

Marcadors clínics i genètics de resposta al tractament amb interferó Beta-1B en pacients amb esclerosi multiple remitent recurrent

Olga Carmona i Codina

ADVERTIMENT. La consulta d'aquesta tesi queda condicionada a l'acceptació de les següents condicions d'ús: La difusió d'aquesta tesi per mitjà del servei TDX (www.tdx.cat) ha estat autoritzada pels titulars dels drets de propietat intel·lectual únicament per a usos privats emmarcats en activitats d'investigació i docència. No s'autoritza la seva reproducció amb finalitats de lucre ni la seva difusió i posada a disposició des d'un lloc aliè al servei TDX. No s'autoritza la presentació del seu contingut en una finestra o marc aliè a TDX (framing). Aquesta reserva de drets afecta tant al resum de presentació de la tesi com als seus continguts. En la utilització o cita de parts de la tesi és obligat indicar el nom de la persona autora.

ADVERTENCIA. La consulta de esta tesis queda condicionada a la aceptación de las siguientes condiciones de uso: La difusión de esta tesis por medio del servicio TDR (www.tdx.cat) ha sido autorizada por los titulares de los derechos de propiedad intelectual únicamente para usos privados enmarcados en actividades de investigación y docencia. No se autoriza su reproducción con finalidades de lucro ni su difusión y puesta a disposición desde un sitio ajeno al servicio TDR. No se autoriza la presentación de su contenido en una ventana o marco ajeno a TDR (framing). Esta reserva de derechos afecta tanto al resumen de presentación de la tesis como a sus contenidos. En la utilización o cita de partes de la tesis es obligado indicar el nombre de la persona autora.

WARNING. On having consulted this thesis you're accepting the following use conditions: Spreading this thesis by the TDX (www.tdx.cat) service has been authorized by the titular of the intellectual property rights only for private uses placed in investigation and teaching activities. Reproduction with lucrative aims is not authorized neither its spreading and availability from a site foreign to the TDX service. Introducing its content in a window or frame foreign to the TDX service is not authorized (framing). This rights affect to the presentation summary of the thesis as well as to its contents. In the using or citation of parts of the thesis it's obliged to indicate the name of the author.

**“MARCADORS CLÍNICS I GENÈTICS DE RESPOSTA AL
TRACTAMENT AMB INTERFERO BETA-1B EN
PACIENTS AMB ESCLEROSI MÚLTIPLE REMITENT
RECURRENT”**

Olga Carmona i Codina
Tesi Doctoral



TXOMIN ARBIZU URDIAIN, Doctor en Medicina i Cirurgia per la Universitat de Barcelona,

CERTIFICA que la memòria “MARCADORS CLÍNICS I GENÈTICS DE RESPOSTA AL TRACTAMENT AMB INTERFERO BETA-1B EN PACIENTS AMB ESCLEROSI MÚLTIPLE REMITENT RECURRENT”

presentada per l’Olga Carmona i Codina, s’ha realitzat sota la seva direcció i considera que reuneix les condicions necessàries per la seva defensa davant el Tribunal corresponent per optar al grau de Doctor en Medicina i Cirurgia.

Dr. Txomin Arbizu Urdiain
Barcelona, setembre del 2010

AGRAÏMENTS

Al Dr. Arbizu pel seu treball incansable i tota una vida dedicada a l'Esclerosi Múltiple.

A la Dra Masuet, sense la seva fe en el meu projecte i ajuda constant, mai hagues estat possible llegir la meva tesis doctoral.

Al Dr. Marco Paz, el meu cap de servei a la Fundació Salut Empordà; perquè d'ell ho he après gairebé tot i per ser, sobretot, un amic incondicional.

A tot l'equip de la Unitat d'Esclerosi Múltiple de Bellvitge (Ana, Mireia, Susanna, Núria, Vicky, Ester, Gisela, Lucía, Olga....) i especialment a l'Ana Gonzalez, que m'ha vist créixer en tots els sentits i pels seus savis consells.

Al Dr. Pedro Alía per la seva indispensable col.laboració al laboratori

Als meus companys de Neurologia de la Fundació Salut Empordà (Cristina, Raul, Teresa, Maria, Tere, Mati...) perquè han "patit" amb mi totes les fases de preparació de la tesi

A la Gisela, l'Ester i la Lucía, per la seva amistat i perquè juntes som capaces d'imaginar un món millor.

I per últim a tots els pacients d'Esclerosi múltiple perquè cada dia són un exemple de superació per tots nosaltres.

A la meva mare i a l'àvia Remei,
pel seu recolzament incondicional, per ser font de la meva vida i dels
meus anhels, des de sempre i per sempre.

GLOSSARI D'ABREVIATURES

BHE	Barrera hematoencefàlica
LCR	Líquid cefalorraquidi
CMH	Complexe major d'histocompatibilitat
SNC	Sistema Nerviós Central
CPA	Cèl.lula presentadora de antígen
EMCD	Esclerosi Múltiple clínicament definida
EAE	Encefalomièlitis autoimmune experimental
EDSS	Expanded disability severity score
EMPP	Esclerosi múltiple primària progressiva
EMRR	Esclerosi múltiple remitent-recurrent
EMSP	Esclerosi múltiple secundària progressiva
IL	Interleuquina
INF-β	Interferó beta
INF-γ	Interferó gamma
RM	Ressonància magnètica
MTP	Metilprednisolona
SCA	Síndrome clínica aïllada
LMP	Leucoencefalopatia multifocal progressiva
ApoE	Apolipoproteïna E
ICS	Institut Català de la Salut
PCR	Reacció de cadena polimerasa
ns	No significatiu
BDI	Índex de depressió de Beck
OR	Odds ratio

ÍNDEX GENERAL

I.	INTRODUCCIO.....	7
	I.1. Introducció a l'esclerosi múltiple.....	8
	I.2. Patogènia de l'esclerosi múltiple.....	11
	I.3. Tractament de l'esclerosi múltiple.....	13
	I.4 Marcadors clínics de resposta al tractament amb interferó beta.....	17
	I.5. Esclerosi múltiple i genotip ApoE	17
II.	HIPÒTESI I OBJECTIUS.....	19
	II.1. Hipòtesi.....	20
	II.2. Objectius.....	22
III.	PACIENTS I MÈTODES.....	24
	III.1. Pacients.....	25
	III.2. Mètodes.....	27
IV.	RESULTATS.....	31
	IV.1. Treball 1. Interferon-B1b in Multiple Sclerosis: Effect on Progression of Disability and Clinical Markers of Treatment.....	32
	IV.2. Treball 2. Multiple sclerosis and cognitive decline: is ApoE4 a surrogate marker?.....	41
	IV.3. Treball 3. Apolipoprotein Alleles and the response to interferon-beta1b in multiple sclerosis	47

V. DISCUSSIÓ GENERAL.....	53
VI. CONCLUSIONS.....	62
VII. BENEFICIS DE LA INVESTIGACIÓ, APLICABILITAT I VALIDESA.....	65
VIII. BIBLIOGRAFÍA.....	66
IX. ANNEX I.....	81

I. INTRODUCCIÓ

1.1. Introducció a l'esclerosi múltiple

L'esclerosi múltiple (EM) és la primera causa de discapacitat d'origen no traumàtic a la població adulta jove del món occidental, amb un pic d'incidència a la tercera dècada de vida. Aproximadament un 70% dels pacients debuten entre els 20 i 40 anys; així doncs, es pot entendre fàcilment el gran impacte que produeix sobre la vida professional, familiar i social dels afectats, així com l'enorme cost econòmic i social que genera.¹ Si bé la prevalença global de l'EM és el doble a la població femenina, a les formes d'inici progressiu, amb debut més tardà (al voltant dels 50 anys), la prevalença entre sexes pràcticament s'igualava.²

Clàssicament, els estudis d'epidemiologia descriptiva realitzats a Espanya mostraven taxes de prevalença de 50 casos/100.000 habitants i d'incidència de 3 nous casos/100.000 habitants/any, situant a l'estat espanyol a la franja de "risc mig" pel desenvolupament de la malaltia.³ Els estudis publicats a la darrera dècada mostren que aquesta xifra és superior amb taxes de prevalença mitja entre 70-80 pacients/100.000 habitants i d'incidència entre 4-5 casos nous/100.000 habitants/any, reflectint probablement un millor diagnòstic de l'enfermetat més que un augment real de l'EM.⁴

L'expressió clínica més comú de la malaltia és la que segueix un curs Remitent Recurrent (80-85%), sent els símptomes clínics més habituals els sensitius (40%) i visuals (35%), seguits dels motors (20%), tronc cerebral (16%), cerebel·losos (15 %) i vesicals (4%). Durant la seva evolució les remissions tendeixen a ser menys constants i unes dues terceres parts dels pacients passen a una forma progressiva amb o sense brots intercurrents (fase Secundària Progressiva) amb un empitjorament gradual de la seva discapacitat. El temps en què es produirà aquesta progressió varia àmpliament, tot i que la mitja es troba entre uns 10-15 anys segons diverses sèries.⁵ En canvi, existeix un petit nombre de pacients que romandran

assintomàtics durant diversos anys després del primer brot (EM Benigna) i un altre petit percentatge (<10%) que desenvoluparan una discapacitat progressiva des de l'inici de la malaltia sense recaigudes ni remissions (forma Primària Progressiva).

(Veure Figura 1)

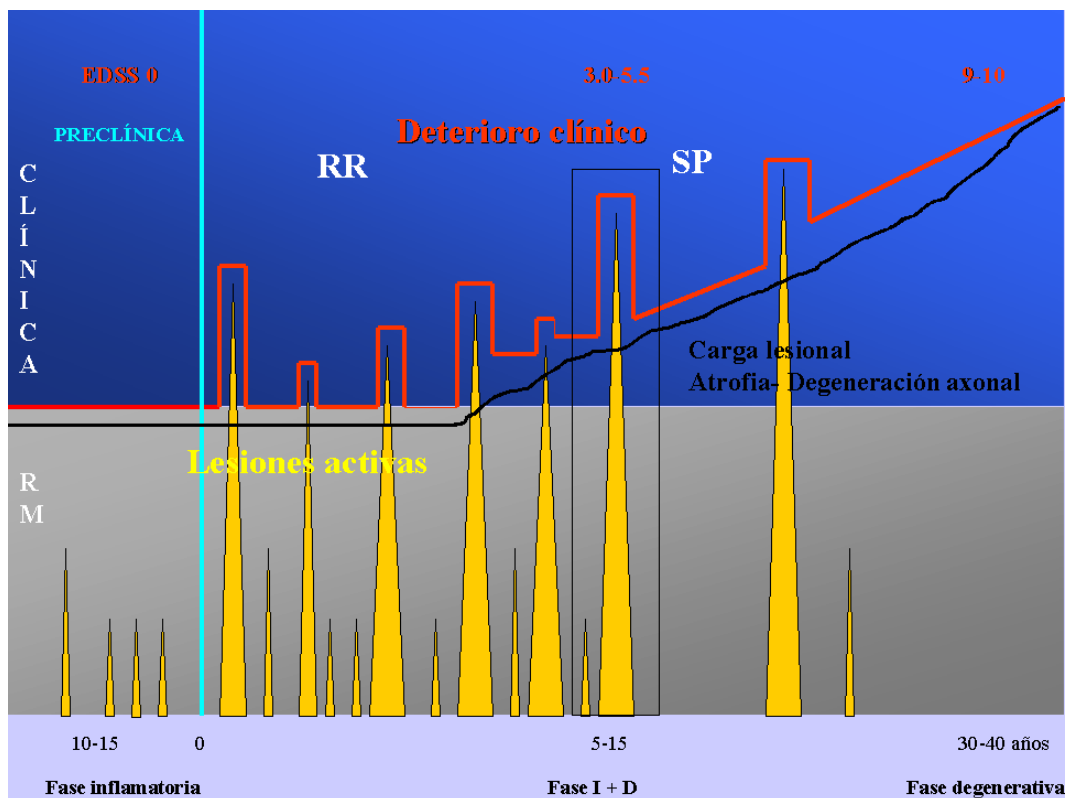


Figura 1

Donada la gran variabilitat de la progressió de la discapacitat entre els pacients d'EM, molts estudis d'història natural han buscat aquells factors predictius que ens permetin seleccionar els pacients amb pitjor pronòstic evolutiu a curt plaç, per tal d'iniciar un tractament més precoç i agressiu.

S'han identificat com a variables clíniques predictores de major temps a l'inici d'una discapacitat irreversible: sexe femení, menor edat d'inici, curs en brots (RR), absència de seqüel.les després del primer brot, clínica de debut en forma de neuritis òptica, absència d'afectació de la via piramidal, menor nombre de brots en els primers anys de malaltia i un major interval entre el primer i el segon brot ⁶.

Tanmateix, pel subgrup de pacients amb curs progressiu o bé per aquells amb forma d'inici en brots que han arribat a una puntuació de 4.0 (dificultat per caminar de forma il.limitada) a l'escala de discapacitat modificada de Kurtzke (EDSS) ⁷ aquestes variables no es mantenen. Això recolzaria la visió global de l'EM com una malaltia amb dues fases que mostrava la Figura 1: una fase inflamatòria inicial de durada variable, influenciada per les variables clíniques i una segona fase degenerativa amb acúmulo progressiu de discapacitat, independent de les variables clíniques i de l'activitat inflamatòria de la malaltia (brots). ⁸

L'objectiu del diagnòstic és evidenciar l'existència de dues o més lesions a la substància blanca del sistema nerviós central separades topogràficament i que hagin estat separades en el temps. Als anys 80-90 la clínica suggestiva (almenys dos episodis) junt amb el LCR, els potencials evocats multimodals i la Resonància Magnètica Cerebral (RM) eren necessaris pel diagnòstic d'EM, segons els primers criteris de Poser ⁹

Des de l'any 2001 gràcies al gran avenç de les tècniques de RM el pacient es pot diagnosticar amb un sol episodi clínic, sempre que es demostrï per imatge la disseminació espacial i temporal, segons els criteris de McDonald ¹⁰. Els darrers criteris proposats enguany pel grup europeu MAGNIMS ¹¹ permeten el diagnòstic de la malaltia amb un sol episodi i en molts casos, amb una sola RM (o en dues si no hi ha lesions captants de gadol.lini).

Tot i la gran ajuda d'aquests criteris, cada cop més senzills, el diagnòstic d'EM continua sent difícil i precisa de l'exclusió d'altres entitats que es poden presentar amb característiques clíniques similars i de l'expertesa del neuròleg.

1.2. Patogenia de la esclerosi múltiple

L'esclerosi múltiple (EM) és una malaltia crònica, autoimmune i desmielinitzant del sistema nerviós central (SNC) d'etiologia desconeguda. Probablement una certa predisposició genètica individual en confluència amb un agent extern desconegut (tòxic, viral...) condicionen una resposta autoimmune mediada per limfòcits T autoreactius vers antígens com la proteïna bàsica de la mielina (MBP) y la glicoproteïna mielínica oligodendrocitària (MOG).¹

La Figura 2 representa esquemàticament els punts més destacables de la patogenia de la malaltia.^{12,13}

La lesió aguda d'EM es caracteritza per la infiltració multifocal perivenular de la substància blanca del SNC per limfòcits i monòcits-macròfags, que generen una destrucció de la mielina i dels oligodendròcits. Clàssicament, es pensava que aquesta desmielinització era la única responsable de la degeneració axonal posterior; en els darrers deu anys múltiples estudis han demostrat que el dany axonal és ja present a fases inicials de la malaltia.^{14,15}

El procés immunopatogènic de la malaltia s'inicia quan les cèl.lules T autoreactives són capaces d'escapar al procés de tolerància central tímica, prèviament activades per exposició a antígens endògens o exògens¹⁶. Aquestes cèl.lules precisen passar la barrera hematoencefàlica (BHE) per tal de produir la resposta citotòxica local: aquesta migració transendotelial estarà mediada per molècules d'adhesió. Inicialment s'estableix una primera unió dèbil i reversible del limfòcit T a la cèlula endotelial ("tethering") a través de selectines i ligandos, que disminueix la velocitat de pas del limfòcit, favorint la unió irreversible a l'endoteli mitjançant les integrines que s'expressen a la superfície limfocitària^{12,13}.

