35.90)	0.0003	176 (136–188)	111 (88–134)	0.0087	377 (311–624)	<0.0001		
CD4 late EM	T CD4	5.26 (3.73–13.14)	5.46 (4.48–8.66)	0.8698	7.30 (5.79–9.92)	0.2724	48 (38–100)	36 (26–47)	0.1171	99 (69–156)	<0.0001		
CD4 TEMRA	T CD4	0.85 (0.47–1.24)	0.29 (0.20–1.25)	0.4662	0.10 (0.00–0.38)	0.0263	6 (4–12)	2 (1–9)	0.1669	2 (1–6)	0.1814		
RTE	T CD4 naïve	3.81 (3.17–4.81)	3.90 (3.16–5.19)	0.9541	5.10 (4.61–5.72)	0.0267	14 (10–18)	11 (6–16)	0.3564	19 (13–30)	0.061		
Th17	T CD4	6.00 (5.36–7.02)	6.19 (4.92–10.36)	0.3581	7.80 (5.67–9.32)	0.0966	48 (37–66)	33 (28–47)	0.1332	125 (79–153)	0.0027		
CD8+ lymphocytes	T cells	25.40 (24.79–30.21)	29.15 (24.57–32.33)	0.4462	29.10 (26.46–36.78)	0.132	311 (300–455)	248 (204–368)	0.0821	713 (570–952)	0.0004		
CD8 naïve	T CD8	40.30 (29.45–44.98)	46.60 (34.87–52.54)	0.2089	29.30 (22.94–44.15)	0.6669	131 (100–178)	82 (72–161)	0.3529	185 (144–408)	0.0047		
CD8 central memory	T CD8	6.99 (6.21–8.79)	8.40 (6.13–14.09)	0.2497	11.10 (9.25–13.05)	0.0022	30 (22–32)	18 (12–25)	0.0256	81 (67–102)	<0.0001		
CD8 early EM	T CD8	24.86 (21.06–30.02)	22.54 (17.74–26.32)	0.4543	28.50 (23.44–31.93)	0.2724	89 (74–112)	54 (35–75)	0.0091	217 (146–283)	0.0002		
CD8 late EM	T CD8	5.58 (4.63–13.49)	6.05 (4.08–13.34)	0.8780	5.50 (3.73–12.21)	1	20 (17–49)	15 (6–46)	0.4767	25 (18–77)	0.1914		
CD8 TEMRA	T CD8	10.76 (6.99–18.32)	8.55 (5.57–20.36)	0.8179	11.80 (4.93–16.75)	0.8973	32 (21–86)	32 (15–48)	0.8327	42 (1–143)	0.6757		
CD4+CD8+ (DPs)	T cells	0.70 (0.59–0.98)	1.35 (0.93–1.71)	0.0273	0.90 (0.59–1.77)	0.1596	9 (7–14)	13 (8–20)	0.3360	23 (15–30)	0.0012		
CD19+ cells	Lymphocytes	8.53 (7.60–12.67)	10.50 (8.94–14.46)	0.2651	19.80 (15.63–21.45)	0.0005	145 (137–261)	127 (70–293)	0.4640	763 (476–893)	0.0004		
Transitional B cells	CD19 cells	8.02 (6.72–11.21)	11.50 (9.39–17.83)	0.0467	6.00 (3.47–12.24)	0.4875	15 (11–28)	13 (11–24)	0.9135	52 (15–74)	0.0768		
T1 Transitional B cells	CD19 cells	2.88 (2.03–3.63)	4.31 (2.96–6.01)	0.1116	3.20 (1.87–5.91)	0.4714	5 (4–9)	5 (4–8)	0.9710	25 (12–44)	0.0018		
T2 Transitional B cells	CD19 cells	5.38 (4.51–7.76)	8.82 (6.27–11.98)	0.1	3.40 (1.05–6.88)	0.0477	11 (7–20)	10 (7–16)	0.8563	30 (0–67)	0.1376		

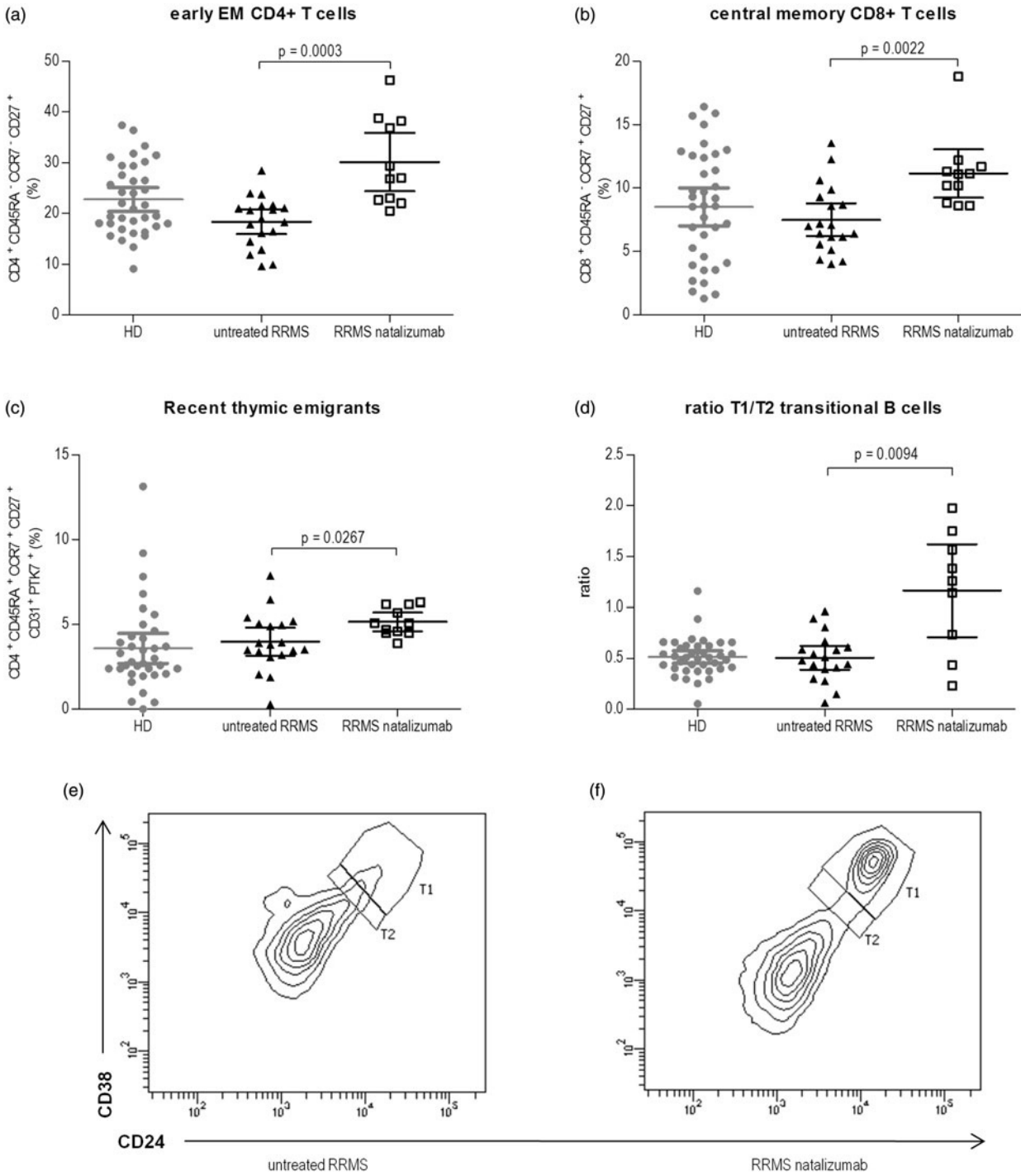


Figure 5. Changes in lymphocyte subpopulations in RRMS patients under treatment with natalizumab compared with RRMS patients without treatment and with HD. Percentages (%) of CD4⁺ early EM (a), CD8⁺ central memory (b), RTEs (c) and T1/T2 transitional B cells ratio (d) were measured. Each dot represents the value of one patient. Medians and interquartile range are shown. Transitional B cells according to CD38 and CD24 expression in CD19⁺CD27⁻ subpopulation in a representative untreated RRMS patient (e) and in an RRMS patient under treatment with natalizumab (f) are shown.

undergoing treatment with IFN- β . Both studies would support an effect of IFN- β increasing B cell release from bone marrow.

Natalizumab's mechanism of action, blocking the entrance of lymphocytes into the CNS, explains the increase in absolute counts of lymphocyte subpopulations in peripheral blood of patients under treatment. However, to our knowledge, minor populations have not widely been analysed in these patients [37]. In this study, patients under treatment with

natalizumab showed an strong increase in the percentage of early EM CD4⁺ cells (CD4⁺CD45RA⁻CCR7⁻CD27⁺), the same subpopulation that was found decreased in untreated RRMS patients. This increase could explain the decrease in the percentage but not in absolute counts observed in naïve and TEMRA CD4⁺ T cells in patients under treatment with natalizumab. Furthermore, central memory CD8⁺ cells (CD8⁺CD45RA⁻CCR7⁺CD27⁺) were also increased, suggesting that these memory CD4⁺ and CD8⁺ T cells probably

Table 4. Changes found in minor lymphocyte subpopulations.

	HD versus untreated RRMS patients		HD versus progressive MS patients		Untreated RRMS patients versus RRMS patients IFN-β		Untreated RRMS patients versus RRMS patients natalizumab	
	%	Counts	%	Counts	%	Counts	%	Counts
CD3+ lymphocytes	ns	ns	ns	↓ (<i>p</i> < 0.001)	ns	↓ (<i>p</i> < 0.05)	↓ (<i>p</i> < 0.05)	↑ (<i>p</i> < 0.001)
CD4+ lymphocytes	↑ (<i>p</i> < 0.05)	ns	ns	↓ (<i>p</i> < 0.01)	ns	↓ (<i>p</i> < 0.05)	ns	↑ (<i>p</i> < 0.001)
CD4 naïve	ns	ns	ns	ns	ns	ns	↓ (<i>p</i> < 0.05)	ns
CD4 central memory	ns	ns	ns	ns	ns	↓ (<i>p</i> < 0.01)	ns	↑ (<i>p</i> < 0.05)
CD4 early EM	↓ (<i>p</i> < 0.05)	ns	ns	↓ (<i>p</i> < 0.05)	ns	↓ (<i>p</i> < 0.01)	↑ (<i>p</i> < 0.001)	↑ (<i>p</i> < 0.0001)
CD4 late EM	ns	ns	ns	↓ (<i>p</i> < 0.01)	ns	ns	ns	↑ (<i>p</i> < 0.0001)
CD4 TEMRA	ns	ns	ns	ns	ns	ns	↓ (<i>p</i> < 0.05)	ns
RTE	ns	ns	ns	ns	ns	ns	↑ (<i>p</i> < 0.05)	ns
Th17	↑ (<i>p</i> < 0.05)	ns	↑ (<i>p</i> < 0.05)	ns	ns	ns	ns	↑ (<i>p</i> < 0.01)
CD8+ lymphocytes	ns	↓ (<i>p</i> < 0.05)	ns	↓ (<i>p</i> < 0.001)	ns	ns	ns	↑ (<i>p</i> < 0.001)
CD8 naïve	ns	ns	ns	↓ (<i>p</i> < 0.01)	ns	ns	ns	↑ (<i>p</i> < 0.01)
CD8 central memory	ns	ns	ns	ns	ns	↓ (<i>p</i> < 0.05)	↑ (<i>p</i> < 0.01)	↑ (<i>p</i> < 0.0001)
CD8 early EM	ns	↓ (<i>p</i> < 0.05)	ns	↓ (<i>p</i> < 0.01)	ns	↓ (<i>p</i> < 0.01)	ns	↑ (<i>p</i> < 0.001)
CD8 late EM	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns
CD8 TEMRA	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns
CD4+CD8+ (DPs)	ns	ns	↑ (<i>p</i> < 0.05)	ns	↑ (<i>p</i> < 0.05)	ns	ns	↑ (<i>p</i> < 0.01)
CD19+ cells	ns	ns	ns	ns	ns	ns	↑ (<i>p</i> < 0.001)	↑ (<i>p</i> < 0.001)
Transitional B cells	ns	ns	ns	ns	↑ (<i>p</i> < 0.05)	ns	ns	ns
T1 Transitional B cells	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	↑ (<i>p</i> < 0.01)
T2 Transitional B cells	ns	ns	ns	ns	ns	ns	↓ (<i>p</i> < 0.05)	ns

migrate to the CNS in untreated RRMS patients and participate in the autoimmune response. In contrast to our study, Planas et al. [38] found no differences in memory (CD3⁺CD4⁺/CD8⁺CD45RO⁺) or effector (CD3⁺CD4⁺/CD8⁺CD45RO⁻CD27⁺) T cells. Differences in the phenotypical characterisation of those cells (these authors did not analyse CD45RA, CCR7, and CD27, markers that allow to better define small subpopulations as early EM CD4⁺ T cells) may account for the different results.

It has previously been reported that natalizumab promotes the release of hematopoietic precursors from primary lymphoid organs, preferentially lymphoid-committed progenitors [38–41]. In order to better characterise those subpopulations, the most immature T cell subset: RTEs (using PTK7, a more specific marker than CD31 for RTEs [30]), and transitional B cells (immature B cells just released from bone marrow) were analysed. Interestingly, an increase in both T- and B-immature subpopulations was found in peripheral blood of patients treated with natalizumab, suggesting that the release of lymphoid-committed progenitors promoted by natalizumab affects both compartments. It is tempting to speculate that this premature release could interfere with the mechanisms of central tolerance, with this also being a factor that could play a role in the exacerbation of the disease observed after discontinuing the treatment. Studies on patients discontinuing the therapy are necessary to confirm this hypothesis.

Conclusions

Changes in lymphocyte subpopulations have been found in patients with RRMS and progressive forms of MS, compared with HD. Furthermore, changes in those subpopulations have been observed in patients under immunomodulatory treatments (Table 4).

This study supports that quantification of minor lymphocyte subpopulations in peripheral blood might be useful

surrogate markers for the characterisation and immunomonitoring of patients with MS or other immune-mediated inflammatory diseases.

Acknowledgements

We thank the members of the COST Action BM0907 ‘European Network for Translational Immunology Research and Education (ENTIRE): From immunomonitoring to personalised immunotherapy’ for their contributions to the characterisation of cellular subpopulations by flow cytometry. We also thank Amanda Rus for her technical assistance. The authors are members of a consolidated group (2014 SGR 1365) as recognized by the Agency for Management of University and Research Grants (AGAUR) of the Generalitat of Catalonia.

Declaration of interest

The authors report no conflicts of interest. This work was supported in part by the Instituto de Investigación Carlos III, grants FIS PI11/02416 and FIS PI14/01175 and Fundación Salud 2000-Ayudas Merck Serono de Investigación to E.M.C.

References

1. Appay, V., R. A. van Lier, F. Sallusto, and M. Roederer. 2008. Phenotype and function of human T lymphocyte subsets: consensus and issues. *Cytometry A* 73: 975–983.
2. Maecker, H. T., J. P. McCoy, and R. Nussenblatt. 2012. Standardizing immunophenotyping for the Human Immunology Project. *Nat. Rev. Immunol.* 12: 191–200.
3. Popadic, D., I. Anegón, D. Baeten, et al. 2013. Predictive immunomonitoring – the COST ENTIRE initiative. *Clin. Immunol.* 147: 23–26.
4. Fritsch, R. D., X. Shen, G. P. Sims, et al. 2005. Stepwise differentiation of CD4 memory T cells defined by expression of CCR7 and CD27. *J. Immunol.* 175: 6489–6497.

Downloaded by [Hospital Universitari], [Aina Teniente-Serra] at 23:53 01 February 2016

5. Hamann, D., P. A. Baars, M. H. Rep, et al. 1997. Phenotypic and functional separation of memory and effector human CD8+ T cells. *J. Exp. Med.* 186: 1407–1418.
6. Monteiro, M., C. Evaristo, A. Legrand, et al. 2007. Cartography of gene expression in CD8 single cells: novel CCR7-subsets suggest differentiation independent of CD45RA expression. *Blood* 109: 2863–2870.
7. Palanichamy, A., J. Barnard, B. Zheng, et al. 2009. Novel human transitional B cell populations revealed by B cell depletion therapy. *J. Immunol.* 182: 5982–5993.
8. Bruck, W., and C. Stadelmann. 2005. The spectrum of multiple sclerosis: new lessons from pathology. *Curr. Opin. Neurol.* 18: 221–224.
9. Sospedra, M., and R. Martin. 2005. Immunology of multiple sclerosis. *Annu. Rev. Immunol.* 23: 683–747.
10. Fletcher, J. M., S. J. Lalor, C. M. Sweeney, et al. 2010. T cells in multiple sclerosis and experimental autoimmune encephalomyelitis. *Clin. Exp. Immunol.* 162: 1–11.
11. Jensen, J., A. R. Langkilde, J. L. Frederiksen, and F. Sellebjerg. 2006. CD8+ T cell activation correlates with disease activity in clinically isolated syndromes and is regulated by interferon-beta treatment. *J. Neuroimmunol.* 179: 163–172.
12. Brucklacher-Waldert, V., K. Stuerner, M. Kolster, et al. 2009. Phenotypical and functional characterization of T helper 17 cells in multiple sclerosis. *Brain* 132: 3329–3341.
13. Jamshidian, A., V. Shaygannejad, A. Pourazar, et al. 2013. Biased Treg/Th17 balance away from regulatory toward inflammatory phenotype in relapsed multiple sclerosis and its correlation with severity of symptoms. *J. Neuroimmunol.* 262: 106–112.
14. Lovett-Racke, A. E., Y. Yang, and M. K. Racke. 2011. Th1 versus Th17: are T cell cytokines relevant in multiple sclerosis? *Biochim. Biophys. Acta* 1812: 246–251.
15. Peelen, E., J. Damoiseaux, J. Smolders, et al. 2011. Th17 expansion in MS patients is counterbalanced by an expanded CD39+ regulatory T cell population during remission but not during relapse. *J. Neuroimmunol.* 240–241: 97–103.
16. Friese, M. A., and L. Fugger. 2009. Pathogenic CD8(+) T cells in multiple sclerosis. *Ann. Neurol.* 66: 132–141.
17. Mars, L. T., P. Saikali, R. S. Liblau, and N. Arbour. 2011. Contribution of CD8 T lymphocytes to the immuno-pathogenesis of multiple sclerosis and its animal models. *Biochim. Biophys. Acta* 1812: 151–161.
18. Haegele, K. F., C. A. Stueckle, J. P. Malin, and E. Sindern. 2007. Increase of CD8+ T-effector memory cells in peripheral blood of patients with relapsing-remitting multiple sclerosis compared to healthy controls. *J. Neuroimmunol.* 183: 168–174.
19. Pender, M. P., P. A. Csurhes, C. M. Pfluger, and S. R. Burrows. 2014. Deficiency of CD8+ effector memory T cells is an early and persistent feature of multiple sclerosis. *Mult. Scler.* 20: 1825–1832.
20. Wilson, H. L. 2012. B cells contribute to MS pathogenesis through antibody-dependent and antibody-independent mechanisms. *Biologics* 6: 117–123.
21. Kieseier, B. C. 2011. The mechanism of action of interferon-beta in relapsing multiple sclerosis. *CNS Drugs* 25: 491–502.
22. Niino, M., C. Bodner, M. L. Simard, et al. 2006. Natalizumab effects on immune cell responses in multiple sclerosis. *Ann. Neurol.* 59: 748–754.
23. Polman, C. H., S. C. Reingold, G. Edan, et al. 2005. Diagnostic criteria for multiple sclerosis: 2005 revisions to the 'McDonald Criteria'. *Ann. Neurol.* 58: 840–846.
24. Liu, G. Z., L. B. Fang, P. Hjelmstrom, and X. G. Gao. 2007. Increased CD8+ central memory T cells in patients with multiple sclerosis. *Mult. Scler.* 13: 149–155.
25. Jilek, S., M. Schluep, A. O. Rossetti, et al. 2007. CSF enrichment of highly differentiated CD8+ T cells in early multiple sclerosis. *Clin. Immunol.* 123: 105–113.
26. Mullen, K. M., A. R. Gocke, R. Allie, et al. 2012. Expression of CCR7 and CD45RA in CD4+ and CD8+ subsets in cerebrospinal fluid of 134 patients with inflammatory and non-inflammatory neurological diseases. *J. Neuroimmunol.* 249: 86–92.
27. Kebir, H., K. Kreymborg, I. Ifergan, et al. 2007. Human TH17 lymphocytes promote blood-brain barrier disruption and central nervous system inflammation. *Nat. Med.* 13: 1173–1175.
28. Durelli, L., L. Conti, M. Clerico, et al. 2009. T-helper 17 cells expand in multiple sclerosis and are inhibited by interferon-beta. *Ann. Neurol.* 65: 499–509.
29. Romme Christensen, J., L. Bornsen, R. Ratzer, et al. 2013. Systemic inflammation in progressive multiple sclerosis involves follicular T-helper, Th17- and activated B-cells and correlates with progression. *PLoS One* 8: e57820.
30. Haines, C. J., T. D. Giffon, L. S. Lu, et al. 2009. Human CD4+ T cell recent thymic emigrants are identified by protein tyrosine kinase 7 and have reduced immune function. *J. Exp. Med.* 206: 275–285.
31. Haegert, D. G., J. D. Hackenbroch, D. Duszczyszyn, et al. 2011. Reduced thymic output and peripheral naive CD4 T-cell alterations in primary progressive multiple sclerosis (PPMS). *J. Neuroimmunol.* 233: 233–239.
32. Aristimuno, C., C. de Andres, M. Bartolome, et al. 2010. IFN-beta-1a therapy for multiple sclerosis expands regulatory CD8+ T cells and decreases memory CD8+ subset: a longitudinal 1-year study. *Clin. Immunol.* 134: 148–157.
33. Kasper, L. H., and A. T. Reder. 2014. Immunomodulatory activity of interferon-beta. *Ann. Clin. Transl. Neurol.* 1: 622–631.
34. Rep, M. H., R. Q. Hintzen, C. H. Polman, and R. A. van Lier. 1996. Recombinant interferon-beta blocks proliferation but enhances interleukin-10 secretion by activated human T-cells. *J. Neuroimmunol.* 67: 111–118.
35. Puissant-Lubrano, B., F. Viala, P. Winterton, et al. 2008. Thymic output and peripheral T lymphocyte subsets in relapsing – remitting multiple sclerosis patients treated or not by IFN-beta. *J. Neuroimmunol.* 193: 188–194.
36. Zanotti, C., M. Chiarini, F. Serana, et al. 2011. Opposite effects of interferon-beta on new B and T cell release from production sites in multiple sclerosis patients. *J. Neuroimmunol.* 240–241: 147–150.
37. Koudriavtseva, T., E. Sbardella, E. Trento, et al. 2014. Long-term follow-up of peripheral lymphocyte subsets in a cohort of multiple sclerosis patients treated with natalizumab. *Clin. Exp. Immunol.* 176: 320–326.
38. Planas, R., I. Jelcic, S. Schippling, et al. 2012. Natalizumab treatment perturbs memory- and marginal zone-like B-cell homing in secondary lymphoid organs in multiple sclerosis. *Eur. J. Immunol.* 42: 790–798.
39. Bonig, H., A. Wundes, K. H. Chang, et al. 2008. Increased numbers of circulating hematopoietic stem/progenitor cells are chronically maintained in patients treated with the CD49d blocking antibody natalizumab. *Blood* 111: 3439–3441.
40. Jing, D., U. Oelschlaegel, R. Ordemann, et al. 2010. CD49d blockade by natalizumab in patients with multiple sclerosis affects steady-state hematopoiesis and mobilizes progenitors with a distinct phenotype and function. *Bone Marrow Transpl.* 45: 1489–1496.
41. Zohren, F., D. Toutzaris, V. Klarner, et al. 2008. The monoclonal anti-VLA-4 antibody natalizumab mobilizes CD34+ hematopoietic progenitor cells in humans. *Blood* 111: 3893–3895.

