

DETERMINACIÓ DEL PATRÓ DE miRNA EN LÍQUID CEFALORAQUIDI DE PACIENTS AMB ESCLEROSI MÚLTIPLE (ESTUDI miEM)

Lluís Ramió i Torrentà

Dipòsit legal: Gi. 1950-2014
<http://hdl.handle.net/10803/284332>

ADVERTIMENT. L'accés als continguts d'aquesta tesi doctoral i la seva utilització ha de respectar els drets de la persona autora. Pot ser utilitzada per a consulta o estudi personal, així com en activitats o materials d'investigació i docència en els termes establerts a l'art. 32 del Text Refós de la Llei de Propietat Intel·lectual (RDL 1/1996). Per altres utilitzacions es requereix l'autorització prèvia i expressa de la persona autora. En qualsevol cas, en la utilització dels seus continguts caldrà indicar de forma clara el nom i cognoms de la persona autora i el títol de la tesi doctoral. No s'autoritza la seva reproducció o altres formes d'explotació efectuades amb finalitats de lucre ni la seva comunicació pública des d'un lloc aliè al servei TDX. Tampoc s'autoritza la presentació del seu contingut en una finestra o marc aliè a TDX (framing). Aquesta reserva de drets afecta tant als continguts de la tesi com als seus resums i índexs.

ADVERTENCIA. El acceso a los contenidos de esta tesis doctoral y su utilización debe respetar los derechos de la persona autora. Puede ser utilizada para consulta o estudio personal, así como en actividades o materiales de investigación y docencia en los términos establecidos en el art. 32 del Texto Refundido de la Ley de Propiedad Intelectual (RDL 1/1996). Para otros usos se requiere la autorización previa y expresa de la persona autora. En cualquier caso, en la utilización de sus contenidos se deberá indicar de forma clara el nombre y apellidos de la persona autora y el título de la tesis doctoral. No se autoriza su reproducción u otras formas de explotación efectuadas con fines lucrativos ni su comunicación pública desde un sitio ajeno al servicio TDR. Tampoco se autoriza la presentación de su contenido en una ventana o marco ajeno a TDR (framing). Esta reserva de derechos afecta tanto al contenido de la tesis como a sus resúmenes e índices.

WARNING. Access to the contents of this doctoral thesis and its use must respect the rights of the author. It can be used for reference or private study, as well as research and learning activities or materials in the terms established by the 32nd article of the Spanish Consolidated Copyright Act (RDL 1/1996). Express and previous authorization of the author is required for any other uses. In any case, when using its content, full name of the author and title of the thesis must be clearly indicated. Reproduction or other forms of for profit use or public communication from outside TDX service is not allowed. Presentation of its content in a window or frame external to TDX (framing) is not authorized either. These rights affect both the content of the thesis and its abstracts and indexes.



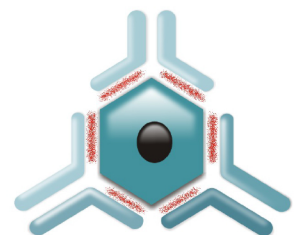
Universitat de Girona

TESI DOCTORAL

**DETERMINACIÓ DEL PATRÓ DE miRNA EN
LÍQUID CEFALORAQUIDI DE PACIENTS AMB
ESCLEROSI MÚLTIPLE
(*ESTUDI miEM*)**

Lluís Ramió i Torrentà

2014





Universitat de Girona

TESI DOCTORAL

**DETERMINACIÓ DEL PATRÓ DE miRNA EN
LÍQUID CEFALORAQUIDI DE PACIENTS AMB
ESCLEROSI MÚLTIPLE
*(ESTUDI miEM)***

Lluís Ramió i Torrentà

2014



Universitat de Girona

TESI DOCTORAL

**DETERMINACIÓ DEL PATRÓ DE miRNA EN
LÍQUID CEFALORAQUIDI DE PACIENTS AMB
ESCLEROSI MÚLTIPLE
(*ESTUDI miEM*)**

Lluís Ramió i Torrentà

2014

PROGRAMA DE DOCTORAT EN CIÈNCIES EXPERIMENTALS I SOSTENIBILITAT

Dirigida per:

Dra. Yolanda Silva Blas

Tutor:

Dr. José Manuel Fernández-Real Lemos

Memòria presentada per optar al títol de doctor per la Universitat de Girona



La Dra. Yolanda Silva Blas, de la Universitat de Girona,

DECLARO:

Que el treball titulat ***DETERMINACIÓ DEL PATRÓ DE miRNA EN LÍQUID CEFALORAQUIDI DE PACIENTS AMB ESCLEROSI MÚLTIPLE (ESTUDI miEM)***, que presenta el Sr. Lluís Ramió i Torrentà per a l'obtenció del títol de doctor, ha estat realitzat sota la meva direcció i que compleix els requisits necessaris per la seva defensa davant el Tribunal corresponent.

I, perquè així consti i tingui els efectes oportuns, signo aquest document.

Signatura, Yolanda Silva

Girona, 11 de setembre 2014

Las neuronas son células de formas delicadas y elegantes, las misteriosas mariposas del alma, cuyo batir de alas quién sabe si esclarecerá algún día el secreto de la vida mental.

Santiago Ramón y Cajal

Si vols anar ràpid, camina sol; però si vols arribar lluny, camina acompanyat.

Proverbi africà

AGRAÏMENTS

Amb aquesta tesi s'acaba un camí. Però no és un camí sense sortida; ben al contrari, espero que continuï. Encara que, com tots els camins, amb entrebancs i dificultats, però ara sense peatges i que vagi paral·lel als altres que també segueixo i que, tots junts, em condueixin a d'altres reptes tant professionals com personals. No ha estat fàcil i ha tingut el seu cost, sobretot a nivell familiar i personal. Però ara, mirant enrere, crec que ha valgut la pena.

Realitzar una tesi quan un està embarcat en altres projectes professionals, lidera un grup de persones i ha format una família, és especialment complex. Però justament he après que només és possible fer-ho, i amb èxit, quan tots els teus companys de feina i especialment la teva família t'ajuden i s'hi bolquen.

Moltes persones, directament o indirectament, s'han implicat i m'han ajudat a la realització d'aquesta tesi.

Els primers a qui vull adreçar el meu agraïment és, òbviament, als pacients afectats d'esclerosi múltiple i a les seves famílies; d'ells n'aprens moltes coses però sobretot com afrontar una malaltia crònica quan estàs iniciant un projecte vital mantenint sempre l'esperança. Els agraeixo la confiança demostrada en els professionals sanitaris, en la medicina i en la recerca.

He tingut la sort de compartir tots aquests anys de neuròleg amb moltes persones. Sens dubte, de totes me n'enduc alguna cosa, però algunes m'han deixat una empremta especial.

De tots els neuròlegs amb qui he treballat, i especialment als que d'alguna manera o altra s'han dedicat a l'esclerosi múltiple, la passió per entendre com funciona el nostre cervell i la dedicació abnegada als pacients.

Una especial menció a en Xavier, en Jaume, la Mar i en Carlos, del CEMCAT, per tot el que m'han ensenyat sobre l'esclerosi múltiple i per fer-me sentir un més del grup. Thanks, Prof. Alan Thompson, for instilling me with the enthusiasm for

research during my stay at Queen Square. De tots els residents que he conegut, i especialment els de neurologia, les ganes d'aprendre i la dedicació a la feina.

De l'Antoni, en David, la Rosa, en Joaquin, l'Albert, la Mar, la Yolanda i en Fabián la demostració de com, tot i tenir maneres de fer diferents, es pot treballar conjuntament. Vull agrair especialment a l'Antoni el fet que em convencés que valia la pena fer la residència de neurologia a l'Hospital Trueta, que lluités perquè pogués quedar-m'hi, per la confiança que em va donar i, sobretot, per la frase "t'has de fer imprescindible!". A en Joaquin per mantenir aquesta confiança i recolzar-me en tot i per tot. Un especial agraïment a en David, que serà sempre el meu mestre i per mi el paradigma de neuròleg clínic, per tot el que he après al seu costat i, sobretot, per ensenyar-me a escoltar i a cuidar els malalts i les seves famílies. I especialment a la Yolanda que, a part d'acceptar ser la directora d'aquesta tesi, fou, és i serà sempre la meva resident gran (amb el què significa això; gràcies per tot, de debò).

La meva dedicació a l'esclerosi múltiple a l'Hospital Trueta ha permès envoltar-me d'un grup de companys excel·lents tant a nivell professional com personal. Amb ells és molt fàcil treballar i fan que un se senti orgullós de formar-ne part. Sense la Pepi, en René, en Jordi, l'Ester, en Micky, l'Héctor, la Laura, la Judit, en Miguel Ángel, la Neus, la Judith i la Rebeca no estaríem on estem i òbviament aquesta tesi no hauria vist la llum. Gràcies a la Pepi per estar sempre disposada a resoldre qualsevol problema, per organitzar-ho i organitzar-nos sempre de forma impecable i per vetllar per les necessitats dels pacients. Gràcies a en René per la confiança demostrada i per considerar-me el seu germà gran (ja saps però que, amb la tesi, no vull que ho facis com jo). Gràcies a en Jordi per ensenyar-me un aspecte de la neurologia poc conegut per mi, per aportar idees de recerca al grup i per fer, quan ha calgut, de "jefe". Gràcies a en Micky per tots aquests anys de fidelitat, per estar sempre pendent i disposat a ajudar. Gràcies a l'Ester per tota la feina i totes les hores que has dedicat a fer possible aquesta tesi i a posar en marxa el laboratori del grup (ens vam conèixer fa anys però ha estat una llàstima que no haguéssim treballat junts abans). Gràcies a l'Héctor per tenir sempre un sí a punt i pel seu constant compromís. Gràcies a la Laura per ensenyar-me, dia a dia, a entendre els pacients. Gràcies a la Judit per fer que les

coses siguin senzilles. Gràcies a en Miguel Ángel per aquest esperit “recercaire” que té. Gràcies a la Neus per ser tant metòdica. Gràcies a la Judith per facilitar la feina. Gràcies a la Rebeca per la implicació i el compromís demostrats.

Durant aquests darrers anys moltes altres són les persones que m’han enriquit tant professionalment com personalment. A l’Àngels vull agrair-li especialment la confiança que va dipositar en mi i que em va permetre obrir el camí universitari en la meva vida professional, el que em facilités i m’acompanyés en les meves primeres passes per la gestió sanitària, i el reforç que va fer-me dels valors de compromís, coherència i confiança en les persones. A l’Albert (una de les tres persones que s’ha fet més pesada perquè acabés la tesi) li vull agrair el que tingui sempre les portes obertes del seu despatx, com m’ha ensenyat a relativitzar els problemes i que després d’un dia dolent en ve un de bo, i especialment tots els cafès que hem compartit. En Jordi, en Xavier, l’Arnau i en Rafa, de VICOROB, amb qui he estat treballant aquests darrers anys i que també han participat en aquesta tesi, són un exemple de mentalitat oberta, de com s’ha de fer recerca i de com es pot treballar conjuntament i amb gran èxit malgrat venir de disciplines ben diferents. I un especial agraïment per a l’Andy que, a part de les hores que hem passat junts intentant *to improve the world*, fou una altra de les persones que va insistir més en que aquesta tesi estigui ja feta.

També vull agrair a en Josep Manuel i en Paco, que, a part de participar en aquesta tesi, m’hagin fet descobrir i despertar l’interès pels microRNAs, i espero que aquesta línia de recerca sigui més pròspera en el futur. També a la Maria per tot el treball i l’ajuda que m’ha donat per a aquesta tesi; és un clar exemple de com una persona dedicada a l’estadística pot entendre com pensem i què necessitem els metges clínics.

Tinc la sort de tenir un grup d’amics propers amb qui puc confiar i amb qui he compartit moltes hores (amb i sense fills). Els meus estimats “Medicinos”, amb qui hem compartit tants anys de trobades i de xerrades per arreglar la medicina del nostre país, us vull agrair especialment la forta i ferma xarxa d’amistat que hem teixit. Blai, et vull agrair especialment, que t’oferissis generosament a

revisar aquesta tesi des de Chicago. Gràcies Jordi, Carme, Xavi, Carme, Xito, Lluís, Jordi i Anita pels sopars i tiberis varis, i específicament Lluís per haver dedicat hores a revisar l'ortografia i el format de la tesi, i Jordi per calmar-me davant les dificultats logístiques i administratives que té qualsevol tesi.

Amb els anys m'he adonat que, per molts camins que un vagi obrint al llarg de la seva vida, necessita una base sòlida d'on en surtin tots per mantenir així l'estabilitat i la coherència. I aquesta base és la família. Sens dubte, aquesta tesi també pertany a la meva família perquè sense la seva implicació no hauria arribat fins aquí. Tots heu patit aquesta tesi però sobretot vull agrair-vos, mare i pare, haver-me inculcat els valors del treball, la constància i el compromís; Pere, per l'amistat retrobada ja de grans; Non, per fer-te càrrec dels nens quan jo havia d'estar tancat a casa "fent tesi"; i a vosaltres Benet i Kevin (que grans i savis que us heu fet ja!) per entendre i respectar que havia de fer un treball molt llarg i complicat durant molts mesos (ara ja podré treure el rètol vermell penjat a la porta de l'estudi: *Keep the door closed. I am doing my thesis*).

Però sobretot aquesta tesi te la dedico a tu, Nuri. Tota una vida junts, amb molts moments passats, amb molts projectes realitzats i amb una família formada; som aquí i continuarem endavant junts per tots aquests camins que hem anat obrint i que, com no pot ser d'altra manera, compartim tots dos junts. T'agraeixo la teva insistència perquè fes i acabés ja d'una vegada aquesta tesi, per ajudar-me en els moments complicats a entendre els "jefes", per l'autonomia que em dones, per mantenir-me de peus a terra quan sovint me'n vaig pels núvols, però sobretot i per damunt de tot, per estar i mantenir-te sempre al meu costat. Gràcies. T'estimo.

Lluís Ramió i Torrentà

ABREVIATURES

AG	Acetat de glatiràmer
AIAQS	Agència d'Informació, Avaluació i Qualitat en Salut
AUC	Area under the ROC curve
BCIP	5-bromo-4-cloro-3-indolilfosfat
BDNF	Brain-derived neurotrophic factor
BOC	Bandes oligoclonals
BOCG	Bandes oligoclonals d'immunoglobulina G
BOCG+	Bandes oligoclonals d'immunoglobulina G positives
BOCM_LE	Bandes oligoclonals d'immunoglobulina M lípidespecífiques
BOCM_LE+	Bandes oligoclonals d'immunoglobulina M lípidespecífiques positives
BOCM	Bandes oligoclonals d'immunoglobulina M
BOCM+	Bandes oligoclonals d'immunoglobulina M positives
BPF	Brain parenchymal fraction
Ca	Calci
C_Barkhof	Criteris de Barkhof
<i>C.elegans</i>	Caenorhabditis elegans
cDNA	DNA còpia
CLP	Cèl·lula precursora limfoide
CMP	Cèl·lula precursora mieloide
Ct	Cycle threshold
DC	Dendritic cell
DE	Disseminació en espai
DN	Double negative
DNA	Deoxyribonucleic Acid
DP	Double positive
DT	Disseminació en temps
DTT	Ditioteitrol
EAE	Encefalomièlitis al·lèrgica experimental
ECG	Electrocardiograma
EDSS	Expanded Disability Status Scale

ELA	Esclerosi lateral amiotròfica
EM	Esclerosi múltiple
EMPP	Esclerosi múltiple primària progressiva
EMPR	Esclerosi múltiple progressiva recurrent
EMRR	Esclerosi múltiple remitent-recurrent
EMSP	Esclerosi múltiple secundària progressiva
F	Femení
FAST	FMRIB's automated segmentation tool
FLAIR	Fluid Attenuated Inversion Recovery
FOXP3	Forkhead Box P3
GC	Germinal center
Gd	Gadolini
GMP	Granulocyte-macrophage progenitor
HLA	Human Leukocyte Antigen
HSC	Hematopoietic stem cell
HTA	Hipertensió arterial
IC95%	Interval de confiança al 95%
IEF	Isoelectroenfof
IFN	Interferó
IL	Interleucina
LCR	Líquid cefaloraquidi
LES	Lupus eritematós sistèmic
LMP	Leucoencefalopatia multifocal progressiva
M	Masculí
MA	Malaltia d'Alzheimer
md	Mediana
MDP	Myeloid dendritic cell progenitors
MH	Malaltia de Huntington
MHC	Major histocompatibility complex
miRNA	microRNA

miRNAs	microRNAs
MP	Malaltia de Parkinson
mRNA	RNA missatger
Na	Sodi
NBT	Nitrobalau de tetrazoli
NK	Natural killer
nm	Nanòmetre
NMO	Neuromielitis òptica
NTZ	Natalizumab
ON	Òxid nítric
<i>p</i>	Probabilitat
PBMC	Cèl·lules mononucleades de sang perifèrica
PCR	Polymerase chain reaction
PD	Proton density
qRT-PCR	Quantitative real-time polymerase chain reaction
RIQ	Recorregut interquartílic
RISC	RNA-Induced silencing complex
RM	Ressonància magnètica
RNA	Ribonucleic acid
ROC	Receiver operating characteristic
RT-PCR	Real-time polymerase chain reaction
SB	Substància blanca
sc	Subcutani
SCA	Síndrome clínicament aïllada
SF	Sistema funcional
SG	Substància gris
SNC	Sistema nerviós central
SOCS3	Suppressor of cytokine signaling 3
SP	Simple positive
SPM	Statistical parametric mapping

STAT3	Signal transducer and activator of transcription 3
T	Tesla
TIM	Tractament immunomodulador
TLDA	TaqMan® low density array
TNF- α	Tumor necrosis factor- α
Treg	T reguladora
UNIEM	Unitat de Neuroimmunologia i Esclerosi múltiple
VEB	Virus Epstein-Barr
μm	Micròmetre

ÍNDIX DE FIGURES

Figura 1. Prevalença d'EM a nivell mundial segons <i>Atlas of MS 2013</i>	4
Figura 2. Esquema del curs patogènic de l'EM	10
Figura 3. Esquema de la patogènia de l'EM	12
Figura 4. Classificació segons fenotip clínic	13
Figura 5. Algoritme per al tractament de l'EMRR proposat per l'Agència d'Informació, Avaluació i Qualitat en Salut	20
Figura 6. Algoritme per al tractament de l'EMSP proposat per l'Agència d'Informació, Avaluació i Qualitat en Salut	21
Figura 7. Esquema de la biogènesi dels miRNAs	39
Figura 8. Potencials teràpies basades en miRNAs	44
Figura 9. Desenvolupament de les cèl·lules immunitàries i miRNAs implicats	47
Figura 10. Desenvolupament del sistema immunitari innat i miRNAs implicats	48
Figura 11. Desenvolupament de les cèl·lules T i miRNAs implicats	50
Figura 12. Desenvolupament de les cèl·lules B i miRNAs implicats	51
Figura 13. Nombre de miRNAs desregulats que comparteixen diferents malalties neurodegeneratives	58
Figura 14. Exemple de resultats de diferents patrons d'anàlisi de BOCG	87
Figura 15. Exemple de resultats de diferents patrons d'anàlisi de BOCM	89
Figura 16. Esquema de la placa TLDA, assaig TaqMan®	91
Figura 17. Diagrama de flux de l'estudi dels miRNAs	93

Figura 18. Resultats de validació dels miRNAs seleccionats entre el grup "Control" i grup "EM"	115
Figura 19. Resultats de validació dels miRNAs seleccionats entre els pacients del grup "EM" amb BOCM_LE negatives i BOCM_LE positives	119
Figura 20. Corbes ROC dels miRNAs amb bona capacitat de discriminació	125

ÍNDIX DE TAULES

Taula 1. Criteris diagnòstics d'EM de McDonald 2010 revisats	16
Taula 2. Variables clíniques associades al pronòstic de l'EM	24
Taula 3. Malalties en les que s'ha estudiat el paper de miRNAs	56
Taula 4. Resum dels treballs publicats en relació a EM i miRNAs	71
Taula 5. Característiques del grup "EM"	102
Taula 6. Descripció del grup "Control" segons sexe, edat i diagnòstic ..	104
Taula 7. Característiques basals del grup "Control" i grup "EM" de la cohort d'identificació	105
Taula 8. Característiques dels pacients del grup "EM" amb BOCM_LE negatives i BOCM_LE positives de la cohort d'identificació	106
Taula 9. miRNAs circulants identificats en la cohort d'identificació amb valors d'expressió fiables	108
Taula 10. miRNAs amb expressió diferenciada en la cohort d'identificació entre el grup "EM" i el grup "Control"	109
Taula 11. miRNAs amb expressió diferenciada en la cohort d'identificació entre pacients del grup "EM" amb BOCM_LE positives i BOCM_LE negatives	110
Taula 12. Característiques basals del grup "Control" i grup "EM" de la cohort de validació	111
Taula 13. Característiques basals dels pacients del grup "EM" amb BOCM_LE negatives i BOCM_LE positives de la cohort de Validació	112
Taula 14. Resultats de validació dels miRNAs seleccionats entre el grup "Control" i grup "EM"	118
Taula 15. Resultats de validació dels miRNAs seleccionats entre els pacients del grup "EM" amb BOCM_LE negatives i BOCM_LE positives	122

Taula 16. AUC i IC95% de l'anàlisi ROC entre els grups "Control" i "EM", i pacients EM amb BOCM_LE negatives i BOCM_LE positives	123
Taula 17. Anàlisi de correlació entre els miRNAs i les variables clíniques, d'anàlisi de LCR i radiològiques	127
Taula 18. Anàlisi d'expressió diferenciada entre els miRNAs i les variables clíniques i radiològiques	134

RESUMS

RESUM

L'esclerosi múltiple és una malaltia neurològica crònica del sistema nerviós central, d'etiologia no ben coneguda i mecanisme autoimmunitari, amb una patogènia mixta inflamatòria i neurodegenerativa, de curs progressiu i que causa discapacitat. És la causa més freqüent de discapacitat neurològica d'origen no traumàtic en la població adulta jove del món occidental. Encara que l'etiologia exacta no sigui ben coneguda, cada vegada hi ha més evidència que existeixen múltiples factors, tant genètics com ambientals, que hi intervenen d'una forma altament complexa. El curs clínic de la malaltia i el seu pronòstic evolutiu és heterogeni i actualment difícil de predir. S'han estudiat diversos biomarcadors en esclerosi múltiple però pocs d'ells s'han validat adequadament. Les bandes oligoclonals d'IgM lípidespecífiques en líquid cefaloraquidi s'han associat a formes clíniques de la malaltia de pitjor pronòstic. Els microRNA són petites molècules amb capacitat de regular l'expressió genètica a nivell posttranscripcional i intervenen en pràcticament totes les funcions cel·lulars, en multitud de processos fisiològics, en la regulació del sistema immunitari i en la patogènia de diferents malalties incloses les de base autoimmunitària i les neurològiques. Per aquest motiu s'estan postulant com a potencials biomarcadors moleculars tant de diagnòstic com de pronòstic en moltes malalties. En els darrers cinc anys, nombrosos estudis han investigat el paper dels microRNAs en l'esclerosi múltiple a través de l'anàlisi de diferents mostres biològiques.