Un cop els limfòcits activats han pogut accedir al SNC la secreció de citocines proinflamàtores augmenta l'expressió de molècules del CMH tipus II als macròfags i microglia, que actuaran com a cèl.lules presentadores d'antígen. La unió del receptor del limfòcit T als antígens mielínics provocarà la seva reactivació i la de les cèl.lules T naïve ($CD4^+CD45^{RA^+}$), amb l'aparició local de les subpoblacions limfocitàries T Helper efectores i T Helper memòria central ($CD4^+CD45^{RO^+}$). La comunicació bidireccional entre cèl.lules del sistema immune i residents al SNC potenciarà les citocines que generaran ones de reclutament cel.lular adicional responsables de mantenir el procés inflamatori local. Aquesta producció de citocines locals és un procés dinàmic que varia durant el curs de la malaltia i que disposa dels seus propis mecanismes de regulació negativa, establint-se un equilibri entre les citocines inflamatòries com l' INF-gamma, TNF- α y β , IL-2 e IL-1 (patró Th1) i antiinflamatòries, com el TGF- β , IL-4 e IL-5 (patró Th2), el que ens portaria al concepte de "balanç Th1/Th2". D'aquesta manera les cèlules Th1CD4⁺ específiques serien les responsables de desencadenar i amplificar la resposta inflamatòria, mentre que el perfil Th2 estaria implicat a la remissió de la malaltia, alliberant citocines antiinflamatòries i factors neurotròfics com el BDNF ^{12,13}. Múltiples estudis experimentals han demostrat que el BDNF afavoreix la preservació axonal gràcies al transport antepregat, estimula la proliferació i remielinització de l'oligodendròcit, disminueix l'expressió de les molècules del CMH tipus II, augmentant la supervivència neuronal ¹⁷⁻¹⁹.

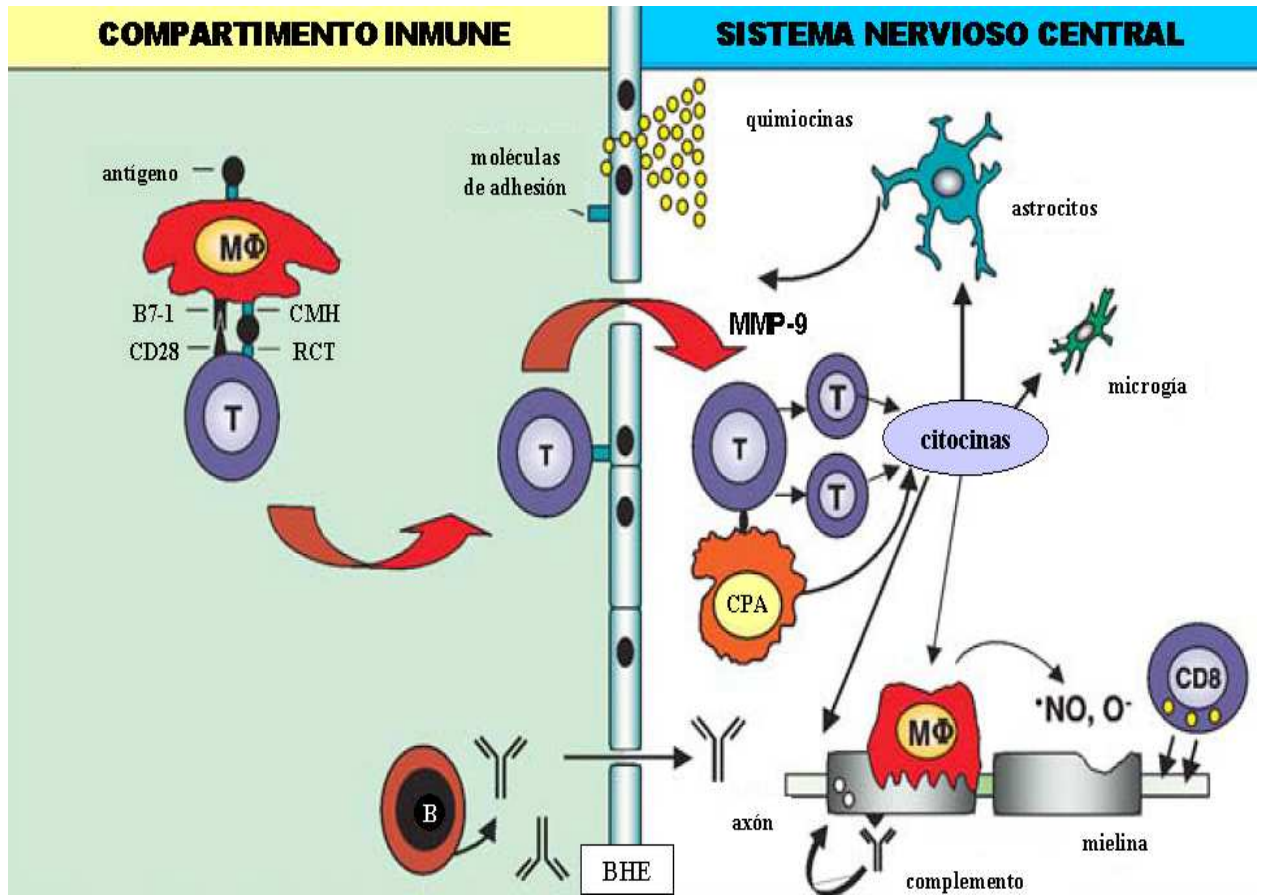


Figura 2

1.3. Tractament de l'esclerosi múltiple

El major coneixement de la patogènia de la malaltia ha permès en els darrers vint anys el desenvolupament dels fàrmacs que disposem actualment per tractar l'EM. La majoria actuen a diversos nivells de la cascada immunològica i han demostrat gran efectivitat a la fase inflamatòria de la malaltia i molt discreta a la progressió de la discapacitat.

Actualment disposem de cinc tipus de fàrmacs aprovats per l'EM: l'interferó beta (INF- β ; Betaferon[®], Rebif[®], Avonex[®]), l'acetat de glatiramer o copolímer (Copaxone[®]), l'azatioprina, el natalizumab (Tysabri[®]) i la mitoxantrona (Novantrone[®]).

L'interferó beta ha demostrat una reducció de la taxa de brots i la disminució de la càrrega lesional a T2 a la RM en pacients amb EMRR (recomenació tipus A) a diversos estudis de classe I²⁰⁻²². No obstant, el seu efecte a retrassar la progressió de la discapacitat no està clara i varia segons estudis; l'INF- β -1a sc a dosis de 44 μ g (Rebif[®]) fou capaç de reduir de forma significativa la proporció de pacients amb progressió confirmada versus placebo (39% en front al 50%) però amb efecte molt discret²². Pel que fa a les formes secundàriament progressives (EMSP) l'INF- β 1b i INF- β 1a sc a altes dosis han demostrat la seva eficàcia per aquelles formes amb persistència d'activitat inflamatòria (brots clínics o activitat a la RM)^{23, 24}. Totes les formes d'interferó beta han demostrat també amb estudis de classe I la seva capacitat de retrassar el diagnòstic d'EM (EMCD) amb el tractament precoç de la síndrome clínica aïllada (SCA) amb alt risc de conversió detectat per RM²⁵⁻²⁷.

L'acetat de glatiramer (Copaxone[®]), una barreja estandaritzada de polipèptids sintètics és eficaç a la reducció de la taxa de brots a l'EMRR (recomenació tipus A), però no ha demostrat capacitat de retrassar la discapacitat ni la seva efectivitat a les formes progressives^{28,29}. Recentment, s'ha aprovat la seva utilització a la SCA amb alt risc de conversió després d'un estudi classe I³⁰.

L'azatioprina, un fàrmac immunosupressor anàleg al nucleòsid 6-mercaptapurina, és possible que sigui capaç de reduir la taxa de brots (recomenació tipus C), mentre que el seu efecte a retrassar la progressió de la discapacitat a l'EM no ha estat demostrat (grau U). Es considera una

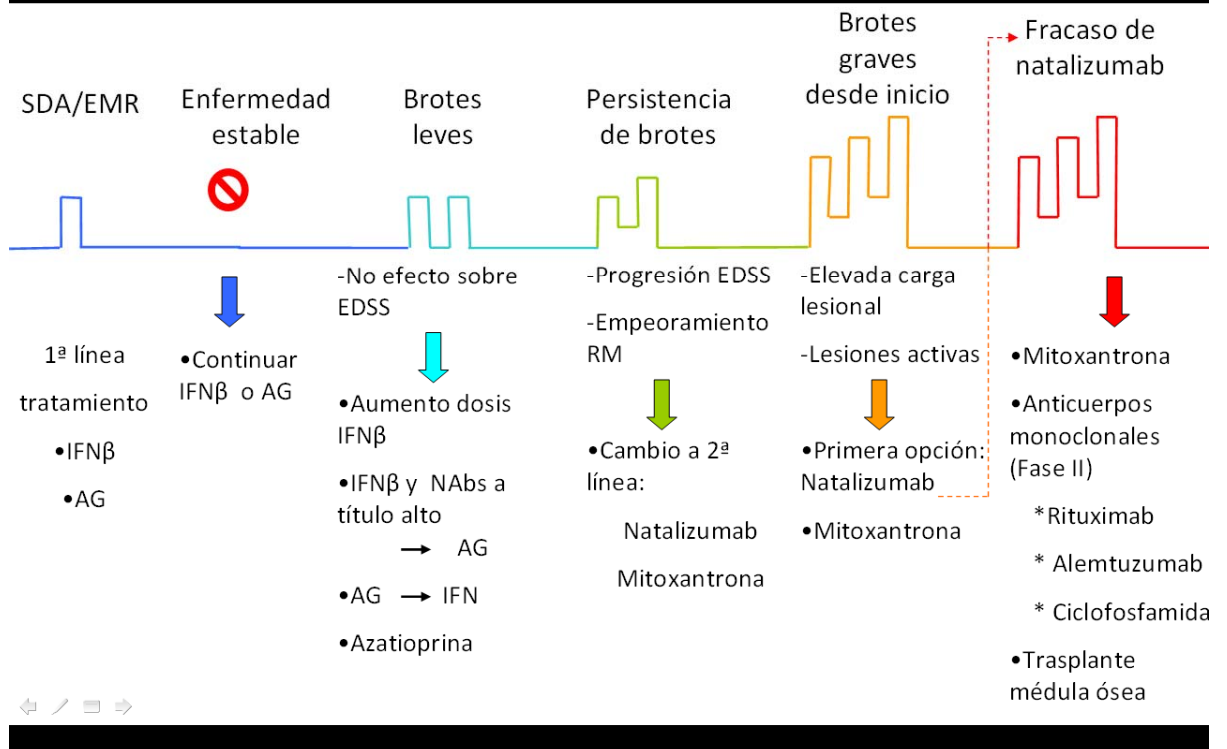
alternativa al tractament per l'EMRR quan no es tolera l'interferó o l'acetat de glatiramer i està aprovat el seu ús a l'EMSP amb brots. No obstant manquen estudis de fase A per augmentar el grau de recomenació ^{31,32}.

El natalizumab (Tysabri[®]), és l'únic anticòs monoclonal autoritzat a l'actualitat pel tractament de l'EM, que actua bloquejant l' α 4-integrina, limitant la migració dels limfòcits i monòcits al SNC a través de la BHE. La seva eficàcia a la reducció de la taxa de brots (70%), de l'activitat inflamatòria a la RM (>80%) i a frenar l'evolució a la discapacitat mantinguda als dos anys s'ha demostrat a dos estudis de classe I, un amb monoteràpia ³³ i l'altra en combinació amb INF- β 1a im setmanal ³⁴, que va haver de ser interromput per l'aparició de casos aïllats de leucoencefalopatia multifocal progressiva (LMP). Per aquest motiu, a l'actualitat, està restringit el seu ús per aquells pacients amb manca de resposta als tractaments de primera línia o com a primera opció en aquelles formes d'EMRR greu d'evolució ràpida.

La mitoxantrona, derivat antraciclínic amb efecte immunosupressor, ha mostrat certa eficàcia a les formes "greus" d'EMRR i d'EMSP a un estudi de classe III ³⁵. Una revisió de l'any 2005 de tots els assaigs doble cec i controlats amb placebo, va concloure que el fàrmac era moderadament eficaç pel control de la progressió de la discapacitat a curt termini ³⁶. De totes maneres, la seva toxicitat cardiològica i el risc de desenvolupar processos leucèmics a mig plaç, limiten el seu ús, quedant restringit a l'actualitat com a fàrmac de segona línia, per aquells pacients que no hagin tolerat o tingut resposta al natalizumab.

Les múltiples alternatives terapèutiques i l'anàlisi del seu perfil de benefici/seguretat han fet que diferents societats científiques s'estiguin posicionant per tal de trobar el millor perfil d'"escalada terapèutica". A la figura 3 es pot veure l'algoritme proposat per la Societat Espanyola de Neurologia a finals del 2009.

Algoritmo de escalado terapéutico



Actualment, nous fàrmacs com el fingolimod, claridibina, laquinimod (orals) i nous anticossos monoclonals (rituximab, alentuzumab) estan en fase avançada d'estudi (classe I) per tal de demostrar la seva eficàcia i optimitzar les alternatives terapèutiques actuals en front una malaltia que acaba produïnt una discapacitat irreversible a una població molt jove.

1.4. Marcadors de resposta clínica a l' interferó beta

Des de l'inici de la utilització dels interferons a mitjans dels anys 90, múltiples autors han analitzat quins són els factors de resposta clínica que podrien ajudar-nos a detectar de forma precoç aquells pacients amb resposta subòptima; l'aparició de nous tractaments amb millor eficàcia però pitjor perfil de seguretat com el natalizumab (Tysabri[®]), ha fet urgent la seva definició.

Els factors clínics més utilitzats actualment com a marcadors de mala resposta al tractament són: persistència de brots o empitjorament de la discapacitat a l'EDSS el primer any de tractament, presència d'anticossos neutralitzants, aparició de noves lesions captants de gadol.lini o augment càrrega lesional a T2 a la RM de control³⁷⁻⁴⁰. Tot i que en els darrers cinc anys altres marcadors com les bandes oligoclonals IGM⁴¹ o les proteïnes 14.3.3 i Tau⁴²⁻⁴³ en LCR han demostrat el seu valor pronòstic, la necessitat de fer puncions lumbars i la complexitat tècnica fan que no s'apliquin a la pràctica clínica habitual.

1.5 ApoE i esclerosi múltiple

L'apolipoproteïna E (ApoE) ha estat involucrada a la regeneració dels axons i la reparació de la mielina de les lesions del sistema nerviós central mitjançant la seva contribució al transport lipídic⁴⁴. L'alel e4 de l' ApoE s'ha relacionat a un major risc de tenir una demència de tipus Alzheimer⁴⁵, al deteriorament cognitiu associat a l'edat avançada⁴⁶ i com a marcador pronòstic als traumatismes cranioencefàlics⁴⁷ entre altres malalties.

Els darrers deu anys múltiples autors han publicat estudis sobre el valor de l'alel e4 del gen de l'ApoE com a marcador de susceptibilitat ⁴⁸⁻⁴⁹, de progressió clínica ⁵⁰⁻⁵⁷, radiològica ⁵⁸⁻⁶¹ o de deteriorament cognitiu ^{62,63} en pacients amb esclerosi múltiple, amb resultats contradictoris, que no han permès arribar a cap correlació ferma.

Per altra banda, un cert efecte protector s'ha inferit a l'alel e2 a algunes publicacions ^{48, 54,64}, de manera poc consistent i algunes vegades únicament associat al sexe femení ⁵⁴.

L'efecte d'aquest marcador genètic a la resposta terapèutica de l' INF- β dels pacients amb esclerosi múltiple ha estat estudiat únicament pel grup de Lanzillo R et al ⁶⁵, a un estudi obert prospectiu a dos anys, focalitzat fonamentalment al deteriorament cognitiu i la seva relació amb dades de ressonància magnètica, variables clíniques i l'ApoE, sense trobar cap associació positiva.

En aquest aspecte, un dels treballs exposats, intenta analitzar la correlació dels alels e4 i e2 del gen ApoE amb els diferents marcadors de resposta clínica a l'interferó beta: sobre l'activitat inflamatòria (brots) i sobre el seu efecte a la discapacitat mantinguda.

II. HIPÒTESIS I OBJECTIUS

II. 1. HIPÒTESIS

H.1.

L'interferó beta (IFN- β) s'ha utilitzat com a tractament de primera línia a l'esclerosi múltiple els darrers vint anys; múltiples estudis multicèntrics randomitzats han demostrat la seva eficàcia sobre l'activitat inflamatòria de la malaltia (reducció de la taxa de brots sobre el 30% i reducció de les noves lesions a T2 a la RM) però només un efecte modest i controvertit sobre la seva capacitat per retrassar l'acumulació de discapacitat dels pacients a llarg terme.

Per altra banda, assumint que no tots els pacients responen a l' IFN- β , no disposem encara de factors predictius inequívocs que ens permetin preveure de forma precoç la fallida al tractament.