6.3. CAPÍTOL 3: Baseline Differences in Minor Lymphocyte Subpopulations may Predict Response to Fingolimod In Relapsing–Remitting Multiple Sclerosis Patients

Teniente-Serra A, Hervás JV, Quirant-Sánchez B, Mansilla MJ, Grau-López L, Ramo-Tello C, Martínez-Cáceres EM. CNS Neurosci Ther. 2016 Jul;22(7):584-92

Una vegada vist que l'anàlisi per citometria de flux permet detectar canvis en les subpoblacions limfocitàries minoritàries de sang perifèrica tant com a conseqüència de la patogènia de la malaltia, com els canvis deguts a teràpies immunomoduladores, el següent objectiu va ser detectar si aquests canvis podien ser predictius de resposta al tractament. Per això es va realitzar un estudi prospectiu de pacients amb EMRR que iniciaven tractament amb fingolimod. Es va realitzar un seguiment clínic i de les subpoblacions limfocitàries durant 12 mesos. Es van analitzar els temps: basal (abans d'iniciar el tractament), 1, 3, 6, 9 i 12 mesos.

En aquest treball es va veure que la majoria de canvis produïts en les subpoblacions limfocitàries, es detectaven ja al primer mes de tractament i es mantenien durant tot el seguiment. De manera rellevant, es va observar que el tractament amb fingolimod produïa un increment del percentatge de limfòcits Th17 que es correlacionava amb un increment, també en el percentatge, dels limfòcits T reguladors. A més, es detecta també un increment en el percentatge de limfòcits B transicionals durant el tractament amb aquest fàrmac.

A l'hora d'analitzar la relació entre les diferents subpoblacions analitzades i la resposta al tractament, cal destacar que es va observar que aquells pacients responedors al tractament tenien un patró de subpoblacions limfocitàries en el

moment basal, previ al inici del tractament, diferent al dels pacients no responedors. En concret, tenien menor percentatge de RTEs i de limfòcits B transicionals T1. A més, al mes d'iniciar el tractament els pacients responedors tenien menors percentatges de RTEs i major percentatge de limfòcits T CD4⁺ early EM.

Baseline Differences in Minor Lymphocyte Subpopulations may Predict Response to Fingolimod in Relapsing–Remitting Multiple Sclerosis Patients

Aina Teniente-Serra,^{1,2} José Vicente Hervás,³ Bibiana Quirant-Sánchez,^{1,2} María José Mansilla,¹ Laia Grau-López,³ Cristina Ramo-Tello^{3,*} & Eva María Martínez-Cáceres^{1,2,*}

1 Immunology Division, Germans Trias i Pujol University Hospital and Research Institute, Badalona, Barcelona, Spain

2 Department of Cell Biology, Physiology and Immunology, Universitat Autònoma de Barcelona (Cerdanyola del Vallès), Barcelona, Spain

3 Multiple Sclerosis Unit, Department of Neurosciences, Germans Trias i Pujol University Hospital, Badalona, Barcelona, Spain

Keywords

Fingolimod; Immunomonitoring; Minor lymphocyte subpopulations; Multiple sclerosis; Response to treatment.

Correspondence

E. M. Martínez-Cáceres, Immunology Division, Germans Trias i Pujol University Hospital, Institut Recerca Germans Trias i Pujol 2nd floor. Carretera del Canyet s/n, Camí de les Escoles s/n, 08916 Badalona, Barcelona, Spain.

Tel.: 34934978666;

Fax: +34934978668;

E-mail: emmartinez.germanstrias@gencat.cat

Received 2 January 2016; revision 2 March

2016; accepted 21 March 2016

SUMMARY

Aims: Fingolimod, oral treatment for relapsing–remitting multiple sclerosis (RRMS), is an agonist of sphingosine and its metabolite S1P that binds their receptors, blocking the egress of lymphocytes from lymph nodes. The aim of this study was immunomonitoring of minor peripheral lymphocyte subpopulations in RRMS patients under treatment with fingolimod and correlation with treatment response. **Methods:** Prospective study. T- and B-cell subpopulations were analyzed using multiparametric flow cytometry in peripheral blood from 14 RRMS patients under treatment with fingolimod at baseline, +1, +3, +6, +9, and +12 months of follow-up. Response to therapy was assessed at month +12. **Results:** Most changes in minor lymphocyte subpopulations occurred in the first month of treatment and were maintained until the end of follow-up. The basal percentages of recent thymic emigrants (RTEs) and transitional B cells were lower in responder patients than in nonresponders. After 1 month of follow-up, the percentages of late effector memory CD4⁺ T cells in peripheral blood were higher in responder patients. **Conclusion:** If confirmed in a bigger cohort of patients, analysis of percentages of minor lymphocyte subpopulations in peripheral blood of patients with RRMS prior and after +1 month of treatment might predict clinical response to fingolimod.

doi: 10.1111/cns.12548

*Shared senior coauthorship.

Introduction

The phosphorylated metabolite of sphingosine (S1P) and its receptor (S1P₁) mediate the circulation of T and B cells between blood and lymph nodes (LN). In physiological conditions, the interaction between S1P and the lymphocytic receptor S1P₁ promotes their egress from LN by overcoming retention signals as the chemokine receptor CCR7. Naive and central memory T cells as well as B cells express CCR7; in contrast, effector memory T cells and terminally differentiated effector T cells (TEMRA) downmodulate CCR7 expression and may egress from LN independently of S1P₁ receptor [1–3].

Fingolimod, the first oral drug approved for relapsing–remitting multiple sclerosis (RRMS), is a structural analogue of sphingosine and its phosphorylated metabolite S1P, that binds 4 of the 5 subtypes of S1P receptors, causing the internalization and degradation of these receptors, and consequently blocking the egress of CCR7⁺

lymphocytes from LN [1]. This specific effect of fingolimod on CCR7⁺ cells has been postulated to be one of the key mechanisms underlying its therapeutic effect. Although the effect of fingolimod on CCR7⁺ cells has been reported [4–7], its effect on other lymphocyte subpopulations such as Th17 cells, regulatory T (Treg) cells, or B cells has been less well-studied, and published results are contradictory [6–11]. Recent advances in the development of multiparametric flow cytometry have made possible an exhaustive and detailed characterization of lymphocyte subsets in whole blood or isolated peripheral blood mononuclear cells (PBMC) of healthy donors and patients [3,12] and has been shown to be a powerful tool for immunomonitoring the response to treatments.

The aim of this study was to analyze whether the percentages of minor lymphocyte subpopulations can correlate with clinical (relapses and disability) and brain MRI variables in order to define potential predictive markers that would make possible to define those patients responders to therapy.

To our knowledge, only one study analyzing the correlation between peripheral lymphocyte subpopulations and response to treatment has been published [13], but potential predictive markers of therapy response before starting fingolimod treatment have not been described yet.

Materials and Methods

Study Design

Single-center, open, prospective, 1-year study to assess changes in peripheral lymphocyte subpopulations in patients with RRMS starting fingolimod treatment. Inclusion criteria comprised diagnosis of RRMS (revised McDonald criteria 2010 [14]) starting fingolimod treatment (0.5 mg/day), age 18–59 years, and disability at baseline quantified with the Expanded Disability Status Scale (EDSS) of 0–6.0. A washout period of over 24 h was established for patients from interferon-beta (IFN β) or glatiramer acetate (AG) and over 2 months for natalizumab or others drugs.

Subjects who met the study criteria were evaluated by EDSS scale and standardized neurological evaluation at baseline, 1, 3, 6, and 12 months. Adverse events and relapses were reported during the follow-up visits. A standardized brain MRI protocol (axial T2, axial T2 FLAIR, and T1) for reliably detecting new or enlarging T2 lesions clinically silent was performed at baseline and 12 months after initiation of fingolimod. The field strength was 1.5 T or 3 T; for each patient, both MRI studies were performed with the same equipment.

Blood samples were obtained before and at 1, 3, 6, 9, and 12 months after initiation of fingolimod treatment.

The study was approved by the local ethical committee. All patients signed the informed consent.

Flow Cytometry

Analysis of Peripheral Lymphocyte Subsets

Samples of peripheral blood were incubated with the appropriate amounts of monoclonal antibodies detailed below for 20 min at room temperature and protected from the light. After erythrocyte lysis, the samples were washed and a total of 100,000 lymphocytes were acquired on a FACSCantoII flow cytometer (BD Biosciences, San José, CA, USA).

Lymphocyte subpopulations were defined using the markers specified in Table S1, using several combinations of the following monoclonal antibodies: anti-CD3-AmCyan, anti-CD4-V450, anti-CCR6-phycoerythrin (PE), anti-CCR4-AlexaFluor 647, anti-CD4-allophycocyanin (APC)-H7, anti-CD8-V450, anti-CD45RA-fluorescein isothiocyanate (FITC), anti-CCR7-PE-Cy7, anti-CD27 PerCP-Cy5.5, anti-CD31-AlexaFluor 647, anti-CD19-PerCP-Cy5.5, anti-CD27-APC, anti-CD24-FITC, anti-CD38-PE, anti-CD19 V500, anti-CD3-V450, anti-IgM-PerCP-Cy5.5, anti-IgD FITC, anti-CD21-PE, anti-CD45-FITC, anti-CD4-PERCP-Cy5.5, anti-CCR4-PE-Cy7, anti-CD127-A647, anti-CD45RO-APC-H7, anti-CD25-PE, HLA-DR-V500 (BD Biosciences), and anti-PTK7-PE (Milteny Biotec, Bergisch Gladbach, Germany) and analyzed with FACSDiva software (BD Biosciences). The

desired lymphocyte subpopulations were gated using forward and side scatter, and their relative percentages were determined. The gating strategy for lymphocyte subsets is shown in Figures S1–6.

Fluorescence minus one (FMO) controls were used to define CCR7 expression on Th17 cells, PTK7 expression on recent thymic emigrants (RTEs), and CD21 expression on immature B cells. When gating CCR7 versus CD45RA in T cells, CD45RO versus CCR4 and CD45RO versus HLA-DR in Tregs and CCR4 versus CCR7 in Th17 cells, internal reference subpopulations gating control were used.

Percentage and absolute counts (number of cells per μ L) were analyzed for all subpopulations defined in Table S1. Absolute counts were calculated as follows: (%subset/100) $\times$ counts of main subpopulation.

Quantification of Absolute Cell Numbers

For quantification of lymphocyte numbers, 25 μ L of peripheral blood samples was incubated with CD45-PerCP (Beckton Dickinson (BD) Biosciences) for 15 min at room temperature and protected from the light. Erythrocytes were removed using 450 μ L lysis buffer (BD FACS™ lysing Solution; BD Biosciences). Twenty-five microliter of Perfect-Count Microspheres (Cytognos SL, Salamanca, Spain) was added to each sample and acquired on an eight-color multiparameter flow cytometer (FACSCantoII; BD Biosciences). The number of total lymphocytes was expressed in cells/ μ L.

Statistical Analysis

For clinical characteristics (mean $\pm$ standard deviation), a descriptive statistical analysis of the main variables was performed. Differences between two groups were analyzed using the nonparametric Wilcoxon test. Comparisons of three groups and more were assessed by one-way ANOVA with Bonferroni's correction for multiple comparisons. The results were expressed as mean $\pm$ standard deviation (SD) or medians (interquartile range). Correlations were calculated with Pearson's correlation. Two-tailed *P* values <0.05 were considered statistically significant. All statistical analyses were performed using the Statistical Package for Social Sciences (SPSS/Windows version 15.0; SPSS Inc, Chicago, IL, USA) and the software program GraphPad Prism (5.0 version; GraphPad, La Jolla, CA, USA).

Results

Patients

Fourteen RRMS patients (9 females) who started treatment with fingolimod were enrolled and followed for 12 consecutive months. Seven patients were treatment naïve, five switched from IFN β , 1 from AG, and one from diazoxide (under clinical trial whose outcome was negative [15]). No patients switched from natalizumab to fingolimod. A total of 12 patients (86%) completed 12 months of treatment. The baseline characteristics of the patients are summarized in Table 1.

Table 1 Clinical characteristics of the patients before and after fingolimod treatment

Baseline clinical characteristics of the patients (n = 14)			
Female sex	9 (64)		
(no. of patients, [%])			
Age (years)	30.2 ± 8.1		
First symptoms to fingolimod start (years)	3.6 ± 3		
Last immunomodulating drugs	7 naïve, 3 IFNb 1a IM, 1 IFNb 1a sc, 1 IFNb1b sc, 1 GA, 1 diazoxide		
Number of previous treatment	1.3 ± 0.8		
Washout period (months)	1.9 ± 2.11		
	IFNb 1.6 ± 1.8, GA 0, diazoxide 5		
ARR* previous year	2.21		
	Naïve patients	2	
	Treated patients	2.4	
Mean EDSS	2 ± 1.13		
Brain MRI* (n = 13)			
<9 T2 lesions	1 (8)		
(no. of patients, [%])			
>9 T2 lesions	12 (92)		
(no. of patients, [%])			
Clinical characteristics of the patients after 12-month fingolimod treatment (ITT, n = 14)			
ARR* previous year to start treatment	2.21	P = 0.01	
ARR* previous year after 12 months of treatment	0.69		
Relapse-free patients	7 (50)		
(no. of patients, [%])			
EDSS (mean ± SD) to start treatment	2 ± 1.13	P = 0.58	
EDSS (mean ± SD) after 12 months of treatment	1.84 ± 0.86		
Progression-free patients	11 (79)		
(no. of patients, [%])			
Brain MRI* (IPP, n = 12)			
New T2 lesions (no. of patients, [%])			
0	3 (25)		
1	4 (33)		
2	1 (8)		
≥3	4 (33)		

*IFNb, Interferon-beta; GA, glatiramer acetate; AAR, annualized relapse rate; MRI, magnetic resonance; ITT, intention-to-treat; IPP, intention-per-protocol.

Efficacy

As shown in Table 1, the annual relapse rate (ARR) was significantly reduced under fingolimod treatment. A significant number of patients suffered a relapse soon after treatment initiation: 3 of 9 (33%) relapses happened in the first month (two patients previously treated with IFNb with a washout period of 1 and 3 months) and 2 of 9 (22%) relapses happened at the second month. At 12 months, the estimated proportion of patients

without progression of disability was 79% and 4 of 12 (33%) patients had more than two new or enlarging T2 lesions in brain MRI (Table 1).

A patient was considered as “nonresponder” when met two or more of the following criteria: (1) ≥1 relapses during the first year of treatment; (2) an increase of 1 point in the EDSS (confirmed at month +6); and (3) presence of more than two new or enlarging T2 lesions in brain MRI at month +12 compared to the baseline MRI. According to these criteria, seven of the intention-to-treat patients (50%) were classified as nonresponders. To avoid considering a patient as nonresponder in the period in which the fingolimod could not be effective, clinical data were reanalyzed excluding early disease activity (relapses within the first 2 months). Taking this consideration, classification of the patients did not change (Table 2).

Safety

No patients had symptomatic bradycardia or auriculo-ventricular blockage either with the first dose or during follow-up. Neither hepatotoxicity nor macular edema was detected. Lymphopenia ≤500 cells/μL occurred in 6 of 14 (43%) patients and ≤500 cells/μL in 2 of 14 (14%) patients (Table 1).

Fifteen infections were reported in seven patients; there were no serious infections and any patient needed hospitalization. The description of infections during the follow-up is summarized in Table S2. Correlation between infections and lymphocyte subpopulations in the blood test previous to infection was not found. Treatment was discontinued in two patients (one male and one female) at 3 and 9 months of treatment, respectively, by recurrent urinary and upper respiratory tract infections (Table S2).

Changes in Lymphocyte Subpopulations are Detected Early After Starting Fingolimod Treatment

Compared with pretreatment values, lymphocyte counts were reduced from month +1 until end of follow-up (baseline: 1728 ± 520 vs. +1 m: 511 ± 224 cells/μL, $P < 0.001$).

Main changes in lymphocyte subpopulations were already found at month +1 after starting treatment and remained stable until the end of follow-up.

As shown in Figure 1, fingolimod treatment induced a decrease in percentages of CD19⁺ (baseline: 3.8 ± 1.1 vs. +1 m: 1.9 ± 0.6 %, $P < 0.001$), CD3⁺ (baseline: 72.9 ± 5.4 vs. +1 m: 48.4 ± 10.6 %, $P < 0.001$), and CD4⁺ T cells (baseline: 79.6 ± 7.0 vs. +1 m: 23.6 ± 9.5 %, $P < 0.001$), at month +1 that remained until month +12. In contrast, proportions of CD8⁺ T cells were increased, also from month +1 until the end of follow-up (baseline: 33.1 ± 6.15 vs. +1 m: 50.7 ± 13.6 %, $P < 0.01$). Consequently, a decrease in the CD4/CD8 ratio was found (baseline: 1.89 ± 0.56 vs. +1 m: 0.49 ± 0.24, $P < 0.0001$).

Percentages of naïve CD4⁺ and CD8⁺ T cells were decreased at month +1 until month +12 (naïve CD4⁺, baseline: 33.3 ± 12.1 vs. +1 m: 11.8 ± 8.4 %, $P < 0.001$ and naïve CD8⁺, baseline: 38.2 ± 16.6 vs. +1 m: 4.7 ± 4.8 %, $P < 0.001$). In contrast, the percentage of early effector memory CD4⁺ T cells increased at month +3 compared to baseline (Figure 2).