En aquest treball de tesi doctoral s'ha estudiat el paper dels microRNAs en líquid cefaloraquidi en les fases inicials de les formes remitent-recurrent d'esclerosi múltiple, i s'han identificat alguns microRNAs com a candidats a ésser biomarcadors del diagnòstic de la malaltia i associats a la presència de bandes oligoclonals d'IgM lípidespecífiques que s'han relacionat amb formes més agressives de la malaltia. L'expressió d'aquests microRNAs s'ha associat a algunes variables clíniques i radiològiques dels pacients amb esclerosi múltiple.

RESUMEN

La esclerosis múltiple es una enfermedad neurológica crónica del sistema nervioso central, de etiología no bien conocida y mecanismo autoinmune, con una patogenia mixta inflamatoria y neurodegenerativa, de curso progresivo y que causa discapacidad. Es la causa más frecuente de discapacidad neurológica de origen no traumático en la población adulta joven del mundo occidental. Aunque la etiología exacta no se conoce bien, cada vez hay más evidencia de que existen múltiples factores, tanto genéticos como ambientales, que intervienen de una forma muy compleja. El curso clínico de la enfermedad y su pronóstico evolutivo es heterogéneo y actualmente difícil de predecir. Se han estudiado varios biomarcadores en esclerosis múltiple pero pocos de ellos se han validado adecuadamente. Las bandas oligoclonales de IgM lípido-específicas en líquido cefalorraquídeo se han asociado a formas clínicas de la enfermedad de peor pronóstico. Los microRNA son pequeñas moléculas con capacidad de regular la expresión genética a nivel post-transcripcional e intervienen en prácticamente todas las funciones celulares, en multitud de procesos fisiológicos, en la regulación del sistema inmunitario y en la patogenia de diferentes enfermedades incluidas las de base autoinmune y las neurológicas. Por este motivo se están postulando como potenciales biomarcadores moleculares tanto de diagnóstico como de pronóstico en muchas enfermedades. En los últimos cinco años, varios estudios han investigado el papel de los microRNAs en la esclerosis múltiple a través del análisis de diferentes muestras biológicas.

En este trabajo de tesis doctoral se ha estudiado el papel de los microRNAs en líquido cefalorraquídeo en las fases iniciales de las formas remitente-recurrente de esclerosis múltiple, y se han identificado algunos microRNAs como candidatos a ser biomarcadores del diagnóstico de la enfermedad y asociados a la presencia de bandas oligoclonales de IgM lípido-específicas que se han relacionado con formas más agresivas de la enfermedad. La expresión de estos microRNAs se ha asociado a algunas variables clínicas y radiológicas de los pacientes con esclerosis múltiple.

ABSTRACT

Multiple sclerosis is a chronic neurological disease of the central nervous system which has a little understood aetiology and an autoimmune mechanism, a mixed inflammatory and neurodegenerative pathogenesis, and a progressive and disabling course. It is the most frequent cause of non-traumatic neurological disability in the young adult population in the Western world. Despite the aetiology being little understood, there is increasing evidence that there are many both genetic and environmental factors that participate in a highly complex manner. The clinical course of the disease and prognosis is heterogeneous and currently difficult to predict. Several biomarkers have been studied in multiple sclerosis but few have been adequately validated. Lipid-specific oligoclonal IgM bands in cerebrospinal fluid have been associated with clinical forms of the disease which have the worst prognosis. MicroRNAs are small molecules which have the ability to post-transcriptionally regulate genetic expression and participate in practically all cellular functions, many physiological processes, the regulation of the immune system, and the pathogenesis of different diseases including autoimmune and neurological ones. For this reason, they have been postulated as potential molecular biomarkers both of diagnosis and prognosis in many diseases. Over the last five years, several studies have investigated the role of microRNAs in multiple sclerosis through the analysis of different biological samples.

In the research for this doctoral thesis, the role of microRNAs in cerebrospinal fluid in the early phases of relapsing-remitting multiple sclerosis has been studied and some microRNAs have been identified as candidates to be biomarkers of the diagnosis of the disease and are associated to the presence of lipid-specific oligoclonal IgM bands, which have been related with more aggressive forms of the disease. The expression of these microRNAs is associated to certain clinical and radiological variables of patients with multiple sclerosis.

ÍNDIX GENERAL

1. INTRODUCCIÓ	1
1.1. ESCLEROSI MÚLTIPLE	3
1.1.1. Introducció	3
1.1.2. Epidemiologia	3
1.1.3. Etiologia i factors de risc	6
1.1.3.1. Factors genètics	6
1.1.3.2. Factors ambientals	7
1.1.4. Patogènia	9
1.1.5. Característiques clíniques	13
1.1.6. Diagnòstic de l'EM	15
1.1.7. Tractament	17
1.2. BIOMARCADORS EN ESCLEROSI MÚLTIPLE	22
1.2.1. Biomarcadors clínics	23
1.2.2. Biomarcadors genètics i moleculars	25
1.2.3. Biomarcadors d'imatge	26
1.3. BANDES OLIGOCLONALS	30
1.3.1. Bandes oligoclonals d'IgG	30
1.3.2. Bandes oligoclonals d'IgM	33
1.3.3. Bandes oligoclonals d'IgM lípidespecífiques	34
1.4. ELS microRNAs	37
1.4.1. Generalitats	37
1.4.2. Biogènesi i detecció dels miRNAs	38

1.4.3. Funcions dels miRNAs	41
1.4.4. Investigació en teràpies basades en miRNAs	43
1.4.4.1. Estratègies per a restaurar les funcions dels miRNAs	43
1.4.4.2. Estratègies per a inhibir funcions dels miRNAs	45
1.4.4.3. Utilitat de les teràpies basades en miRNAs	45
1.4.5. miRNAs i sistema immunitari	46
1.4.5.1. miRNAs i sistema immunitari innat	47
1.4.5.2. miRNAs i sistema immunitari adaptatiu	49
1.4.6. miRNAs i autoimmunitat	52
1.4.7. miRNAs i SNC	52
1.4.8. miRNAs i diferents malalties	54
1.4.9. miRNAs i esclerosi múltiple	58
2. HIPÒTESIS i OBJECTIUS	73
2.1. HIPÒTESIS	75
2.2. OBJECTIUS	76
2.2.1. Objectius principals	76
2.2.2. Objectius secundaris	76
3. PACIENTS i MÈTODES	77
3.1. PACIENTS	79
3.1.1. Disseny	79

3.1.2. Subjectes de l'estudi	79
3.1.2.1. Criteris d'inclusió i exclusió dels subjectes de l'estudi	81
3.1.2.2. Grups de pacients	81
3.1.2.3. Cohorts d'estudi	82
3.1.3. Variables d'estudi	82
3.1.3.1. Variables clíniques	82
3.1.3.2. Variables d'anàlisi de LCR	83
3.1.3.3. Variables radiològiques	84
3.2. MÈTODES	85
3.2.1. Protocol de la recollida de mostres	85
3.2.2. Tècniques de detecció de BOCG, BOCM i càlcul de l'índex IgG	86
3.2.3. Tècniques de detecció i quantificació dels miRNAs	89
3.2.4. Seqüència de l'estudi dels miRNAs	92
3.2.5. Obtenció de variables clíniques	93
3.2.6. Obtenció de variables radiològiques	94
3.3. ANÀLISI ESTADÍSTICA	96
3.3.1. Descripció dels subjectes d'estudi	96
3.3.2. Identificació i validació dels miRNAs	97
3.3.3. Capacitat discriminatòria dels miRNAs	97
3.3.4. Relació dels miRNAs amb variables clíniques, d'anàlisi de LCR i radiològiques	98

4. RESULTATS	99
4.1. DESCRIPCIÓ DELS SUBJECTES D'ESTUDI	101
4.1.1. Descripció dels pacients del grup "EM"	101
4.1.2. Descripció dels subjectes del grup "Control"	103
4.2. ESTUDI D'IDENTIFICACIÓ DE miRNAs	105
4.2.1. Descripció dels subjectes	105
4.2.2. Estudi d'identificació de miRNAs candidats	107
4.3. ESTUDI DE VALIDACIÓ DE miRNAs	111
4.3.1. Descripció dels subjectes	111
4.3.2. Estudi de validació de miRNAs candidats	113
4.4. CAPACITAT DE DISCRIMINACIÓ DELS miRNAs	123
4.5. RELACIÓ ENTRE L'EXPRESSIÓ DELS miRNAs I VARIABLES CLÍNiques, D'ANÀLISI DE LCR I RADIOLÒGIQUES	126
5. DISCUSSIÓ	141
5.1. ELS miRNAs I LA LITERATURA PRÈVIA	143
5.2. MOSTRES ESTUDIADES	146
5.3. ESTUDI D'IDENTIFICACIÓ DE miRNAs CANDIDATS	148
5.4. CAPACITAT DE DISCRIMINACIÓ DELS miRNAs	151
5.5. DESCRIPCIÓ DELS miRNAs DESTACATS PRÈVIAMENT RELACIONATS AMB L'EM (miR-155 i miR-142-3p)	151
5.6. DESCRIPCIÓ DELS miRNAs DESTACATS NO PRÈVIAMENT RELACIONATS AMB L'EM (miR-203, miR-520c-3p i miR-106a)	153
5.7. RELACIÓ ENTRE L'EXPRESSIÓ DELS miRNAs I VARIABLES CLÍNiques, D'ANÀLISI DE LCR I RADIOLÒGIQUES	155

5.8. LIMITACIONS	158
5.9. PERSPECTIVES DE FUTUR	160
6. CONCLUSIONS	163
7. REFERÈNCIES BIBLIOGRÀFIQUES	167
8. ANNEXOS	207
8.1. ANNEX 1: Escala ampliada de discapacitat de Kurtzke (EDSS)	209
8.2. ANNEX 2: Criteris de Barkhof	215
8.3. ANNEX 3: Full informatiu i Consentiment informat per pacient amb malaltia inflamatòria-desmielinitzant del SNC	216
8.4. ANNEX 4: Full informatiu i Consentiment informat per pacient amb altres malalties neurològiques	223

1. INTRODUCCIÓ

1.1. ESCLEROSI MÚLTIPLE

1.1.1. Introducció

L'esclerosi múltiple (EM) és una malaltia neurològica crònica del sistema nerviós central (SNC), d'etiologia no ben coneguda i mecanisme autoimmunitari, amb una patogènia mixta inflamatòria i neurodegenerativa, de curs progressiu i que causa discapacitat (Compston *et al.* 2005).

L'EM es caracteritza per la presència d'infiltrats inflamatoris, desmielinització i lesió axonal en el SNC (cervell, cerebel, tronc encefàlic, nervis òptics i medul·la espinal). Encara que l'etiologia exacta no sigui ben coneguda, cada vegada hi ha més evidència que existeixen múltiples factors, tant genètics com ambientals, que hi intervenen d'una forma altament complexa (Compston *et al.* 2005). A més, gràcies als estudis epidemiològics, histopatològics, immunològics i genètics dels darrers anys, es coneix que el dany tissular es produeix com a conseqüència d'una resposta descontrolada del sistema immunitari cel·lular i humoral contra antígens del SNC (Brosnan i Raine 1996).

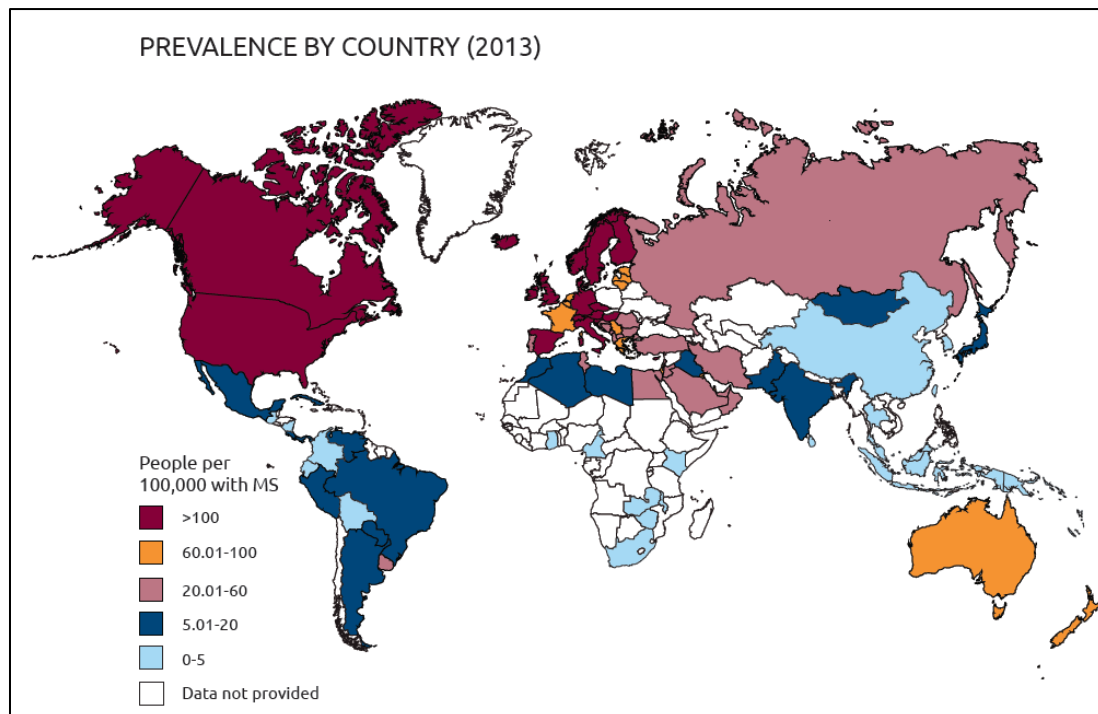
L'EM és la causa més freqüent de discapacitat neurològica d'origen no traumàtic en la població adulta jove del món occidental i en la gran majoria de casos es diagnostica en un moment vital de la vida d'aquestes persones i de les seves famílies. Així, causa un alt impacte i interferència en la seva vida personal, familiar, social i laboral (Cook 2001; Compston *et al.* 2005).

1.1.2. Epidemiologia

L'EM és una malaltia de distribució mundial amb una prevalença variable segons les zones geogràfiques i amb un clar gradient nord-sud amb més alta prevalença a mesura que ens allunyem de l'equador (2 casos per 100.000 habitants a Àfrica subsahariana i Àsia, i 160 casos per 100.000 habitants a Europa i Amèrica del Nord) (Multiple Sclerosis International Federation 2013). La prevalença a

Europa es considera moderada-alta (Rosati 2001; Pugliatti *et al.* 2006; Multiple Sclerosis International Federation 2013) i, en estudis realitzats en diferents àrees geogràfiques, s'està detectant un augment dels casos d'EM (Otero *et al.* 2010; Pugliatti *et al.* 2005; Elhami *et al.* 2011). A la darrera publicació de la Multiple Sclerosis International Federation (2013), *Atlas of MS 2013*, s'indica que el nombre de diagnòstics d'EM arreu del món ha augmentat dels 2,1 milions de persones a l'any 2008 als 2,3 milions a l'any 2013, i que la prevalença mediana a nivell global s'ha incrementat dels 30 casos per 100.000 habitants a l'any 2008 als 33 casos per 100.000 habitants a l'any 2013. Aquests increments en els casos diagnosticats s'atribueixen, en part, a la millora dels processos diagnòstics de la malaltia i a un major accés de la població als sistemes sanitaris, però també responen a un increment real de la incidència i prevalença de la malaltia.

Figura 1. Prevalença d'EM a nivell mundial segons *Atlas of MS 2013* (Multiple Sclerosis International Federation 2013).



La prevalença a Espanya era, fa uns anys, entre 32 i 65 casos per 100.000 habitants (Fernández *et al.* 1994; Bufill *et al.* 1995; Benito-León *et al.* 1998; Tola Arribas *et al.* 1999; Modrego i Pina 2003; Ares *et al.* 2007) però estudis recents mostren prevalences més altes de, per exemple, 78,6 (Otero-Romero *et al.* 2013) i, fins i tot, de 125 (Fernández *et al.* 2012). La incidència de la malaltia ha estat menys estudiada en el nostre entorn, però diversos estudis informen d'incidències molt variables que oscil·len entre 0,5 i 5,3 nous casos per 100.000 habitants i any (Fernández *et al.* 2011).

L'EM, de forma similar a totes les malalties de base autoimmunitària, té un predomini pel gènere femení. És de 3 a 4 vegades més prevalent en dones que en homes. La malaltia es diagnostica en més del 70% de casos entre els 20 i 40 anys, amb una edat mitjana de debut de 32 anys (Compston *et al.* 2005).

La història natural de l'EM és cap a la cronicitat i, en la majoria de casos, té tendència a progressar i a evolucionar cap a un alt nivell de discapacitat tant física com cognitiva. Aquesta discapacitat produïda per la malaltia està relacionada amb una major taxa de desocupació (2/3 dels pacients han deixat la feina a causa de la malaltia i no tenen cap feina remunerada als 15 anys del diagnòstic (Rao *et al.* 1991)), limitacions en les relacions personals, socials i familiars, i major grau de dependència, i es redueix globalment la qualitat de vida dels pacients i de les famílies afectades (Aronson 1997; Amato *et al.* 2001; Benito-León *et al.* 2002). Malauradament, avui en dia no existeixen mesures terapèutiques curatives, però, no obstant això, el diagnòstic precoç i els tractaments disponibles actualment modifiquen parcialment el curs de la malaltia i milloren el pronòstic a curt i mitjà termini.

L'EM és una de les vint malalties amb un impacte socioeconòmic per a la societat més elevat (Andlin-Sobocki *et al.* 2005). Els costos de la malaltia són tant directes (la majoria), indirectes com intangibles. Els costos de la malaltia són deguts a la discapacitat física i cognitiva que es crea, al procés diagnòstic, al cost de l'atenció sanitària que es requereix i als tractaments que actualment s'utilitzen, a les ajudes i suport que es requereixen al llarg dels anys, a la pèrdua de productivitat laboral, i a la pèrdua global de qualitat de vida dels pacients i de les seves

famílies. El cost total per pacient i any, abans de la introducció dels nous tractaments per la EM com natalizumab, fingolimod, terifunomida, dimetilfumarat, alemtuzumab, s'ha calculat entre 6.000 i 91.000€ (depenent del grau de discapacitat i països on s'han fet els estudis) amb una mitjana d'uns 50.000€ (Kobelt *et al.* 2006a; Kobelt *et al.* 2006b; Casado *et al.* 2006), dels quals, en el nostre entorn, un 46,5% corresponen a costos directes, un 35,5% a costos indirectes i un 18% a costos intangibles. El cost atribuït als fàrmacs immunomoduladors, que forma part dels costos directes, correspon a un 15,5% del cost global de la malaltia (Casado *et al.* 2006).

1.1.3. Etiologia i factors de risc

Actualment l'etiologia específica de l'EM no és coneguda. Els estudis realitzats en els darrers 25 anys suggereixen que no hi ha una única causa de la malaltia, sinó que l'EM és el resultat d'una complexa interacció entre diferents factors genètics i ambientals, tots ells encara no ben coneguts, que produiran, a través de diferents mecanismes patogènics, les alteracions, símptomes i signes característics de la malaltia.

1.1.3.1. Factors genètics

Estudis epidemiològics i de cribratge genòmic han identificat alguns gens de susceptibilitat candidats a augmentar el risc d'EM.

La justificació de la influència dels factors genètics ve donada per la marcada segregació familiar observada, ja que fins el 20% dels pacients amb EM tenen algun familiar afectat i els familiars de primer grau tenen entre 18 i 36 vegades més probabilitat de presentar la malaltia en comparació amb la població general (Sadovnick i Baird 1988; Ebers i Yee 2000; Dymant *et al.* 2004). No obstant això, aquests factors genètics només confereixen un risc parcial de major susceptibilitat a tenir la malaltia que no és superior al 30%. Aquests factors genètics s'interrelacionen de forma complexa entre ells i amb diversos factors ambientals per tal de conferir la susceptibilitat global a la malaltia (Hauser *et al.*

2013; Baranzini i Nickles 2012). La complexitat del paper dels factors genètics queda palesa en els estudis amb bessons univitel·lins: aquests comparteixen el 100% del material genètic però el risc de tenir EM si un dels bessons univitel·lins pateix la malaltia és només del 33% per l'altra. En bessons bivitel·lins aquest risc és aproximadament del 6,5% (Compston i Coles 2008).

Els gens més implicats a conferir susceptibilitat a la malaltia són els del complex major d'histocompatibilitat (MHC), situats en el cromosoma 6. Dels gens que formen el MHC, el principal locus associat amb més risc per EM és l'antigen leucocitari humà (HLA) de classe II, HLA-DRB1, i més concretament l'haplotip DRB1*1501 (Lincoln *et al.* 2005; Compston i Coles 2008; Ramagopalan *et al.* 2009). Altres gens no associats amb l'HLA han demostrat també exercir certa susceptibilitat en el desenvolupament de la malaltia (Sawcer *et al.* 2011; Beecham *et al.* 2013; Patsopoulos *et al.* 2013), però el risc que confereixen cadascun d'aquests 110 gens descrits recentment relacionats amb l'EM és molt baix. Alguns autors han estimat que els gens HLA expliquen un 13,2% de l'heretabilitat de l'EM, l'haplotip DRB1*1501 un 11,1% i el conjunt de gens no-HLA un 18-24% (Lin *et al.* 2012).