Actualment estudis controlats amb placebo no es podrien justificar èticament, motiu pel qual els estudis observacionals i la seva comparació amb cohorts històriques no tractades ens han de permetre obtenir dades de seguretat, tolerabilitat i eficàcia a llarg terme dels fàrmacs immunomoduladors, així com determinar els factors pronòstics de resposta al tractament.

H.2.

Sobre un 43-65% dels pacients amb EM desenvoluparan un deteriorament cognitiu de tipus subcortical al llarg de la seva evolució, afectant la seva vida diària tant com la discapacitat física. L'atenció, la velocitat de processament, la memòria i les funcions executives són les àrees més afectades. Alguns estudis han associat aquest deteriorament a l'atròfia cerebral i a la càrrega lesional a la RM, però la seva etiologia és encara desconeguda.

El polimorfisme ApoE-4 s'ha relacionat amb un elevat risc de desenvolupar Malaltia d'Alzheimer o deteriorament cognitiu associat a l'edat; paral·lelament, alguns autors han implicat aquest polimorfisme amb el deteriorament cognitiu que es produeix a l'EM, amb resultats inconsistents. L'estudi neuropsicològic d'una cohort de pacients amb EM tractats amb el mateix immunomodulador i la seva comparació amb una cohort de subjectes sans ens ha de permetre confirmar el deteriorament i la seva relació amb les variables clíniques de la malaltia i la presència de l'alel ApoE-4.

H.3.

Múltiples autors han publicat estudis sobre el valor dels alels e4 i e2 de l'ApoE com a marcadors de susceptibilitat i de progressió clínico-radiològica en pacients amb EM, amb resultats contradictoris. No obstant, l'efecte d'aquest marcador genètic sobre la resposta al tractament immunomodulador no disposa d'estudis a llarg terme.

El nostre treball analitza la correlació dels alels e4 i e2 del gen ApoE amb els diferents marcadors de resposta clínica a l'interferó beta-1b en una sèrie de 95 pacients amb un seguiment de quasi cinc anys: sobre l'activitat inflamatòria (brots) i sobre el seu efecte a la discapacitat mantinguda (mesurat mitjançant l'escala de l'EDSS).

II.2. OBJECTIUS

O1.

O1.a. Comprovar l'eficàcia de l' IFN- β 1b a retrassar la progressió de la discapacitat dels pacients amb EMRR a la pràctica clínica diària, mitjançant la comparació amb una cohort històrica de pacients no tractats.

O1.b. Determinar quines variables clíniques ens permeten preveure la resposta dels pacients amb EM al tractament immunomodulador d'una forma precoç: factors clínics pronòstics de la malaltia.

O2.

O2.a. Comparar el grau de deteriorament cognitiu entre una cohort de 50 pacients amb EMRR amb discapacitat moderada i una cohort de 35 subjectes sans

O2.b. Determinar l'associació entre l'alel ApoE-4 i el deteriorament cognitiu a la cohort de pacients amb EMRR tractats amb IFN- β 1b

O2.c. Correlacionar el grau de deteriorament cognitiu amb les diferents variables clíniques de la malaltia (edat d'inici, taxa de brots, grau de discapacitat)

03.

03.a. Confirmar la presència de l'alel ApoE-4 com un factor de mala resposta al tractament amb interferó beta-1b en una cohort de 95 pacients amb EMRR (brots i discapacitat mantinguda)

03.b. Confirmar la presència de l'alel ApoE-2 com un factor protector o de bona resposta terapèutica a l'interferó beta-1b en una cohort de 95 pacients amb EMRR (brots i discapacitat mantinguda)

III. PACIENTS I MÈTODES

III. 1. PACIENTS

III.1.1. Pacients i variables clíniques

El Disseny del nostre estudi és longitudinal i prospectiu: es varen incloure tots els pacients (n=115) de la Unitat d'Esclerosi Múltiple de l'Hospital de Bellvitge (L'Hospitalet del Llobregat, Barcelona) amb el diagnòstic d'EMRR que iniciaven tractament immunomodulador (veure taula I) amb IFN- β 1b via subcutània cada 48 hores des de l'octubre de l'any 1995 fins el setembre del 2006, registrats a la base de dades EDMUS⁶⁶ (European Multiple Sclerosis Database) del centre.

Tots els pacients complien criteris d'EM clínicament definida, tenien una forma activa de la malaltia abans d'iniciar el tractament (dos brots en els darrers tres anys) i es controlaven clínicament cada sis mesos i sempre que presentaven un episodi clínic de la malaltia, en un període màxim de set dies.

Taula I. *Criteris per l'inici del tractament immunomodulador del Consell Assessor de l'esclerosi múltiple de l'Institut Català de la Salut (1995)*

- Esclerosi múltiple en forma Remitent- Recurrent
- Evolució mínima d'un any de la malaltia
- Pacients ambulatoris, capaços de caminar sense ajuda un mínim de 100 metres (EDSS entre 0-5.5)
- Presència d'un mínim de dos brots en els darrers dos anys

Seguint els paràmetres del Consell Assessor de l'Institut Català de la Salut (ICS) l'IFN-β fou retirat o substituït per un altre fàrmac immunomodulador si presentaven més de tres brots en un any de tractament o un empitjorament d'almenys dos punts a l'escala de discapacitat de l'EDSS, no relacionat amb els brots. Tots els pacients donaren el seu consentiment per escrit (aprovat pel CEIC de l'Hospital), sense retirades durant el seguiment.

Es varen registrar:

1- *Variables clínico-demogràfiques generals:*

- Edat d'inici de l'EM
- Sexe
- Anys d'evolució de la malaltia
- Temps de seguiment

2- *Variables basals abans d'iniciar el tractament amb IFN-β:*

- Taxa de brots anual prèvia a l'inici del tractament
- Brots en els primers dos anys de malaltia
- Nombre de brots totals fins l'inici del tractament
- EDSS basal
- Presència de seqüel.les del primer brot

3- *Variables clíniques de la malaltia durant el tractament:*

- Data d'inici de l' IFN-β
- Presència o no de brots
- Data del primer brot
- Puntuació de l'EDSS a cada visita
- Data de progressió a EMSP
- Data d'abandonament i/o canvi de tractament (si s'esqueia)
- Motius del canvi de tractament

Posteriorment es varen determinar els marcadors de resposta a l' IFN- β 1b segons:

- Taxa de brots anualitzada
- Temps de progressió d'un punt a l'EDSS (mantingut durant almenys sis mesos consecutius)
- Temps fins a tenir una discapacitat moderada (EDSS=3) i severa (EDSS=6)
- Índex de progressió (definit com la puntuació de l'EDSS dividit pels anys d'evolució de la malaltia)
- Temps d'evolució a fase secundària progressiva
- Percentatge d'abandonament de l' IFN- β 1b

III. 2. MÈTODES

III.2.1. Valoració de l'efecte de l' IFN- β 1b sobre la discapacitat progressiva

Per tal d'analitzar l'efecte de IFN- β 1b a la progressió de la discapacitat, es va seleccionar una cohort històrica de pacients no tractats, seguida prospectivament cada sis mesos a la mateixa Unitat d'Esclerosi Múltiple (Hospital de Bellvitge). La cohort incloïa 44 pacients amb EMRR clínicament definida, que havien presentat un mínim de dos brots en els darrers dos anys i un EDSS inicial < 5.5. Les seves dades estaven registrades a la base de dades EDMUS i complien els mateixos criteris que la cohort tractada amb IFN- β 1b. Aquesta cohort històrica estava formada per aquells pacients d'EMRR registrats abans de l'any 1995, en què fou aprovat el primer interferó al nostre país, mentre esperaven iniciar el tractament immunomodulador.

III.2.2. Valoració Neuropsicològica

De la cohort principal es va fer un estudi neuropsicològic complet de 50 pacients amb EMRR que es va comparar amb els resultats de 35 controls sans; els controls es seleccionaren dels familiars o amics dels pacients que acceptaven participar a l'estudi i es va fer un "group matching" per obtenir distribucions comparables en quan a sexe, edat i nivell educacional.

L'estudi neuropsicològic es va realitzar durant les visites rutinàries, en una única sessió de 45 minuts, per la mateixa neuropsicòloga, excepte quan els pacients estaven en brot o havien estat tractats amb corticoides el darrer mes; en aquest cas es va postposar l'examen a la següent visita programada a la Unitat. Es van excloure aquells pacients que presentaven: discapacitat motora i/o sensitiva que hagués pogut interferir a la realització dels tests, història prèvia d'abús de tòxics i/o de trastorns psiquiàtrics.

Les variables clíniques analitzades foren:

- Edat
- Sexe
- Durada de la malaltia
- Nombre de brots
- Grau de discapacitat (EDSS)
- Edat d'inici de la malaltia
- Nivell educatiu (mesurat com a anys d'estudis realitzats)

La bateria neuropsicològica administrada comprenia els següents test i funcions: *atenció* (Barcelona Test), *velocitat de processament* de la informació (SDMT, PASAT 3s, Stroop Test), *fluència verbal* (llistes de paraules en un minut), *memòria* (Barcelona Test), *resolució de problemes* (WCST, WAIS) i el grau de *depressió* (Beck Depression Inventory).

Posteriorment els pacients es varen dividir en tres grups diferents, en base als resultats dels tests i la bibliografia sobre el tema ⁶⁷:

- No deteriorament cognitiu (0-2 subtests alterats)
- Deteriorament cognitiu lleu (3-5 subtests alterats)
- Deteriorament cognitiu moderat (més de 5 subtests alterats).

III.2.3. Estudi genètic

Les mostres de sang es varen obtenir durant els controls de laboratori habituals dels pacients, prèvia signatura del consentiment informat, a 95 dels 115 pacients tractats amb IFNB de la sèrie. No hi va haver retirades de consentiment durant el seguiment.

El processament de les mostres i l'obtenció dels seus productes, així com la seva anàlisi mitjançant sondes/marcadors genètics es va realitzar amb l'ajuda i col.laboració del Servei de Bioquímica de l'Hospital de Bellvitge, especialment amb la col.laboració del Dr. Pedro Alia.

El mètode utilitzat es descriu a continuació:

- Extracció del DNA amb els kits comercials estàndard
- Conservació a -20° als congeladors del departament de Bioquímica
- Amplificació del DNA mitjançant PCR (reacció de cadena polimerasa) obtenint una seqüència de 244 nucleòtids (que inclouen els codons 112 i 158)
- Digestió dels nucleòtids amb l'enzim de restricció CfoI per distingir els alels e2, e3 i e4 del gen ApoE.

III.2.4. Anàlisi Estadística

Inicialment es va fer una anàlisi descriptiva, amb mesures de tendència central (mitja i mitjana) i de dispersió (desviació estandard, rang interquartil) segons normalitat (Test de Kolmogorov-Smirnov test).

Per les variables quantitatives es va utilitzar el test T de Student o de U Mann -Whitney segons va ser necessari. El test de Xi-quadrat es va utilitzar per comparacions de variables qualitatives o el test de Fisher segons criteris. El Test de Kaplan-Meier es va utilitzar per analitzar les variables quantitatives segons el temps i l'Anàlisi de Regressió lineal per correlacionar les diferents variables clíniques i els marcadors de resposta al tractament. Si no existien interaccions i les covariables eren estadísticament significatives es consideraren pel model final.

El p-valor de 0.05 fou considerat com a significatiu.

L'anàlisi estadística es va fer amb el paquet estadístic SPSS 15.0 per Windows (SPSS Inc., 2006), amb la col.laboració del Servei de Medicina Preventiva de l'Hospital de Bellvitge, especialment de la Dra. Cristina Masuet.

III.2.5. Aspectes ètics

Aquest treball està inclòs al projecte d'investigació nº 62/01 titulat "Implicacions genètiques de l'Esclerosi Múltiple" que fou aprovat pel CEIC de l'Hospital de Bellvitge el 30/09/2003. A l'annex I s'adjunta el certificat d'aprovació i el document d'informació al pacient amb el model de consentiment informat aprovat per l'estudi (versió 01.08.03).

IV. RESULTATS

TREBALL 1.

O. Carmona, V. Casado, E. Moral, L. Alonso-Magdalena, A. Martínez-Yélamos, S. Martínez-Yélamos, G. Martín-Ozaeta, T. Arbizu.

Interferon Beta-1b in Multiple Sclerosis: Effect on Progression of Disability and Clinical Markers of Treatment Response.

Eur Neurol 2008; 60 (6): 279-284.

Aquest primer treball avalua l'efecte de l' IFN-β1b en condicions de pràctica clínica habitual en una sèrie de 115 pacients amb EMRR i demostra la seva eficàcia a retrassar la progressió de la discapacitat de la malaltia a llarg plaç mitjançant la comparació amb una cohort històrica de 44 pacients no tractats.

La meua participació al treball va ser el seguiment clínic dels pacients, creació de la base de dades i la seva explotació. Així mateix vaig redactar l'article amb l'ajuda dels Drs. Txomin Arbizu i Sergio Martínez-Yélamos.

Aquest treball va ser presentat com a comunicació oral a la LIV Reunió de la Societat Espanyola de Neurologia, a l'any 2002

IV. 1. RESULTATS

IV.1.1 Característiques basals del pacients i estudi descriptiu

La cohort tractada amb IFN-B1b consistia en 115 pacients amb EMRR seguits de forma prospectiva i de 44 pacients de la cohort històrica.

La mitja de seguiment dels pacients tractats era de 4.6 anys (rang: 0.5-7.1 anys) i la mitjana fou de 5.58 anys. La mitjana de l'EDSS basal era 2.5 i la mitja de brots d'1.6 a l'any previ a l'inici del tractament immunomodulador.

Les característiques basals i demogràfiques d'ambdues cohorts es mostren a la taula següent:

Taula II. *Característiques demogràfiques basals del grup de pacients tractats amb interferó beta-1b i del grup de la cohort històrica no tractada*

	Interferó beta-1b	Cohort històrica	p
Sexe:			
Homes (%)	33%	28%	0.46
Dones (%)	67%	72%	
Edat inici (mitja)	27.7	33.6	0.04
Mitja seguiment (anys)	4.8	1.8	0.00
Taxa brots 2 anys previs	3.2	3.4	0.43
EDSS basal (mitja)	2.5	2.7	0.38

Al final del seguiment, el 70% (80/115) dels pacients de la cohort tractada seguien amb el mateix tractament amb bona tolerància i eficàcia sostinguda. Només el 8.7% (10/115) havien canviat a un altre tractament immunomodulador per ineficàcia (segons els criteris descrits prèviament, del comitè assessor pel tractament de l'EM de l'ICS).

El 74% (85/115) d'aquesta cohort havien experimentat una reducció superior al 50% de la seva taxa de brots prèvia i només el 26% (30/115) havien presentat una resposta subòptima al tractament amb IFN- β 1b . Cal remarcar que 25 pacients (21.7%) restaren lliures de brots durant el seguiment. Únicament set pacients (6%) compliren criteris per SPMS durant aquest període.

La mitja anualitzada de brots de la cohort tractada fou de 0.70 brots/any.

IV.1.2 Anàlisi dels pacients que abandonaren el tractament amb IFNB

El 30% dels pacients (35/115) abandonaren el tractament amb IFN- β 1b durant el seguiment, tot i que la gran majoria (28/35) manteniren el seguiment clínic a la Unitat d'Esclerosi Múltiple de Bellvitge. Només set pacients (6%) varen abandonar els controls al nostre centre: cinc per canvi de domicili i dos varen morir per causes diferents a l'EM.

Les causes més freqüents d'abandonament del tractament foren: efectes adversos (n=12), intenció d'embarç (n=4), voluntari (n=2) i ineficàcia (n=10). Els efectes secundaris relacionats amb l'abandonament de l' IFN- β 1b es mostren a la taula III.

Només un pacient va experimentar un efecte advers greu, que va comportar hospitalització per hepatitis aguda; inicialment es va pensar que era per hepatotoxicitat del fàrmac, però després d'una biòpsia hepàtica, el diagnòstic fou d'Hepatitis Autoimmune ⁶⁸.

Taula III. Efectes adversos relacionats amb l'abandonament del tractament amb IFN- β 1b.

EFECTE ADVERS	Nombre de pacients
Astènia	2
Síndrome pseudogripal severa	2
Depressió	3
Reacció local	3 (dues amb necrosis)
Espasticitat severa	1
Hepatitis Autoimmune	1

Analitzant els pacients que abandonaren el tractament per ineficàcia, segons els criteris del Consell Assessor de l'ICS, tres pacients havien progressat més de dos punts a l'EDSS a l'any previ i la resta de pacients (n=7) havien presentat més de tres brots en el darrer any.