No significant differences were observed in percentages of central memory either CD4⁺ or CD8⁺ T cells, although a trend toward decrease was observed. A trend toward increase in late effector memory and TEMRA CD4⁺ T cell and CD8⁺ T cell subpopulations was also observed during treatment (Figure 2).

When analyzing absolute counts, a decrease in naïve, central memory, and early effector memory CD4⁺ and CD8⁺ T cells was found. Moreover, late effector memory cells were decreased in CD4⁺ but not in CD8⁺ T cells (Table S3).

The Increase of Th17 Cells is Correlated with an Increase in Treg Cells

Although numbers of Th17 cells in peripheral blood were dramatically decreased by fingolimod at month +1 (baseline: 43.3 ± 19.4 vs. +1 m: 1.2 ± 5.6 cells/ μ L, $P < 0.001$, Figure 3A), the

percentage of this subpopulation, in relation to total percentage of CD4⁺ T cells, was increased at month +3 until the end of follow-up (baseline: 5.8 ± 1.9 vs. +3 m: 13.4 ± 5.1 %, $P < 0.001$, Figure 3B). No changes were found in the percentage of CCR7⁺ Th17 cells (data not shown), although a clear decrease was observed in absolute counts. Interestingly, a parallel increase in the percentages of activated Treg cells at months +3 was also observed (baseline: 1.3 ± 0.4 vs. +3 m: 3.9 ± 2.5 %, $P < 0.05$), +6 (baseline: 1.3 ± 0.4 vs. +6 m: 4.1 ± 2.5 %, $P < 0.05$), and +12 (4.1 ± 2.3 %, $P < 0.05$, Figure 3D).

The correlation between the increase in Th17 and Treg cells was analyzed, resulting statically significant in percentages ($r = 0.79$; IC95% 0.67–0.87, Figure 3F) and absolute counts ($r = 0.89$; IC95% 0.83–0.93). The Th17/Treg ratio remained stable during the entire follow-up (Figure 3C).

Fingolimod Induces Early Changes in Immature B Cells but not in Memory B Cells

A trend toward increase was found in percentages of immature B cells (CD19⁺CD27⁺IgD⁺IgM⁺CD21⁺) from month +1 until month +12, being statistically significant at month +9 (baseline: 0.6 ± 0.3 vs. +9 m: 3.7 ± 3.8 %, $P < 0.05$, Figure S7).

Similarly, an increase in percentages of transitional B cells (including transitional-T1 and transitional-T2) was observed at month +3 until the end of follow-up (baseline: 7.3 ± 3.8 vs. +3 m: 24.9 ± 13.5 %, $P < 0.01$, Figure 3G). This increase was observed at month +3 in transitional-T1 (baseline: 5.2 ± 4.2 vs. +3 m: 2.6 ± 1.9 %, $P < 0.01$, Figure 3H) and at month +6 in transitional-T2 B cells (baseline: 4.8 ± 2.6 vs. +6 m: 14.8 ± 7.6 %, $P < 0.01$, Figure 3I), and remained high until the end of follow-up.

Numbers of naïve, unswitched memory, IgM memory, class-switched, and exhausted memory B cells were decreased at month +1 until month +12. In contrast, no changes were found in their percentages (Figure S7).

Table 2 Characteristics of responders and nonresponders patients

	Responders (n = 7)	Nonresponders (n = 7)	P
Naïve patients (n)	3	4	
Previous treated patients (n)	4	3	
Washout period (months)	2.25 ± 2.6	1.33 ± 1.5	0.56
ARR previous year of treatment	3	1.4	0.07
ARR in treatment	0	1.3	0.001
EDSS at baseline (mean $\pm$ SD)	2.6 ± 1.2	1.3 ± 0.7	0.04
EDSS at +12 months of treatment (mean $\pm$ SD)	2 ± 1.0	1.7 ± 0.5	0.6
MRI new lesions (mean $\pm$ SD)	1 ± 0.7	1.9 ± 1.5	0.29

ARR, annualized relapse rate.

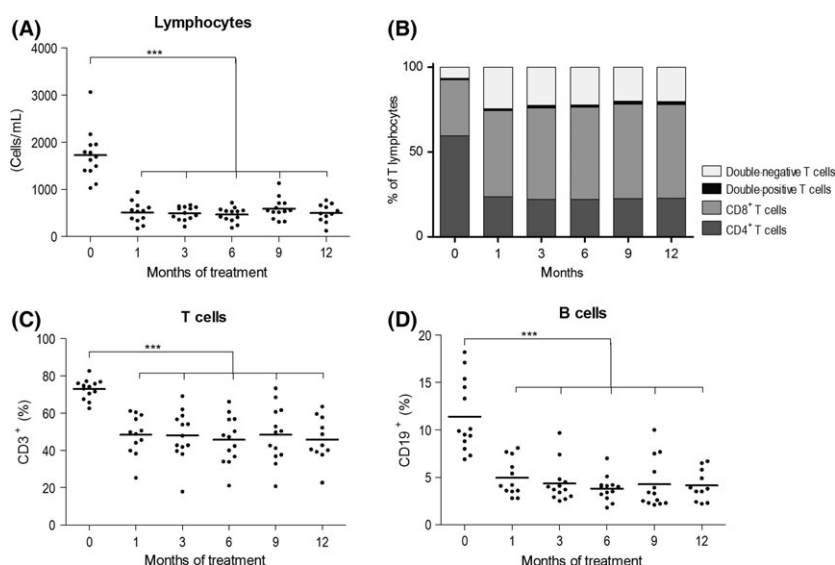


Figure 1 Changes in total lymphocyte counts, CD3⁺, CD4⁺, and CD8⁺ T-cell and B-cell subpopulations during the 12-month follow-up. Absolute counts (cells/ μ L) of total lymphocytes (A), percentages (%) of CD4⁺, CD8⁺, double-negative (CD4⁺CD8⁺) and double-positive (CD4⁺CD8⁺) T cells (B), percentages (%) CD3⁺ T cells (C) and CD19⁺ B cells (D) were measured by flow cytometry. Each dot represents the value of an individual patient. *** $P < 0.001$.

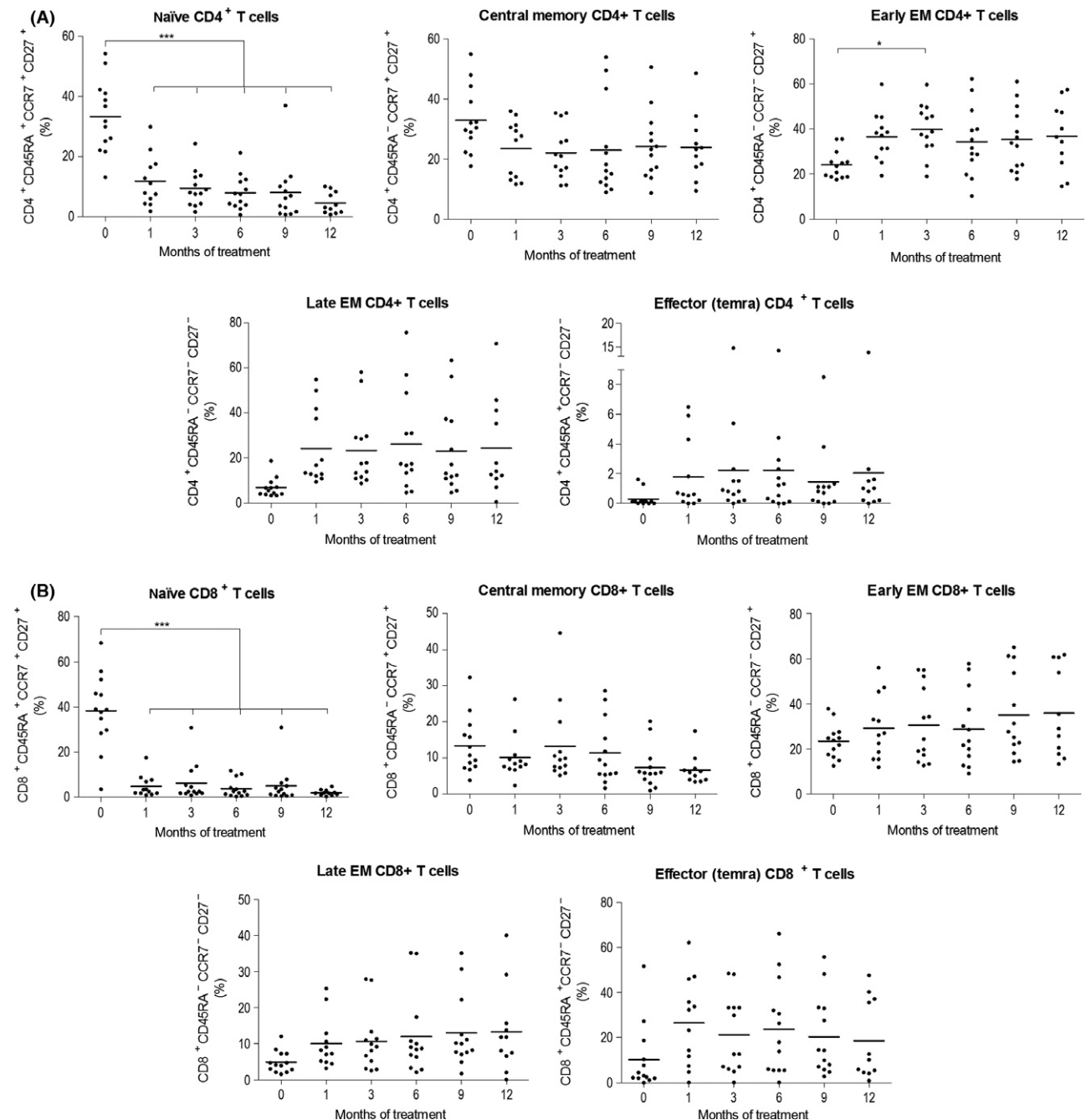


Figure 2 Changes in minor CD4 and CD8 T-cell subpopulations under fingolimod treatment. Percentages of naïve, central memory, early EM, late EM, and TEMRA CD4⁺ T cells (A) and percentages of naïve, central memory, early EM, late EM, and TEMRA CD8⁺ T cells (B) measured by flow cytometry are shown. Each dot represents the value of an individual patient. * $P < 0.05$; *** $P < 0.001$. EM, effector memory; TEMRA, terminally differentiated effector.

Patients Who are Responders and Nonresponders to Fingolimod have a Different Pattern of Peripheral Lymphocyte Subpopulations

To determine whether the distribution of lymphocyte subpopulations before starting treatment could predict clinical response to fingolimod treatment, baseline values between responders and

nonresponders were compared. To determine whether those baseline differences in minor lymphocyte subpopulations could be affected by other factors, confounders as previous treatment, age, or gender were analyzed. No differences were found between both groups (data not shown).

Interestingly, responders had a lower percentage of RTEs at baseline than nonresponders (R: 3.4 (3.1–3.6) vs. NR: 6.3 (6.1–6.5) %, $P < 0.05$, Figure 4A) and lower percentage and absolute

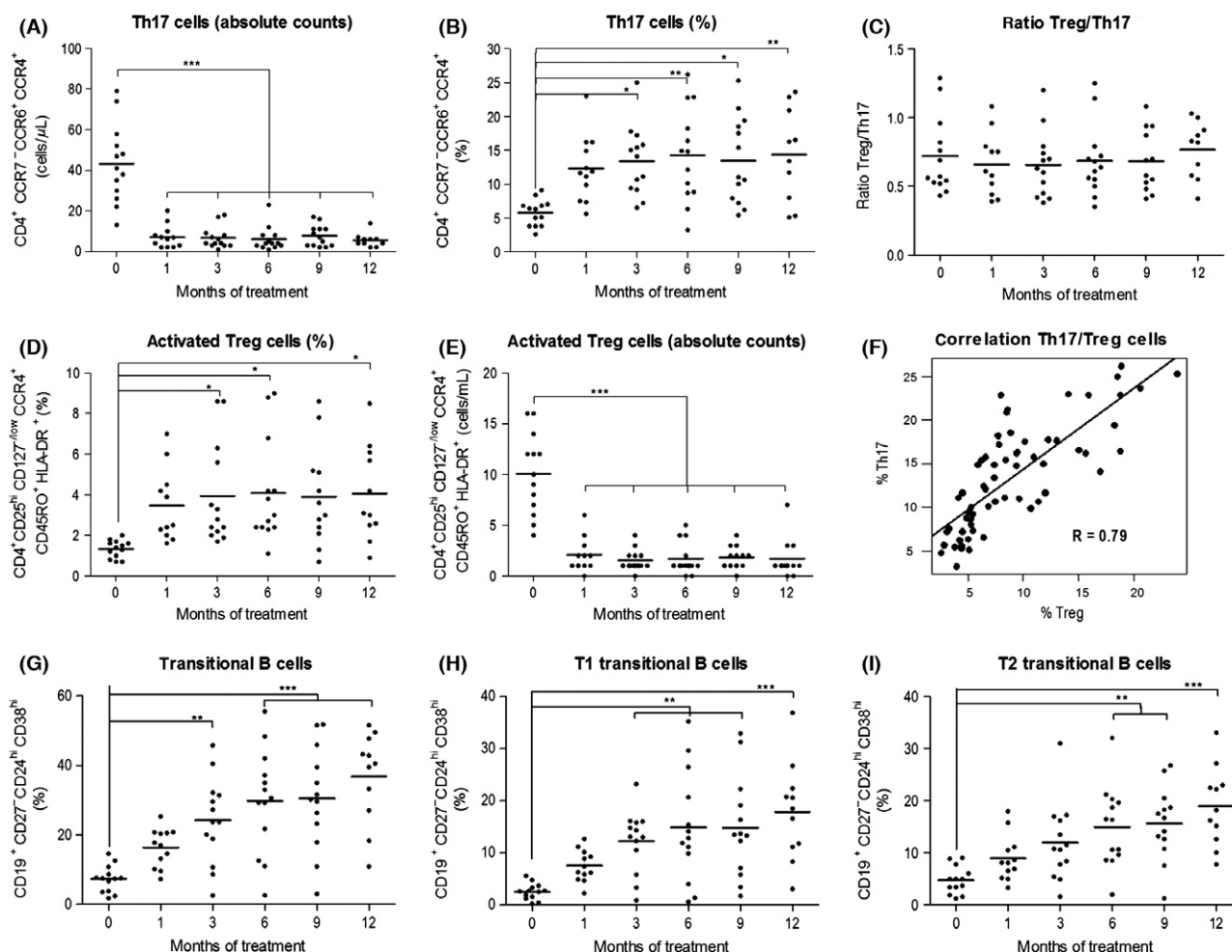


Figure 3 Changes Th17, regulatory T cells and transitional B cells under fingolimod treatment. Absolute counts (cells/ μ L) (A) and percentages (%) of Th17 cells (B) and absolute counts (cells/ μ L) (D) and percentages (%) of activated Treg cells (E) were measured by flow cytometry. Correlation (F) and ratio between percentages of Treg and Th17 cells (C) were calculated. Percentages of total transitional B cells (G), T1 (H), and T2 (I) transitional B cells were also measured by flow cytometry. Each dot represents the value of an individual patient. * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$; *** $P < 0.001$. Treg, regulatory T cells.

counts of T1 transitional B cells (R: 1.6 (0.8–2.3) versus NR: 3.0 (2.6–4.4) %, $P < 0.01$; R: 3 (2–4) versus NR: 6 (5–7) cells/ μ L, $P < 0.01$, Figure 4B,C). Moreover, responder patients had higher percentage and absolute counts of CD8⁺ T cells than nonresponders (R: 37.6 (34.1–40.0) versus NR: 28.4 (27.3–30.1) %, $P < 0.05$; R: 501 (460–588) vs. NR: 326 (264–371) cells/ μ L, $P < 0.05$, Figure 4D,E).

In addition, lymphocyte subpopulations were compared between responders and nonresponders after starting fingolimod treatment. The most relevant changes were found in late effector memory CD4⁺ T cells at month +1, where percentages and absolute counts were higher in responders than in nonresponders (R: 30.5 (14.8–47.9) vs. NR: 12.4 (11.1–15.8) %, $P < 0.05$; R: 20 (14–29) vs. NR: 4 (2–7) cells/ μ L, $P < 0.01$, Figure 4H,I) and RTEs, where percentages were lower in responders than in nonresponders (R: 2.7 (1.9–2.8) versus NR: 6.1 (4.8–6.8) %, $P < 0.05$, Figure 4F). Moreover, the postbaseline mean (mean of percentages of month 1–12) of RTEs was lower in responders than in nonresponders (R: 2.6 (2.4–2.9) vs. NR: 5.4 (4.1–6.1) %, $P < 0.05$, Fig-

ure 4G). Furthermore, the postbaseline mean of double-positive CD4⁺CD8⁺ T cells was higher in responder patients than nonresponders (R: 2.1 (1.3–2.4) vs. NR: 0.7 (0.6–1.1) %, $P < 0.05$; R: 6 (3–8) vs. NR: 1 (1–2) cells/ μ L, $P < 0.05$).

Discussion

In this study, an exhaustive flow cytometry analysis of minor peripheral lymphocyte subpopulations during a year of follow-up was performed in patients with RRMS that initiated treatment with fingolimod. A different pattern in percentages of RTEs, transitional B cells, and late effector memory CD4⁺ T cells was found according to response to fingolimod treatment.

As expected, fingolimod profoundly reduced total lymphocyte counts and affected mainly CCR7⁺ T cell subpopulations (naïve and central memory T cells) [4,5,7,16,17]. These changes were produced early (present at 1 month after starting treatment) and maintained until the end of follow-up.

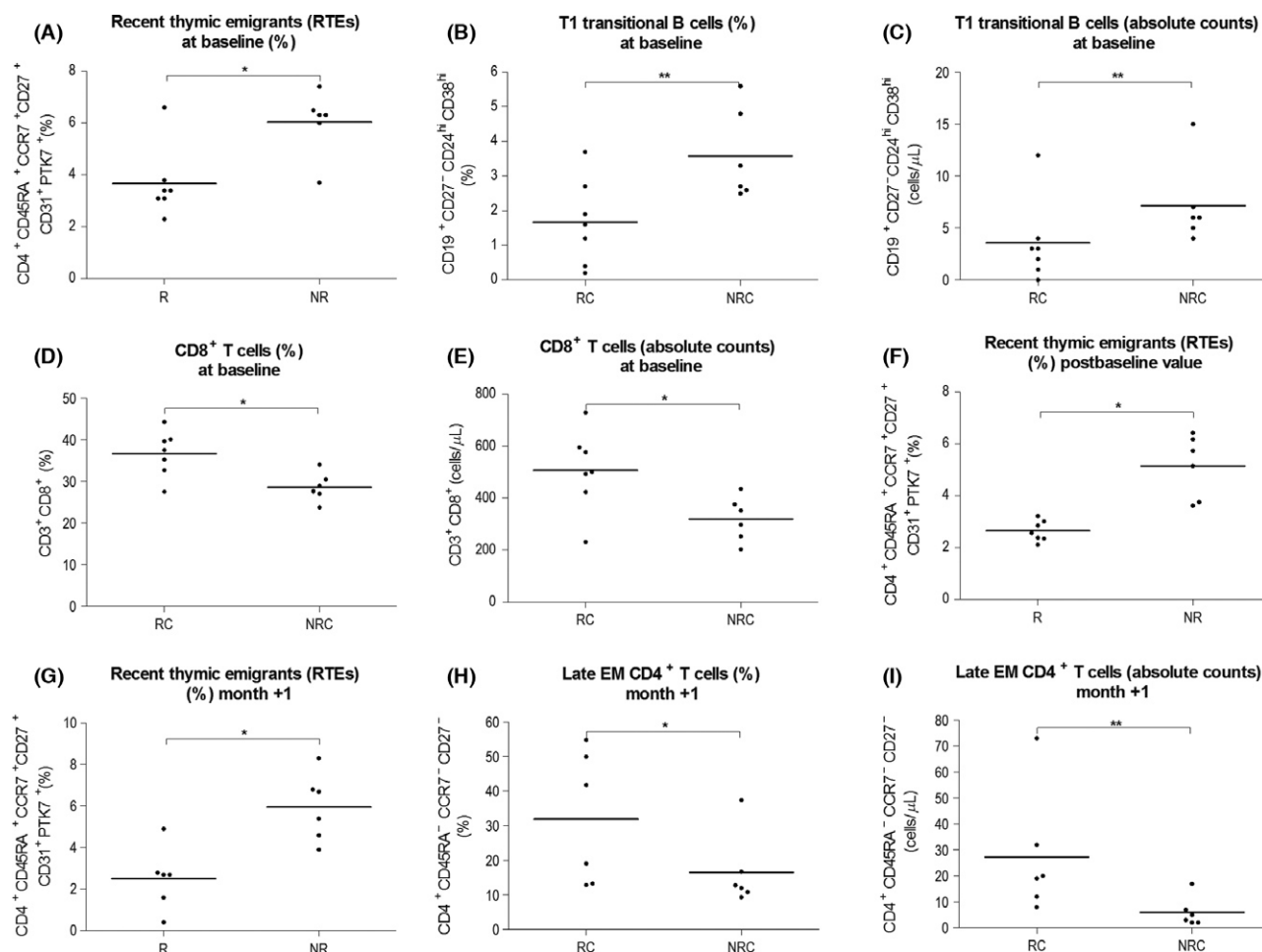


Figure 4 Responders and nonresponders patients had different lymphocyte distribution at baseline and after starting fingolimod treatment. Percentages of recent thymic emigrants (A), percentages (B), and absolute counts (C) of T1 transitional B cells and percentages (D) and absolute counts (E) of $CD8^+$ T cells at baseline. Percentages at +1 month (G) and postbaseline mean value during treatment (F) of recent thymic emigrants and percentages (H) and absolute counts (I) of late effector memory $CD4^+$ T cells at +1 month of treatment. Each dot represents the value of an individual patient. * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$. RTEs, recent thymic emigrants; R, responder patients; NR, nonresponder patients.

