



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>

Tesis doctoral:

**RESPUESTA ADAPTATIVA
MEDIADA POR CÉLULAS NATURAL KILLER
EN LA ESCLEROSIS MÚLTIPLE**

Autora: Antía Moreira Villanueva

Director: Jose Enrique Martínez Rodríguez

Tutor: Jaume Roquer González

Programa de doctorado en Medicina

UAB
Universitat Autònoma
de Barcelona

Departamento de Medicina
Universidad Autónoma de Barcelona
Barcelona, 2020

Agradecimientos

A Jose E. Martínez, por encaminarme en el mundo de la neuroinmología, apoyarme y dirigirme durante todo el proceso y por su enorme paciencia y ayuda durante la realización y escritura de esta tesis.

Elvira Munteis, por enseñarme la importancia del buen trato con el paciente, por tutorizarme tanto durante la residencia, como posteriormente. Por estar siempre ahí en cada decisión difícil.

A Mireia Llop, por su apoyo incondicional cada mañana y por facilitarnos, como sólo ella sabe, nuestro trabajo diario.

A Andrea Vera, Eli Alari-Pahisa, Merce Bonastre y Ana Zabalza, por su amistad, por compartir conmigo las diferentes etapas de este proyecto y porque sin ellas esta tesis hubiese durado mucho más tiempo.

A Jaume Roquer, por ejercer como jefe y tutor, por escucharme y acompañarme desde mi inicio laboral en el mundo de la medicina, hasta este momento.

A Miguel López-Botet, por enseñarme la importancia de cada palabra escrita, aportar ideas y experiencia y apoyarnos en el desarrollo de proyectos.

A todo el servicio de Neurología del Hospital del Mar por permitirme formar parte de este gran equipo y sobre todo, por enseñarme no sólo neurología.

A todos los pacientes con esclerosis múltiple, por permitirnos seguir aprendiendo con ellos y porque sin su participación voluntaria, este proyecto nunca hubiese sido posible.

Ós meus pais, por tódolo apoio e cariño incondicional recibido e por alimentar a miña curiosidade investigadora dende ben pequena, respondendo pacientemente a tódolos meus “¿e por qué?” cun sorriso.

A Rodri, por acompañarme y estar literalmente a mi lado cada día. Por redirigirme en los momentos de duda y desesperación, facilitarme las situaciones difíciles, y por permitir que juntos, podamos seguir avanzando.

Abreviaturas

ADCC: “*Antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity*” (citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos).

BOC: Bandas oligoclonales.

CIS: “*Clinical isolated syndrome*” (síndrome clínico aislado).

DIS: “*Dissemination in space*” (diseminación en espacio).

DIT: “*Dissemination in time*” (diseminación en el tiempo).

EAE: “*Experimental autoimmune encephalomyelitis*” (encefalomielitis experimental autoinmune).

EBNA-1: “*Epstein Barr nuclear antigen-1*” (antígeno nuclear de Epstein Barr- 1).

EDSS: “*Expanded disability status scale*” (escala expandida del estado de la discapacidad).

EM: Esclerosis múltiple.

EMPP: Esclerosis múltiple primaria progresiva.

EMRR: Esclerosis múltiple remitente recurrente.

EMSP: Esclerosis múltiple secundaria progresiva.

FcR γ : Cadena gamma del complejo de señalización del receptor Fc CD16.

GWAS: “*Genome-wide association study*” (estudio de asociación del genoma completo).

HCMV: “*Human cytomegalovirus*” (citomegalovirus humano).

HHV6: “*Human herpesvirus 6*” (herpesvirus humano tipo 6).

HLA: “*Human Leucocyte Antigen*” (antígeno leucocitario humano).

IFN: Interferón.

Ig: Inmunoglobulinas.

LCR: Líquido cefalorraquídeo.

MCMV: “*Murine cytomegalovirus*” (citomegalovirus murino).

MOG: “*Myelin oligodendrocyte glycoprotein*” (glicoproteína de la mielina de oligodendrocitos).

MSSS: “*Multiple sclerosis severity scale*” (escala de gravedad en la esclerosis múltiple)

NK: “Natural Killer”.

OR: “Odds ratio”.

PBMC: “*Peripheral blood mononuclear cells*” (células mononucleares de sangre periférica).

PLP: “*Myelin proteolipid protein*” (proteína proteolipídica).

PLZF: “*Promyelocytic leukemia zinc finger*”.

RNM: Resonancia nuclear magnética.

SNC: Sistema nervioso central

TME: Tratamiento modificador de la enfermedad.

TNF: “*Tumor necrosis factor*” (factor de necrosis tumoral).

VEB: Virus de Epstein Barr.

INDICE

RESUMEN	6
1. INTRODUCCIÓN.....	10
1.1. ESCLEROSIS MÚLTIPLE.....	10
1.1.1. Epidemiología de la Esclerosis Múltiple.....	10
1.1.2. Semiología y diagnóstico	10
1.1.3. Tratamiento.....	13
1.1.4. Fisiopatología de la Esclerosis Múltiple.....	14
1.2. CÉLULAS NATURAL KILLER Y ESCLEROSIS MÚLTIPLE	20
1.2.1. Inmunología de la Esclerosis Múltiple	20
1.2.2. Inmunología de las células Natural Killer	21
1.2.3. Citomegalovirus y células Natural Killer	22
1.2.4. Papel de las células Natural Killer en la Esclerosis Múltiple	24
2. HIPÓTESIS	26
3. OBJETIVOS.....	27
4. METODOLOGÍA.....	28
5. ARTÍCULOS.....	33
5.1. Low cytomegalovirus seroprevalence in early multiple sclerosis: a case for the “hygiene hypothesis”?.....	33
5.1.1. Material suplementario Artículo 1.....	51
5.2. Adaptive Features of Natural Killer Cells in Multiple Sclerosis.	53
5.2.1. Material suplementario Artículo 2.....	66
6. RESUMEN GLOBAL DE RESULTADOS	70
7. RESUMEN GLOBAL DE LA DISCUSIÓN.....	77
8. CONCLUSIONES.....	82
9. LÍNEAS DE FUTURO.....	84
10. BIBLIOGRAFÍA.....	85
11. ANEXOS:.....	102
Anexo 1: Proyectos financiados.....	102

RESUMEN

La esclerosis múltiple (EM) es una enfermedad inflamatoria desmielinizante del sistema nervioso central que presenta un curso clínico impredecible y heterogéneo. En el desarrollo de la EM intervienen factores genéticos y medioambientales, destacando entre estos últimos la influencia de infecciones por herpesvirus. Concretamente, el Virus de Epstein Barr (VEB) es un herpesvirus que se ha asociado en base a múltiples estudios seroepidemiológicos con un mayor riesgo de desarrollo de la enfermedad, estando presente de forma prácticamente universal en los pacientes con EM y relacionándose los títulos de inmunoglobulina G (IgG) frente al antígeno nuclear de Epstein Barr-1 (EBNA-1), con un mayor riesgo de conversión a EM. Por el contrario, el citomegalovirus podría conferir una menor susceptibilidad al desarrollo de la EM.

En la inmunopatología de la EM intervienen tanto linfocitos T como B, implicándose también el sistema inmune innato, destacando dentro de este último las células “*natural killer*” (NK). En este sentido, el citomegalovirus (HCMV) es uno de los factores ambientales más influyentes a la hora de modificar el sistema inmune, incrementando la población de células T de memoria específicas para el virus, así como induciendo cambios en el compartimento NK, produciendo una expansión en algunos sujetos de células NK adaptativas que expresan el receptor activador NKG2C(+) que ha sido asociado con un menor riesgo de progresión de la enfermedad. Recientemente se han descrito otros cambios adaptativos adicionales a la expresión de NKG2C(+) asociados a la infección crónica por el HCMV, como la silenciamiento epigenético del factor de transcripción PLZF (“*promyelocytic leukemia zinc finger*”) y la pérdida de la cadena gamma en el complejo de señalización del receptor Fc CD16 (FcR γ) que se ha asociado con una mayor actividad NK mediante citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (ADCC: “*Antibody Dependent Cell-mediated Cytotoxicity*”).

El objetivo del presente trabajo fue evaluar los cambios inducidos por el HCMV en el compartimento NK, tanto en su inmunofenotipo como en su función, estudiando las implicaciones de la respuesta adaptativa NK en la clínica de los pacientes con EM, teniendo en cuenta la seroprevalencia del HCMV, así como su posible impacto sobre el control de otras infecciones virales que podrían estar implicadas en la enfermedad, tal como la del VEB.

En nuestro estudio, observamos una menor seroprevalencia del HCMV en fases iniciales de la enfermedad, así como una correlación negativa, en sujetos HCMV(+), entre el tiempo de evolución de la enfermedad y la respuesta humoral determinada por los títulos de anti-EBNA-1, lo que podría indicar un mayor control de la infección por VEB en aquellos casos con infección crónica por HCMV, e implicando posibles mecanismos de inmunidad heteróloga entre el HCMV y el VEB. Adicionalmente, los individuos HCMV(+), independientemente de la presencia de la enfermedad, mostraron una mayor proporción de células T diferenciadas terminales, implicando que la presencia de células T menos diferenciadas en pacientes HCMV(-) podría conferir mayor susceptibilidad a desarrollar procesos inflamatorios.

Posteriormente, se analizó la influencia del HCMV en el compartimento NK, encontrando que la infección crónica por el virus se asoció a un inmunofenotipo adaptativo en estos linfocitos, caracterizado por una mayor expresión de NKG2C, así como una menor expresión de FcR γ y PLZF, tanto en controles sanos como en pacientes con EM, pero con diferencias en la distribución de marcadores adaptativos en las células NK en pacientes, influenciadas por la forma clínica de la enfermedad y el tratamiento con interferón-beta. Asimismo, la expresión de NKG2C(+) asociado a la infección crónica por HCMV se encontró relacionada a una menor discapacidad ya desde fases iniciales de la enfermedad, apoyando la hipótesis del HCMV como posible factor protector para el desarrollo de la misma. Adicionalmente, se observó una mayor pérdida de PLZF en pacientes con esclerosis múltiple seronegativos para el citomegalovirus con respecto a los controles, sugiriendo que otros factores independientes al HCMV podrían inducir el desarrollo de marcadores adaptativos en las células NK en el contexto de la EM.

Por último, nuestro estudio evaluó la influencia del inmunofenotipo NK en la función de estos linfocitos en pacientes con EM, encontrando que la actividad citotóxica mediada por anticuerpos de las células NK contra linfocitos B infectados por virus de Epstein Barr puede diferir en la esclerosis múltiple en relación a su forma clínica, siendo menor en pacientes con formas primarias progresivas, y que, al contrario que en sujetos sanos, un inmunofenotipo adaptativo en la EM, no se asoció a una mayor actividad celular dependiente de anticuerpos en la enfermedad, apoyando la hipótesis de una menor respuesta NK adaptativa en pacientes con EM.

ABSTRACT

Multiple Sclerosis (MS) is an inflammatory demyelinating disease of the central nervous system characterized by a highly variable clinical course. Both genetic and environmental factors are involved in the development of MS, with a remarkable influence of herpesvirus infections. Epstein-Barr Virus (EBV) is associated with an increased risk of MS, which is supported by seroepidemiological studies, describing a universal seroprevalence of EBV in MS patients and a higher risk of MS conversion associated with elevated Epstein-Barr virus nuclear antigen-1 (EBNA-1) immunoglobulin G titers. By contrast, human cytomegalovirus was recently related to lower MS susceptibility.

T cells and, recently B lymphocytes, are involved in MS immunopathogenesis. In addition, the innate immune system, and in particular, natural killer (NK) cells, have also been implicated in the disease. In this regard, HCMV exerts a profound impact on the immune system, increasing HCMV specific memory T cells, and promoting a persistent reconfiguration of the NK cell compartment characterized by an expansion of NKG2C(+) NK cells, which have been associated with lower disability risk in MS patients. Additional associated-adaptive NK cell markers include the epigenetic silencing of the promyelocytic leukemia zinc finger (PLZF) transcription factor, and the loss of the gamma chain adaptor coupled to CD16 (FcR γ), which has been related to higher antibody dependent cell-mediated cytotoxicity (ADCC) by NK cells.

The aim of the present work was to evaluate HCMV-induced changes on the NK cell compartment in MS. We evaluated the NK cell adaptive immunophenotype as well as the function of these lymphocytes, assessing the implications of the adaptive NK cell response in the clinical course of MS patients, as well as the impact of HCMV chronic infection on humoral responses to other herpesvirus infections (i.e., EBV) involved in the disease.

We observed a low HCMV seroprevalence in early MS patients that was independent of age. Moreover, HCMV(+) early MS patients had an inverse correlation between MS duration and the humoral response to EBV determined by anti-EBNA-1 IgG index, which might suggest a higher immune control of EBV infection in HCMV(+) cases by mechanisms of heterologous immunity between both viruses. In addition, HCMV(+)

MS patients had a higher proportion of differentiated terminal T cells as compared to HCMV(-) cases independently of other clinical characteristics, suggesting that the differentiation of the T cell compartment might be involved in the putative protective role of HCMV in MS.

Evaluating the HCMV influence on the NK cell compartment, we found that chronic HCMV infection was associated to an adaptive NK cell immunophenotype, that was characterized by higher expression of NKG2C, and lower of FcR γ and PLZF in NK cells, both in healthy controls and MS patients. However, adaptive NK cell markers in patients were influenced by MS clinical form and treatment with interferon beta. Moreover, a higher NKG2C(+) expression in NK cells was related to lower MS disability in early MS patients, supporting the hypothesis that HCMV may reduce MS risk. Additionally, we observed a higher PLZF loss in HCMV(-) MS patients as compared to controls, suggesting that other factors independent to HCMV infection could induce the expression of the adaptive NK cell markers in the context of MS.

Finally, we evaluated the influence of the adaptive NK cell immunophenotype on the function of these lymphocytes in MS. We found that antibody dependent cell-mediated cytotoxicity (ADCC) responses by NK cells against EBV(+) lymphoblastoid cell lines may differ in relation to MS clinical form, perceiving a lower ADCC function in primary progressive MS patients. Furthermore, in contrast to healthy controls, an adaptive immunophenotype was not associated to higher ADCC in MS. Overall, our results provides further insights on the putative protective role of HCMV in MS, suggesting that an adaptive NK cell response induced by chronic HCMV infection may be deficient in MS patients.

1. INTRODUCCIÓN

1.1.ESCLEROSIS MÚLTIPLE

1.1.1. Epidemiología de la Esclerosis Múltiple

La Esclerosis Múltiple (EM) es una enfermedad inflamatoria desmielinizante del sistema nervioso central (SNC) de etiología desconocida caracterizada por un curso clínico impredecible y heterogéneo. La EM es una de las principales causas de discapacidad en adultos jóvenes, con una prevalencia estimada de unos 2,3 millones de pacientes a nivel mundial. En nuestro medio, estudios recientes muestran que aproximadamente 80-100 pacientes/100.000 habitantes en España padecen la enfermedad (1). La EM se presenta predominante en el sexo femenino, con una proporción mujer/hombre de 1,5-2,5/1 (2), iniciándose en la mayoría de los pacientes entre los 20 y los 40 años, aunque se han descrito casos en la primera e incluso en la octava década de la vida (3,4).

La prevalencia de EM varía según la latitud, siendo menor en regiones cercanas al ecuador, y mayor en zonas de Norteamérica, sur de Australia y Europa del Norte. Se cree que esta mayor proporción en zonas de menor exposición solar podría estar en relación con una baja concentración de vitamina D (5). No obstante, otros factores ambientales podrían jugar un papel adicional en el desarrollo de la EM.

En los últimos años se ha descrito un aumento en el número de pacientes con EM. Sin embargo, no está claro si este aumento se debe a una mayor incidencia real de la enfermedad, a un mayor acceso al sistema sanitario de los pacientes en relación con una mayor disponibilidad de pruebas diagnósticas, y/o a cambios en los criterios diagnósticos que permiten realizar un diagnóstico precoz de la enfermedad (6).

1.1.2. Semiología y diagnóstico

La clínica y forma de presentación de la EM es muy variable y heterogénea. El 85% de los pacientes se presentan con un curso clínico denominado remitente-recurrente (EMRR), caracterizado por una presentación semiológica de la enfermedad en forma de

brotos de afectación neurológica focal o multifocal con una duración mayor a 24h, en ausencia de fiebre o clínica infecciosa, y que puede presentar una recuperación parcial o completa posteriormente. Los estudios de historia natural de la enfermedad describen que tras 10-20 años de evolución, aproximadamente la mitad de los pacientes con EMRR desarrollan una discapacidad progresiva, independientemente de la presencia de brotes (Esclerosis Múltiple Secundaria Progresiva, EMSP). Sin embargo, estudios más recientes han reportado un menor porcentaje de transición a EMSP (7), que podría estar relacionado con el uso de fármacos modificadores de la enfermedad (8). Entre un 10-15% de los pacientes pueden presentar un cuadro progresivo desde el inicio (Esclerosis Múltiple Primaria Progresiva, EMPP). Actualmente, se tiende a categorizar las formas de esclerosis múltiple tanto las formas en brotes, como las progresivas, según la presencia de actividad clínica (brotes) o radiológica (presencia de captación de gadolinio por Resonancia Nuclear Magnética (RNM)), siendo posible categorizar las formas progresivas en activas o no activas (9).

Las manifestaciones clínicas de la EM vienen definidas por la localización de las lesiones, presentándose a nivel clínico de forma heterogénea. Sin embargo, dado que las lesiones tienen una predilección por ciertas áreas topográficas del SNC, la semiología puede presentarse de una forma típica sugestiva de la enfermedad. Los síntomas característicos de la enfermedad pueden ser sensitivos, alteraciones motoras, visuales, trastornos de la coordinación, disfunción sexual, alteraciones genitourinarias o intestinales, y trastornos afectivos o cognitivos.

La discapacidad de la enfermedad se mide en la práctica clínica a través de la escala EDSS (*Expanded Disability Status Scale, EDSS*) de Kurtzke (10) que puntúa mediante una escala ordinal de forma ascendente de 0 a 10, evaluando 8 sistemas funcionales, y teniendo en cuenta la capacidad del paciente para la deambulación con o sin necesidad de apoyos. Otra escala utilizada para evaluar la discapacidad es la MSSS (*Multiple Sclerosis Severity Score*) que permite cuantificar la discapacidad del paciente, mediante una variable continua medida mediante el EDSS en función de la duración de su enfermedad (11).

El diagnóstico de la enfermedad, basado en los criterios diagnósticos McDonald 2010 (12), y revisados en 2017 (13), se realiza a través de hallazgos clínicos y de

neuroimagen, apoyados por otras pruebas paraclínicas de laboratorio, así como la exclusión razonable de otros diagnósticos. Estos criterios precisan la demostración de la diseminación de la enfermedad tanto en espacio (lesiones en diferentes localizaciones típicas de la enfermedad) como en tiempo (al menos dos brotes típicos de la enfermedad, separados por al menos 30 días, o presencia de nuevas lesiones en RNM o en diferente fase evolutiva). A nivel de neuroimagen, la diseminación en espacio (DIS) mediante RNM, puede demostrarse por la presencia de una o más lesiones hiperintensas en T2, características de la enfermedad, en 2 o más de las cuatro áreas típicas del SNC: periventriculares, corticales o yuxtacorticales, infratentoriales y/o medulares. La diseminación en tiempo (DIT) puede demostrarse por la presencia simultánea de lesiones captantes y no captantes de gadolínio en una única RNM, o por la aparición de nuevas lesiones hiperintensas en T2 o captantes de gadolinio en una RNM de control.

El estudio del LCR de los pacientes es útil para evaluar la presencia de Bandas Oligoclonales (BOC), presentes en hasta un 87% de pacientes con EM (14). Es un criterio relevante para el diagnóstico de los pacientes con EMPP (12), y también en casos en los que el paciente sólo ha presentado un único evento clínico o brote, (CIS: *Clinically Isolated Syndrome*), donde la presencia de BOC, siempre que por RNM cumpla criterios de DIS, puede sustituir al criterio de DIT para establecer el diagnóstico de EM (13,15).

El diagnóstico de EMPP, según los criterios actuales, requiere la evidencia de progresión clínica durante al menos 1 año, y al menos dos de tres de las siguientes características: DIS en RNM según lo previamente descrito, dos o más lesiones en T2 a nivel medular, o presencia de bandas oligoclonales (BOC) en líquido cefalorraquídeo (LCR) (13).

1.1.3. Tratamiento

El tratamiento de la enfermedad puede clasificarse en tratamiento del brote, tratamiento inmunomodulador con fármacos modificadores de la enfermedad, y tratamiento sintomático.

- Tratamiento del brote:

El objetivo del tratamiento del brote con corticoides a altas dosis es la reducción de la duración del mismo (16). Sin embargo, su efecto a largo plazo sobre la reducción de la discapacidad de la enfermedad no está demostrado. Actualmente, el régimen recomendado es la administración de metilprednisolona endovenosa en bolus de 1g/día durante 3 o 5 días (17). Recientemente, nuevos estudios sugieren que el uso de una pauta oral de 1 g o 500 mg de metilprednisolona podría tener la misma eficacia sobre el brote, con similares efectos adversos (18).

En los casos en los que el tratamiento con metilprednisolona no es efectivo, diferentes estudios apoyan el uso de la plasmaféresis en brotes graves con importante discapacidad (19). Asimismo, existen algunos datos a favor del uso de inmunoglobulinas endovenosas para el tratamiento del brote, con resultados más controvertidos.

- Tratamiento modificador de la enfermedad (TME):

Se denominan tratamientos modificadores de la enfermedad a aquellos fármacos que consiguen la reducción del número de brotes, así como de la discapacidad secundaria a los mismos. Actualmente, el tratamiento de la EM se basa en intentar suprimir la actividad inflamatoria. Para ello, disponemos de múltiples fármacos con diferentes mecanismos de acción y efectos adversos. En general, se denominan fármacos de moderada eficacia a aquellos fármacos que, a pesar de tener una menor eficacia, son fármacos más seguros, y se consideran los fármacos de elección para el tratamiento inicial de pacientes con EM activa (utilizando una aproximación de terapia de escalado). En aquellos pacientes que presentan una forma de inicio agresiva o de muy alta actividad, donde es asumible un mayor riesgo de efectos adversos a expensas de una más alta eficacia, se usarían fármacos

de alta eficacia (en un contexto de terapia de inducción), con el objetivo de conseguir una mayor tolerancia inmunológica modificando el sistema inmune.

Como fármacos de moderada eficacia actualmente tenemos el interferón beta, el acetato de glatirámico, la teriflunomida y el dimetil fumarato. En caso de fallo terapéutico con dichos fármacos o ante casos de inicio clínico agresivo, se dispone de fármacos de alta eficacia, como el fingolimod, natalizumab, ocrelizumab, cladribina y alemtuzumab, de mayor eficacia demostrada frente a un comparador activo (en general interferón o teriflunomida), a expensas de una mayor complejidad en cuanto a seguridad y potenciales efectos adversos.

1.1.4. Fisiopatología de la Esclerosis Múltiple

La EM se considera una enfermedad autoinmune, interviniendo en su desarrollo una interacción compleja entre factores genéticos y medioambientales. Actualmente se postula que la EM se desarrolla en sujetos genéticamente predispuestos en los que se desencadena un proceso autoinmune mediado por células T autorreactivas específicas frente antígenos mielínicos del SNC sobre las que se han alterado los mecanismos de regulación inmunológica, conduciendo a su paso por la barrera hematoencefálica y desencadenando desmielinización y daño axonal en el SNC (20).

Factores genéticos

La EM se considera una enfermedad con un componente genético, presentando entre un 10-20% de los pacientes algún familiar afectado con la enfermedad (21–23). Hoy en día sabemos que la tasa promedio de concordancia de EM para gemelos monocigotos es de aproximadamente un 25%, y de un 5% para gemelos dicigotos (24). Dos hechos llaman la atención de estos datos. Por un lado, la evidente mayor concordancia en gemelos monocigotos que en dicigotos y, por otro lado, la proporción significativa de gemelos monocigotos que no son concordantes, lo que sugiere que los factores genéticos por sí solos no son suficientes para desarrollar la enfermedad, sino que incrementan la susceptibilidad a la misma, siendo la interacción de esta susceptibilidad genética en

asociación con otros factores medioambientales, lo que condiciona el desarrollo de la enfermedad (25).

Existe una asociación del haplotipo HLA-DR15 (HLA, “*Human Leucocyte Antigen*”) con una mayor susceptibilidad para padecer la EM, con una “*odds ratio*” (OR) 3.1 para el alelo HLA-DRB1*1501 (26), así como una menor contribución de otros genes identificados mediante estudios GWAS (“*Genome-wide association study*”), estando la gran mayoría de ellos relacionados con el funcionamiento del sistema inmune, lo que apoyaría la hipótesis de autoinmunidad desarrollada en un contexto de susceptibilidad genética. De estos, destacan los alelos que codifican los genes de IL2R α e IL7R α (27), implicados en la homeostasis de las células T (28), así como otros genes implicados en vías de señalización de citoquinas (Ej: CXCR5, IL7, IL12RB1, IL22RA2, IL12A, IL12B, IRF8, TNFRSF1A, TNFRSF14, TNFSF14), moléculas coestimuladoras (Ej: CD37, CD40, CD58) y señales de traducción (Ej: STAT3, MALT1, TYK2). También se han descrito genes relacionados con otros factores de riesgo ambientales como la vitamina D (CYP27B1, CYP24A1), con los mecanismos de acción de los diferentes TME tales como el natalizumab (VCAM1) y daclizumab (IL2RA), así como con el funcionamiento de linfocitos T, B, células NK, células mieloides y microglia (29).

Factores ambientales

Se han descrito múltiples factores ambientales que pueden influir en el desarrollo de la enfermedad. Entre ellos destacan los niveles bajos de vitamina D, la exposición al tabaco (30), ambos asociados en diferentes estudios de forma negativa con la enfermedad (31–34), y que podría deberse a la relación de ambos factores con modificaciones inmunes que condicionarían un estado proinflamatorio (35). No obstante, uno de los factores ambientales en la EM más ampliamente estudiados es la asociación a infecciones crónicas por herpesvirus (36).

- Virus de Epstein-Barr y Esclerosis Múltiple

El virus de Epstein-Barr (VEB) es un γ -herpesvirus altamente prevalente en nuestro medio con una prevalencia en la población general de aproximadamente un 90-95%. La

primoinfección suele producirse en la infancia, y suele ser asintomática o subclínica. Sin embargo, cuando esta primoinfección se produce en la adolescencia o al inicio de la edad adulta, puede producir síntomas y manifestarse como una mononucleosis infecciosa en un 30-40% de los infectados, desarrollando fiebre, adenopatías, amigdalitis, mialgias, hepatomegalia y fatiga. En contexto de una inmunosupresión, la primoinfección por VEB puede dar lugar a complicaciones graves, como, por ejemplo, en sujetos con la enfermedad de Duncan, un síndrome linfoproliferativo ligado al cromosoma X, donde la infección por el VEB puede llegar a ser mortal. Tras la primoinfección, el virus se mantiene de forma persistente en sujetos inmunocompetentes, estableciendo una infección latente con un reservorio en linfocitos B, pudiendo, hipotéticamente, modular su función y favorecer el desarrollo de trastornos autoinmunes (37). Las células B infectadas por VEB podrían mantener una población de células B autorreactivas, facilitando su maduración a células B de memoria y su interacción con células T (38,39).

La mayoría de los estudios seroepidemiológicos apuntan a una asociación del VEB con la EM, encontrándose de forma prácticamente universal en todos los pacientes, en contraposición con aproximadamente el 90% de los sujetos sanos (40). Así mismo, existe un riesgo aumentado de desarrollar la enfermedad en aquellos sujetos que han padecido una mononucleosis infecciosa (41,42). En apoyo de la influencia del VEB en el desarrollo de la enfermedad, se ha descrito que los pacientes con EM presentan una mayor respuesta de linfocitos T específicos para el antígeno EBNA-1 (antígeno nuclear de Epstein Barr-1) frente antígenos mielínicos (43), y se han relacionado los títulos de inmunoglobulina G (IgG) EBNA-1 con un mayor riesgo de conversión a una EM definida desde estadios iniciales de la enfermedad (44).

En diferentes estudios patológicos de pacientes con EM se ha evaluado la presencia del VEB en lesiones desmielinizantes y en infiltrados linfoides formando folículos linfoides ectópicos en las meninges de pacientes con formas progresivas, aunque con resultados controvertidos según los estudios (45–48). Recientemente, un estudio realizado en tejido cerebral postmortem en pacientes con EM describe la presencia de VEB en más del 90% de los pacientes (91/101), contrastando con su detección en tan solo una pequeña proporción de controles, además de observar la presencia del virus no sólo en células B sino también en microglía y astrocitos, planteándose estos autores un

potencial papel patogénico del VEB en la enfermedad (49).

Por todo ello, el VEB se considera como el principal patógeno relacionado con la EM, en la que jugaría un papel como factor *sine qua non* (50,51), pero sin que se haya podido demostrar de forma fehaciente hasta la fecha un papel patogénico directo en la enfermedad.

- Citomegalovirus y Esclerosis Múltiple

En contraposición al VEB, el citomegalovirus humano (HCMV: *Human Cytomegalovirus*) ha sido relacionado en los últimos años con un menor riesgo de EM (52). El HCMV es un β -herpesvirus altamente prevalente en la población general con una frecuencia variable (40-100%) dependiendo de la edad y asociado de forma inversa con el nivel socioeconómico (53). Similar a otros herpesvirus, la primoinfección suele producirse en la infancia, siendo asintomática o subclínica en la mayoría de los casos, pero con una alta morbimortalidad en pacientes inmunosuprimidos. Asimismo, la infección congénita por el virus, mediante transmisión vertical, es la principal causa de malformaciones perinatales de etiología infecciosa, produciendo hipoacusia neurosensorial y microcefalia en neonatos (54). El HCMV tiene capacidad para infectar diferentes subtipos celulares, manteniéndose el virus de forma persistente en fase de latencia en progenitores mieloides CD34(+) (55).

Diversos estudios seroepidemiológicos, realizados tanto en población pediátrica (56,57) como en población adulta (52,58) relacionan al HCMV con una menor probabilidad de desarrollar EM. En este sentido, es importante destacar el interés de los estudios seroepidemiológicos en población pediátrica en la búsqueda de potenciales factores desencadenantes o protectores, dado que el inicio de la enfermedad está probablemente más próximo en el tiempo a dichos factores. Sin embargo, existe controversia en cuanto al papel protector o predisponente del HCMV en el desarrollo de la enfermedad, sin encontrarse diferencias en seroprevalencias en algunos metaanálisis (59) o encontrándose en otros estudios una mayor prevalencia de HCMV en una cohorte de pacientes con EM de origen iraní (60). En todo caso, la mayoría de las evidencias epidemiológicas sugieren un posible papel protector del HCMV sobre la enfermedad, pero sin poder dilucidar si este hallazgo es simplemente un epifenómeno relacionado con

la exposición a otros factores ambientales (dígase, VEB), o si el HCMV juega un papel activo en la fisiopatología de la enfermedad.

Diversos estudios inmunológicos sobre la relación del HCMV con la EM aportan una visión adicional con respecto a los estudios epidemiológicos. En pacientes con EM, títulos altos de anticuerpos contra el HCMV se han asociado a un mejor pronóstico clínico y radiológico, observándose en pacientes con títulos altos de IgG-HCMV un mayor volumen cerebral y menor número de lesiones en T2 en RNM (61), sugiriendo que los cambios secundarios a la infección por el HCMV en el sistema inmune podrían tener un papel inmunorregulador de la enfermedad. Este efecto protector del citomegalovirus también ha sido observado en modelos murinos (62), en los que se observó que la infección previa por el citomegalovirus murino (MCMV) atenuaba el curso clínico de la enfermedad, relacionándose con un menor infiltrado cerebral por células CD3(+). Sin embargo, en otros trabajos se ha observado un aumento de la discapacidad en modelos murinos de EAE MCMV(+), que se correlacionaron con la expansión de células T CD4(+) CD28^{null} citotóxicas inducidas por el virus (63). No obstante, es importante destacar que, en estos estudios, el papel de la infección por MCMV fue evaluado en un contexto de primoinfección en el modelo murino, un escenario que puede diferir del de la infección crónica latente presente en pacientes con EM.