Aquest relatiu baix risc que els factors genètics confereixen en la susceptibilitat a desenvolupar EM, fins i tot en individus genèticament iguals, suggereix que no només el codi genètic en sí, sinó també la regulació de l'expressió genètica d'aquest codi per altres factors és determinant per a desenvolupar la malaltia; és el que s'anomena *regulació epigenètica* (Koch *et al.* 2013). Entre els mecanismes de regulació epigenètica més importants hi ha els fenòmens de metilació de DNA, de modificació d'histones i de regulació posttranscripcional mitjançant miRNAs (Urduingio *et al.* 2009; Portela i Esteller 2010; Esteller 2011; Jakovcevski i Akbarian 2012). Aquest darrer mecanisme, que és el que ha motivat la realització d'aquest treball de tesi doctoral, serà explicat més extensament posteriorment.

1.1.3.2. Factors ambientals

En els darrers 25 anys s'han intentat identificar els factors ambientals més implicats en la patogènia de l'EM (Compston i Coles 2008), entre els quals

destaquem els nivells de vitamina D, el tabac i la infecció pel virus Epstein-Barr (VEB).

La vitamina D és una hormona esteroide que es produeix a la pell i els seus nivells depenen de la ingesta adequada dels seus precursors i de l'exposició de l'individu a la radiació ultraviolada. El risc d'EM augmenta amb nivells baixos de vitamina D (Munger *et al.* 2006). Com ja s'ha comentat abans, la prevalença d'EM augmenta en països situats a més latitud, i avui en dia es creu que la distribució geogràfica de l'EM s'explica per l'exposició solar i pels conseqüents nivells de vitamina D dels individus (Simpson *et al.* 2011). Nivells baixos de vitamina D també s'han associat a un increment del nombre de brots de la malaltia i del grau de discapacitat adquirida, i a un pitjor pronòstic de la malaltia (Smolders *et al.* 2008; Simpson *et al.* 2010). Actualment s'estan duent a termini diferents assajos clínics amb suplementes de vitamina D com a possible tractament de la malaltia (Burton *et al.* 2010).

El tabac ha estat estudiat com a factor de risc de la malaltia durant molts anys. Estudis recents han demostrat que els fumadors tenen un risc més elevat, de fins 1,5 vegades, de patir la malaltia en comparació amb els individus no fumadors (Manouchehrinia *et al.* 2013; Salzer *et al.* 2013).

Les infeccions víriques sempre han estat proposades com un dels factors de risc ambientals associats al desenvolupament d'EM. Entre elles, el VEB és el que ha estat més estudiat i el que té més evidència científica sobre el seu paper en la patogènia de la malaltia. No obstant això, aquests estudis sempre han estat complicats de realitzar i és difícil obtenir conclusions fiables ja que la seropositivitat que té la població general al VEB és molt elevada (al voltant del 95%). Ara bé, la seronegativitat al VEB s'ha associat amb un risc molt baix de desenvolupar EM comparat amb els individus seropositius (Ascherio i Munger 2007). I al contrari, una història d'infecció simptomàtica per VEB, com la mononucleosi infecciosa, dobla aproximadament el risc de desenvolupar EM (Handel *et al.* 2010).

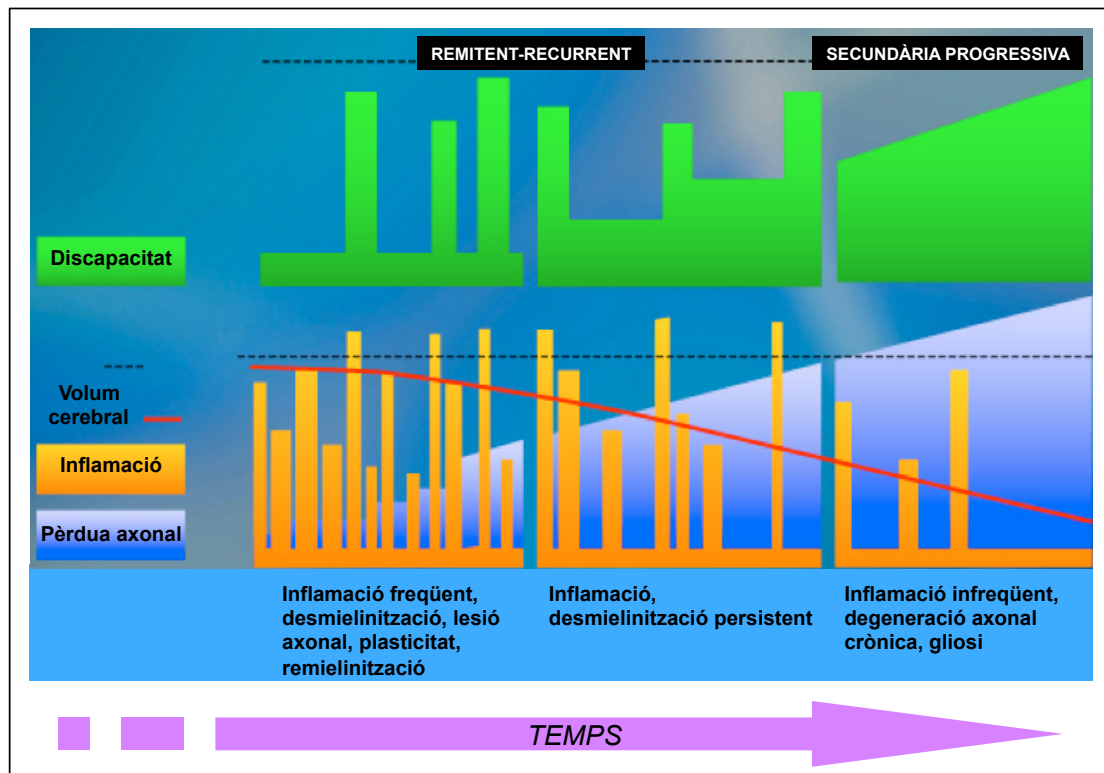
Aquests i d'altres possibles factors ambientals interactuen sobre els factors de predisposició genètica mitjançant canvis o modificacions epigenètiques que finalment seran els responsables del desenvolupament de l'EM.

1.1.4. Patogènia

La hipòtesis patogènica més acceptada avui en dia és que l'EM és fruit de la interrelació entre factors ambientals no ben caracteritzats, una predisposició genètica parcialment coneguda i uns mecanismes epigenètics que recentment s'han començat a estudiar que, en un subjecte determinat, originarien un ampli espectre d'alteracions de la resposta immunitària que serien els causants de les lesions característiques de la malaltia.

Avui en dia és ben conegut i acceptat que en l'EM se superposen dos mecanismes patogènics: la inflamació i la neurodegeneració (Sospedra i Martin 2005; Brück 2005; Hauser i Oksenberg 2006; Compston i Coles 2008), amb afectació tant de la substància blanca com de la substància grisa (Kutzelnigg *et al.* 2005) i amb la participació tant de fenòmens inflamatoris aguts i crònics com de lesió axonal i pèrdua neuronal que són els responsables de la progressió de la malaltia i el desenvolupament de la discapacitat a llarg termini (Trapp *et al.* 1998).

Tot i que ambdós fenòmens patogènics apareixen ja des de l'inici de l'EM (Trapp *et al.* 1998; Kuhlmann *et al.* 2002; Davies *et al.* 2004; Sastre-Garriga *et al.* 2005; Ramió-Torrentà *et al.* 2006) i es relacionen amb la discapacitat física i cognitiva ja en fases precoces (Amato *et al.* 1995; Amato *et al.* 2001; Feillet *et al.* 2007), uns estan més presents a les primeres fases de la malaltia mentre que els altres ho estan en fases posteriors.

Figura 2. Esquema del curs patològic de l'EM.

En les primeres fases de la malaltia, es produeix, en persones susceptibles, una activació anòmala de limfòcits T autoreactius de sang perifèrica (immunitat adquirida) que han escapat dels processos d'autocontrol i d'autoregulació específics de l'individu i que són activats per fenòmens de mimetisme molecular d'èpitops compartits entre la mielina i possibles antígens infecciosos o per activació policlonal a través de superantígens bacterians o vírics.

Aquesta activació de limfòcits T és deguda a la presentació d'antígens endògens o exògens mitjançant cèl·lules presentadores d'antigen a través del MHC de classe II i d'altres molècules coestimuladores al receptor de cèl·lules T dels limfòcits Th1.

Aquests limfòcits activats expressen molècules d'adhesió que, juntament amb proteïnes com selectines i integrines, permetran la seva unió i posterior pas a través de l'endoteli activat de la barrera hematoencefàlica cap a l'espai perivascular que envolta la microcirculació del SNC i migraran posteriorment

cap al SNC mitjançant la secreció de metaloproteases que degradaran la matriu extracel·lular.

Un cop dins del SNC, els limfòcits Th1 activats (bàsicament limfòcits CD4+ i CD8+, però també limfòcits B) reconeixen l'antigen que els va activar inicialment i que els és presentat de nou per cèl·lules presentadores d'antigen com micròglia, monòcits, macròfags i astròcits (immunitat innata), i inicien una resposta inflamatòria tipus Th1 alliberant interferó- γ , factor de necrosi tumoral- α (TNF- α), IL-1, IL-2 i altres citocines i quimiocines que, al seu torn, activaran altres limfòcits Th1 i macròfags que alliberaran més TNF- α , radicals d'oxigen (O_2), òxid nítric (ON) i glutamat que provocaran desmielinització, lesió axonal i lesió d'oligodendròcits. Les cèl·lules Th17 també intervenen en aquest procés alliberant citocines pro-inflamatòries i regulant els fenòmens pro i antiinflamatoris.

La histologia de les lesions actives desmielinitzants es caracteritzen per infiltrats inflamatoris multifocals perivenulars formats bàsicament per diferents tipus de cèl·lules T (CD4+, Th1, Th17, CD8+, Treg i cèl·lules T γ/δ), monòcits, macròfags i elements derivats de la destrucció de la mielina i dels oligodendròcits (Brück 2005).

Es genera un procés en el que intervenen cèl·lules tant del sistema immunitari adquirit com innat (cèl·lules residents del SNC) que, juntament amb diferents citocines i quimiocines com el glutamat, ON, radicals lliures, Ca^{2+} i Na^+ , creen una cascada inflamatòria que permet que es mantingui el procés inflamatori local i participen de la fase més neurodegenerativa de la malaltia.

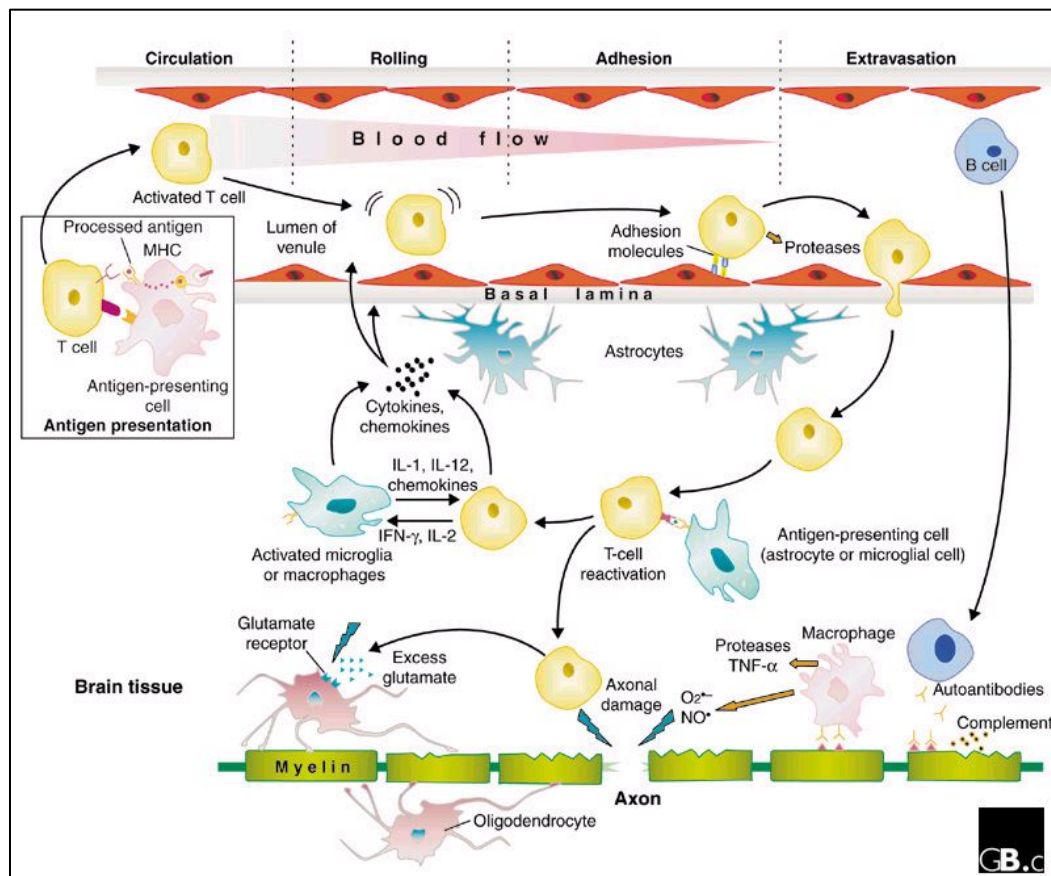
Els limfòcits Th2 també promouen la producció d'anticossos per part de les cèl·lules B que, a través de dipòsit de complement i de la formació de complexos tòxics, provoquen també desmielinització neuronal i lesió d'oligodendròcits. Les cèl·lules B són també les encarregades de la síntesi de les bandes oligoclonals intratecals que s'utilitzen pel diagnòstic de la malaltia (Sospedra i Martin 2005).

Alhora, aquests limfòcits Th2 tenen una funció antiinflamatòria i poden limitar i modular la resposta pro-inflamatòria per part dels limfòcits Th1 mitjançant la

secreció d'IL-4, IL-5, IL-6, IL-10, IL-13, factor de creixement tumoral β i factors neurotròfics com BDNF. Aquest darrer afavoreix la preservació axonal, estimula la proliferació i remielinització dels oligodendròcits i augmenta la supervivència neuronal.

Malgrat haver adquirit molt coneixement en els darrers 25 anys sobre la patogènia de la malaltia i els seus elements, actualment no es coneix amb exactitud com s'articula tota aquesta complexa resposta immunitària.

Figura 3. Esquema de la patogènia de l'EM (Baranzini i Hauser 2002).

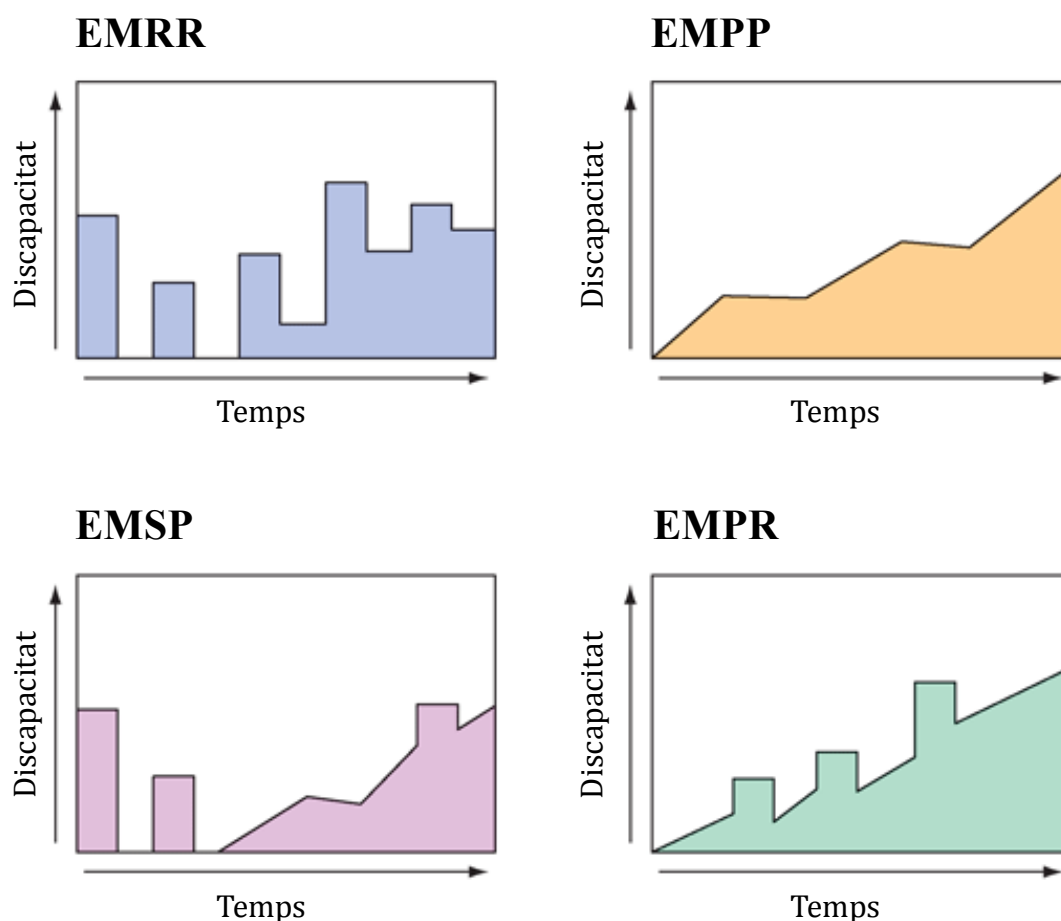


1.1.5. Característiques clíniques

L'EM és una malaltia molt heterogènia tant des del punt de vista patogènic i histopatològic, com també a nivell clínic i de pronòstic.

L'EM s'ha classificat tradicionalment des d'un punt de vista fenotípic clínic en: remitent-recurrent (EMRR), secundària progressiva (EMSP), primària progressiva (EMPP) i progressiva-recurrent (EMPR) (Lublin i Reingold 1996).

Figura 4. Classificació segons fenotip clínic (adaptat de Lublin i Reingold 1996).



Molt recentment, un grup d'experts internacionals, han proposat redefinir els diferents fenotips clínics evolutius d'EM (SCA, EMRR i EM progressiva) segons l'activitat i la progressió de la malaltia en base a la informació clínic i de RM

(Lublin *et al.* 2014). Els autors proposen començar a utilitzar i validar aquests nous descriptors tant en la recerca clínica com en la pràctica clínica diària.

L'EM s'inicia, en el 80-85% dels pacients, en forma d'un brot clínic en el que els pacients tenen un episodi d'afectació d'alguna àrea del SNC (nervi òptic, medul·la, tronc, hemisferis cerebrals o multifocal). Aquesta primera manifestació clínica de la malaltia s'anomena síndrome clínicament aïllada (SCA). Si el pacient presenta nous brots de la malaltia sense progressió entre ells, que poden remetre totalment o deixar seqüeles permanents, s'anomena EM forma remitent-recurrent (EMRR). La història natural de la malaltia evoluciona, en la majoria de casos, cap a l'empitjorament progressiu amb increment de la discapacitat sense brots i, al cap d'entre 10 i 19 anys de l'inici de la malaltia, la meitat dels pacients presentaran un forma secundària progressiva d'EM (EMSP) (Pittock *et al.* 2004; Confavreux i Vukusic 2006). Entre un 15-20% dels pacients presenten ja des de l'inici una forma progressiva de la malaltia sense brots, és l'anomenada EM primària progressiva (EMPP). Una petita proporció d'aquests pacients poden tenir algun brot al llarg d'aquest curs progressiu de la malaltia; és la que s'anomena la forma progressiva-recurrent de la malaltia (EMPR).

Els símptomes de la malaltia són molt variables ja que pot afectar-se qualsevol funció del SNC depenent de a quines àrees es produeixen els fenòmens d'inflamació i neurodegeneració propis de la malaltia (Compston *et al.* 2005; Fernández *et al.* 2011). Els símptomes més freqüents són alteracions motores (90%), sensitives (77%), cerebel·loses (75%), diplopia (60%), pèrdua de visió (20%), cognitives (65%), espasticitat (50%), vertigen (20%), disàrtria (30%), disfàgia (30%), alteracions esfinterianes (90%), disfunció sexual (70%), trastorns afectius (70%), fatiga (75%) i d'altres.

La discapacitat que crea l'EM es produeix tant per la recuperació incompleta i l'aparició de seqüeles després dels brots, com per l'empitjorament gradual i progressiu no associat a aquests.

1.1.6. Diagnòstic de l'EM

L'objectiu del diagnòstic de l'EM és fer un diagnòstic precís i de la manera més simplificada i precoç possible.

El diagnòstic d'EM es basa en demostrar la disseminació en espai de la malaltia (aparició d'almenys dues lesions de localització diferent en el SNC) i la disseminació en temps (aparició de dues lesions separades en el temps).

Un aspecte primordial pel diagnòstic és que els símptomes i signes que presenta un pacient no puguin ésser explicats per un altre procés patològic, i per tant, abans de fer un diagnòstic definitiu d'EM cal haver descartat tota una sèrie molt àmplia de malalties que poden presentar-se d'una forma similar.

Al llarg dels anys la comunitat científica dedicada a l'EM ha anat desenvolupant diferents criteris diagnòstics basats en aspectes clínics de la malaltia i diferents exploracions complementàries com bàsicament la RM i l'estudi de LCR i determinació de bandes oligoclonals (BOC). Des dels primers criteris descrits per Allison i Millar (1954) i dels primers més àmpliament usats de Poser *et al.* (1983), s'han fet grans esforços per crear uns criteris diagnòstics que fossin aplicables arreu del món, a totes les formes de presentació clínica de la malaltia, amb el màxim de precisió i simplicitat possible, conservant una bona sensibilitat i especificitat, i que permetin fer el diagnòstic al més aviat possible després de la primera presentació clínica de la malaltia. Els darrers criteris diagnòstics que s'han proposat i que actualment s'utilitzen són els de McDonald revisats al 2010 (Polman *et al.* 2011). En aquests criteris, la RM té un paper molt important i permeten fer el diagnòstic d'EM després del primer episodi clínic, fins i tot, amb una sola RM.