Previous reports regarding the effect of fingolimod on Th17 cells are contradictory [6,7,11]. This fact is probably a consequence of the diversity in surface markers used to define this T-cell subset. Specifically, CCR7—a clue marker for cells homing to lymph nodes—can differentiate effector Th17 cells ($CCR7^-$) from central memory or pre-Th17 cells ($CCR7^+$) [3,6,12]. In our study, effector Th17 cells were defined as $CD4^+ CCR7^- CCR6^+ CCR4^+$, following the international consensus of 2008 [3], but also $CCR7^+$ Th17 cells were analyzed. In absolute counts both, effector ($CCR7^-$) as well as $CCR7^+$ Th17 cells, were decreased. In contrast, when analyzing percentages of these subpopulations in relation to total $CD4^+$ lymphocytes, we observed a clear increase in the percentage of peripheral effector Th17 cells after treatment with fingolimod, whereas no changes in percentages of $CCR7^+$ Th17 subpopulations were found.

The fact that absolute counts of effector Th17 cells were decreased, together with the maintenance of the ratio effector Th17/Treg described here, suggests that the relative increase in

effector Th17 in periphery does not affect the therapeutic effect of the drug. Moreover, the increase in Treg cells at later time-points of the monitorization is in agreement with previous studies and supports the conclusion that fingolimod can exert an alternative immunomodulatory mechanism inducing the production of Treg cells, as had been postulated previously in *in vitro* and *ex vivo* models [10,11,18–20]. Interestingly, a correlation between the increase of effector Th17 and Treg cells was observed in the present study. Previous studies have shown that, under certain conditions, Th17 cells can downregulate IL-17 and upregulate IL-10 exercising an antiinflammatory effect [21]. Although the analysis of IL-10 production by Th17 cells was not analyzed in the present study, it might be hypothesized that treatment with fingolimod may promote an increase of regulatory Th17 memory cells, as it has been described for Tregs and Bregs subsets [9,10,20,22,23], although this point has to be addressed in future studies.

In contrast to T cells, B-cell subsets have not been extensively studied in patients under treatment with fingolimod. Results

reported until the moment regarding these subpopulations are scarce and in disagreement [8,9,24]. A decrease in B cells (CD19⁺) was observed in the present study, although no differences were detected in naïve or memory B-cell subsets. Interestingly, we observed an increase in immature and transitional B cells in line with recently published data [8,9], suggesting that migration of transitional B cells from bone marrow is dependent on other factors than S1P [9]. In addition to published results, we observed that the increase of immature and transitional B cells was already present at month +3 after initiation of fingolimod treatment.

As reported in another cohort of patients [25], a high number of patients (55%) suffered a relapse soon after fingolimod treatment initiation. We believe that the increased activity rather than related to the treatment is related to the fact that treatment had not yet had effect (in the case of naïve patients), or washout period of the previous treatments had been long (Table 2).

In this study, the definition of responders and nonresponders to fingolimod treatment was established after 12 months of follow-up, and the lymphocyte subpopulations analyzed consequently. In order to avoid bias, considering a patient as nonresponder in the period in which the fingolimod could not be effective, a reanalysis was performed excluding early relapses (two first months). The exclusion of these relapses did not change the results. In the same way, to determine whether those baseline differences in minor lymphocyte subpopulations could be affected by confounders as previous treatment, disease activity, age, or gender, those parameters were analyzed separately, and no differences between both groups were observed. These data support that analysis of percentages of minor lymphocyte subpopulations in peripheral blood prior and after +1 month of treatment could predict clinical response to fingolimod.

Although the number of analyzed patients is small, in this preliminary study we show that the baseline percentage of RTEs and transitional B cells was lower in responders. Therefore, if corroborated in a bigger cohort of patients, immunomonitoring of minor peripheral lymphocyte subpopulations may be a surrogate marker

for the response to fingolimod treatment, and RTEs and transitional B cells percentages could be a tool for predicting which patients with RRMS would be good candidates to receive fingolimod. Moreover, the percentage of late effector memory CD4⁺ T cells and RTEs might provide information on the response to therapy as soon as 1 month after starting this therapy.

These findings, when confirmed in a larger and independent cohort of patients, open up the opportunity to initiate a personalized therapy in RRMS treatments, enabling the clinicians to choose the best treatment for each patient and predict which patients are the most suitable for receiving a specific therapy.

Acknowledgments

This work has been supported by positive discussion through A FACTT network (Cost Action BM1305; www.afactt.eu) and ENTIRE network (BM0907; www.entire-net.eu). We thank Mr. Marco A. Fernández of the Cytometry Facility of IGTP for their continuous help and suggestions, Ms. Amanda Rus and Ms. Aroa Pardell for their technical assistance and Ms. Anna Suñol for nursing care. The authors are members of a consolidated group (2014 SGR 1365) as recognized by the Agency for Management of University and Research Grants (AGAUR) of the Generalitat of Catalonia.

Conflict of Interest

The authors declare no conflict of interest.

Declaration of Funding

This work was supported in part by grants FIS PI11/02416 and PI14/01175 (to Eva M. Martínez-Cáceres) integrated in the *Plan Nacional de I+D+I* and co-supported by the *ISCIII-Subdirección General de Evaluación* and the *Fondo Europeo de Desarrollo Regional (FEDER)*.

References

- Hla T, Brinkmann V. Sphingosine 1-phosphate (S1P): Physiology and the effects of S1P receptor modulation. *Neurology* 2011;**76**:53–58.
- Soliven B, Miron V, Chun J. The neurobiology of sphingosine 1-phosphate signaling and sphingosine 1-phosphate receptor modulators. *Neurology* 2011;**76**:S9–S14.
- Appay V, van Lier RA, Sallusto F, Roederer M. Phenotype and function of human T lymphocyte subsets: Consensus and issues. *Cytometry A* 2008;**73**:975–983.
- Henault D, Galleguillos L, Moore C, Johnson T, Bar-Or A, Antel J. Basis for fluctuations in lymphocyte counts in fingolimod-treated patients with multiple sclerosis. *Neurology* 2013;**81**:1768–1772.
- Mehling M, Brinkmann V, Burgener AV, et al. Homing frequency of human T cells inferred from peripheral blood depletion kinetics after sphingosine-1-phosphate receptor blockade. *J Allergy Clin Immunol* 2013;**131**:1440–1443. e7.
- Mehling M, Lindberg R, Raulf F, et al. Th17 central memory T cells are reduced by FTY720 in patients with multiple sclerosis. *Neurology* 2010;**75**:403–410.
- Sato DK, Nakashima I, Bar-Or A, et al. Changes in Th17 and regulatory T cells after fingolimod initiation to treat multiple sclerosis. *J Neuroimmunol* 2014;**268**:95–98.
- Chiarini M, Sottini A, Bertoli D, et al. Newly produced T and B lymphocytes and T-cell receptor repertoire diversity are reduced in peripheral blood of fingolimod-treated multiple sclerosis patients. *Mult Scler* 2014;**21**:726–734.
- Miyazaki Y, Niino M, Fukazawa T, et al. Suppressed pro-inflammatory properties of circulating B cells in patients with multiple sclerosis treated with fingolimod, based on altered proportions of B-cell subpopulations. *Clin Immunol* 2014;**151**:127–135.
- Muls N, Dang HA, Sindic CJ, van Pesh V. Fingolimod increases CD39-expressing regulatory T cells in multiple sclerosis patients. *PLoS One* 2014;**9**:e113025.
- Serpero LD, Filaci G, Parodi A, et al. Fingolimod modulates peripheral effector and regulatory T cells in MS patients. *J Neuroimmune Pharmacol* 2013;**8**:1106–1113.
- Maecker HT, McCoy JP, Nussenblatt R. Standardizing immunophenotyping for the Human Immunology Project. *Nat Rev Immunol* 2012;**12**:191–200.
- Song ZY, Yamasaki R, Kawano Y, et al. Peripheral blood T cell dynamics predict relapse in multiple sclerosis patients on fingolimod. *PLoS One* 2014;**10**:e0124923.
- Polman CH, Reingold SC, Banwell B, et al. Diagnostic criteria for multiple sclerosis: 2010 revisions to the McDonald criteria. *Ann Neurol* 2011;**69**:292–302.
- Villoslada P, Rovira A, Montalban X, et al. Effects of diazoxide in multiple sclerosis: A randomized, double-blind phase 2 clinical trial. *Neurol Neuroimmunol Neuroinflamm* 2015;**2**:e147.
- Kowarik MC, Pellkofer HL, Cepok S, et al. Differential effects of fingolimod (FTY720) on immune cells in the CSF and blood of patients with MS. *Neurology* 2011;**76**:1214–1221.
- Mehling M, Brinkmann V, Antel J, et al. FTY720 therapy exerts differential effects on T cell subsets in multiple sclerosis. *Neurology* 2008;**71**:1261–1267.
- Haas J, Schwarz A, Korporal-Kunke M, et al. Fingolimod does not impair T-cell release from the thymus and beneficially affects Treg function in patients with multiple sclerosis. *Mult Scler* 2015;**21**:1521–1532.
- Kim MG, Lee SY, Ko YS, et al. CD4⁺ CD25⁺ regulatory T cells partially mediate the beneficial effects of FTY720, a sphingosine-1-phosphate analogue, during ischaemia/reperfusion-induced acute kidney injury. *Nephrol Dial Transplant* 2011;**26**:111–124.
- Schrawat S, Rouse BT. Anti-inflammatory effects of FTY720 against viral-induced immunopathology: Role of drug-induced conversion of T cells to become Foxp3⁺ regulators. *J Immunol* 2008;**180**:7636–7647.
- Zielinski CE, Mele F, Aschenbrenner D, et al. Pathogen-induced human TH17 cells produce IFN- γ or

- IL-10 and are regulated by IL-1beta. *Nature* 2012;**484**:514–518.
22. Sun Y, Wang W, Shan B, et al. FTY720-induced conversion of conventional Foxp3⁺ CD4⁺ T cells to Foxp3⁺ regulatory T cells in NOD mice. *Am J Reprod Immunol* 2011;**66**:349–362.
23. Grutzke B, Huckle S, Gross CC, et al. Fingolimod treatment promotes regulatory phenotype and function of B cells. *Ann Clin Transl Neurol* 2015;**2**:119–130.
24. Claes N, Dhaeze T, Fraussen J, et al. Compositional changes of B and T cell subtypes during fingolimod treatment in multiple sclerosis patients: A 12-month follow-up study. *PLoS One* 2014;**9**:e111115.
25. Ferraro D, Federzoni L, Vitetta F, et al. Frequent early multiple sclerosis relapses during treatment with fingolimod: A paradoxical effect? *Mult Scler* 2013;**19**:1550.

Supporting Information

The following supplementary material is available for this article:

Figure S1. Gating strategy of flow cytometric analysis of CD4⁺ T cell subpopulations.

Figure S2. Gating strategy of flow cytometric analysis of CD8⁺ T cell subpopulations.

Figure S3. Gating strategy of flow cytometric analysis of Th17 subpopulation.

Figure S4. Gating strategy of flow cytometric analysis of Treg subpopulations.

Figure S5. Gating strategy of flow cytometric analysis of B cell subpopulations.

Figure S6. Gating strategy of flow cytometric analysis of transitional B cell subpopulations.

Figure S7. Changes in minor B cell subpopulations under fingolimod treatment.

Table S1. Lymphocyte subpopulations and phenotype analysed.

Table S2. Description of the infections during the follow-up of the RRMS patients.

Table S3. Absolute counts of analysed lymphocyte subpopulations during the 12-months follow-up.

Supplementary Table 1. Lymphocyte subpopulations and phenotype analysed

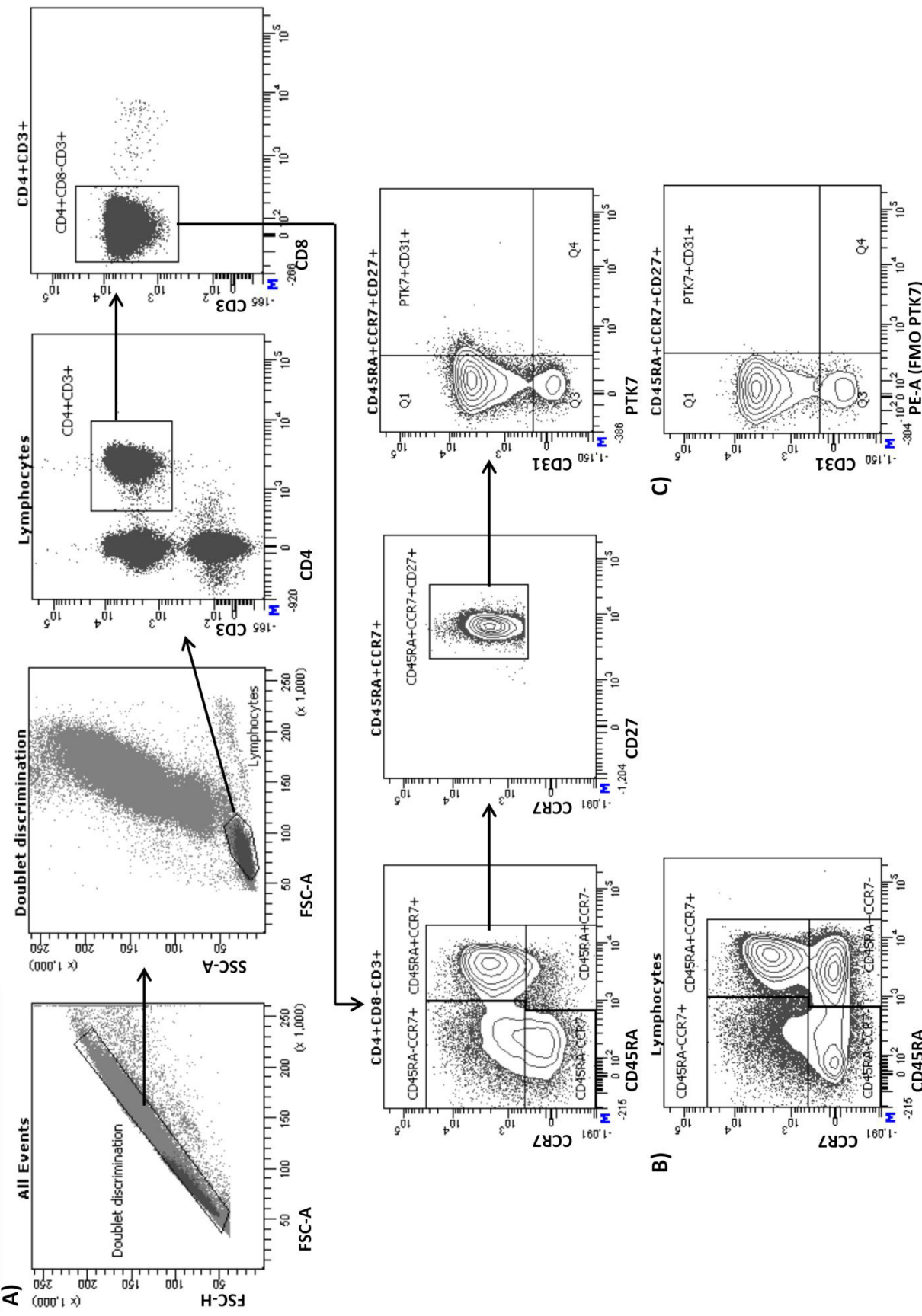
Lymphocyte subpopulation	Phenotype
T cells subsets	
Naïve	CD3+CD4+CD27+CCR7+CD45RA+ CD3+CD8+CD27+CCR7+CD45RA+
Central memory (T _{CM})	CD3+CD4+CD27+CCR7+CD45RA- CD3+CD8+CD27+CCR7+CD45RA-
Early effector memory (T _{early EM})	CD3+CD4+CD27+CCR7-CD45RA- CD3+CD8+CD27+CCR7-CD45RA-
Late effector memory (T _{late EM})	CD3+CD4+CD27-CCR7-CD45RA- CD3+CD8+CD27-CCR7-CD45RA-
Terminally differentiated effector cells (T _{EMRA})	CD3+CD4+CD27-CCR7-CD45RA+ CD3+CD8+CD27-CCR7-CD45RA+
Recent thymic emigrants (RTEs)	CD3+CD4+CD27+CCR7+CD45RA+CD31+PTK7+
Double Positive T lymphocytes (DPs)	CD3+CD4+CD8+
Th17	CD4+CCR7-CCR4+CCR6+
T regs	CD4+CD127 ^{low} CD25+CCR4+CD45RO+HLADR+
B cells subsets	
Naïve	CD19+CD27-IgD+IgM+
Unswitched memory	CD19+CD27+IgD+IgM+
IgM memory	CD19+CD27+IgD+IgM-
Switched memory	CD19+CD27+IgD-IgM-
Exhausted memory	CD19+CD27-IgD-IgM-
Immature B cells	CD19+CD27-IgD+IgM+CD21-
Transitional B cells	CD19+CD24 ^{hi} CD38 ^{hi} CD27-
T1 Transitional B cells	CD19+CD24 ^{hihi} CD38 ^{hihi} CD27-
T2 Transitional B cells	CD19+CD24 ^{hi} CD38 ^{hi} CD27-

Supplementary Table 2. Description of the infections during the follow-up of the patients

ID Patient	Infection type	Time of infection (months after starting treatment)	Severity	Treatment required
2	Upper respiratory tract infection	1	Mild	No
	Urinary infection	5	Mild	Yes (oral antibiotic)
3	Tonsillitis	3	Mild	Yes (oral antibiotic)
	Conjunctivitis	4	Mild	No
	Flu	6	Mild	No
5	Tonsillitis	2	Mild	Yes (oral antibiotic)
8	Herpes Simplex	1	Mild	Yes (aciclovir)
	Otitis	4	Mild	Yes (oral antibiotic)
	Tonsillitis	5	Mild	Yes (oral antibiotic)
	Tonsillitis	6	Mild	Yes (oral antibiotic)
	Gastroenteritis	7	Mild	Yes (oral antibiotic)
10	Urinary infection	3	Moderate	Yes (intravenous antibiotic)
13	Gastroenteritis	6	Mild	Yes (oral antibiotic)
	Flu	12	Mild	No
14	Upper respiratory tract infection	1	Mild	No