En relación a la posible relación del HCMV con la EM, existen diferentes hipótesis que relacionan el virus con el desarrollo o modulación de enfermedades autoinmunes (55,63), tales como la presencia de epítomos con reactividad cruzada entre el HCMV y el péptido encefalitogénico MOG (“*myelin oligodendrocyte glycoprotein*”), sugiriendo un papel patogénico del virus; sin embargo, la administración de dicho péptido en modelos de primates no humanos no ha conseguido reproducir la enfermedad (64). En todo caso, recientemente ha sido descrito el HCMV como uno de los factores ambientales más influyentes a la hora de modificar el sistema inmune (65), abriendo la posibilidad de que este virus pueda modular respuestas inmunes en determinados contextos patológicos, tal como podría ocurrir en el caso de la EM u otras enfermedades de etiología autoinmune (55). Así mismo, la posibilidad de inmunidad heteróloga entre virus (dígase HCMV y VEB) podría tener implicaciones inmunológicas adicionales en el contexto de estas patologías (66,67).

- Otros virus implicados en la Esclerosis Múltiple

Además de las asociaciones descritas previamente con el VEB y el HCMV, otros virus, tales como el herpesvirus humano tipo 6 (HHV6), también se han asociado con la enfermedad (68). El HHV6 es un virus linfotrópico y neurotrópico, que puede infectar astrocitos en SNC (69), y se ha demostrado su presencia en lesiones desmielinizantes (68). Asimismo, la presencia del virus en sangre se ha asociado a una peor respuesta al tratamiento con IFN β y a un aumento del número de brotes (70). En este sentido, se ha descrito una replicación activa del HHV6 en sangre periférica de pacientes con EM asociada a la presencia de un polimorfismo del gen MHC2TA, el cual regula la expresión de las moléculas HLA de clase II, además de estar relacionado con una mejor respuesta a IFN β (71).

1.2.CÉLULAS NATURAL KILLER Y ESCLEROSIS MÚLTIPLE

1.2.1. Inmunología de la Esclerosis Múltiple

El papel de los linfocitos T en la EM ha sido sustentado desde el desarrollo del modelo murino de encefalomielitis alérgica experimental (*Experimental Autoimmune Encephalomyelitis*, EAE), destacando una implicación de linfocitos T CD4(+) Th1 y Th17 autorreactivos (72–74). La involucración de células T CD4(+) en la fisiopatología de la EM en humanos estaría apoyada, así mismo, por los estudios genéticos que confirman un mayor riesgo de EM conferido por el HLA de clase II (HLADRB1_1501/HLADRB5_0101) (27). No obstante, en pacientes con EM es característico encontrar un mayor infiltrado de linfocitos T CD8(+) en estudios anatomopatológicos de lesiones del SNC (75), también sustentada dicha asociación por estudios genéticos que relacionan, en menor medida alelos HLA de clase I con la EM (26).

En los últimos años, la implicación de los linfocitos B en la EM ha adquirido un papel relevante gracias a los resultados favorables obtenidos con terapias depletoras de células B, sugiriendo un posible papel de estos linfocitos en funciones inmunológicas de presentación de antígenos y producción de citoquinas, además de la clásica producción de anticuerpos (76). La presencia de gammaglobulinas en LCR descrita por Kabat en 1942, y la posterior evidencia de bandas oligoclonales en LCR, descrita en por Karcher en 1959, fueron las primeras evidencias para involucrar a estos linfocitos en la patología de la EM, sustentando una producción intratecal de inmunoglobulinas por clones de células B, aunque se desconoce si juegan un papel patogénico en la enfermedad. Así mismo, la presencia de bandas IgM lípido-específicas en LCR se ha asociado con una mayor conversión de CIS a EM, así como a una mayor actividad y progresión de la enfermedad (77). La descripción por algunos autores de la presencia de folículos linfoides ectópicos en meninges con células B infectadas por VEB en la fase progresiva de la enfermedad (EMSP), apoyaría el papel patogénico de los linfocitos B, asociados también a lesiones corticales subpiales (47).

La EM se caracteriza por múltiples lesiones focales (placas) predominantemente en la sustancia blanca del SNC, aunque también puede afectar a la sustancia gris, tanto cortical como profunda, en la médula y el tronco encefálico, en las que se produce un infiltrado inflamatorio, con desmielinización, la formación de una cicatriz astrocitaria y una pérdida axonal. Estas lesiones, pueden ser parcial o completamente remielinizadas, variando el grado de remielinización entre pacientes. Asimismo, también se produce un proceso de neurodegeneración difusa en la sustancia blanca y sustancia gris de apariencia normal, que da lugar a atrofia cerebral, que puede ser cuantificable desde el inicio de la enfermedad, siendo mayor en formas progresivas (78).

Las placas desmielinizantes, pueden diferenciarse en lesiones activas, caracterizadas por una importante disrupción de la barrera hematoencefálica, presentes sobre todo en pacientes con EMRR, donde predominan células T CD8(+) y macrófagos que infiltran de forma difusa el parénquima cerebral afectado, con presencia de células B, y escasas células plasmáticas, únicamente a nivel perivascular; lesiones crónicas activas o en lenta expansión, caracterizadas por la preservación de la barrera hematoencefálica y que pueden observarse tanto a nivel cortical como en la sustancia blanca, con actividad inflamatoria desmielinizante en la periferia de la lesión, dependiente de microglía activada, con mínima o ausencia de infiltración de linfocitos a nivel cortical o de la sustancia blanca, observándose únicamente un infiltrado de células T CD8(+), células B CD20(+) y células plasmáticas a nivel meníngeo en las lesiones corticales o perivascular en las lesiones de sustancia blanca. Se cree que la desmielinización y neurodegeneración asociada a estas lesiones, podría depender de factores solubles liberados por las células inflamatorias presentes a nivel perivascular o meníngeo (78).

1.2.2. Inmunología de las células Natural Killer

Las células Natural Killer (NK) son linfocitos del sistema inmune innato especializados en la defensa contra virus y células tumorales, así como implicadas en la regulación de la respuesta inmune adaptativa (79). Las células NK carecen de receptores antígeno-específicos, en contraposición al sistema inmune adaptativo, siendo su función determinada por un complejo equilibrio entre receptores NK activadores (ej. CD16,

NKG2D, CD266, NKp30, NKp44, DNAM-1, KIRs activadores) e inhibidores (ej. CD94/NKG2A, ILT2, KIRs inhibidores), existiendo diferentes subtipos de células NK con diferentes estadios de maduración y expresión clonal de receptores. Entre otras señales inhibitoras, la función de células NK está controlada por el reconocimiento específico de moléculas HLA de clase I, implicando la pérdida de expresión de estas moléculas en las células diana (“missing self” hypothesis), tal como ocurre en células tumorales o infectadas por virus, la activación de células NK y la consiguiente inducción de la muerte celular. Una vez activadas, las células NK producen citoquinas que pueden inducir la muerte celular, mediante degranulación de perforinas y granzimas o induciendo la apoptosis vía producción de TNF α o la vía FasL/TRAIL (80).

Las células NK constituyen entre un 5-25% del total de linfocitos circulantes, y, en humanos, se clasifican en función de la expresión de CD56 y CD16, siendo el subtipo celular CD56^{dim} (CD56^{dim} CD16+) el más frecuente en sangre periférica (90% aproximadamente), caracterizado por su función citotóxica tanto directa como mediada por anticuerpos al interactuar con el receptor CD16 (Fc γ RIIIA); las células CD56^{bright} (CD56^{bright} CD16-), que suponen hasta un 10% de las NK en sangre periférica, son las predominantes en tejidos periféricos, con una menor función citotóxica, pero presentando una mayor función de secreción de citoquinas (81,82).

1.2.3. Citomegalovirus y células Natural Killer

La relación virus-huésped inducida por el HCMV implica la movilización de importantes recursos inmunológicos para poder controlar la infección. Los linfocitos T y células NK juegan un papel principal en el control del HCMV, pero este, a su vez, ha desarrollado diferentes mecanismos de evasión inmune que le permiten permanecer de forma latente en el huésped. En este sentido, el HCMV se ha relacionado con procesos de inmunosenescencia inmunológica, incrementando con la edad el reservorio de linfocitos T CD8(+) HCMV específicos (83,84)

Así mismo, la infección crónica por HCMV induce en algunos sujetos cambios persistentes y variables en el repertorio de receptores NK, expandiendo, como sello característico de la infección por HCMV, una subpoblación de células NK maduras

caracterizadas por la expresión en superficie del receptor activador CD94/NKG2C con características distintivas a nivel fenotípico y funcional, y con mayor capacidad para funciones efectoras dependientes de anticuerpos, en particular, para la producción de citoquinas proinflamatorias (85–87). La expansión de células NK NKG2C(+) ha sido descrita en el contexto de otras infecciones virales agudas o crónicas, pero siempre sistemáticamente asociada a una coinfección por el HCMV(86). La expansión de células NK NKG2C(+) guardaría analogía con la descrita en el modelo murino de infección por MCMV en el que se expande una población de células NK Ly49(+) que confiere respuesta de “memoria” o adaptativa a subsecuentes reinfecciones por el virus (88). La expansión de las células NK NKG2C(+) asociadas a la infección por HCMV está adicionalmente influenciada por factores genéticos, existiendo en individuos sanos de diferentes poblaciones estudiadas, una delección del gen *NKG2C* de forma homocigota y heterocigota que oscila entre un 4% y un 30%, respectivamente (89,90). El número de copias del gen *NKG2C* confiere no tan solo una diferencia en la expresión de superficie del receptor NKG2C en células NK (91), sino modificaciones adicionales en la respuesta funcional de la célula ante el acoplamiento del receptor (87).

Recientemente han sido descritos otros mecanismos adaptativos asociados a la infección por HCMV adicionales a la expansión NKG2C(+), tales como la silenciación epigenética de la expresión de moléculas adaptadoras de señal (por ej. Syk, Eat2, FcR γ) y factores de transcripción (PLZF, HELIOS e IKZF2). Concretamente, la pérdida de la cadena γ en el complejo de señalización del receptor Fc CD16 (FcR γ), y su reemplazo por una cadena ζ , se ha asociado con una mayor capacidad para mediar citotoxicidad celular mediada por anticuerpos (ADCC: *Antibody Dependent Cell-mediated Cytotoxicity*) (87,92). Por otro lado, Schlums et al. sugieren que la silenciación epigenética del PLZF (“*promyelocytic leukemia zinc finger*”) implicaría a células NK adaptativas con pérdida de la expresión FcR γ , SYK y/o EAT2. Sin embargo, la implicación funcional en las células NK de la silenciación de este factor de transcripción, no es bien conocida actualmente (93).

Estos mecanismos adaptativos de células NK se han descrito en sujetos seropositivos para HCMV, y se han relacionado estrechamente con la expansión de NKG2C(+), pero podrían adquirirse de forma independiente durante la diferenciación

celular, detectándose pérdida de la cadena gamma y de PLZF en sujetos HCMV(+) sin expansión de NKG2C (87,93,94). No obstante, los mecanismos moleculares y celulares que subyacen el desarrollo de las células NK adaptativas son parcialmente conocidos hasta la fecha.

1.2.4. Papel de las células Natural Killer en la Esclerosis Múltiple

El papel de las células NK en la fisiopatología de la EM ha sido evaluado en diversos estudios, reportando tanto un posible papel patogénico como protector para la enfermedad. En relación a un posible efecto perjudicial en la EM, las células NK son capaces de inducir la muerte de oligodendrocitos (95), y en modelos murinos se ha evidenciado que un aumento de IL-18 empeora la enfermedad al inducir células T autorreactivas contra el SNC mediado por la secreción de IFN γ por células NK (96). Asimismo, recientemente se ha observado que las células NK pueden estar implicadas en la producción de desmielinización perivascular en lesiones corticales de pacientes con EM (97).

No obstante, la mayoría de los estudios parecen sustentar un papel beneficioso de las células NK en la EM, reportando una peor evolución clínica en casos en que la función NK es deficiente. En este sentido, existe una reducción del número y de la función de células NK precediendo al desarrollo de brotes y nuevas lesiones en la RNM (98,99), habiéndose descrito una actividad citolítica deficiente en sangre periférica en pacientes con EM (100,101).

En modelos de EAE, la depleción de células NK induce una exacerbación de los síntomas de la enfermedad en diferentes condiciones experimentales, como por ejemplo el “wild-type C57BL/6” (102) y el modelo “SJL/J” (103). Este efecto protector, podría deberse a un control de la proliferación de linfocitos T CD4(+) mediado por células NK, observándose una supresión de células Th17 reactivas a la mielina a nivel de SNC mediado por las células NK y su interacción con la microglía (74). Asimismo, Xu et al observaron un efecto citotóxico directo de las células NK sobre células T encefalitogénicas específicas para el antígeno PLP (“*ProteoLipid Protein*”) (103).

Recientemente, en lesiones desmielinizantes procedentes de biopsias de pacientes con EM, se han descrito células NK con granzima K polarizada y perforina en próxima relación con células T, sugiriendo una interacción entre estas células inmunes en las placas agudas (104).

La expresión de receptores NK en linfocitos en sangre periférica puede diferir en pacientes con EM en función de su curso clínico (105), habiéndose descrito una expansión de células NK CD56^{bright} en pacientes tratados con algunas terapias inmunológicas (daclizumab, interferón-beta) que se relaciona con una respuesta clínica y radiológica favorable (105–108), la cual se ha asociado con el control de células T activadas ejercido por células NK mediante un mecanismo citotóxico que podría estar alterado en pacientes con EM (109,110). Basados en estos estudios, se postula que uno de los posibles mecanismos por los que las células NK podrían ser beneficiosas en la EM sería a través de la inmunoregulación de respuestas adaptativas.

Adicionalmente, las células NK participan en la regulación de células infectadas por virus, teniendo un papel relevante en el control de la infección por VEB. Tanto las NK CD56^{bright} como CD56^{dim} pueden ejercer un papel en el control de dicho virus. Las NK CD56^{bright}, mediante la producción de IFN γ , controlan la replicación del virus a nivel amigdalario mediante citotoxicidad directa (111). Así mismo, las células NK adaptativas NKG2C(+) CD56^{dim}, asociadas a la infección por HCMV, ejercen una potente respuesta ADCC frente a células infectadas por VEB (112). Por tanto, un mecanismo adicional de las células NK, que podría jugar un papel importante en la EM, sería el de control de infecciones virales.

Recientemente, ha sido descrita una relación entre una menor expansión de células NK NKG2C(+) en pacientes con EM y un mayor riesgo de progresión clínica, pudiendo indicar un posible papel protector del HCMV en la enfermedad (113). No obstante, se desconoce actualmente el posible papel del HCMV y las células NK en las fases iniciales de EM. Asimismo, y a diferencia de la expansión de células NK NKG2C(+), las posibles implicaciones clínicas de la adquisición de otros marcadores adaptativos de células NK en la EM no han sido previamente evaluadas.

2. HIPÓTESIS

Las células NK presentan funciones inmunorreguladoras en la EM que podrían jugar un papel beneficioso en la enfermedad. En este sentido, la respuesta adaptativa mediada por células NK puede diferir en pacientes con EM en función de la seroprevalencia de HCMV y en relación con características clínicas de actividad y discapacidad de la enfermedad.

En base a estas premisas, se establecen las siguientes hipótesis:

H.1. La prevalencia de la infección por HCMV en nuestro medio difiere en pacientes con EM en función de la edad y el tiempo de evolución de la enfermedad, pudiendo influir en la expresividad clínica de la enfermedad y en las respuestas humorales frente al VEB en estadios tempranos de la EM.

H.2. La impronta del HCMV en los compartimentos T y NK puede variar en pacientes con EM en comparación con controles sanos, y diferir en pacientes en función del tiempo de evolución de la enfermedad.

H.3. El inmunofenotipo adaptativo de las células NK se relaciona tanto con la seroprevalencia de HCMV como con características clínicas de la enfermedad tales como la forma clínica y el tratamiento con interferón-beta.

H.4. El inmunofenotipo adaptativo NK puede tener influencia en la funcionalidad de estos linfocitos y diferir en función de la forma clínica de la enfermedad.

3. OBJETIVOS

Objetivo principal:

Estudio de la respuesta adaptativa mediada por células NK en pacientes con EM y su relación con la infección crónica por el HCMV y las características clínicas de la enfermedad.

Objetivos secundarios:

O.1. Estudio de la prevalencia de la infección por HCMV en controles y pacientes con EM, evaluando su influencia en el curso clínico de la enfermedad y en la respuesta humoral frente a otros herpesvirus (VEB, HHV6).

O.2. Evaluación del impacto de la infección por HCMV en subpoblaciones linfocitarias NK y T en pacientes con EM en función de la edad y el tiempo de evolución de la enfermedad.

O.3. Estudio de marcadores adaptativos en células NK en pacientes con EM en función de las características clínicas de la enfermedad y de la seroprevalencia HCMV.

O.4. Evaluación de la función ADCC mediada por células NK en pacientes con diversas formas clínicas de EM y su relación con el inmunofenotipo adaptativo de estos linfocitos

4. METODOLOGÍA

- **Diseño del estudio:** Estudio transversal de casos y controles de muestras recogidas de forma prospectiva de pacientes con EM y controles sanos.

- **Sujetos del estudio:** Se incluyeron pacientes con diagnóstico de EM según criterios de McDonald 2010, recogidos en el Hospital del Mar, IMIM (Barcelona), así como de otros hospitales participantes en la REEM (Red Española de Esclerosis Múltiple) (Hospital Ramón y Cajal, Madrid; Hospital Clínico San Carlos, Madrid), categorizando los casos en los diferentes subgrupos clínicos de enfermedad (EMRR, EMSP, EMPP). Asimismo, se incluyeron controles sanos apareados por edad y género de la misma área geográfica.

Criterios de inclusión: Pacientes que cumplieron criterios de McDonald 2010 para el diagnóstico de EM y controles sanos, mayores de 18 años.

Criterios de exclusión: se excluyeron todos aquellos pacientes que estaban en tratamiento con terapias depletoras o bloqueantes del tráfico de linfocitos (Ej: fingolimod, dimetifumarato, natalizumab), gestantes, aquellos pacientes con enfermedades concomitantes graves o en los que recibieron corticoesteroides en los 30 días previos a la recogida de la muestra.

- **Variables de estudio:**

Variables independientes: porcentaje y número absoluto de células NKG2C, NK FcR γ (-), y NK PLZF(-), genotipo *NKG2C*, serologías para HCMV y VEB.

Variables clínicas dependientes: edad, sexo, tiempo de evolución, forma clínica (EMRR, EMSP, EMPP), EDSS (*Expanded disability status scale*), MSSS (*Multiple sclerosis severity score*), tasa anualizada de brotes, número de brotes en los 2 últimos años, tiempo de evolución de la enfermedad y tratamiento inmunomodulador.

Los pacientes fueron categorizados en dos subgrupos según el tiempo de evolución de la enfermedad, en fase temprana o iniciales de la enfermedad (≤ 5 años del inicio clínico de la enfermedad) y aquellos de más larga evolución (> 5 años del inicio clínico).

- **Serologías herpéticas:** tras extracción de muestras por venopunción, se realizaron los test diagnósticos clínicos estándar para evaluar la presencia de anticuerpos circulantes específicos para EBV (LIASON[®]) y HCMV (Roche[®], Cobas602).

En una subcohorta de pacientes y controles sanos se realizó un ensayo por inmunoadsorción ligado a enzimas (ELISA) para la determinación cuantitativa de IgG antiEBNA-1, IgG antiVCA (Trinity Biotech), IgM e IgG anti-CMV (Vircell), e IgM e IgG anti-HHV6 A/B (Vidia) con los kits comerciales disponibles. Los resultados se expresaron como un valor índice [“index value”: 10 x (absorbancia de la muestra/valor del punto de corte)].

- Metodología inmunológica:

Se extrajeron células mononucleares de sangre periférica (PBMCs: *Peripheral blood mononuclear cells*) de pacientes con EM y controles sanos, mediante el uso de gradiente de densidad Ficoll-Hypaque, para su posterior criopreservación en suero fetal bovino con 10% dimetil sulfóxido hasta su análisis mediante citometría de flujo. Para la inmunotinción, las células fueron pretratadas con concentraciones saturantes de inmunoglobulinas humanas para bloquear receptores Fc-gamma, para realizar posteriormente los diferentes marcajes del estudio.

* Inmunofenotipo NK: se realizó un marcaje indirecto mediante anti-NKG2A (clone Z199) indirectamente marcado con el anticuerpo secundario PECy7 (Biolegend), seguido de una tinción directa mediante los anticuerpos conjugados anti-CD3-PerCP (BD Pharmigen), anti-CD56-APC (Biolegend), anti-CD16-eFluor450 (eBioscience), y anti-NKG2C-PE (R&D Systems). Para evaluar la expresión de la cadena gamma (FcR γ) y del factor de transcripción PLZF mediante marcaje intracelular, las células fueron tratadas mediante el kit de fijación y permeabilización (BD Biosciences) seguido de la incubación mediante los anticuerpos anti-FcR γ -FITC (Millipore) y anti-PLZF-PE CF594 (BD Biosciences).

* Inmunofenotipo de diferenciación terminal de linfocitos T: se evaluó mediante un panel de marcadores de células T diferenciadas, previamente relacionadas con la infección del HCMV (células T CD27-CD28-/CD57+/LILRB1+), en una subcohorta de pacientes (n=35, en fases tempranas de la enfermedad (≤ 5 años); n=32, de más larga evolución) y controles (n=32) estratificados según la serología para HCMV (114). Se realizó una tinción inmunofluorescente indirecta con anti-LILRB1-HPF1 y anti-mouse Ig-PE-Cy7 (Biolegend) y posteriormente incubadas con anti-CD3-ACP-H7, anti-CD27-PerCP-Cy5.5, anti-CD28-PE-CF594, anti-CD57-PE (BD Biosciences), y anti-CD4-FITC

(eBioscience), y anti-CD8-BV510 (Biolegend).

* Estudio funcional de células NK: la evaluación de la respuesta ADCC de las células NK se realizó determinando la degranulación mediante la expresión de CD107 y la producción de TNF α en respuesta a la interacción con la línea celular linfoblastoide 721.221, caracterizada por una expresión deficiente de MHC clase I, y la línea celular AKBM (línea de células B infectada por VEB en ciclo lítico). Para ello, se obtuvieron PBMCs de 42 pacientes (22 RRMS, 8 SPMS y 12PPMS) y 17 controles, estratificados para la serología de HCMV, incubándose “*overnight*” a 37°C con IL-2 (200U/ml). Posteriormente, se incubaron estas células durante 4h con las células diana 721.221 con o sin la presencia de rituximab (50 ng/ml) con una ratio célula efectora/célula diana de 1/1. Asimismo, de forma paralela se evaluó la respuesta con la línea celular AKBM tras inducción de su ciclo lítico en presencia de suero seropositivo o seronegativo para VEB en base a la metodología previamente publicada (112,115). La degranulación y la producción de TNF α se realizó mediante citometría de flujo, utilizando el anticuerpo monoclonal anti-CD107-APC (BD Pharmigen) durante la incubación con brefaldina y monensina (GolgiPlugR, BD; GolgiStopR, BD), realizando posteriormente el marcaje de anticuerpos directos con anti-CD3-PerCP (BD Pharmigen), anti-CD56-APC-Cy7 (Biolegend) y anti-NKG2C-PE (R&D System). Las células fueron fijadas y permeabilizadas, procediéndose a la tinción intracelular mediante anti-TNF α -CFBlue (marcado por Immunostep), anti-FcR γ -FITC (Millipore) y anti-PLZF-PE.

Las muestras se analizaron en el citómetro LSR Fortessa (*BD Biosciences*), definiendo las células NK como linfocitos CD3(-)CD56(+), y los linfocitos T como CD3(+) utilizando el software FlowJo (Tree Star, Oregon, USA) mediante las estrategias mostradas (**Artículo 1, Figura 1 y Artículo 2, figura 1**).

- Genotipo *NKG2C*

El genotipado de *NKG2C* se realizó mediante la extracción de ADN de sangre total, mediante un sistema *Purogene, BloodCore Kit B (Quiagen)*, evaluando el número de copias del gen *NKG2C* mediante técnicas de PCR previamente descritas (90).

- Análisis multidimensional t-SNE:

Se realizó un análisis mutidimensional mediante citometría de flujo utilizando Barnes-Hut t-SNE, de acuerdo con la metodología previamente descrita (116). La compensación

de los datos obtenidos por citometría fue efectuada mediante el software FlowJo (Tree Star, Oregon, USA) y posteriormente se importaron a R utilizando los paquetes FlowCore y OpenCyto. Los linfocitos se definieron según sus características en “*forward scatter*” y “*side scatter*” evaluándose las células NK CD56^{dim}. El canal FITC fue normalizado utilizando el paquete de R, FlowStats, con intención de disminuir la variabilidad experimental en la intensidad de la fluorescencia. Posteriormente, se seleccionaron datos de 500 células NK CD56^{dim} por muestra de forma randomizada y concatenada. Finalmente se realizó el análisis de Barnes-HUT t-SNE mediante el paquete de Rtsne. Los gráficos se realizaron utilizando los paquetes de R ggplot2 y RcolorBrewer.

-Análisis estadístico:

Las variables se clasificaron según su normalidad utilizando la prueba de Kolmogorov-Smirnov, en paramétricas y no paramétricas. Las variables continuas paramétricas se expresaron mediante media y desviación estándar, y las no paramétricas mediante su mediana y su rango intercuartílico (primer y tercer cuartil). Las diferencias entre variables continuas y dicotómicas se evaluaron mediante los test T de Student y U de Mann-Whitney, respectivamente, calculándose los índices de correlación de Pearson o Spearman entre variables continuas para valorar la asociación entre diferentes variables.

La co-expresión de los marcadores adaptativos se evaluó mediante análisis tridimensional con diagramas de Venn. En el subgrupo de pacientes seguidos prospectivamente durante un año tras inicio de tratamiento con interferón beta, el análisis estadístico fue realizado mediante el test de Wilcoxon para datos apareados. Para un análisis dicotómico de la expresión categórica de NKG2C, se estableció un valor de corte en el tercer tercil de la distribución del porcentaje de NKG2C(+) en células NK en controles sanos, clasificando como bajos aquellos porcentajes de células NK NKG2C(+) <19.3% y altos, los porcentajes iguales o mayores a 19.3%, de acuerdo con la metodología previamente publicada (113). Tras los análisis univariados pertinentes, se realizó un análisis multivariado, mediante regresión lineal de las variables independientes, ajustado mediante la serología del HCMV, variables clínicas y el tratamiento con INFβ. Los resultados se consideraron significativos para una p de 0.05. El análisis se llevó a cabo utilizando el software SPSS v.23.

- Aspectos éticos:

Los estudios fueron aprobados por el comité de ética de investigación clínica del Hospital del Mar (número de protocolos: 2014/5806/I, 2017/7460/I), incluyéndose un consentimiento informado que fue firmado por todos los participantes en el momento de su inclusión en el estudio.

5. ARTÍCULOS

5.1. Low cytomegalovirus seroprevalence in early multiple sclerosis: a case for the “hygiene hypothesis”?

Elisenda Alari-Pahissa, PhD; **Antía Moreira**, MD; Ana Zabalza, MD; Roberto Alvarez-Lafuente, PhD; Elvira Munteis, MD; Andrea Vera, Rafael Arroyo, MD, PhD; Jose C. Alvarez-Cermeño, MD, PhD; Luisa Maria Villar, PhD; Miguel López-Botet, MD, PhD; Jose E.Martínez-Rodríguez, MD,PhD

Eur J Neurol, 25: 925-933. Doi: 10.1111/ene.13622

Low cytomegalovirus seroprevalence in early multiple sclerosis: a case for the “hygiene hypothesis”?

Elisenda Alari-Pahissa, PhD; Antía Moreira, MD; Ana Zabalza, MD; Roberto Alvarez-Lafuente, PhD; Elvira Munteis, MD; Andrea Vera, Rafael Arroyo, MD, PhD; Jose C. Alvarez-Cermeño, MD, PhD; Luisa Maria Villar, PhD; Miguel López-Botet, MD, PhD; Jose E.Martínez-Rodríguez, MD, PhD

Jose E.Martínez-Rodríguez, Elisensa Alari-Pahissa, Ana Zabalza, Elvira Munteis, Andrea Vera: Neurology Department, Hospital del Mar Medical Research Institute (IMIM), Barcelona, Spain. **Antía Moreira:** Neurology Department, IMIM, Universitat Autònoma de Barcelona, Spain. **Roberto Alvarez-Lafuente:** Neurology Service, Instituto de Investigación Sanitaria del Hospital Clínico de San Carlos, Madrid, Spain. **Rafael Arroyo:** Neurology Service, Hospital Universitario Quirónsalud, Madrid. **Jose C.Alvarez-Cermeño:** Neurology Department, Ramon y Cajal University Hospital, Madrid, Spain. **Luisa María Villar:** Immunology Department, Hospital Universitario Ramón y Cajal, Madrid, Spain. **Miguel López-Botet:** Immunology Unit, University Pompeu Fabra; IMIM, Barcelona, Spain.

Correspondence to: J.E.Martínez-Rodríguez, Neurology Department, Hospital del Mar Medical Research Institute (IMIM), Passeig Marítim 25-29, Barcelona 08003, Spain. Phone: +34 932483235. Fax: +34 932483236. E-mail: JMartinezR@hospitaldelmar.cat.

Running title: CMV in early MS

Keywords: Multiple sclerosis, natural killer cells, cytomegalovirus, Epstein-Barr virus, herpesvirus, hygiene hypothesis, immunosenescence.

Conflict of interest: Jose E.Martínez-Rodríguez has participated as principal investigator in pharmaceutical company-sponsored clinical trials including Novartis, Roche, Merck-Serono, Actelion, and Celgene, and personal fees for consulting services and lectures from Roche, Novartis, Biogen Idec and Merck-Serono. Antia Moreira has received travel funding from Teva and Biogen Idec. Ana Zabalza has received travel funding from Biogen Idec. Roberto Alvarez-Lafuente has received honoraria for lectures from Merck-Serono, Novartis and Biogen Idec, and grant from Merck-Serono, Teva, Sanofi-Aventis, Biogen Idec and Bayer. Elvira Munteis has received personal fees for consulting services and lectures from Merck-Serono, Biogen Idec, Teva, Genzyme, Novartis, Bayer and Almirall. Rafael Arroyo has received honoraria as consultants in advisory boards, and as chairmen or lecturer in meetings, and has also participated in clinical trials and other research projects promoted by Biogen-Idec, Bayer-Schering, Merck-Serono, Teva, Novartis, Genzyme, Roche, Allergan, and Almirall. Jose C Alvarez-Cermeño received compensation for consulting services from Biogen Idec, Novartis, Sanofi, Merck-Serono, Bayer, Roche, Genzyme, and Teva; and speaking fees from Biogen Idec, Merck, Bayer, Sanofi-Aventis, Teva, Genzyme, Almirall, Merck-Serono, and Novartis. Luisa Maria Villar reports personal fees for consulting services

from Biogen Idec, and grants from Merck-Serono, Biogen Idec, Teva, and Genzyme. Miguel López Botet and Elisenda Alari-Pahissa report no disclosures.

Acknowledgements: Supported by grants FIS/PI14/00177, FIS/PI17/00254, SAF 2013-49063-C2-1-R (Spanish Ministry of Economy and Competitiveness and FEDER), the EU FP7-MINECO Infect-ERA Program (PCIN-2015-191-C02-01) and *Red Española de Esclerosis Múltiple* (REEM) from the Instituto de Salud Carlos III, the European Regional Development Fund (Grant RD16/0015/0011) and the Spanish Ministry of Economy and Competitiveness.

ABSTRACT

Background and purpose: Cytomegalovirus (CMV) infection has been recently associated with a lower multiple sclerosis (MS) susceptibility, remaining controversial whether it has a protective role or is merely an epiphenomenon related to westernization and early-life viral infections. We aimed to evaluate whether CMV serostatus may differ in early MS as compared to non-early MS patients, analyzing the putative association of this virus with MS clinical course and humoral immune responses against other herpesviruses.