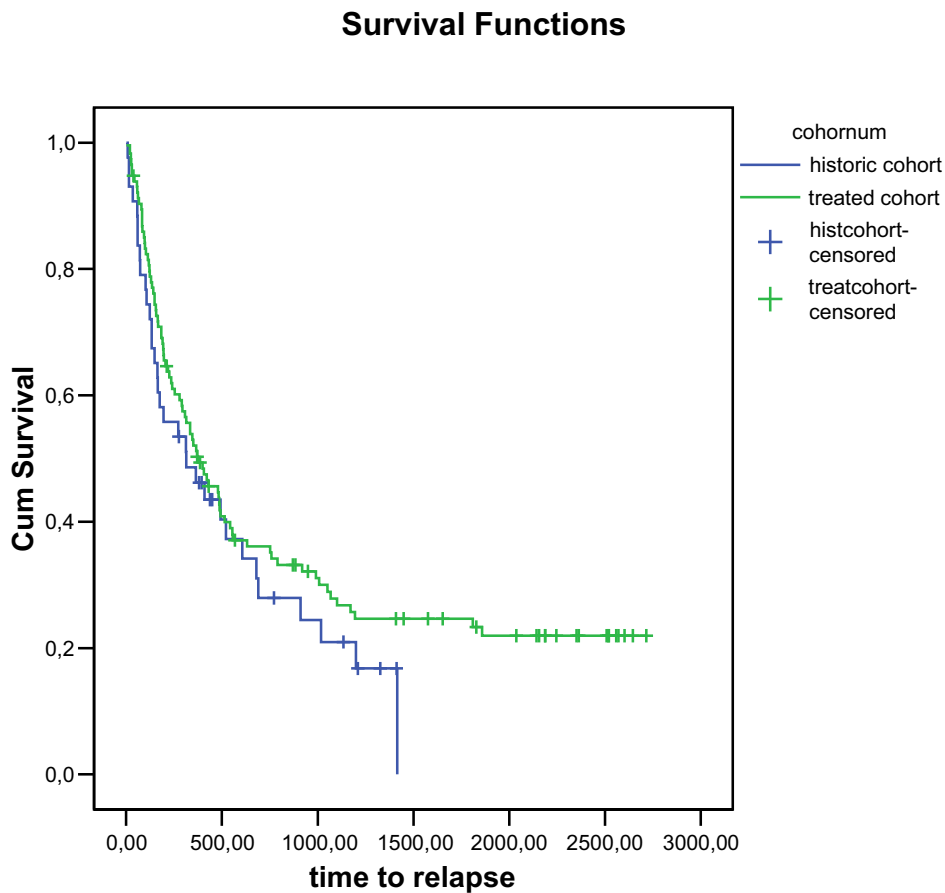
Si dividim els pacients tractats amb IFN- β 1b en dos grups (els que abandonaren el tractament i els que seguiren amb el mateix fàrmac) no observem diferències a les seves característiques basals. Aquells pacients que abandonaren l'IFNB per efectes adversos tenien un EDSS similar al final del seguiment que els que seguiren amb el fàrmac (3.25 vs 2.5, respectivament; ns).

Obviament, els resultats són diferents en analitzar aquell grup de pacients que va abandonar l'interferó per ineficàcia; el seu EDSS al final del seguiment era significativament superior als que es varen mantenir amb l' IFN- β 1b (4.5 vs 2.5, respectivament; $p < 0.01$)

IV.1.3 Anàlisi del temps fins al primer brot

La mitjana de temps de la cohort tractada amb IFN- β 1b (n=115) per presentar el primer brot després d'iniciar el tractament immunomodulador foren 375 dies mentre que a la cohort històrica fou de 313 dies ($p=0.26$).

Figura 1.



La mitja de brots després de dos anys de tractament va disminuir a 1.7 (sent la mitja de brots basal de 3.2), corresponent a una reducció absoluta del 47%. L'anàlisi bivariada no va trobar diferències significatives entre els pacients en funció de si varen presentar un brot precoç o no després de l'instauració del tractament, l'edat d'inici de la malaltia, el sexe, les seqüel.les després del primer brot o la forma de presentació de l'EM.

IV.1.4. Anàlisi del temps fins a la progressió de la discapacitat mantinguda

Només el 25% (29/115) dels pacients tractats amb IFN- β 1b presentaren una progressió d'1 o més punts a l'EDSS durant el seguiment de quasi cinc anys. La mitja del canvi de discapacitat durant el seguiment, mesurada per l'EDSS, fou de 0.46 punts (95% IC: 0.7-0.2).

La mitjana de l'EDSS basal de 2.5 es va mantenir als 24 mesos (101/115 pacients), als 36 m (84/115), als 48 mesos (74/115) i va disminuir lleugerament a un EDSS 2.25 als 60 mesos (55/115 pacients en seguiment). Si comparem aquestes dades amb les d'història natural de l'EM⁶ (considerant un empitjorament mig de 0.3 punts a l'EDSS anual) només 18 pacients (15.7%) progressaren més de l'esperat. Podriem dir, en conseqüència, que el 84.3% (97/115) dels pacients de la cohort tractada varen obtenir benefici del tractament amb IFN- β 1b a la progressió de la discapacitat de la seva malaltia. A l'anàlisi bivariada, no es varen trobar diferències entre els pacients que progressaren a la seva discapacitat o els que es varen mantenir estables, en quan a edat d'inici, sexe, seqüel.les després del primer brot o inici mono o polisimptomàtic.

IV.1.5. Anàlisi del temps fins a fase secundària progressiva

Al final del seguiment, el 6% (7/115) dels pacients havien convertit a fase secundària progressiva i la majoria (5/7) havien abandonat el tractament amb IFN- β 1b; dos per efectes adversos, un de forma voluntària i els altres dos per manca d'eficàcia.

IV.1.6. Marcadors de resposta al tractament amb IFN- β 1b

La mitja anualitzada de brots als dos anys de seguiment fou de 0.74 en el grup tractat amb IFN- β 1b respecte a 2.2 a la cohort no tractada ($p=0.001$).

Per altra banda, després de dos anys de seguiment el 32.5% dels pacients tractats estaven lliure de brots en comparació amb el 22.7% dels no tractats (ns).

Es va trobar una correlació positiva entre el nombre total de brots previ a l'inici del tractament i el nombre total de brots després de l'inici de l' IFN- β 1b (Coeficient de correlació de Pearson= 0.27; $p=0.004$).

Els pacients que presentaren un brot durant els primers dotze mesos de tractament amb IFN- β 1b tenien un EDSS superior al final del seguiment que aquells que no varen tenir brots (3.37 vs 2.36, respectivament; $p=0.003$), tot i que no hi havia diferències entre els dos grups a l'EDSS basal (2.61 vs 2.18; $p=0.07$).

A més, l'índex de progressió abans i després de l'inici del tractament amb INFB també fou diferent: 0.03 pels pacients lliures de brots al primer any versus 0.21 pels pacients amb brot ($p=0.024$).

IV.1.7. Anàlisi Multivariada

L'anàlisi de les variables disponibles a l'inici de la malaltia va mostrar:

- 1- Només el nombre de brots els primers dos anys de la malaltia (activitat inflamatòria inicial del'EM) fou predictor d'un brot precoç després de l'inici del tractament amb IFN- β 1b (ROR: 1.13; $p = 0.009$)
- 2- El temps entre el primer i el segon brot de l'EM es va relacionar amb la progressió precoç d'un punt a l'EDSS (ROR: 1.01; $p = 0.026$) i amb la conversió a EMSP (ROR: 1.02; $p = 0.028$) després de l'inici de l' IFN- β 1b

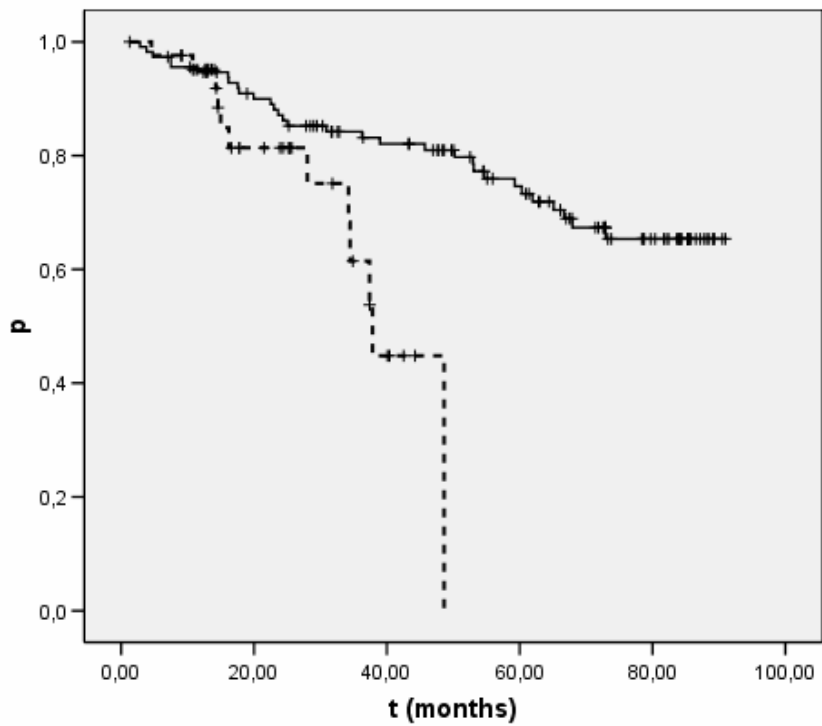
Quan s'afegiren les variables disponibles a l'inici del tractament, només el nombre de brots en els primers dos anys de malaltia es relacionava amb un brot precoç (ROR: 1.15; $p=0.004$). L'edat d'inici, sexe, debut mono o polisimptomàtic o la presència de seqüel.les després del primer brot no es varen relacionar amb la progressió de la discapacitat després de l'inici del tractament immunomodulador.

IV.1.8. Progressió de la discapacitat comparada amb la cohort històrica

La cohort tractada amb IFN- β 1b ($n=115$) i la cohort històrica ($n=44$) eren iguals en quan a sexe, EDSS basal i nombre de brots en els dos anys previs a l'inici de l'estudi tal com s'ha mostrat a la taula II. L'edat mitja d'inici de l'EM era inferior a la cohort tractada amb IFN- β 1b que la de la cohort històrica. El seguiment mig era inferior a la cohort històrica (1.8 versus 4.6 anys, respectivament; $p<0.001$).

A l'analitzar el temps per progressar un punt a l'EDSS s'observaren diferències significatives entre ambdues cohorts: 36.94 mesos (cohort històrica) comparat amb 72.94 mesos (cohort amb IFNB), tal com es pot veure a la figura 2; ($p=0.002$).

Figure 2. Time to increase 1 EDSS point



TREBALL 2.

O. Carmona, C. Masuet, O. Santiago, P. Alía, V. Casado, E. Moral, L. Alonso-Magdalena, T. Arbizu.

Multiple sclerosis and cognitive decline: is ApoE4 a surrogate marker?

*Acceptat per la seva publicació a la revista « Acta Neurologia Scandinavica »
el 16/11/2010.*

Aquest segon treball avalua la presència de deteriorament cognitiu a una cohort de 50 pacients amb EMRR tractats amb IFNB, mitjançant la comparació amb una cohort de controls sans i analitza si el fet de ser portador de l'alel ApoE4 és un factor de risc per desenvolupar-lo d'una forma més precoç.

La meva participació al treball va ser el seguiment clínic dels pacients, creació de la base de dades i la seva explotació. Així mateix vaig redactar l'article amb l'ajuda dels Drs. Txomin Arbizu, Olga Santiago i Cristina Masuet.

IV. 2. RESULTATS

IV.2.1 Característiques basals dels pacients

L'edat mitja dels pacients al moment de l'estudi neuropsicològic fou de 37.08 (SD 8.6) i el 66% (33/50) eren dones.

La mitja d'anys d'escolarització fou de 10.62 anys (DE 3.6).

La mitjana de l'EDSS fou de 2.25 (DE 1.6) i la durada mitja de la malaltia de 9.44 anys (SD 7.1).

Els pacients havien rebut tractament amb IFN- β 1b durant un temps mig de 3.24 anys (DE 1.34).

Taula IV. *Característiques demogràfiques del grup de pacients i del grup control que realitzaren l'estudi neuropsicològic*

	Pacients EM (n=50)	Controls (n=35)	p
Edat (Mitja +/- SD)	37.08 +/- 8.6	38.34 +/-14.2	0.64
Sexe (Dones)	66 %	65.7%	0.97
Anys educació (mitja+/- SD)	10.62 +/- 3.6	11.66 +/- 3.7	0.20
EDSS (mitja+/- SD)	2.25 +/- 1.6	n-a	
Durada EM (mitja+/- SD)	9.44 +/- 7.1	n-a	
Durada del tractament (mitja+/- SD)	3.24 +/- 1.34	n-a	

n-a: no aplicable

IV.2.2 Comparació dels estudis neuropsicològics entre els pacients d'EM i els controls sans

En comparar les valoracions neuropsicològiques dels pacients amb EM i els controls sans es trobaren diferències significatives als següents ítems :

- memòria verbal
- aprenentatge
- velocitat de processament de la informació

Inesperadament, les puntuacions als tests de depressió de Beck (BDI) no eren diferents a ambdós grups: 5.63 (DE 6.84) pels subjectes sans versus 7.98 (DE 5.85) pels pacients d'EM ($p=0.094$).

A la **taula V** es descriuen els resultats de tots els subtests aplicats a l'estudi neuropsicològic segons el grup de pacients tractats i de control sans, i les seves diferències.

Taula V.

	Pacients EM (n=50)	Controls (n=35)	p
Fluència verbal			
Animals 60 s	18.56 (5.8)	20.65 (5.1)	0.92*
Paraules comencen amb "p" 60 s	12.60 (4.7)	13.54 (4.3)	0.35*
Velocitat de processament			
Stroop paraules	94 (20)	100 (9.50)	0.032**
Stroop colors	59.46 (14.7)	65.37 (14.1)	0.08*
Stroop paraula-color	36.19 (9.7)	40.78 (13.8)	0.087*
PASAT 3 s	35.65 (16.4)	47.76 (10)	0.001*
Digit symbol test	41.68 (12.1)	52.14 (18.2)	0.005*
Control mental			
Interferència	-82.74 (24.3)	-89.96 (18.7)	0.160*
Atenció			
Test de Dígits directes	6.00 (1)	5.00 (1)	0.204**
Inversa Test Dígits	4.00 (1)	4.00 (2)	0.065**
Resolució de problemes (WAIS)	8.24 (2.7)	9.42 (2.3)	0.046*
WSCT nombre de categories	3.00 (2.25)	4.00 (2.0)	0.113**
WSCT respostes correctes	45.30 (9.1)	47.82 (9.1)	0.221*
WSCT primer intent categories	3.00 (12.0)	2.00 (2.0)	0.057**
WSCT perseveracions	5.39 (4.5)	3.54 (3.7)	0.05
Memòria immediata i diferida			
Test aprenentatge 1	4.90 (1.3)	4.42 (1.6)	0.164*
Test aprenentatge 2	6.54 (1.3)	6.68 (1.5)	0.641*
Test aprenentatge 3	7.00 (2.0)	8.00 (2.0)	0.030**
Aprenentatge global	18.62 (3.1)	18.88 (3.9)	0.730*
Aprenentatge diferit	4.90 (2.1)	5.85 (2.1)	0.060*
Memòria immediata verbal	6.76 (2.5)	8.02 (2.8)	0.036*
Memòria diferida	7.24 (2.7)	8.80 (2.8)	0.014*
Questions memòria immediata	9.00 (4.0)	10.00 (4.0)	0.091**
Questions memòria diferida	8.60 (2.7)	9.62 (2.6)	0.085*
Memòria visual			
Memòria de reproducció visual	11.10 (2.4)	12.82 (2.4)	0.002*

* T-test (Mitja i desviació estandard)

** Mann-Whitney U test (Mitja i rang interquartil)

IV.2.3 Relació deteriorament cognitiu i variables clíniques de l'EM

La majoria de pacients tractats amb IFN- β 1b (41/50) no presentaven signes de deteriorament cognitiu després de quasi deu anys de malaltia (errors a 0-2 tests) i només el 18% (9/50) varen suspendre 3-5 tests, corresponent a un "deteriorament cognitiu lleu". Cap pacient de la nostra sèrie complia criteris de deteriorament cognitiu moderat (més de 5 tests).