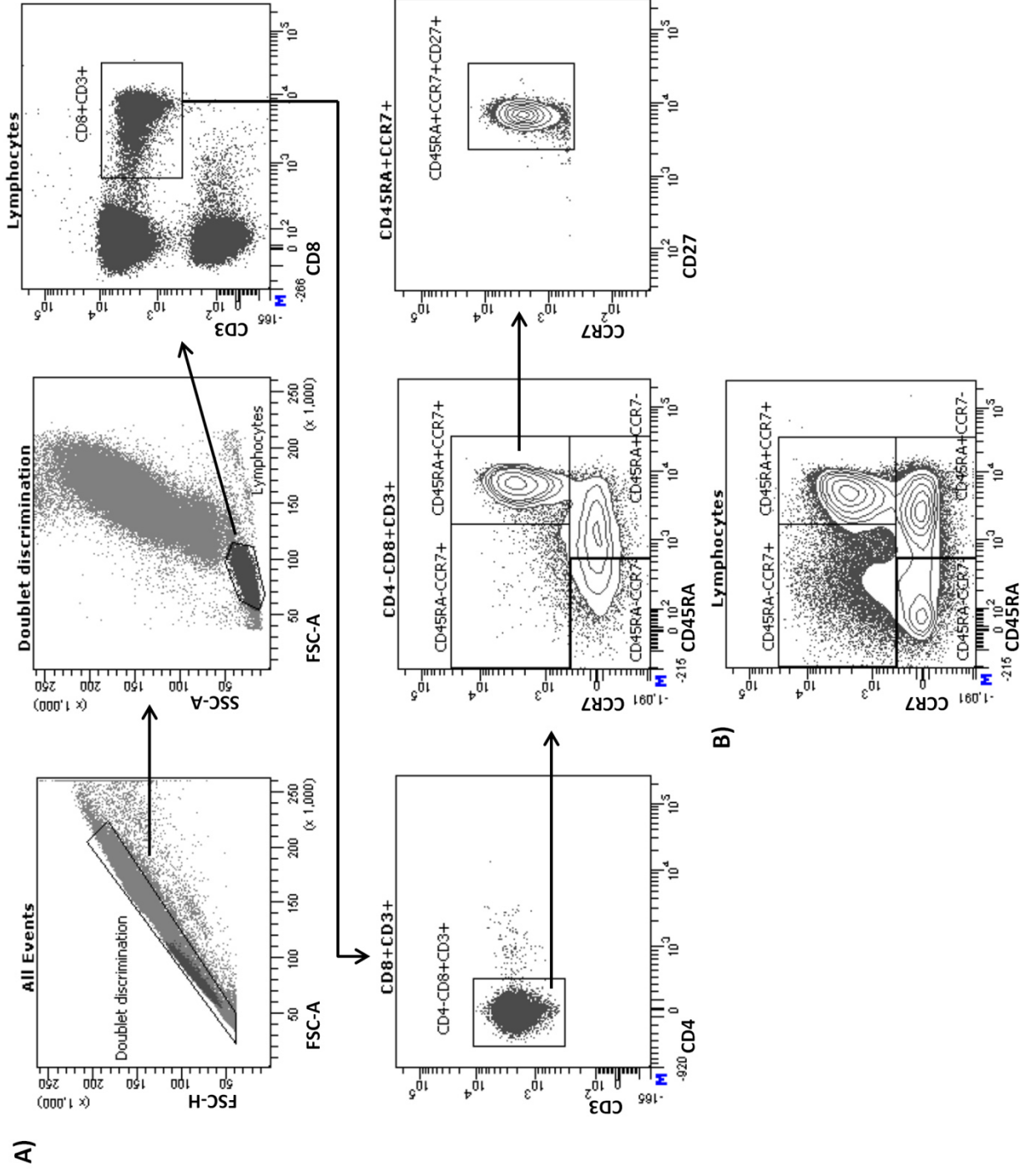
Supplementary Table 3. Absolute counts of analysed lymphocyte subpopulations during the 12-months follow-up

	Baseline (cells/ μ l)	+1m of treatment (cells/ μ l)	+3m of treatment (cells/ μ l)	+6m of treatment (cells/ μ l)	+9m of treatment (cells/ μ l)	+12m of treatment (cells/ μ l)
Total lymphocytes	1728 $\pm$ 520	512 $\pm$ 224	495 $\pm$ 143	465 $\pm$ 152	592 $\pm$ 225	499 $\pm$ 191
CD3+ lymphocytes	1254 $\pm$ 349	258 $\pm$ 146	242 $\pm$ 99	221 $\pm$ 107	297 $\pm$ 163	234 $\pm$ 102
CD4+ lymphocytes	740 $\pm$ 192	62 $\pm$ 50	53 $\pm$ 35	50 $\pm$ 45	68 $\pm$ 58	49 $\pm$ 37
CD4 naïve	246 $\pm$ 112	7 $\pm$ 6	5 $\pm$ 4	4 $\pm$ 6	9 $\pm$ 22	2 $\pm$ 3
CD4 central memory	250 $\pm$ 116	15 $\pm$ 13	11 $\pm$ 10	13 $\pm$ 20	17 $\pm$ 19	10 $\pm$ 7
CD4 early EM	176 $\pm$ 57	21 $\pm$ 13	20 $\pm$ 15	14 $\pm$ 11	20 $\pm$ 13	17 $\pm$ 16
CD4 late EM	48 $\pm$ 28	17 $\pm$ 20	14 $\pm$ 15	14 $\pm$ 21	15 $\pm$ 18	13 $\pm$ 15
CD4 TEMRA	2 $\pm$ 4	2 $\pm$ 4	1 $\pm$ 3	1 $\pm$ 2	1 $\pm$ 3	1 $\pm$ 2
Recent Thymic Emigrants	11 $\pm$ 5	0.08 $\pm$ 0.29	0 $\pm$ 0	0.08 $\pm$ 0.28	1 $\pm$ 2	0 $\pm$ 0
Th17	43 $\pm$ 19	7 $\pm$ 6	7 $\pm$ 5	6 $\pm$ 6	8 $\pm$ 5	6 $\pm$ 3
Treg	28 $\pm$ 10	5 $\pm$ 4	4 $\pm$ 2	4 $\pm$ 3	5 $\pm$ 3	4 $\pm$ 4
activated Treg	10 $\pm$ 4	2 $\pm$ 2	2 $\pm$ 1	2 $\pm$ 2	2 $\pm$ 1	2 $\pm$ 2
CD8+ lymphocytes	421 $\pm$ 157	137 $\pm$ 96	135 $\pm$ 71	126 $\pm$ 80	171 $\pm$ 109	136 $\pm$ 83
CD8 naïve	157 $\pm$ 94	5 $\pm$ 6	10 $\pm$ 20	4 $\pm$ 4	11 $\pm$ 28	2 $\pm$ 1
CD8 central memory	58 $\pm$ 56	13 $\pm$ 10	17 $\pm$ 13	13 $\pm$ 11	11 $\pm$ 8	7 $\pm$ 4
CD8 early EM	96 $\pm$ 38	34 $\pm$ 18	37 $\pm$ 20	29 $\pm$ 16	50 $\pm$ 27	40 $\pm$ 23
CD8 late EM	21 $\pm$ 13	14 $\pm$ 10	15 $\pm$ 16	16 $\pm$ 19	21 $\pm$ 19	19 $\pm$ 22
CD8 TEMRA	50 $\pm$ 84	49 $\pm$ 67	35 $\pm$ 39	42 $\pm$ 54	46 $\pm$ 63	32 $\pm$ 39
CD4+CD8+ (DPs)	10 $\pm$ 7	3 $\pm$ 2	3 $\pm$ 3	3 $\pm$ 3	5 $\pm$ 5	4 $\pm$ 5
CD4-CD8- (DNs)	82 $\pm$ 62	57 $\pm$ 44	51 $\pm$ 40	42 $\pm$ 27	53 $\pm$ 43	45 $\pm$ 33
CD19+ cells	199 $\pm$ 94	25 $\pm$ 19	19 $\pm$ 6	18 $\pm$ 6	26 $\pm$ 21	19 $\pm$ 8
Transitional B cells	15 $\pm$ 10	4 $\pm$ 2	5 $\pm$ 4	5 $\pm$ 3	7 $\pm$ 5	7 $\pm$ 4
T1 Transitional B cells	5 $\pm$ 4	2 $\pm$ 1	3 $\pm$ 2	2 $\pm$ 2	4 $\pm$ 3	3 $\pm$ 2
T2 Transitional B cells	10 $\pm$ 6	2 $\pm$ 2	2 $\pm$ 2	3 $\pm$ 2	4 $\pm$ 3	4 $\pm$ 2
Naïve B cells	123 $\pm$ 66	15 $\pm$ 12	12 $\pm$ 6	12 $\pm$ 6	21 $\pm$ 19	15 $\pm$ 7
Unswitched memory B cells	28 $\pm$ 25	4 $\pm$ 6	2 $\pm$ 4	2 $\pm$ 5	1 $\pm$ 1	1 $\pm$ 1
IgM memory B cells	6 $\pm$ 7	0.36 $\pm$ 1	0.09 $\pm$ 0.3	0.08 $\pm$ 0.28	0 $\pm$ 0	0.1 $\pm$ 0.32
Switched memory B cells	32 $\pm$ 30	3 $\pm$ 4	2 $\pm$ 1	2 $\pm$ 2	2 $\pm$ 2	2 $\pm$ 2
Exhausted memory B cells	9 $\pm$ 5	3 $\pm$ 3	2 $\pm$ 1	2 $\pm$ 1	2 $\pm$ 1	2 $\pm$ 2



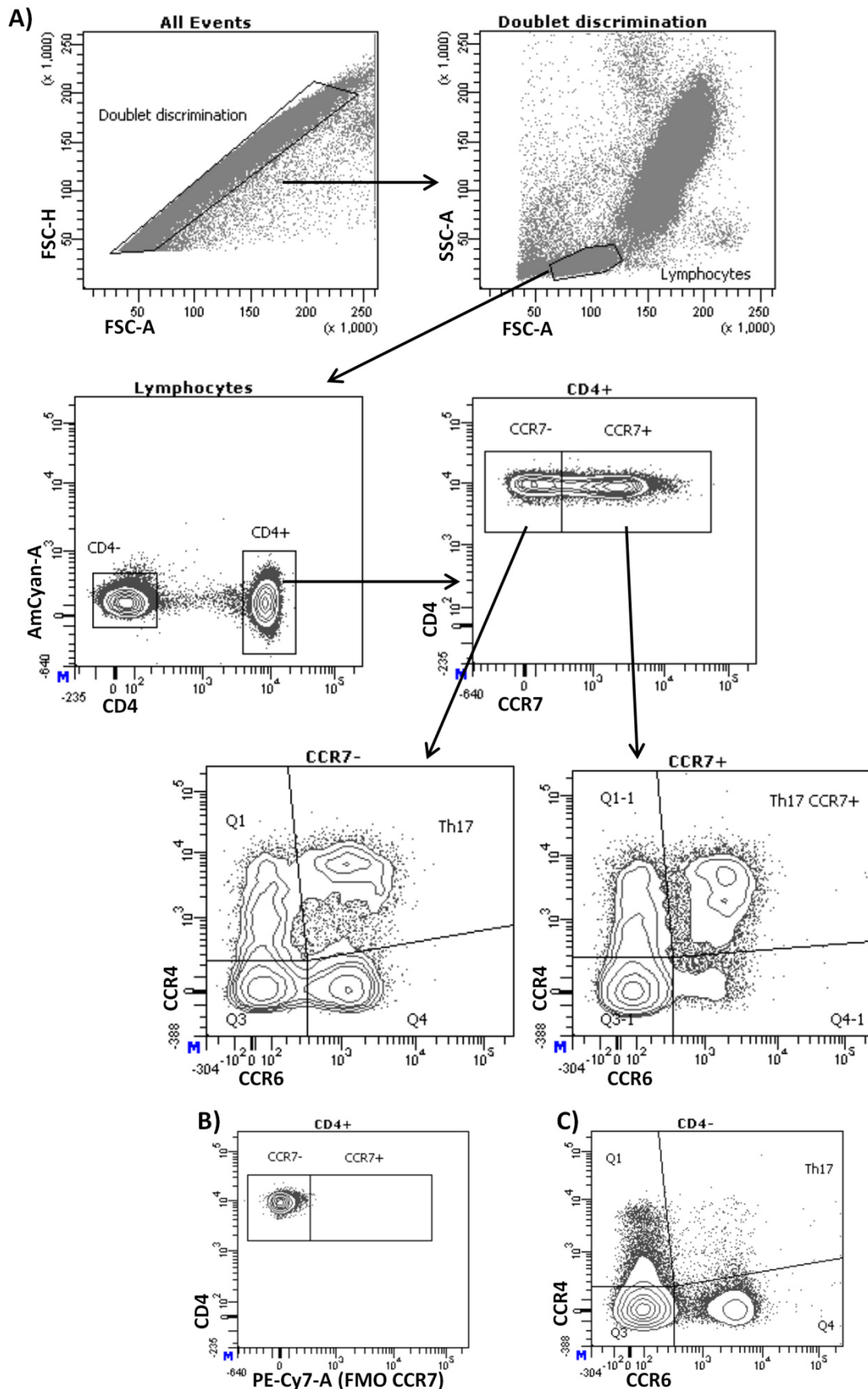
Supplementary Figure 1. Gating strategy of flow cytometric analysis of CD4⁺ T cell subpopulations.

A) A representative analysis of RTES (CD3⁺CD4⁺CD45RA⁺CCR7⁺CD27⁺CD31⁺PTK7⁺), naïve (CD3⁺CD4⁺CD45RA⁺CCR7⁺CD27⁺), CM (CD3⁺CD4⁺CD45RA⁺CCR7⁺CD27⁺), early EM (CD3⁺CD4⁺CD45RA⁺CCR7⁺CD27⁺), late EM (CD3⁺CD4⁺CD45RA⁺CCR7⁺CD27⁺), TEMRA (CD3⁺CD4⁺CD45RA⁺CCR7⁺CD27⁺) in CD4⁺ T cells is shown. B) Lymphocyte subpopulation was used as a reference in gating CCR7 vs CD45RA dot plot. C) PTK7⁺CD31⁺ gating was based on FMO control for PTK7. CM= central memory; EM=effector memory; TEMRA=terminally differentiated effector.



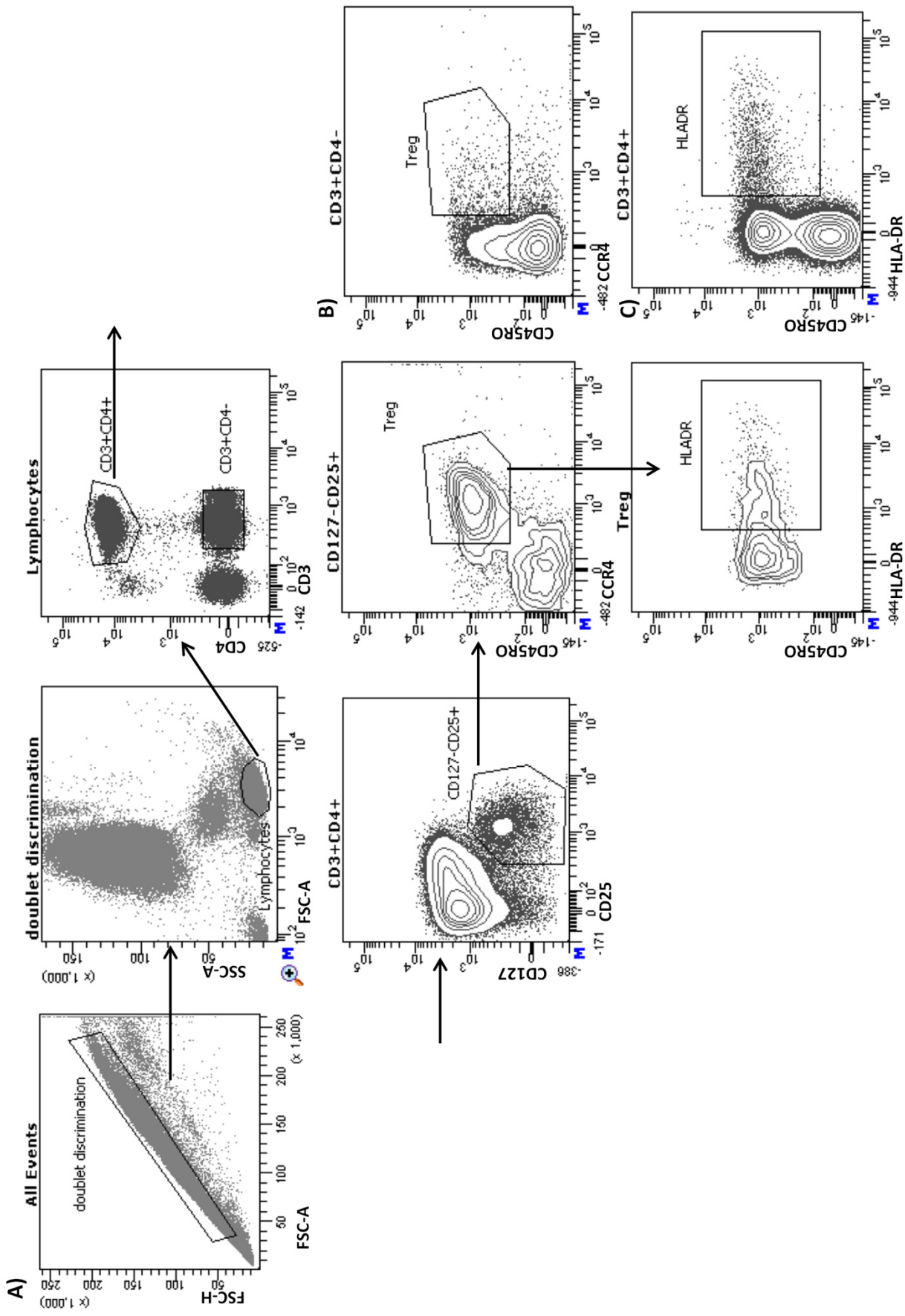
Supplementary Figure 2. Gating strategy of flow cytometric analysis of CD8⁺ T cell subpopulations.

A) A representative analysis of naïve (CD3⁺CD8⁺CD45RA⁺CCR7⁺CD27⁺), CM (CD3⁺CD8⁺CD45RA⁺CCR7⁺CD27⁺), early EM (CD3⁺CD8⁺CD45RA⁺CCR7⁺CD27⁺), late EM (CD3⁺CD8⁺CD45RA⁺CCR7⁺CD27⁺), TEMRA (CD3⁺CD8⁺CD45RA⁺CCR7⁺CD27⁺), TEMRA (CD3⁺CD8⁺CD45RA⁺CCR7⁺CD27⁺) in CD8⁺T cells is shown. B) Lymphocyte subpopulation was used as a reference in gating CCR7 vs CD45RA dot plot.



Supplementary Figure 3. Gating strategy of flow cytometric analysis of Th17 subpopulation.

A) A representative analysis of effector Th17 (CD4⁺CCR7⁻CCR6⁺CCR4⁺) and CCR7⁺ Th17 (CD4⁺CCR7⁺CCR6⁺CCR4⁺) in CD4⁺ T cells is shown. B) CCR7 expression was based on FMO control in CD4 vs CCR7 dot plot. C) CD4⁻ subpopulation was used as a reference in gating CCR4 vs CCR6 dot plot.



Supplementary Figure 4. Gating strategy of flow cytometric analysis of Treg subpopulations.

A) A representative analysis of Tregs ($CD4^+CD127^{low}CD25^+CCR4^+CD45RO^+$) and activated Tregs ($CD4^+CD127^{low}CD25^+CCR4^+CD45RO^+HLADR^+$) cells is shown. B) $CD3^+CD4^-$ subpopulation was used as a reference in gating $CD45RO$ vs $CCR4$ dot plot. C) $CD3^+CD4^+$ subpopulation was used as a reference in gating $CD45RO$ vs $HLA-DR$ dot plot.

7. DISCUSSIÓ GENERAL

Poder identificar els diferents immunofenotips per a cada pacient amb una malaltia immunomediada i poder definir quina és la millor diana terapèutica dins del gran ventall que existeixen actualment, és un dels objectius més rellevants en el món de la immunologia clínica actual. El desenvolupament que s'ha produït en el camp de la citometria de flux ho està fent possible.

En aquest treball s'ha realitzat l'estudi fenotípic multiparamètric per citometria de flux d'un ampli panell de subpoblacions limfocitàries minoritàries en sang perifèrica, de controls sans i pacients amb dues malalties autoimmunitàries organoespecífiques, amb tres finalitats concretes:

- Veure si els pacients presenten diferències en comparació amb donants sans.
- Analitzar si en els pacients en tractament amb teràpies immunomoduladores es poden detectar canvis provocats pels diferents fàrmacs.
- Ser capaços de diferenciar en un estudi longitudinal de pacients en tractament aquells que tindran una bona resposta al tractament dels que no.

En la patogènia de la malaltia de Graves-Basedow els autoanticossos activen el receptor de la TSH produint-se un increment de la síntesi d'hormones tiroidees. Però a més, hi tenen un paper molt important els limfòcits T que infiltren la glàndula tiroidea on participen en la resposta autoimmunitària. La recerca de biomarcadors en sang perifèrica en la malaltia de Graves-Basedow s'ha quedat bàsicament circumscrita en la determinació d'autoanticossos i

nivells d'hormones. No hi ha treballs en els que s'estudiïn de manera detallada marcadors pronòstics de la malaltia ni de resposta al tractament, i no se sap perquè uns pacients responen als tractaments i d'altres no. Pel que fa als estudis de subpoblacions limfocitàries, pràcticament tots els treballs que existeixen s'han realitzat en PBMCs aïllades o intratiroidals i moltes vegades amb una estimulació in vitro prèvia.^{108, 113, 117-118, 221} De fet, segons el nostre coneixement, no existeixen estudis en què es faci un anàlisi multiparamètric, en sang perifèrica, en un grup clínicament ben definit de pacients i amb un tamany mostral adequat.