Methods: Multicentric analysis of 310 MS patients (early MS, disease duration ≤ 5 years, n=127) and controls (n=155), evaluating specific humoral responses to CMV, Epstein-Barr virus (EBV) and human herpesvirus-6 (HHV-6), as well as T-and Natural Killer (NK)-cell immunophenotypes.

Results: CMV seroprevalence in early MS was lower than in non-early MS or controls ($p<0.01$), being independently associated with disease duration (odds ratio 1.04, 95% confidence interval 1.01-1.08, $p<0.05$). CMV+ MS patients displayed increased proportions of differentiated T-cells (CD27-CD28-, CD57+, LILRB1+) and of NKG2C+ NK-cells, which were associated with a lower disability in early MS ($p<0.05$). CMV+ early MS patients had an age-related decline in serum anti-EBNA-1 antibodies ($p<0.01$), but no CMV-related differences in anti-HHV-6 humoral responses.

Conclusions: Low CMV seroprevalence was observed in early MS patients. Modification of MS risk attributed to CMV might be related to the induction of differentiated T- and NK-cell subsets and/or modulation of EBV-specific immune responses at early stages of the disease.

INTRODUCTION

Multiple sclerosis (MS) is believed to be caused by a complex interplay between genetic and environmental risk factors (e.g. herpesvirus infections). Most evidences support a role of Epstein-Barr virus (EBV), a gamma-herpesvirus almost universally present in MS patients [1]. Other herpesviruses (e.g., human herpesvirus-6 (HHV-6)) have been also related to MS [2]. By contrast, recent studies have associated cytomegalovirus (CMV) infection with a decrease in MS susceptibility [3-5], although a causal relation and the mechanisms underlying a putative protective effect remain controversial [6]. Notwithstanding, the influence of herpesviruses in MS seems to be more marked at early stages of the disease, as evaluated by specific-immune responses [7-9].

CMV is a beta-herpesvirus that establishes a lifelong infection in 60-100% of human populations. Substantial immunological resources are devoted to control CMV infection, leading to an “inflation” of terminally differentiated T-cells which has been related to immunosenescence [10]. In addition, CMV may induce an adaptive differentiation and persistent expansion of an NKG2C⁺ natural killer (NK)-cell subset [11], and this effect has been recently associated with decreased MS progression [12]. Herpesvirus coinfections might have additional immunological implications influencing the responses against other pathogens [13-15]. In this study we evaluated whether CMV infection and its imprint on the T- and NK-cell compartments may differ in early MS as compared to non-early MS patients, analyzing the putative association of this virus with MS clinical course and humoral immune responses against EBV and HHV-6.

METHODS

MS patients and controls

A cross-sectional multicenter study was performed in three hospitals integrated in the Spanish Network for MS Research (REEM) where MS patients were prospectively recruited from routine clinical visits. Patients (n=310) met MS criteria based on McDonald 2010. Exclusion criteria were (1) a relapse within 30 days prior to inclusion, (2) any severe concomitant disease, (3) pregnancy, and (4) disease-modifying drug (DMD) therapy known to deplete peripheral lymphocytes or alter their trafficking (i.e., fingolimod, natalizumab). Healthy controls (n=155) were included from the same geographic area than patients. Clinical variables (Table 1) were evaluated at the time of the analysis, including DMD treatment (interferon-beta, n=80; glatiramer acetate, n=8). Early MS (n=127, median time from onset: 1.33 years) was defined as a disease duration ≤ 5 years from the first clinical demyelinating

event, classifying the remaining patients as non-early MS (n=183, median time from onset: 16 years). Blood samples from venous puncture were obtained for serological and immunological analysis. The study was approved by the IMIM Ethics Committee, including patients after written informed consent.

Immunological analysis of peripheral blood lymphocyte subsets

Peripheral blood mononuclear cells (PBMC) were isolated from blood samples taken in EDTA collection tubes using Lymphoprep, and subsequently cryopreserved in fetal calf serum with 10% DMSO. The gating strategy of the study is shown in Figure 1. NK-cell immunophenotype was evaluated in early MS patients (n=120) as previously reported [12], using the following conjugated monoclonal antibodies: anti-CD3-PerCP, anti-CD56-APC (BD Biosciences), NKG2C-PE (R&D Systems), and DAPI. A selected panel of immunological markers of differentiated /senescent T-cells previously related to CMV infection (CD27-CD28-/CD57+/LILRB1+ T-cells) [16-18] were evaluated in a subcohort of MS patients (early MS, n=35; non-early MS, n=32) and controls (n=32) stratified for CMV serology. Samples were stained by indirect immunofluorescence with LILRB1 HP-F1 and anti-mouse Ig-PE-Cy7 (Biolegend), washed and further incubated with anti-CD3-APC-H7, anti-CD27-PERCP-Cy5.5, anti-CD28-PE-CF594, CD57-PE (BD Biosciences), and anti-CD4-FITC (eBioscience), anti-CD8-BV510 (Biolegend). All samples were analyzed at the Flow Cytometry Unit (UPF/CRG, Barcelona) with an LSRII-Fortessa flow cytometer (BD Biosciences).

Analysis of humoral responses to herpesviruses

Standard clinical diagnostic tests to evaluate CMV and EBV specific circulating antibodies were performed in serum samples (BioMérieux). Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay (ELISA) tests were performed in subcohorts of MS patients (early MS, n=59; non-early MS, n=50) and controls (n=101) for quantitative determination of anti-EBNA-1 IgG and anti-VCA IgG (Trinity Biotech), anti-CMV IgG and IgM (Vircell), and anti-HHV-6 A/B IgG and IgM (Vidia) with commercially available kits following the manufacturer instructions.

Results were expressed as an index value that was calculated as follows: $[10 \times (\text{sample absorbance}/\text{cut-off value})]$. Samples were analyzed in duplicate and doubtful samples (index value 9-11) were reanalyzed.

Statistical analysis

After assessment of normal distribution using normal Q-Q probability plots, continuous variables were expressed as mean \pm standard deviation (SD) or median (first-third quartile) for parametric and non-parametric variables, respectively. Relationship between continuous and dichotomous variables was analyzed by Student t-test or Mann-Whitney U-test, respectively. Pearson or Spearman correlation indexes were calculated for pair-wise continuous variables. For a categorical analysis of NKG2C expression, a cut-off value was established at the third tertile of the distribution of the percentage of NKG2C⁺ NK-cells in healthy controls, classifying patients as low %NKG2C⁺ NK-cells (<19.3%) and high %NKG2C⁺ NK-cells (\geq 19.3%), as previously reported [12]. Logistic regression analysis determined predictors of CMV seropositivity adjusting the model for age and MS duration. Results were considered significant at the two-sided level of 0.05.

RESULTS

CMV seroprevalence in early MS patients

We first analyzed serum anti-CMV levels in MS patients (127 early MS, mean age, 35 ± 10.2 years; 183 non-early MS, 49.2 ± 11.7 years) and controls ($n=155$, 37.6 ± 12.0 years, age-matched with early MS patients). Elevated anti-CMV IgM antibodies suggestive of recent asymptomatic primary infection were detected in 3 early MS patients. CMV seroprevalence did not differ in the whole cohort of MS patients as compared to controls (58.4% vs. 63.8%, respectively, $p=0.149$) (Figure 2A). However, CMV seroprevalence in early MS (48%) was significantly lower compared two by two with non-early MS patients (65%, $p<0.01$) and controls (63.8%, $p<0.01$) (Figure 2B). Subsequently, cases were age-categorized in ≤ 40 or >40 years-old. CMV seroprevalence was significantly lower in cases ≤ 40 years as compared to cases >40 years, both in MS patients ($p<0.001$) and controls ($p<0.05$) (Figure 2C). MS patients ≤ 40 years had a significant lower CMV seroprevalence as compared to controls ≤ 40 years (45% vs. 67%, $p<0.05$), but without differences between patients and controls older than 40 years (Figure 2C). No other clinical differences were associated with CMV seroprevalence in early MS (Table 1). A logistic regression analysis of the whole MS cohort showed that CMV seroprevalence was significantly associated with disease duration (odds ratio (OR) 1.04, 95% confidence interval (CI) 1.01-1.08, $p<0.05$), independently of age (OR 1.02, 95% CI 0.99-1.04, $p=0.190$).

CMV-driven NKG2C+ NK-cell expansion in early MS patients

We subsequently evaluated the CMV-imprint on the NK-cell compartment of early MS patients (n=120). As previously reported (12), CMV seropositivity was associated with higher %NKG2C+ NK-cells in early MS patients (CMV-: $10.9\% \pm 5.7$ vs. CMV+: $18.8\% \pm 16.5$, $p < 0.01$) and in controls (CMV-: $11.6\% \pm 8.2$ vs. CMV+: $21.5\% \pm 19.2$, $p < 0.05$).

Classifying cases according to the magnitude of the NKG2C expansion, early MS patients with a high %NKG2C+ NK-cells had lower disability scores as compared to patients with low %NKG2C+ NK-cells (Table 1). No significant differences were found analyzing proportions of NKG2C+ T-cells (early MS, $2.2\% \pm 2.0$; non-early MS, $1.7\% \pm 2.0$; controls, $1.8\% \pm 1.9$, $p = 0.187$). No additional differences were observed for CSF oligoclonal bands evaluated in a subcohort of 74 early MS patients (Supporting information, Table S1).

Association of CMV seropositivity with increased proportions of terminally differentiated T-cells in MS patients

In order to evaluate the influence of CMV on the T-cell compartment, the expression of immunological markers of terminal differentiation was analyzed in a subcohort of MS patients (early MS, n=35; non-early MS, n=32) and controls (n=32). CMV seropositivity in patients and controls was associated with significantly higher proportions of CD27-CD28-, CD57+ and LILRB1+ in CD8+ T-cells (Figure 3A), independently of age and MS duration. Regarding CD4+ T-cells, CMV induced a less pronounced terminal differentiation than in CD8+ T-cells, and was mainly observed in early MS and controls as compared to non-early MS (Figure 3B). Controls and non-early MS patients showed an age-related increase in

differentiated CD8+ T-cells, without additional differences observed according to DMD therapy (Supporting information, Table S2) or other clinical characteristics (data not shown).

Humoral immune responses to herpesviruses in early MS

Virus-specific antibodies against CMV, EBV and HHV-6 were evaluated in early MS (n=59, 8 DMD-treated cases), non-early MS (n=50, 18 DMD-treated cases), and controls (n=101). Seroprevalences for herpesviruses in early MS compared to controls were as follows: CMV+, 44.1% vs.63% ($p<0.05$); EBV+, 98.3% vs.88.5% ($p<0.05$); and HHV-6+, 87.9% vs.89%

($p=0.515$). Evaluating virus-specific quantitative indexes in seropositive individuals, MS patients had a significantly higher EBNA-1 index as compared to controls (24.25 ± 4.96 vs. 18.93 ± 4.06 , $p<0.0001$) independently of MS duration (Figure 4A). Anti-VCA index was similar in early MS patients and controls (data not shown). No differences were observed for CMV or HHV-6 indexes according to MS duration (Figure 4B-C).

The putative influence of CMV infection with humoral responses to other herpesviruses was subsequently studied in individuals co-infected with EBV and HHV-6 (30 early MS, 23 non-early MS, 52 controls). CMV serostatus had no relationship with EBNA-1 or HHV-6 indexes in MS patients and controls (Figure 4D-E). However, an inverse correlation between anti-EBNA-1 and MS duration was observed in CMV+ MS patients ($R_{\text{Spearman}} -0.59$, $p<0.01$) but not in CMV seronegative cases (Figure 5), suggesting a progressive reduction in EBV humoral responses after MS onset in CMV-infected patients. No additional differences were detected regarding proportions of NKG2C+ NK-cells or DMD therapy (data not shown).

CMV IgG index was directly correlated with some markers of terminal differentiation in CD4⁺ and CD8⁺ T-cells in CMV⁺ MS patients and controls (Supporting information, Table S3). EBV humoral responses neither were related to NKG2C⁺ NK-cells expansion nor terminally differentiated T-cells, except for an inverse correlation of EBNA-1 index in early MS with percentages of CD3⁺CD56⁺ ($R_{\text{Spearman}} -0.55, p < 0.01$), independently of CMV and HHV-6 serostatus. No correlations between EBV and HHV-6 serostatus and T-cell differentiation markers were found in MS patients or controls (data not shown).

DISCUSSION

Infections have been considered as potential environmental factors involved in MS pathogenesis. EBV is the main pathogen suspected to be related to MS, suggesting the implication of virus-triggered immunological responses [1,9]. In contrast, some recent evidences support an inverse association between CMV and MS risk in pediatric and adult populations [3-5]. Our study shows a low CMV seroprevalence rate in early MS independently of age at disease onset, pointing out to epidemiological differences related to previous herpesvirus primary infections at early stages of the disease, in line with a putative protective role of CMV in MS.

Globally, CMV seroprevalence varies from an almost universal infection in undeveloped countries to 60-80% in western populations. CMV is transmitted through secretions and primary infection often occurs at early childhood. In this regard, we did not find serological evidences of CMV primary infection in early MS, except for 3 cases. Differences in seroprevalence for herpesviruses found in early MS might be related to the

“hygiene hypothesis”, which proposes that early exposure in life to certain pathogens may be protective against autoimmune diseases, as opposed to a higher risk conferred by late primary infections [1]. The low CMV seroprevalence observed in early MS might be interpreted according to the “old friends” reformulation of the “hygiene hypothesis”, which attributes the increase in autoimmune disorders related to western lifestyle to a loss of symbiotic relationships with microorganisms that have a long-lasting co-evolution with humans [19].

Persistent CMV infection may have functional implications in the immune system, with a potential impact on the development of autoimmune diseases [20]. CMV develops a variety of immunoevasion strategies leading to complex host-virus interactions. Expansions of oligoclonal CMV-specific effector-memory T-cell populations are detected in CMV+ individuals and tend to increase with aging [10]. Such “memory inflation” reflects an accumulation of oligoclonal differentiated T-cells, which have a limited proliferative capacity but maintain their effector functions upon antigen stimulation [16,18]. The reduced diversity of the CD8+ T-cell compartment has been related to immunosenescence and potentially limits the development of immune responses to unrelated antigens [10,18,21]. Based on our results, increased proportions of terminally differentiated T-cells were observed in CMV+ MS patients. Presumably, CMV seronegative MS patients close to disease onset develop the inflammatory process involving a pool of less differentiated T-cells as compared to CMV+ individuals. In this setting, persistent CMV infection might divert immunological resources reducing the risk of autoimmunity, in line with the hypothesis that it may be protective for MS development [4,5].

On the other hand, CMV infection may also have a positive indirect effect in the control of other viral infections. Previous exposure to some pathogens may modify specific immune responses to unrelated pathogens, a phenomenon termed “heterologous immunity”, which can be mediated by innate responses as well as cross-reactive T-cells, bystander activation of T-cells, and humoral responses [14,15]. Chronic infections may modify specific immunity against other pathogens impairing the development of CD8⁺ T-cell memory responses and inducing contraction of specific T-cell populations [22,23]. In particular, CMV may increase the production of proinflammatory cytokines (e.g., TNF- α and IFN- γ) and antibody-dependent cell-cytotoxicity mediated by adaptive NK-cells, which may influence immune responses to other pathogens [13,24]. On this basis, we analyzed specific humoral responses in MS patients according to CMV serostatus, observing a decrease in EBNA-1 index related to disease duration in CMV⁺ early MS patients. In contrast, no CMV-related differences were found when HHV-6 humoral responses were analyzed. Since anti-EBNA-1 antibody levels were previously shown to directly correlate with higher MS disease activity [1,8] and EBV-specific CD8⁺ T-cells [7], further studies are needed to evaluate whether this CMV-related reduction in anti-EBNA-1 levels could be associated with decreased virus-specific T-cell responses.

In contrast to several evidences supporting a protective role of CMV in MS [3-5,12], other reports suggest a higher MS risk induced by this virus [6,25], an effect that could be related to the detrimental effect of CMV primary infection by increasing the inflammatory process in MS [6,25]. Nevertheless, our observations are consistent with a putative influence of a non-primary CMV infection in early MS. We did not find any significant clinical differences in early MS according to CMV serostatus. However, based on our results, lower disability scores at early stages of MS were associated with NKG2C⁺ NK-cell expansion, in

accordance with a previous study describing a lower risk of long-term progression in MS patients displaying such an NK-cell adaptive CMV-imprint [12].

In conclusion, early MS patients in our study were characterized by low CMV seroprevalence, suggesting that disease duration may be a relevant variable in studies analyzing the influence of this virus on MS risk. It is tempting to speculate that missing a potential “old friend” such as CMV could be associated to increased susceptibility for autoimmunity. By contrast, exposure to CMV in early childhood and the imprint of the virus on the immune system might influence the development of immune responses to other herpesviruses infections and decrease the risk of MS. The putative protective role conferred by CMV at early stages of MS remains to be addressed in further studies.

REFERENCES

1. Ascherio A, Munger KL. Environmental risk factors for multiple sclerosis. Part I: the role of infection. *Ann Neurol* 2007;61:288-99.
2. Leibovitch EC, Jacobson S. Evidence linking HHV-6 with multiple sclerosis: an update. *Curr Opin Virol* 2014;9:127-33.
3. Makhani N, Banwell B, Tellier R, et al. Viral exposures and MS outcome in a prospective cohort of children with acquired demyelination. *Mult Scler* 2016;22:385-8.
4. Sundqvist E, Bergstrom T, Daialhosein H, et al. Cytomegalovirus seropositivity is negatively associated with multiple sclerosis. *Mult Scler* 2014;20:165-73.
5. Waubant E, Mowry EM, Krupp L, et al. Common viruses associated with lower pediatric multiple sclerosis risk. *Neurology* 2011;76:1989-95.
6. Vanheusden M, Stinissen P, 't Hart BA, Hellings N. Cytomegalovirus: a culprit or protector in multiple sclerosis? *Trends Mol Med* 2015;21:16-23.
7. Jilek S, Schluep M, Meylan P, et al. Strong EBV-specific CD8+ T-cell response in patients with early multiple sclerosis. *Brain* 2008;131:1712-21.
8. Lunemann JD, Tintore M, Messmer B, et al. Elevated Epstein-Barr virus-encoded nuclear antigen-1 immune responses predict conversion to multiple sclerosis. *Ann Neurol* 2010;67:159-69.
9. Sundström P, Juto P, Wadell G, et al. An altered immune response to Epstein-Barr virus in multiple sclerosis: a prospective study. *Neurology* 2004;62:2277-82.
10. Sansoni P, Vescovini R, Fagnoni FF, et al. New advances in CMV and immunosenescence. *Exp Gerontol* 2014;55:54-62.
11. López-Botet M, Muntasell A, Vilches C. The CD94/NKG2C+ NK-cell subset on the edge of innate and adaptive immunity to human cytomegalovirus infection. *Semin Immunol* 2014;26:145-51.
12. Martínez-Rodríguez JE, Cobo-Calvo A, Villar LM, et al. Adaptive natural killer cell response to cytomegalovirus and disability progression in multiple sclerosis. *Mult Scler* 2016;22:741-52.
13. López-Montañes M, Alari-Pahissa E, Sintes J, Martínez-Rodríguez JE, Muntasell A, López-Botet M. Antibody-Dependent NK Cell Activation Differentially Targets EBV-Infected Cells in Lytic Cycle and Bystander B Lymphocytes Bound to Viral Antigen-Containing Particles. *J Immunol* 2017;199:656-65.
14. Welsh RM, Che JW, Brehm MA, Selin LK. Heterologous immunity between viruses. *Immunol Rev* 2010;235:244-66.

- Accepted Article
15. White DW, Suzanne BR, Barton ES. Immune modulation during latent herpesvirus infection. *Immunol Rev* 2012;245:189-208.
 16. Akbar AN, Henson SM. Are senescence and exhaustion intertwined or unrelated processes that compromise immunity? *Nat Rev Immunol* 2011;11:289-95.
 17. Bigley AB, Spielmann G, Agha N, O'Connor DP, Simpson RJ. Dichotomous effects of latent CMV infection on the phenotype and functional properties of CD8⁺ T-cells and NK-cells. *Cell Immunol* 2016;300:26-32.
 18. Gustafson CE, Qi Q, Hutter-Saunders J, et al. Immune Checkpoint Function of CD85j in CD8 T Cell Differentiation and Aging. *Front Immunol* 2017;8:692.
 19. Rook GA. Hygiene hypothesis and autoimmune diseases. *Clin Rev Allergy Immunol* 2012;42:5-15.
 - 20 Halenius A, Hengel H. Human cytomegalovirus and autoimmune disease. *Biomed Res Int* 2014;2014:472978.
 21. Wang GC, Dash P, McCullers JA, Doherty PC, Thomas PG. T cell receptor alphabeta diversity inversely correlates with pathogen-specific antibody levels in human cytomegalovirus infection. *Sci Transl Med* 2012;4:128ra42.
 22. Selin LK, Vergilis K, Welsh RM, Nahill SR. Reduction of otherwise remarkably stable virus-specific cytotoxic T lymphocyte memory by heterologous viral infections. *J Exp Med* 1996;183:2489-99.
 23. Stelekati E, Shin H, Doering TA, et al. Bystander chronic infection negatively impacts development of CD8(+) T cell memory. *Immunity* 2014;40:801-13.
 24. Costa-Garcia M, Vera A, Moraru M, Vilches C, López-Botet M, Muntasell A. Antibody-mediated response of NKG2C^{bright} NK cells against human cytomegalovirus. *J Immunol* 2015;194:2715-24.
 25. Vanheusden M, Broux B, Welten SP, et al. Cytomegalovirus infection exacerbates autoimmune mediated neuroinflammation. *Sci Rep* 2017;7:663.

Table 1. Clinical characteristics of early MS patients according to CMV seroprevalence and NKG2C immunophenotype.

		CMV Serostatus		NKG2C immunophenotype ^a			
		CMV-	CMV+		Low % NKG2C	High % NKG2C	
		n=65	n=62	P-value	n=103	n=17	P-value
Age (y)		34.6 ± 9.6	35.4 ± 10.8	0.629	35.7 ± 10.3	33.0 ± 10.4	0.320
MS duration (y)		1.8 ± 1.6	2.2 ± 1.7	0.218	2.1 ± 1.7	1.7 ± 1.6	0.396
Sex (female)		40 (61.5%)	43 (69.3%)	0.230	67 (65.5%)	12 (70.6%)	0.441
MS form	RRMS	62	56	0.084	94	17	0.488
	SPMS	0	3		3	0	
	PPMS	0	3		6	0	
EDSS at onset		1.84 ± 0.87	1.85 ± 1.51	0.161	2.02 ± 1.22	0.95 ± 0.86	<0.05*
MSSS		5.13 ± 2.94	5.18 ± 2.68	0.933	5.42 ± 2.77	3.57 ± 2.29	<0.05*
ARR		1.00 (0.64-2.00)	1.00 (0.40-1.75)	0.753	1.00 (0.40-1.86)	1.00 (1.00-2.80)	0.174
DMD-naive		54 (83.1%)	49 (79.0%)	0.361	83 (80.6%)	15 (88.2%)	0.356

RRMS: relapsing-remitting MS. SPMS: secondary progressive MS. PPMS: primary progressive MS. EDSS: Expanded Disability Status Scale. MSSS: Multiple Sclerosis Severity Score. ARR: annualized relapse rate (total number of relapses / MS duration). DMD: disease-modifying drugs. Values are expressed as n (%), and mean ± standard deviation for parametric variables, and median (25th-75th percentile) for non-parametric variables. P-values: * <0.05 . ^a The analysis of NKG2C immunophenotype is categorized based on the percentage of expression of NKG2C in NK-cells as detailed in Methods in low %NKG2C (CMV- and CMV+ MS patients), and high %NKG2C (CMV+ MS patients).

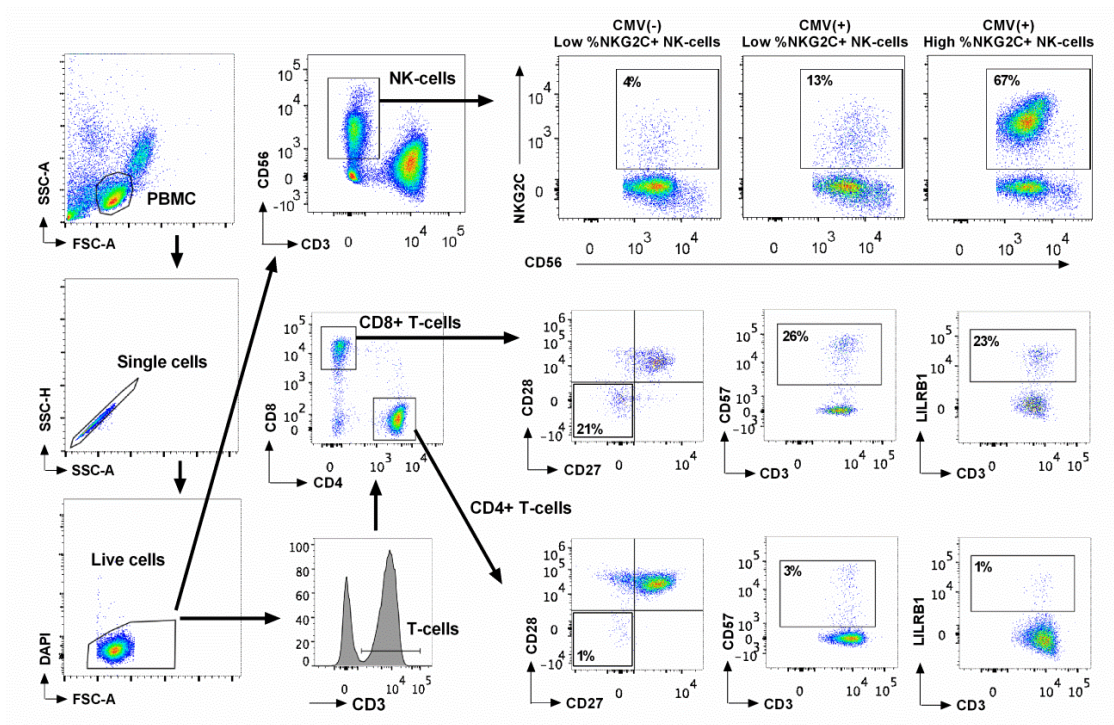


Figure 1. Flow cytometry immunophenotyping of CD3-CD56+ NK-cells and CD3+ T-cells. Representative examples of NKG2C+ NK-cell distributions are shown. Terminally differentiated T-cell subsets were defined as CD27-CD28-, CD57+ and LILRB1+ CD8+ and CD4+ lymphocytes.

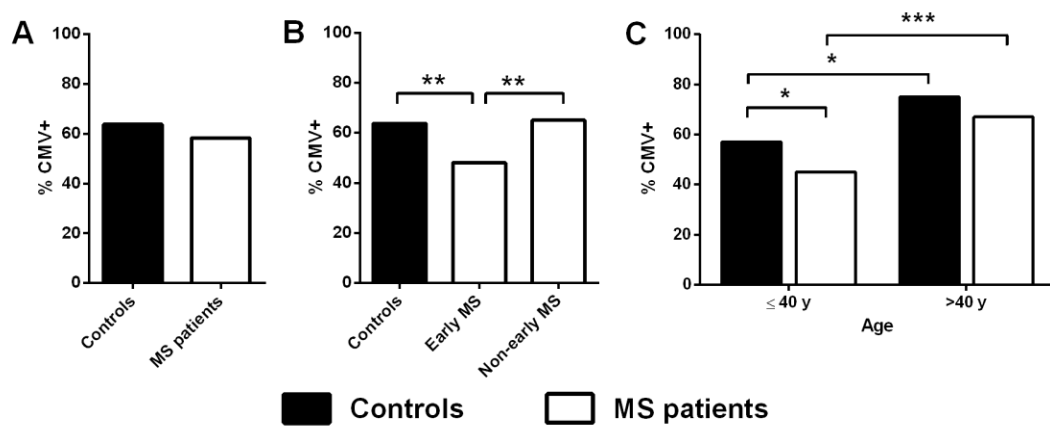
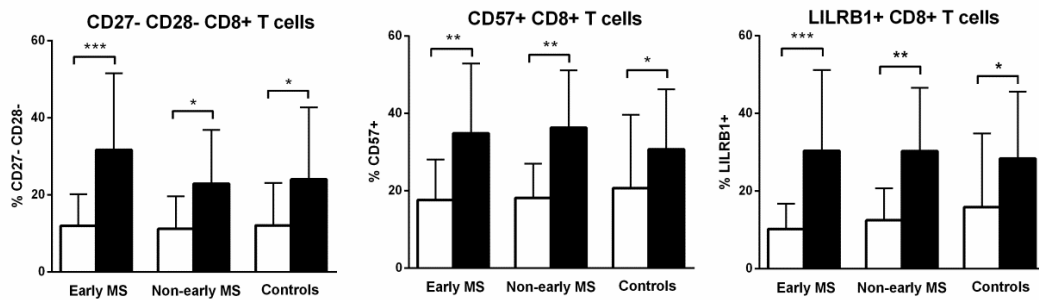


Figure 2. CMV serostatus in MS patients and controls. CMV seroprevalence in MS patients and controls (A), according to MS duration (early MS: ≤ 5 years) (B), and categorizing cases according to age ≤ 40 and >40 years-old (C). P-values: * <0.05 ; ** <0.01 ; *** <0.001 .

A) CD8+ T cells



B) CD4+ T cells

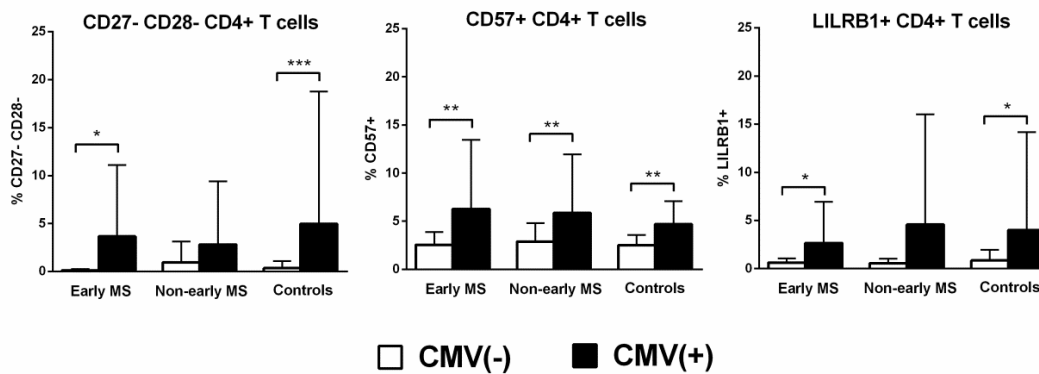


Figure 3. Terminally differentiated T-cells in MS patients and controls according to CMV serostatus and MS duration. Percentages of CD27-CD28-, CD57+ and LILRB1+ were evaluated in CD8+ T-cells (A) and CD4+ T-cells (B). P-values: * <0.05 ; ** <0.01 ; *** <0.001 .