No es va trobar correlació amb el deteriorament cognitiu i la discapacitat física (mesurada per l'EDSS), l'índex de progressió, el nombre de brots, la durada mitja de la malaltia o el temps d'exposició al tractament amb IFNB. Es va utilitzar la Regressió lineal per estudiar el risc de deteriorament cognitiu (definit com errors a 3 o més tests), considerant les següents variables: sexe ($p=0.776$), durada mitja de la malaltia ($p=0.251$), EDSS ($p=0.603$), puntuacions al BDI ($p=0.622$), nivell educatiu ($p=0.032$) i la presència de l'alel ApoE4 ($p=0.757$).

El nivell educatiu va ser la única variable independent que permetia predir el deteriorament cognitiu al nostre grup de pacients amb una OR =0.73.

IV.2.4 Relació deteriorament cognitiu i l'ApoE4

La distribució del genotip ApoE a la nostra mostra era la següent:

- E2-E2 0%
- E2-E3 16%
- E3-E3 68%
- E3-E4 10%
- E2-E4 4%
- E4-E4 2%

Degut al nombre reduït de portadors d'ApoE4 es van dividir els pacients amb dos subgrups: Portadors E4 (16%) i noE4 (84%).

No es varen trobar diferències entre els portadors i no de l'ApoE4 als tests neuropsicològics, a les puntuacions de l'escala de depressió de Beck (BDI) o pel que feia a les diferents variables clíniques.

Els resultats es mostren a la Taula VI.

Taula VI. Característiques demogràfiques, clíniques i neuropsicològiques dels pacients d'EM segons el genotip ApoE4

	E4+ (n=8)	E4- (n=42)	p
Sexe (dones)	66.7%	62.5%	0.558*
Edat, mitja (DE)	33.25 (2.69)	37.81 (1.34)	0.062
Nivell educacional, mitja (DE)	11.50 (1.39)	10.68 (0.51)	0.550
Durada (en anys), mitja (DE)	10.73 (2.69)	12.05 (1.08)	0.157
EDSS, mitja (DE)	2.12 (1.38)	2.73 (1.70)	0.292
BDI, mitja (DE)	5.13 (4.58)	8.54 (5.95)	0.092
Fluència verbal, mitja (DE)	3.49 (0.22)	3.37 (0.31)	0.312
Velocitat de processament, mitja (DE)	255.00 (31.92)	260.70 (57.94)	0.716
Control mental, mitja (DE)	108.50 (16.75)	100.84 (21.32)	0.345
Atenció, mitja (DE)	37.50 (14.94)	47.06 (17.56)	0.165
Memòria verbal immediata, mitja (DE)	39.37 (5.37)	39.97 (8.15)	0.265
Memòria verbal diferida, mitja (DE)	23.87 (6.60)	20.02 (7.39)	0.184
Deteriorament cognitiu lleu/no deterior	25.0%	23.8%	0.627*

* Chi-Square test or Student t-test segons necessari

TREBALL 3.

O. Carmona, C. Masuet, P. Alía, E. Moral, L. Alonso-Magdalena, V. Casado, Martín-Ozaeta G, T. Arbizu.

Apolipoprotein Alleles and the response to interferon-beta1b in multiple sclerosis

Acceptat per la seva publicació a la revista "European Neurology" el dia 24/12/2010

Aquest tercer treball avalua el valor predictor dels alels E4 i E2 de l'ApoE sobre la resposta al tractament immunomodulador amb IFN- β 1b a un grup de 95 pacients amb esclerosi múltiple remitent-recurrent seguits a la Unitat d'Esclerosi Múltiple durant una mitja de temps de quasi cinc anys.

La meua participació al treball va ser el seguiment clínic dels pacients, creació de la base de dades i la seva explotació. Així mateix vaig redactar l'article amb l'ajuda dels Drs. Txomin Arbizu i Cristina Masuet.

Els resultats preliminars d'aquest treball van ser presentats com a poster al 20th Congress of the European Committee for Treatment and Research in Multiple Sclerosis (ECTRIMS) a Viena, l'any 2004.

IV. 3. RESULTATS

IV.3.1 Característiques basals dels pacients

De la cohort original de 115 malalts d'EM tractats amb IFN- β 1b es varen poder obtenir mostres de sang per l'estudi del polimorfisme de l'ApoE de 95 pacients (82.6%).

La taula VII mostra les característiques clínico-demogràfiques dels pacients abans d'iniciar el tractament amb IFN- β 1b i la seva distribució segons l'ApoE. El 15% dels pacients de la mostra eren portadors de l'alel E4 i el 14% de l'alel E2. Només un pacient (1.06%) era homozigot per E4 i cap per E2.

Taula VII. *Característiques demogràfiques basals de la població i distribució segons els alels de l'ApoE*

Sexe	Dones	n (%)	66 (69,5)
Edat inici	Mitja (DE)		28,08 (7,99)
Temps de seguiment (anys)	Mitja (DE)		7,44 (2,98)
Nombre de brots dos anys previs IFN- β 1b	Mitja (DE)		3,29 (1,97)
EDSS a l'inici	Mitja (DE)		2,35 (1,28)
E2-E2		n (%)	0 (0)
E2E3		n (%)	11 (11,58)
E4E4		n (%)	1 (1,06)
E4 portadors		n (%)	14 (14,73)
E3E3		n (%)	70 (73,68)
E4E3		n (%)	11 (11,58)
E4E2		n (%)	2 (2,10)
E2 portadors		n (%)	13 (13,68)

No es varen trobar diferències basals per les variables clíniques entre els pacients portadors o no de l'alel E4 ni tampoc entre el grup de portadors o no de l'alel E2 tal com es pot veure a la taula següent.

Taula VIII. Característiques basals segons genotip ApoE

		E4 portadors		Total	p-valor	E2 portadors		Total	p-valor
		negatiu	positiu			negatiu	positiu		
Sexe	Dones n (%)	57 (70,37)	9 (64,29)	66 (69,47)	,755	57 (69,51)	9 (69,23)	66 (69,47)	1,000
Edat d'inici	Mitja (DE)	28,21 (7,49)	27,36 (10,75)	28,08 (7,99)	,714	28,11 (8,15)	27,92 (7,17)	28,08 (7,99)	,938
Temps de seguiment (any)	Mitja (DE)	7,27 (3,09)	8,39 (2,13)	7,44 (2,98)	,106	7,36 (3,00)	7,98 (2,94)	7,44 (2,98)	,486
Nombre brots dos anys previs IFNβ1b	Mitja (DE)	3,37 (2,09)	2,86 (0,95)	3,29 (1,97)	,370	3,37 (2,06)	2,85 (1,14)	3,29 (1,97)	,379
EDSS inicial	Mitja (DE)	2,39 (1,28)	2,10 (1,22)	2,35 (1,28)	,439	2,43 (1,29)	1,80 (1,05)	2,35 (1,28)	,098

IV.3.2 Correlacions amb l'alel E4

No es van trobar diferències significatives entre les variables de resposta al tractament amb IFN-β1b i els pacients portadors de l'alel E4, a excepció del “temps fins al primer brot després del tractament”, que era superior en aquells portadors de l'alel E4, tot i que la taxa de brots o el nombre total de brots durant el seguiment no eren diferents.

A la Taula IX es mostren els resultats de tots els marcadors de resposta clínica analitzats

Taula IX. *Marcadors de resposta a l'interferó-beta1b i la seva relació amb l'alel E4 de l'ApoE.*

	APOE4+	APOE4-	p
	n=14	n= 81	
Nombre de brots (seguiment)	3.00 (5)	3.00 (4)	0.883**
Taxa de brots (seguiment)	0.24 (0.54)	0.42 (0.73)	0.096**
Temps de seguiment (mesos)	255.23 (64.64)	221.26 (93.93)	0.197*
Temps fins primer brot (mesos)	74.29 (71.44)	35.44 (45.55)	0.035*
Temps progressió EDSS (mesos)	82.75 (46.72)	86.70 (84.15)	0.24**
Temps fins a SPMS (mesos)	255.10 (64.77)	219.64 (93.50)	0.084*
Temps fins EDSS=3 (mesos)	160.78 (74.64)	143.03 (115.10)	0.502**
Índex de progressió	0.25 (0.82)	0.28 (1.42)	0.878**
Percentatge d'abandonaments	21.4%	40.7%	0.169***

* T-test (mitja i desviació estandard)

** U-Mann-Whitney test (mitja i rang interquartil)

*** Chi-Square

IV.3.3 Correlacions amb l'alel E2

El temps per arribar a una discapacitat moderada (mesurada com a EDSS=3 a l'escala de discapacitat de Kudzke) era superior en els pacients portadors de l'alel E2 (204.50 mesos) que en aquells no-E2 (142.90 mesos) (p=0.032).

Es va observar també una tendència a un menor index de progressió (calculat com l'empitjorament de l'EDSS dividit pels anys d'evolució de l'EM) pels portadors de l'alel E2 (0.13 versus 0.17; p=0.119), tot i que sense tenir significació estadística.

No es trobaren diferències entre els altres marcadors de resposta al tractament amb INFB, ni el nombre d'abandonaments per ineficàcia o per efectes adversos.

La taula X mostra els resultats complets de totes les comparacions.

Taula X. *Marcadors de resposta a l'interferó-beta1b i la seva relació amb l'alel E2 de l'ApoE.*

	APOE2+ n=13	APOE2- n= 82	p
Nombre de brots (seguiment)	2.00 (2)	4.00 (4)	0.154**
Taxa de brots (seguiment)	0.20 (0.40)	0.42 (0.72)	0.096**
Temps fins primer brot (mesos)	120.04 (10.63)	167.38 (31.89)	0.18*
Temps fins progression EDSS (mesos)	95.73 (74.33)	83.48 (77.34)	0.30**
Temps fins a SPMS (mesos)	204.77 (157.95)	151.97 (78.51)	0.251**
Temps fins a EDSS=3 (mesos)	204.50 (155.00)	142.90 (102.64)	0.032**
Índex de progressió	0.13 (0.12)	0.17 (0.24)	0.119**
Percentatge d'abandonaments	23.1%	40.2%	0.236***

* T-test (mitja i desviació estandard)

** U-Mann-Whitney test (mitja i rang interquartil)

*** Chi-Square

IV.3.4 Anàlisi Multivariada

Es va utilitzar la regressió logística per estudiar el temps fins a arribar a una discapacitat moderada (EDSS=3) considerant les següents variables com a possibles determinants:

- sexe (p=0.458)
- edat d'inici de l'EM (p=0.426)
- nombre de brots als dos anys de l'inici del tractament (p=0.282)
- genotip ApoE2 (p=0.036)

L'alel E2 de l'ApoE fou la única variable independent capaç de predir la progressió de la discapacitat moderada al nostre grup de pacients.

V. DISCUSSIÓ GENERAL

V.1. Efecte de l'interferó beta-1b sobre la progressió de la discapacitat i marcadors clínics de resposta terapèutica

Aquest primer treball confirma la seguretat, tolerabilitat i efecte sostingut a llarg termini de l' IFN- β 1b a reduir la taxa de brots i la progressió a la discapacitat a una cohort de pacients d'EMRR, tot i l'efecte de regressió a la mitja ^{69, 70}. Els pacients van ser monitoritzats pel mateix grup de neuròlegs durant tot el seguiment i varen tenir una bona adherència al tractament, que és una mica superior a altres sèries publicades ⁷¹.

La progressió de la discapacitat es va mantenir estable (definida com a progressió de menys d'un punt a l'EDSS) a quasi el 75% dels pacients al final del seguiment. Aquest resultat és millor del que s'esperaria per les descripcions clàssiques d'història natural de l'EM ⁶, però similar a algunes revisions més recents ⁵. L'eficàcia a llarg termini de l' IFN- β 1b per retrassar la discapacitat no es va poder demostrar d'una manera clara als estudis pivotals ^{20,72}, probablement per problemes de disseny. Les bases de dades de la pràctica clínica habitual ⁷³ poden ser útils per analitzar l'eficàcia a llarg termini així com les dades de seguiment obert dels estudis pivotals ⁷⁴. Les cohorts històriques de pacients no tractats es poden utilitzar com a grups control per valorar l'efecte de regressió a la mitja ^{69, 70}. Utilitzant aquest enfoc el nostre treball demostra que l' IFN- β 1b té un efecte sostingut sobre la progressió de la discapacitat dels nostres pacients, tal com s'havia comunicat a l'estudi de seguiment de 16 anys del pivotal per Ebers GC et al ⁷⁴. Els nostres resultats, amb només un 25% dels pacients amb empitjorament de més d'un punt a l'EDSS, són una mica superiors als del pivotal, amb un percentatge de no progressió del 65% a 4 anys de seguiment ²⁰. Una possible

explicació seria que el nombre de pacients que abandonaren l' IFN- β 1b a la nostra sèrie poguessin suposar un biaix de selecció, però no pensem que aquest fet expliqui completament els nostres resultats.

Més del 20% (25/115) dels nostres pacients estaven lliures de brots al final del seguiment i el 74% havien reduït la seva taxa prèvia de brots més del 50%; aquestes dades són similars a les aportades en altres sèries publicades^{38, 71}. La reducció de la taxa anualitzada de brots de la nostra sèrie (0.7 versus 0.78 a l'estudi pivotal) també fou similar a altres treballs^{38, 71, 72, 75}. A la nostra anàlisi varem utilitzar el "temps fins el primer brot" (anàlisi de supervivència) com a objectiu primari, en lloc de la taxa anualitzada de brots, per tal d'evitar el biaix de selecció per la cohort tractada. Donat que el nombre de brots (més de tres en un any) era un dels criteris per fer canvi de tractament, amb l'abandonament corresponent dels pacients de la cohort, varem pensar que estariem excluint els pacients més actius al final del seguiment i conseqüentment magnificant l'efecte del tractament, si utilitzàvem la taxa de brots anualitzada com a "gold standard".

En referència a les variables pronòstiques de resposta a l' IFN- β 1b, l'activitat inicial de la malaltia (especialment els dos primers anys de malaltia i els dos anys previs a l'inici del tractament immunomodulador) fou el factor més relevant al nostre estudi. Aquests marcadors pronòstics són diferents dels descrits per Waubant et al³⁷ a la seva sèrie; a la nostra cohort ni l'edat d'inici ni la durada de la malaltia eren marcadors de resposta al tractament immunomodulador, mentre que al grup francès, els pacients de major edat amb més temps d'evolució de la malaltia tenien una millor resposta a l'interferó. Aquestes troballes contradiuen els resultats a llarg termini realitzats amb immunomoduladors que ens han demostrat que l'eficàcia d'aquests fàrmacs és superior a estadiatsges inicials de la malaltia^{27, 76, 77}.

Cal afegir també, que els responedors de la cohort francesa tenien una taxa de brots més alta a l'any previ de l'inici del tractament; en canvi, a la nostra cohort, l'alta activitat inflamatòria als dos anys previs a l'inici de l'IFNB fou un factor predictor de brot precoç durant el seguiment i de pitjor pronòstic. Pel que fa a la progressió de la discapacitat, només el temps entre el primer i segon brot (reflexe un cop més de l'activitat inicial de la malaltia) fou predictor de la progressió mantinguda d'un punt a l'EDSS o de la conversió a fase secundària progressiva a la nostra sèrie. Les característiques basals d'ambdós estudis són similars en quan a edat d'inici i taxa de brots abans del tractament, però difereixen lleument a la mitja de l'EDSS a l'inici del tractament immunomodulador (1.5 a la cohort francesa versus 2.5 a la nostra cohort). És difícil de dir si aquesta dada pot explicar o no les diferències observades entre els dos estudis.

V.2.1. Esclerosi Múltiple i deteriorament cognitiu

D'acord amb la literatura ^{62, 63, 67, 78} els nostres resultats mostren diferències significatives al rendiment dels tests neuropsicològics entre subjectes sans i els pacients d'esclerosi múltiple, confirmant la presència de deteriorament cognitiu inclòs en pacients amb baixa discapacitat física.

No obstant, al nostre estudi el deteriorament cognitiu no es relacionava amb marcadors clínics de progressió (mesurats com puntuació a l'EDSS o l'índex de progressió) tal com s'havia apuntat a altres sèries. Una possible explicació seria la baixa discapacitat dels nostres pacients; en aquest sentit, Amato P et al no va trobar correlació entre l'EDSS i el deteriorament cognitiu a la seva primera sèrie publicada ⁶⁷ a estadiatges inicials de la malaltia, però

quan va reanalitzar els mateixos pacients deu anys després, l'EDSS sí que fou predictor d'alteració cognitiva ⁷⁸. De totes maneres, això explicaria només en part els nostres resultats, si tenim en compte que els nostres pacients tenien una mitja de durada de la malaltia de quasi deu anys; les diferències a la discapacitat de les dues cohorts (mitjana de l'EDSS de 2.25 a la nostra sèrie versus 3.5 a la cohort italiana) o l'efecte del tractament immunomodulador sobre el deteriorament cognitiu (només el 24% dels pacients italians estaven amb tractament actiu) podrien ser altres causes alternatives de la disparitat de resultats.