Taula 1. Criteris diagnòstics d'EM de McDonald 2010 revisats (Polman *et al.* 2011).

Presentació clínica	Dades addicionals pel diagnòstic d'EM
≥2 brots; evidència clínica objectiva de ≥2 lesions o evidència clínica objectiva d'1 lesió amb evidència històrica raonable d'un brot previ	Cap
≥2 brots; evidència clínica objectiva d'1 lesió	DE demostrada per ≥1 lesió en T2 en com a mínim 2 de 4 localitzacions del SNC característiques d'EM (periventricular, juxtacortical, infratentorial, medul·lar); o esperar per un nou brot clínic en una localització diferent del SNC
1 brot; evidència clínica objectiva de ≥2 lesions	DT demostrada per presència simultània de lesions asimptomàtiques realçades i no realçades amb Gd en qualsevol moment; o nova lesió en T2 i/o ≥1 lesió realçada amb Gd en una RM de seguiment; o esperar per un nou brot clínic
1 brot; evidència clínica objectiva d'1 lesió (SCA)	DE i DT, demostrats per: DE: ≥1 lesió en T2 en com a mínim 2 de 4 localitzacions del SNC característiques d'EM (periventricular, juxtacortical, infratentorial, medul·lar); o esperar per un nou brot clínic en una localització diferent del SNC DT: presència simultània de lesions asimptomàtiques realçades i no realçades amb Gd en qualsevol moment; o nova lesió en T2 i/o ≥1 lesió realçada amb Gd en una RM de seguiment; o esperar per un nou brot clínic
Progressió neurològica suggestiva d'EM (EM primària progressiva)	1 any de progressió retrospectiva o prospectiva de la malaltia i 2 dels 3 criteris següents: 1- Evidència per DE per ≥1 lesió en localitzacions del SNC característiques d'EM (periventricular, juxtacortical o infratentorial) 2- ≥2 lesions en la medul·la 3- LCR positiu per BOC positives mitjançant IEF i/o índex IgG elevat

1.1.7. Tractament

Actualment no es disposa de cap tractament curatiu per a l'EM. No obstant això, el coneixement que s'ha adquirit en els darrers 25 anys de la patogènia de la malaltia, ha permès desenvolupar teràpies que permeten reduir parcialment l'activitat inflamatòria i els brots clínics de la malaltia i, en menor grau, la progressió de la discapacitat.

Als anys 90 van aparèixer els primers estudis amb fàrmacs per a l'EM i des d'aleshores s'han dut a termini molts assajos clínics que han demostrat l'eficàcia de diferents molècules per al tractament de la malaltia i han permès que progressivament s'hagin pogut usar nous fàrmacs a la pràctica clínica diària.

Actualment disposem de 6 fàrmacs diferents aprovats per les autoritats sanitàries del nostre entorn per a tractar l'EM: interferó- β (Betaferon®, Extavia®, Rebif®, Avonex®), acetat de glatiràmer (Copaxone®), natalizumab (Tysabri®), fingolimod (Gilenya®), mitoxantrona (Novantrone®) i azatioprina. L'Agència Europea del Medicament ha aprovat tres nous fàrmacs per l'EM que estan pendents d'ésser aprovats al nostre país: terifunomida, dimetil fumarat i alemtuzumab. A més a més, en el moment actual hi ha molts altres fàrmacs en assajos clínics fases II i III com a potencials nous tractaments per a la malaltia. Aquest ampli ventall d'opcions terapèutiques permetrà, en un futur no gaire llunyà, poder tractar d'una forma més adequada els pacients amb EM, permetent seleccionar el pacient adequat per ésser tractat amb el fàrmac més adequat, a la dosi adequada i en el moment més adequat de la seva malaltia; el que anomenem *medicina personalitzada*.

Els fàrmacs per a l'EM actualment més utilitzats a la pràctica clínica són les diferents presentacions d'interferó- β , l'acetat de glatiràmer, el natalizumab i el fingolimod. Estan indicats en diferents formes de la malaltia: SCA, Betaferon®, Extavia®, Avonex® i Copaxone®; EMRR, tots ells; EMSP, Betaferon®, Extavia®, Rebif®; formes EMRR amb mala resposta a interferó- β o acetat de glatiràmer i formes greus d'evolució ràpida, Tysabri® i Gilenya®.

Aquests fàrmacs tenen un perfil d'eficàcia variable demostrada en diferents assajos clínics, que va des d'una reducció de brots de la malaltia moderada del voltant d'un 30% (interferó- β i acetat de glatiràmer) fins a un efecte més important del 60-70% (natalizumab i fingolimod). El perfil d'efectes adversos també és variable: efectes poc greus però relativament freqüents i incòmodes, com la simptomatologia pseudo-gripal (interferó- β), els símptomes postpuncionals immediats en forma de taquicàrdia, dispnea i envermelliment de breu duració (acetat de glatiràmer) i els efectes locals produït per les injeccions subcutànies (interferó- β i acetat de glatiràmer); efectes que requereixen monitorització periòdica, com la leucopènia o hepatotoxicitat (interferó- β); o efectes potencialment més greus, encara que molt menys freqüents, però que requereixen d'una monitorització clínica i d'utilització d'altres proves complementàries (laboratori, RM, ECG o proves oftalmològiques) més estreta i d'un pla de riscos ben establert, com són els efectes cardíacs i l'edema macular (fingolimod) o la leucoencefalopatia multifocal progressiva (natalizumab).

Tots aquests fàrmacs tenen també un efecte important positiu sobre la reducció de l'aparició de noves lesions a la RM però han demostrat, en general, menys efecte sobre la reducció de la progressió de la discapacitat. Això reflecteix que aquests fàrmacs actuen bàsicament a les primeres fases de la malaltia on predominen els fenòmens patogènics inflamatoris, i menys en les fases més tardanes on els fenòmens neurodegeneratius dominen i són els responsables de l'acumulació progressiva de la discapacitat.

Malgrat la disponibilitat avui en dia de diferents tractaments per a l'EM, no tots els pacients poden aconseguir un òptim control de la malaltia, i molts d'ells continuen encara presentant brots clínics i incrementen progressivament la seva discapacitat física i cognitiva. Les causes d'aquesta resposta subòptima -que són multifactorials- no són, avui en dia, encara ben conegudes. S'està fent un gran esforç en els darrers anys per identificar quins són aquests factors i per reconèixer de forma precoç els pacients que tindran una resposta subòptima als diferents tractaments per l'EM (Río *et al.* 2006; Bertolotto i Gilli 2008; Río *et al.* 2009; Río *et al.* 2009b; Sormani *et al.* 2013a; Sormani *et al.* 2013b). Identificar de forma precoç aquests pacients és de vital importància, no només per estalviar

temps i diners als pacients i al sistema sanitari, sinó per reduir l'activitat inflamatòria i la progressió de la malaltia el més aviat possible i per millorar la qualitat de vida d'aquests pacients.

Diferents societats científiques, a causa de les diverses i múltiples alternatives terapèutiques amb diferent eficàcia en cada forma clínica de la malaltia i amb un perfil benefici/risc propi, han proposat algoritmes que són útils per ajudar a prendre decisions terapèutiques a la pràctica clínica diària (Álvarez-Cermeño *et al.* 2007; Agència d'Informació, Avaluació i Qualitat en Salut 2012).

Figura 5. Algoritme per al tractament de l'EMRR proposat per l'Agència d'Informació, Avaluació i Qualitat en Salut (2012).

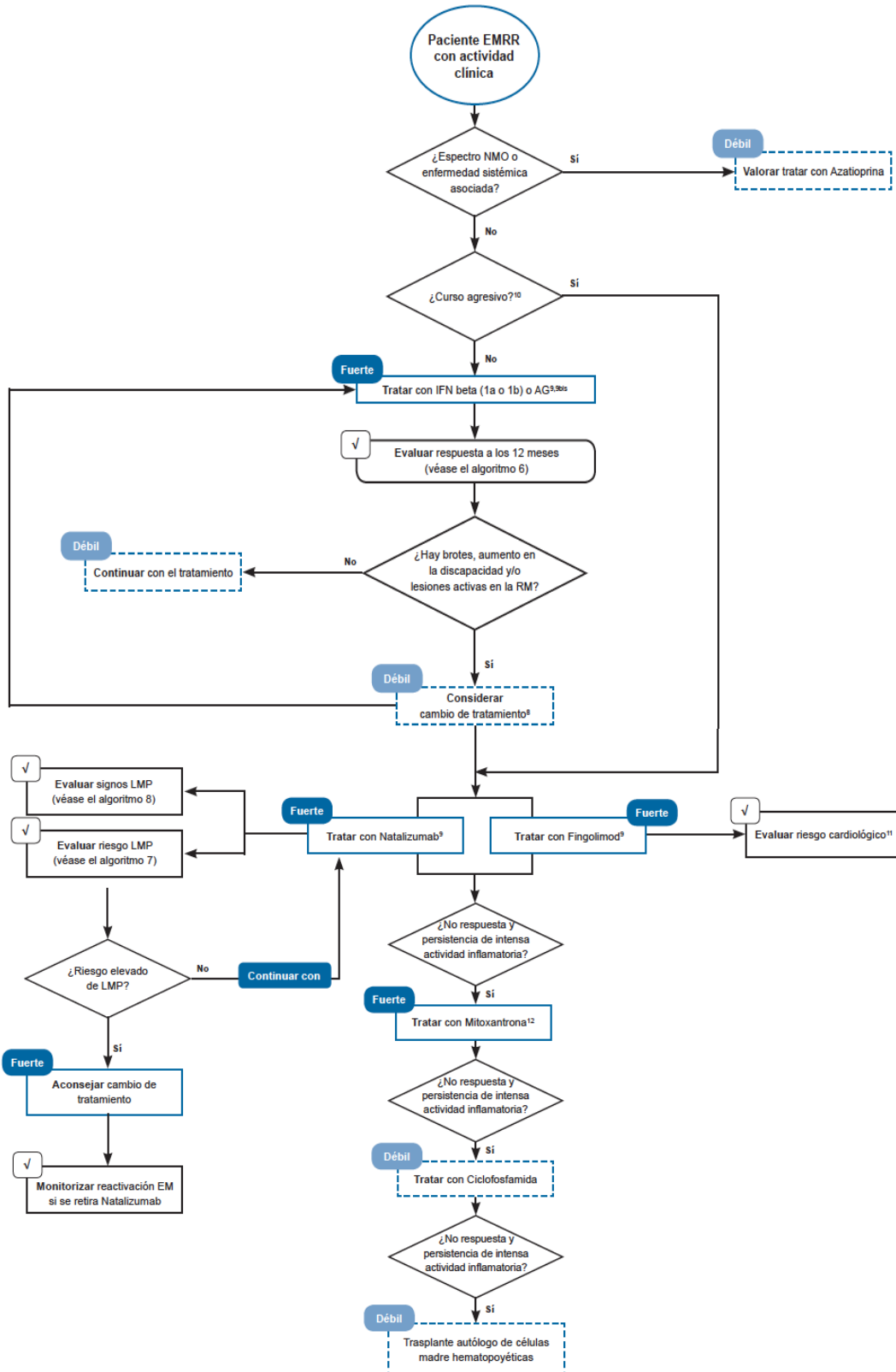
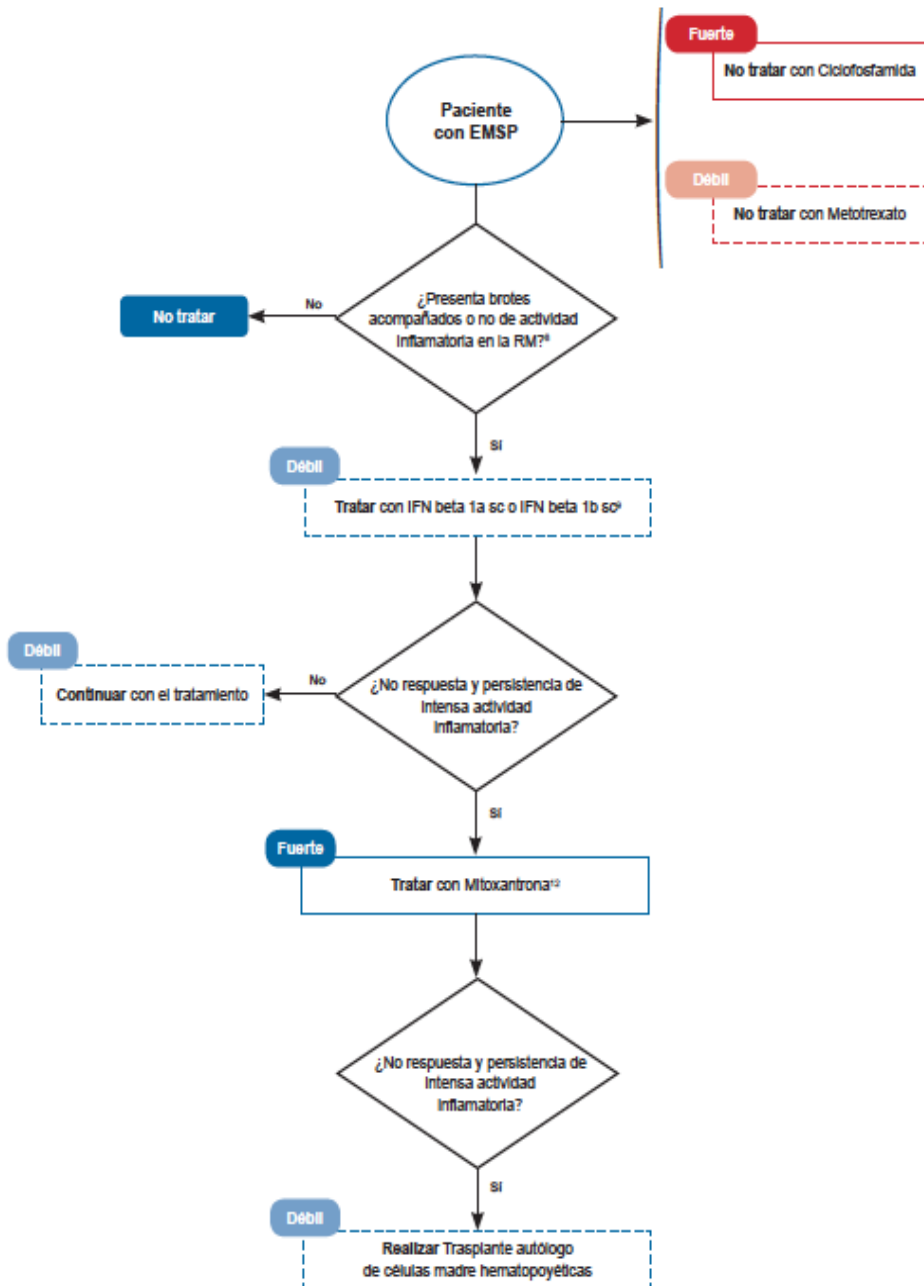


Figura 6. Algoritme per al tractament de l'EMSP proposat per l'Agència d'Informació, Avaluació i Qualitat en Salut (2012).



1.2. BIOMARCADORS EN ESCLEROSI MÚLTIPLE

Un biomarcador o marcador biològic és una característica que pot ser mesurada i avaluada objectivament com un indicador de processos biològics, de processos patogènics o com un indicador de resposta terapèutica. Els biomarcadors també permeten clarificar les vies mecanístiques implicades en les diferents malalties i millorar el coneixement de la seva neuropatologia i, d'aquesta manera, poden ajudar en el diagnòstic diferencial de malalties fenotípicament similars. La seva utilització requereix una quantificació i una validació clínica confirmada en diferents laboratoris i estudis independents. Un biomarcador òptim ha de ser simple, sensible, específic, reproducible, cost-efectiu i estable al llarg del temps (Atkinson *et al.* 2001).

Un biomarcador subrogat és un marcador biològic que substitueix un criteri de valoració clínic amb qui té una forta associació en base a una evidència científica i que permet predir un pronòstic o benefici clínic (Atkinson *et al.* 2001).

Els biomarcadors es poden classificar de diferents maneres: segons l'objectiu a respondre (factor de risc, diagnòstic, pronòstic, resposta a tractament), segons l'estructura o funció que mesuren (genètics, moleculars, clínics, d'imatge), segons el mecanisme patogènic que mesurin (en el cas d'EM pot ser inflamació, desmielinització, lesió axonal, remielinització, regeneració) o segons el tipus de mostra biològica d'on s'obtingui (sang, LCR, orina, llàgrima, saliva, etc.) (Atkinson *et al.* 2001).

La identificació de biomarcadors en l'EM és complicada ja que es tracta d'una malaltia altament complexa tant des del punt de vista patogènic, de presentació clínica, d'evolució, de pronòstic, com també de resposta als diferents tractaments, però la seva determinació és molt important per comprendre millor la patogènia de la malaltia, permetre un millor i més precoç diagnòstic, ajudar en el seu diagnòstic diferencial, millorar el coneixement actual sobre el pronòstic evolutiu de la malaltia tant a curt com a llarg termini, comprendre millor l'efecte dels diferents tractaments, identificar futures dianes terapèutiques, plantejar

nous estudis sobre la malaltia, identificar nous biomarcadors, i, en definitiva, orientar el maneig de la malaltia cap a una medicina més personalitzada (Rudick 2012).

Des de fa anys s'ha treballat intensament en la recerca de biomarcadors en l'EM i se n'han identificat alguns que podrien ser candidats molt prometedors per ésser usats per al diagnòstic precoç de la malaltia, per identificar els diferents perfils clínics, per al pronòstic i per a la monitorització de la resposta terapèutica (Villoslada 2010; Hampel *et al.* 2011; Katsavos i Anagnostouli 2013; Fernández *et al.* 2013). Malauradament, encara pocs d'ells s'han validat adequadament i això limita la seva aplicabilitat clínica. En els darrers anys la recerca s'està focalitzant més en la validació clínica dels biomarcadors ja existents que en la descoberta i la identificació de nous (Rudick 2012).

1.2.1. Biomarcadors clínics

L'EM és una malaltia clínicament heterogènia fent que sigui impossible poder donar un pronòstic concret, precís i de forma precoç a un pacient individual. No obstant això, hi ha molts estudis sobre la seva història natural i s'han identificat una sèrie de variables clíniques que es relacionen, de forma genèrica, amb la seva evolució i el seu pronòstic a llarg termini (Weinshenker *et al.* 1989; Runmarker i Andersen 1993; Weinshenker 1998; Kremenchutzky *et al.* 1999; Confavreux *et al.* 2000; Confavreux *et al.* 2003; Confavreux i Vukusic 2006; Degenhardt *et al.* 2009).

Les principals variables clíniques que s'han trobat relacionades amb el pronòstic i evolució de la malaltia són l'edat d'inici, el gènere, la forma de debut de la malaltia, el nombre de brots i l'evolució durant els primers 2 i 5 anys de la malaltia (taula 1).

La forma fenotípica inicial de la malaltia està relacionada estretament amb el pronòstic de la discapacitat; les formes progressives arriben abans a discapacitats més elevades que les formes remitents-recurrents.

L'edat d'inici de la malaltia està inversament relacionada amb la velocitat de progressió de la discapacitat; una edat més precoç tarda més a arribar a discapacitats més elevades, però com que comencen la malaltia abans, arriben a discapacitats mesurades mitjançant l'Escala de discapacitat ampliada de Kurtze (1983) de 4 o 6 a edats similars als pacients que inicien la malaltia més tard.

Tot i que la malaltia és 3 vegades més freqüent en dones, els homes tenen una progressió de la discapacitat més accelerada que les dones.

La forma de debut de la malaltia està relacionada amb el pronòstic a mig-llarg termini: els brots de neuritis òptica i sensitius tenen més bon pronòstic que els motors, cerebel·losos, de tronc o medul·lars. El debut monosimptomàtic també té és bon pronòstic que el polisimptomàtic.

Taula 2. Variables clíniques associades al pronòstic de l'EM.

Bon pronòstic	Mal pronòstic
Sexe femení	Sexe masculí
Debut en edat jove	Debut en edat més avançada
Inici: neuritis òptica, brot sensitiu	Inici: Brot motor, cerebel·lós, tronc, medul·la
Brot inicial monosimptomàtic	Brot inicial polisimptomàtic
Forma: remitent-recurrent	Forma: progressiva
Recuperació completa	Recuperació incompleta
Interval llarg entre els primer i segon brot	Interval curt entre els primer i segon brot
Pocs brots els primers 2 anys	Molts brots els primers 2 anys
Molt temps per arribar a EDSS 3	Poc temps per arribar a EDSS 3
Poca discapacitat els primers 2-5 anys	Alta discapacitat els primers 2-5 anys

L'activitat de la malaltia en forma de brots clínics, sobretot durant els primers dos anys, és un factor pronòstic d'evolució posterior. No obstant això, aquest efecte es manté només fins arribar a una discapacitat mesurada per EDSS de 3-4,

ja que a partir de llavors la discapacitat progressa de forma continua i bastant homogènia i amb independència dels brots previs i posteriors (Leray *et al.* 2010).

Aquestes variables clíniques associades a un pitjor pronòstic evolutiu de la malaltia per història natural, només semblen tenir importància durant la fase remitent-recurrent, ja que quan els pacients entren en la fase progressiva de la malaltia, que sol ocórrer al voltant dels 40 anys d'acord amb aquests estudis d'història natural, independentment de si inicialment van començar amb una forma remitent-recurrent o directament amb una forma progressiva, l'acumulació de discapacitat a partir d'aquest moment és independent de les variables clíniques i de l'activitat inflamatòria de la malaltia (Confavreux *et al.* 2003).