El nostre treball mostra que és possible detectar diferències en les subpoblacions limfocitàries minoritàries en pacients amb malaltia de Graves-Basedow en comparació amb donants sans. En el primer dels articles que formen part d'aquest treball s'ha realitzat una caracterització fenotípica de subpoblacions limfocitàries de pacients amb malaltia de Graves clínicament estables en els que es manté la presència anti-receptor de la TSH (autoanticossos patogènics). Els resultats obtinguts, ens ha permès veure que aquest grup de pacients una disminució de limfòcits T reguladors i limfòcits T CD8+ memòria en comparació amb els controls sans, les quals no s'observen en els pacients en què els autoanticossos han negativitzat.

Per tant, és important realitzar estudis fenotípics que permetin avaluar les subpoblacions minoritàries en sang total, amb grups clínicament ben estratificats, amb un tamany mostral adequat, multiparamètrics, en què es valori les diferents subpoblacions de manera paral·lela per a poder veure de manera global com es troben distribuïdes les diferents subpoblacions minoritàries i la seva relació amb la clínica i la resposta al tractament. De ser així, poder identificar ja en el moment del diagnòstic aquells pacients que probablement tindran un curs més actiu de la malaltia, pot ser de gran ajuda

en la pràctica clínica de cara a enfocar l'estratègia a seguir i poder evitar complicacions tardanes i moltes vegades irreversibles.

Durant el desenvolupament d'aquest treball s'han estudiat també 3 pacients amb malaltia de Graves en el moment del debut. Poder ampliar en un futur aquest grup de malalts, en detectar poder veure si aquestes diferències en les subpoblacions limfocitàries es troben ja en el moment del debut de la malaltia.

Els resultats obtinguts plantegen la necessitat d'estudiar amb més profunditat la malaltia de Graves-Basedow, caracteritzar millor immunològicament als pacients i així poder-los estratificar millor.

L'EM és una malaltia autoimmunitària mediada per limfòcits T autoreactius contra la mielina, produint-se infiltrats perivenulars en el SNC que causen inflamació, desmielinització i degeneració axonal. En el segon article que forma part d'aquest treball, hem pogut veure que els pacients amb EM sense tractament presenten alteracions a nivells de les subpoblacions limfocitàries minoritàries en sang perifèrica, i que aquestes són diferents en els pacients que tenen un curs remitent-recurrent d'aquells amb formes progressives. A més, s'ha vist que els pacients amb en tractament amb fàrmacs immunomoduladors, com són interferó- β i natalizumab, presenten canvis en les subpoblacions limfocitàries, com a conseqüència dels diferents mecanismes d'acció d'aquestes teràpies.

L'avantatge de les subpoblacions limfocitàries com a biomarcadors per a l'EM respecte a molts dels marcadors o potencials biomarcadors descrits fins a l'actualitat és que es realitza en sang perifèrica. L'estudi del teixit diana en aquest cas és inabordable ja que implicaria fer una biòpsia cerebral. El LCR és

una font que ens dóna molta informació en l'EM, però que s'obté per un procediment invasiu i de vegades amb efectes adversos per als pacients. Això fa que en la pràctica clínica s'intenti realitzar el menor nombre d'extraccions de LCR possibles, i per tant no és una bona font de biomarcadors, sobretot de resposta al tractament (ja que això implicaria fer puncions lumbars de manera repetida al pacient). Tot això fa de les subpoblacions limfocitàries en sang perifèrica òptims biomarcadors, sobretot de resposta, tant al tractament com de predicció d'efectes adversos.

En aquest sentit, l'últim article d'aquest treball ens ha permès estudiar la dinàmica dels canvis produïts pel tractament amb fingolimod, des del inici del tractament fins a l'any de seguiment. El resultat més rellevant d'aquest treball, tal i com es detalla en el capítol 3, és que l'estudi per citometria de flux de les subpoblacions limfocitàries minoritàries en sang perifèrica permet diferenciar en el moment basal (abans d'iniciar el tractament) aquells pacients que tindran millor resposta al tractament d'aquells que no.

Aquest fet, en el context actual en què cada vegada existeixen més teràpies disponibles per al tractament de l'EM i del fet que tracta d'una malaltia molt heterogènia, que inclou pacients amb diferents fenotips clínics i amb patrons d'evolució de la malaltia molt diferents, ens podria portar a poder realitzar un "immunotipatge" de cada pacient que identifiqués per a quin tractament és el candidat més adequat. Aquest avanç ens obriria les portes a una medicina personalitzada per a l'EM.

L'estandardització del immunomonitoratge amb citometria de flux

La immunomonitorització dels diversos grups de pacients així com dels tractaments cada vegada està guanyant més importància. De fet diferents

grups treballen no tan sols en la immunomonitorització de teràpies biològiques, sinó també en teràpies cel·lulars i en altres situacions patològiques com és el seguiment de la immunosupressió postrasplantament. Tot i els avenços que hi ha hagut en els últims anys en la creació de diferents grups de treball,^{26, 37-38, 44} per a la implementació de la immunomonitorització per citometria de flux en la pràctica clínica, la realitat és que encara no està ben estandarditzat. És molt important poder establir un consens clar d'aquelles subpoblacions a estudiar, amb quins marcadors fenotípics caracteritzar-les, en quin tipus de mostra realitzar l'estudi i que l'anàlisi es pugui realitzar en la majoria d'equips disponibles al mercat i que no depengui exclusivament d'una casa comercial.

En aquest sentit, totes les iniciatives que tenen com a objectiu l'estandardització del procés, realitzen l'estudi en sang total, excepte el HIPC que utilitzen PBMCs congelades. De fet, aquest és el gran inconvenient del projecte HIPC. En els resultats que han publicat recentment⁴¹ no han pogut valorar les subpoblacions Th1, Th2 i Th17, que les caracteritzen mitjançant l'expressió en superfície dels receptors de quimiocines CXCR3 i CCR6, ja que es veu altament afectada tant pels processos de separació per gradient de densitat (per a la obtenció de PBMCs) com per la congelació i descongelació. Per contra, la utilització de PBMCs congelades presenta una gran avantatge en els estudis longitudinals, i és que es poden realitzar totes les tincions dels diferents temps i pacients a la vegada disminuint així la variabilitat entre mostres. Però només es podrà fer en el cas que s'analitzin marcadors que no s'alterin en els processos de congelació i descongelació.

El desavantatge més important de la citometria de flux és la gran variabilitat que hi pot haver entre operadors i entre laboratoris. Per a això s'han de dissenyar els estudis minimitzant al màxim aquests punts:

- És indispensable treballar sempre amb un citòmetre en condicions òptimes, calibrat i amb controls de qualitat diaris.
- Poder utilitzar anticossos monoclonals liofilitzats disminueix la variabilitat, però té els inconvenients de que és més car, limitat a haver de realitzar el panell ja dissenyat prèviament, i restringeix a treballar amb una sola casa comercial.
- El panell que s'utilitzi per a definir un biomarcador ha de ser una combinació d'anticossos monoclonals adaptable a qualsevol dels citòmetres de flux que existeixen en el mercat, de manera que es pugui implementar a la majoria de laboratoris i no quedi restringit a laboratoris especialitzats.
- L'anàlisi ha de ser el màxim automatitzat possible. Fins que no existeixin programes d'anàlisi automatitzat fàcils d'utilitzar i aplicar en un laboratori assistencial, han d'estar molt ben establerts els criteris de positivitat per a cadascuna de les subpoblacions evitant al màxim la subjectivitat entre operadors. En aquest sentit, un dels punts per resoldre de les iniciatives internacionals actuals per a l'estandardització és poder realitzar l'anàlisi automatitzat i en cas de que no hagi sigut possible realitzar-lo, s'ha realitzat un anàlisi centralitzat, en el qual s'ha mostrat l'estratègia d'anàlisi realitzada però en cap d'ells s'ha discutit quins són els millors controls de positivitat per a cadascuna de les subpoblacions utilitzades.

En quant als marcadors utilitzats per als diferents consorcis que s'ha format per a definir les subpoblacions leucocitàries, The ONE study,³⁸ que ha dissenyat un panell per al seguiment de pacients transplantats renals, i HIPC/ENTIRE,^{26, 37} que té com a objectiu l'estudi de malalties immunomediades tan immunodeficiències primàries com malalties autoimmunitàries, utilitzen

marcadors molt similar. The ONE Study fa un anàlisi molt exhaustiu, incloent més marcadors com són el CD57, CD27 i CD28 en els limfòcits T i IgM i CD21 als limfòcits B. A més és l'únic que inclou un panell per a analitzar el TCR $\alpha\beta$ i TCR $\gamma\delta$. Pel contrari no inclou les subpoblacions de les cèl·lules NK ni les subpoblacions funcionals dels limfòcits T CD4⁺ (Th1, Th2 i Th17) que sí que s'estudien en HIPC/ENTIRE. Cal destacar que l'únic que inclou en el seu protocol un rentat de la sang total per a eliminar la IgD i IgM del plasma en l'anàlisi de subpoblacions B és The ONE study. Els panells utilitzats a The ONE Study i ENTIRE tenen el gran inconvenient que estan dissenyats per a un citòmetre en concret, el Navios de Beckman Coulter i LSRFortessa de Beckton Dickinson, respectivament.

L'estudi de *The Milieu interieu*⁴³⁻⁴⁵ forma part d'un estudi molt més ampli, no només de subpoblacions limfocitàries, que aportarà molta informació de l'immunotip normal. Però els marcadors que utilitzen (a excepció dels marcadors de limfòcits T) no estan basats en els suggerits com a consens en els darrers anys, i això farà difícil poder extrapolar els seus resultats als de la resta d'iniciatives.

Tenint en compte tots aquests aspectes i els panells definits pels consorcis internacionals, en aquest treball s'ha dissenyat un panell per citometria de flux en sang total i amb els marcadors més específics de subpoblacions limfocitàries T i B, que ha permès poder identificar aquelles subpoblacions limfocitàries candidates a ser possibles biomarcadors amb el principal objectiu que sigui d'utilitat i aplicable en la pràctica clínica, en el seguiment de malalties immunomediades.

Per això en el disseny del panell s'ha prioritzat que es pugui realitzar en un citòmetre de flux de 8 paràmetres, fàcilment aplicable a la majoria de laboratoris.

S'ha considerat també molt important poder-ho realitzar en sang total i utilitzant marcatge de superfície, ja que hi ha una menor manipulació de la mostra (i com a conseqüència una menor alteració de l'expressió dels marcadors de superfície), és més ràpid, més senzill i per tant, més fàcil d'aplicar-lo en la pràctica clínica.

Per aquest motiu, a l'hora d'escollir els marcadors a utilitzar, per a caracteritzar els limfòcits T reguladors en hem basat en el panell de ENTIRE. És un marcatge de superfície, i a més, en la comparativa realitzada en el nostre laboratori es va veure que concordava molt bé amb la tinció intracel·lular de Foxp3.

En quant a les subpoblacions minoritàries de limfòcits T hem inclòs CD45RA, CCR7 i CD27 seguint el consens proposat per Appay et al ³⁶, i que han seguit, en part, tant en el ENTIRE com a The ONE Study . Aquest punt és important, ja que ha permès diferenciar millor les subpobacions de limfòcits T memòria efectora i hem vist que en la majoria de grups de pacients que hem estudiat hi ha variacions en les subpoblacions de limfòcits T CD4⁺ o CD8⁺ memòria efectora CD27⁺ o CD27⁻. Això indicaria que probablement la resposta que estan exercint o la funcionalitat d'aquestes subpoblacions és diferent en cada tipus de resposta immunitària, com passa amb els diferents patrons de subpoblacions que responen a les infeccions per virus. ^{36, 62} A més, com que volíem valorar també si els mecanismes de tolerància central es trobaven alterats, vam analitzar addicionalment el CD31 i PTK7, marcadors de superfície per als RTEs, ⁵⁸ que no han estat utilitzats per cap dels consorcis.

Pels que fa als limfòcits B ens hem centrat en els marcadors utilitzats per The ONE Study, que inclouen IgM i CD21, tot i que l'hem adaptat a un citòmetre de 8 paràmetres i s'ha dividit en dos panells, i hem aplicat també un protocol de rentat de la sang previ a la tinció per tal d'eliminar les immunoglobulines lliures.

A més, en aquest treball hem establert una estratègia d'anàlisi molt ben definida, utilitzant controls de positivitat per a tots aquells marcadors en què el criteri de positivitat podia no ser clar. Sempre que ha sigut possible hem utilitzat com a controls subpoblacions de referència, ja que es tracta d'un control intern dins del mateix panell i permet haver de tecnicar un menor nombre de tubs, és més ràpid i més funcional de cara a la seva translació en la pràctica clínica. Això fa que en un moment donat aquest panell pugui ser analitzat per a diferents operadors (tant en estudis multicèntrics, com en la rutina assistencial del laboratori) però que tinguin els mateixos criteris per a l'anàlisi.

Per tant, a l'hora de dissenyar aquesta estratègia, ho hem fet amb l'objectiu de poder-ho aplicar també a d'altres malalties autoimmunitàries, com pot ser el cas de l'artritis reumatoide o la psoriasis. Per al tractament de les malalties immunomediades existeixen molts tractaments biològics amb diferents dianes terapèutiques, com són els anticossos monoclonals anti-TNF α , anti-IL6, anti-IL23 o anti-CD20, entre d'altres. Poder identificar en el moment del diagnòstic diferents subgrups de pacients amb característiques immunològiques que els diferenciï podria ajudar a identificar els millors candidats per a cada estratègia terapèutica.

En el nostre treball, l'estudi de subpoblacions minoritàries per citometria de flux ens permet tenir una fotografia de la composició cel·lular del sistema immunitari en un moment donat, analitzant d'una forma minuciosa el fenotip limfocitari en sang perifèrica. Per a acabar de tenir tota la informació del que està passant seria rellevant saber també com estan funcionant aquestes cèl·lules, què estan alliberant a l'entorn, és a dir com estan participant en la resposta immunitària en aquell moment i en aquell entorn. Actualment aquesta informació ens la podria donar, en part, la quantificació de citocines. Però com ja s'ha comentat anteriorment, és una tècnica amb una elevada variabilitat i, a més, no dóna informació de quina cèl·lula és la que està produint les citocines. També es podria fer una medicació intracel·lular però aquest procediment es fa en PBMCs, prèvia estimulació in vitro de les cèl·lules. Per tant, tampoc ens dóna una informació real del que està passant, ni és un bon biomarcador, ja que s'estan manipulant i estimulants les cèl·lules del pacient in vitro, fet que a més, genera una elevada variabilitat en els resultats. Possiblement, la utilització de nous mètodes, com la proliferació limfocitària en sang total ^{28, 43} i de futures tecnologies com la citometria de masses ²⁵, ens permetrà fer un immunofenotipatge detallat de totes les subpoblacions leucocitàries però a més saber a nivell d'una sola cèl·lula, quines proteïnes està sintetitzant i quin grau de fosforil·lació, és a dir d'activació, presenta.

Les subpoblacions limfocitàries que es vagin identificant com a candidates a ser biomarcadors, soles o conjuntament amb altres biomarcadors detectats per altres metodologies (com pot ser la detecció de la presència d'anticossos anti-fàrmacs) portaran en un futur pròxim a poder realitzar de manera fàcil i rutinària la immunomonitorització de pacients en tractament amb diferents teràpies biològiques o immunosuprimits en la majoria dels laboratoris d'immunologia dels nostres hospitals. Això aportarà avantatges molt importants per al sistema sanitari en 3 vessants:

- ✓ **Pel pacient.** Poder identificar els pacients permetrà tant iniciar un tractament de manera precoç, disminuint així les complicacions que apareixen en estadis avançats de la malaltia. A més, es podran donar el tractament i la dosi més adequats per a cada pacient, de manera pràcticament personalitzada, disminuint així els possibles efectes adversos que produeixen aquestes teràpies.

- ✓ **Pel metge.** La immunomonitorització permetrà que el metge disposi d'una eina objectiva que l'ajudaran en la presa de decisions durant el maneig clínic del pacient, que actualment s'estan prenent en molts casos de manera empírica.

- ✓ **Pel gestor.** El nombre de teràpies biològiques disponibles al mercat cada dia és més elevat. Aquests tractaments, tot i que molt eficaços, tenen elevats preus. Poder donar el tractament adequat a cada pacient, a la dosi que necessita per a les seves característiques intrínseques, així com poder detectar de forma precoç els fracassos terapèutics és una important eina per a disminuir la despesa sanitària.

8. CONCLUSIONS

- S'ha dissenyat un panell de citometria de flux reproduïble, estandarditzable i aplicable en la pràctica clínica, capaç de:
 - detectar canvis en les subpoblacions minoritàries de sang perifèrica en pacients diagnosticats de malalties autoimmunitàries organoespecífiques.
 - descriure els canvis produïts per a diferents teràpies immunomoduladores i, en el cas en concret del fingolimod, diferenciar en les fases inicials del tractament aquells pacients que responen al tractament dels que no.
- La caracterització fenotípica de subpoblacions limfocitàries minoritàries en sang perifèrica per citometria de flux és una eina útil que permet identificar possibles biomarcadors per al diagnòstic i resposta al tractament i que pot aplicar-se a altres tipus de malalties immunomediades.

9. BIBLIOGRAFIA

1. Roep BO, Buckner J, Sawcer S, Toes R and Zipp F. The problems and promises of research into human immunology and autoimmune disease. *Nat Med*. 2012; 18: 48-53.
2. Willis JC and Lord GM. Immune biomarkers: the promises and pitfalls of personalized medicine. *Nat Rev Immunol*. 2015; 15: 323-9.
3. Robb MA, McInnes PM and Califf RM. Biomarkers and Surrogate Endpoints: Developing Common Terminology and Definitions. *JAMA*. 2016; 315: 1107-8.
4. . 2016/03/25 ed. 2016.
5. Hernandez-Fuentes MP and Lechler RI. A 'biomarker signature' for tolerance in transplantation. *Nat Rev Nephrol*. 2010; 6: 606-13.
6. Labrecque N and Cermakian N. Circadian Clocks in the Immune System. *J Biol Rhythms*. 2015; 30: 277-90.
7. Ricano-Ponce I and Wijmenga C. Mapping of immune-mediated disease genes. *Annu Rev Genomics Hum Genet*. 2013; 14: 325-53.
8. Brand O, Gough S and Heward J. HLA , CTLA-4 and PTPN22 : the shared genetic master-key to autoimmunity? *Expert Rev Mol Med*. 2005; 7: 1-15.
9. Bogdanos DP, Smyk DS, Rigopoulou EI, et al. Twin studies in autoimmune disease: genetics, gender and environment. *J Autoimmun*. 2012; 38: J156-69.
10. Awata T, Kuzuya T, Matsuda A, Iwamoto Y and Kanazawa Y. Genetic analysis of HLA class II alleles and susceptibility to type 1 (insulin-dependent) diabetes mellitus in Japanese subjects. *Diabetologia*. 1992; 35: 419-24.
11. Badenhoop K, Walfish PG, Rau H, et al. Susceptibility and resistance alleles of human leukocyte antigen (HLA) DQA1 and HLA DQB1 are shared in endocrine autoimmune disease. *J Clin Endocrinol Metab*. 1995; 80: 2112-7.
12. Simmonds MJ, Howson JM, Heward JM, et al. Regression mapping of association between the human leukocyte antigen region and Graves disease. *Am J Hum Genet*. 2005; 76: 157-63.
13. Khatri P and Sarwal MM. Using gene arrays in diagnosis of rejection. *Curr Opin Organ Transplant*. 2009; 14: 34-9.
14. O'Connell RM, Rao DS, Chaudhuri AA and Baltimore D. Physiological and pathological roles for microRNAs in the immune system. *Nat Rev Immunol*. 2010; 10: 111-22.
15. Pauley KM, Cha S and Chan EK. MicroRNA in autoimmunity and autoimmune diseases. *J Autoimmun*. 2009; 32: 189-94.
16. Zhang B, Wang J, Wang X, et al. Proteogenomic characterization of human colon and rectal cancer. *Nature*. 2014; 513: 382-7.
17. Rose N. *The Autoimmune Diseases*. 4th ed.: Elsevier Academic Press, 2006.