En línia amb la nostra hipòtesi, Zivadinov R et al ⁷⁹ i Koutsis G et al ⁸⁰ tampoc trobaren relació entre la puntuació de l'EDSS i el dèficit cognitiu en una sèrie de pacients amb poca discapacitat.

Probablement el percentatge tan baix de deteriorament cognitiu a la nostra sèrie (18%), que només era "lleu", pogui atribuir-se a l'efecte del tractament immunomodulador.

V.2.2. L'ApoE-4 com a marcador de deteriorament cognitiu en pacients amb esclerosi Múltiple

En relació al polimorfisme de l'ApoE, i en consonància amb les troballes d'altres grups ^{65, 81-83}, no hem trobat diferències significatives entre el deteriorament cognitiu dels pacients portadors de l'alel E4 i la resta.

El grup de Savettieri G ⁶² havia publicat una correlació, poc consistent, entre aquest polimorfisme i alteracions neuropsicològiques: les diferències eren només significatives al grup dels homes, mentre que la correlació es perdia quan s'analitzava tot el grup de pacients; els autors suggerien un

possible efecte protector dels estrògens per explicar les seves troballes. Des d'aquest punt de vista Beatty WW et al ⁸³, havien realitzat prèviament una anàlisi de l'estudi neuropsicològic de 64 pacients amb EM respecte al gènere, trobant únicament diferències significatives als tests de memòria verbal i no verbal. Els autors ajustaren el seus resultats per sexe seguint la metanàlisi del grup de Herlitz A ⁸⁴, que suggeria una diferència de gènere en quan a les tasques d'aprenentatge verbal i memòria a la població sana. Al contrari, el nostre estudi no va trobar diferències respecte al sexe analitzant el grup de pacients ni el grup de controls sans, tot i que som conscients que el nostre tamany de mostra no permet fer conclusions fermes al respecte.

En concordància amb els nostres resultats, Oliveri RL et al ⁶³ i Parmenter BA et al ⁸⁵ tampoc no trobaren relació entre el deteriorament cognitiu i el sexe o l'ApoE4 (la proporció de portadors de l'alel E4 era baix, inferior al 20%, a l'igual que la nostra sèrie). Desafortunadament, cap d'aquestes sèries (inclosa la nostra) no disposava de dades de càrrega lesional per RM, que ha mostrat una correlació més clara amb l'alel E4 de l'ApoE ⁶¹.

Recentment, Portaccio E i el seu grup ⁸⁶, han publicat un treball sobre aquest tema; tot i que tampoc varen trobar relació entre les mesures de deteriorament cognitiu i el marcador genètic, demostraren una associació clara entre el grau de lesió cortical i les tasques d'aprenentatge verbal i el grau de lesió subcortical amb una pitjor realització dels tests d'atenció i concentració en pacients amb EM. Una conclusió similar s'ha trobat a l'estudi COGIMUS ⁸⁷ que va demostrar que el volum lesional a T2 era un factor predictor de deteriorament cognitiu en pacients no tractats.

A la nostra cohort tampoc hem trobat relació amb la durada del tractament immunomodulador i el grau d'afectació cognitiva, en contrast amb els resultats de Fletcher S et al ⁸⁸ i de Kappos et al ⁸⁹ a l'estudi BENEFIT.

Estudis longitudinals amb llarg seguiment clínic i radiològic són encara necessaris per confirmar l'efecte de l'interferó-beta sobre el deteriorament cognitiu en pacients amb EM.

V.3.1. La ApoE-4 com a marcador de resposta al tractament amb IFN-β1b en pacients amb esclerosi múltiple

A la nostra sèrie de pacients amb EM tractats amb IFN-β1b, l'alel E4 de l'ApoE no es va relacionar amb els marcadors clínics habituals de resposta al tractament: índex de progressió, taxa de brots, temps fins l'empitjorament d'un punt a l'EDSS o fins a una discapacitat moderada (definida com a EDSS=3), o abandonament o canvi de tractament degut a ineficàcia. Tot i que el temps fins al primer brot després de l'inici de l' IFN-β1b dels pacients portadors de l'alel E4 va ser significativament superior als pacients no portadors (suggerint un efecte protector), altres mesures com la taxa anualitzada de brots o el nombre d'abandonaments del tractament per ineficàcia no confirmaren aquest efecte.

Aquests resultats són similars als del grup de Lanzillo R et al ⁶⁵, al seu estudi amb una població de pacients d'EM tractada amb IFN-β1b amb un EDSS (mitja=2) i percentatge de portadors de l'alel E4 (14%) similar al nostre grup; els autors no van trobar associació entre l'alel i el deteriorament cognitiu o variables clíniques de resposta. No obstant, les nostres troballes difereixen de les publicades pel grup d'Enzinger C et al ⁵⁹; van estudiar una sèrie de 44 pacients durant dos anys, trobant que la taxa de brots dels pacients amb l'alel E4 era el doble que la dels no portadors (4.1 versus 1.7; p=0.02) i una major tendència a canvi de tractament immunomodulador al grup E4 (44% versus 17%; p=0.17).

La majoria de treballs publicats sobre el gen ApoE són transversals o retrospectius. Només tres grups ^{56, 59, 65}, han realitzat estudis prospectius, tot i que el seguiment més llarg fou de dos anys. L'ampli seguiment del nostre estudi (7.44 ± 2.98 anys) reforça els nostres resultats sobre els factors

pronòstics, especialment pel que fa a l'índex de progressió i el temps per arribar a una discapacitat moderada; no obstant, persisteix la limitació de l'absència de dades radiològiques durant el seguiment.

Tot i que no consideren la resposta al tractament, dos estudis retrospectius realitzats per grups espanyols^{50, 51}, amb una proporció de pacients E4 similar a la nostra (17-20%) tampoc trobaren associació entre aquest marcador genètic i els marcadors clínics pronòstics, tals com l'índex de progressió o el temps fins a una discapacitat moderada (EDSS=3) o severa (EDSS=6). De fet, Sedano MJ et al⁵¹ puntualitzava a la seva publicació que la majoria d'estudis que han trobat relació entre l'alel E4 i les formes clíniques més agressives de l'EM s'havien portat a terme al nord d'Europa^{48, 56-59}, mentre que els estudis negatius s'havien realitzat al sud d'Europa^{50,51,53,90}. Factors ambientals com la dieta podrien modificar el gen de l'ApoE i explicar aquestes diferències, tal com s'ha proposat a múltiples publicacions sobre la resposta al tractament amb estatines⁹¹.

Una altra possible explicació a la disparitat de resultats sobre l'efecte del gen ApoE a l'EM és que els estudis que han demostrat correlació positiva tenen una proporció de l'alel E4 a la població (20-45%) superior als que no han pogut demostrar-la (15-20%).

Després d'una metanàlisi de 24 estudis, Burwick RM et al⁹² conclouïa que no hi ha relació entre l'alel E4 i la susceptibilitat, severitat i forma clínica de l'EM. Nosaltres podríem afegir que tampoc sembla que es relacioni amb la resposta clínica al tractament amb IFN-β1b d'aquests pacients.

V.3.2. L' ApoE-2 com a marcador de resposta al tractament amb IFN-B1b en pacients amb esclerosi múltiple

A diferència de l'alel E4, l'alel E2 sí es va associar a la resposta a l' IFN-B1b a la nostra cohort. Els pacients portadors d'aquest alel d'ambdós sexes tenien una menor probabilitat de tenir una discapacitat moderada (mesurada com a EDSS=3) que els no portadors. No obstant, l'alel E2 no es va associar a una menor probabilitat de desenvolupar la fase secundària progressiva (tenint en compte que només el 13.7% dels nostres pacients van assolir aquest ítem). Aquests resultats es confirmaren a l'anàlisi multivariada: l'alel E2 fou l'únic marcador associat amb una progressió més lenta a la discapacitat moderada, independentment d'altres variables com el sexe, edat d'inici de l'EM o nombre de brots als dos anys abans de l'inici de l' IFN-B1b.

Paral·lelament a aquests resultats, l'any 2002 Schmidt S et al ⁴⁸ suggeria al seu treball que l'alel E2 podia tenir un efecte protector contra les formes severes o més agressives d'EM, després de trobar una menor probabilitat de desenvolupar una discapacitat moderada deu anys després de l'inici de la malaltia (OR=2.10).

És difícil determinar si la progressió més lenta de la discapacitat dels nostres pacients és deguda únicament a l'efecte de l'alel E2 o si la presència d'aquest alel pot influir a la resposta immunomoduladora del mateix interferó.

Des del nostre punt de vista, aquests resultats podrien obrir una nova línia de recerca en el paper de l'alel E2 a la resposta del tractament immunomodulador per tal de determinar si és capaç de conferir una millor resposta terapèutica als interferons, que continuen sent la teràpia de primera línia de l'esclerosi múltiple a l'actualitat.

VI. CONCLUSIONS

C1.

C1a. L'interferó-beta1b (IFN- β 1b) és capaç de reduir la progressió a la discapacitat a la nostra cohort de pacients d'EMRR durant una mitja de seguiment de quasi cinc anys

C1b. L'activitat inflamatòria inicial de la malaltia (mesurada com el nombre de brots els primers dos anys) fou predictora d'un brot precoç després d'iniciar el tractament immunomodulador

C1c. El temps entre el primer i el segon brot de l'EM es relaciona amb la progressió precoç de la discapacitat i amb la conversió a la forma secundària progressiva de la malaltia.

C1d. L'activitat inflamatòria a l'inici del tractament immunomodulador (mesurada com a presència d'un brot als primers dotze mesos) fou predictor d'una progressió precoç de la discapacitat.

C2.

C2a. Els pacients d'EM amb baix nivell de discapacitat, presenten pitjors puntuacions de memòria verbal, capacitat d'aprenentatge i velocitat de processament de la informació respecte als controls sans

C2b. No hi ha diferències significatives als tests de depressió (BDI) entre els pacients d'EM amb discapacitat moderada i els controls sans

C2c. No hi ha correlació entre el deteriorament cognitiu i els marcadors de progressió clínica ni el temps d'exposició al tractament immunomodulador a la nostra cohort de pacients d'EM

C2d. El nivell educatiu previ és l'únic factor predictor de deteriorament cognitiu

C2e. El baix percentatge de deteriorament cognitiu (només lleu) de la nostra sèrie de pacients amb EM (18%) podria atribuir-se a l'efecte del tractament immunomodulador.

C2f. El deteriorament cognitiu dels nostres pacients d'EM no es relaciona amb la presència de l'alel E4

C3.

C3a. L'alel E4 de l'ApoE no es relaciona amb les variables de resposta al tractament immunomodulador a la nostra sèrie

C3b. L'alel E2 de l'ApoE confereix un efecte protector vers la progressió a una discapacitat moderada (EDSS=3) sota tractament amb IFN- β 1b

VII. BENEFICIS DE LA INVESTIGACIÓ, APLICABILITAT I VALIDESA

El primer treball publicat ha contribuït a la confirmació de la capacitat dels tractaments immunomoduladors en retrassar la discapacitat que produeix l'EM a llarg plaç i recolza la utilitat dels estudis observacionals per valorar teràpies que ja existeixen al mercat però que pels estudis pivotals fase III, només disposem de resultats a un període restringit de temps a 2-3 anys.

Els dos treballs següents, confirmen la majoria d'articles de la literatura que defensen el possible paper de l'APOE4 com a marcador de susceptibilitat però "no" de valor pronòstic als pacients amb EM. Per altra banda, les troballes d'un possible efecte protector de l'APOE2 sobre la progressió de la malaltia, recolzaria articles recents i podria ser d'utilitat (si es confirma per altres estudis) per la presa de decisions dels neuròlegs que tractem pacients amb EM davant un pacient amb resposta subòptima a les teràpies de primera línia i la possibilitat d'iniciar fàrmacs de segona línia que tenen un perfil de seguretat inferior.

VIII. BIBLIOGRAFIA

1. Handbook of Multiple Sclerosis: Third Edition. Stuart D. Cook. Marcel Dekker, Inc. New York.Basel, 2001.
2. Ebers GC, Sadovnick AD. Epidemiology. In: Paty DW, Ebers GC, eds. Multiple sclerosis. Philadelphia: FA Davis, 1997: 5-28.
3. Fernández O, Bello P. Cuadernos de Esclerosis Múltiple. Alcantara Publicidad S.L. Madrid, 2004.
4. Ares B, Prieto JM, Lema M, Dapena D, Arias M, Noya M. Prevalence of multiple sclerosis in Santiago de Compostela (Galicia, Spain). *Mult Scler* 2007; 13 (2):262-4.
5. Pittock SJ, Mayr WT, McClelland RL, Jorgensen NW, Weigand SD, Noseworthy JH, Weinshenker BG, Rodriguez M. Change in MS-related disability in a population-based cohort: a 10-year follow-up study. *Neurology* 2004;62:51-59.
6. Weinshenker BG. The natural history of multiple sclerosis: update 1998. *Semin Neurol* 1998; 18(3):301-7.
7. Kurtzke JF. Rating neurologic impairment in multiple sclerosis: an expanded disability status scale (EDSS). *Neurology* 1983; 33(11):1444-52.
8. Confavreux C, Vukusic S, Adeleine P. Early clinical predictors and progression of irreversible disability in multiple sclerosis: an amnesic process. *Brain* 2003; 126:770-82.
9. Poser CM, Paty DW, Scheinberg L et al. New diagnostic criteria for multiple sclerosis: guidelines for research protocols. *Annals of Neurology* 1983;13:227-231.
10. McDonald WI, Compston A, Edan G, Goodkin D, Hartung HP, Lublin FD, McFarland HF, Paty DW, Polman CH, Reingold SC, Sandberg-Wollheim M, Sibley W, Thompson A, van den Noort S, Weinshenker BY, Wolinsky JS. Recommended diagnostic criteria for multiple sclerosis: guidelines from the International Panel on diagnosis of multiple sclerosis. *Ann Neurol* 2001; 50 (1): 121-7.

11. Montalban X, Tintoré M, Swanton J, Barkhof F, Fazekas F, Filippi M, Frederiksen J, Kappos L, Palace J, Polman C, Rovaris M, de Stefano N, Thompson A, Yousry T, Rovira A, Miller DH. MRI criteria for MS in patients with clinically isolated syndromes. *Neurology* 2010; 74(5):427-34.
12. Kieseier BC, Hemmer B, Hartung HP. Multiple sclerosis--novel insights and new therapeutic strategies. *Curr Opin Neurol* 2005; 18(3):211-20.
13. Sospedra M, Martin R. Immunology of multiple sclerosis. *Annu Rev Immunol* 2005; 23:683-747.
14. Ferguson B, Matyszak MK, Esiri MM, Perry VH. Axonal damage in acute multiple sclerosis lesions. *Brain* 1997; 120:393-9.
15. Trapp BD, Peterson J, Ransohoff RM, Rudick R, Mork S, Bo L. Axonal transection in the lesions of multiple sclerosis. *N Engl J Med* 1998 29; 338(5):278-85.
16. Pette M, Fujita K, Kitze B, Whitaker JN, Albert E, Kappos L, Wekerle H. Myelin basic protein-specific T lymphocyte lines from MS patients and healthy individuals. *Neurology* 1990; 40(11):1770-6.
17. Sendtner M, Holtmann B, Kolbeck R, Thoenen H, Barde YA. Brain-derived neurotrophic factor prevents the death of motoneurons in newborn rats after nerve section. *Nature* 1992; 360(6406):757-9.
18. Binder DK, Scharfman HE. Brain-derived neurotrophic factor. *Growth Factors* 2004; 22(3):123-31.
19. Pezet S, Malcangio M. Brain-derived neurotrophic factor as a drug target for CNS disorders. *Expert Opin Ther Targets* 2004; 8(5):391-9.
20. The IFNB Multiple Sclerosis Study Group. *Neurology*. Interferon beta-1b is effective in relapsing-remitting multiple sclerosis. I. Clinical results of a multicenter, randomized, double-blind, placebo-controlled trial. *Neurology* 1993; 43(4):655-61.