1.2.2. Biomarcadors genètics i moleculars

En l'EM s'han proposat diferents tipus de biomarcadors genètics i moleculars: per diferents objectius (diagnòstic, forma de presentació clínica, pronòstic, evolució de la discapacitat, resposta a tractament), per procés patogènic (inflamació, desmielinització, pèrdua axonal, neurodegeneració) i en diferents tipus de mostra (sang, LCR, orina, llàgrimes, saliva i biòpsies de teixit cerebral) (Villoslada 2010; Fernández *et al.* 2013; Katsavos i Anagnostouli 2013).

A nivell de biomarcadors en sang s'han identificat en els darrers 20 anys diferents molècules, algunes de les quals podrien ser en un futur potencials biomarcadors. D'aquests el que actualment està més validat i s'utilitza en la pràctica clínica diària, són els anticossos anti-aquaporina4 que tenen molt valor pel diagnòstic de la neuromielitis òptica com a diagnòstic diferencial de l'EM (Wingerchuk *et al.* 2007).

El LCR ha estat on també s'han estudiat, per les seves característiques particulars, possibles biomarcadors per l'EM. El més important, validat i que actualment s'utilitza de forma més generalitzada, són les bandes oligoclonals

d'IgG. En els darrers anys també estan agafant importància les bandes oligoclonals d'IgM. De totes dues, se n'ampliarà la informació més endavant.

També s'han identificat altres molècules que potencialment podrien ser de gran utilitat com a biomarcadors de pronòstic si acaben finalment validant-se, com són els neurofilaments (Salzer *et al.* 2010; Kuhle *et al.* 2011; Gunnarsson *et al.* 2011; Teunissen i Khalil 2012) i la chitinasa 3-like1 (Comabella *et al.* 2010). Els microRNAs són unes altres molècules que regulen l'expressió genètica a nivell posttranscripcional i que recentment estan agafant importància com a potencials biomarcadors de diverses malalties, incloses les neurodegeneratives i, específicament, l'EM. Aquestes en concret són les que han despertat l'interès i han motivat la realització d'aquest treball de tesi doctoral.

1.2.3. Biomarcadors d'imatge

Hi ha diferents tècniques relacionades amb la imatge que s'han estudiat i s'han proposat com a biomarcadors de diagnòstic i pronòstic de l'EM.

La **tomografia de coherència òptica** és una tècnica relativament nova d'imatge del nervi òptic podria ser candidata a ésser utilitzat en el futur en la pràctica clínica diària com a biomarcador de neurodegeneració (Pulicken *et al.* 2007; Gordon-Lipkin *et al.* 2007; Toledo *et al.* 2008; Petzold *et al.* 2010; Oreja-Guevara *et al.* 2010; Oreja-Guevara *et al.* 2012).

Els **potencials evocats**, que anys enrere s'utilitzaven de forma quasi rutinària en el procés diagnòstic de l'EM, avui en dia, gràcies a l'avenç tecnològic de la RM i a la seva alta sensibilitat per a la detecció de lesions subclíniques d'EM, s'utilitzen en molt poques ocasions i la seva utilitat en aquesta malaltia està en discussió tot i que hi ha estudis que suggereixen el seu potencial paper com a mesura pronòstica i de neurodegeneració (Fuhr *et al.* 2001; Jung *et al.* 2008; Rico *et al.* 2009; Schlaeger *et al.* 2012).

La **RM** és el biomarcador d'imatge en EM més ben validat i acceptat, i s'utilitza en la pràctica clínica diària tant per al diagnòstic i el seguiment de la malaltia i, en els darrers anys, hi ha cada vegada més evidència que proporciona una valuosa informació que és útil pel maneig terapèutic dels pacients afectats d'EM.

S'utilitza en el diagnòstic per demostrar la disseminació en espai i en temps de la malaltia. Actualment és la principal exploració complementària inclosa en els criteris diagnòstics d'EM de McDonald 2010 revisats (Polman *et al.* 2011) i, en ocasions, només una sola RM permet fer el diagnòstic definitiu d'EM en un pacient amb debut clínic suggestiu de la malaltia.

La RM s'utilitza com a biomarcador d'activitat de la malaltia tant a la pràctica clínica com en assajos clínics. La presència de lesions realçades amb gadolini o noves lesions en T2 ens indica una elevada probabilitat de tenir un nou brot clínic o que apareguin noves lesions en RM a curt termini (Rovira i León 2008; Filippi i Rocca 2011).

El valor de l'activitat de la malaltia demostrada per RM com a biomarcador pronòstic de discapacitat és variable: per una banda, hi ha una baixa correlació entre les lesions que realcen amb gadolini i la discapacitat en formes d'EM remitent-recurrent i sobretot en formes secundàries progressives (Kappos *et al.* 1999), però per altra, hi ha una correlació moderada entre el nombre de lesions basals a la RM inicial i la discapacitat a llarg termini (Tintoré *et al.* 2006), i l'increment de la càrrega lesional en T2 durant els primers anys de la malaltia s'ha associat amb la probabilitat de desenvolupar una forma secundària progressiva de la malaltia (Fisniku *et al.* 2008).

Les mesures d'atròfia cerebral, dirigides a avaluar els processos neurodegeneratius de la malaltia, estan moderadament correlacionades amb la discapacitat en formes d'EM remitent-recurrent i secundària progressiva (Giorgio *et al.* 2008). Els mètodes de segmentació identifiquen patrons d'atròfia cerebral regional tant de substància blanca com, sobretot, de substància gris que es correlacionen, ja a l'inici de la malaltia, amb la discapacitat, la càrrega lesional

en T2 i el trastorn cognitiu (Chard *et al.* 2002; Fisher *et al.* 2002; Dalton *et al.* 2004; Riccitelli *et al.* 2011).

La presència d'atròfia medul·lar, sobretot a nivell cervical, es pot detectar ja també en fases inicials de la malaltia i s'ha correlacionat de forma moderada amb la progressió de la discapacitat (Losseff *et al.* 1996; Miller *et al.* 2002; Agosta i Filippi 2007).

Les tècniques convencionals de RM mostren, en general, una moderada relació amb la discapacitat a llarg termini. Per aquest motiu, s'ha estudiat si les tècniques no convencionals de RM podrien ser més bons biomarcadors de pronòstic. La transferència de magnetització, l'espectroscòpia, la difusió, la tractografia, la identificació i quantificació de lesions intracorticals, la identificació de dipòsits de ferro, la identificació de vècules intraplaques, la utilització d'aparells d'alt camp magnètic (3T i 7T) i la RM funcional, són algunes d'aquestes noves tècniques que s'estan validant com a potencials futurs biomarcadors d'imatge tant de diagnòstic com de pronòstic de la malaltia (Filippi i Rocca 2011).

La RM també pot ser utilitzada com a biomarcador de resposta al tractament de l'EM. De fet, els assajos clínics mostren una forta correlació (>80%) entre l'efecte del tractament en les lesions actives identificables en RM i l'efecte sobre els brots (Sormani *et al.* 2011), mentre que la seva correlació amb la discapacitat és més dèbil (Sormani *et al.* 2010).

En els darrers anys alguns estudis han demostrat que la RM també pot utilitzar-se com a biomarcador de resposta terapèutica a nivell individual i que la combinació d'informació clínica (nombre de brots i increment de la discapacitat mesurada mitjançant l'escala EDSS) juntament amb informació provinent de la RM convencional (noves lesions en T2 o realçades amb gadolini) després d'un any de tractament amb interferó- β té un valor pronòstic significatiu per identificar els pacients que presentaran activitat clínica i progressió de la malaltia durant els següents 2, 3 i fins i tot 4 anys (Río *et al.* 2006; Río *et al.* 2009a; Río *et al.* 2009b; Sormani *et al.* 2013b; Sormani i De Stefano 2013).

Aquest anomenat *Río-score* permetria identificar de forma precoç els pacients considerats no-respondors després d'un any de tractament amb immunomoduladors.

1.3. BANDES OLIGOCLONALS

Les bandes oligoclonals són fraccions d'immunoglobulines que es detecten en diferents fluids corporals i que són produïdes per diversos clons de cèl·lules plasmàtiques.

1.3.1. Bandes oligoclonals d'IgG

Les bandes oligoclonals d'IgG en LCR (BOCG) corresponent a la síntesi intratecal d'immunoglobulines IgG i estan presents en la majoria dels pacients amb EM i la seva detecció ajuda en el diagnòstic de la malaltia. La seva presència en el LCR però no en el sèrum (BOCG+) indica que la síntesi d'aquestes immunoglobulines s'ha produït en el SNC per un nombre limitat de clons de cèl·lules plasmàtiques com a resposta a antígens lipídics associats a la mielina (Compston *et al.* 2005; Villar *et al.* 2005).

Hi ha diferents mètodes per a l'anàlisi de les BOCG que poden tenir resultats diferents en quant a sensibilitat, especificitat i reproductibilitat (Andersson *et al.* 1994). Per això s'han establert unes normes de consens per a l'anàlisi de la síntesi intratecal d'IgG per al diagnòstic d'EM (Freedman *et al.* 2005) i es recomana l'estudi qualitatiu mitjançant tècniques d'isoelectroenfoc i immunodetecció (Sádaba *et al.* 2004), i quan s'utilitza la fosfatassa alcalina per a la immunodetecció s'obté la sensibilitat més alta (Villar *et al.* 2009a).

Un meta-anàlisi i revisió sistemàtica recent (Dobson *et al.* 2013) ha analitzat els resultats de 71 articles publicats sobre els resultats de les BOCG en 12.253 pacients amb EM i 2.685 pacients amb SCA. El 87,7% dels pacients amb EM i el 68,6% dels pacients amb SCA tenien BOCG+ en LCR. Una altra revisió sistemàtica recent (Petzold 2013) que ha inclòs l'anàlisi en profunditat de 49 estudis publicats sobre BOCG utilitzant les guies recomanades d'anàlisi i interpretació de resultats en pacients amb EM, pacients amb altres malalties neurològiques

inflamatòries i no inflamatòries i controls, va trobar que la presència de BOCG té una sensibilitat del 93% i una especificitat del 94% per al diagnòstic d'EM, però que l'especificitat es redueix al 61% quan s'analitzen pacients amb EM i pacients amb altres malalties neurològiques de patogènia inflamatòria.

Aquestes dades indiquen que l'absència de BOCG no necessàriament descarta l'EM. Es coneix que la variant al·lèlica HLA-DRB1*04:04 es correlaciona amb BOCG negatives (Mero *et al.* 2013), que la població amb EM no caucàsica (per exemple, asiàtica i brasilera) té un percentatge menor de BOCG positives (Li *et al.* 2007; Gama *et al.* 2009) i, encara que no s'ha trobat l'explicació, hi ha una correlació moderadament positiva entre BOCG+ i la latitud (Lechner-Scott *et al.* 2012; Dobson *et al.* 2013). També és conegut que poden existir diferències en les tècniques, la metodologia i la interpretació de les dades que poden influir en el resultat, motiu pel qual es van establir les recomanacions d'anàlisi del LCR i determinació de BOCG abans esmentades. No obstant això, la negativitat de BOCG en LCR en pacients amb sospita d'EM ha de fer replantejar el diagnòstic d'EM cap a d'altres malalties amb una presentació clínica i radiològica similar.

Els pacients amb un SCA i BOCG negatives, tenen un risc molt baix de desenvolupar EM (valor predictiu negatiu del 88%) que és similar als pacients que no compleixen criteris de RM de Barkhof per disseminació en espai (Tintore *et al.* 2001; Barkhof *et al.* 1997).

D'altra banda, les BOCG no són específiques d'EM i poden estar presents en altres malalties neurològiques de patogènia immunològica: malalties desmielinitzants del sistema nerviós perifèric; infeccions agudes o cròniques del SNC com la neuroborreliosi; malaltia de motoneurona; malalties inflamatòries sistèmiques com la sarcoïdosi, malaltia de Sjögren, LES, malaltia de Behçet, síndrome anticardiolipina; síndromes paraneoplàstiques; limfomes i altres neoplàsies del SNC; malalties neurodegeneratives. En aquests casos, però, altres dades del LCR, dades clíniques i dades radiològiques poden ajudar a diferenciar aquestes altres malalties de l'EM (Compston *et al.* 2005; Petzold 2013).

En un estudi es va analitzar si les BOCG afegien informació a la RM per predir el desenvolupament d'un segon brot en pacients amb síndrome clínicament aïllada (Tintoré *et al.* 2008). Els resultats foren que la presència de BOCG en LCR doblaven el risc de tenir un segon atac independentment de la RM i que la seva presència era clínicament rellevant sobretot en pacients amb RM normal o que no complien criteris de Barkhof per disseminació en espai. En aquest estudi, amb 415 pacients amb SCA estudiats prospectivament, la presència de BOCG en LCR estava present en el 27% dels pacients sense lesions a la RM, en el 64% dels pacients que tenien entre 1 i 9 lesions en T2 a la RM i en el 83% de pacients amb més de 9 lesions T2 a la RM inicial.

Recentment s'ha observat canvis en la presència de BOCG i alguns tractament immunomoduladors utilitzats en l'EM. Dos estudis han demostrat que el tractament amb natalizumab s'associa a una reducció de la presència de BOCG en el LCR dels pacients tractats: en 4 de 6 pacients al cap d'una mitjana de 10 infusions en un estudi (Von Glehn *et al.* 2012), i en el 84% d'una cohort de 73 pacients al cap d'una mitjana de 30 mesos de tractament en un altre estudi (Harrer *et al.* 2013), suggerint que el natalizumab interfereix en la producció intratecal d'IgG.

Tot i que en els criteris diagnòstics que actualment s'utilitzen per al diagnòstic d'EM, Criteris de McDonald 2010 revisats, (Polman *et al.* 2011) només està inclosa la necessitat de determinar les BOCG per fer el diagnòstic de la forma primària progressiva d'EM, aquestes són útils en el diagnòstic diferencial de la malaltia, per fer un diagnòstic més acurat i evitar un diagnòstic erroni tant pel propi pacient, com pel neuròleg i com pel sistema sanitari.

La seva determinació és especialment útil en les següents situacions:

- 1- En pacients amb SCA o sospita d'EM amb una RM normal o que no compleix criteris de Barkhof per disseminació en espai o temps (per exemple, si debuten en forma de neuritis òptica o mielitis sense lesions cranials suggestives d'EM).

- 2- En pacients amb altres malalties neurològiques que es poden presentar amb símptomes similars i alteracions radiològiques de substància blanca difícils de diferenciar de l'EM (per exemple, pacients amb lesions isquèmiques de petit vas o migranya, o pacients amb lesions inespecífiques de substància blanca) (Solomon *et al.* 2012).
- 3- En pacients amb clínica inespecífica però amb RM que compleix criteris de Barkhof per disseminació en espai o temps.
- 4- Cal replantejar-se el diagnòstic d'EM en pacients amb sospita diagnòstica però història clínica dubtosa i BOCG negatives.

La determinació de les BOCG, juntament amb la RM, són els biomarcadors de diagnòstic més utilitzats per l'EM.

1.3.2. Bandes oligoclonals d'IgM

En l'EM també hi ha síntesi intratecal d'immunoglobulines IgM i la detecció de BOCM en el LCR i sèrum és el millor mètode per investigar la síntesi intratecal d'IgM (Sharief *et al.* 1990).

En els darrers anys s'han posat a punt tècniques de detecció BOCM i cada vegada hi ha més dades sobre la importància de la seva determinació pel maneig de l'EM.

Es poden detectar BOCM fins en el 40% del LCR de pacients amb EM utilitzant una tècnica molt similar a la utilitzada per la determinació de BOCG (Villar *et al.* 2001; Villar *et al.* 2009a). Aquestes BOCM també són inespecífiques i es poden detectar en altres malalties de patogènia inflamatòria (Villar *et al.* 2002a).

Les BOCM s'han associat, en els darrers anys, a factors de mal pronòstic de l'EM com la conversió precoç de SCA a EM, a una major discapacitat a mitjà termini i a una mala resposta al tractament immunomodulador com interferó- β i acetat de glatiràmer (Fernández *et al.* 2013).

Villar *et al.* (2003) van trobar en un grup de pacients amb EM amb un seguiment entre 5 i 16 anys, que el 63,6% dels que tenien BOCM+ arribaven a EDSS de 6,

mentre que cap dels pacients amb BOCM negatives arribaven a EDSS > 3, i que el 70,8% dels pacients amb BOCM+ desenvolupaven una forma secundària progressiva, mentre que cap dels pacients amb BOCM negatives ho feia. Aquests resultats foren validats per Perini *et al.* (2006) que va observar que l'índex d'IgM a l'inici de la malaltia es correlacionava indirectament amb el temps d'aparició del següent brot i directament amb la discapacitat als 10 anys d'evolució de la malaltia.

A més a més, s'ha correlacionat l'índex IgM amb la càrrega lesional en T1, T2 i atròfia cerebral en formes EMRR, i amb la càrrega lesional periventricular en formes EMSP (Jongen *et al.* 2007).

Finalment s'ha observat una associació entre la presència de BOCM i la necessitat de rebre tractament immunomodulador. García-Barragán *et al.* (2009) van objectivar en un estudi prospectiu que el 100% dels pacients amb SCA amb BOCM positives van requerir tractament immunomodulador de primera línia per criteris clínics durant el seguiment, mentre que només fou així en el 44% dels pacients amb BOCM negatives; això suggereix que les BOCM poden ser biomarcadors per a seleccionar, de forma precoç, pacients candidats a tractament immunomodulador.

1.3.3. Bandes oligoclonals d'IgM lípidespecífiques

L'IgM es produeix en el SNC pels limfòcits B CD5+ i reconeixen antígens no proteics (Villar *et al.* 2010). En el 80% dels casos, les BOCM reconeixen diferents lípids de la mielina, principalment fosfatidilcolina, però també fosfolípids, cerebròsids, esfingomielina o gangliòsids (Villar *et al.* 2005). Aquestes són les que anomenem BOCM lípidespecífiques (BOCM_LE) i són les que específicament confereixen un factor de mal pronòstic per a l'EM. El 20% dels pacients que tenen BOCM_LE negatives tenen una evolució similar als pacients amb BOCM negatives.

En estudis de necròpsies de pacients amb EM (Sádaba *et al.* 2012) s'ha detectat tant la presència d'IgM com d'IgG en la superfície dels axons i en les membranes dels oligodendròcits tant en lesions agudes, cròniques actives com cròniques inactives, i també en oligodendròcits de substància blanca aparentment normal. També es van trobar co-localitzades amb el factor C3b del complement i en macròfags escumosos en àrees de lesions actives, suggerint que tant l'IgM com l'IgG podrien tenir un paper en la patogènia de la malaltia.

Aquests resultats foren corroborats per Thangarajh *et al.* (2008) en un estudi en que es van analitzar pacients amb un seguiment de més d'11 anys que van confirmar que els pacients amb BOCM_LE positives tenien més probabilitat de desenvolupar de forma més precoç una forma secundària progressiva i arribar a un EDSS de 4.

La presència de BOCM_LE en pacients amb SCA és un factor de risc per a convertir a EM i s'han correlacionat amb el temps de conversió (Villar *et al.* 2002b; Boscá *et al.* 2010; Ferraro *et al.* 2013). Els pacients amb SCA i BOCM_LE positives tenen una probabilitat més alta de convertir a EM clínicament definida, tenen més brots i adquireixen més grau de discapacitat durant els 2 primers anys d'evolució de la malaltia (Villar *et al.* 2002b). En altres estudis també s'ha vist que els pacients amb SCA i BOCM_LE positives tenen 39,6 vegades més risc de convertir a EM comparat amb els que tenen BOCG negatives i 4,4 vegades més comparat amb els que tenen BOCG positives però BOCM negatives (Boscá *et al.* 2010).

Les BOCM_LE s'han correlacionat també amb dades RM. La seva presència en pacients amb SCA s'ha correlacionat amb el volum lesional en T2 i amb l'atròfia cerebral als 2 anys d'evolució de la malaltia (Magraner *et al.* 2012).

Finalment, s'han associat les BOCM_LE a la resposta terapèutica a fàrmacs immunomoduladors.

La presència de BOCM_LE s'ha associat a una mala resposta terapèutica a interferó- β en pacients amb EMRR amb una mitjana de seguiment de 37,4 mesos (Bosca *et al.* 2010): els pacients amb BOCM_LE positives, comparats amb els que

les tenien negatives, van presentar significativament més brots durant el primer any, major taxa global de brots, menys proporció de pacients lliures de brots i més risc d'increment de discapacitat mantinguda durant el seguiment.

En un estudi realitzat amb un grup reduït de pacients (Villar *et al.* 2012) es va observar que el tractament amb natalizumab s'associava a la reducció dels nivells d'IgM, de limfòcits B CD5+ i, en menor mesura, els nivells d'IgG en el LCR dels pacients responedors i lliures d'activitat de la malaltia durant els 2 primers anys de tractament. En un altre estudi multicèntric internacional liderat pel grup de la Dra. Luisa M. Villar (Hospital Ramon y Cajal, Madrid) pendent de publicar s'ha observat que els pacients amb BOCM_LE positives i tractats amb natalizumab tenen menys incidència d'LMP que els pacients amb BOCM_LE negatives, suggerint que les BOCM_LE poden ajudar a determinar el risc de complicacions greus en pacients tractats amb aquest fàrmac.

Tots aquests estudis aporten dades per permetre considerar la determinació i utilització de les BOCM_LE com a possible biomarcador de pronòstic d'EM i, fins i tot, de resposta terapèutica, podent ajudar, en un futur, a prendre decisions terapèutiques en els pacients amb EM.

1.4. ELS microRNAs

1.4.1. Generalitats

Les seqüències més ben estudiades del genoma humà són els gens que codifiquen proteïnes. Els exons d'aquests gens representen només un 2% del genoma. En els darrers anys s'ha comprovat que la part del genoma no codificant és bàsica per al desenvolupament i fisiologia normal dels individus i, alhora, està molt implicada en la patogènia de diferents malalties (Mercer *et al.* 2009).