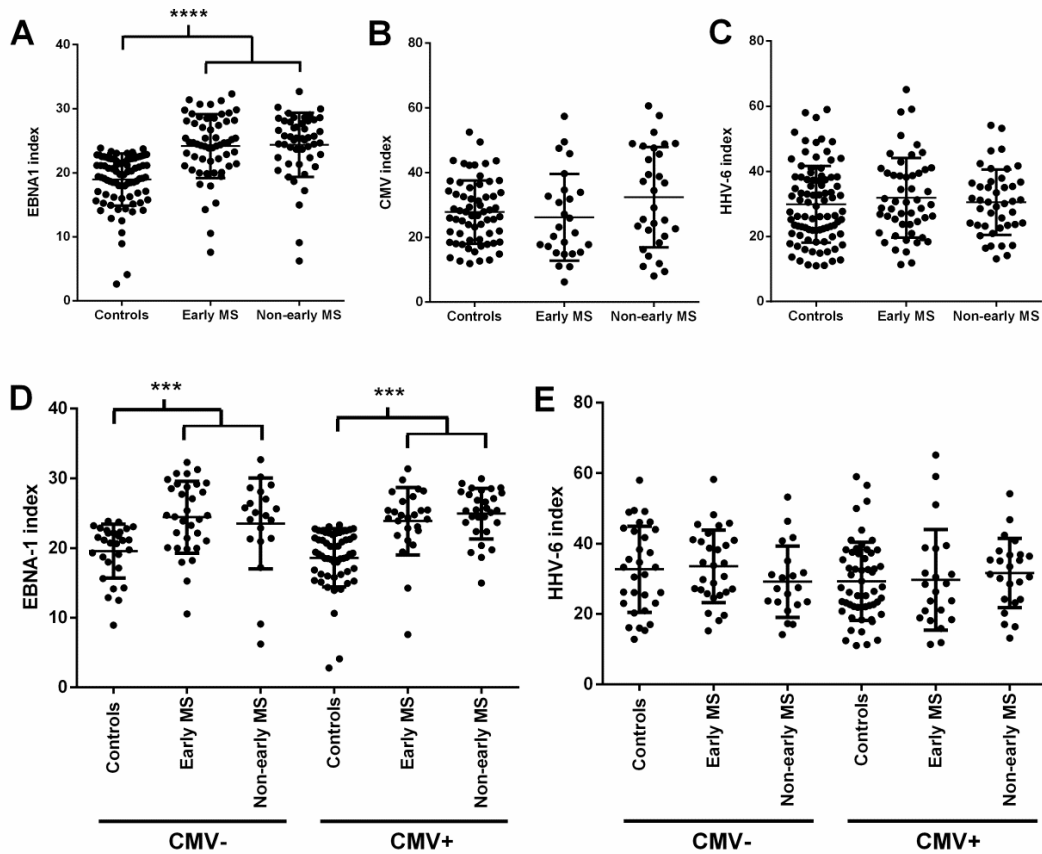


Figure 4. Humoral immune responses to CMV, EBV and HHV-6 in MS patients and controls. IgG EBNA-1 index (A), IgG CMV index (B) and IgG HHV-6 index in MS patients and controls. EBNA-1 index in MS patients and controls according to CMV serostatus (D). IgG HHV-6 index in MS patients and controls according to CMV serostatus (E). P- values:***<0.001,****<0.0001

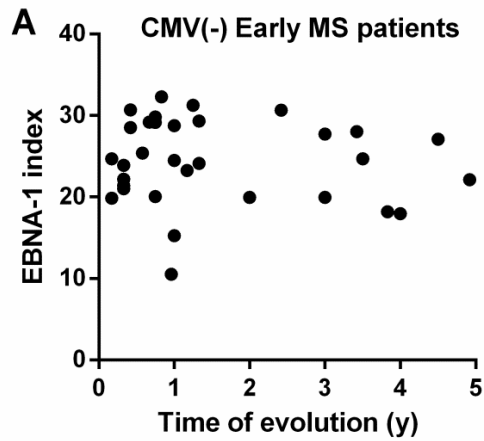
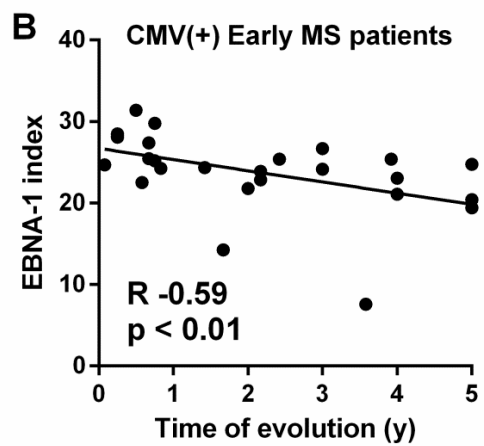


Figure 5. Correlations between EBNA-1 index and MS duration in early MS patients according to CMV serostatus.



5.1.1. Material suplementario Artículo 1.

Table S1. CSF oligoclonal band analysis in early MS patients according to CMV seroprevalence and NKG2C immunophenotype.

	CMV serostatus		P-value	NKG2C immunophenotype ^a		P-value
	CMV- n=41	CMV+ n=33		Low % NKG2C n=59	High % NKG2C n=11	
OCGB (+)	39 (95.1%)	29 (87.9%)	0.240	53 (89.8%)	11 (100%)	0.344
LS_OCMB (+)	29 (70.7%)	27 (81.8%)	0.203	46 (80%)	10 (90.9%)	0.299

OCGB: oligoclonal IgG bands. LS_OCMB: lipid-specific oligoclonal IgM bands. ^aThe analysis of NKG2C immunophenotype is categorized based on the percentage of expression of NKG2C in NK-cells as detailed in Methods in low %NKG2C (CMV- and CMV+ MS patients) and high %NKG2C (CMV+ MS patients). Oligoclonal band analysis was performed as previously reported (Villar LM, et al. *J Clin Invest* 2005 Jan;115:187-194).

Table S2. Terminally differentiated markers in T-cells according to disease-modifying drugs (DMD) therapy.

	DMD	Mean %	SD	P-value
CD4+ LILRB1+	Untreated	3.013	8.094	0.067
	Treated	0.711	0.832	
CD4+ CD27-CD28-	Untreated	2.259	6.216	0.270
	Treated	1.167	1.818	
CD4+ CD57+	Untreated	4.786	6.028	0.210
	Treated	3.983	1.785	
CD8+ CD57+	Untreated	29.125	16.731	0.789
	Treated	24.799	15.024	
CD8+ LILRB1+	Untreated	23.389	18.204	0.223
	Treated	18.102	14.050	
CD8+ CD27-CD28-	Untreated	23.351	17.203	0.361
	Treated	16.860	12.691	

Untreated MS patients, n=49; treated MS patients, n=18
(interferon-beta, n=15, glatiramer acetate, n=5).

Table S3. CMV IgG index correlations with terminal differentiation markers in CD4+ and CD8+ T-cells from CMV+ MS patients and controls.

	Early MS (n=16)		Non-early MS (n=19)		Controls (n=14)	
	R	P-value	R	P-value	R	P-value
CD4+ CD27-CD28-	0.411	0.294	0.467	<0.05	0.433	0.122
CD4+ CD57+	0.294	0.269	0.414	0.078	0.349	0.221
CD4+ LILRB1	0.252	0.347	0.246	0.311	0.569	<0.05
CD8+ CD27-CD28-	0.203	0.451	0.549	<0.05	0.200	0.493
CD8+ CD57+	0.285	0.284	0.575	<0.05	0.095	0.748
CD8+ LILRB1	0.300	0.259	0.365	0.124	0.297	0.303

5.2. Adaptive Features of Natural Killer Cells in Multiple Sclerosis.

Antía Moreira, Elisenda Alari-Pahissa, Elvira Munteis, Andrea Vera, Ana Zabalza, Mireia Llop, Noelia Villarrubia, Marcel Costa-García, Roberto Álvarez-Lafuente, Luisa Maria Villar, Miguel López-Botet, Jose E. Martínez-Rodríguez.
Front. Immunol. 10:2403. doi: 10.3389/fimmu.2019.02403



Adaptive Features of Natural Killer Cells in Multiple Sclerosis

Antía Moreira^{1,2,3}, Elisenda Alari-Pahissa⁴, Elvira Munteis¹, Andrea Vera¹, Ana Zabalza¹, Mireia Llop¹, Noelia Villarrubia⁵, Marcel Costa-García⁴, Roberto Álvarez-Lafuente⁶, Luisa María Villar⁵, Miguel López-Botet^{4,7*} and Jose E. Martínez-Rodríguez^{1*}

¹Neurology Department, Hospital del Mar Medical Research Institute (IMIM), Barcelona, Spain, ²Neurology Department, Althaia, Xarxa Assistencial i Universitària de Manresa, Manresa, Spain, ³Departament de Medicina, Universitat Autònoma de Barcelona, Barcelona, Spain, ⁴University Pompeu Fabra, Barcelona, Spain, ⁵Immunology Department, Hospital Universitario Ramón y Cajal, Madrid, Spain, ⁶Neurology Service, Instituto de Investigación Sanitaria del Hospital Clínico de San Carlos, Madrid, Spain, ⁷Hospital del Mar Medical Research Institute (IMIM), Barcelona, Spain

OPEN ACCESS

Edited by:

Zsolt Illes,

University of Southern
Denmark, Denmark

Reviewed by:

Catharina C. Gross,

University of Münster, Germany

Anna Fogdell-Hahn,

Karolinska Institute (KI), Sweden

Bruno Gran,

Nottingham University Hospitals NHS
Trust, United Kingdom

*Correspondence:

Miguel López-Botet

miguel.lopez-botet@upf.edu

Jose E. Martínez-Rodríguez

jmartinezr@hospitaldelmar.cat

Specialty section:

This article was submitted to

Multiple Sclerosis and

Neuroimmunology,

a section of the journal

Frontiers in Immunology

Received: 11 June 2019

Accepted: 25 September 2019

Published: 15 October 2019

Citation:

Moreira A, Alari-Pahissa E, Munteis E,

Vera A, Zabalza A, Llop M,

Villarrubia N, Costa-García M,

Álvarez-Lafuente R, Villar LM,

López-Botet M and

Martínez-Rodríguez JE (2019)

Adaptive Features of Natural Killer

Cells in Multiple Sclerosis.

Front. Immunol. 10:2403.

doi: 10.3389/fimmu.2019.02403

Human cytomegalovirus (HCMV) has been recently related with a lower susceptibility to multiple sclerosis (MS). HCMV promotes an adaptive development of NK cells bearing the CD94/NKG2C receptor with a characteristic phenotypic and functional profile. NK cells are proposed to play an immunoregulatory role in MS, and expansion of the NKG2C(+) subset was recently associated with reduced disability progression. To further explore this issue, additional adaptive NK cell markers, i.e., downregulation of FcεR1γ chain (FcRγ) and PLZF transcription factor, as well as antibody-dependent NK cell activation were assessed in controls and MS patients considering HCMV serology and clinical features. In line with previous reports, increased proportions of NKG2C(+), FcRγ(−), and PLZF(−) CD56^{dim} NK cells were found in HCMV(+) cases. However, PLZF(−) NK cells were detected uncoupled from other adaptive markers within the CD56^{bright} subset from HCMV(+) cases and among CD56^{dim} NK cells from HCMV(−) MS patients, suggesting an additional effect of HCMV-independent factors in PLZF downregulation. Interferon-β therapy was associated with lower proportions of FcRγ(−) CD56^{dim} NK cells in HCMV(+) and increased PLZF(−) CD56^{bright} NK cells in HCMV(−) patients, pointing out to an influence of the cytokine on the expression of adaptive NK cell-associated markers. In addition, proportions of NKG2C(+) and FcRγ(−) NK cells differed in progressive MS patients as compared to controls and other clinical forms. Remarkably, an adaptive NK cell phenotype did not directly correlate with enhanced antibody-triggered degranulation and TNFα production in MS in contrast to controls. Altogether, our results provide novel insights into the putative influence of HCMV and adaptive NK cells in MS.

Keywords: multiple sclerosis, natural killer cells, cytomegalovirus, NKG2C, FcεR1γ, PLZF

INTRODUCTION

Multiple sclerosis (MS) is an immune-mediated disease of the central nervous system characterized by a highly variable clinical course. Both genetic and environmental factors are involved in MS, with an influence of herpesvirus infections supported by seroepidemiological studies. Whereas Epstein–Barr virus (EBV) is consistently associated with MS and might play a pathogenic role as an environmental trigger (1, 2), human cytomegalovirus (HCMV) was recently related to lower MS susceptibility (3–6); however, the basis for these observations remains uncertain.

HCMV establishes a lifelong latent infection whose prevalence appears inversely related with socioeconomic development and, in line with the “hygiene hypothesis,” the reported associations with MS might be indirectly linked to the exposure to other environmental factors. On the other hand, a putative influence of HCMV in MS immunopathology is conceivable (7), as this herpesvirus may exert a profound impact on the immune system (8), and could potentially modulate the response to other pathogens (i.e., heterologous immunity) (9, 10). Nevertheless, whether HCMV may exert a beneficial or detrimental effect on MS is currently uncertain (11).

T lymphocytes and natural killer (NK) cells play complementary key roles in controlling HCMV, which, reciprocally, has developed a variety of immune evasion mechanisms (12). HCMV has been reported to induce a persistent reconfiguration of NK cell compartment, both in healthy individuals and under pathological conditions. The magnitude of this effect is variable and hallmarked by the differentiation and expansion of functionally mature NK cells displaying high levels of the CD94/NKG2C activating receptor encompassed by additional phenotypic and functional changes (13–16). Human adaptive NKG2C(+) NK cells are contained within the major circulating CD56^{dim} subset, which mediates cytotoxicity and cytokine production upon interaction with target cells, either directly or through IgG engagement of FcγRIIIA (CD16A). As compared to other subsets, adaptive NKG2C(+) NK cells effectively mediate antibody-dependent effector functions, particularly cytokine production (17, 18). Additional associated-adaptive NK cell

markers include epigenetic silencing of the promyelocytic leukemia zinc finger (PLZF) transcription factor, with unknown functional implications in NK cells (17, 19–21), and loss of the FcεRI gamma chain (FcRγ) adaptor coupled to CD16, whose replacement by the ζ chain may enhance antibody-dependent NK cell activation (17, 19, 22, 23). Some adaptive NK cell-associated features have also been detected in NKG2C(–) NK cell subsets, suggesting that NK cell differentiation is independent of NKG2C expression and may be induced by stimuli other than HCMV (17, 18, 24). Moreover, adaptive NK cell differentiation may not be a coordinated process, as supported by the delayed FcRγ loss observed in adaptive NK cells following HCMV infection in hematopoietic stem cell transplantation recipients (25). The cellular and molecular mechanisms underlying the development of adaptive NK cells and their implications in human health remain partially defined.

NK cells have been previously studied in the context of MS (26, 27), and changes associated with the response to some immunomodulatory therapies have been reported (28, 29), proposing an immunoregulatory role played by the minor circulating CD56^{bright} NK cell subset (30). These cells display a CD16(–) NKG2A(+) phenotype and have a limited cytotoxic capacity but efficiently produce cytokines, constituting the predominant subset in peripheral lymphoid tissues. However, the role of NK cells in MS immunology is only partially understood. Recently, we described an association of HCMV-induced expansion of NKG2C(+) NK cells with a lower risk of disability progression in MS, suggesting an influence of these

lymphocytes on the clinical course (31). In the present study, we aimed to further explore whether HCMV and adaptive NK cells play a protective role in MS. Adaptive NK cell immunophenotype and antibody-triggered NK cell activation against EBV-transformed B cell lines were evaluated in MS patients considering their HCMV serostatus and clinical profile, providing further insights into the involvement of NK cells in this disease.

MATERIALS AND METHODS

Study Design and Population

A case–control study of MS patients was designed to analyze adaptive NK cell markers and antibody-dependent NK cell activation in accordance to HCMV serostatus and clinical characteristics. MS patients diagnosed based on McDonald criteria 2010 from Hospital del Mar, IMIM (Barcelona) and Hospital Ramón y Cajal (Madrid) (REEM, Spanish Network for MS research) were recruited from routine clinical visits. In addition, a subgroup of MS patients was prospectively evaluated after onset of interferon-beta (IFNβ) therapy to assess the influence of this treatment on adaptive NK cells. We excluded patients on disease-modifying therapies known to deplete peripheral lymphocytes or alter their trafficking (e.g., natalizumab, fingolimod, dimethyl fumarate), as well as those undergoing corticosteroid treatment in the last 30 days, pregnancy, or any severe concomitant disease. The following demographic and clinical characteristics were evaluated in every case: age, sex, disease duration, MS form (RRMS: relapsing–remitting MS, SPMS: secondary progressive MS, PPMS: primary progressive MS), disability scores (EDSS: Expanded Disability Status Scale, MSSS: multiple sclerosis severity score) and treatment. Healthy controls matched for age and sex were recruited from the same geographical area.

The study was approved by the local Ethics Committee, including participants after written informed consent. Blood samples obtained from venous puncture were obtained from controls and MS patients, performing standard clinical diagnostics test to evaluate EBV-(LIASON[®]) and HCMV-specific circulating antibodies (Roche[®], Cobas602).

Analysis of NK Cell Immunophenotype

Peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) from 47 healthy controls and 151 MS patients were isolated from blood samples collected in EDTA tubes using Ficoll–Hypaque density gradient centrifugation and cryopreserved in fetal calf serum with 10% dimethyl sulfoxide until analysis. Sample staining for flow cytometry analysis was performed using anti-NKG2A (clone Z199) indirectly labeled with a secondary goat anti-mouse PE-Cy7 (Biolegend) and the following fluorochrome-conjugated antibodies: anti-CD3-PerCP (BD Pharmingen), anti-CD56-APC (Biolegend), anti-CD16-eFluor450 (eBioscience), and NKG2C-PE (R&D Systems). For the analysis of FcRγ (MS, *n* = 139; controls *n* = 47) and PLZF expression (MS, *n* = 86; controls *n* = 26), cells were treated with a fixation/permeabilization kit (BD Biosciences) followed by incubation with anti-FcRγ-FITC (Millipore) and anti-PLZF-PE CF594 (BD Biosciences). Samples

were acquired in LSRFortessa (BD Biosciences) and data were analyzed using FlowJo software (Tree Star, Oregon, USA), using the gating strategy shown in **Figure 1**

Functional Assessment of Antibody-Dependent NK Cell Activation

PBMCs from 42 MS patients (22 RRMS, 8 SPMS and 12 PPMS) and 17 controls matched for HCMV serostatus were incubated overnight at 37°C with recombinant IL-2 (200 U/ml). The response of NK cells to the HLA class I- defective 721.221 B-lymphoblastoid cell line with or without rituximab (50 ng/ml) was assessed following a 4-h incubation (E/T = 1/1). A complementary approach was performed using EBV(+) AKBM cells as targets following induction of the lytic cycle in the presence of EBV(+) or EBV(-) sera, as previously described (32, 33). Surface expression of CD107 as a marker of degranulation and intracellular TNF α production was analyzed by flow cytometry as previously reported (34), using the anti-CD107-APC (BD Pharmigen) monoclonal antibody during incubation together with monensin (GolgiStop[®]; BD) and brefeldin (GolgiPlug[®]; BD). Cultures were then stained with anti-CD3-PerCP (BD Pharmigen), anti-CD56-APC-Cy7 (Biolegend), and anti-NKG2C-PE (R&D System), permeabilized, fixed and stained intracellularly with anti-TNF α -CFBlue (labeled by Immunostep), anti-FcR γ -FITC (Millipore), and anti-PLZF-PE CF594 (BD Biosciences). Data acquisition was performed with an LSRFortessa cytometer (BD Biosciences).

Multidimensional Flow Cytometry Analysis Using Barnes-Hut t-SNE

A multidimensional flow cytometry analysis was performed as previously described (35), compensating raw flow cytometry data using FlowJo software (Tree Star, Oregon, USA) and later imported into R using flowCore and openCyto packages. Lymphocytes were gated on forward scatter and side scatter characteristics and then on CD56^{dim} NK cells. FITC channel was normalized using flowStats R package in order to reduce experimental variability on fluorescence intensity. Subsequently, randomly selected data from 500 CD56^{dim} NK cells per sample was concatenated. The most positive and negative one per mille values for each parameter were reduced to their less extreme border. Next, Barnes-Hut t-SNE was conducted using the Rtsne package. Graphics were produced using ggplot2 and RcolorBrewer R packages.

Statistical Analysis

Normal distribution was assessed using Kolmogorov–Smirnov test. Continuous variables were expressed as mean \pm standard deviation (SD) or median (first–third quartile) for parametric and non-parametric variables, respectively. Relationship between continuous and dichotomous variables was assessed by Student's *t*-test or Mann–Whitney *U*-test, respectively. Pearson or Spearman correlation coefficients were calculated for pairwise comparison of continuous variables. Wilcoxon test for paired samples was used to compare matched prospectively followed-up samples before and after IFN β therapy. Three-dimensional Venn analysis evaluated the co-expression of adaptive markers

in NK cells. Multivariate lineal regression analysis determined predictors for adaptive NK cell markers adjusting the models for HCMV serostatus, clinical variables, and IFN β treatment. Results were considered significant at the two-sided level of 0.05. Analyses were performed using SPSS v.23 software.

RESULTS

HCMV-Related Expansion of Adaptive NK Cells in MS Patients

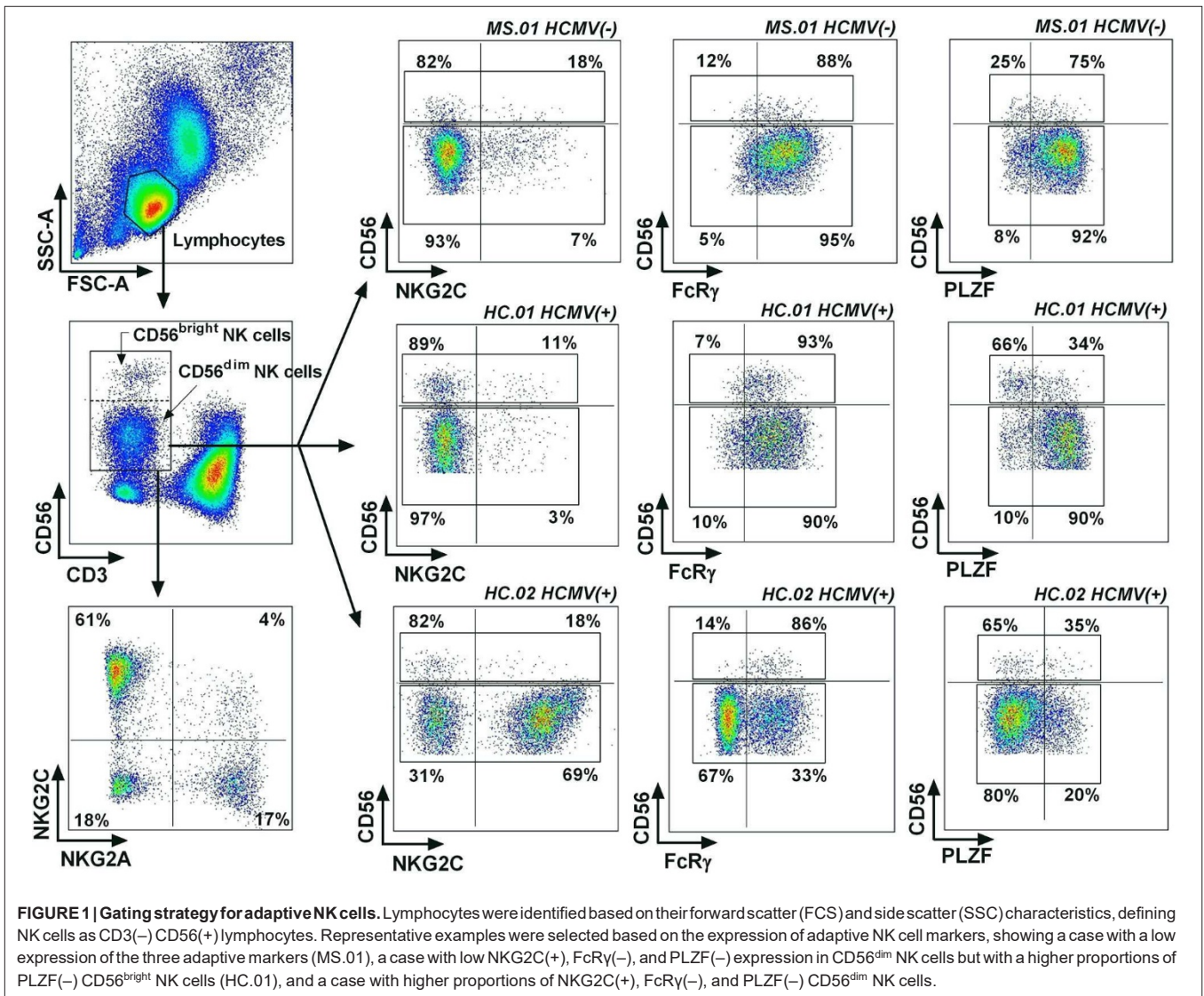
We comparatively studied in controls and MS patients the influence of HCMV on the expression of adaptive NK cell differentiation markers (NKG2C, FcR γ , and PLZF) based on the gating strategy for flow cytometry analysis illustrated in **Figure 1**. Demographic and clinical characteristics of MS patients and controls are shown in **Table 1**. In our study, HCMV seroprevalence was comparable in both groups (**Table 1**), and no clinical differences were observed in MS patients associated with HCMV serostatus (data not shown).

HCMV seropositivity was associated with greater proportions of NKG2C(+) NK cells, with no significant differences between MS patients and controls (**Figure 2A**). The expansion of NKG2C(+) cells was confined to the CD56^{dim} NK cell subset, whereas detection of CD56^{bright} NKG2C(+) NK cells appeared unrelated to HCMV serology (**Figure 2A**). Similarly, the frequency of CD56^{dim} FcR γ (-) NK cells was also increased in HCMV(+) patients and controls as compared to HCMV(-) individuals (**Figure 2B**). By contrast, HCMV(+) controls and MS patients showed increased proportions of PLZF(-) cells not only in CD56^{dim} NK cells but, remarkably, also among the CD56^{bright} subset (**Figure 2C**); these PLZF(-) NK cells were confirmed to display the characteristic CD56^{bright} NKG2A(+) CD16(-) phenotype (**Supplementary Figure 1**). Of note, an increased frequency of PLZF(-) cells was also detected among CD56^{dim} NK cells from HCMV(-) MS patients as compared to seronegative controls (**Figure 2C**). Overall, these results support previous studies describing the HCMV-related expansion of adaptive NK cells displaying the NKG2C(+), FcR γ (-), and PLZF(-) markers in CD56^{dim} NK cells; however, a lack of PLZF expression associated to HCMV seropositivity was also perceived in the CD56^{bright} NK cell subset, in both controls and MS patients, in addition to an influence of HCMV-independent factors in PLZF downregulation in CD56^{dim} NK cells found in MS cases.

Relationship Between Adaptive NK Cell Markers in MS Patients and Controls

We next evaluated the relation of adaptive NK cell markers in CD56^{dim} NK cells from controls and MS patients. Three-dimensional Venn diagrams illustrated that NK cells co-expressing adaptive NK cell markers were increased in HCMV(+) compared to HCMV(-) MS patients (**Figures 3A,B**). The presence in MS patients of increased proportions of PLZF(-) CD56^{dim} NK cells without other adaptive markers was also confirmed (**Figure 3A**).

t-SNE multidimensional analysis of adaptive markers in CD56^{dim} NK cells (**Figure 3C**) revealed an HCMV-related



expression of NKG2C, more pronounced in controls than in MS patients. By contrast, NKG2C(-) FcRγ(-) PLZF(-) NK cells were more evident in MS patients than in controls, with a less marked relation to HCMV serology (Figure 3C). These results further point out an uncoupled expression of adaptive markers in NK cells from MS patients as compared to controls, suggesting the influence of factors other than HCMV.

Influence of IFNβ Therapy on Adaptive NK Cells in RRMS

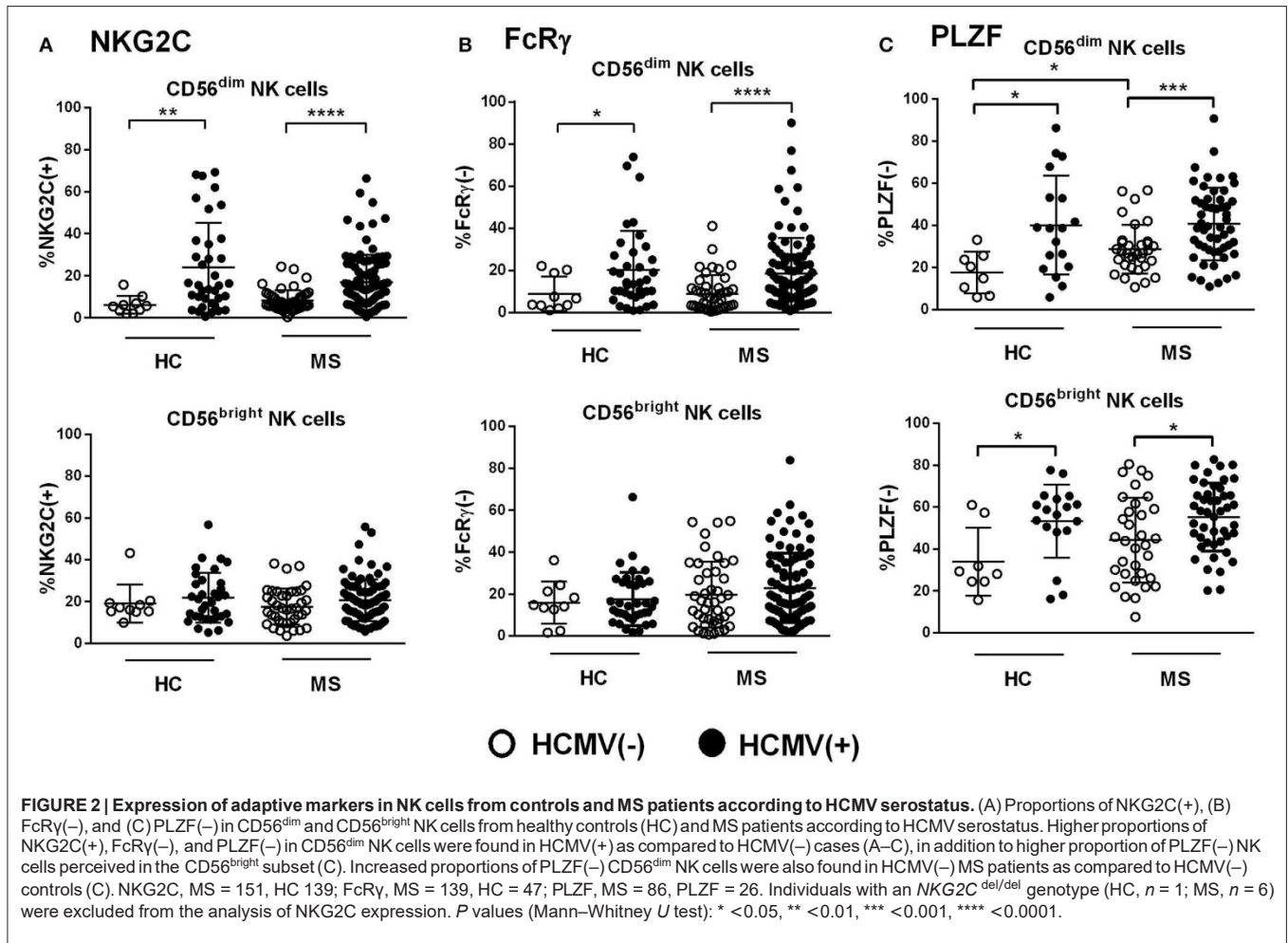
We next evaluated the impact of IFNβ therapy on adaptive NK cell markers in RRMS (mean time of treatment, 7.0 ± 4.2 years). As previously reported (36), IFNβ-treated patients displayed increased proportions of CD56^{bright} NK cells as compared to untreated cases ($14.8\% \pm 11.6$ vs. $8.3\% \pm 7.1$, $p < 0.05$), which appeared unrelated to any of the adaptive markers analyzed (data not shown). IFNβ therapy did not alter the effect of HCMV on the proportions of

NKG2C(+) CD56^{dim} NK cells (Figure 4A). However, lower proportions of FcRγ(-) CD56^{dim} NK cells were found in IFNβ-treated patients as compared to untreated cases ($9.6\% \pm 8.2$ vs. $19.3\% \pm 19.7$, $p < 0.05$), a finding only perceived in CD56^{dim} NK cells from HCMV(+) but not in HCMV(-) MS cases, who displayed low proportions of FcRγ(-) NK cells independently of treatment (Figure 4B). Interestingly, PLZF(-) CD56^{bright} NK cells tended to increase in IFNβ-treated HCMV(-) patients (Figure 4C), vanishing the differences related to HCMV serostatus noticed in both CD56^{dim} and CD56^{bright} NK cell subsets (Figure 2C). These results suggest that HCMV-driven adaptive NK cell development in RRMS might be modulated by IFNβ therapy. However, the above-mentioned IFNβ-related modifications in adaptive markers were not perceived in a subgroup of MS patients prospectively followed after 1 year of treatment (Supplementary Figure 2), indicating that the cytokine does not directly modify the adaptive NK cell immunophenotype.