21. Jacobs LD, Cookfair DL, Rudick RA, Herndon RM, Richert JR, Salazar AM, Fischer JS, Goodkin DE, Granger CV, Simon JH, Alam JJ, Bartoszak DM, Bourdette DN, Braiman J, Brownscheidle CM, Coats ME, Cohan SL, Dougherty DS, Kinkel RP, Mass MK, Munschauer FE 3rd, Priore RL, Pullicino PM, Scherokman BJ, Whitham RH, et al. Intramuscular interferon beta-1a for disease progression in relapsing multiple sclerosis. The Multiple Sclerosis Collaborative Research Group (MSCRG). *Ann Neurol* 1996;39(3):285-94.
22. PRISMS (Prevention of Relapses and Disability by Interferon beta-1a Subcutaneously in Multiple Sclerosis) Study Group. Randomised double-blind placebo-controlled study of interferon beta-1a in relapsing/remitting multiple sclerosis. *Lancet* 1998; 352(9139):1498-504.
23. Placebo-controlled multicentre randomised trial of interferon beta-1b in treatment of secondary progressive multiple sclerosis. European Study Group on interferon beta-1b in secondary progressive MS. *Lancet* 1998; 352 (9139):1491-7.15.
24. Secondary Progressive Efficacy Clinical Trial of Recombinant Interferon-beta-1a in MS (SPECTRIMS) Study Group. Randomized controlled trial of interferon- beta-1a in secondary progressive MS: Clinical results. *Neurology* 2001; 56(11):1496-504.
25. Comi G, Filippi M, Barkhof F, Durelli L, Edan G, Fernández O, Hartung H, Seeltrayers P, Sørensen PS, Rovaris M, Martinelli V, Hommes OR. Early Treatment of Multiple Sclerosis Study Group. Effect of early interferon treatment on conversion to definite multiple sclerosis: a randomised study. *Lancet* 2001; 357 (9268):1576-82.

26. CHAMPS Study Group. Interferon beta-1a for optic neuritis patients at high risk for multiple sclerosis. *Am J Ophthalmol* 2001; 132 (4):463-71.
27. Kappos L, Polman CH, Freedman MS, Edan G, Hartung HP, Miller DH, Montalban X, Barkhof F, Bauer L, Jakobs P, Pohl C, Sandbrink R. Treatment with interferon beta-1b delays conversion to clinically definite and McDonald MS in patients with clinically isolated syndromes. *Neurology* 2006; 67(7):1242-9.
28. Johnson KP, Brooks BR, Cohen JA, Ford CC, Goldstein J, Lisak RP, Myers LW, Panitch HS, Rose JW, Schiffer RB. Copolymer 1 reduces relapse rate and improves disability in relapsing-remitting multiple sclerosis: results of a phase III multicenter, double-blind placebo-controlled trial. The Copolymer 1 Multiple Sclerosis Study Group. *Neurology* 1995; 45(7):1268-76.
29. Bornstein MB, Miller A, Slagle S, Weitzman M, Drexler E, Keilson M, Spada V, Weiss W, Appel S, Rolak L, et al. A placebo-controlled, double-blind, randomized, two-center, pilot trial of Cop 1 in chronic progressive multiple sclerosis. *Neurology* 1991;41(4):533-9.
30. Comi G, Martinelli V, Rodegher M, Moiola L, Bainerau O, Carra A, Elovaara I, Fazekas F, Hartung HP, Hillert J, King J, Komoly S, Lubetzki C, Montalban X, Myhr KM, Raynborg M, Rieckmann P, Wynn D, Young C, Filippi M; PreCISe study group. Effect of glatiramer acetate on conversion to clinically definite multiple sclerosis in patients with clinically isolated syndrome (PreCISe study): a randomised, double blind, placebo-controlled trial. *Lancet* 2009; 374 (970):1503-11.
31. Palace J, Rothwell P. New treatments and azathioprine in multiple sclerosis. *Lancet* 1997; 350(9073):261.

32. Ellison GW, Myers LW, Mickey MR, Graves MC, Tourtellotte WW, Syndulko K, Holevoet-Howson MI, Lerner CD, Frane MV, Pettler-Jennings P. A placebo-controlled, randomized, double-masked, variable dosage, clinical trial of azathioprine with and without methylprednisolone in multiple sclerosis. *Neurology* 1989; 39(8):1018-26.
33. Polman CH, O'Connor PW, Havrdova E, Hutchinson M, Kappos L, Miller DH et al. A randomized, placebo-controlled trial of natalizumab for relapsing multiple sclerosis. *N Engl J Med* 2006; 354: 899-910
34. Hutchinson M, Kappos L, Calabresi PA, Confavreux C, Giovannoni G, Galetta SL, Havrdova E, Lublin FD, Miller DH, O'Connor PW, Phillips JT, Polman CH, Radue EW, Rudick RA, Stuart WH, Waigt A, Weinstock-Guttman B, Wynn DR, Lynn F, Panzara MA. The efficacy of natalizumab in patients with relapsing multiple sclerosis: subgroup analyses of AFFIRM and SENTINEL. *J Neurol* 2009 Mar; 256(3):405-15.
35. Hartung HP, Gonsette R, Konig N, Kwiecinski H, Guseo A, Morrissey SP, Krapf H, Zwingers T; Mitoxantrone in Multiple Sclerosis Study Group (MIMS). Mitoxantrone in progressive multiple sclerosis: a placebo-controlled, double-blind, randomised, multicentre trial. *Lancet* 2002; 360 (9350):2018-25.
36. Martinelli BF, Rovaris M, Capra R, Comi G, Martinelli Boneschi F. Mitoxantrone for multiple sclerosis. *Cochrane Database Syst Rev* 2005;(4):CD002127.
37. Waubant E, Vukusic S, Gignoux L, Dubief FD, Achiti I, Blanc S, Renoux C, Confavreux C. Clinical characteristics of responders to interferon therapy for relapsing MS. *Neurology* 2003; 61:184-189.

38. Paolillo A, Pozzilli C, Giugni E, Tomassini V, Gasperini C, Fiorelli M, Mainero C, Horsfield M, Galgani S, Bastianello S, Buttinelli C. A 6-year clinical and MRI follow-up study of patients with relapsing-remitting multiple sclerosis treated with interferon-beta. *Eur J Neurol* 2002; 9:645-655.
39. Río J, Castelló J, Rovira A, Tintoré M, Sastre-Garriga J, Horga A, Nos C, Comabella M, Aymerich X, Montalban X. Measures in the first year of therapy predict the response to interferon beta in MS. *Mult Scler* 2009; 15 (7): 848-53.
40. Tomassini V, Paolillo A, Russo P, Giugni E, Prosperini L, Gasperini C, Antonelli G, Bastianello S, Pozzili C. Predictors of long-term clinical response to interferon beta therapy in relapsing multiple sclerosis. *J Neurol* 2006; 253 (3): 287-93
41. Bosca I, Villar LM, Coret F, Magraner MJ, Simó-Castelló M, Alvarez-Cermeño JC, Casanova B. Response to interferon in multiple sclerosis is related to lipid-specific oligoclonal IgM bands. *Mult Scler* 2010; 16 (7): 810-5.
42. Martínez-Yelamos A, Saiz A, Sanchez-Valle R, Casado V, Ramón JM, Graus F, Arbizu T. 14-3-3 protein in the CSF as prognostic marker in early multiple sclerosis. *Neurology* 2001; 57(4):722-4.
43. Martínez-Yelamos A, Saiz A, Bas J, Hernandez JJ, Graus F, Arbizu T. Tau protein in cerebrospinal fluid: a possible marker of poor outcome in patients with early relapsing-remitting multiple sclerosis. *Neurosci Lett* 2004; 363(1):14-7.
44. Carlin C, Murray L, Graham D, Doyle D, Nicoll J. Involvement of Apolipoprotein E in multiple sclerosis: Absence of remyelination associated with possession of the APOE 2 allele. *J Neuropathol Exp Neurol* 2000; 59 (5):361-367.

45. Saunders AM, Strittmatter WJ, Schmechel D, George-Hyslop PH, Pericak-Vance MA, Joo SH, Rosi BL, Gusella JF, Crapper-MacLachlan DR, Alberts MJ et al. Association of apolipoprotein E allele epsilon 4 with late-onset familial and sporadic Alzheimer's disease. *Neurology* 1993; 43: 1467-1472.
46. Dik MG, Jonker C, Comijs HC, Bouter LM, Twisk JW, van Kamp GJ, Deeg DJ. Memory complaints and APOE-epsilon 4 accelerate cognitive decline in cognitively normal elderly. *Neurol* 2001; 57: 2217-22.
47. Liberman JN, Stewart WF, Wesnes K, Troncoso J. Apolipoprotein Eepsilon 4 and short-term recovery from predominantly mild brain injury. *Neurology* 2002; 58:1038-44.
48. Schmidt S, Barcellos L, DeSombre K, Rimmler J.B, Lincoln R, Bucher P, Saunders AM, Lai E, Martin ER, Vance JM, Oksenberg JR, Hauser SL, Pericak-Vance MA, Haines JL; Multiple Sclerosis Genetics Group. Association of polymorphisms in the Apolipoprotein E region with susceptibility to and progression of multiple sclerosis. *AmJ. Hum Genet* 2002; 70: 708-717.
49. Weatherby SJ, Mann CL, Davies MB, Carthy D, Fryer AA, Boggild MD, Young C, Strange RC, Ollier W, Hawkins CP. Polymorphisms of Apolipoprotein E: outcome and susceptibility in multiple sclerosis. *Mult Scler* 2000; 6: 32-36.
50. Guerrero AL, Laherrán E, Gutiérrez F, Martín-Polo J, Iglesias F, Alcázar C, Peralta J, Rostami P. Apolipoprotein E genotype does not associate with disease severity measured by Multiple Sclerosis Severity Score. *Acta Neurol Scand* 2008; 117: 21-25.
51. Sedano MJ, Calmarza P, Perez L, Trejo JM. No association of apolipoprotein E epsilon 4 genotype with faster progression or less recovery of relapses in Spanish cohort of multiple sclerosis. *Mult Scler* 2006; 12:13-18.

52. Pinholt M, Frederiksen JL, Andersen PS, Christiansen M. APO E in multiple sclerosis and optic neuritis: the Apo E- ϵ 4 allele is associated with progression in multiple sclerosis. *Mult Scler* 2005; 11: 511-515.
53. Savettieri G, Andreoli V, Bonavita S, Cittadella R, Caltagirone C, Fazio MC, Girlanda P, Le Pira F, Liguori M, Logroscino G, Lugaresi A, Nocentini U, Reggio A, Salemi G, Serra P, Tedeschi G, Toma L, Trojano M, Valentino P, Quattrone A. Apolipoprotein E genotype does not influence the progression of multiple sclerosis. *J Neurol* 2003; 250: 1094-1098.
54. Kantarci OH, Hebrink DD, Achenbach SJ, Pittock SJ, Altintas A, Schaefer-Klein JL, Atkinson EJ, De Andrade M, McMurray CT, Rodriguez M, Weinshenker BG. Association of APOE polymorphisms with disease severity in MS is limited to women. *Neurology* 2004; 62:811-814.
55. Masterman T, Zhang Z, Hellgren D, Salter H, Anvret M, Lilius L, Lannfelt L, Hillert J. APOE genotypes and disease severity in multiple sclerosis. *Mult Scler* 2002; 8: 98-103
56. Chapman J, Vinokurov S, Achiron A, Karussis DM, Mitosek-Szewczyk K, Birnbaum M, Michaelson DM, Korczyn AD. APOE genotype is a major predictor of long-term progression of disability in MS. *Neurology* 2001; 56:312-316.
57. Fazekas F, Strasser-Fuchs S, Kollegger H, Berger T, Kristoferitsch W, Schmidt H, Enzinger C, Schiefermeier M, Schwarz C, Kornek B, Reindl M, Huber K, Grass R, Wimmer G, Vass K, Pfeiffer KH, Hartung HP, Schmidt R. Apolipoprotein E- ϵ 4 is associated with rapid progression of multiple sclerosis. *Neurology* 2001; 57:853-857.
58. Enzinger C, Ropele S, Smith S, Strasser-Fuchs S, Poltrum B, Schmidt H, Matthews PM, Fazekas F. Accelerated evolution of brain atrophy and “black holes” in MS patients with Apo E- ϵ 4. *Ann Neurol* 2004; 55: 563-569.

59. Enzinger C, Ropele S, Strasser-Fuchs S, Kapeller P, Schmidt H, Poltrum B, Schmidt R, Hartung HP, Fazekas F. Lower levels of N-Acetylaspartate in multiple sclerosis patients with the Apolipoprotein E- ϵ 4 allele. *Arch Neurol* 2003; 60:65-70.
60. Schreiber K, Otura AB, Ryder LP, Madsen HO, Jørgensen OS, Svejgaard A, Sorensen PS. Disease severity in Danish multiple sclerosis patients evaluated by MRI and three genetic markers (HLA-DRBI, CCR5 deletion mutation, apolipoprotein E). *Mult Scler* 2002; 8:295-298.
61. De Stefano N, Bartolozzi ML, Nacmias B, Zipoli V, Mortilla M, Guidi L, Siracusa G, Sorbi S, Federico A, Amato MP. Influence of Apolipoprotein E 4 Genotype on Brain Tissue Integrity in Relapsing-Remitting Multiple Sclerosis. *Arch Neurol* 2004; 61:536-540.
62. Savettieri G, Messina D, Andreoli V, Bonavita S, Caltagirone C, Cittadella R, Farina D, Fazio MC, Girlanda P, Le Pira F, Liguori M, Lugaresi A, Nocentini U, Reggio A, Salemi G, Tedeschi G, Trojano M, Valentino P, Quattrone A. Gender-related effect of clinical and genetic variables on the cognitive impairment in multiple sclerosis. *J Neurol* 2004; 251: 1208-1214.
63. Oliveri RL, Cittadella R, Sibilgia G, Manna I, Valentino P, Gambardella A, Aguglia U, Zappia M, Romeo N, Andreoli V, Bono F, Caracciolo M, Quattrone A. APOE and risk of cognitive impairment in multiple sclerosis. *Acta Neurol Scand* 1999; 100: 290-295.
64. Ballerini C, Campani D, Rombolà G, Gran B, Nacmias B, Amato MP, Siracusa G, Bartolozzi L, Sorbi S, Massacesi L. Association of apolipoprotein E polymorphism to clinical heterogeneity of multiple sclerosis. *Neurosci Lett* 2000; 296 (2-3): 174-6.

65. Lanzillo R, Prinster A, Scarano V, Liuzzi R, Coppola G, Florio C, Salvatore E, Schiavone V, Brunetti A, Muto M, Orefice G, Alfano B, Bonavita V, Brescia Morra V. Neuropsychological assessment, quantitative MRI and ApoE gene polymorphisms in a series of MS patients treated with IFN beta-1b. *J Neurol Sci.* 2006; 15; 245(1-2): 141-5.
66. Confavreux C, Compston DA, Hommes OR, McDonald WI, Thompson AJ. EDMUS, a European database for multiple sclerosis. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 1992; 55:671-676.
67. Amato MP, Ponziani G, Pracucci G, Bracco L, Siracusa G, Amaducci L. Cognitive impairment in early onset multiple sclerosis. Pattern, predictors, and impact on everyday life in a 4-year follow-up. *Arch Neurol* 1995; 52 (2):168-72.
68. Carmona O, Gubieras L, Romero-Pinel L, Alonso-Magdalena L, Moral E, Casado V, Arbizu T. Interferon-beta and autoimmune hepatitis in multiple sclerosis: cause-effect or association. *Neurología* 2008; 23 (7): 468-9
69. Martínez-Yélamos S, Martínez-Yélamos S, Martínez-Yélamos A, Martín Ozaeta G, Casado V, Carmona O, Arbizu Tx. Regression to the mean in multiple sclerosis. *Mult Scler* 2006; 12:826-829.
70. Goodkin DE. Interferon beta therapy for multiple sclerosis. *Lancet* 1998; 352:1486-1487.
71. Milanese C, La Mantia L, Palumbo R, Martinelli V, Murialdo A, Zaffaroni M, Caputo D, Capra R, Bergamaschi R. A post-marketing study on interferon beta 1b and 1a treatment in relapsing-remitting multiple sclerosis: different response in drop-outs and treated patients. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 2003; 74:1689-1692.