Els microRNAs (miRNAs), identificats en mamífers, peixos, insectes, cucs i plantes, són la família més àmpliament estudiada d'un ampli grup de molècules de RNA no codificant que en els darrers anys estant essent investigats de forma molt extensa i s'estan implicant progressivament i de forma important en diferents malalties (Esteller 2011).

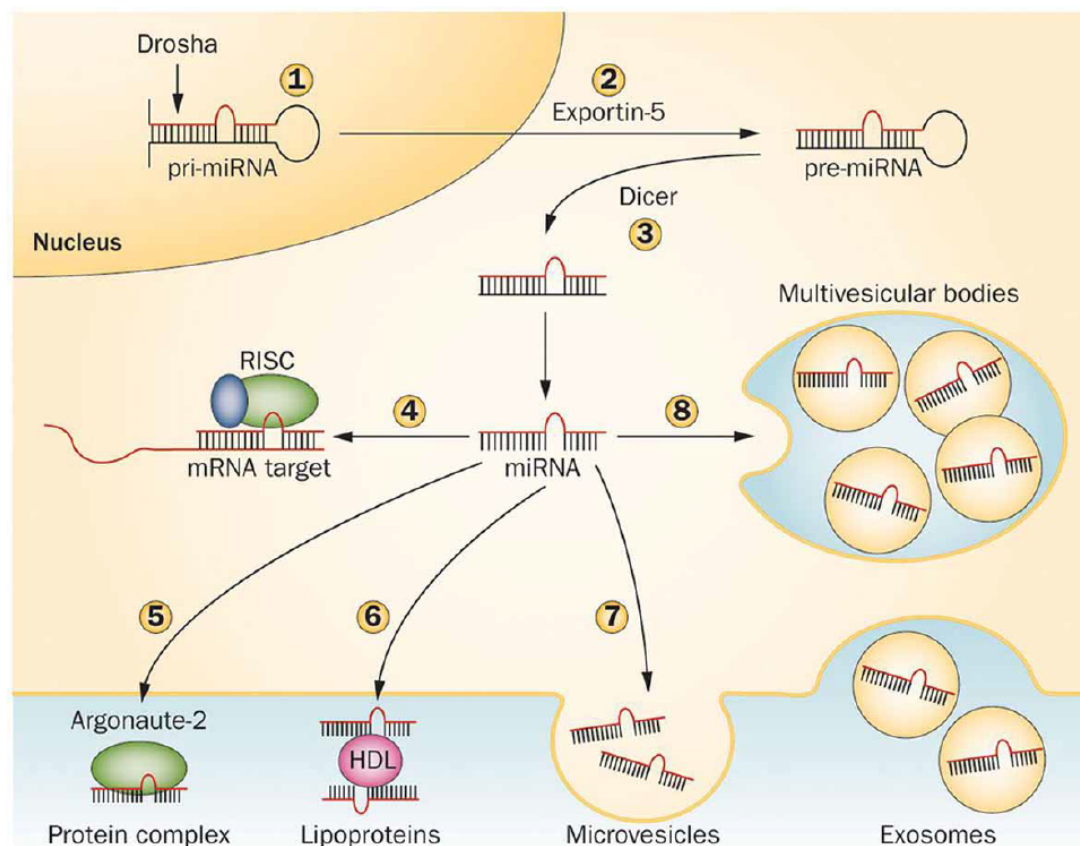
Els miRNAs es sintetitzen de forma endògena, estan formats per RNA d'una sola cadena, tenen una longitud de 19 a 24 parells de bases, estan localitzats en el 80% dels casos en introns i en el 20% dels casos en exons, i són molt estables i filogenèticament molt ben conservats. Són més estables que l'mRNA perquè estan protegits dels fenòmens de degradació ja que estan inclosos en endosomes o microvesícules (aproximadament en el 10-15% dels casos) o formen complexes amb altres proteïnes (Valadi *et al.* 2007; Bartel 2004).

Des que fou descrit per primera vegada el primer miRNA al 1993 en el nematode *Caenorhabditis elegans* (*C.elegans*) (Lee *et al.* 1993), se n'han descrit fins a l'actualitat més de 24.500 en més de 200 espècies, dels quals més de 2.500 ho són en humans (<http://www.mirbase.org/>) (Kozomara i Griffiths-Jones 2014). En el *C.elegans* es va descobrir que els miRNAs lin-4 i let-7 regulaven respectivament els mRNAs lin-14, lin-28 i let-17 que intervenien en el desenvolupament postembrionari entre les fases III i IV del període de larva del nematode (Lee *et al.* 1993; Reinhart *et al.* 2000).

1.4.2. Biogènesi i detecció dels miRNAs

La biogènesi dels miRNAs és un procés complex que es realitza en diferents etapes i que implica diferents enzims intracel·lulars (Lee *et al.* 2003; He i Hannon 2004; Yates *et al.* 2013). Al principi, els pre-precursors dels miRNAs, anomenats *pri-miRNAs*, localitzats en zones intròniques del gens, es processen a dins el nucli cel·lular a través de l'endoribonucleasa III anomenada *Drosha*, en precursors d'uns 70 nucleòtids anomenats *pre-miRNAs*. Aquests precursors surten del nucli a través de la proteïna transportadora *Exportina-5* i, un cop al citoplasma, una segona endoribonucleasa III anomenada *Dicer* els processa en dúplexs de 21-23 nucleòtids formats per les cadenes madures dels miRNAs i les seves corresponents cadenes complementàries (miRNA:miRNA*). Posteriorment una de les cadenes d'aquest dúplex pot incorporar-se al complex proteic *RISC* que actuarà inhibint la retrotranscripció del RNA a mRNA o pot alliberar-se de la cèl·lula a través de l'associació a proteïnes transportadores, com l'Argonaute-2 o les lipoproteïnes, o en forma de microvesícules o exosomes (figura 7).

Els dos punts claus i més importants en la síntesi i regulació dels miRNAs estan a en les dues endoribonucleasses III, *Drosha* i *DICER*. Alteracions genètiques puntuals en aquests i d'altres enzims poden provocar disrupcions en la biogènesi del miRNAs i, en conseqüència, defectes en el desenvolupament normal dels organismes o ser responsables del desenvolupament de diferents malalties.

Figura 7. Esquema de la biogènesi dels miRNAs (Guay i Regazzi 2013).

Biogènesi dels miRNAs: Processament dels pri-miRNAs (1); sortida dels pre-miRNAs al citoplasma (2); processament dels pre-miRNAs (3); incorporació de miRNAs a RISC (4); alliberació de miRNAs mitjançant proteïnes transportadores (5), lipoproteïnes (6), microvesícules (7) i exosomes (8).

Els efectes de les alteracions genètiques sobre els miRNAs poden ser directes o indirectes. Els efectes directes poden ser deguts a la presència de mutacions o polimorfismes en els propis precursors dels miRNAs que poden tenir un efecte en el seu procés de biogènesi, tant per excés com per defecte, i els efectes indirectes inclouen mutacions o polimorfismes que afecten als promotors dels miRNAs o dels mRNAs interferint en la seva transcripció. Alguns estudis han investigat el paper de les alteracions genètiques en la síntesi i la funció dels miRNAs en diferents malalties, inclosa també l'EM (Salzman i Weidhaas 2013; Fenoglio *et al.* 2011; Paraboschi *et al.* 2011; Ridolfi *et al.* 2013).

Malgrat que s'han identificat elements que actuen en els diferents passos de la síntesi dels miRNAs, els mecanismes bioquímics específics d'aquests processos no són encara ben coneguts.

Els miRNAs es poden detectar tant a nivell intracel·lular com a nivell extracel·lular. En l'ésser humà s'han detectat en diferents fluids humans com plasma, sèrum, LCR, orina, saliva, llet materna o d'altres, si bé en el LCR és on n'hi ha menys quantitat (Weber *et al.* 2010). No es coneix bé quin és l'origen dels miRNAs que es detecten a nivell extracel·lular. Les hipòtesis proposades inclouen l'alliberació activa des de les cèl·lules a l'espai extracel·lular i el buidament passiu des de les cèl·lules (figura 7). Alguns estudis suggereixen que els miRNAs poden ser subproductes derivats de la degradació i l'apoptosi cel·lulars (Jin *et al.* 2013).

Alguns autors diferencien els miRNAs circulants, que serien els que circularien lliures per l'espai extracel·lular i es detectarien en el sèrum i altres líquids biològics, dels que són secretats, que es detectarien en les mateixes mostres biològiques però dins d'estructures com exosomes o microvesícules (Kosaka *et al.* 2013). Els exosomes són petites vesícules, de 40-100 nm de diàmetre, que estan formades per membranes d'endosomes, que són orgànuls de les cèl·lules animals delimitats per una única membrana que transporta material que s'acaba d'incorporar a la cèl·lula. Les microvesícules són petites partícules, de 50 nm a 1 µm de diàmetre, que estan formades per part de la membrana cel·lular i l'externalització de part del citoplasma de la cèl·lula i els seus components. Per últim, també s'han detectat miRNAs dins de cossos apoptòtics i lligats a altres molècules com HDL, LDL o proteïnes transportadores (figura 7). Per aquest motiu també es consideren que els miRNAs tenen funcions de comunicació intercel·lular (Kosaka *et al.* 2013).

Les tècniques que es requereixen per la detecció i quantificació de miRNAs són complexes i calen sofisticats sistemes d'anàlisi bioinformàtica per a la interpretació dels resultats obtinguts.

L'expressió dels miRNAs es mesuren mitjançant tècniques de biologia molecular com la transferència de RNA (*Nothern Blotting*), tècniques de PCR i qRT-PCR, bioxips i tècniques d'expressió genètica. A més, en els darrers anys s'han incorporat tècniques més modernes i sofisticades basades en luminiscència, fluorescència, electroquímica, colometria, activitat enzimàtica i, fins i tot, nanotecnologia (Kong i Zhao 2009; Sheinerman i Umansky 2013).

1.4.3. Funcions dels miRNAs

Els diferents estudis realitzats fins ara suggereixen que, en mamífers, els miRNAs poden encarregar-se de regular l'expressió genètica i la síntesi proteica de fins aproximadament el 60% dels gens que codifiquen per proteïnes. Els miRNAs participen pràcticament en totes les funcions cel·lulars i tenen funcions molt importants en múltiples processos fisiològics, regulen l'expressió dels gens a nivell posttranscripcional tant del desenvolupament com de les vies cel·lulars bàsiques que controlen i regulen la formació, la diferenciació, la proliferació i la mort cel·lular (Bartel 2004). Tenen patrons d'expressió específics de fase de desenvolupament i d'especificitat de teixit. Alguns actuen en moments específics i de forma transitòria, mentre que d'altres tenen uns patrons d'expressió temporals i espacials dinàmics (Bartel 2004; Esteller 2011).

Els miRNAs són un dels mecanismes de regulació epigenètica de l'expressió dels gens. Els canvis epigenètics del DNA permeten influir en l'expressió dels gens sense alterar la seqüència basal del DNA (Koch *et al.* 2013). Els altres dos principals mecanismes d'aquest sistema de regulació són la metilació del DNA i la modificació de les histones. La regulació mitjançant els miRNAs és un sistema altament complex en que un miRNA pot regular l'expressió de diversos mRNAs i un mRNA pot estar regulat alhora per diversos miRNAs. Aquests tres sistemes de regulació actuen de forma interrelacionada i coordinada (He i Hannon 2004; Han *et al.* 2007; Scott *et al.* 2006; Zhao *et al.* 2011; Huang *et al.* 2010).

El 70% dels miRNAs identificats s'expressen en el SNC i són bàsics pel seu correcte funcionament. Estan implicats en el seu desenvolupament, en el

manteniment de la seva funció normal durant l'adolescència, en la neurogènesi i el creixement de les neurites, i en la diferenciació dels oligodendròcits i el manteniment de la mielina (Cao *et al.* 2006).

També tenen un paper molt important en el sistema immunitari, perquè participen en el desenvolupament, diferenciació, manteniment, tolerància immunitària i comunicació entre els seus diferents elements, tant de la immunitat innata com de la immunitat adquirida, i en les diferents cèl·lules implicades (Xiao i Rajewsky 2009; O'Connell *et al.* 2010; Tufekci *et al.* 2010). S'estima que el 50% dels gens del sistema immunitari innat estan regulats per diversos i diferents miRNAs.

En els darrers anys s'ha comprovat que els miRNAs també exerceixen funcions bàsiques en processos com la oncogènesi, el metabolisme, la angiogènesi, la inflamació i la neurodegeneració, i s'han trobat implicats en la patogènia de diferents malalties autoimmunitàries (lupus eritematós sistèmic, artritis reumatoide, cirrosi biliar primària, colitis ulcerosa, malaltia de Crohn, púrpura trombocitopènica idiopàtica, malaltia de Sjögren, psoriasis, esclerosi múltiple) (Pauley *et al.* 2009; Carlsen *et al.* 2013), malalties psiquiàtriques (Maffioletti *et al.* 2014; Kolshus *et al.* 2014), malalties neurològiques (malaltia d'Alzheimer, esclerosi lateral amiotròfica, esclerosi múltiple, epilèpsia, atàxia, malaltia de Parkinson, malaltia de Huntington) (Danborg *et al.* 2014), malalties cardiovasculars (cardiopatia isquèmica, insuficiència cardíaca, arítmies, HTA) (Sayed *et al.* 2014) i en el càncer (leucèmia limfàtica crònica, limfoma, osteosarcoma, càncer colo-rectal, hepatocarcinoma, càncer gàstric, carcinoma escamós de cap i coll, càncer esofàgic, càncer prostàtic, glioblastoma) (Xi 2013; Schwarzenbach *et al.* 2014; Tessitore *et al.* 2014; Palanichamy i Rao 2014).

El coneixement que s'ha adquirit d'uns anys ençà sobre els miRNAs i la seva implicació en la patogènia de diferents malalties cròniques complexes, permeten suggerir que podrien ser utilitzats com a biomarcadors de diagnòstic, pronòstic, monitorització i resposta terapèutica i, fins i tot esdevenir, objectius de futurs tractaments (Forsheew *et al.* 2012; Murtaza *et al.* 2013; Kosaka *et al.* 2013). De fet, en patologia oncològica ja es comencen a utilitzar alguns miRNAs com a

biomarcadors de diagnòstic i pronòstic d'algun tipus de càncer (Shen *et al.* 2013). No obstant això, encara hem de considerar que estem a l'inici de conèixer el paper d'aquestes molècules en les diferents malalties (tant *in vitro* com *in vivo*) i el seu potencial ús tant per a la recerca com per a la pràctica clínica.

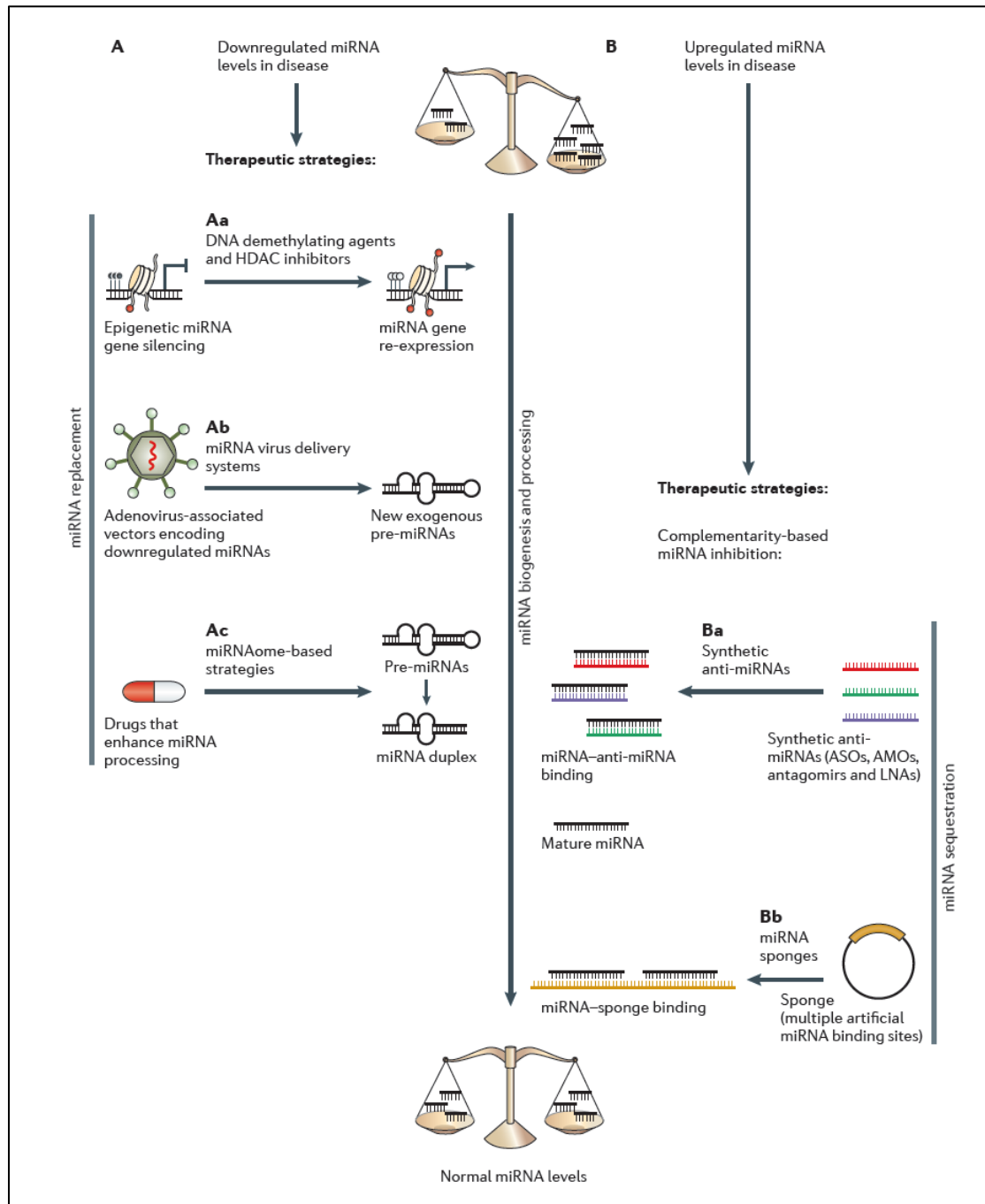
1.4.4. Investigació en teràpies basades en miRNAs

Tenint en compte que els miRNAs s'han implicat en múltiples patologies, diferents estudis duts a terme en els darrers anys suggereixen que seria possible tractar algunes malalties, incloses les neurològiques, si s'aconseguís restaurar o inhibir els miRNAs que hi estan implicats (Czech i Ph 2006; Esteller 2011) (figura 8). Tot i que els avenços en aquesta línia són molt prematurs, ja han començat a donar algun fruit sobretot en patologia oncològica (Stenvang *et al.* 2008).

1.4.4.1. Estratègies per a restaurar les funcions dels miRNAs (figura 8)

Aquestes estratègies estarien encaminades a augmentar l'activitat dels miRNAs que tenen una expressió disminuïda en determinades malalties.

Un sistema seria usar substàncies desmetiladores de DNA i inhibidors d'histones per estimular l'alliberació de miRNAs que silenciïn l'expressió genètica (Lujambio *et al.* 2007). Un altre seria alliberar miRNAs en llocs estratègics usant vectors virals o altres micropartícules (Banks 2008; Pan *et al.* 2012; Wu *et al.* 2011; Im i Kenny 2012). I finalment, administrar fàrmacs que estimulin la síntesi de miRNAs (Melo i Villanueva 2011).

Figura 8. Potencials teràpies basades en miRNAs (Esteller 2011).

Esquema de teràpies basades en miRNAs. A: Estratègies per a restaurar les funcions dels miRNAs. Aa: Desmetiladors de DNA i inhibidors d'histones. Ab: Vectors virals o altres micropartícules. Ac: Estimuladors de la síntesi de miRNAs. B: Estratègies per a inhibir les funcions dels miRNAs. Ba: miRNAs antimiRNAs. Bb: Esponges de miRNAs.

1.4.4.2. Estratègies per a inhibir funcions dels miRNAs (figura 8)

Aquestes estratègies estarien encaminades a reduir l'activitat dels miRNAs que estan sobreexpressats en determinades situacions patològiques. Això es podria aconseguir mitjançant la síntesi d'*oligonucleòtids antisentit* o *miRNAs antimRNA* que inhibirien la funció de miRNAs determinats. S'han usat en models animals de patologia oncològica (Ma *et al.* 2010) i en patologia cardiovascular (Elmén *et al.* 2008). Cal dir que no sempre serà efectiu el bloqueig d'un sol miRNA com a possible teràpia, ja que en la majoria de les patologies els mecanismes patogènics implicats són complexos i hi intervenen diferents miRNAs i altres molècules. Per aquest motiu, s'han dissenyat també tractaments multidiana que inclouen diversos *oligonucleòtids antisentit* amb l'objectiu de bloquejar l'acció de varis miRNAs alhora, o bé un sol *oligonucleòtid antisentit* que sigui capaç de bloquejar diversos miRNAs (Lu *et al.* 2009).

Una altra estratègia per reduir l'activitat dels miRNAs sobreexpressats en una determinada malaltia és la síntesi de les anomenades *esponges de miRNAs*, que són molècules que contenen diversos punts d'unió a diferents miRNAs per a que aquests s'hi uneixin i bloquegin així la seva unió i acció sobre els seus objectius naturals (Ebert i Sharp 2010).

A tall d'exemple, alguns estudis han investigat l'efecte d'oligonucleòtids antimRNA en el model animal d'EM, l'encefalomièlitis al·lèrgica experimental (EAE). Du *et al.* (2009) van comprovar com silenciant el miR-326 en EAE es reduïen el nombre de cèl·lules Th17 i la severitat de la malaltia. Murugaiyan i Beynon (2011) van administrar antimRNA-155 en els animals i van observar tant una reducció precoç de l'activitat de cèl·lules T CD4+ com de la severitat de la clínica dels animals. També van demostrar que ratolins sense miR-155 tenien menys activitat clínica de la malaltia i menys resposta inflamatòria Th1 i Th17.