TABLE 1 | Demographic and clinical characteristics of MS patients and controls.

	Controls <i>n</i> = 47	MS patients <i>n</i> = 151	<i>P</i> -value*	RRMS <i>n</i> = 88	SPMS <i>n</i> = 44	PPMS <i>n</i> = 19	<i>P</i> -value#
Age (years)	46.6 ± 13.3	50.1 ± 11.4	0.08	45.6 ± 10.0	55.0 ± 8.8	59.4 ± 13.0	<0.001
HCMV seroprevalence, <i>n</i> (%)	37 (78.7)	103 (68.7)	0.126	59 (67.8)	33 (75)	11 (57.9)	0.217
EBV seroprevalence, <i>n</i> (%)	40 (87)	147 (98.7)	<0.01	86 (98.9)	43 (97.7)	18 (100)	0.152
Sex (female), <i>n</i> (%)	30 (63.8)	101 (66.9)	0.413	59 (67.0)	28 (63.6)	14 (73.7)	0.861
MS duration (years)	–	15.1 ± 10.0	–	11.6 ± 9.1	21.5 ± 8.7	16.2 ± 9.8	<0.001
DMT, <i>n</i> (%)	–	50 (33.1)	–	42 (47.7)	7 (15.9)	1 (5.3)	<0.001
DMT-naive, <i>n</i> (%)	–	47 (34.1)	–	22 (28.9)	9 (20.9)	16 (84.2)	<0.001
EDSS	–	3.5 (2.0–6.0)	–	2.0 (1.0–3.0)	6.5 (5.5–7.5)	6.0 (4.5–7.0)	<0.001
MSSS	–	4.23 ± 2.92	–	2.60 ± 2.20	6.58 ± 2.25	6.56 ± 1.91	<0.001
2y-RR	–	0.19 ± 0.41	–	0.34 ± 0.52	0.01 ± 0.08	0.0 ± 0.0	<0.001
ARR	–	0.37 ± 0.41	–	0.42 ± 0.42	0.52 ± 0.39	0.01 ± 0.02	<0.001

Values are expressed as mean ± SD or median (1st–3rd quartile). HCMV, human cytomegalovirus; EBV, Epstein–Barr virus; DMT, disease-modifying therapy (interferon-beta, *n* = 45; glatiramer acetate, *n* = 5), EDSS, Expanded Disability Status Scale; MSSS, multiple sclerosis severity score; 2y-RR, relapsing rate in the previous 2 years; ARR, annualized relapsing rate; RRMS, relapsing–remitting MS; SPMS, secondary progressive MS; PPMS, primary progressive MS. **P*-values comparing controls and MS patients using *t* test or Mann–Whitney *U*-test. #*P*-values comparing RRMS, SPMS, and PPMS patients using one-way ANOVA.



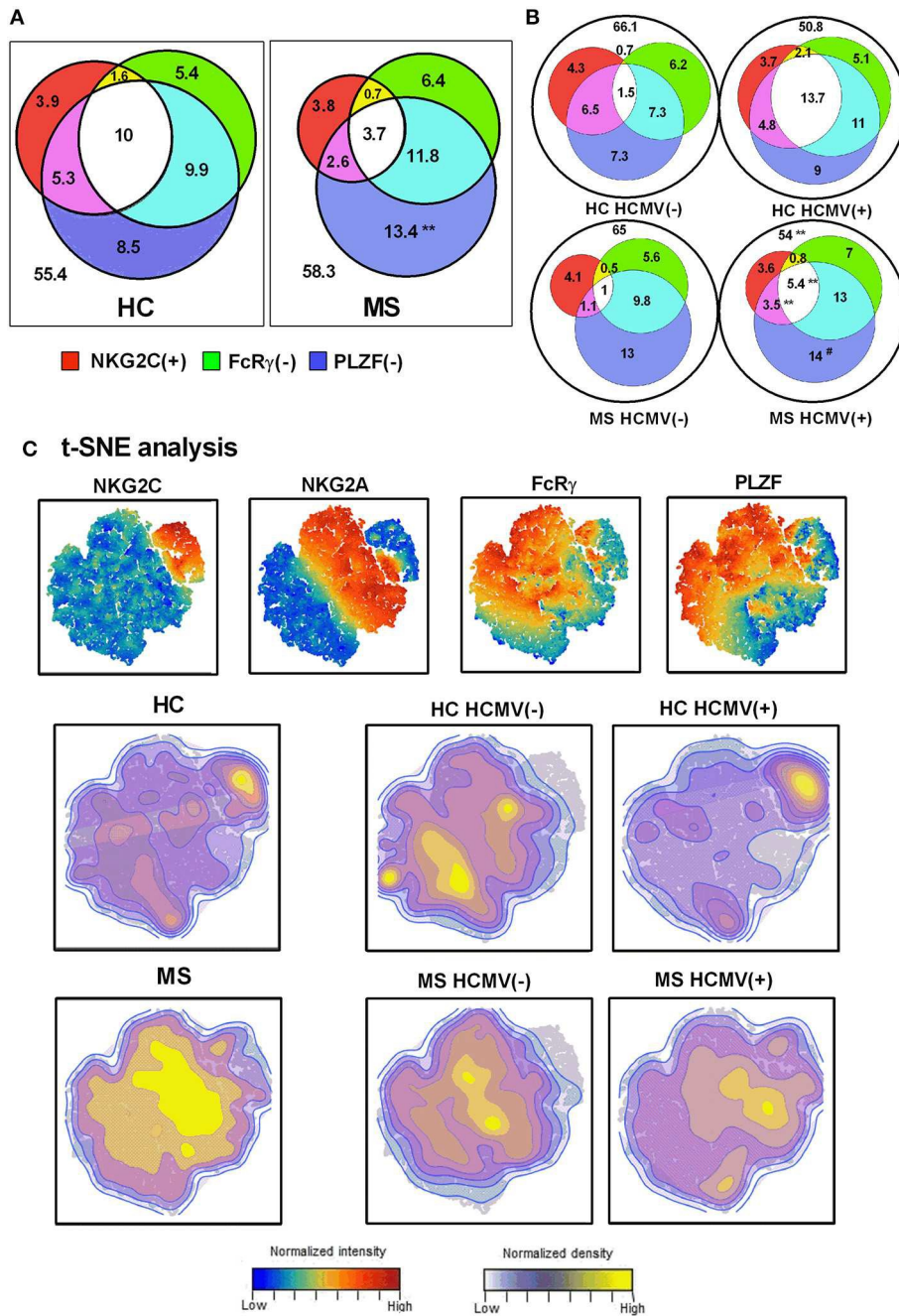
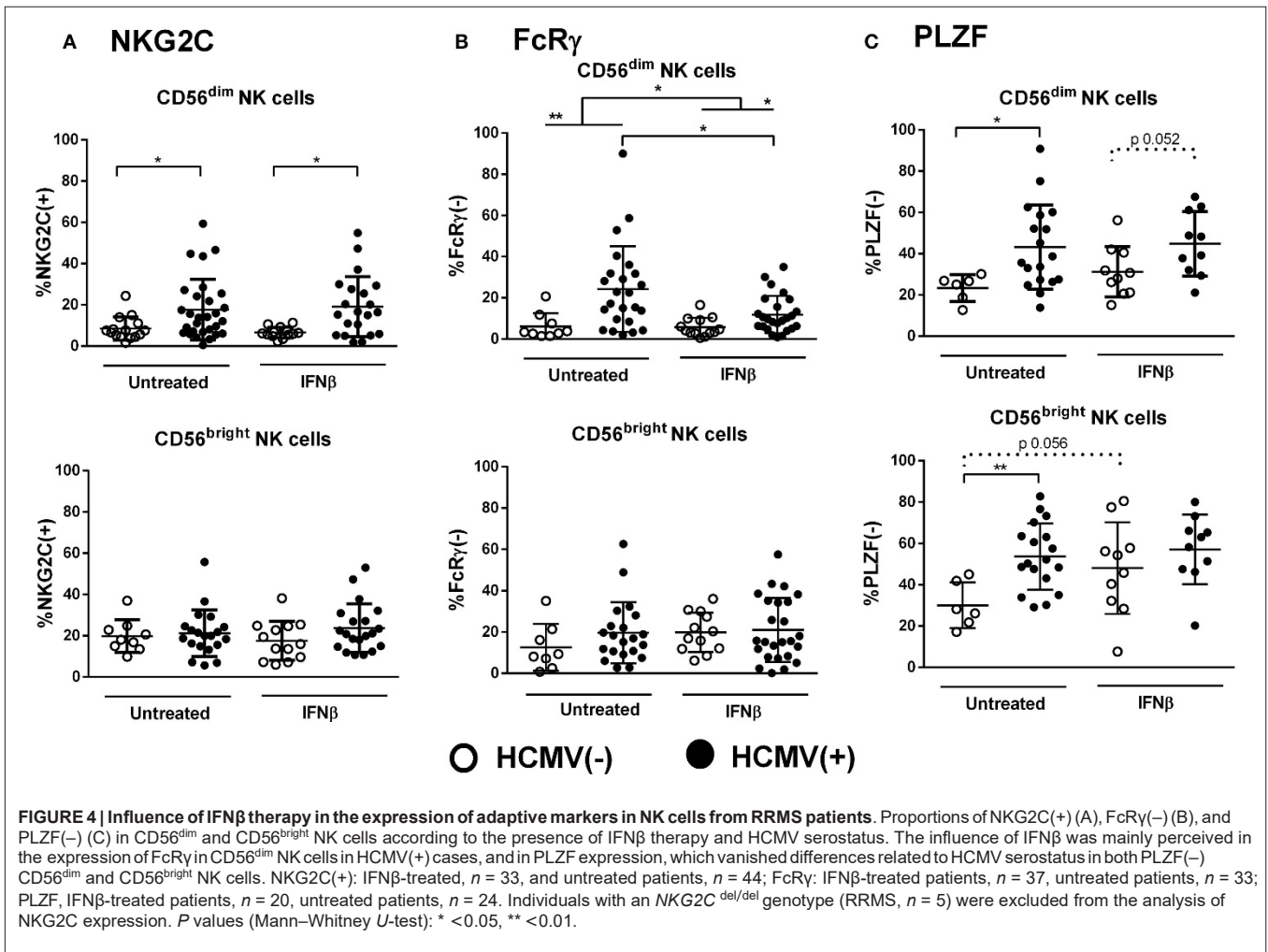


FIGURE 3 | Interrelationship of adaptive NK cell markers in MS. Venn diagrams depicting the proportions of NKG2C(+), FcR γ (-), and PLZF(-) CD56^{dim} NK cells in healthy controls (HC) ($n = 26$) and MS patients ($n = 86$) (A), and stratifying results according to HCMV serostatus (B). Values expressed the mean proportion for each group. P -values (Mann–Whitney U -test): ** < 0.01 , comparing controls vs. MS patients; ## < 0.01 , comparing HCMV(-) vs. HCMV(+). (C) t-SNE plots of NKG2C, NKG2A, FcR γ , and PLZF expression in CD56^{dim} NK cells evaluated in HC and MS patients according to HCMV serostatus.

Distribution of Adaptive NK Cells in MS Patients According to Clinical Forms

Considering MS form, NKG2C(+) CD56^{dim} NK cell proportions were lower in PPMS patients as compared to SPMS patients (Supplementary Figure 3A). By contrast, proportions of

FcR γ (-) NK cells appeared greater in SPMS patients as compared to RRMS, in both CD56^{dim} and CD56^{bright} NK cells (Supplementary Figure 3B). No differences were observed for PLZF expression according to MS form (Supplementary Figure 3C). After multivariate regression



analysis, the association of MS form with adaptive markers appeared independent of HCMV and IFN β -therapy only for the proportions of NKG2C(+) CD56^{dim} and FcR γ (-) CD56^{bright} NK cells (Supplementary Table 1). No additional correlations were observed between adaptive NK cell markers and age, disease duration, disability scores, or disease activity (data not shown). These results suggest that the expression of some adaptive NK cell markers may vary in progressive MS forms independently of the influence of HCMV and IFN β therapy.

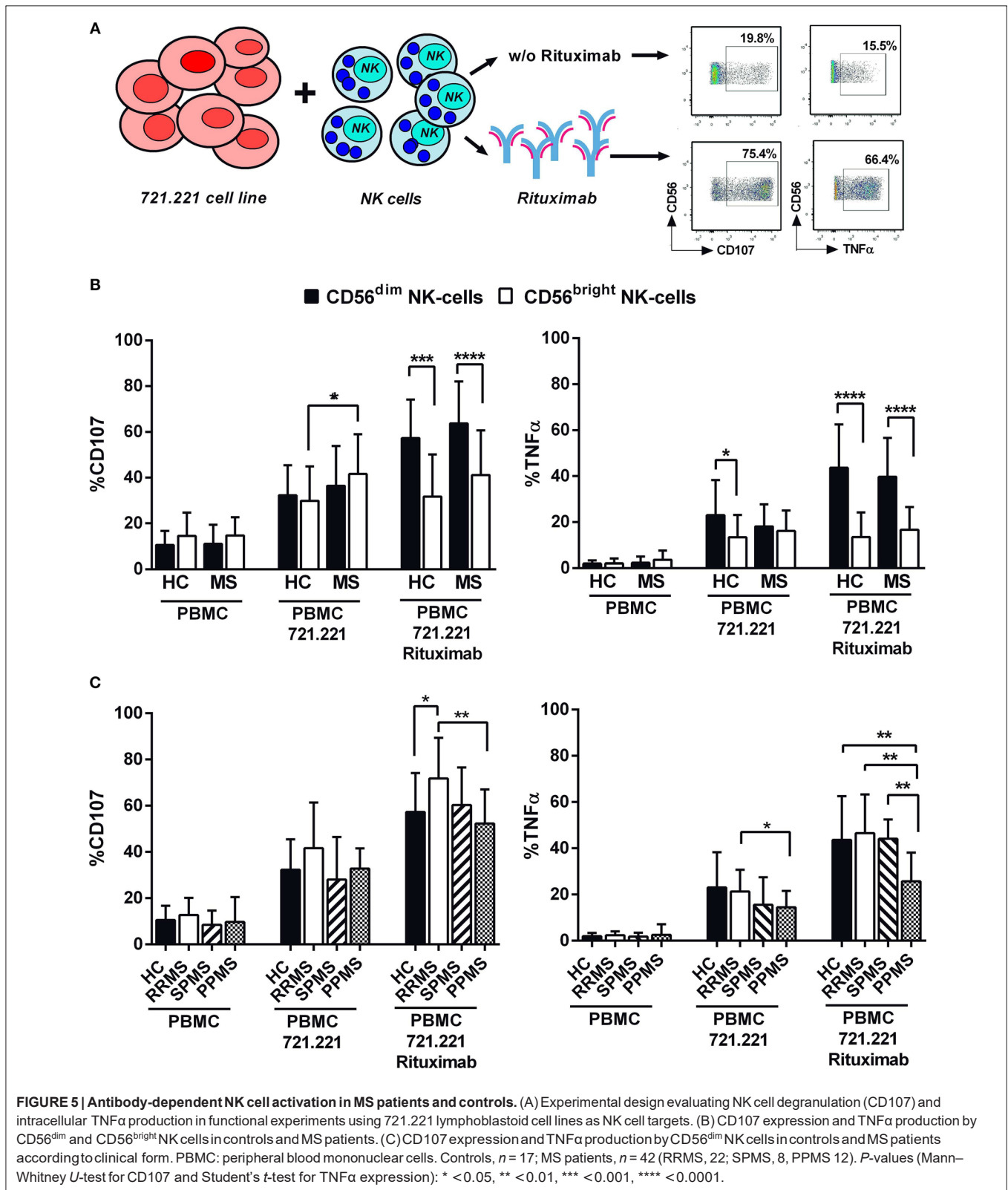
Adaptive NK Cell Markers and Antibody-Dependent Activation in MS

In order to evaluate antibody-dependent NK cell functions, degranulation and TNF α production were measured in NK cells from 42 MS patients and 17 controls following stimulation with the 721.221 cell line in the absence or presence of rituximab (Figure 5A). As expected, CD56^{dim} NK cells in controls and MS patients showed a greater degranulation and TNF α production in the presence of rituximab (Figure 5B). In addition, an increased degranulation of CD56^{bright} NK cells in the direct response to the 721.221 cell line without rituximab was perceived in MS patients (Figure 5B).

Comparable results were observed in experiments using the EBV-infected AKBM cell line as target (Supplementary Figure 4A).

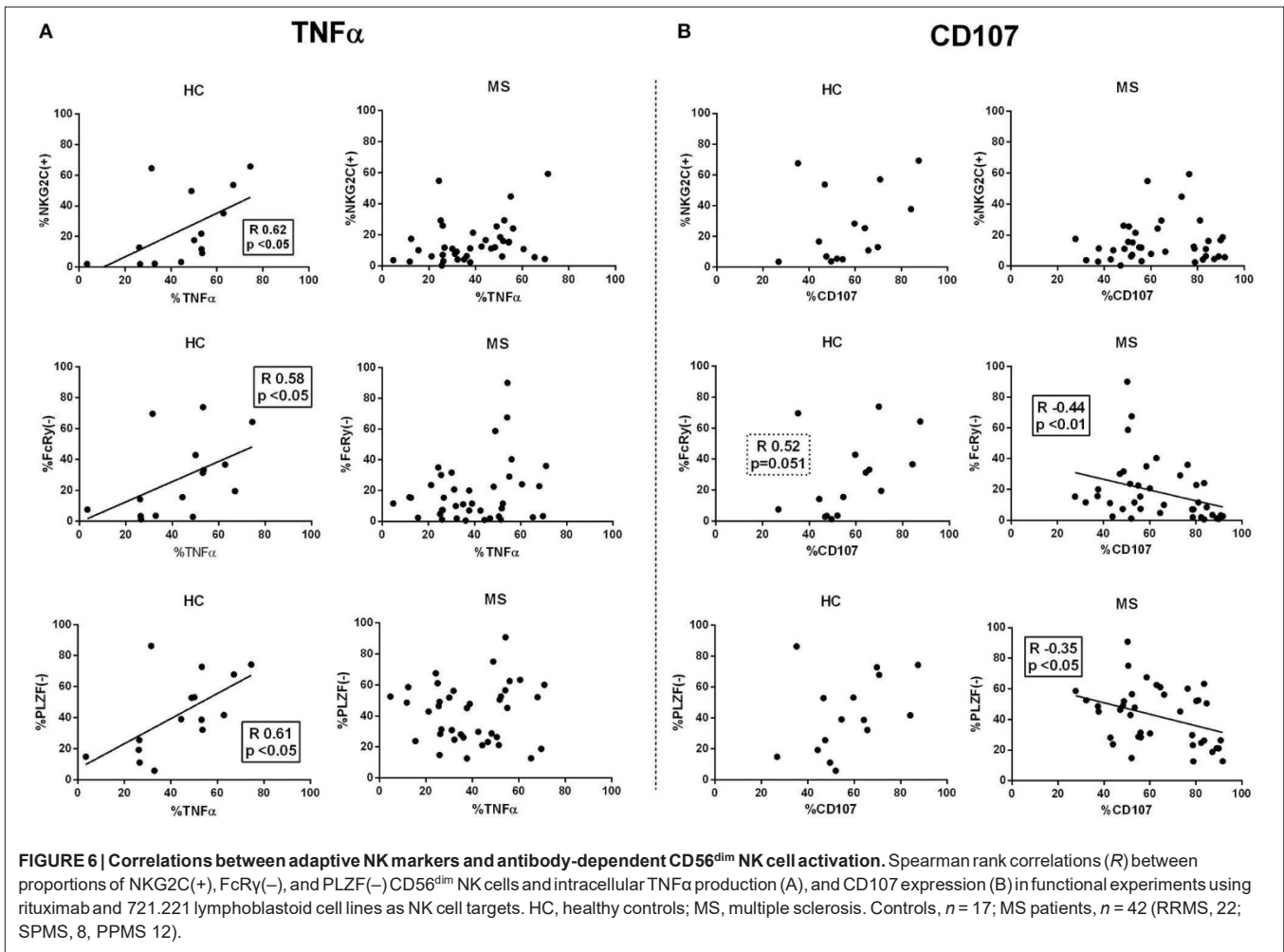
We subsequently evaluated antibody-dependent NK cell functions according to MS form (Figure 5C). RRMS patients displayed increased proportions of degranulating CD56^{dim} NK cells as compared with controls and PPMS; moreover, the proportions of TNF α -secreting cells were lower in PPMS as compared with controls and other MS forms (Figure 5C). Similar results for TNF α production were obtained using the AKBM cell line (Supplementary Figure 4B). IFN β therapy in MS patients did not influence the results obtained in these experiments (data not shown).

Next, we evaluated the relationship of adaptive markers in CD56^{dim} NK cells and antibody-triggered responses. In controls, the proportions of NKG2C(+), FcR γ (-), and PLZF(-) CD56^{dim} NK cells appeared unrelated to degranulation, whereas a direct correlation with TNF α production was observed (Figure 6). By contrast, the proportions of adaptive NK cells in MS patients did not correlate with TNF α secretion and, moreover, an inverse relation between degranulation and the proportions of FcR γ (-) and PLZF(-) CD56^{dim} NK cells was detected (Figure 6); similar



observations were found in CD56^{bright} NK cells from MS patients (data not shown). An analysis considering the co-expression of adaptive markers in controls and MS patients showed

that antibody-triggered responses were greater in NKG2C(+) CD56^{dim} NK cells independently of FcR γ or PLZF expression (Supplementary Figure 5).



Overall, these results suggest that adaptive NK cell function may differ in MS according to clinical form, being greater in RRMS as compared to progressive MS forms; however, in contrast to healthy individuals, an adaptive NK cell profile in MS patients did not correlate with proficient antibody-triggered effector functions.

DISCUSSION

Considering the high prevalence of lifelong HCMV infection and its broad impact on the immune system (8), the possibility that this herpesvirus might somehow impact the development of autoimmune disorders is plausible (37). A lower HCMV seroprevalence has been reported in studies of pediatric and adult MS populations (3–7, 11), suggesting that this infection might have a protective effect. Among different hypotheses to explain how HCMV might influence MS, we considered the involvement of NK cells, which have been previously related with the disease (26–30). The virus promotes to a variable extent an adaptive differentiation of NK cells (13–15, 17, 19), which effectively mediate antibody-triggered cytotoxicity and cytokine production, thus potentially contributing to the immune response against HCMV and other microbial pathogens

(10, 38–40). In line with reports relating HCMV with a reduced MS susceptibility (3–5), an association of HCMV-driven adaptive NKG2C(+) NK cell expansion with a lower risk of clinical progression was previously described (31). Yet, it remains uncertain whether and how adaptive NK cells might influence the development and clinical course of MS.

In agreement with extensive observations in healthy blood donors and different clinical settings, our results pointed out that HCMV infection is the leading factor that promotes the development of conventional adaptive NKG2C(+), FcR γ (-), and PLZF(-) CD56^{dim} NK cells in MS patients (17–19, 22, 23). In previous reports, an uncoupled distribution of the expression of some adaptive NK cell-associated markers, with potential functional implications, was noticed (17, 18, 25). In this regard, we observed increased proportions of PLZF(-) NK cells, but not of NKG2C(+) or FcR γ (-) NK cells, among the CD56^{bright} NK cell subset from HCMV(+) individuals. Such phenotype may result from an influence of HCMV at early stages of adaptive NK cell development, according to the linear model of differentiation from CD56^{bright} NK cells (41), but also of HCMV-unrelated factors (20, 42), as suggested by the detection of increased PLZF(-) CD56^{dim} NK cells in HCMV(-) MS patients.

No significant differences in NKG2C expression were perceived between controls and progressive forms; yet, lower proportions of NKG2C(+) NK cells in PPMS as compared to SPMS were detected, in line with the lower NKG2C pattern of expression in MS patients observed in the multidimensional analysis as well as in previous studies with a larger number of cases (31). An additional factor related with changes in the expression of adaptive NK cell markers in MS was IFN β therapy, which was associated with reduced proportions of CD56^{dim} FcR γ (-) NK cells in HCMV(+) RRMS patients. Moreover, HCMV-related differences in the proportions of PLZF(-) CD56^{dim} and CD56^{bright} NK cell subsets vanished in IFN β -treated cases, an effect related with an increase of PLZF(-) cells in HCMV(-) patients. However, no phenotypic changes in adaptive NK cells were perceived in a subset of RRMS cases prospectively followed up for 1 year after initiating IFN β therapy, pointing out that this effect likely results from complex mechanisms eventually requiring a longer exposure to be perceived. Further studies would be required to assess whether PLZF downregulation might be related to clinical response to IFN β therapy.

Adaptive NK cells have been reported to effectively mediate antibody-triggered effector functions, particularly cytokine production (22, 23, 34). NK cell activation upon incubation with rituximab-coated 721.221 cells was mainly exerted by CD56^{dim} NK cells, without significant differences between controls and MS patients, as previously reported (43). Other clinical variables (i.e., age and IFN β -therapy) appeared as well unrelated with antibody-triggered responses mediated by CD56^{dim} NK cells (data not shown). Notwithstanding, NK cell activation differed in MS according to the clinical form, being lower in PPMS as compared to RRMS patients. Similar results were obtained using as a target the AKBM cell line, suggesting a comparable pattern of NK cell response against EBV-infected targets. In accordance to previous studies addressing the relation of adaptive markers with NK cell antibody-triggered function (18, 25, 44), a proficient antibody-dependent activity was related to NKG2C expression in CD56^{dim} NK cells rather than to other adaptive-associated markers. This finding, in conjunction with the low NKG2C expression found in progressive MS (31), deserves attention, suggesting that an adaptive NK cell dysfunction may be associated with a risk of disability progression.

Based on our observations, some considerations need to be made regarding the putative connection of HCMV infection and adaptive NK cells with MS immunopathology. First, the ability of NK cells to eliminate activated T lymphocytes suggested that they may play a relevant immunoregulatory role in the context of MS (27, 28, 30). Yet, adaptive NK cells do not effectively exert this function (17), possibly reflecting their expression of KIRs and ILT2 HLA class I-specific inhibitory receptors. Second, given their CD16-triggered antibody-dependent effector functions and proliferation, adaptive NK cells likely participate in the immune response to different microbial pathogens (17, 19, 22, 40). Thus, HCMV-induced adaptive NK cells might contribute to the control of other herpesviruses proposed to

be involved in MS, as supported by their participation in the marked antibody-dependent response against EBV-infected cells (33). In this regard, the adaptive NK cell phenotype in MS patients was not associated with proficient antibody-dependent effector functions, in contrast to the pattern of response observed in healthy donors. Third, PLZF(-) CD56^{bright} NK cells were detected in HCMV(+) controls and MS patients and, moreover, IFN β therapy was associated with increased PLZF(-) CD56^{bright} NK cells in HCMV(-) RRMS. This finding deserves further attention in the context of the regulatory role of CD56^{bright} NK cells and their contribution to control EBV infection (45, 46).

In conclusion, our results provide novel insights into the putative influence of HCMV in MS involving the NK cell compartment. The study shows that the distribution of adaptive NK cell markers in MS may vary not only depending on HCMV seropositivity but also on IFN β therapy and disease form, revealing differences in their antibody-dependent activation as compared to healthy individuals. Further studies are required to explore the involvement of HCMV in the immune response to EBV in MS patients, and the putative influence of HCMV-unrelated factors in PLZF downregulation.

DATA AVAILABILITY STATEMENT

The datasets generated for this study will not be made publicly available. The work is based on flow cytometry analysis of peripheral blood mononuclear cells. Data will be available under request.

ETHICS STATEMENT

The studies involving human participants were reviewed and approved by Comité Ético d'Investigacions Clíniques (CEIC), Hospital del Mar Medical Research Institute. The patients/participants provided their written informed consent to participate in this study.

AUTHOR CONTRIBUTIONS

AM, EA-P, AV, and JM-R designed the study, executed experiments, and performed the statistical analysis. AM, EA-P, ML-B, and JM-R contributed to interpretation of the results and wrote the final draft that was revised for all authors. AZ, EM, and ML contributed to data interpretation and critically reviewed the manuscript. MC-G performed and contributed to the interpretation of the t-SNE analysis. NV, LV, and RÁ-L provided samples, performed serological analysis, and critically reviewed the manuscript.

FUNDING

This work was supported by grants FIS/PI17/00254, SAF 2016-80363-C2-1-R (Spanish Ministry of Economy and Competitiveness and FEDER), the EU FP7-MINECO

Infect-ERA Program (PCIN-2015-191-C02-01), and *Red Española de Esclerosis Múltiple* (REEM) from the Instituto de Salud Carlos III, the European Regional Development Fund (Grant RD16/0015/0011), and the Spanish Ministry of Economy and Competitiveness.