18. Liu G, Qi M, Hutchinson MR, Yang G and Goldys EM. Recent advances in cytokine detection by immunosensing. *Biosens Bioelectron.* 2016; 79: 810-21.
19. Hagan S and Tomlinson A. Tear fluid biomarker profiling: a review of multiplex bead analysis. *Ocul Surf.* 2013; 11: 219-35.
20. Keustermans GC, Hoeks SB, Meerding JM, Prakken BJ and de Jager W. Cytokine assays: an assessment of the preparation and treatment of blood and tissue samples. *Methods.* 2013; 61: 10-7.
21. Jaye DL, Bray RA, Gebel HM, Harris WA and Waller EK. Translational applications of flow cytometry in clinical practice. *J Immunol.* 2012; 188: 4715-9.
22. Coulter WH. Means for counting particles suspended in a fluid. In: Patent U, (ed.). USA1953.
23. Darzynkiewicz Z. *Cytometry: Part 1*. 3th edition ed.: Elsevier Academic Press, 2000.
24. Saeys Y, Gassen SV and Lambrecht BN. Computational flow cytometry: helping to make sense of high-dimensional immunology data. *Nat Rev Immunol.* 2016; 16: 449-62.
25. Chattopadhyay PK and Roederer M. Cytometry: today's technology and tomorrow's horizons. *Methods.* 2012; 57: 251-8.
26. Maecker HT, McCoy JP and Nussenblatt R. Standardizing immunophenotyping for the Human Immunology Project. *Nat Rev Immunol.* 2012; 12: 191-200.
27. Bacher P and Scheffold A. Flow-cytometric analysis of rare antigen-specific T cells. *Cytometry A.* 2013; 83: 692-701.
28. Marits P, Wikstrom AC, Popadic D, Winqvist O and Thunberg S. Evaluation of T and B lymphocyte function in clinical practice using a flow cytometry based proliferation assay. *Clin Immunol.* 2014; 153: 332-42.
29. Lyons AB, Blake SJ and Doherty KV. Flow cytometric analysis of cell division by dilution of CFSE and related dyes. *Curr Protoc Cytom.* 2013; Chapter 9: Unit9 11.
30. Abraham RS and Aubert G. Flow Cytometry, a Versatile Tool for Diagnosis and Monitoring of Primary Immunodeficiencies. *Clin Vaccine Immunol.* 2016; 23: 254-71.
31. Hoffmann HJ, Santos AF, Mayorga C, et al. The clinical utility of basophil activation testing in diagnosis and monitoring of allergic disease. *Allergy.* 2015; 70: 1393-405.
32. Olteanu H, Schur BC, Harrington AM and Kroft SH. Time and temperature stability of T-cell subsets evaluated by a dual-platform method. *Am J Blood Res.* 2012; 2: 128-35.

33. Schlickeiser S, Streitz M and Sawitzki B. Standardized Multi-Color Flow Cytometry and Computational Biomarker Discovery. *Methods Mol Biol.* 2016; 1371: 225-38.
34. Villanova F, Di Meglio P, Inokuma M, et al. Integration of lyoplate based flow cytometry and computational analysis for standardized immunological biomarker discovery. *PLoS One.* 2013; 8: e65485.
35. Mair F, Hartmann FJ, Mrdjen D, Tosevski V, Krieg C and Becher B. The end of gating? An introduction to automated analysis of high dimensional cytometry data. *Eur J Immunol.* 2016; 46: 34-43.
36. Appay V, van Lier RA, Sallusto F and Roederer M. Phenotype and function of human T lymphocyte subsets: consensus and issues. *Cytometry A.* 2008; 73: 975-83.
37. Popadic D, Anegón I, Baeten D, et al. Predictive immunomonitoring -- the COST ENTIRE initiative. *Clin Immunol.* 2013; 147: 23-6.
38. Streitz M, Miloud T, Kapinsky M, et al. Standardization of whole blood immune phenotype monitoring for clinical trials: panels and methods from the ONE study. *Transplant Res.* 2013; 2: 17.
39. Kalina T, Flores-Montero J, van der Velden VH, et al. EuroFlow standardization of flow cytometer instrument settings and immunophenotyping protocols. *Leukemia.* 2012; 26: 1986-2010.
40. van Dongen JJ, Lhermitte L, Bottcher S, et al. EuroFlow antibody panels for standardized n-dimensional flow cytometric immunophenotyping of normal, reactive and malignant leukocytes. *Leukemia.* 2012; 26: 1908-75.
41. Finak G, Langweiler M, Jaimes M, et al. Standardizing Flow Cytometry Immunophenotyping Analysis from the Human ImmunoPhenotyping Consortium. *Sci Rep.* 2016; 6: 20686.
42. Thomas S, Rouilly V, Patin E, et al. The Milieu Interieur study - an integrative approach for study of human immunological variance. *Clin Immunol.* 2015; 157: 277-93.
43. Duffy D, Rouilly V, Libri V, et al. Functional analysis via standardized whole-blood stimulation systems defines the boundaries of a healthy immune response to complex stimuli. *Immunity.* 2014; 40: 436-50.
44. Hasan M, Beitz B, Rouilly V, et al. Semi-automated and standardized cytometric procedures for multi-panel and multi-parametric whole blood immunophenotyping. *Clin Immunol.* 2015; 157: 261-76.
45. Chen X, Hasan M, Libri V, et al. Automated flow cytometric analysis across large numbers of samples and cell types. *Clin Immunol.* 2015; 157: 249-60.
46. Immunetolerance Network (<https://www.immunetolerance.org/>).
47. Bendall SC, Nolan GP, Roederer M and Chattopadhyay PK. A deep profiler's guide to cytometry. *Trends Immunol.* 2012; 33: 323-32.

48. Maecker HT, Nolan GP and Fathman CG. New technologies for autoimmune disease monitoring. *Curr Opin Endocrinol Diabetes Obes.* 2010; 17: 322-8.
49. Klein L, Hinterberger M, Wirnsberger G and Kyewski B. Antigen presentation in the thymus for positive selection and central tolerance induction. *Nat Rev Immunol.* 2009; 9: 833-44.
50. Kyewski B and Klein L. A central role for central tolerance. *Annu Rev Immunol.* 2006; 24: 571-606.
51. Sallusto F, Geginat J and Lanzavecchia A. Central memory and effector memory T cell subsets: function, generation, and maintenance. *Annu Rev Immunol.* 2004; 22: 745-63.
52. Zhu J and Paul WE. CD4 T cells: fates, functions, and faults. *Blood.* 2008; 112: 1557-69.
53. Geginat J, Paroni M, Maglie S, et al. Plasticity of human CD4 T cell subsets. *Front Immunol.* 2014; 5: 630.
54. Caza T and Landas S. Functional and Phenotypic Plasticity of CD4(+) T Cell Subsets. *Biomed Res Int.* 2015; 2015: 521957.
55. MacLeod MK, Clambey ET, Kappler JW and Marrack P. CD4 memory T cells: what are they and what can they do? *Semin Immunol.* 2009; 21: 53-61.
56. Sathaliyawala T, Kubota M, Yudanin N, et al. Distribution and compartmentalization of human circulating and tissue-resident memory T cell subsets. *Immunity.* 2013; 38: 187-97.
57. Kohler S and Thiel A. Life after the thymus: CD31+ and CD31- human naive CD4+ T-cell subsets. *Blood.* 2009; 113: 769-74.
58. Haines CJ, Giffon TD, Lu LS, et al. Human CD4+ T cell recent thymic emigrants are identified by protein tyrosine kinase 7 and have reduced immune function. *J Exp Med.* 2009; 206: 275-85.
59. Tanaskovic S, Fernandez S, Price P, Lee S and French MA. CD31 (PECAM-1) is a marker of recent thymic emigrants among CD4+ T-cells, but not CD8+ T-cells or gammadelta T-cells, in HIV patients responding to ART. *Immunol Cell Biol.* 2010; 88: 321-7.
60. Hamann D, Baars PA, Rep MH, et al. Phenotypic and functional separation of memory and effector human CD8+ T cells. *J Exp Med.* 1997; 186: 1407-18.
61. Sallusto F, Lenig D, Forster R, Lipp M and Lanzavecchia A. Two subsets of memory T lymphocytes with distinct homing potentials and effector functions. *Nature.* 1999; 401: 708-12.
62. Appay V, Dunbar PR, Callan M, et al. Memory CD8+ T cells vary in differentiation phenotype in different persistent virus infections. *Nat Med.* 2002; 8: 379-85.

63. De Rosa SC, Herzenberg LA and Roederer M. 11-color, 13-parameter flow cytometry: identification of human naive T cells by phenotype, function, and T-cell receptor diversity. *Nat Med*. 2001; 7: 245-8.
64. Koch S, Larbi A, Derhovanessian E, Ozcelik D, Naumova E and Pawelec G. Multiparameter flow cytometric analysis of CD4 and CD8 T cell subsets in young and old people. *Immun Ageing*. 2008; 5: 6.
65. Monteiro M, Evaristo C, Legrand A, Nicoletti A and Rocha B. Cartography of gene expression in CD8 single cells: novel CCR7- subsets suggest differentiation independent of CD45RA expression. *Blood*. 2007; 109: 2863-70.
66. Restifo NP and Gattinoni L. Lineage relationship of effector and memory T cells. *Curr Opin Immunol*. 2013; 25: 556-63.
67. Fritsch RD, Shen X, Sims GP, Hathcock KS, Hodes RJ and Lipsky PE. Stepwise differentiation of CD4 memory T cells defined by expression of CCR7 and CD27. *J Immunol*. 2005; 175: 6489-97.
68. Duhon T, Duhon R, Lanzavecchia A, Sallusto F and Campbell DJ. Functionally distinct subsets of human FOXP3+ Treg cells that phenotypically mirror effector Th cells. *Blood*. 2012; 119: 4430-40.
69. LeBien TW and Tedder TF. B lymphocytes: how they develop and function. *Blood*. 2008; 112: 1570-80.
70. Suryani S, Fulcher DA, Santner-Nanan B, et al. Differential expression of CD21 identifies developmentally and functionally distinct subsets of human transitional B cells. *Blood*. 2010; 115: 519-29.
71. Cancro MP, Hao Y, Scholz JL, et al. B cells and aging: molecules and mechanisms. *Trends Immunol*. 2009; 30: 313-8.
72. Sanz I, Wei C, Lee FE and Anolik J. Phenotypic and functional heterogeneity of human memory B cells. *Semin Immunol*. 2008; 20: 67-82.
73. Agematsu K, Hokibara S, Nagumo H and Komiyama A. CD27: a memory B-cell marker. *Immunol Today*. 2000; 21: 204-6.
74. Wu YC, Kipling D and Dunn-Walters DK. The relationship between CD27 negative and positive B cell populations in human peripheral blood. *Front Immunol*. 2011; 2: 81.
75. Wu YC, Kipling D, Leong HS, Martin V, Ademokun AA and Dunn-Walters DK. High-throughput immunoglobulin repertoire analysis distinguishes between human IgM memory and switched memory B-cell populations. *Blood*. 2010; 116: 1070-8.
76. Weller S, Braun MC, Tan BK, et al. Human blood IgM "memory" B cells are circulating splenic marginal zone B cells harboring a prediversified immunoglobulin repertoire. *Blood*. 2004; 104: 3647-54.
77. Anolik JH, Friedberg JW, Zheng B, et al. B cell reconstitution after rituximab treatment of lymphoma recapitulates B cell ontogeny. *Clin Immunol*. 2007; 122: 139-45.

78. Palanichamy A, Barnard J, Zheng B, et al. Novel human transitional B cell populations revealed by B cell depletion therapy. *J Immunol.* 2009; 182: 5982-93.
79. Sims GP, Ettinger R, Shirota Y, Yarboro CH, Illei GG and Lipsky PE. Identification and characterization of circulating human transitional B cells. *Blood.* 2005; 105: 4390-8.
80. Lanzavecchia A and Sallusto F. Human B cell memory. *Curr Opin Immunol.* 2009; 21: 298-304.
81. Colonna-Romano G, Bulati M, Aquino A, et al. A double-negative (IgD-CD27-) B cell population is increased in the peripheral blood of elderly people. *Mech Ageing Dev.* 2009; 130: 681-90.
82. Wang L, Wang FS and Gershwin ME. Human autoimmune diseases: a comprehensive update. *J Intern Med.* 2015; 278: 369-95.
83. Goodnow CC. Multistep pathogenesis of autoimmune disease. *Cell.* 2007; 130: 25-35.
84. Goodnow CC, Sprent J, Fazekas de St Groth B and Vinuesa CG. Cellular and genetic mechanisms of self tolerance and autoimmunity. *Nature.* 2005; 435: 590-7.
85. Walker LS and Abbas AK. The enemy within: keeping self-reactive T cells at bay in the periphery. *Nat Rev Immunol.* 2002; 2: 11-9.
86. Sakaguchi S, Powrie F and Ransohoff RM. Re-establishing immunological self-tolerance in autoimmune disease. *Nat Med.* 2012; 18: 54-8.
87. Bruno R, Sabater L, Sospedra M, et al. Multiple sclerosis candidate autoantigens except myelin oligodendrocyte glycoprotein are transcribed in human thymus. *Eur J Immunol.* 2002; 32: 2737-47.
88. Sospedra M, Ferrer-Francesch X, Dominguez O, Juan M, Foz-Sala M and Pujol-Borrell R. Transcription of a broad range of self-antigens in human thymus suggests a role for central mechanisms in tolerance toward peripheral antigens. *J Immunol.* 1998; 161: 5918-29.
89. Takaba H, Morishita Y, Tomofuji Y, et al. Fezf2 Orchestrates a Thymic Program of Self-Antigen Expression for Immune Tolerance. *Cell.* 2015; 163: 975-87.
90. Michels AW and Gottlieb PA. Autoimmune polyglandular syndromes. *Nat Rev Endocrinol.* 2010; 6: 270-7.
91. Mueller DL. Mechanisms maintaining peripheral tolerance. *Nat Immunol.* 2010; 11: 21-7.
92. Kuchroo VK, Ohashi PS, Sartor RB and Vinuesa CG. Dysregulation of immune homeostasis in autoimmune diseases. *Nat Med.* 2012; 18: 42-7.
93. Roncarolo MG, Gregori S, Bacchetta R and Battaglia M. Tr1 cells and the counter-regulation of immunity: natural mechanisms and therapeutic applications. *Curr Top Microbiol Immunol.* 2014; 380: 39-68.

94. Tsai S, Clemente-Casares X and Santamaria P. CD8(+) Tregs in autoimmunity: learning "self"-control from experience. *Cell Mol Life Sci.* 2011; 68: 3781-95.
95. Kalampokis I, Yoshizaki A and Tedder TF. IL-10-producing regulatory B cells (B10 cells) in autoimmune disease. *Arthritis Res Ther.* 2013; 15 Suppl 1: S1.
96. Lin W, Cerny D, Chua E, et al. Human regulatory B cells combine phenotypic and genetic hallmarks with a distinct differentiation fate. *J Immunol.* 2014; 193: 2258-66.
97. Mauri C and Ehrenstein MR. The 'short' history of regulatory B cells. *Trends Immunol.* 2008; 29: 34-40.
98. Blair PA, Norena LY, Flores-Borja F, et al. CD19(+)CD24(hi)CD38(hi) B cells exhibit regulatory capacity in healthy individuals but are functionally impaired in systemic Lupus Erythematosus patients. *Immunity.* 2010; 32: 129-40.
99. Manjarrez-Orduno N, Quach TD and Sanz I. B cells and immunological tolerance. *J Invest Dermatol.* 2009; 129: 278-88.
100. Nemazee D and Weigert M. Revising B cell receptors. *J Exp Med.* 2000; 191: 1813-7.
101. Vinuesa CG, Sanz I and Cook MC. Dysregulation of germinal centres in autoimmune disease. *Nat Rev Immunol.* 2009; 9: 845-57.
102. Morshed SA, Latif R and Davies TF. Delineating the autoimmune mechanisms in Graves' disease. *Immunol Res.* 2012; 54: 191-203.
103. Antonelli A, Ferrari SM, Corrado A, Di Domenicantonio A and Fallahi P. Autoimmune thyroid disorders. *Autoimmun Rev.* 2015; 14: 174-80.
104. Menconi F, Marcocci C and Marino M. Diagnosis and classification of Graves' disease. *Autoimmun Rev.* 2014; 13: 398-402.
105. Fujikawa M, Okamura K, Sato K, et al. Usefulness of surface phenotype study of intrathyroidal lymphocytes obtained by fine needle aspiration cytology in autoimmune thyroid disease and malignant lymphoma of the thyroid. *Clin Endocrinol (Oxf).* 1998; 49: 191-6.
106. Tomer Y. Genetic susceptibility to autoimmune thyroid disease: past, present, and future. *Thyroid.* 2010; 20: 715-25.
107. Uchimura K, Itoh M, Yamamoto K, et al. The effects of CD40- and interleukin (IL-4)-activated CD23+ cells on the production of IL-10 by mononuclear cells in Graves' disease: the role of CD8+ cells. *Clin Exp Immunol.* 2002; 128: 308-12.
108. Armengol MP, Sabater L, Fernandez M, et al. Influx of recent thymic emigrants into autoimmune thyroid disease glands in humans. *Clin Exp Immunol.* 2008; 153: 338-50.
109. Iwatani Y, Hidaka Y, Matsuzuka F, Kuma K and Amino N. Intrathyroidal lymphocyte subsets, including unusual CD4+ CD8+ cells and CD3loTCR alpha

- beta lo/-CD4-CD8- cells, in autoimmune thyroid disease. *Clin Exp Immunol*. 1993; 93: 430-6.
110. Strawa K, Markowska A, Miskiewicz P, et al. Increased concentration of T cell receptor rearrangement excision circles (TREC) in peripheral blood in Graves' disease. *Clin Endocrinol (Oxf)*. 2014.
111. Yanagawa T, Manglabruks A, Chang YB, et al. Human histocompatibility leukocyte antigen-DQA1*0501 allele associated with genetic susceptibility to Graves' disease in a Caucasian population. *J Clin Endocrinol Metab*. 1993; 76: 1569-74.
112. Bossowski A, Urban M and Stasiak-Barmuta A. Analysis of changes in the percentage of B (CD19) and T (CD3) lymphocytes, subsets CD4, CD8 and their memory (CD45RO), and naive (CD45RA) T cells in children with immune and non-immune thyroid diseases. *J Pediatr Endocrinol Metab*. 2003; 16: 63-70.
113. Figueroa-Vega N, Alfonso-Perez M, Benedicto I, Sanchez-Madrid F, Gonzalez-Amaro R and Marazuela M. Increased circulating pro-inflammatory cytokines and Th17 lymphocytes in Hashimoto's thyroiditis. *J Clin Endocrinol Metab*. 2010; 95: 953-62.
114. Nanba T, Watanabe M, Inoue N and Iwatani Y. Increases of the Th1/Th2 cell ratio in severe Hashimoto's disease and in the proportion of Th17 cells in intractable Graves' disease. *Thyroid*. 2009; 19: 495-501.
115. Peng D, Xu B, Wang Y, Guo H and Jiang Y. A high frequency of circulating th22 and th17 cells in patients with new onset graves' disease. *PLoS One*. 2013; 8: e68446.
116. Bossowski A, Moniuszko M, Dabrowska M, et al. Lower proportions of CD4+CD25(high) and CD4+FoxP3, but not CD4+CD25+CD127(low) FoxP3(+)T cell levels in children with autoimmune thyroid diseases. *Autoimmunity*. 2013.
117. Fountoulakis S, Vartholomatos G, Kolaitis N, Frilingos S, Philippou G and Tsatsoulis A. HLA-DR expressing peripheral T regulatory cells in newly diagnosed patients with different forms of autoimmune thyroid disease. *Thyroid*. 2008; 18: 1195-200.
118. Marazuela M, Garcia-Lopez MA, Figueroa-Vega N, et al. Regulatory T cells in human autoimmune thyroid disease. *J Clin Endocrinol Metab*. 2006; 91: 3639-46.
119. Nakano A, Watanabe M, Iida T, et al. Apoptosis-induced decrease of intrathyroidal CD4(+)CD25(+) regulatory T cells in autoimmune thyroid diseases. *Thyroid*. 2007; 17: 25-31.
120. Pan D, Shin YH, Gopalakrishnan G, Hennessey J and De Groot LJ. Regulatory T cells in Graves' disease. *Clin Endocrinol (Oxf)*. 2009; 71: 587-93.
121. Zhou J, Bi M, Fan C, et al. Regulatory T cells but not T helper 17 cells are modulated in an animal model of Graves' hyperthyroidism. *Clin Exp Med*. 2012; 12: 39-46.