1.4.4.3. Utilitat de les teràpies basades en miRNAs

Aquestes teràpies que tenen com a objectiu els miRNAs i que s'estan començant a investigar i a desenvolupar presenten avui en dia tres problemàtiques principals: els possibles efectes colaterals de modificar l'expressió d'un o

diversos miRNAs, ja que un miRNA té impacte sobre diversos mRNAs i, alhora, un mRNA pot estar regulat per diversos miRNAs; com aconseguir que aquest tractaments proposats arribin i actuïn en el lloc adequat que interessa (Jackson i Linsley 2010; Junker *et al.* 2011); i, d'altra banda, es desconeix quin efecte podrien tenir aquestes teràpies en humans.

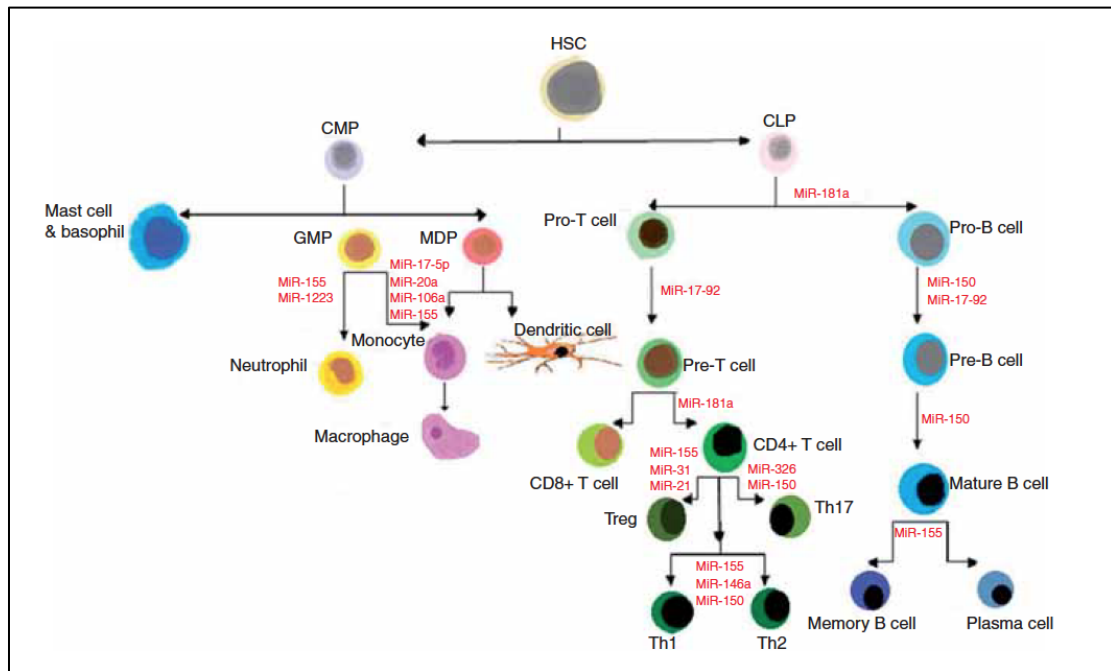
D'altra banda també s'ha demostrat, tant en estudis *in vitro* com *in vivo*, que diferents tractaments farmacològics actualment usats en diferents malalties poden modificar l'expressió d'alguns miRNAs: interferó- β en hepatitis C (Pedersen *et al.* 2007), esteroides en limfomes i leucèmies (Rainer *et al.* 2009) i també interferó- β , acetat de glatiràmer i natalizumab en EM (Hecker *et al.* 2013; Waschbisch *et al.* 2011; Sievers *et al.* 2012; Meira *et al.* 2014a).

1.4.5. miRNAs i sistema immunitari

Els miRNAs tenen un paper clau en el desenvolupament, diferenciació, manteniment, tolerància immunitària i comunicació entre els diferents elements que formen part tant de la immunitat innata com de la immunitat adquirida (Xiao i Rajewsky 2009; O'Connell *et al.* 2010; Tufekci *et al.* 2010).

Aquestes molècules tenen una funció molt important en la regulació de les cèl·lules mare i la seva diferenciació en progenitors multipotencials que posteriorment donaran lloc a les línies progenitores limfoides i mieloides del sistema hematopoètic. Diferents miRNAs determinen els diferents tipus cel·lulars, la seva regulació i diferenciació, i el desenvolupament final de les cèl·lules immunitàries efectores.

Figura 9. Desenvolupament de les cèl·lules immunitàries i miRNAs implicats (Zare-Shahabadi *et al.* 2013).



miRNAs involucrats en el desenvolupament de les cèl·lules immunitàries tant d'estirp mieloide (CMP i cèl·lules derivades) com d'estirp limfoide (CLP i cèl·lules T i B derivades).

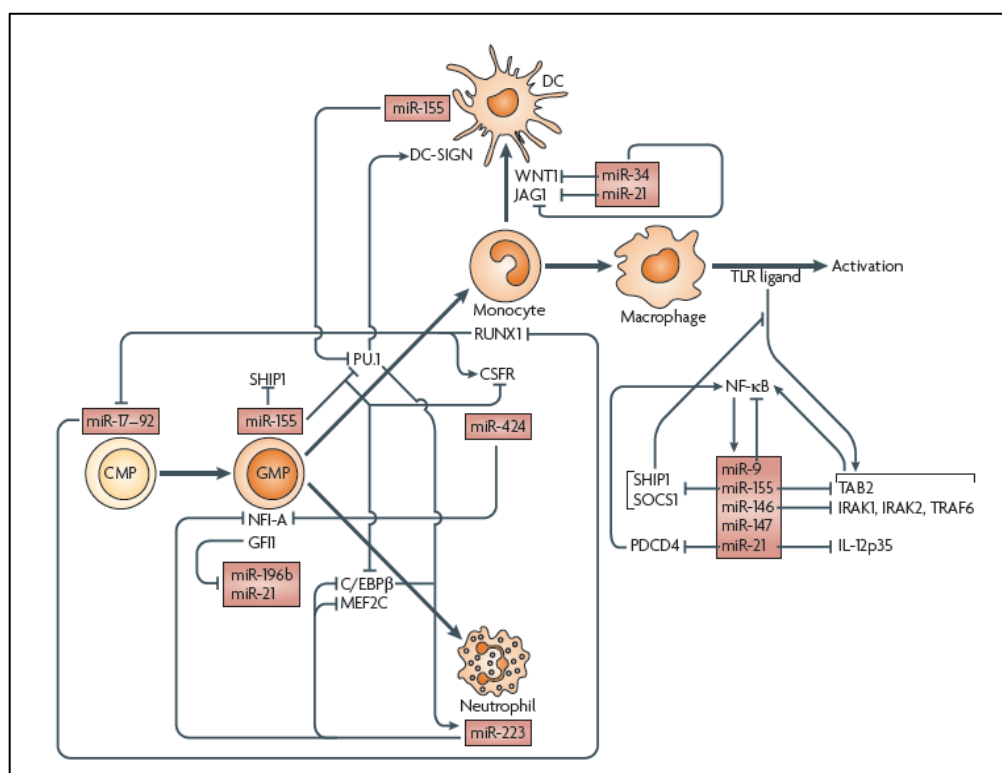
1.4.5.1. *miRNAs i sistema immunitari innat*

El sistema immunitari innat és el conjunt de cèl·lules i mecanismes que defensen, de manera immediata però no específica, un hoste de les infeccions per part d'altres organismes. Es troba en totes les classes de vida vegetal i animal. Les cèl·lules del sistema innat reconeixen i responen a patògens d'una manera genèrica, però a diferència del sistema immunitari adaptatiu, no confereix una memòria immunitària permanent o protectora a l'hoste. Les cèl·lules principals d'aquest sistema immunitari són els macròfags, cèl·lules dendrítiques, monòcit, neutròfils i cèl·lules NK.

En els darrers anys s'ha sabut que fins el 50% dels gens del sistema immunitari innat estan regulats per varis i diferents miRNAs i que aquests contribueixen de forma important en el desenvolupament, funció i regulació del sistema

immunitari innat, tant en la destrucció i eliminació directa dels gèrmens, en la producció de citocines, com també en el procés de presentació d'antígens. Alguns miRNAs com els miR-17-5p, miR-20a, miR-106a, miR-233, miR-34, miR-21, miR-146, miR-93, miR-125b i d'altres estan implicats en el desenvolupament, maduració i regulació de diferents cèl·lules del sistema immunitari innat. També el miR-155 té un paper important en aquest sistema, sobretot en la maduració dels neutròfils i en la funció de les cèl·lules presentadores d'antígens (O'Connell *et al.* 2010; Tufekci *et al.* 2010).

Figura 10. Desenvolupament del sistema immunitari innat i miRNAs implicats (adaptat de O'Connell *et al.* 2010).



miRNAs involucrats en el desenvolupament de les cèl·lules del sistema immunitari innat (cèl·lules dendrítiques, monòcits, macròfags i neutròfils) i les seves interaccions amb diferents factors de transcripció rellevants.

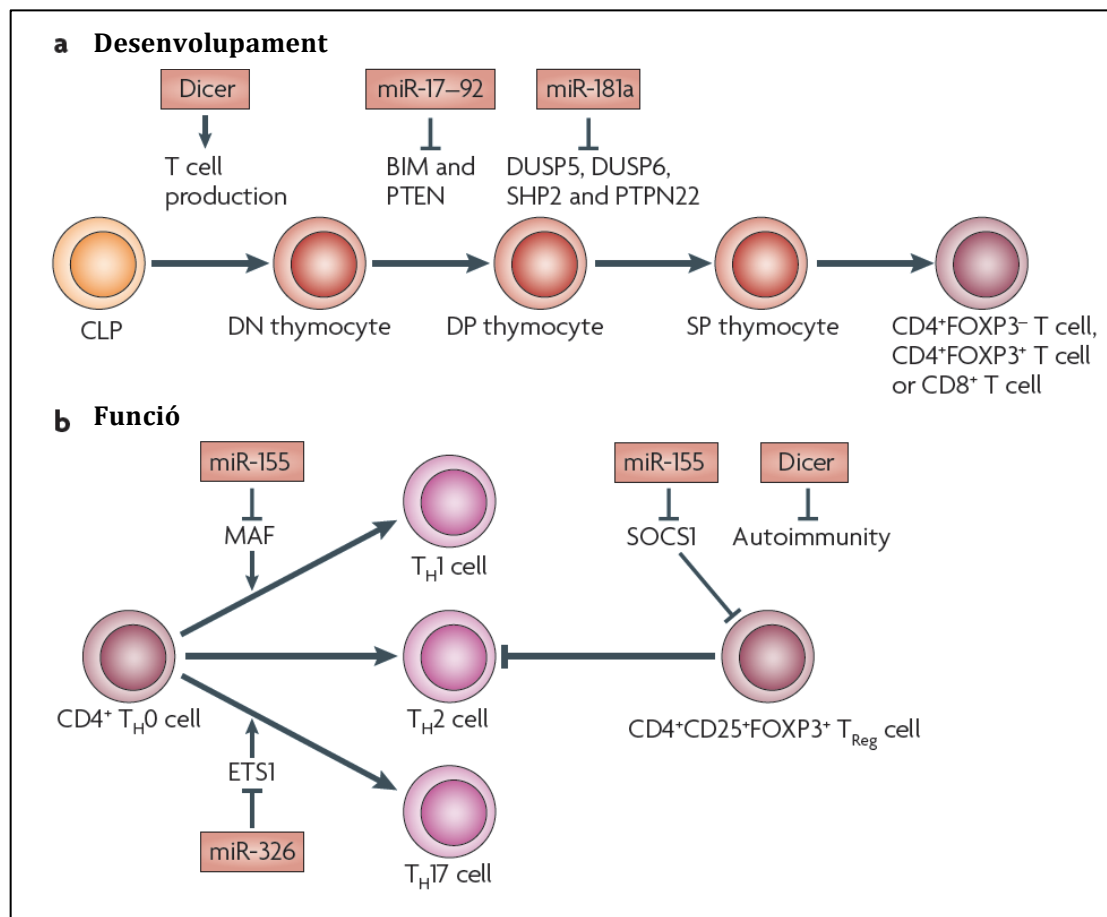
1.4.5.2. miRNAs i sistema immunitari adaptatiu

El sistema immunitari adaptatiu o adquirit, que aparegué amb els primers vertebrats i és activat pel sistema immunitari innat (menys específic i evolutivament més antic), està format per cèl·lules i actua mitjançant processos altament especialitzats que eliminen o eviten les agressions dels patògens. Aquest sistema dona resposta immunitària a antígens que es sotmeten a un procés d'identificació, d'aprenentatge i de memòria immunitària. És un sistema complex on intervenen diferents cèl·lules i molècules d'intercomunicació (cèl·lules T, cèl·lules B, cèl·lules presentadores d'antigen, citocines, receptors cel·lulars, molècules coestimuladores, complex major d'histocompatibilitat, etc.). Els miRNAs regulen l'expressió genètica posttranscripcional de totes les molècules implicades i la seva interrelació.

Diferents miRNAs, com miR-17-92, miR-181a i miR-155 entre d'altres, s'han identificat com a claus en el procés de diferenciació de les diferents subpoblacions de cèl·lules T (Th1, Th2, Th17 i Treg) (figura 10).

Treballs recents, posen de manifest el paper clau del miR-155 en aquest procés. El miR-155 té un paper molt important, a través de la regulació de la producció de citocines, en el sistema immunitari dels mamífers, específicament en la regulació de la diferenciació de les cèl·lules T i en la resposta per anticossos dependent de cèl·lula T (Thai *et al.* 2007). El miR-155 també regula l'expressió de les cèl·lules Treg a través de regular l'expressió de SOCS1 que alhora activa el factor de transcripció STAT5 en resposta a l'IL-2 (Lu *et al.* 2009; O'Connell *et al.* 2010; Zare-Shahabadi *et al.* 2013). A més a més, aquest miRNA s'ha trobat desregulat en diferents malalties de patogènia autoimmunitària i específicament en l'EM (Junker *et al.* 2009; Paraboschi *et al.* 2011; Waschbisch *et al.* 2011; Zhang *et al.* 2014).

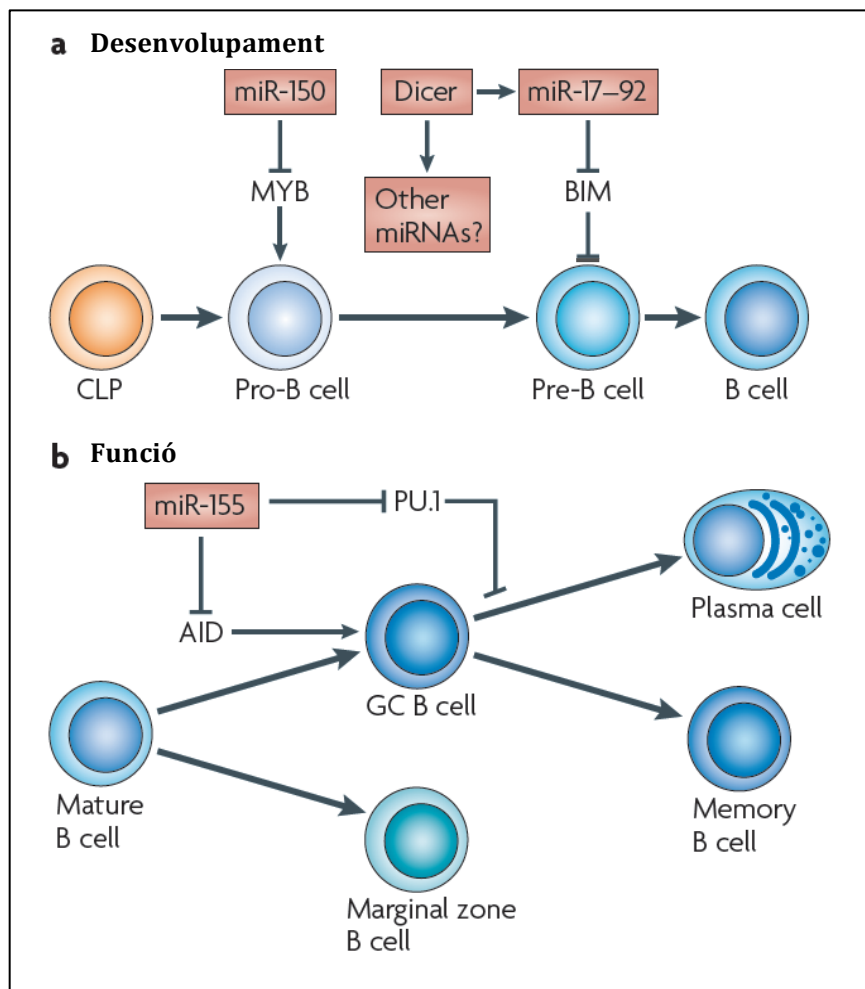
Figura 11. Desenvolupament de les cèl·lules T i miRNAs implicats (adaptat de O'Connell *et al.* 2010).



miRNAs involucrats en el desenvolupament de les cèl·lules T CD4⁺ (Th1, Th2, Th17 i Treg) del sistema immunitari adaptatiu i les seves interaccions amb diferents factors de transcripció rellevants.

D'una forma similar, diferents miRNAs s'han implicat en el desenvolupament, diferenciació, maduració i regulació de les cèl·lules B (miR-181a, miR-17-92, miR-150, miR-125 i també el miR-155). Aquest darrer està implicat en la regulació de la resposta antigènica de la cèl·lula B mitjançant anticossos (Zare-Shahabadi *et al.* 2013; O'Connell *et al.* 2010) (figura 11). Les cèl·lules B tenen el seu paper en la fisiopatologia de l'EM i en el diagnòstic de la malaltia, ja que la detecció de bandes oligoclonals en LCR (que són la secreció oligoclonal d'immunoglobulines produïdes per les cèl·lules B del LCR) s'utilitzen per al diagnòstic i pronòstic de la malaltia (Compston *et al.* 2005).

Figura 12. Desenvolupament de les cèl·lules B i miRNAs implicats (adaptat de O'Connell *et al.* 2010).



miRNAs involucrats en el desenvolupament de les cèl·lules B de memòria i cèl·lules plasmàtiques del sistema immunitari adaptatiu i les seves interaccions amb diferents factors de transcripció rellevants.

En resum, tant el sistema immunitari innat com l'adaptatiu i els seus components estan regulats per diferents miRNAs. Tant l'expressió incrementada com la disminuïda dels miRNAs implicats en resposta a l'estímul inflamatori pot influenciar diferents processos biològics i exercir un efecte pro o antiinflamatori.

1.4.6. miRNAs i autoimmunitat

Els miRNAs, degut al seu paper en el desenvolupament, regulació i manteniment del sistema immunitari, participen també en la regulació de la resposta immunitària contra els propis teixits (O'Connell *et al.* 2010). El sistema immunitari està fisiològicament dissenyat, mitjançant mecanismes parcialment coneguts, per respondre davant dels patògens externs i no davant dels propis antígens. Manté, el que s'anomena, una tolerància immunològica. Els miRNAs participen en afinar l'expressió genètica per mantenir aquesta situació, adequar l'activació cel·lular, controlar i reduir la inflamació, controlar el creixement limfocitari i mantenir l'homeòstasi de les cèl·lules T reguladores (Vinuesa *et al.* 2009).

Com s'ha descrit anteriorment els miRNAs regulen de forma molt fina tota l'hematopoesi i la diferenciació cel·lular, i les alteracions tant de miRNAs individualment com de la interrelació entre ells poden produir alteracions de la resposta immunitària fisiològica. Aquestes alteracions poden ser degudes a canvis genètics, influències hormonals o factors ambientals com les infeccions. Tot aquest complex sistema de regulació del sistema immunitari i els seus potencials punts d'alteracions, poden explicar com petits canvis en algun punt de la regulació dels miRNAs poden intervenir en la patogènia de les malalties autoimmunitàries (Tufekci *et al.* 2010).

Cada vegada hi ha més treballs que detecten canvis en l'expressió de diferents miRNAs en varies malalties autoimmunitàries com l'artritis reumatoide, el lupus eritematós sistèmic, la cirrosi biliar primària, la colitis ulcerosa, la psoriasis, la púrpura trombocitopènica idiopàtica, la malaltia de Sjögren i, també, l'esclerosi múltiple (Pauley *et al.* 2009; Danborg *et al.* 2014).

1.4.7. miRNAs i SNC

El 70% dels miRNAs s'expressen en el cervell i molts d'ells són específics de les neurones. Diferents miRNAs són essencials pel correcte funcionament del

sistema nerviós central i estan implicats en la regulació de l'expressió genètica del seu desenvolupament, de la diferenciació de diferents línies cel·lulars importants pel SNC, del desenvolupament de cèl·lules glials i de la neurogènesi tant en l'embrió com en l'adult (Cao *et al.* 2006; Liu i Zhao 2009; Shen i Temple 2009; Szulwach *et al.* 2010; Zhao *et al.* 2010; Emery 2010).

En ratolins, s'han identificat diferents miRNAs que regulen l'expressió genètica durant la diferenciació dels oligodendròcits (miR-219, miR-338, miR-23, miR-9, miR-17-92), la seva proliferació (miR-175-5p, miR-19b) i durant la mielinització de les neurones (Zhao *et al.* 2010; Letzen *et al.* 2010; Emery 2010; Budde *et al.* 2010; Li i Yao 2012).

En estudis en EAE s'han identificat diferents miRNAs (miR-124, miR-146 i miR-155) com a reguladors de la diferenciació i activació de la micròglia (Ponomarev *et al.* 2013; Ponomarev *et al.* 2011; Li *et al.* 2011).

Els astròcits són les cèl·lules que donen suport mecànic al teixit nerviós i suport metabòlic a les neurones, i intervenen en la regulació homeostàtica del SNC mantenint la composició adequada del medi extracel·lular i la barrera hematoencefàlica amb l'alliberament de factors neurotròfics i precursors per a la síntesi de neurotransmissors. Alguns estudis han observat que els miRNAs que es detecten més en lesions actives d'EM estan expressats pels astròcits (miR-155, miR-214, miR-34a, miR-142-5p, miR-193a, miR-320, miR-326, miR-23a, miR-146a, miR-130, miR-30a-3p, miR-199a) (Junker *et al.* 2009; Brosnan i Raine 2013).