SUPPLEMENTARY MATERIAL

The Supplementary Material for this article can be found online at: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fimmu.2019.02403/full#supplementary-material>

REFERENCES

- Ascherio A, Munger KL, Lennette ET, Spiegelman D, Hernán MA, Olek MJ, et al. Epstein-Barr virus antibodies and risk of multiple sclerosis: a prospective study. *JAMA*. (2001) 286:3083–8. doi: 10.1001/jama.286.24.3083
- Jilek S, Schluep M, Meylan P, Vingerhoets F, Guignard L, Monney A, et al. Strong EBV-specific CD8+ T-cell response in patients with early multiple sclerosis. *Brain*. (2008) 131:1712–21. doi: 10.1093/brain/awn108
- Waubant E, Mowry EM, Krupp L, Chitnis T, Yeh EA, Kuntz N, et al. Common viruses associated with lower pediatric multiple sclerosis risk. *Neurology*. (2011) 76:1989–95. doi: 10.1212/WNL.0b013e31821e552a
- Sundqvist E, Bergström T, Dialalosein H, Nyström M, Sundström P, Hillert J, et al. Cytomegalovirus seropositivity is negatively associated with multiple sclerosis. *Mult Scler J*. (2014) 20:165–73. doi: 10.1177/1352458513494489
- Makhani N, Banwell B, Tellier R, Yea C, McGovern S, O'Mahony J, et al. Viral exposures and MS outcome in a prospective cohort of children with acquired demyelination. *Mult Scler J*. (2016) 22:385–8. doi: 10.1177/1352458515595876
- Langer-Gould A, Wu J, Lucas R, Smith J, Gonzales E, Amezcua L, et al. Epstein-Barr virus, cytomegalovirus, and multiple sclerosis susceptibility: a multiethnic study. *Neurology*. (2017) 89:1330–7. doi: 10.1212/WNL.0000000000004412
- Alari-Pahissa E, Moreira A, Zabalza A, Alvarez-Lafuente R, Munteis E, Vera A, et al. Low cytomegalovirus seroprevalence in early multiple sclerosis: a case for the 'hygiene hypothesis'? *Eur J Neurol*. (2018) 25:925–33. doi: 10.1111/ene.13622
- Brodin P, Jovic V, Gao T, Bhattacharya S, Angel CJL, Furman D, et al. Variation in the human immune system is largely driven by non-heritable influences. *Cell*. (2015) 160:37–47. doi: 10.1016/j.cell.2014.12.020
- White DW, Suzanne Beard R, Barton ES. Immune modulation during latent herpesvirus infection. *Immunol Rev*. (2012) 245:189–208. doi: 10.1111/j.1600-065X.2011.01074.x
- Smitley MJ, Venturi V, Davenport MP, Buntzman AS, Vincent BG, Frelinger JA, et al. Lifelong CMV infection improves immune defense in old mice by broadening the mobilized TCR repertoire against third-party infection. *Proc Natl Acad Sci USA*. (2018) 115:E6817–25. doi: 10.1073/pnas.1719451115
- Vanheusden M, Stinissen P, Hart BA, Hellings N. Cytomegalovirus: a culprit or protector in multiple sclerosis? *Trends Mol Med*. (2015) 21:16–23. doi: 10.1016/j.molmed.2014.11.002
- Vieira Braga FA, Hertoghs KML, van Lier RAW, van Gisbergen KPJM. Molecular characterization of HCMV-specific immune responses: parallels between CD8+ T cells, CD4+ T cells, and NK cells. *Eur J Immunol*. (2015) 45:2433–45. doi: 10.1002/eji.201545495
- Gumá M, Angulo A, Vilches C, Gómez-Lozano N, Malats N, López-Botet M. Imprint of human cytomegalovirus infection on the NK cell receptor repertoire. *Blood*. (2004) 104:3664–71. doi: 10.1182/blood-2004-05-2058
- Lopez-Verges S, Milush JM, Schwartz BS, Pando MJ, Jarjoura J, York VA, et al. Expansion of a unique CD57+ NKG2C^{hi} natural killer cell subset during acute human cytomegalovirus infection. *Proc Natl Acad Sci USA*. (2011) 108:14725–32. doi: 10.1073/pnas.1110900108
- Foley B, Cooley S, Verneris MR, Pitt M, Curtsinger J, Luo X, et al. Cytomegalovirus reactivation after allogeneic transplantation promotes a lasting increase in educated NKG2C⁺ natural killer cells with potent function. *Blood*. (2012) 119:2665–74. doi: 10.1182/blood-2011-10-386995
- López-Botet M, Muntasell A, Vilches C. The CD94/NKG2C⁺ NK-cell subset on the edge of innate and adaptive immunity to human cytomegalovirus infection. *Semin Immunol*. (2014) 26:145–51. doi: 10.1016/j.smim.2014.03.002
- Schlums H, Cichocki F, Tesi B, Theorell J, Beziat V, Holmes TD, et al. Cytomegalovirus infection drives adaptive epigenetic diversification of NK cells with altered signaling and effector function. *Immunity*. (2015) 42:443–56. doi: 10.1016/j.immuni.2015.02.008
- Muntasell A, Pupuleku A, Cisneros E, Vera A, Moraru M, Vilches C, et al. Relationship of NKG2C copy number with the distribution of distinct cytomegalovirus-induced adaptive NK cell subsets. *J Immunol*. (2016) 196:3818–27. doi: 10.4049/jimmunol.1502438
- Lee J, Zhang T, Hwang I, Kim A, Nitschke L, Kim M, et al. Epigenetic modification and antibody-dependent expansion of memory-like NK cells in human cytomegalovirus-infected individuals. *Immunity*. (2015) 42:431–42. doi: 10.1016/j.immuni.2015.02.013
- Schlums H, Jung M, Han H, Theorell J, Bigley V, Chiang SCC, et al. Adaptive NK cells can persist in patients with GATA2 mutation depleted of stem and progenitor cells. *Blood*. (2017) 129:1927–39. doi: 10.1182/blood-2016-08-734236
- Peppas D, Pedroza-Pacheco I, Pellegrino P, Williams I, Maini MK, Borrow P. Adaptive reconfiguration of natural killer cells in HIV-1 infection. *Front Immunol*. (2018) 9:474. doi: 10.3389/fimmu.2018.00474
- Hwang I, Zhang T, Scott JM, Kim AR, Lee T, Kakarla T, et al. Identification of human NK cells that are deficient for signaling adaptor FcRγ and specialized for antibody-dependent immune functions. *Int Immunol*. (2012) 24:793–802. doi: 10.1093/intimm/dxs080
- Zhang T, Scott JM, Hwang I, Kim S. Cutting edge: antibody-dependent memory-like NK cells distinguished by FcR deficiency. *J Immunol*. (2013) 190:1402–6. doi: 10.4049/jimmunol.1203034
- Della Chiesa M, Falco M, Bertaina A, Muccio L, Frassoni F, et al. Human cytomegalovirus infection promotes rapid maturation of NK cells expressing activating killer Ig-like receptor in patients transplanted with NKG2C⁻ umbilical cord blood. *J Immunol*. (2014) 192:1471–9. doi: 10.4049/jimmunol.1302053
- Muccio L, Falco M, Bertaina A, Locatelli F, Frassoni F, Sivori S, et al. Late development of FcεRγ^{neg} adaptive natural killer cells upon human cytomegalovirus reactivation in umbilical cord blood transplantation recipients. *Front Immunol*. (2018) 9:1050. doi: 10.3389/fimmu.2018.01050
- De Jager PL, Rossin E, Pyne S, Tamayo P, Ottoboni L, Viglietta V, et al. Cytometric profiling in multiple sclerosis uncovers patient population structure and a reduction of CD8^{low} cells. *Brain*. (2008) 131:1701–11. doi: 10.1093/brain/awn118
- Gross CC, Schulte-Mecklenbeck A, Wiendl H, Marcenaro E, Kerlero de Rosbo N, Uccelli A, et al. Regulatory functions of natural killer cells in multiple sclerosis. *Front Immunol*. (2016) 7:606. doi: 10.3389/fimmu.2016.00606
- Bielekova B, Catalfamo M, Reichert-Scrivner S, Packer A, Cerna M, Waldmann TA, et al. Regulatory CD56^{bright} natural killer cells mediate immunomodulatory effects of IL-2R⁻ targeted therapy (daclizumab) in multiple sclerosis. *Proc Natl Acad Sci USA*. (2006) 103:5941–46. doi: 10.1073/pnas.0601335103
- Martínez-Rodríguez JE, López-Botet M, Munteis E, Rio J, Roquer J, Montalban X, Comabella M. Natural killer cell phenotype and clinical response to interferon-beta therapy in multiple sclerosis. *Clin Immunol*. (2011) 141:348–356. doi: 10.1016/j.clim.2011.09.006
- Laroni A, Armentani E, Kerlero de Rosbo N, Ivaldi F, Marcenaro E, Sivori S, Gandhi R, Weiner HL, Moretta A, Mancardi GL, et al. Dysregulation of regulatory CD56^{bright} NK cells/T cells interactions in multiple sclerosis. *J Autoimmun*. (2016) 72:8–18. doi: 10.1016/j.jaut.2016.04.003
- Martínez-Rodríguez JE, Cobo-Calvo A, Villar LM, Munteis E, Blanco Y, Rasal R, et al. Adaptive natural killer cell response to cytomegalovirus and disability progression in multiple sclerosis. *Mult Scler*. (2016) 31:741–52. doi: 10.1177/13524585156601215

32. Rensing ME, Keating SE, van Leeuwen D, Koppers-Lalic D, Pappworth IY, Wiertz EJHJ, et al. Impaired transporter associated with antigen processing- dependent peptide transport during productive EBV infection. *J Immunol.* (2005) 174:6829–38. doi: 10.4049/jimmunol.174.11.6829
33. López-Montañés M, Alari-Pahissa E, Sintés J, Martínez-Rodríguez JE, Muntasell A, López-Botet M. Antibody-dependent NK cell activation differentially targets EBV-infected cells in lytic cycle and bystander B lymphocytes bound to viral antigen-containing particles. *J Immunol.* (2017) 199:656–65. doi: 10.4049/jimmunol.1601574
34. Costa-García M, Vera A, Moraru M, Vilches C, López-Botet M, Muntasell A. Antibody-mediated response of NKG2C^{bright} NK cells against human cytomegalovirus. *J Immunol.* (2015) 194:2715–24. doi: 10.4049/jimmunol.1402281
35. Amir ED, Davis KL, Tadmor MD, Simonds EF, Levine JH, Bendall SC, et al. viSNE enables visualization of high dimensional single-cell data and reveals phenotypic heterogeneity of leukemia. *Nat Biotechnol.* (2013) 31:545–52. doi: 10.1038/nbt.2594
36. Saraste M, Irjala H, Airas L. Expansion of CD56Bright natural killer cells in the peripheral blood of multiple sclerosis patients treated with interferon-beta. *Neurol Sci.* (2007) 28:121–6. doi: 10.1007/s10072-007-0803-3
37. Halenius A, Hengel H. Human cytomegalovirus and autoimmune disease. *Biomed Res Int.* (2014) 2014:1–15. doi: 10.1155/2014/472978
38. Kheav VD, Busson M, Scieux C, Peffault de Latour R, Maki G, Haas P, et al. Favorable impact of natural killer cell reconstitution on chronic graft-versus-host disease and cytomegalovirus reactivation after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *Haematologica.* (2014) 99:1860–7. doi: 10.3324/haematol.2014.108407
39. Redondo-Pachón D, Crespo M, Yélamos J, Muntasell A, Pérez-Sáez MJ, Pérez-Fernández S, et al. Adaptive NKG2C⁺ NK cell response and the risk of cytomegalovirus infection in kidney transplant recipients. *J Immunol.* (2017) 198:94–101. doi: 10.4049/jimmunol.1601236
40. Hart GT, Tran TM, Theorell J, Schlums H, Arora G, Rajagopalan S, et al. Adaptive NK cells in people exposed to *Plasmodium falciparum* correlate with protection from malaria. *J Exp Med.* (2019) 216:1280–90. doi: 10.1084/jem.20181681
41. Björkstam NK, Riese P, Heuts F, Andersson S, Fauriat C, Ivarsson MA, et al. Expression patterns of NKG2A, KIR, and CD57 define a process of CD56dim NK-cell differentiation uncoupled from NK-cell education. *Blood.* (2010) 116:3853–64. doi: 10.1182/blood-2010-04-281675
42. Tesi B, Schlums H, Cichocki F, Bryceson YT. Epigenetic regulation of adaptive NK cell diversification. *Trends Immunol.* (2016) 37:451–61. doi: 10.1016/j.it.2016.04.006
43. Gross CC, Schulte-Mecklenbeck A, Rünzi A, Kuhlmann T, Posevitz-Fejfar A, Schwab N, et al. Impaired NK-mediated regulation of T-cell activity in multiple sclerosis is reconstituted by IL-2 receptor modulation. *Proc Natl Acad Sci USA.* (2016) 113:E2973–82. doi: 10.1073/pnas.1524924113
44. Holder KA, Lajoie J, Grant MD. Natural killer cells adapt to cytomegalovirus along a functionally static phenotypic spectrum in human immunodeficiency virus infection. *Front Immunol.* (2018) 9:2494. doi: 10.3389/fimmu.2018.02494
45. Strowig T, Brilot F, Arrey F, Bougras G, Thomas D, Muller WA, et al. Tonsillar NK cells restrict B cell transformation by the Epstein-Barr virus via IFN- γ . *PLoS Pathog.* (2008) 4:e27. doi: 10.1371/journal.ppat.0040027
46. Lunemann A, Vanoaica LD, Azzi T, Nadal D, Munz C. A distinct subpopulation of human NK cells restricts B cell transformation by EBV. *J Immunol.* (2013) 191:4989–95. doi: 10.4049/jimmunol.1301046

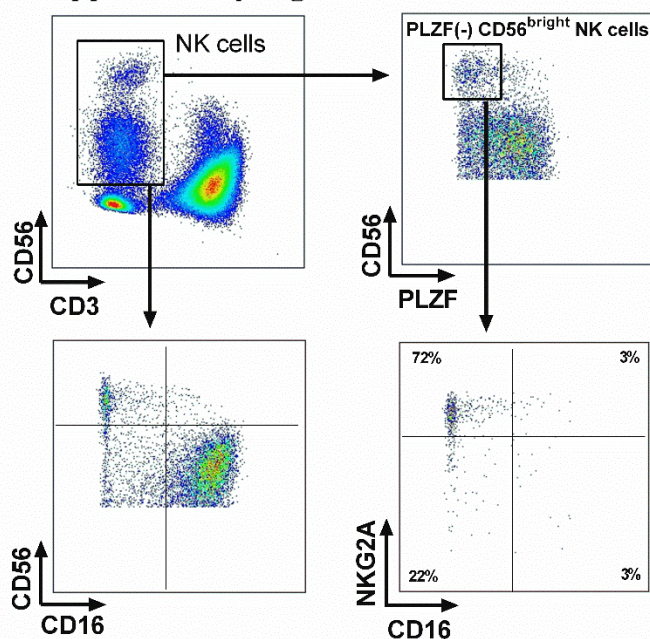
Conflict of Interest: AM has received travel funding from Teva, Biogen Idec, Novartis, Almirall, Bayer, and Genzyme. EM has received personal fees for consulting services and lectures from Merck-Serono, Biogen Idec, Teva, Genzyme, Novartis, Bayer, and Almirall. AZ has received travel funding from Biogen Idec, Novartis, and Genzyme. RÁ-L has received honoraria for lectures from Merck-Serono, Novartis, and Biogen Idec, and grants from Merck-Serono, Teva, Sanofi-Aventis, Biogen Idec, and Bayer. LV reports personal fees for consulting services from Biogen Idec, and grants from Merck-Serono, Biogen Idec, Teva, and Genzyme. JM-R has participated as principal investigator in pharmaceutical company-sponsored clinical trials including Novartis, Roche, Merck-Serono, Actelion, and Celgene, and personal fees for consulting services and lectures from Novartis, Biogen Idec and Merck-Serono.

The remaining authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.

Copyright © 2019 Moreira, Alari-Pahissa, Munteis, Vera, Zabalza, Llop, Villarrubia, Costa-García, Álvarez-Lafuente, Villar, López-Botet and Martínez-Rodríguez. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (CC BY). The use, distribution or reproduction in other forums is permitted, provided the original author(s) and the copyright owner(s) are credited and that the original publication in this journal is cited, in accordance with accepted academic practice. No use, distribution or reproduction is permitted which does not comply with these terms.

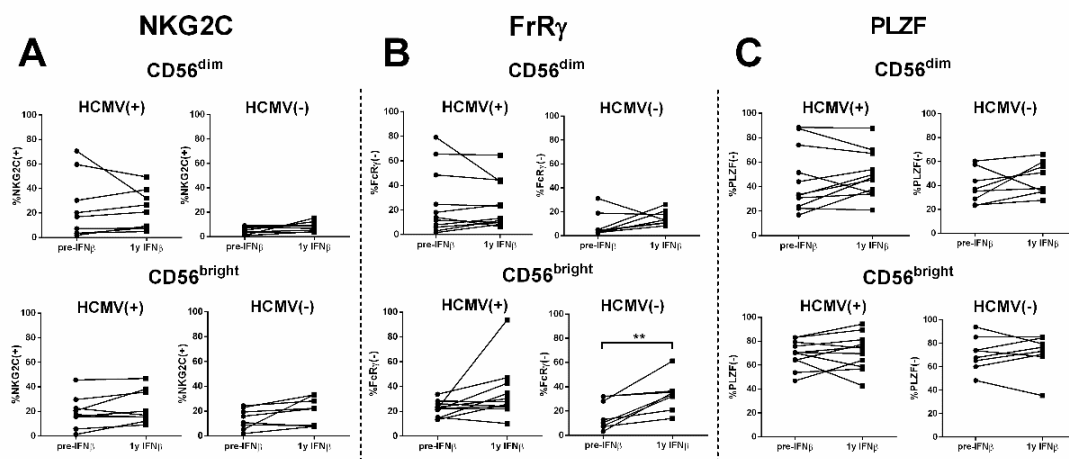
5.2.1. Material suplementario Artículo 2

Supplementary Figure 1



Supplementary Figure 1. Immunophenotype of PLZF(-) CD56^{bright} NK cells. A representative dot plot of CD56^{bright} PLZF(-) NK cells displaying a CD16(-) NKG2A(+) phenotype.

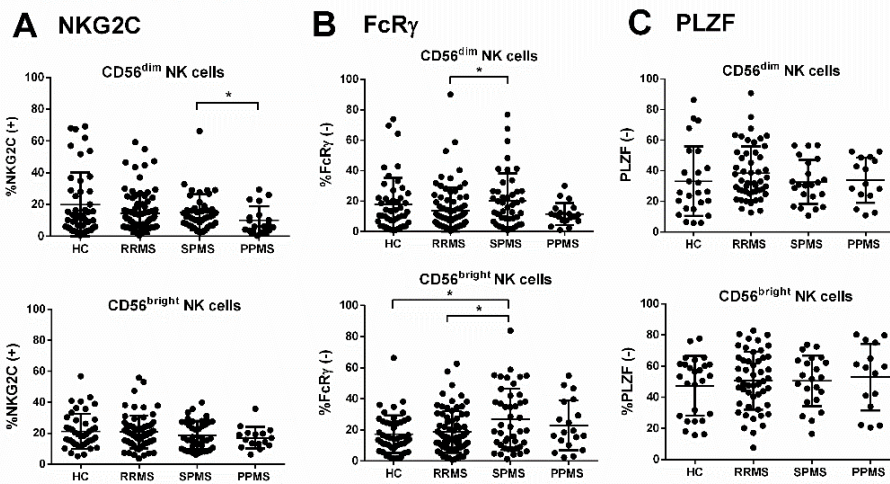
Supplementary Figure 2



Supplementary Figure 2. Prospective analysis of adaptive NK cell markers in MS patients after one year of IFN β therapy. A subgroup of MS patients [HCMV(+), n=11; HCMV(-), n=8] was followed up for a year after treatment onset. No significant changes in the proportions of NKG2C(+), FcR γ (-) and PLZF(-) CD56^{dim} NK cells were detected after IFN β therapy, independently of HCMV serostatus.

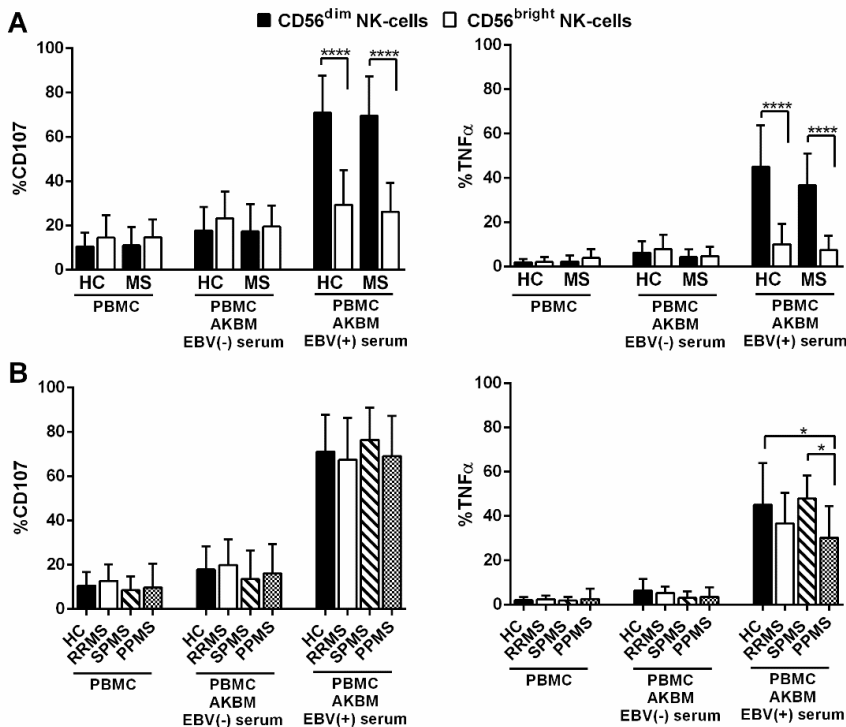
Similarly, no differences were found in CD56^{bright} NK cells, except for a significant increase in FcR γ (-) cells in HCMV(-) MS patients after therapy. P-value (Wilcoxon test): ** <0.01.

Supplementary Figure 3



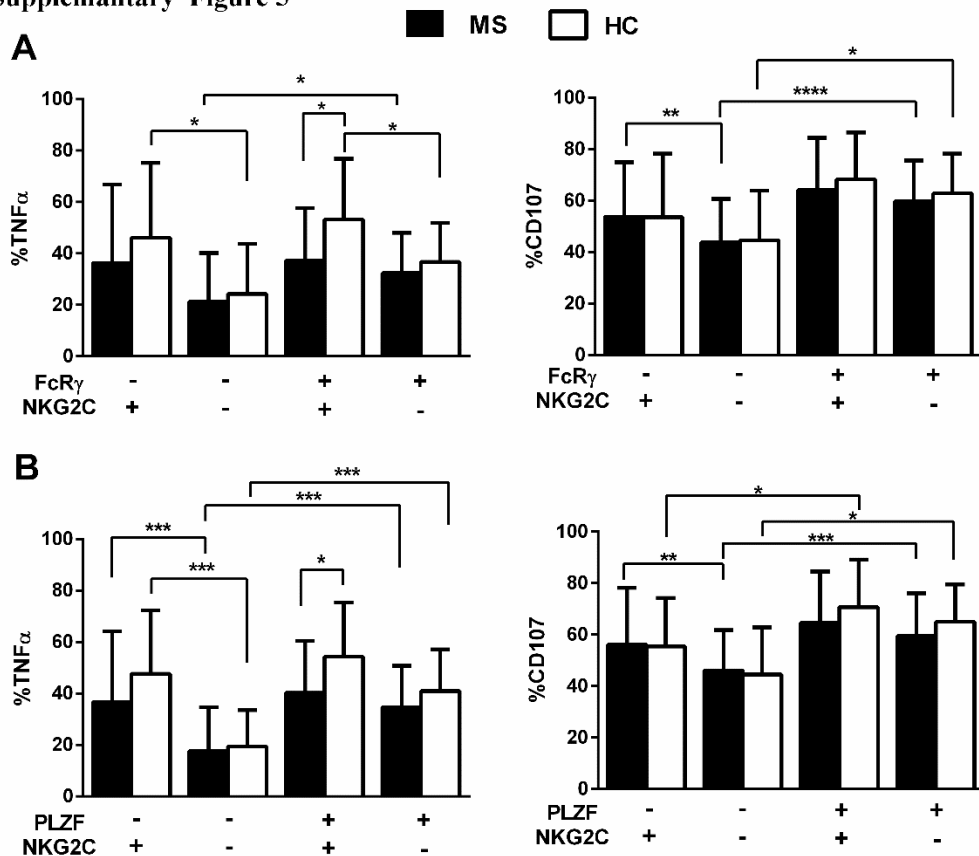
Supplementary Figure 3. Adaptive markers in NK cells from MS patients according to clinical form. Proportions of NKG2C(+) (A), FcR γ (-) (B), and PLZF(-) (C) in CD56^{dim} and CD56^{bright} NK cells in healthy controls (HC) and MS patients according to clinical form. RRMS: relapsing-remitting MS. SPMS: secondary progressive MS. PPMS: primary-progressive MS. P-values were evaluated by pairwise Mann-Whitney U test: * <0.05.

Supplementary Figure 4



Supplementary Figure 4. Antibody dependent NK cell activation in MS patients and controls in experiments using the AKBM cell line. A) CD107 expression and TNF α production by CD56^{dim} and CD56^{bright} NK cells in controls and MS patients. B) CD107 expression and TNF α production by CD56^{dim} NK cells in controls and MS patients according to clinical form. PBMC: peripheral blood mononuclear cells. P-values (Mann-Whitney U test for CD107 and Student's t-test for TNF α statistical analysis) : * <0.05, **** <0.0001.

Supplementary Figure 5



Supplementary Figure 5. Antibody-triggered responses in CD56dim NK cells according to double expression of adaptive markers. CD107 expression and intracellular TNF α production by CD56dim NK cells in controls (HC, n=17) and MS patients (n=42), according to the co-expression of the adaptive markers NKG2C and FcR (A), and NKG2C and PLZF (B). P-values (Mann-Whitney U test): * <0.05, ** <0.01, ***<0.001, **** <0.0001.

Supplementary Table 1. Multivariate analysis of adaptive NK cell markers in MS.

	<u>NKG2C(+) CD56^{dim} *</u>				<u>FcRγ(-) CD56^{dim} **</u>				<u>FcRγ(-) CD56^{bright} **</u>			
<u>Univariate analysis</u>	<u>P-value †</u>				<u>P-value †</u>				<u>P-value †</u>			
MS form	0.025 ^{&}				0.023 ^{&}				0.048 ^{&}			
HCMV	<0.0001 ^{&}				<0.0001 ^{&}				0.263			
IFNβ	0.432				0.010 ^{&}				0.746			
<u>Multivariate analysis</u>	B	β	CI 95%	p-value	B	β	CI 95%	p-value	B	β	CI 95%	p-value
MS form	-0.219	-0.263	-0.426, -0.011	0.039	-0.067	-0.112	-0.175, 0.041	0.221	-	-	-	-
HCMV	0.105	0.126	-0.103, 0.312	0.316	0.448	0.429	0.273, 0.624	<0.001	-	-	-	-
IFNβ	-	-	-	-	-0.240	-0.246	-0.415, -0.065	0.008	-	-	-	-

†: Mann-Whitney test. &: variables introduced in the multivariate linear regression models. * Multivariate linear regression analysis performed in SPMS and PPMS patients (*), and in RRMS and SPMS patients (**). B: Unstandardized coefficient. β: standardized coefficient. CI 95%: confidence interval 95%.

6. RESUMEN GLOBAL DE RESULTADOS

Objetivo principal: Estudio de la respuesta adaptativa mediada por células NK en pacientes con EM y su relación con la infección crónica por el HCMV y las características clínicas de la enfermedad

De cara a intentar responder al objetivo principal se han desarrollado los siguientes objetivos de acuerdo con las hipótesis planteadas:

Objetivo secundario 1: Estudio de la prevalencia de la infección por HCMV en controles y pacientes con EM, evaluando su influencia en el curso clínico de la enfermedad y en la respuesta humoral frente a otros herpesvirus (VEB, HHV6)

En este objetivo se pretendió evaluar la prevalencia de la infección por HCMV en pacientes con EM, tanto de forma global en todos los pacientes, como en fases iniciales de la enfermedad, y su comparación con controles sanos. Para ello, se evaluó la influencia del HCMV en el curso clínico de la enfermedad, así como en la respuesta humoral frente a otros herpesvirus, sentando las bases para el posterior estudio del efecto del virus sobre linfocitos T y células NK planteado en los siguientes objetivos.

La seroprevalencia del HCMV en la población global de pacientes con EM fue similar a la encontrada en controles (58% vs. 68.3%, respectivamente, $p = 0.149$). Sin embargo, al evaluar la seroprevalencia en los pacientes en fases iniciales de la enfermedad (≤ 5 años), esta fue menor que en pacientes con menor tiempo de evolución en comparación con aquellos pacientes de más tiempo de evolución (48% vs. 65% $p < 0.01$), así como en controles sanos (63.8%, $p < 0.01$) (**Artículo 1, Figura 2 A-B**). Dado que estas diferencias podrían estar en relación con el incremento de edad de los pacientes de mayor tiempo de evolución, comprobamos que estos resultados se mantenían al evaluar pacientes y controles menores de 40 años (45% vs. 67%, $p < 0.05$) (**Artículo 1, Figura 2C**). Así mismo, un análisis de regresión logística en la cohorte global de pacientes con EM mostró que la seroprevalencia del HCMV se asociaba con la duración de la

enfermedad (Odds Ratio (OR) 1.04, intervalo de confianza (IC) del 95%, 1.01-1.08 $p < 0.05$) de forma independientemente de la edad (OR 1.02, IC 95% 0.99-1.04, $p = 0.190$). No se encontraron otras asociaciones de la infección crónica por HCMV con variables clínicas de la EM como la actividad o la discapacidad.

De cara a estudiar la respuesta humoral frente a otros herpesvirus, se evaluaron en una muestra de 109 pacientes (59 en fases iniciales (≤ 5 años) y 50 de mayor tiempo de evolución) y 101 controles sanos, anticuerpos específicos contra los virus HCMV, VEB y HHV-6. La seroprevalencia de HCMV y VEB de pacientes con EM en fase temprana de la enfermedad difirió de la de los controles, siendo menor la prevalencia de HCMV y mayor la del VEB (HCMV+ 44.1% vs. 63%, $p < 0.05$; VEB+ 98.3% vs. 88.5% $p < 0.05$), sin encontrar diferencias en cuanto a la seroprevalencia de HHV-6. Así mismo, el índice EBNA-1 fue mayor en pacientes comparado con controles (24.25 ± 4.96 vs. 18.93 ± 4.06 , $p < 0.0001$) de forma independiente al tiempo de evolución de la enfermedad o a la serología HCMV, sin encontrar diferencias en IgG-HCMV o IgG-HHV6 (**Artículo 1, Figura 4**). No se encontraron tampoco diferencias en cuanto al índice de anti-VCA (datos no mostrados).

La influencia de la infección por HCMV en la respuesta humoral a otros herpesvirus fue estudiada en aquellos individuos seropositivos para VEB y HHV6, sin encontrarse relación entre el seroestatus HCMV con el índice de EBNA1 o HHV6 en pacientes y controles. No obstante, al evaluar los pacientes en fases iniciales de la enfermedad (≤ 5 años) seropositivos para el HCMV, se observó una correlación inversa entre anti-EBNA1 y la duración de la enfermedad ($R_{\text{Spearman}} -0.59$, $p < 0.01$), que no estaba presente en pacientes seronegativos, sugiriendo una reducción progresiva de la respuesta humoral al VEB en pacientes seropositivos para HCMV (**Artículo 1, Figura 5**).

Los resultados de este objetivo sugieren que el HCMV podría tener un papel protector sobre la EM, siendo este patógeno menos prevalente al inicio de la enfermedad, independientemente de la edad del paciente, y asociándose a una menor respuesta humoral frente al VEB, pudiendo implicar en este proceso mecanismos de inmunidad heteróloga entre ambos herpesvirus.

Objetivo secundario 2: Evaluación del impacto de la infección por HCMV en subpoblaciones linfocitarias NK y T en pacientes con EM en función de la edad y el tiempo de evolución de la enfermedad.

Una vez evaluada la seroprevalencia del HCMV y su relación con la clínica en la EM, el siguiente objetivo pretendió estudiar el impacto del HCMV en las poblaciones T y NK. Para ello, se determinó la presencia de células adaptativas NK NKG2C(+) en pacientes y controles en relación a la seropositividad del HCMV, encontrando, de acuerdo con lo previamente publicado, una mayor expresión de células NK NKG2C(+) tanto en pacientes ($18.8\% \pm 16.5$ en HCMV(+)) vs. $10.9\% \pm 5.7$ en HCMV(-), $p < 0.01$) como en controles (HCMV(+), $21.5\% \pm 19.2$ vs. HCMV(-), $11.6\% \pm 8.2$ $p < 0.05$).

Al valorar pacientes en fases iniciales de la enfermedad (≤ 5 años), se observó que aquellos casos con mayor proporción de células NK NKG2C(+) (categorizados como fenotipo NKG2C^{bright}) tenían un menor valor de la EDSS (fenotipo NKG2C^{bright}: 0.95 ± 0.89 vs. NKG2C^{dim} 2.02 ± 1.22 ; $p < 0.05$) y MSSS (3.57 ± 2.29 vs. 5.42 ± 2.77 , respectivamente; $p < 0.05$), confirmando estudios previos de nuestro grupo (113) que sugieren que la expansión de células NK NKG2C(+) se asocia a una menor progresión de la enfermedad, apoyando el presente estudio que dichos cambios ya son percibidos en fases tempranas de la enfermedad.

En cuanto al impacto del HCMV sobre la población linfocitaria T, la seropositividad para el HCMV se asoció de forma significativa, tanto en pacientes como en controles, con mayor proporción de células T CD8(+) CD27(-) CD28(-), CD57(+) y LILRB1(+). Estas diferencias relacionadas con el HCMV, en contraposición a lo encontrado en células NK, fueron independientes del tiempo de evolución de la EM, estando ya presentes desde estadios iniciales de la enfermedad. Asimismo, se encontraron diferencias en las subpoblaciones T CD4(+), pero de menor magnitud en comparación al compartimento T CD8(+), predominantemente en controles y en fases iniciales de la enfermedad (**Artículo 1, Figura 3**). No se encontraron diferencias significativas en la expresión de NKG2C en linfocitos T, ni en relación con aspectos clínicos de la EM.

Los resultados obtenidos sugieren que la infección crónica por el HCMV induce cambios en el sistema inmune caracterizados por una mayor diferenciación terminal de linfocitos T, así como a un inmunofenotipo NK adaptativo caracterizado por la expansión

de células NKG2C(+). No obstante, mientras que los cambios inducidos en el compartimento T no guardaron relación con las características clínicas de la enfermedad, las modificaciones ejercidas por el virus en el compartimento NK se asociaron a una menor discapacidad en fases tempranas de la enfermedad, precisando ampliar el estudio del inmunofenotipo adaptativo NK en la EM.