122. Zha B, Wang L, Liu X, et al. Decrease in proportion of CD19+ CD24(hi) CD27+ B cells and impairment of their suppressive function in Graves' disease. *PLoS One*. 2012; 7: e49835.
123. van der Weerd K, Van Hagen PM, Schrijver B, et al. The peripheral blood compartment in patient with Graves' disease: activated T lymphocytes and increased transitional and pre-naïve mature B lymphocytes. *Clin Exp Immunol*. 2013.
124. Laurberg P, Wallin G, Tallstedt L, Abraham-Nordling M, Lundell G and Torring O. TSH-receptor autoimmunity in Graves' disease after therapy with anti-thyroid drugs, surgery, or radioiodine: a 5-year prospective randomized study. *Eur J Endocrinol*. 2008; 158: 69-75.
125. Bruck W and Stadelmann C. The spectrum of multiple sclerosis: new lessons from pathology. *Curr Opin Neurol*. 2005; 18: 221-4.
126. Dendrou CA, Fugger L and Friese MA. Immunopathology of multiple sclerosis. *Nat Rev Immunol*. 2015; 15: 545-58.
127. Lublin FD. New multiple sclerosis phenotypic classification. *Eur Neurol*. 2014; 72 Suppl 1: 1-5.
128. Loma I and Heyman R. Multiple sclerosis: pathogenesis and treatment. *Curr Neuroparmacol*. 2011; 9: 409-16.
129. Grau-Lopez L, Raich D, Ramo-Tello C, et al. Specific T-cell proliferation to myelin peptides in relapsing-remitting multiple sclerosis. *Eur J Neurol*. 2011; 18: 1101-4.
130. Bielekova B, Sung MH, Kadom N, Simon R, McFarland H and Martin R. Expansion and functional relevance of high-avidity myelin-specific CD4+ T cells in multiple sclerosis. *J Immunol*. 2004; 172: 3893-904.
131. Fletcher JM, Lalor SJ, Sweeney CM, Tubridy N and Mills KH. T cells in multiple sclerosis and experimental autoimmune encephalomyelitis. *Clin Exp Immunol*. 2010; 162: 1-11.
132. Petermann F and Korn T. Cytokines and effector T cell subsets causing autoimmune CNS disease. *FEBS Lett*. 2011; 585: 3747-57.
133. Brucklacher-Waldert V, Stuermer K, Kolster M, Wolthausen J and Tolosa E. Phenotypical and functional characterization of T helper 17 cells in multiple sclerosis. *Brain*. 2009; 132: 3329-41.
134. Kebir H, Kreyenborg K, Ifergan I, et al. Human TH17 lymphocytes promote blood-brain barrier disruption and central nervous system inflammation. *Nat Med*. 2007; 13: 1173-5.
135. Friese MA and Fugger L. Pathogenic CD8(+) T cells in multiple sclerosis. *Ann Neurol*. 2009; 66: 132-41.
136. Mars LT, Saikali P, Liblau RS and Arbour N. Contribution of CD8 T lymphocytes to the immuno-pathogenesis of multiple sclerosis and its animal models. *Biochim Biophys Acta*. 2011; 1812: 151-61.

137. Mullen KM, Gocke AR, Allie R, et al. Expression of CCR7 and CD45RA in CD4+ and CD8+ subsets in cerebrospinal fluid of 134 patients with inflammatory and non-inflammatory neurological diseases. *J Neuroimmunol.* 2012; 249: 86-92.
138. Jilek S, Schluep M, Rossetti AO, et al. CSF enrichment of highly differentiated CD8+ T cells in early multiple sclerosis. *Clin Immunol.* 2007; 123: 105-13.
139. Denic A, Wootla B and Rodriguez M. CD8(+) T cells in multiple sclerosis. *Expert Opin Ther Targets.* 2013; 17: 1053-66.
140. Wilson HL. B cells contribute to MS pathogenesis through antibody-dependent and antibody-independent mechanisms. *Biologics.* 2012; 6: 117-23.
141. Niino M, Hirotani M, Miyazaki Y and Sasaki H. Memory and naive B-cell subsets in patients with multiple sclerosis. *Neurosci Lett.* 2009; 464: 74-8.
142. Kuerten S, Pommerschein G, Barth SK, et al. Identification of a B cell-dependent subpopulation of multiple sclerosis by measurements of brain-reactive B cells in the blood. *Clin Immunol.* 2014; 152: 20-4.
143. Comabella M and Montalban X. Body fluid biomarkers in multiple sclerosis. *Lancet Neurol.* 2014; 13: 113-26.
144. Stangel M, Fredrikson S, Meinl E, Petzold A, Stuve O and Tumani H. The utility of cerebrospinal fluid analysis in patients with multiple sclerosis. *Nat Rev Neurol.* 2013; 9: 267-76.
145. Teunissen CE, Malekzadeh A, Leurs C, Bridel C and Killestein J. Body fluid biomarkers for multiple sclerosis--the long road to clinical application. *Nat Rev Neurol.* 2015; 11: 585-96.
146. Axisa PP and Hafler DA. Multiple sclerosis: genetics, biomarkers, treatments. *Curr Opin Neurol.* 2016; 29: 345-53.
147. Lowenthal A, Vansande M and Karcher D. The differential diagnosis of neurological diseases by fractionating electrophoretically the CSF gamma-globulins. *J Neurochem.* 1960; 6: 51-6.
148. Felgenhauer K and Reiber H. The diagnostic significance of antibody specificity indices in multiple sclerosis and herpes virus induced diseases of the nervous system. *Clin Investig.* 1992; 70: 28-37.
149. Kaplan B, Aizenbud BM, Golderman S, Yaskariev R and Sela BA. Free light chain monomers in the diagnosis of multiple sclerosis. *J Neuroimmunol.* 2010; 229: 263-71.
150. Keller A, Leidinger P, Steinmeyer F, et al. Comprehensive analysis of microRNA profiles in multiple sclerosis including next-generation sequencing. *Mult Scler.* 2014; 20: 295-303.
151. Kuhle J, Disanto G, Dobson R, et al. Conversion from clinically isolated syndrome to multiple sclerosis: A large multicentre study. *Mult Scler.* 2015; 21: 1013-24.

152. Villar LM, Masjuan J, Gonzalez-Porque P, et al. Intrathecal IgM synthesis predicts the onset of new relapses and a worse disease course in MS. *Neurology*. 2002; 59: 555-9.
153. Brettschneider J, Czerwoniak A, Senel M, et al. The chemokine CXCL13 is a prognostic marker in clinically isolated syndrome (CIS). *PLoS One*. 2010; 5: e11986.
154. Comabella M, Fernandez M, Martin R, et al. Cerebrospinal fluid chitinase 3-like 1 levels are associated with conversion to multiple sclerosis. *Brain*. 2010; 133: 1082-93.
155. Norgren N, Rosengren L and Stigbrand T. Elevated neurofilament levels in neurological diseases. *Brain Res*. 2003; 987: 25-31.
156. Teunissen CE, Iacobaeus E, Khademi M, et al. Combination of CSF N-acetylaspartate and neurofilaments in multiple sclerosis. *Neurology*. 2009; 72: 1322-9.
157. Jiao Y, Fryer JP, Lennon VA, et al. Updated estimate of AQP4-IgG serostatus and disability outcome in neuromyelitis optica. *Neurology*. 2013; 81: 1197-204.
158. Tanaka M and Tanaka K. Anti-MOG antibodies in adult patients with demyelinating disorders of the central nervous system. *J Neuroimmunol*. 2014; 270: 98-9.
159. Hoftberger R, Sepulveda M, Armangue T, et al. Antibodies to MOG and AQP4 in adults with neuromyelitis optica and suspected limited forms of the disease. *Mult Scler*. 2015; 21: 866-74.
160. Kitley J, Woodhall M, Waters P, et al. Myelin-oligodendrocyte glycoprotein antibodies in adults with a neuromyelitis optica phenotype. *Neurology*. 2012; 79: 1273-7.
161. Chang KH, Tseng MY, Ro LS, et al. Analyses of haptoglobin level in the cerebrospinal fluid and serum of patients with neuromyelitis optica and multiple sclerosis. *Clin Chim Acta*. 2013; 417: 26-30.
162. Villar LM, Sadaba MC, Roldan E, et al. Intrathecal synthesis of oligoclonal IgM against myelin lipids predicts an aggressive disease course in MS. *J Clin Invest*. 2005; 115: 187-94.
163. Fenoglio C, Ridolfi E, Cantoni C, et al. Decreased circulating miRNA levels in patients with primary progressive multiple sclerosis. *Mult Scler*. 2013; 19: 1938-42.
164. Trentini A, Comabella M, Tintore M, et al. N-acetylaspartate and neurofilaments as biomarkers of axonal damage in patients with progressive forms of multiple sclerosis. *J Neurol*. 2014; 261: 2338-43.
165. Magraner MJ, Bosca I, Simo-Castello M, et al. Brain atrophy and lesion load are related to CSF lipid-specific IgM oligoclonal bands in clinically isolated syndromes. *Neuroradiology*. 2012; 54: 5-12.

166. Polman CH, Bertolotto A, Deisenhammer F, et al. Recommendations for clinical use of data on neutralising antibodies to interferon-beta therapy in multiple sclerosis. *Lancet Neurol.* 2010; 9: 740-50.
167. Calabresi PA, Giovannoni G, Confavreux C, et al. The incidence and significance of anti-natalizumab antibodies: results from AFFIRM and SENTINEL. *Neurology.* 2007; 69: 1391-403.
168. Hecker M, Thamilarasan M, Koczan D, et al. MicroRNA expression changes during interferon-beta treatment in the peripheral blood of multiple sclerosis patients. *Int J Mol Sci.* 2013; 14: 16087-110.
169. De Felice B, Mondola P, Sasso A, et al. Small non-coding RNA signature in multiple sclerosis patients after treatment with interferon-beta. *BMC Med Genomics.* 2014; 7: 26.
170. Bloomgren G, Richman S, Hotermans C, et al. Risk of natalizumab-associated progressive multifocal leukoencephalopathy. *N Engl J Med.* 2012; 366: 1870-80.
171. Perumal J and Khan O. Emerging disease-modifying therapies in multiple sclerosis. *Curr Treat Options Neurol.* 2012; 14: 256-63.
172. Buck D and Hemmer B. Treatment of multiple sclerosis: current concepts and future perspectives. *J Neurol.* 2011; 258: 1747-62.
173. Grigoriadis N and van Pesch V. A basic overview of multiple sclerosis immunopathology. *Eur J Neurol.* 2015; 22 Suppl 2: 3-13.
174. Winkelmann A, Loebermann M, Reisinger EC, Hartung HP and Zettl UK. Disease-modifying therapies and infectious risks in multiple sclerosis. *Nat Rev Neurol.* 2016; 12: 217-33.
175. Lehmann-Horn K, Penkert H, Grein P, et al. PML during dimethyl fumarate treatment of multiple sclerosis: How does lymphopenia matter? *Neurology.* 2016; 87: 440-1.
176. Khatri BO, Garland J, Berger J, et al. The effect of dimethyl fumarate (Tecfidera) on lymphocyte counts: A potential contributor to progressive multifocal leukoencephalopathy risk. *Mult Scler Relat Disord.* 2015; 4: 377-9.
177. Mikulkova Z, Praksova P, Stourac P, Bednarik J and Michalek J. Imbalance in T-cell and cytokine profiles in patients with relapsing-remitting multiple sclerosis. *J Neurol Sci.* 2011; 300: 135-41.
178. Haeghele KF, Stueckle CA, Malin JP and Sindern E. Increase of CD8+ T-effector memory cells in peripheral blood of patients with relapsing-remitting multiple sclerosis compared to healthy controls. *J Neuroimmunol.* 2007; 183: 168-74.
179. Liu GZ, Fang LB, Hjelmstrom P and Gao XG. Increased CD8+ central memory T cells in patients with multiple sclerosis. *Mult Scler.* 2007; 13: 149-55.
180. Pender MP, Csurhes PA, Pfluger CM and Burrows SR. Deficiency of CD8+ effector memory T cells is an early and persistent feature of multiple sclerosis. *Mult Scler.* 2014.

181. Jamshidian A, Shaygannejad V, Pourazar A, Zarkesh-Esfahani SH and Gharagozloo M. Biased Treg/Th17 balance away from regulatory toward inflammatory phenotype in relapsed multiple sclerosis and its correlation with severity of symptoms. *J Neuroimmunol.* 2013; 262: 106-12.
182. Peelen E, Damoiseaux J, Smolders J, et al. Th17 expansion in MS patients is counterbalanced by an expanded CD39+ regulatory T cell population during remission but not during relapse. *J Neuroimmunol.* 2011; 240-241: 97-103.
183. Claes N, Fraussen J, Stinissen P, Hupperts R and Somers V. B Cells Are Multifunctional Players in Multiple Sclerosis Pathogenesis: Insights from Therapeutic Interventions. *Front Immunol.* 2015; 6: 642.
184. Dooley J, Pauwels I, Franckaert D, et al. Immunologic profiles of multiple sclerosis treatments reveal shared early B cell alterations. *Neurol Neuroimmunol Neuroinflamm.* 2016; 3: e240.
185. Kasper LH and Reder AT. Immunomodulatory activity of interferon-beta. *Ann Clin Transl Neurol.* 2014; 1: 622-31.
186. Kieseier BC. The mechanism of action of interferon-beta in relapsing multiple sclerosis. *CNS Drugs.* 2011; 25: 491-502.
187. Aristimuno C, de Andres C, Bartolome M, et al. IFNbeta-1a therapy for multiple sclerosis expands regulatory CD8+ T cells and decreases memory CD8+ subset: a longitudinal 1-year study. *Clin Immunol.* 2010; 134: 148-57.
188. Durelli L, Conti L, Clerico M, et al. T-helper 17 cells expand in multiple sclerosis and are inhibited by interferon-beta. *Ann Neurol.* 2009; 65: 499-509.
189. Zhang X and Markovic-Plese S. Interferon beta inhibits the Th17 cell-mediated autoimmune response in patients with relapsing-remitting multiple sclerosis. *Clin Neurol Neurosurg.* 2010; 112: 641-5.
190. Jensen J, Langkilde AR, Frederiksen JL and Sellebjerg F. CD8+ T cell activation correlates with disease activity in clinically isolated syndromes and is regulated by interferon-beta treatment. *J Neuroimmunol.* 2006; 179: 163-72.
191. Zanolini C, Chiarini M, Serana F, et al. Opposite effects of interferon-beta on new B and T cell release from production sites in multiple sclerosis patients. *J Neuroimmunol.* 2011; 240-241: 147-50.
192. Puissant-Lubrano B, Viala F, Winterton P, Abbal M, Clanet M and Blancher A. Thymic output and peripheral T lymphocyte subsets in relapsing--remitting multiple sclerosis patients treated or not by IFN-beta. *J Neuroimmunol.* 2008; 193: 188-94.
193. Skarica M, Eckstein C, Whartenby KA and Calabresi PA. Novel mechanisms of immune modulation of natalizumab in multiple sclerosis patients. *J Neuroimmunol.* 2011; 235: 70-6.
194. Putzki N, Baranwal MK, Tettenborn B, Limmroth V and Kreuzfelder E. Effects of natalizumab on circulating B cells, T regulatory cells and natural killer cells. *Eur Neurol.* 2010; 63: 311-7.

195. Koudriavtseva T, Sbardella E, Trento E, Bordignon V, D'Agosto G and Cordiali-Fei P. Long-term follow-up of peripheral lymphocyte subsets in a cohort of multiple sclerosis patients treated with natalizumab. *Clin Exp Immunol*. 2014; 176: 320-6.
196. Planas R, Jelcic I, Schippling S, Martin R and Sospedra M. Natalizumab treatment perturbs memory- and marginal zone-like B-cell homing in secondary lymphoid organs in multiple sclerosis. *Eur J Immunol*. 2012; 42: 790-8.
197. Kivisakk P, Healy BC, Viglietta V, et al. Natalizumab treatment is associated with peripheral sequestration of proinflammatory T cells. *Neurology*. 2009; 72: 1922-30.
198. Bonig H, Wundes A, Chang KH, Lucas S and Papayannopoulou T. Increased numbers of circulating hematopoietic stem/progenitor cells are chronically maintained in patients treated with the CD49d blocking antibody natalizumab. *Blood*. 2008; 111: 3439-41.
199. Jing D, Oelschlaegel U, Ordemann R, et al. CD49d blockade by natalizumab in patients with multiple sclerosis affects steady-state hematopoiesis and mobilizes progenitors with a distinct phenotype and function. *Bone Marrow Transplant*. 2010; 45: 1489-96.
200. Zohren F, Toutzaris D, Klarner V, Hartung HP, Kieseier B and Haas R. The monoclonal anti-VLA-4 antibody natalizumab mobilizes CD34+ hematopoietic progenitor cells in humans. *Blood*. 2008; 111: 3893-5.
201. Zanotti C, Chiarini M, Serana F, et al. Peripheral accumulation of newly produced T and B lymphocytes in natalizumab-treated multiple sclerosis patients. *Clin Immunol*. 2012; 145: 19-26.
202. Krumbholz M, Meinl I, Kumpfel T, Hohlfeld R and Meinl E. Natalizumab disproportionately increases circulating pre-B and B cells in multiple sclerosis. *Neurology*. 2008; 71: 1350-4.
203. Mehling M, Brinkmann V, Antel J, et al. FTY720 therapy exerts differential effects on T cell subsets in multiple sclerosis. *Neurology*. 2008; 71: 1261-7.
204. Mehling M, Brinkmann V, Burgener AV, et al. Homing frequency of human T cells inferred from peripheral blood depletion kinetics after sphingosine-1-phosphate receptor blockade. *J Allergy Clin Immunol*. 2013; 131: 1440-3 e7.
205. Sato DK, Nakashima I, Bar-Or A, et al. Changes in Th17 and regulatory T cells after fingolimod initiation to treat multiple sclerosis. *J Neuroimmunol*. 2014; 268: 95-8.
206. Henault D, Galleguillos L, Moore C, Johnson T, Bar-Or A and Antel J. Basis for fluctuations in lymphocyte counts in fingolimod-treated patients with multiple sclerosis. *Neurology*. 2013; 81: 1768-72.

207. Miyazaki Y, Niino M, Fukazawa T, et al. Suppressed pro-inflammatory properties of circulating B cells in patients with multiple sclerosis treated with fingolimod, based on altered proportions of B-cell subpopulations. *Clin Immunol.* 2014; 151: 127-35.
208. Claes N, Dhaeze T, Fraussen J, et al. Compositional changes of B and T cell subtypes during fingolimod treatment in multiple sclerosis patients: a 12-month follow-up study. *PLoS One.* 2014; 9: e111115.
209. Kim MG, Lee SY, Ko YS, et al. CD4+ CD25+ regulatory T cells partially mediate the beneficial effects of FTY720, a sphingosine-1-phosphate analogue, during ischaemia/reperfusion-induced acute kidney injury. *Nephrol Dial Transplant.* 2011; 26: 111-24.
210. Sun Y, Wang W, Shan B, et al. FTY720-induced conversion of conventional Foxp3- CD4+ T cells to Foxp3+ regulatory T cells in NOD mice. *Am J Reprod Immunol.* 2011; 66: 349-62.
211. Sehrawat S and Rouse BT. Anti-inflammatory effects of FTY720 against viral-induced immunopathology: role of drug-induced conversion of T cells to become Foxp3+ regulators. *J Immunol.* 2008; 180: 7636-47.
212. Muls N, Dang HA, Sindic CJ and van Pesch V. Fingolimod increases CD39-expressing regulatory T cells in multiple sclerosis patients. *PLoS One.* 2014; 9: e113025.
213. Serpero LD, Filaci G, Parodi A, et al. Fingolimod modulates peripheral effector and regulatory T cells in MS patients. *J Neuroimmune Pharmacol.* 2013; 8: 1106-13.
214. Haas J, Schwarz A, Korporal-Kunke M, et al. Fingolimod does not impair T-cell release from the thymus and beneficially affects Treg function in patients with multiple sclerosis. *Mult Scler.* 2015.
215. Song ZY, Yamasaki R, Kawano Y, et al. Peripheral blood T cell dynamics predict relapse in multiple sclerosis patients on fingolimod. *PLoS One.* 2014; 10: e0124923.
216. Mehling M, Lindberg R, Raulf F, et al. Th17 central memory T cells are reduced by FTY720 in patients with multiple sclerosis. *Neurology.* 2010; 75: 403-10.
217. Chiarini M, Sottini A, Bertoli D, et al. Newly produced T and B lymphocytes and T-cell receptor repertoire diversity are reduced in peripheral blood of fingolimod-treated multiple sclerosis patients. *Mult Scler.* 2014.
218. Grutzke B, Huckle S, Gross CC, et al. Fingolimod treatment promotes regulatory phenotype and function of B cells. *Ann Clin Transl Neurol.* 2015; 2: 119-30.
219. Polman CH, Reingold SC, Edan G, et al. Diagnostic criteria for multiple sclerosis: 2005 revisions to the "McDonald Criteria". *Ann Neurol.* 2005; 58: 840-6.

220. Polman CH, Reingold SC, Banwell B, et al. Diagnostic criteria for multiple sclerosis: 2010 revisions to the McDonald criteria. *Ann Neurol*. 2011; 69: 292-302.
221. Mao C, Wang S, Xiao Y, et al. Impairment of regulatory capacity of CD4+CD25+ regulatory T cells mediated by dendritic cell polarization and hyperthyroidism in Graves' disease. *J Immunol*. 2011; 186: 4734-43.