72. The IFNB Multiple Sclerosis Study Group and The University of British Columbia MS/MRI Analysis Group. Interferon beta-1b in the treatment of multiple sclerosis: final outcome of the randomized controlled trial. *Neurology* 1995; 45:1277-1285.
73. Weinshenker BG. Databases in MS research: pitfalls and promises. *Mult Scler* 1999; 5:206-211.
74. Ebers GC, Reder AT, Traboulsee A, Li D, Langdon D, Goodin DS, Wolf C, Beckmann K, Konieczny A; Investigators of the 16-Year Long-Term Follow-Up Study. Long-term follow-up of the original interferon-beta1b trial in multiple sclerosis: design and lessons from a 16-year observational study. *Clin Ther* 2009; 31(8):1724-36.
75. Dubois BD, Keenan E, Porter BE, Kapoor R, Rudge P, Thompson AJ, Miller DH, Giovannoni G. Interferon beta in multiple sclerosis: experience in a British specialist multiple sclerosis centre. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 2003; 74:946-949.
76. PRISMS Study Group and the University of British Columbia MS/MRI Analysis Group: PRISMS-4: long-term efficacy of interferon-beta-1a in relapsing MS. *Neurology* 2001; 56:1628-1636.
77. Polman C, Kappos L, Freedman MS, Edan G, Hartung HP, Miller DH, Montalbán X, Barkhof F, Selmaj K, Uitdehaag BM, Dahms S, Bauer L, Pohl C, Sandbrink R; for the BENEFIT Investigators; Subgroups of the BENEFIT Study: Risk of developing MS and treatment effect of interferon-beta-1b. *J Neurol* 2008; 255: 480-487.
78. Amato MP, Ponziani G, Siracusa G, Sorbi S. Cognitive dysfunction in early-onset multiple sclerosis: a reappraisal after 10 years. *Arch Neurol* 2001; 58 (10):1602-6.

79. Zivadinov R, Sepcic J, Nasuelli D, De Massi R, Bragadin LM, Tommasi MA, Zambito-Marsala S, Moretti R, Bratina A, Ukmar M, Pozzi-Mucelli RS, Grop A, Cazzato G, Zorzon M. A longitudinal study of brain atrophy and cognitive disturbances in the early phase of relapsing-remitting multiple sclerosis. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 2001; 70 (6):773-780.
80. Koutsis G, Panas M, Giogkaraki E, Potagas C, Karadima G, Sfagos C, Vassilopoulos D. APOE epsilon4 is associated with impaired verbal learning in patients with MS. *Neurology* 2007; 68 (8): 546-549.
81. Rubinsztein DC, Hanlon CS, Irving RM, Goodburn S, Evans DG, Kellar-Wood H, Xuereb JH, Bandmann O, Harding AE. ApoE genotypes in multiple sclerosis, Parkinson's disease, schwannomas and late-onset Alzheimer's disease. *Mol Cell Probes* 1994; 8 (6): 519-25.
82. Gervais A, Gaillard O, Plassart E, Reboul J, Fontaine B, Schuller E. Apolipoprotein E polymorphism in multiple sclerosis. *Ann Clin Biochem* 1998; 35 (1):135-6.
83. Beatty WW, Goodkin DE, Herstgaard D, Monson N. Clinical and demographic predictors of cognitive performance in multiple sclerosis: do diagnostic type, disease duration and disability matter?. *Arch Neurol* 1990; 47 (3): 305-8.
84. Herlitz A, Yonyer JE. Sex differences in episodic memory: the influence of intelligence. *J Clin Exp Neuropsychol* 2002; 24 (1): 107-14.
85. Parmenter BA, Denney R, Lynch SG, Middleton LS, Harlana LM. Cognitive impairment in patients with multiple sclerosis: association with the APOE gene and promoter polymorphisms. *Mult Scler* 2007; 13 (1): 25-32.
86. Portaccio E, Goretti B, Zipoli V, Nacmias B, Stromillo ML, Bartolozzi ML, Siracusa G, Guidi L, Federico A, Sorbi S, De Stefano N, Amato MP. APOE-e4 is not associated with cognitive impairment in relapsing-remitting multiple sclerosis. *Mult Scler* 2009; 15 (12) 1489-1494.

87. Patti F, Amato MP, Trojano M, Bastianello S, Tola MR, Goretti B, Caniatti L, Di Monte E, Ferrazza P, Brescia Morra V, Lo Fermo S, Picconi O, Luccichenti G; COGIMUS Study Group. Cognitive impairment and its relation with disease measures in mildly disabled patients with relapsing-remitting multiple sclerosis: baseline results from the Cognitive Impairment in Multiple Sclerosis (COGIMUS) study. *Mult Scler* 2009; 15: 779-788.
88. Fletcher S, Vardi J, Finkelstein Y, Pollak L. Cognitive dysfunction evaluation in multiple sclerosis patients treated with interferon beta-1b: an open-label prospective 1 year study. *Isr Med Assoc J.* 2007; 9 (6): 457-9.
89. Kappos L, Freedman MS, Polman CH, Edan G, Hartung HP, Miller DH, Montalbán X, Barkhof F, Radü EW, Metzigg C, Bauer L, Lanius V, Sandbrink R, Pohl C; BENEFIT Study Group Long-term effect of early treatment with interferon beta-1b after a first clinical event suggestive of multiple sclerosis: a 5-year active treatment extension of the phase 3 BENEFIT trial. *Lancet Neurol* 2009; 8 (11): 987-97.
90. Guerrero AL, Bueno V, Hernandez MT, Martin-Serradilla JI, Carrasco E, Cuadrado I. Apolipoprotein e polymorphism as a predictor of progression of multiple sclerosis. [in Spanish] *Neurología* 2003; 18 (3):146-148.
91. Zintzaras E, Kitisios GD, Triposkiadis F, Lau J, Raman G. APOE gene polymorphisms and response to statin therapy. *The Pharmacogenomics Jour* 2009; 9: 248-257.

92. Burwick RM, Ramsay PP, Haines JL, Hauser SL, Oksenberg JR, Pericak-Vance MA, Schmidt S, Compston A, Sawcer S, Cittadella R, Savettieri G, Quattrone A, Polman CH, Uitdehaag BM, Zwemmer JN, Hawkins CP, Ollier WE, Weatherby S, Enzinger C, Fazekas F, Schmidt H, Schmidt R, Hillert J, Masterman T, Hogg P, Niino M, Kikuchi S, Maciel P, Santos M, Rio ME, Kwiecinski H, Zakrzewska-Pniewska B, Evangelou N, Palace J, Barcellos LF. APOE epsilon variation in multiple sclerosis susceptibility and disease severity. *Neurology* 2006; 66:1373-1383.

X. ANNEX I

Hoja de información al Paciente I

Título del proyecto: ESTUDIO GENÉTICO DE LA APOE y SUS ALELOS COMO MARCADOR DE PROGRESIÓN Y/O DE RESPUESTA AL TRATAMIENTO CON INTERFERON BETA EN SANGRE DE PACIENTES CON ESCLEROSIS MÚLTIPLE (EM).

Código: N° 62/01

Antecedentes y propósito

Actualmente se están iniciando amplias investigaciones sobre los genes causantes de la EM, y sobre la eficacia de ciertos medicamentos en función de las variaciones genéticas. De la misma manera se están investigando factores bioquímicos de la sangre, orina, y de líquido cefalorraquídeo (LCR), que de ahora en adelante llamaremos "*muestras biológicas*", que pueden ser marcadores diagnósticos y también marcadores pronósticos de la evolución de la enfermedad y de la respuesta a determinados medicamentos.

Entre estas investigaciones diversos autores (Chapman et al, 2001) han implicado la variante alélica E4 del gen de la APOE como posible marcador de progresión de discapacidad en pacientes con EM y de una mayor rapidez en alcanzar una discapacidad moderada (EDSS 3) o severa (EDSS 6) durante su evolución clínica.

La Unidad de EM del Hospital Universitario de Bellvitge, planea estudiar los genes que podrían estar involucrados en la E.M., así como los factores bioquímicos implicados en la evolución y en la respuesta farmacológica. Entre ellos se va a estudiar el gen APOE (con sus variantes alélicas E2, E3 y E4) como marcador de progresión de la enfermedad y/o marcador de buena o mala respuesta al tratamiento con Interferón beta. Por ello, dado que usted padece esta enfermedad, se le pide que participe en este estudio y que autorice el uso de una muestra de su sangre para su estudio.

El objetivo de este estudio es recoger una muestra de sangre para una o más de las siguientes actividades:

1. Identificar variaciones en el gen de la APOE que puedan modificar el curso de la EM.
2. Buscar si dicho gen está relacionado con la E.M.
3. Identificar las posibles causas genéticas (variaciones alélicas del gen de la APOE) por las que ciertos pacientes responden de forma distinta a los medicamentos (interferón beta)..
4. Relacionar dicho marcador genético en sangre de pacientes con E.M, con la forma clínica evolutiva de la enfermedad y con la rapidez de aparición de discapacidad residual.

El Comité Ético de Investigación Clínica de este hospital ha aprobado la realización de este estudio (proyecto de investigación n° 62/01 titulado "Implicaciones genéticas de la Esclerosis Múltiple", 05/04/01).

Período del estudio, visitas y tratamiento

Si usted decide participar, su médico le hablará de la E.M. y le preguntará sobre su salud y su historia familiar.

Se le extraerá una muestra de 5 ml de sangre, que es una cantidad inferior a la de cualquier extracción de sangre para realizar un análisis, normalmente aprovechando un análisis habitual preciso para el seguimiento y control de su tratamiento. Si la muestra inicial no pudiera ser procesada por alteración, manejo o transporte inadecuados, pérdida o dificultades técnicas para extraer el material genético y/o factores bioquímicos, podría ser necesaria una segunda extracción. Su muestra será la fuente del material genético (DNA) para estudiar las variantes alélicas de dicho gen. La información de su material genético se combinará con su información clínica, pero usando un sistema de codificación desidentificador para proteger su confidencialidad. El término "desidentificador" significa que su muestra se identificará solo por un código y que la Unidad de Esclerosis Múltiple mantendrá la relación entre este código y sus datos bajo estrictos procedimientos operativos, para asegurar la confidencialidad y solo personas debidamente autorizadas podrán relacionar los datos genéticos con los datos clínicos.

Participación voluntaria

La decisión de participar o no participar en este estudio es totalmente voluntaria por su parte. Su decisión, sea cual fuere, no comportará penalización alguna, ni afectará de ningún modo a los cuidados médicos y la asistencia que usted reciba.

Además, si usted acepta participar, después puede retirarse del estudio en cualquier momento, sin tener que explicar sus motivos y sin que ello repercuta tampoco en la asistencia que reciba en el futuro. Si decide retirarse, su muestra (sangre) y el DNA extraído podrán ser destruidos. Sin embargo, si los resultados genéticos de su muestra ya se hubieran incluido en el análisis genético global del estudio antes de recibir su petición de destrucción, no podrán retirarse aunque su muestra se destruya.

Por otra parte, si en el momento en que usted pide la destrucción, su muestra ya ha sido anonimizada, no podrá destruirse, porque ya no podrá ser relacionada con usted. Al final de esta hoja de información encontrará el teléfono de su médico, que puede usar para pedir la retirada de su muestra.

Alternativas a participar en el estudio

La alternativa a la participación es no autorizar el uso de una muestra de su sangre para este estudio.

Como ya se ha dicho antes, la participación o no participación en este estudio no afectará en modo alguno al tratamiento y asistencia que usted reciba.

Beneficios

La participación en este estudio no le beneficiará directamente. Sin embargo, en el futuro puede beneficiar a otras personas con E.M., ya que los estudios que se realicen pueden ayudar a los científicos a entender porque aparece la enfermedad, porque no siempre evoluciona de la misma manera o porque las personas responden de modos distintos a los fármacos.

Riesgos

El riesgo físico y molestias de una extracción de sangre incluyen dolor menor, hematoma o, en raros casos, infección en el punto de inyección o desvanecimiento.

Sus responsabilidades

Si decide participar, deberá:

- Firmar el formulario de consentimiento informado
- Proporcionar una muestra de sangre, que pasará a ser propiedad de la Unidad de Esclerosis Múltiple. El material genético de su muestra se conservará durante un periodo de tiempo indefinido y podrá ser destruido o anonimizado.
- Responder a las preguntas sobre su salud y sus antecedentes familiares. Al firmar el consentimiento informado autoriza usted a la Unidad de Esclerosis Múltiple de este estudio, el acceso a sus antecedentes médicos.
- Informar a su médico si quiere retirarse y que se destruya su muestra.

Confidencialidad

Si usted está de acuerdo en participar, toda la información respecto a sus resultados se almacenará y procesará por ordenador, cumpliendo los requisitos de la Ley 15/99 de protección de datos de carácter personal. La información en el ordenador se limita a los datos clínicos como la edad, sexo, estado de salud, de la variante alélica del gen APOE, etc. y el acceso a ellos será restringido.

Dado que el posible significado de los datos genéticos no podrá definirse hasta después de diversos estudios, no se informará ni a usted ni a su médico de los resultados de los análisis genéticos realizados, ni figurarán en ningún caso en su historia clínica.

El promotor no dará información genética individual identificable a terceros, a menos que sea por requerimiento legal. En caso de requerimiento legal, si es posible el promotor intentará ponerse previamente en contacto con usted, con lo que tendrá oportunidad de proteger sus intereses.

Se mantendrá totalmente la confidencialidad de sus datos y su nombre no aparecerá en ningún caso en ningún informe ni publicación de resultados del estudio.

No le podemos garantizar que sus resultados genéticos y bioquímicos no se relacionen jamás con su persona, pero se adoptarán todas las medidas posibles para evitarlo.

Aspectos comerciales

Los resultados de las investigaciones genéticas que se realicen pueden llegar a ser valiosos desde un punto de vista comercial y/o de propiedad intelectual, dando lugar a patentes. Por ejemplo, se podrían usar para desarrollar nuevos fármacos o tests diagnósticos, bien directamente por el promotor o bien colaborando con diferentes empresas.

Usted no recibirá ninguna compensación por ninguna actividad comercial relacionada con el material genético o biológico de su muestra, ni ningún interés o participación en los beneficios derivados de ella.

Personas de contacto

La persona de contacto por si tiene alguna duda acerca del estudio o de sus derechos como participante, o para el caso de que usted desee retirarse y que su muestra sea destruida, es su médico/investigador:

Dr. Txomin Arbizu Urdiain Teléfono de contacto 93/2607509

Su médico/investigador le informará asimismo de cualquier nueva información de que disponga, que pudiera influir en su decisión de participar o continuar participando en el estudio.

Recibirá usted una copia de esta hoja de información al paciente y del consentimiento informado firmado por usted.

Título del proyecto: ESTUDIO GENÉTICO DE LA APOE y SUS ALELOS COMO MARCADOR DE PROGRESIÓN Y/O DE RESPUESTA AL TRATAMIENTO CON INTERFERON BETA EN SANGRE DE PACIENTES CON ESCLEROSIS MÚLTIPLE (EM).

Código: N° 62/01

CONSENTIMIENTO INFORMADO DEL PACIENTE

D/Dña:

1. He leído la hoja de información que me ha sido entregada.
2. He podido hacer preguntas acerca del estudio.
3. He recibido suficiente información sobre el estudio.
4. He hablado con el Dr. Arbizu Urdiain.
5. Mi participación es voluntaria.

Y presto libremente mi conformidad para participar en el estudio, autorizando así mismo se conserve indefinidamente mis muestras biológicas y mi material hereditario o ADN para realización de futuros estudios bajo las condiciones antes referidas.

Firma del Investigador

Fecha:

Firma del paciente

Fecha:



Comitè Ètic d'Investigació Clínica

Dr. Txomin Arbizu
Servicio de Neurología

Distinguido Doctor,

En relación al proyecto de investigación nº **62/01**, propuesto por Ud. como investigador principal y titulado: "IMPLICACIONES GENÉTICAS DE LA ESCLEROSIS MÚLTIPLE", el Comité Ético de Investigación Clínica de este Hospital Universitario de Bellvitge, en su reunión de fecha 30 de Septiembre de 2003, ha evaluado la siguiente documentación, para el estudio incluido en dicho proyecto y titulado:

"ESTUDIO GENÉTICO DE LA APOE Y SUS ALELOS COMO MARCADOR DE PROGRESIÓN Y/O DE RESPUESTA AL TRATAMIENTO CON INTERFERON BETA EN SANGRE DE PACIENTES CON ESCLEROSIS MÚLTIPLE (EM)"

- Hoja de información al paciente y consentimiento informado versión de fecha 01.08.03

Tras estudiar la documentación presentada, el Comité ha acordado dar su aprobación definitiva al mencionado proyecto de investigación, cuyo documento le adjunto.

Con un cordial saludo,

A handwritten signature in blue ink, appearing to read "Mª Ignacia Ferrer Salvans", with a long horizontal flourish extending to the right.

Dra. M^a Ignacia Ferrer Salvans
Secretario del CEIC

L'Hospitalet de Llobregat, 06 de Octubre de 2003