Objetivo secundario 3: Estudio de marcadores adaptativos en células NK en pacientes con EM en función de las características clínicas de la enfermedad y la seroprevalencia HCMV.

Dados los resultados obtenidos en el desarrollo de los objetivos previos, el presente objetivo abordó el estudio del inmunofenotipo adaptativo NK en la EM, evaluando la influencia de factores relacionados con la enfermedad y la infección por HCMV, llevándose a término dicho trabajo en el **Artículo 2**.

Se estudiaron muestras de 151 pacientes y 47 controles para evaluar la expresión de los marcadores adaptativos en las células NK (NKG2C, FcR γ , PLZF), y su asociación con el HCMV y otras variables clínicas. De acuerdo a lo previamente publicado, los individuos seropositivos para el HCMV, tanto pacientes, como controles, mostraron un mayor porcentaje de células NK CD56^{dim} NKG2C(+), FcR γ (-) y PLZF(-) en comparación con individuos seronegativos (**Artículo 2, Figura 2**). En cuanto a la subpoblación de células NK CD56^{bright}, no se observaron diferencias asociadas a la seropositividad para el HCMV en la expresión de NKG2C(+) y FcR γ (-); sin embargo, los individuos HCMV(+) mostraron un mayor porcentaje de células PLZF(-), tanto en la subpoblación NK CD56^{dim} como en la CD56^{bright} (**Artículo 2, figura 2C**). En individuos HCMV(-), no se observaron diferencias entre pacientes y controles en la expresión de marcadores adaptativos, exceptuando un mayor porcentaje de células NK CD56^{dim} PLZF(-) en pacientes con EM con respecto a controles sanos seronegativos (**Artículo 2, figura 2C**), lo que podría implicar factores independientes al HCMV en la diferenciación de células NK adaptativas en la EM.

Posteriormente, se evaluó la coexpresión de los marcadores adaptativos mediante un análisis de diagramas de Venn, evidenciándose la coexpresión de los tres marcadores adaptativos (NKG2C(+), FcR γ (-) y PLZF(-)) en pacientes y controles HCMV(+), y

confirmándose una mayor expresión de PLZF(-) en los pacientes con EM no asociada a la expresión de NKG2C(+) y FcR γ (-) (**Artículo 2, figura 3 A y B**). Así mismo, mediante un análisis de t-SNE en células NK CD56^{dim}, se observó una mayor expresión de NKG2C(+) en controles que en pacientes seropositivos para HCMV, así como una mayor expresión de células NKG2C(-) FcR γ (-) PLZF(-) en pacientes con EM con respecto a controles (**Artículo 2, figura 3 C**).

Tras estos resultados globales, se procedió a evaluar la asociación entre la expresión de marcadores adaptativos NK y las características clínicas de la EM. El inmunofenotipo adaptativo se encontró influenciado por la forma clínica de la EM, observando una menor expansión de células NK CD56^{dim} NKG2C(+) en formas de EMPP comparado con pacientes con EMSP. Así mismo, las formas EMSP presentaron una mayor proporción de FcR γ (-) tanto en células NK CD56^{dim} como en CD56^{bright}, en comparación con formas EMRR (**Artículo 2, figura suplementaria 3**).

La influencia del tratamiento inmunomodulador fue estudiada en pacientes EMRR. Aquellos casos tratados con IFN β , presentaron una mayor proporción de células NK CD56^{bright} (14.8% \pm 11.6 vs. 8.3% \pm 7.1; p<0.05) tal como ha sido previamente descrito (107). En cuanto a la expresión de marcadores adaptativos, los pacientes tratados con IFN β presentaron una menor frecuencia de células NK CD56^{dim} FcR γ (-) (9.6% \pm 8.2 vs. 19.3% \pm 19.7; p<0,05), un hallazgo sólo presente en células NK CD56^{dim} de pacientes HCMV(+), pero no en HCMV(-), donde el porcentaje de este subtipo celular ya fue bajo de por sí. Asimismo, en pacientes HCMV(-) tratados, la proporción de células NK CD56^{bright} PLZF(-) tendía a incrementarse, desapareciendo las diferencias previamente descritas asociadas a la seropositividad del HCMV (**Artículo 2, figura 4**). No hubo correlación entre la expresión de marcadores adaptativos y la expansión de células NK CD56^{bright} asociada al tratamiento con IFN β .

A raíz de estos hallazgos, se intentó evaluar de forma prospectiva un subgrupo de pacientes con EMRR previo al inicio de tratamiento con IFN y tras un año de inicio del mismo, sin poder evidenciar los cambios previamente descritos en la muestra global, los cuales tenían una media de tiempo en tratamiento de 7 \pm 4.2 años (**Artículo 2, Figura suplementaria 2**).

Teniendo en cuenta los resultados obtenidos en cuanto a la forma clínica y el tratamiento con IFN β , se procedió a realizar un análisis multivariado, mostrando que la expresión de NKG2C en células NK CD56^{dim} se asoció de forma independiente a la forma

clínica de EM, así como la relación del tratamiento con IFN β con la proporción de células NK CD56^{dim} FcR γ (-) (**Artículo 2, tabla suplementaria 1**). No se observaron otras correlaciones de los marcadores adaptativos con la edad, el tiempo de evolución de la enfermedad, las escalas de discapacidad o la actividad de la enfermedad.

En conclusión, estos resultados sugerirían que los cambios inducidos por el HCMV en el compartimento NK podrían diferir en pacientes con EM en comparación con controles, observándose un menor porcentaje de NKG2C(+) en pacientes que en controles, y un mayor porcentaje de células NKG2C(-) FcR γ (-) PLZF(-). Asimismo, la presencia de marcadores adaptativos podría diferir en las diferentes formas clínicas y en aquellos pacientes tratados con IFN β , siendo menor la expresión de NKG2C en las formas progresivas y observándose una disminución de células NK FcR γ (-) en aquellos pacientes tratados.

Objetivo secundario 4: Evaluación de la función ADCC mediada por células NK en pacientes con diversas formas clínicas de EM y su relación con el inmunofenotipo adaptativo de estos linfocitos.

Tras la evaluación del inmunofenotipo adaptativo NK y su relación con variables clínicas de la EM y el HCMV, el presente objetivo se planteó con intención de estudiar las implicaciones de los resultados previos en la función ADCC mediada por células NK frente a líneas linfoblastoides B como marcador de respuesta NK frente a células infectadas por VEB. Se evaluó la función ADCC de las células NK mediante la degranulación y la producción de TNF α en 42 pacientes y 17 controles, mediante la estimulación con las líneas celulares 721.221 en presencia o no de rituximab (**Artículo 2, figura 5**), observándose una mayor degranulación de las células NK CD56^{dim} en pacientes con EMRR en comparación con controles o formas EMPP. Así mismo, los pacientes con EMPP mostraron una menor producción de TNF α comparado con controles y el resto de las formas clínicas de EM. No se observaron diferencias en cuanto al tratamiento con IFN β u otras variables clínicas tales como la edad o el tiempo de evolución de la enfermedad. Resultados similares se observaron estudiando la respuesta de células NK ante la línea celular AKBM (**Artículo 2, figura suplementaria 4**) en presencia o ausencia de suero seropositivo para VEB.

En cuanto a la relación de la expresión de marcadores adaptativos y la producción de citoquinas, se observó una correlación directa entre la producción de TNF α y la presencia de marcadores adaptativos en controles sanos que, sin embargo, no se observó en pacientes. Es más, los pacientes con EM, presentaron una correlación inversa entre la degranulación y la proporción de células NK FcR γ (-) y PLZF(-) (**Artículo 2, figura 6**). Evaluando la expresión concomitante de marcadores adaptativos, se encontró que la respuesta mediada por anticuerpos fue mayor en células NK CD56^{dim} NKG2C(+), independientemente de la expresión de FcR γ (-) o PLZF(-) tanto en pacientes, como en controles (**Artículo 2, figura suplementaria 5**).

Los resultados obtenidos en el presente objetivo sugerirían que la función de las células NK adaptativas puede diferir en función de la forma clínica de la EM, siendo mayor en formas EMRR en comparación con formas EMPP. Así mismo, y a diferencia de los controles sanos, el inmunofenotipo adaptativo NK no se correlacionó con una mayor eficiencia en la respuesta efectora de células NK mediada por anticuerpos.

7. RESUMEN GLOBAL DE LA DISCUSIÓN

El papel del HCMV en la EM es controvertido, con un menor riesgo de desarrollo de la enfermedad conferido por el virus sugerido por estudios epidemiológicos de amplio tamaño muestral, tanto en población pediátrica (56,57) como en adulta (52), sin haberse encontrado diferencias en cuanto a la seroprevalencia en otros estudios (59), e incluso planteándose un posible papel desencadenante en el desarrollo de enfermedades autoinmunes o desmielinizantes por algunos estudios (60,63), algunos de ellos en contexto de una primoinfección por el virus (63).

En nuestro estudio, hemos observado una menor prevalencia del HCMV en fases tempranas de la EM, que iría a favor de un potencial papel protector para el desarrollo de la enfermedad. En base a estos resultados, las diferencias en cuanto a prevalencias en las diferentes poblaciones estudiadas podrían estar en relación al momento de evaluación, justificando la inclusión de variables clínicas de la EM en el estudio de la influencia del HCMV en esta enfermedad. Nuestros resultados confirman una menor seroprevalencia del HCMV en aquellos pacientes de reciente diagnóstico en comparación con controles estratificados por edad, sin observarse diferencias en la muestra global de pacientes, probablemente por un aumento de la seroprevalencia del virus en ambos grupos asociado a la edad (117).

En cualquier caso, el papel del HCMV como posible factor protector de la EM permanece en debate actualmente, sin poder descartarse un epifenómeno asociado a otros virus en base a la hipótesis de higiene planteada para explicar enfermedades autoinmunes, la cual propone que la exposición a ciertos patógenos de forma precoz en la infancia podría ser protectora para el desarrollo de enfermedades autoinmunes, que se contrapondría con un mayor riesgo conferido por una primoinfección en edades más tardías. Este posible aumento en el desarrollo de enfermedades autoinmunes asociadas al desarrollo socioeconómico podría estar relacionado con la pérdida de relaciones simbióticas con microorganismos con los que el ser humano ha convivido a lo largo de la evolución, establecido dicho argumento en la reinterpretación de la hipótesis de higiene dentro de la “*old friends*” hipótesis (118). Nuestros resultados podrían estar en concordancia también con dicha hipótesis, apoyando una relación del HCMV con un menor riesgo de EM que, sin poder descartar una asociación epifenómica, aportarían algunas evidencias mecanicistas sobre como el virus podría modificar el riesgo de EM

y/o modificar su curso clínico.

En este sentido, la infección crónica por HCMV podría contribuir al control de otros herpesvirus que estarían relacionados con la enfermedad (Ej: VEB/ HHV6). La exposición previa a algunos virus puede modificar la respuesta inmune frente a otros patógenos, un término denominado “inmunidad heteróloga”, que puede estar mediada por diferentes mecanismos, tales como respuestas inmunes innatas, reacción cruzada de células T, respuestas humorales o activación inespecífica (66,67). En particular, el HCMV puede incrementar la producción de citoquinas proinflamatorias (por ejemplo, $INF\gamma$, $TNF\alpha$) y la citotoxicidad celular mediada por anticuerpos por células NK, lo que podría influenciar la respuesta frente a VEB (112). Basándonos en estas premisas, analizamos la respuesta humoral en pacientes con EM de acuerdo con su serología para el HCMV, observándose una disminución del índice EBNA-1 asociado a la duración de la enfermedad en pacientes HCMV(+) en casos con ≤ 5 años de evolución, sin encontrarse diferencias en la respuesta humoral contra el HHV6. Estos resultados apoyarían que los pacientes con EM HCMV(+) podrían tener una mejor respuesta inmune contra el VEB en fases iniciales de EM, siendo precisos estudios adicionales para apoyar esta hipótesis.

Por otro lado, otro de los mecanismos por los que el HCMV podría ejercer un papel protector en la EM podría estar relacionado con los cambios en poblaciones linfocitarias que produce la infección crónica por el virus. En este sentido, el HCMV ha sido descrito como uno de los principales factores ambientales relacionados con modificaciones en el sistema inmune, tal como se describe en un reciente estudio de gemelos monocigotos discordantes para la infección (65). Así mismo, los sujetos HCMV(+) presentan una expansión oligoclonal de células T memoria efectoras específicas para el HCMV que aumentan con la edad, relacionándose con fenómenos de inmunosenescencia (120), y reduciendo la diversidad de células T CD8+, lo que podría conferir un menor riesgo de desarrollo de respuestas autoinmunes frente a otros antígenos (121,122). En nuestro estudio hemos observado una mayor proporción de células T diferenciadas terminales en individuos con EM HCMV(+). De esta forma, pacientes con EM HCMV(-) con un diagnóstico reciente de EM podrían desarrollar un proceso inflamatorio en un contexto de una población de células T menos diferenciadas en comparación con individuos HCMV(+), lo que podría favorecer un mayor desarrollo de fenómenos autoinmunes contra antígenos del SNC. Estas premisas irían a favor del

potencial papel protector del HCMV, donde la infección crónica por el virus podría reducir los recursos de diversidad inmunológica, reduciendo el riesgo de autoinmunidad.

Además de los cambios descritos en el compartimento T, observamos un aumento en la expresión de NKG2C(+) en individuos HCMV(+) que, en pacientes en fases iniciales de la enfermedad, se asoció con una menor discapacidad, acorde con los resultados previamente publicados (113), y que iría a favor del potencial papel protector del HCMV en la EM. Estudios previos han descrito que el HCMV se ha asociado con un aumento de la expresión de los marcadores adaptativos en las células NK (NKG2C(+), FcR γ (-) y PLZF(-)) en controles sanos. Los cambios adaptativos inducidos por el HCMV no siempre se producen de forma sincrónica, con presencia de unos marcadores disociados de otros en algunos sujetos (87,123). En nuestros pacientes con EM hemos observado un mayor porcentaje de células NK CD56^{dim} PLZF(-) en sujetos HCMV(-), hallazgo no observado en sujetos sanos, sugiriendo la posible influencia de otros factores diferentes del HCMV en el desarrollo de esta subpoblación NK en el contexto de la enfermedad. Asimismo, en sujetos HCMV(+) se apreció una mayor expresión de células NK CD56^{bright} PLZF(-), tanto en pacientes como en controles, lo que podría sugerir cambios precoces en el desarrollo de células NK adaptativas relacionadas con la infección crónica por el HCMV, suponiendo un modelo de diferenciación lineal de las células NK desde subtipos CD56^{bright} a CD56^{dim} (124).

En nuestro trabajo, hemos confirmado que esta modificación del compartimento NK también se produce en pacientes con EM. Sin embargo, los pacientes con formas progresivas presentaron una menor expresión de NKG2C(+) en relación a controles y formas EMRR, hallazgo que se ha relacionado previamente con una menor discapacidad (113). Otro factor asociado a la expresión diferencial de los marcadores adaptativos fue el tratamiento con IFN β , relacionado con menores proporciones de células NK CD56^{dim} FcR γ (-) en pacientes con EMRR HCMV(+), e incrementos en el porcentaje de células NK CD56^{dim} PLZF(-) en pacientes HCMV(-), lo que hizo desaparecer las diferencias comparativas con los pacientes HCMV(+). Sin embargo, no logramos detectar esas diferencias en un subgrupo de pacientes seguidos durante un año tras el tratamiento con IFN β . Esto podría ser debido a la necesidad de un mayor tiempo de exposición al tratamiento (>1 año) para poder desarrollar dichos cambios celulares.

En cualquier caso, nuestros resultados parecen confirmar la presencia de una menor población de células NK adaptativas en la EM, principalmente en formas con

mayor discapacidad clínica, en las que se aprecia una menor población de células NK NKG2C(+). Este hallazgo, junto a la previamente descrita menor seroprevalencia de HCMV en fases iniciales de la enfermedad, podrían permitir inferir que la ausencia de infección crónica por HCMV, o bien, una primoinfección tardía una vez desarrollada la EM, se asociaría a una menor respuesta adaptativa de células NK asociada a un peor pronóstico clínico. Esta interpretación de nuestros resultados se contextualizaría dentro de un escenario en el que las células NK se considerarían protectoras para la EM, tal como recogen numerosos estudios previos en los que se describe una menor función NK asociada a la actividad de la EM (98,99), así como la expansión de subpoblaciones NK con el tratamiento inmunomodulador (105,106).

En este sentido, los mecanismos por los que las células NK podrían estar implicadas en la inmunopatología de la EM no son bien conocidos. Una posibilidad sería la implicación de las células NK como inmunorreguladoras de respuestas adaptativas, realizando un control de linfocitos T activados, tal como describen previamente diversos autores (109,110). Otro mecanismo adicional, no excluyente con respecto al primero, sería también el control que las células NK ejercen sobre células infectadas por virus, concretamente el VEB. El papel antiviral de estos linfocitos es ampliamente conocido (125), destacando, en este sentido, diversos estudios que demuestran la función defensora de células NK contra células infectadas por VEB (111). No obstante, hasta la fecha, no se han realizado estudios concluyentes que demuestren en pacientes con EM un posible papel beneficioso de las células NK en el control del VEB.

Con el objetivo de evaluar una hipotética función antiviral de células NK en pacientes con EM, desarrollamos un análisis funcional de la respuesta ADCC mediada por células NK contra linfocitos B infectados por VEB. Dado que el HCMV se asocia al desarrollo de células NK adaptativas, y esto puede incrementar la citotoxicidad celular mediada por anticuerpos, en particular la producción de citoquinas proinflamatorias (126,127), evaluamos la respuesta de las células NK en función de su inmunofenotipo adaptativo tras activación e incubación con la línea celular 721.221 con rituximab en un subgrupo de pacientes y controles, sin observarse diferencias entre ambos grupos, tal como describen algunos estudios previos (128). Tampoco se encontraron diferencias significativas con otras variables clínicas (tiempo de evolución, edad, tratamiento con IFN β). Sin embargo, la función ADCC mediada por células NK en pacientes con EM difirió según la forma clínica de la enfermedad, siendo menor en los pacientes con EMPP

comparativamente a pacientes EMRR. Este hallazgo fue confirmado al evaluar la respuesta NK ante la línea celular AKBM, sugiriendo un patrón de respuesta de las células NK contra líneas infectadas por VEB en fase lítica.

Estudios previos han demostrado una mayor función NK mediada por anticuerpos asociada a la presencia de marcadores adaptativos, observándose una mayor producción de TNF α asociada a la expresión de NKG2C(+) y pérdida de FcR γ (87,127). Sin embargo, un fenotipo adaptativo en nuestros pacientes con EM no se halló asociado a una mayor actividad NK, encontrándose, de hecho, una relación inversa entre la expresión de PLZF(-) y FcR γ (-) y la degranulación de las células NK, lo que podría sugerir un disfunción de estas células en el contexto de un curso clínico más agresivo de EM, y asociado, a su vez, con una menor respuesta contra el VEB.

En resumen, nuestros estudios demuestran una respuesta adaptativa mediada por células NK que puede estar reducida en pacientes con EM, principalmente en aquellos con formas progresivas. La infección crónica del HCMV, como posible factor protector para el desarrollo de EM, podría mediar dicho efecto por un mecanismo de aumento de la respuesta adaptativa NK, implicando la expansión de células NK FcR γ (-), PLZF(-) y, especialmente, NKG2C(+), así como favoreciendo una mayor diferenciación terminal de linfocitos T. Así mismo, nuestros resultados apuntarían a una posible involucración de la respuesta de células NK adaptativas contra el VEB en la EM, y su potenciación por mecanismos de inmunidad heteróloga inducida por el HCMV, precisando estudios adicionales para corroborar estas hipótesis.

8. CONCLUSIONES

1) Objetivo principal: Estudio de la respuesta adaptativa mediada por células NK en pacientes con EM y su relación con la infección crónica por el HCMV y las características clínicas de la enfermedad.

Conclusión: En base a los resultados obtenidos, la respuesta adaptativa de las células NK en la EM parece ser deficiente, observándose una menor proporción de células NK adaptativas, así como una menor función citotóxica de las mismas, principalmente en formas progresivas de la enfermedad, que conjuntamente con una menor seroprevalencia del HCMV en fases iniciales de la enfermedad, sugerirían un papel protector de la infección crónica por el HCMV que podría estar mediado, entre otros mecanismos, por células NK adaptativas.

2) Objetivo secundario 1. Estudio de la prevalencia de la infección por HCMV en controles y pacientes con EM, evaluando su influencia en el curso clínico de la enfermedad y en la respuesta humoral frente a otros herpesvirus (VEB, HHV6).

Conclusión: Los pacientes con EM en fases iniciales de la enfermedad presentan una menor seroprevalencia de infección crónica por HCMV, apoyando un posible papel protector del virus en el desarrollo de la enfermedad, sin observarse otras diferencias clínicas asociadas a la infección por el HCMV. Este efecto protector del HCMV podría estar mediado, en parte, por un mecanismo de inmunidad heteróloga entre el HCMV y el VEB en fases tempranas de la enfermedad.

3) Objetivo secundario 2. Evaluación del impacto de la infección por HCMV en subpoblaciones linfocitarias NK y T en pacientes con EM en función de la edad y el tiempo de evolución de la enfermedad.

Conclusión: La infección crónica por el HCMV induce cambios en el compartimento T caracterizados por una mayor diferenciación terminal de linfocitos T CD4(+) y, especialmente, T CD8(+), independientemente de las características clínicas de la enfermedad, hallazgo que podría tener relevancia en estadios tempranos de la enfermedad. Asimismo, la expansión de células NK NKG2C(+) relacionada con la infección por HCMV en fases iniciales de la EM se asocia a una menor discapacidad de la enfermedad.

4) Objetivo secundario 3. Estudio de marcadores adaptativos en células NK en pacientes con EM en función de las características clínicas de la enfermedad y la seroprevalencia HCMV.

Conclusión: La infección crónica por HCMV promueve un inmunofenotipo adaptativo de las células NK, con una distribución de marcadores influenciada por la forma clínica y el tratamiento con interferón-beta. Asimismo, el HCMV se asocia a la expresión de células NK CD56^{bright} PLZF(-) tanto en controles como en pacientes con EM, implicando a este marcador en la diferenciación adaptativa temprana de estos linfocitos. Del mismo modo, pacientes con EM HCMV(-) presentan un aumento de células NK CD56^{dim} PLZF(-), sugiriendo que otros mecanismos independientes del HCMV podrían influenciar el inmunofenotipo NK adaptativo en la EM.

5) Objetivo Secundario 4. Evaluación de la función ADCC mediada por células NK en pacientes con diversas formas clínicas de EM y su relación con el inmunofenotipo adaptativo de estos linfocitos.

Conclusión: Las células NK presentan una actividad citotóxica mediada por anticuerpos contra células infectadas por el VEB que difiere en pacientes con EM en relación a su forma clínica, siendo menor en sujetos con formas primarias progresivas, lo que podría guardar relación con una menor respuesta adaptativa NK previamente descrita en esta forma clínica. Asimismo, una mayor expresión de marcadores adaptativos en la EM no conlleva una mayor actividad celular dependiente de anticuerpos, apoyando una deficiencia de la respuesta adaptativa mediada por células NK en esta enfermedad.

9. LÍNEAS DE FUTURO

- El modelo de desarrollo de las células NK más aceptado, es un modelo de diferenciación lineal, que presupone que las células NK CD56^{bright} son un estadio previo evolutivo a las CD56^{dim}. El hallazgo en nuestro estudio de células CD56^{bright} PLZF(-) sugeriría que estas células podrían estar en un proceso intermedio de diferenciación a células NK adaptativas, y por lo tanto, sería interesante evaluar específicamente este subtipo celular, tanto a nivel de expresión de receptores, como su capacidad citotóxica y reguladora.
- Teniendo en cuenta la menor expresión de células NK adaptativas en las formas primarias progresivas de EM, así como su menor actividad dependiente de anticuerpos evaluada frente a células linfoblastoides B, estaría justificado evaluar si esta menor respuesta de las células NK se debe a la presencia de otros receptores inhibidores del sistema inmune, los cuales han sido relacionados con infecciones crónicas tal como las infección por el virus de la hepatitis, y que en el contexto de la EM podrían estar relacionadas con la infección crónica por VEB.
- Teniendo en cuenta la hipótesis del papel patogénico del VEB en la EM, podría ser pertinente la evaluación del posible control sobre el VEB mediante la activación de células NK en el contexto de diversos tratamientos inmunomoduladores.
- En nuestro trabajo observamos células NK PLZF(-) en pacientes con EM que no han sido previamente expuestos a la infección por HCMV. Los factores que llevan al desarrollo de esta subpoblación, independientes del HCMV, no son conocidos, por lo que sería interesante evaluar su potencial relación con el tratamiento o con fenómenos de inflamación mantenida o infecciones crónicas por otros virus de cara a conocer mejor su desarrollo.

10. BIBLIOGRAFÍA

1. Otero-Romero S, Roura P, Solà J, Altimiras J, Sastre-Garriga J, Nos C, et al. Increase in the prevalence of multiple sclerosis over a 17-year period in Osona, Catalonia, Spain. *Mult Scler J*. 2013;19(2):245–8.
2. Koch-Henriksen N, Sørensen PS. The changing demographic pattern of multiple sclerosis epidemiology. *Lancet Neurol* [Internet]. 2010 May [cited 2019 Jun 25];9(5):520–32. Available from:
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20398859>
6. Sadovnick AD, Ebers GC. Epidemiology of Multiple Sclerosis: A Critical Overview. *Can J Neurol Sci / J Can des Sci Neurol* [Internet]. 1993 Feb 18 [cited 2019 Jun 25];20(1):17–29. Available from:
https://www.cambridge.org/core/product/identifier/S0317167100047351/type/journal_article
7. Compston A, Coles A. Multiple sclerosis. *Lancet* [Internet]. 2008 Oct 25 [cited 2019 Aug 13];372(9648):1502–17. Available from:
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18970977>
5. Simpson S, Blizzard L, Otahal P, Van der Mei I, Taylor B. Latitude is significantly associated with the prevalence of multiple sclerosis: a meta-analysis. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* [Internet]. 2011 Oct 1 [cited 2019 Aug 13];82(10):1132–41. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21478203>
6. Browne P, Chandraratna D, Angood C, Tremlett H, Baker C, Taylor B V., et al. Atlas of multiple sclerosis 2013: A growing global problem with widespread inequity. Vol. 83, *Neurology*. Lippincott Williams and Wilkins; 2014. p. 1022–4.
7. Coret F, Pérez-Miralles FC, Gascón F, Alcalá C, Navarré A, Bernad A, et al. Onset of secondary progressive multiple sclerosis is not influenced by current relapsing multiple sclerosis therapies. *Mult Scler J - Exp Transl Clin*. 2018 Apr;4(2):205521731878334.

8. Cree BAC, Gourraud P-A, Oksenberg JR, Bevan C, Crabtree-Hartman E, Gelfand JM, et al. Long-term evolution of multiple sclerosis disability in the treatment era. *Ann Neurol* [Internet]. 2016 Oct [cited 2019 Nov 18];80(4):499–510. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1002/ana.24747>
9. Lublin FD, Reingold SC, Cohen JA, Cutter GR, Sørensen PS, Thompson AJ, et al. Defining the clinical course of multiple sclerosis: the 2013 revisions. *Neurology* [Internet]. 2014 Jul 15 [cited 2019 Aug 20];83(3):278–86. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24871874>
10. Kurtzke JF. Rating neurologic impairment in multiple sclerosis: An expanded disability status scale (EDSS). *Neurology*. 1983;33(11):1444–52.
11. Roxburgh R, Seaman SR, Masterman T, Hensiek AE, Sawcer SJ, Vukusic S, et al. Multiple sclerosis severity score: Using disability and disease duration to rate disease severity. *Neurology* [Internet]. 2005 Apr 12 [cited 2020 Mar 4];64(7):1144–51. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15824338>
12. Polman CH, Reingold SC, Banwell B, Clanet M, Cohen JA, Filippi M, et al. Diagnostic criteria for multiple sclerosis: 2010 Revisions to the McDonald criteria. *Ann Neurol* [Internet]. 2011 Feb [cited 2019 Jun 25];69(2):292–302. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21387374>
13. Thompson AJ, Banwell BL, Barkhof F, Carroll WM, Coetzee T, Comi G, et al. Diagnosis of multiple sclerosis: 2017 revisions of the McDonald criteria. *Lancet Neurol* [Internet]. 2018 Feb [cited 2019 Jun 25];17(2):162–73. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1474442217304702>
14. Dobson R, Ramagopalan S, Davis A, Giovannoni G. Cerebrospinal fluid oligoclonal bands in multiple sclerosis and clinically isolated syndromes: A meta-analysis of prevalence, prognosis and effect of latitude. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* [Internet]. 2013 Aug [cited 2020 Feb 27];84(8):909–14. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23431079>
15. Arrambide G, Tintore M, Espejo C, Auger C, Castillo M, Río J, et al. The value of oligoclonal bands in the multiple sclerosis diagnostic criteria. *Brain* [Internet]. 2018 [cited 2020 Feb 27];141(4):1075–84. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29462277>

16. Andersson PB, Goodkin DE. Glucocorticosteroid therapy for multiple sclerosis: a critical review. *J Neurol Sci* [Internet]. 1998 Sep 18 [cited 2019 Dec 16];160(1):16–25. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9804112>
17. Filippini G, Brusafferri F, Citterio A, Ciucci G, Midgar R, Sibley WA, et al. Corticosteroids or acth for acute exacerbations in multiple sclerosis. *Neurol Sci*. 2000;21(4 SUPPL.).
18. Le Page E, Veillard D, Laplaud DA, Hamonic S, Wardi R, Lebrun C, et al. Oral versus intravenous high-dose methylprednisolone for treatment of relapses in patients with multiple sclerosis (COPOUSEP): A randomised, controlled, double-blind, non-inferiority trial. *Lancet*. 2015 Sep 5;386(9997):974–81.
19. Berkovich R. Treatment of Acute Relapses in Multiple Sclerosis. *Neurotherapeutics* [Internet]. 2013 Jan 11 [cited 2019 Nov 5];10(1):97–105. Available from: <http://link.springer.com/10.1007/s13311-012-0160-7>
20. Sospedra M, Martin R. IMMUNOLOGY OF MULTIPLE SCLEROSIS. *Annu Rev Immunol* [Internet]. 2005 Apr [cited 2019 Jun 11];23(1):683–747. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15771584>
21. Landete Pascual L, Casanova Estruch B, Burguera Hernández JA. Esclerosis múltiple familiar: estudio de seis familias. *Rev Neurol* [Internet]. 1998 [cited 2020 Feb 8];27(155):43. Available from: <https://www.neurologia.com/articulo/98055>
22. Amela Peris R, Pinel González AB, Conde Sendín MÁ, Alemany Rodríguez MJ, Muñoz Fernández C, Reyes Yáñez M del P, et al. Esclerosis múltiple familiar en Canarias. *Rev Neurol* [Internet]. 2004 Nov 16 [cited 2020 Feb 8];39(10):911. Available from: <https://www.neurologia.com/articulo/2004280>
23. Ebers GC. The natural history of multiple sclerosis: a geographically based study: 8: Familial multiple sclerosis. *Brain* [Internet]. 2000 Mar 1 [cited 2020 Feb 8];123(3):641–9. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10686184>
24. Willer CJ, Dyment DA, Risch NJ, Sadovnick AD, Ebers GC, Paty DW, et al. Twin concordance and sibling recurrence rates in multiple sclerosis. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2003 Oct 28;100(22):12877–82.

25. Hawkes CH. Multiple sclerosis genetics is dead. Vol. 2, Multiple Sclerosis and Related Disorders. Elsevier; 2013. p. 156–61.
26. International Multiple Sclerosis Genetics Consortium TIMSGC, Wellcome Trust Case Control Consortium 2 WTCCC 2, Sawcer S, Hellenthal G, Pirinen M, Spencer CCA, et al. Genetic risk and a primary role for cell-mediated immune mechanisms in multiple sclerosis. *Nature* [Internet]. 2011 Aug 10 [cited 2019 Oct 8];476(7359):214–9. Available from:
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21833088>
26. International Multiple Sclerosis Genetics Consortium, Hafler DA, Compston A, Sawcer S, Lander ES, Daly MJ, et al. Risk Alleles for Multiple Sclerosis Identified by a Genomewide Study. *N Engl J Med* [Internet]. 2007 Aug 30 [cited 2019 Jun 11];357(9):851–62. Available from:
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17660530>
28. Cersaletti K, Schneider A, Schwedhelm K, Frank I, Tatum M, Wei S, et al. Multiple autoimmune-associated variants confer decreased IL-2R signaling in CD4+CD25hi T cells of type 1 diabetic and multiple sclerosis patients. *PLoS One*. 2013 Dec 23;8(12).
29. International Multiple Sclerosis Genetics Consortium. Multiple sclerosis genomic map implicates peripheral immune cells and microglia in susceptibility. *Science* [Internet]. 2019 [cited 2019 Dec 24];365(6460). Available from:
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/31604244>
30. O’Gorman C, Lucas R, Taylor B. Environmental risk factors for multiple sclerosis: a review with a focus on molecular mechanisms. *Int J Mol Sci* [Internet]. 2012 [cited 2019 Oct 8];13(9):11718–52. Available from:
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23109880>
31. Hedström AK, Bäärnhielm M, Olsson T, Alfredsson L. Tobacco smoking, but not Swedish snuff use, increases the risk of multiple sclerosis. *Neurology* [Internet]. 2009 Sep 1 [cited 2020 Mar 8];73(9):696–701. Available from:
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19720976>
32. Healy BC, Ali EN, Guttman CRG, Chitnis T, Glanz BI, Buckle G, et al. Smoking and disease progression in multiple sclerosis. *Arch Neurol* [Internet]. 2009 Jul

- [cited 2020 Mar 8];66(7):858–64. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19597087>
33. Simpson S, Taylor B, Blizzard L, Ponsonby AL, Pittas F, Tremlett H, et al. Higher 25-hydroxyvitamin D is associated with lower relapse risk in multiple sclerosis. *Ann Neurol* [Internet]. 2010 Aug [cited 2020 Mar 8];68(2):193–203. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20695012>
 34. Sintzel MB, Rametta M, Reder AT. Vitamin D and Multiple Sclerosis: A Comprehensive Review. Vol. 7, *Neurology and Therapy*. Springer Healthcare; 2018. p. 59–85.
 35. Smolders J, Damoiseaux J. Vitamin D as a T-cell Modulator in Multiple Sclerosis [Internet]. Vol. 86, *Vitamins and Hormones*. 2011 [cited 2020 Mar 8]. 401–428 p. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21419282>
 36. Tarlinton RE, Khaibullin T, Granatov E, Martynova E, Rizvanov A, Khaiboullina S. The interaction between viral and environmental risk factors in the pathogenesis of multiple sclerosis [Internet]. Vol. 20, *International Journal of Molecular Sciences*. MDPI AG; 2019 [cited 2020 Mar 8]. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30646507>
 37. Bar-Or A, Pender MP, Khanna R, Steinman L, Hartung HP, Maniar T, et al. Epstein–Barr Virus in Multiple Sclerosis: Theory and Emerging Immunotherapies. *Trends in Molecular Medicine*. Elsevier Ltd; 2019.
 38. Pender MP. Infection of autoreactive B lymphocytes with EBV, causing chronic autoimmune diseases. *Trends Immunol*. 2003;24(11):584–8.
 39. Márquez AC, Horwitz MS. The role of latently infected B cells in CNS autoimmunity. Vol. 6, *Frontiers in Immunology*. Frontiers Media S.A.; 2015.
 40. Ascherio A, Munger KL, Lennette ET, Spiegelman D, Hernán MA, Olek MJ, et al. Epstein-Barr Virus Antibodies and Risk of Multiple Sclerosis. *JAMA* [Internet]. 2001 Dec 26 [cited 2019 Feb 5];286(24):3083. Available from: <http://jama.jamanetwork.com/article.aspx?doi=10.1001/jama.286.24.3083>
 41. Ascherio A, Munger KL. Environmental risk factors for multiple sclerosis. Part I: The role of infection. Vol. 61, *Annals of Neurology*. 2007. p. 288–99.
 42. Handel AE, Williamson AJ, Disanto G, Handunnetthi L, Giovannoni G,

- Ramagopalan S V. An Updated Meta-Analysis of Risk of Multiple Sclerosis following Infectious Mononucleosis. Jacobson S, editor. PLoS One [Internet]. 2010 Sep 1 [cited 2019 Oct 15];5(9):e12496. Available from: <http://dx.plos.org/10.1371/journal.pone.0012496>
43. Lünemann JD, Münz C. Do natural killer cells accelerate or prevent autoimmunity in multiple sclerosis? *Brain* [Internet]. 2008 Jul [cited 2019 Dec 22];131(Pt 7):1681–3. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18586760>
 44. Lünemann JD, Tintoré M, Messmer B, Strowig T, Rovira Á, Perkal H, et al. Elevated Epstein-Barr virus-encoded nuclear antigen-1 immune responses predict conversion to multiple sclerosis. *Ann Neurol*. 2010 Feb;67(2):159–69.
 45. Tzartos JS, Khan G, Vossenkamper A, Cruz-Sadaba M, Lonardi S, Sefia E, et al. Association of innate immune activation with latent Epstein-Barr virus in active MS lesions. *Neurology* [Internet]. 2012 Jan 3 [cited 2019 Oct 15];78(1):15–23. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22156987>
 46. Aloisi F, Serafini B, Magliozzi R, Howell OW, Reynolds R. Detection of Epstein–Barr virus and B-cell follicles in the multiple sclerosis brain: what you find depends on how and where you look. *Brain* [Internet]. 2010 Dec 1 [cited 2019 Oct 15];133(12):e157–e157. Available from: <https://academic.oup.com/brain/article-lookup/doi/10.1093/brain/awq223>
 47. Magliozzi R, Serafini B, Rosicarelli B, Chiappetta G, Veroni C, Reynolds R, et al. B-Cell Enrichment and Epstein-Barr Virus Infection in Inflammatory Cortical Lesions in Secondary Progressive Multiple Sclerosis. *J Neuropathol Exp Neurol* [Internet]. 2013 Jan [cited 2019 Jun 11];72(1):29–41. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23242282>
 48. Peferoen LAN, Lamers F, Lodder LNR, Gerritsen WH, Huitinga I, Melief J, et al. Epstein Barr virus is not a characteristic feature in the central nervous system in established multiple sclerosis. *Brain* [Internet]. 2010 May 1 [cited 2019 Oct 15];133(5):e137–e137. Available from: <https://academic.oup.com/brain/article-lookup/doi/10.1093/brain/awp296>
 49. Hassani A, Corboy JR, Al-Salam S, Khan G. Epstein-Barr virus is present in the brain of most cases of multiple sclerosis and may engage more than just B cells. Zhang L, editor. PLoS One [Internet]. 2018 Feb 2 [cited 2019 Oct

15];13(2):e0192109. Available from:

<https://dx.plos.org/10.1371/journal.pone.0192109>

50. Deuschle K, Hofmann J, Otto C, Bellmann-Strobl J, Scherner O, Klumbies K, et al. Are there Epstein-Barr virus seronegative patients with multiple sclerosis? Vol. 19, *Multiple Sclerosis Journal*. 2013. p. 1242–3.
51. Pakpoor J, Disanto G, Gerber JE, Dobson R, Meier UC, Giovannoni G, et al. The risk of developing multiple sclerosis in individuals seronegative for Epstein-Barr virus: A meta-analysis. *Mult Scler J*. 2013;19(2):162–6.
52. Sundqvist E, Bergström T, Daialhosein H, Nyström M, Sundström P, Hillert J, et al. Cytomegalovirus seropositivity is negatively associated with multiple sclerosis. *Mult Scler J* [Internet]. 2014 Feb 2 [cited 2019 Feb 5];20(2):165–73. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23999606>
53. Cannon MJ, Schmid DS, Hyde TB. Review of cytomegalovirus seroprevalence and demographic characteristics associated with infection. *Rev Med Virol* [Internet]. 2010 Jun 18 [cited 2020 Feb 11];20(4):202–13. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1002/rmv.655>
54. Jarvis MA, Nelson JA. Mechanisms of human cytomegalovirus persistence and latency. *Front Biosci* [Internet]. 2002 Jun 1 [cited 2019 Oct 22];7:d1575-82. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12045013>
55. Halenius A, Hengel H. Human cytomegalovirus and autoimmune disease. *Biomed Res Int* [Internet]. 2014 Apr 29 [cited 2019 Feb 5];2014:472978. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24967373>
56. Waubant E, Mowry EM, Krupp L, Chitnis T, Yeh EA, Kuntz N, et al. Common viruses associated with lower pediatric multiple sclerosis risk. *Neurology* [Internet]. 2011 Jun 7 [cited 2019 Feb 5];76(23):1989–95. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21646624>
57. Makhani N, Banwell B, Tellier R, Yea C, McGovern S, O’Mahony J, et al. Viral exposures and MS outcome in a prospective cohort of children with acquired demyelination. *Mult Scler J* [Internet]. 2016 Mar 21 [cited 2019 Feb 5];22(3):385–8. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26199356>
58. Langer-Gould A, Wu J, Lucas R, Smith J, Gonzales E, Amezcua L, et al. Epstein-

- Barr virus, cytomegalovirus, and multiple sclerosis susceptibility: A multiethnic study. *Neurology* [Internet]. 2017 Sep 26 [cited 2019 Feb 5];89(13):1330–7. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28855411>
59. Pakpoor J, Pakpoor J, Disanto G, Giovannoni G, Ramagopalan S V. Cytomegalovirus and multiple sclerosis risk. Vol. 260, *Journal of Neurology*. 2013. p. 1658–60.
 60. Sanadgol N, Ramroodi N, Ahmadi GA, Komijani M, Moghtaderi A, Bouzari M, et al. Prevalence of cytomegalovirus infection and its role in total immunoglobulin pattern in Iranian patients with different subtypes of multiple sclerosis. *New Microbiol* [Internet]. 2011 Jul [cited 2019 Jul 31];34(3):263–74. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21811746>
 61. Zivadinov R, Nasuelli D, Tommasi MA, Serafin M, Bratina A, Ukmar M, et al. Positivity of cytomegalovirus antibodies predicts a better clinical and radiological outcome in multiple sclerosis patients. *Neurol Res* [Internet]. 2006 Apr 19 [cited 2019 Jul 31];28(3):262–9. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16687051>
 62. Pirko I, Cardin R, Chen Y, Lohrey AK, Lindquist DM, Dunn RS, et al. CMV Infection Attenuates the Disease Course in a Murine Model of Multiple Sclerosis. Jacobson S, editor. *PLoS One* [Internet]. 2012 Feb 29 [cited 2019 Jul 30];7(2):e32767. Available from: <https://dx.plos.org/10.1371/journal.pone.0032767>
 63. Vanheusden M, Broux B, Welten SPM, Peeters LM, Panagioti E, Wijmeersch B Van, et al. Cytomegalovirus infection exacerbates autoimmune mediated neuroinflammation. *Sci Rep*. 2017 Dec 1;7(1).
 64. Brok HPM, Boven L, van Meurs M, Kerlero de Rosbo N, Celebi-Paul L, Kap YS, et al. The human CMV-UL86 peptide 981-1003 shares a crossreactive T-cell epitope with the encephalitogenic MOG peptide 34-56, but lacks the capacity to induce EAE in rhesus monkeys. *J Neuroimmunol*. 2007 Jan;182(1–2):135–52.
 65. Brodin P, Jojic V, Gao T, Bhattacharya S, Angel CJL, Furman D, et al. Variation in the human immune system is largely driven by non-heritable influences. *Cell* [Internet]. 2015 Jan 15 [cited 2019 Feb 5];160(1–2):37–47. Available from:

- <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25594173>
66. Welsh RM, Che JW, Brehm MA, Selin LK. Heterologous immunity between viruses. Vol. 235, *Immunological Reviews*. 2010. p. 244–66.
 67. White DW, Suzanne Beard R, Barton ES. Immune modulation during latent herpesvirus infection. Vol. 245, *Immunological Reviews*. 2012. p. 189–208.
 68. Leibovitch EC, Jacobson S. Evidence linking HHV-6 with multiple sclerosis: An update. Vol. 9, *Current Opinion in Virology*. Elsevier B.V.; 2014. p. 127–33.
 69. Donati D, Martinelli E, Cassiani-Ingoni R, Ahlqvist J, Hou J, Major EO, et al. Variant-Specific Tropism of Human Herpesvirus 6 in Human Astrocytes. *J Virol*. 2005 Aug 1;79(15):9439–48.
 70. Garcia-Montojo M, De Las Heras V, Dominguez-Mozo M, Bartolome M, Garcia-Martinez MA, Arroyo R, et al. Human herpesvirus 6 and effectiveness of interferon β 1b in multiple sclerosis patients. *Eur J Neurol* [Internet]. 2011 Aug [cited 2019 Nov 19];18(8):1027–35. Available from:
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21518144>
 71. Dominguez-Mozo MI, Garcia-Montojo M, De Las Heras V, Garcia-Martinez A, Arias-Leal AM, Casanova I, et al. MHC2TA mRNA levels and human herpesvirus 6 in multiple sclerosis patients treated with interferon beta along two-year follow-up. *BMC Neurol*. 2012 Sep 25;12.
 72. Bettelli E, Sullivan B, Szabo SJ, Sobel RA, Glimcher LH, Kuchroo VK. Loss of T-bet, But Not STAT1, Prevents the Development of Experimental Autoimmune Encephalomyelitis. *J Exp Med* [Internet]. 2004 Jul 5 [cited 2019 Jun 11];200(1):79–87. Available from:
<http://www.jem.org/lookup/doi/10.1084/jem.20031819>
 73. Korn T. Pathophysiology of multiple sclerosis. *J Neurol* [Internet]. 2008 Dec [cited 2019 Jun 11];255(S6):2–6. Available from:
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19300953>
 74. Hao J, Liu R, Piao W, Zhou Q, Vollmer TL, Campagnolo DI, et al. Central nervous system (CNS)–resident natural killer cells suppress Th17 responses and CNS autoimmune pathology. *J Exp Med* [Internet]. 2010 Aug 30 [cited 2019 Jun 11];207(9):1907–21. Available from:

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20696699>

75. Babbe H, Roers A, Waisman A, Lassmann H, Goebels N, Hohlfeld R, et al. Clonal expansions of CD8(+) T cells dominate the T cell infiltrate in active multiple sclerosis lesions as shown by micromanipulation and single cell polymerase chain reaction. *J Exp Med* [Internet]. 2000 Aug 7 [cited 2019 Jun 11];192(3):393–404. Available from: <http://www.jem.org/lookup/doi/10.1084/jem.192.3.393>
76. Bar-Or A, Fawaz L, Fan B, Darlington PJ, Rieger A, Ghorayeb C, et al. Abnormal B-cell cytokine responses a trigger of T-cell-mediated disease in MS? *Ann Neurol* [Internet]. 2010 Apr [cited 2019 Jun 11];67(4):452–61. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1002/ana.21939>
77. Villar LM, Masjuan J, González-Porqué P, Plaza J, Sádaba MC, Roldán E, et al. Intrathecal IgM synthesis is a prognostic factor in multiple sclerosis. *Ann Neurol* [Internet]. 2003 Feb [cited 2019 Jun 11];53(2):222–6. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12557289>
78. Lassmann H. Pathogenic mechanisms associated with different clinical courses of multiple sclerosis. Vol. 10, *Frontiers in Immunology*. Frontiers Media S.A.; 2019. p. 3116.
79. Waggoner SN, Cornberg M, Selin LK, Welsh RM. Natural killer cells act as rheostats modulating antiviral T cells. *Nature* [Internet]. 2012 Jan 20 [cited 2019 Jun 11];481(7381):394–8. Available from: <http://www.nature.com/articles/nature10624>
80. Zamai L, Ahmad M, Bennett IM, Azzoni L, Alnemri ES, Perussia B. Natural killer (NK) cell-mediated cytotoxicity: Differential use of TRAIL and Fas ligand by immature and mature primary human NK cells. *J Exp Med* [Internet]. 1998 Dec 21 [cited 2020 Mar 8];188(12):2375–80. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9858524>
81. Björkström NK, Lindgren T, Stoltz M, Fauriat C, Braun M, Evander M, et al. Rapid expansion and long-term persistence of elevated NK cell numbers in humans infected with hantavirus. *J Exp Med* [Internet]. 2011 Jan 17 [cited 2019 Feb 5];208(1):13–21. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21173105>

82. Cooper MA, Elliott JM, Keyel PA, Yang L, Carrero JA, Yokoyama WM. Cytokine-induced memory-like natural killer cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2009 Feb 10;106(6):1915–9.
83. Koch S, Larbi A, Ozcelik D, Solana R, Gouttefangeas C, Attig S, et al. Cytomegalovirus Infection: A Driving Force in Human T Cell Immunosenescence. *Ann N Y Acad Sci* [Internet]. 2007 Oct 1 [cited 2019 Jun 11];1114(1):23–35. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17986574>
84. Tu W, Rao S. Mechanisms Underlying T Cell Immunosenescence: Aging and Cytomegalovirus Infection. *Front Microbiol* [Internet]. 2016 [cited 2019 Jun 11];7:2111. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28082969>
85. Gumá M, Angulo A, Vilches C, Gómez-Lozano N, Malats N, López-Botet M. Imprint of human cytomegalovirus infection on the NK cell receptor repertoire. *Blood* [Internet]. 2004 Dec 1 [cited 2019 Feb 5];104(12):3664–71. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15304389>
86. Muntasell A, López-Montañés M, Vera A, Heredia G, Romo N, Peñafiel J, et al. *NKG2C* zygosity influences CD94/NKG2C receptor function and the NK-cell compartment redistribution in response to human cytomegalovirus. *Eur J Immunol* [Internet]. 2013 Dec [cited 2019 Feb 5];43(12):3268–78. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24030638>
87. Muntasell A, Pupuleku A, Cisneros E, Vera A, Moraru M, Vilches C, et al. Relationship of NKG2C Copy Number with the Distribution of Distinct Cytomegalovirus-Induced Adaptive NK Cell Subsets. *J Immunol* [Internet]. 2016 May 1 [cited 2019 Feb 5];196(9):3818–27. Available from: <http://www.jimmunol.org/content/196/9/3818.long>
88. Sun JC, Beilke JN, Lanier LL. Adaptive immune features of natural killer cells. *Nature* [Internet]. 2009 Jan 29 [cited 2019 Feb 5];457(7229):557–61. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19136945>
89. Miyashita R. Molecular genetic analyses of human NKG2C (KLRC2) gene deletion. *Int Immunol* [Internet]. 2004 Jan 1 [cited 2019 Jun 11];16(1):163–8. Available from: <https://academic.oup.com/intimm/article-lookup/doi/10.1093/intimm/dxh013>
90. Moraru M, Cañizares M, Muntasell A, Pablo R, López-Botet M, Vilches C.

Assessment of copy-number variation in the NKG2C receptor gene in a single-tube and characterization of a reference cell panel, using standard polymerase chain reaction. *Tissue Antigens* [Internet]. 2012 Aug [cited 2019 Jun 11];80(2):184–7. Available from:

<http://doi.wiley.com/10.1111/j.1399-0039.2012.01911.x>

91. Noyola DE, Fortuny C, Muntasell A, Noguera-Julian A, Muñoz-Almagro C, Alarcón A, et al. Influence of congenital human cytomegalovirus infection and the NKG2C genotype on NK-cell subset distribution in children. *Eur J Immunol* [Internet]. 2012 Dec [cited 2019 Jun 11];42(12):3256–66. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1002/eji.201242752>
92. Zhang T, Scott JM, Hwang I, Kim S. Cutting edge: antibody-dependent memory-like NK cells distinguished by FcR γ deficiency. *J Immunol* [Internet]. 2013 Feb 15 [cited 2019 Feb 5];190(4):1402–6. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23345329>
93. Schlums H, Cichocki F, Tesi B, Theorell J, Beziat V, Holmes TD, et al. Cytomegalovirus Infection Drives Adaptive Epigenetic Diversification of NK Cells with Altered Signaling and Effector Function. *Immunity* [Internet]. 2015 Mar 17 [cited 2019 Feb 5];42(3):443–56. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25786176>
94. Della Chiesa M, Falco M, Bertaina A, Muccio L, Alicata C, Frassoni F, et al. Human Cytomegalovirus Infection Promotes Rapid Maturation of NK Cells Expressing Activating Killer Ig-like Receptor in Patients Transplanted with NKG2C $^{-/-}$ Umbilical Cord Blood. *J Immunol*. 2014 Feb 15;192(4):1471–9.
95. Morse RH, Séguin R, McCrea EL, Antel JP. NK cell-mediated lysis of autologous human oligodendrocytes. *J Neuroimmunol* [Internet]. 2001 May 1 [cited 2019 Oct 14];116(1):107–15. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11311336>
96. Shi F-D, Takeda K, Akira S, Sarvetnick N, Ljunggren H-G. IL-18 Directs Autoreactive T Cells and Promotes Autodestruction in the Central Nervous System Via Induction of IFN- γ by NK Cells. *J Immunol* [Internet]. 2000 Sep 15 [cited 2019 Oct 14];165(6):3099–104. Available from:

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10975822>

97. Lagumersindez-Denis N, Wrzos C, Mack M, Winkler A, van der Meer F, Reinert MC, et al. Differential contribution of immune effector mechanisms to cortical demyelination in multiple sclerosis. *Acta Neuropathol* [Internet]. 2017 Jul 6 [cited 2019 Oct 14];134(1):15–34. Available from:
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28386765>
98. De Jager PL, Rossin E, Pyne S, Tamayo P, Ottoboni L, Vigiotta V, et al. Cytometric profiling in multiple sclerosis uncovers patient population structure and a reduction of CD8low cells. *Brain* [Internet]. 2008 Jul [cited 2019 Jun 11];131(Pt 7):1701–11. Available from:
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18567923>
99. Kastrukoff LF, Morgan NG, Zecchini D, White R, Petkau AJ, Satoh J, et al. A role for natural killer cells in the immunopathogenesis of multiple sclerosis. *J Neuroimmunol* [Internet]. 1998 Jun 15 [cited 2019 Oct 13];86(2):123–33. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9663557>
100. Kastrukoff LF, Lau A, Wee R, Zecchini D, White R, Paty DW. Clinical relapses of multiple sclerosis are associated with “novel” valleys in natural killer cell functional activity. *J Neuroimmunol* [Internet]. 2003 Dec [cited 2019 Jun 11];145(1–2):103–14. Available from:
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14644036>
101. Benczur M, Petrányi GG, Pálffy G, Varga M, Tálás M, Kotsy B, et al. Dysfunction of natural killer cells in multiple sclerosis: a possible pathogenetic factor. *Clin Exp Immunol* [Internet]. 1980 Mar [cited 2019 Jun 11];39(3):657–62. Available from:
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6155232>
102. Zhang B, Yamamura T, Kondo T, Fujiwara M, Tabira T. Regulation of experimental autoimmune encephalomyelitis by natural killer (NK) cells. *J Exp Med* [Internet]. 1997 Nov 17 [cited 2019 Oct 13];186(10):1677–87. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9362528>
103. Xu W, Fazekas G, Hara H, Tabira T. Mechanism of natural killer (NK) cell regulatory role in experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Neuroimmunol* [Internet]. 2005 Jun 1 [cited 2019 Oct 14];163(1–2):24–30. Available from:

<https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0165572805000743>

104. Gross CC, Schulte-Mecklenbeck A, Rünzi A, Kuhlmann T, Posevitz-Fejfar A, Schwab N, et al. Impaired NK-mediated regulation of T-cell activity in multiple sclerosis is reconstituted by IL-2 receptor modulation. *Proc Natl Acad Sci U S A* [Internet]. 2016 May 24 [cited 2019 Feb 5];113(21):E2973-82. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27162345>
105. Martínez-Rodríguez JE, López-Botet M, Munteis E, Rio J, Roquer J, Montalban X, et al. Natural killer cell phenotype and clinical response to interferon-beta therapy in multiple sclerosis. *Clin Immunol* [Internet]. 2011 Dec [cited 2019 Mar 26];141(3):348–56. Available from:
<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1521661611002750>
106. Bielekova B, Catalfamo M, Reichert-Scrivner S, Packer A, Cerna M, Waldmann TA, et al. Regulatory CD56bright natural killer cells mediate immunomodulatory effects of IL-2R -targeted therapy (daclizumab) in multiple sclerosis. *Proc Natl Acad Sci* [Internet]. 2006 Apr 11 [cited 2019 Mar 26];103(15):5941–6. Available from: <http://www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.0601335103>
107. Bielekova B, Howard T, Packer AN, Richert N, Blevins G, Ohayon J, et al. Effect of anti-CD25 antibody daclizumab in the inhibition of inflammation and stabilization of disease progression in multiple sclerosis. *Arch Neurol* [Internet]. 2009 Apr [cited 2020 Mar 8];66(4):483–9. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19364933>
108. Saraste M, Irjala H, Airas L. Expansion of CD56Bright natural killer cells in the peripheral blood of multiple sclerosis patients treated with interferon-beta. *Neurol Sci* [Internet]. 2007 Jun 30 [cited 2019 Feb 5];28(3):121–6. Available from: <http://link.springer.com/10.1007/s10072-007-0803-3>
109. Laroni A, Armentani E, Kerlero de Rosbo N, Ivaldi F, Marcenaro E, Sivori S, et al. Dysregulation of regulatory CD56 bright NK cells/T cells interactions in multiple sclerosis. *J Autoimmun*. 2016 Aug;72:8–18.
110. Nielsen CM, White MJ, Bottomley C, Lusa C, Rodríguez-Galán A, Turner SEG, et al. Impaired NK Cell Responses to Pertussis and H1N1 Influenza Vaccine Antigens in Human Cytomegalovirus-Infected Individuals. *J Immunol* [Internet]. 2015 May 15 [cited 2019 Feb 5];194(10):4657–67. Available from:

- <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25855356>
111. Strowig T, Brilot F, Arrey F, Bougras G, Thomas D, Muller WA, et al. Tonsillar NK Cells Restrict B Cell Transformation by the Epstein-Barr Virus via IFN- γ . *PLoS Pathog* [Internet]. 2008 [cited 2019 May 12];4(2):e27. Available from: <https://dx.plos.org/10.1371/journal.ppat.0040027>
 112. López-Montañés M, Alari-Pahissa E, Sintés J, Martínez-Rodríguez JE, Muntasell A, López-Botet M. Antibody-Dependent NK Cell Activation Differentially Targets EBV-Infected Cells in Lytic Cycle and Bystander B Lymphocytes Bound to Viral Antigen-Containing Particles. *J Immunol*. 2017 Jul 15;199(2):656–65.
 113. Martínez-Rodríguez JE, Cobo-Calvo A, Villar LM, Munteis E, Blanco Y, Rasal R, et al. Adaptive natural killer cell response to cytomegalovirus and disability progression in multiple sclerosis. *Mult Scler J* [Internet]. 2016 May 11 [cited 2018 Nov 14];22(6):741–52. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26362897>
 114. Bigley AB, Spielmann G, Agha N, O'Connor DP, Simpson RJ. Dichotomous effects of latent CMV infection on the phenotype and functional properties of CD8+ T-cells and NK-cells. *Cell Immunol*. 2016 Feb 1;300:26–32.
 115. Rensing ME, Keating SE, van Leeuwen D, Koppers-Lalic D, Pappworth IY, Wiertz EJHJ, et al. Impaired Transporter Associated with Antigen Processing-Dependent Peptide Transport during Productive EBV Infection. *J Immunol* [Internet]. 2005 Jun 1 [cited 2020 Mar 4];174(11):6829–38. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15905524>
 116. Amir ED, Davis KL, Tadmor MD, Simonds EF, Levine JH, Bendall SC, et al. viSNE enables visualization of high dimensional single-cell data and reveals phenotypic heterogeneity of leukemia. *Nat Biotechnol* [Internet]. 2013 Jun 19 [cited 2019 Mar 26];31(6):545–52. Available from: <http://www.nature.com/articles/nbt.2594>
 117. Lachmann R, Loenenbach A, Waterboer T, Brenner N, Pawlita M, Michel A, et al. Cytomegalovirus (CMV) seroprevalence in the adult population of Germany. *PLoS One*. 2018 Jul 1;13(7).
 118. Rook GAW. Hygiene hypothesis and autoimmune diseases. *Clin Rev Allergy*

- Immunol. 2012 Feb;42(1):5–15.
119. Jilek S, Schlupe M, Meylan P, Vingerhoets F, Guignard L, Monney A, et al. Strong EBV-specific CD8⁺ T-cell response in patients with early multiple sclerosis. *Brain* [Internet]. 2008 Jul [cited 2019 Feb 5];131(7):1712–21. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18550621>
 120. Sansoni P, Vescovini R, Fagnoni FF, Akbar A, Arens R, Chiu YL, et al. New advances in CMV and immunosenescence. *Exp Gerontol*. 2014;55:54–62.
 121. Wang GC, Dash P, McCullers JA, Doherty PC, Thomas PG. T cell receptor $\alpha\beta$ diversity inversely correlates with pathogen-specific antibody levels in human cytomegalovirus infection. *Sci Transl Med*. 2012 Apr 4;4(128).
 122. Gustafson CE, Qi Q, Hutter-Saunders J, Gupta S, Jadhav R, Newell E, et al. Immune checkpoint function of CD85j in CD8 T cell differentiation and aging. *Front Immunol*. 2017 Jun 14;8(JUN).
 123. Muccio L, Falco M, Bertaina A, Locatelli F, Frassoni F, Sivori S, et al. Late Development of Fc ϵ R γ neg Adaptive Natural Killer Cells Upon Human Cytomegalovirus Reactivation in Umbilical Cord Blood Transplantation Recipients. *Front Immunol* [Internet]. 2018 May 15 [cited 2019 Feb 17];9:1050. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29868012>
 124. Björkström NK, Riese P, Heuts F, Andersson S, Fauriat C, Ivarsson MA, et al. Expression patterns of NKG2A, KIR, and CD57 define a process of CD56dim NK-cell differentiation uncoupled from NK-cell education. *Blood* [Internet]. 2010 Nov 11;116(19):3853–64. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20696944>
 125. Vivier E, Tomasello E, Baratin M, Walzer T, Ugolini S. Functions of natural killer cells. Vol. 9, *Nature Immunology*. 2008. p. 503–10.
 126. Zhang Y, Zhang X, Liu D, Wang H, Pan S, Wang D, et al. Elevated fibrinogen levels in neuromyelitis optica is associated with severity of disease. *Neurol Sci* [Internet]. 2016 Nov 23 [cited 2018 Nov 13];37(11):1823–9. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27450097>
 127. Costa-Garcia M, Vera A, Moraru M, Vilches C, López-Botet M, Muntasell A. Antibody-Mediated Response of NKG2Cbright NK Cells against Human

Cytomegalovirus. *J Immunol* [Internet]. 2015 Mar 15 [cited 2019 Feb 5];194(6):2715–24. Available from:

<http://www.jimmunol.org/content/194/6/2715.long>

128. Gross CC, Schulte-Mecklenbeck A, Wiendl H, Marcenaro E, Kerlero de Rosbo N, Uccelli A, et al. Regulatory Functions of Natural Killer Cells in Multiple Sclerosis. *Front Immunol* [Internet]. 2016 Dec 19 [cited 2019 Feb 5];7:606. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28066417>

11. ANEXOS:

Anexo 1: Proyectos financiados

Este trabajo fue posible gracias a proyectos financiados:

- 1) Respuesta adaptativa mediada por células Natural Killer en la Esclerosis Múltiple (FIS/PI17/00254)
- 2) Estudio del valor pronóstico en la Esclerosis Múltiple de un nuevo biomarcador asociado a la infección por citomegalovirus (FIS/PI14/00177)
- 3) Red española de Esclerosis Múltiple (RD16/0015/0011).