Actualment coneixem que diversos miRNAs estan implicats en la neurodegeneració (Eacker *et al.* 2009; Bushati i Cohen 2008). Existeixen models animals en què s'ha demostrat que la pèrdua d'expressió d'alguns miRNAs provoca fenòmens de neurodegeneració i cada vegada tenim més evidència que en humans la desregulació d'alguns miRNAs està implicada en diferents processos neurodegeneratius. Per tant, tenint en compte la participació dels miRNAs en processos neurodegeneratius però també en la neurogènesi i en la diferenciació de diferents línies cel·lulars, la seva modulació podria estimular la

diferenciació d'oligodendròcits que poguessin remielinitzar o reparar la mielina malmesa (Piaton *et al.* 2009; Taveggia *et al.* 2010) i de neurones madures que podrien substituir les neurones alterades (Chang *et al.* 2008) pels processos tant inflamatoris com neurodegeneratius de diferents malalties neurològiques. En aquest sentit es pot plantejar tenir com a un objectiu terapèutic intentar estimular aquests mecanismes de reparació a través dels miRNAs implicats.

1.4.8. miRNAs i diferents malalties

El paper dels miRNAs també s'ha estudiat en diferents malalties tant neurològiques com no neurològiques i tant en malalties de mecanisme autoimmunitari com en d'altres mecanismes patogènics.

Alguns estudis han implicat diversos miRNAs en diferents malalties com càncer (Suzuki *et al.* 2013; Hauptman i Glavac 2013), neoplàsies hematològiques (Gounaris-Shannon i Chevassut 2013), aterosclerosi (Lu i Kakkar 2013; Sun *et al.* 2013), hipertensió (Kim 2013), cardiopatia isquèmica (Briasoulis *et al.* 2013; Sala *et al.* 2014; Fiedler i Thum 2013), ictus (Tan *et al.* 2011; Liu *et al.* 2013), diabetis (Kumar *et al.* 2012; Lorenzen *et al.* 2012), obesitat i trastorns del metabolisme lipídic (Rotllan i Fernández-Hernando 2012; Williams i Mitchell 2012; Prats-Puig *et al.* 2013; Ortega *et al.* 2013), etc.

El paper dels miRNAs també s'ha estudiat en malalties sistèmiques de base autoimmunitària. En l'artritis reumatoide s'han implicat diversos miRNAs, identificats en sang perifèrica, teixit sinovial o fibroblasts (Furer *et al.* 2010; Filková *et al.* 2012; Singh *et al.* 2013), alguns dels quals són els que també s'han identificat en estudis realitzats en EM (miR-155, miR-146a) (Nakasa *et al.* 2008; Pauley *et al.* 2008; Stanczyk *et al.* 2008), suggerint vies patogèniques similars.

En altres malalties autoimmunitàries també s'han identificat miRNAs desregulats, alguns dels quals són comuns entre elles i també amb l'EM: en el LES, els miR-101, miR-21, miR-148a, miR-126, miR-155, miR-31, miR-146a i miR-125a (Amarilyo i La Cava 2012; Singh *et al.* 2013; Carlsen *et al.* 2013); en la

malaltia inflamatòria intestinal, els miR-16, miR-21, miR-23a, miR-24, miR-29a, miR-126, miR-195, let-7f, miR-192, miR-375 i miR-422b (Pekow i Kwon 2012); en la malaltia de Sjögren, miR-4524b i miR-5100 (Singh *et al.* 2013); en la psoriasi, miR-21, miR-205, miR-221, miR-222, miR-125b, miR-146 i miR-203 (Zibert *et al.* 2010; Furer *et al.* 2010; Xu *et al.* 2011).

En dues publicacions recents (Maciotta *et al.* 2013; Danborg *et al.* 2014) es fa una revisió extensa dels treballs que han estudiat el paper dels miRNA en malalties neurodegeneratives com malaltia d'Alzheimer, malaltia de Parkinson, demència frontotemporal, en l'esclerosi lateral amiotròfica, la malaltia de Huntington i també l'EM. Cal esmentar que la malaltia que té més treballs publicats en relació amb miRNAs és l'EM, seguit de la malaltia d'Alzheimer. En totes aquestes malalties s'ha estudiat l'expressió de diferents miRNAs en models animals, en cultius cel·lulars i en mostres biològiques d'alguns pacients afectats i subjectes control (sang perifèrica, plasma, cèl·lules mononucleades, teixit cerebral o medul·lar obtingut d'autòpsies i LCR). Cal dir que no hi ha una homogeneïtat en els resultats obtinguts entre els diferents treballs ni fins i tot quan s'estudia el paper dels miRNAs en la mateixa malaltia. Això pot ser degut a la heterogeneïtat dels estudis, del nombre i característiques dels pacients estudiats, del tipus de mostres biològiques analitzades i de l'heterogeneïtat metodològica i d'interpretació de resultats.

En la malaltia d'Alzheimer (MA) s'han identificat desregulació de miRNAs implicats en la regulació de l'expressió de la proteïna precursora de l'amiloide, de la proteïna tau i de la presenilina i en la formació de la proteïna precursora de l'amiloide.

En la malaltia de Parkinson (MP) s'han identificat desregulació de miRNAs que intervenen en la regulació dels gens implicats en la malaltia (SNCA i LRRK2) i en factors neurotròfics que participen en la supervivència de neurones dopaminèrgiques.

En l'esclerosi lateral amiotròfica (ELA) s'han identificat diferents nivells d'expressió de miRNAs que intervenen en processos de reinnervació a través de

factors de creixement i en la regulació de neurofilaments del citoesquelet neuronal.

En la malaltia de Huntington (MH) s'han trobat expressions diferenciades de miRNAs implicats en la supervivència neuronal i en la regulació de l'expressió del gen de la huntingtina.

Taula 3. Malalties en les que s'ha estudiat el paper de miRNAs.

Grup de malalties	Malalties
Càncer	General Mama Pulmó Colon Pròstata Hepàtic Meningioma Leucèmia limfàtica crònica Testicular Sarcoma Limfoma de Burkitt
Malalties cardiovasculars	Hipertensió arterial Aterosclerosi Infart agut de miocardi Arrítmia Insuficiència cardíaca
Malalties endocrinològiques	Diabetis Hipercolesterolèmia Obesitat
Malalties sistèmiques autoimmunes	Artritis reumatoide Lupus eritematós sistèmic Malaltia inflamatòria intestinal Malaltia de Sjögren Psoriasi
Malalties neurològiques no degeneratives	Ictus Epilèpsia
Malalties neurològiques degeneratives	Malaltia d'Alzheimer Malaltia de Parkinson Esclerosi Múltiple Esclerosi lateral amiotròfica Malaltia de Huntington Demència frontotemporal Malalties espongiformes Atròfia muscular espinal Atàxies espinocerebel·loses

Taula 3 (continuació). Malalties en les que s'ha estudiat el paper de miRNAs.

Grup de malalties	Malalties
Altres	Síndrome de Rett Síndrome de Prader-Willi Síndrome d'Angelman Síndrome 5q Síndrome d'anomalies facials

En la revisió de Danborg *et al.* (2014) s'identifiquen 17 miRNAs que podrien ser potencials biomarcadors diagnòstics degut a que la seva desregulació, en la mateixa o diferent mostra biològica, va en sentit oposat -sobreexpressió o expressió disminuïda- en dues malalties neurodegeneratives diferents (per exemple: miR-1, miR-126 i miR-301a en EM i MP; miR-200a, miR-579 i miR-34a, miR-155 en EM i MA; miR-1275 en EM i ELA; miR-let-7b en MA i ELA). Alhora, en el mateix treball, s'identifiquen miRNAs que comparteixen la mateixa direcció en la seva desregulació en diferents malalties neurodegeneratives (per exemple: miR-155, miR-146a, miR-128, miR-181c i let-7f en EM i MA; miR-92a-1* i la família de let-7 en algunes formes clíniques de EM i ELA; miR-22, miR-29 i miR-181c en EM i MP; miR-29a en MH i EM; miR-9 entre MH i MA, miR-181c en MP i MA), indicant la implicació de vies patogèniques similars.

Figura 13. Nombre de miRNAs desregulats que comparteixen diferents malalties neurodegeneratives (adaptat de Danborg *et al.* 2014).

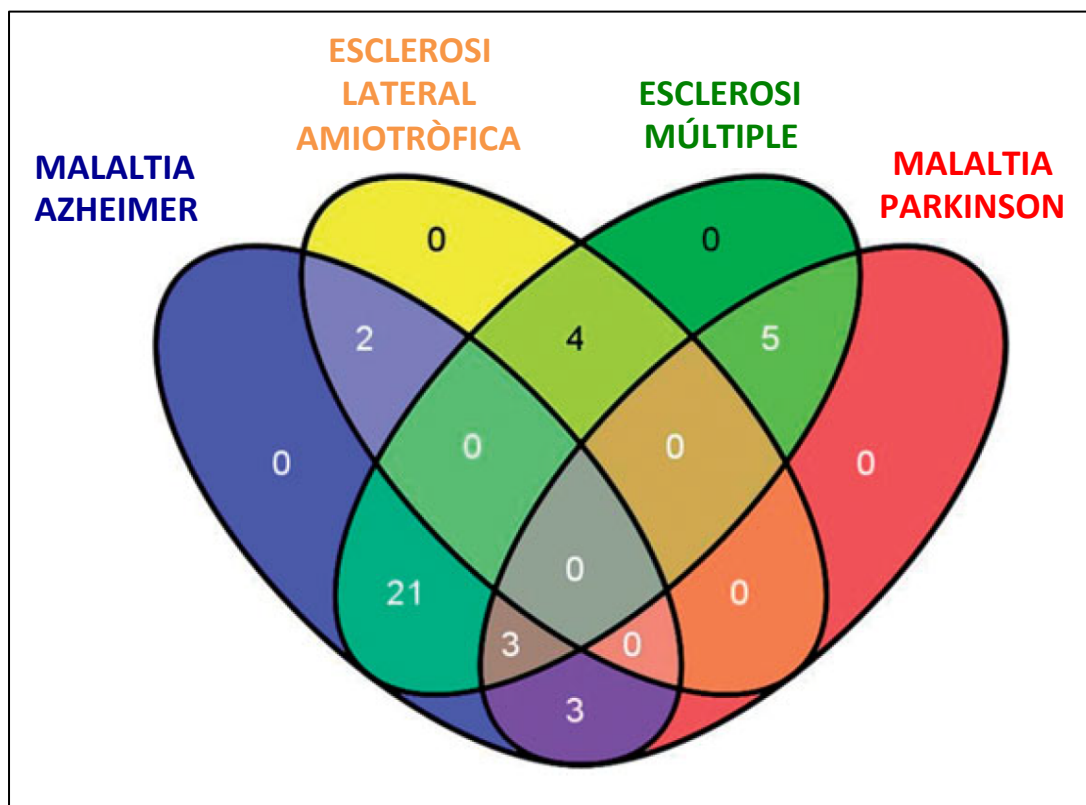


Diagrama de Venn: 38 miRNAs expressats de forma diferent entre pacients i controls en dos o més estudis entre dos o més malalties neurodegeneratives.

1.4.9. miRNAs i esclerosi múltiple

En els darrers anys s'ha despertat l'interès per investigar el paper dels miRNAs en l'EM per part dels investigadors i grups dedicats tant a nivell bàsic com clínic en aquesta malaltia. Tot i que actualment no hi ha literatura abundant publicada sobre miRNAs i EM, aquesta és una de les malalties neurològiques en què diferents grups han estudiat més el seu paper tant en pacients afectats com en mostres biològiques d'EM. L'interès per aprofundir en aquest tema és cada vegada més gran degut a la rellevància que tenen els miRNAs en la regulació de l'expressió genètica tant en diferents processos fisiològics com en diferents malalties, entre les que s'inclou l'EM, i perquè els miRNAs es postulen com uns

potencials biomarcadors de diagnòstic, de pronòstic i de resposta a tractament i, fins i tot, com a potencials dianes terapèutiques per aquestes mateixes malalties.

En la literatura actual hi ha fins a 22 treballs publicats en els que s'ha investigat el paper dels miRNAs en l'EM.

Cal remarcar que els diferents treballs publicats en relació a EM no són del tot coincidents en els seus resultats. Això pot ser degut a diferències entre els estudis realitzats pel que fa a tipus de mostres biològiques (sang total, plasma, cèl·lules diferents, teixit cerebral, LCR), protocols de maneig de les mostres utilitzades, tècniques d'obtenció de resultats, criteris de resultats positius utilitzats, nombre de miRNAs investigats, grups ètnics estudiats, criteris de selecció de la població a estudiar, nombre de pacients estudiats, fase i activitat de la malaltia en el moment de l'anàlisi, formes clíniques de la malaltia, etc. Totes aquestes variables poden fer que les troballes i els resultats dels diferents treballs no siguin homogènies.

Otaegui *et al.* (2009) foren un dels primers grups a interessar-se pel paper dels miRNAs en l'EM. Van investigar en un estudi pilot els patrons d'expressió de 346 miRNAs en cèl·lules mononucleades en sang perifèrica en controls sans i en 21 pacients amb EM en brot clínic i en remissió. Van trobar diferències en l'expressió d'alguns miRNAs entre controls i pacients, i també entre pacients amb i sense activitat de la malaltia. Els miR-18b i miR-599 estaven sobreexpressats durant el brot i el miR-96 estava sobreexpressat en la fase de remissió. Els gens als que està dirigit el miR-96 estan relacionats amb diferents vies del sistema immunològic en les que intervenen diferents interleucines.

Keller *et al.* (2009) van investigar els patrons d'expressió de 866 miRNAs en cèl·lules mononucleades de sang perifèrica en controls i 20 pacients d'EM, dels quals 9 estaven tractats amb acetat de glatiràmer i 10 amb interferó- β . Van identificar 165 miRNAs que presentaven una expressió diferenciada (sobre o infraexpressada) en pacients EM comparats amb controls. El miRNA amb diferències més significatives fou el miR-145 que permetia discriminar pacients EM de controls amb una especificitat del 89,5%, una sensibilitat del 90% i una

precisió del 89,7%. Un conjunt de 48 miRNAs ho permetien fer amb una especificitat del 95%, una sensibilitat del 97,6% i una precisió del 96,3%. Dels 165 miRNAs desregulats en pacients amb EM alguns ja s'havien prèviament relacionats amb altres malalties però d'altres eren exclusius d'EM.

Du *et al.* (2009) va estudiar el paper del miR-326 en leucòcits de sang perifèrica de controls i pacients xinesos afectats d'EM i de Neuromielitis òptica (NMO) i en el model animal de EAE. Van determinar que el miR-326, que està associat a les cèl·lules Th17, estava sobreexpressat en cèl·lules CD4+ en pacients xinesos afectats d'EM comparat amb pacients afectats de NMO i controls, i la seva expressió estava correlacionada amb la severitat de la malaltia. En EAE, la sobreexpressió de miR-326 es correlacionava directament amb el nombre de cèl·lules Th17 i amb la severitat clínica de la malaltia en animals. El miR-326 va dirigit contra el gen *Ets-1* que és un regulador negatiu de la diferenciació de Th17 (Moisan i Grenningloh 2007). Aquests resultats suggereixen un paper crític del miR-326 en la regulació de l'activitat Th17 i en la patogènia de l'EM. El miR-326 és un dels que s'ha trobat més sobreexpressats en lesions actives d'EM (Junker *et al.* 2009), fet que suggereix el seu paper rellevant en la patogènia de la malaltia. Un estudi posterior (Cox *et al.* 2010) no va trobar diferències en l'expressió de miR-326 en pacients comparats amb controls, però aquestes diferències en els resultats es podrien explicar perquè les poblacions a estudi eren ètnicament diferents i perquè les mostres biològiques estudiades foren també diferents. En el mateix treball els autors van objectivar que en un subgrup de pacients en brot clínic d'EM, el tractament amb esteroides disminuïa l'expressió de miR-326, indicant que aquest miRNA podria ser una diana terapèutica i podria utilitzar-se com a biomarcador de monitorització de resposta a tractament.

Junker *et al.* (2009) van realitzar un estudi que va aportar una interessant i valuosa informació en la recerca del paper dels miRNAs en l'EM. Els autors van investigar els diferents patrons d'expressió de 365 miRNAs en mostres de teixit cerebral de controls sense malalties neurològiques conegudes i de lesions actives i inactives d'EM obtingudes mitjançant microdissecció per làser de 20 pacients amb EM (16 lesions actives, de les quals 8 provenien de formes agressives i

fulminants d'EM –variant de Marburg-, i 5 lesions inactives). Van trobar que en lesions actives d'EM, 20 miRNAs estaven sobreexpressats i 8 miRNAs estaven infraexpressats comparats amb teixit normal. En lesions inactives, 22 miRNAs estaven sobreexpressats i 13 miRNAs estaven infraexpressats comparats amb teixit normal. També van trobar que tres dels miRNAs que estaven més sobreexpressats en lesions actives d'EM (miR-155, miR-326 i miR-34a) anaven dirigits contra el gen CD47, que alhora estava infraexpressat tant en lesions actives com inactives d'EM. Els autors també van trobar que els miR-155, miR-650, miR-34a i miR-326 estaven més sobreexpressats en lesions actives que en lesions inactives d'EM. La proteïna CD47 és una glicoproteïna de membrana que es troba en cèl·lules del SNC i té una funció de mediadora de la funció dels macròfags (Oldenborg *et al.* 2000; Yamao *et al.* 2002). CD47 dona una senyal d'inhibició de la fagocitosi per part dels macròfags, i la seva reducció estimula els fenòmens de fagocitosi pels macròfags. Per tant, en aquest estudi, els autors suggereixen que la sobreexpressió de miR-155, miR-326 i miR-34a reduiria els nivells de la proteïna CD47 de les cèl·lules del SNC (astròcits, oligodendròcits), fet que afavoriria la funció dels macròfags i promouria la fagocitosi tant de mielina com d'astròcits i oligodendròcits.

Lindberg *et al.* (2010) van investigar els patrons d'expressió de 365 miRNAs en cèl·lules CD4+, cèl·lules CD8+ i cèl·lules B de sang perifèrica en controls i 8 pacients mitjançant bioxips inicialment i posteriorment ho varen validar en cèl·lules CD4+ de controls i 15 pacients mitjançant RT-PCR. Cap dels pacients havia rebut tractaments específics per la seva malaltia en els 6 mesos previs a l'anàlisi. Els autors van identificar 10 miRNAs en cèl·lules CD4+, 4 miRNAs en cèl·lules CD8+ i 6 miRNAs en cèl·lules B que estaven expressades de forma diferent en controls i en pacients amb EM. Els miRNAs i els seus patrons d'expressió eren diferent en les diferents cèl·lules, fet que està en línia amb el fet conegut que els miRNAs i el seu patró d'expressió és diferent en les diferents cèl·lules del sistema immunològic. El miR-17-5p, que està involucrat en el desenvolupament de la autoimmunitat (Xiao i Rajewsky 2009) i en diferents malalties limfoproliferatives (Mraz *et al.* 2009) estava sobreexpressat en cèl·lules CD4+ dels pacients. Els mateixos autors van trobar que també el miRNA-193a

estava sobreexpressats en cèl·lules CD4+ de pacients, mentre que el miR-497, miR-1, miR-126 mostraven una expressió disminuïda.

Cox *et al.* (2010) van investigar, en un estudi amb més nombre de subjectes i miRNAs estudiats, els patrons d'expressió de 733 miRNAs en sang total en controls i 59 pacients amb EM (18 formes primàries progressives, 17 formes secundàries progressives i 24 formes remitent-recurrents) sense tractament immunomodulador específic en els 3 mesos abans de l'estudi. Van trobar, i confirmar mitjançant RT-PCR, que els miR-17 i miR-20a tenien una expressió disminuïda en totes les formes clíniques d'EM. Van demostrar, mitjançant models cel·lulars, que aquests miRNAs modulen els gens d'activació de les cèl·lules T, i que els mateixos gens d'activació de les cèl·lules T estaven sobreexpressats en el mRNA de sang total dels pacients. D'aquesta manera es suggeria la implicació d'aquests miRNAs en la patogènia de la malaltia i el possible potencial d'aquests miRNAs com a dianes terapèutiques.

De Santis *et al.* (2010) van estudiar els patrons d'expressió de 723 miRNAs en cèl·lules Treg CD4+CD25+ de controls i 12 pacients amb EM remitent-recurrent que no havien rebut tractaments immunomoduladors. Van observar que hi havia 23 miRNAs que estaven expressats de forma diferent entre controls i pacients, i d'entre ells el miR-106b i miR-25 tenien una expressió disminuïda en pacients comparats amb controls. Aquests dos miRNAs modulen les vies de senyalització de TGF- β que està implicada en la diferenciació i maduració de les cèl·lules Treg (Yamagiwa i Gray 2001).

Paraboschi *et al.* (2011) van estudiar els patrons d'expressió de 22 miRNAs relacionats amb immunitat en cèl·lules mononucleades de sang perifèrica en controls i pacients amb EM remitent-recurrent. Van observar que els miR-155, miR-92a, let-7f i miR-19a estaven significativament més sobreexpressats en pacients. D'aquests, el miR-155 és el que presentava uns nivells de sobreexpressió més incrementats i fou confirmat per RT-PCR. A més, van trobar que un haplotip de tres SNPs localitzats propers al gen de miR-155, i que es creu que poden afectar l'expressió del miRNA, estava associat a l'EM.

Waschbisch *et al.* (2011) van estudiar l'expressió de 5 miRNAs específics en cèl·lules mononucleades de sang perifèrica de 32 controls i 36 pacients amb EM remitent-recurrent sense tractament immunomodulador previ. Van trobar que els miR-20b, miR-142-3p, miR-146a, miR-155 i miR-326 estaven sobreexpressats en pacients comparats amb els controls. A més van fer un estudi d'expressió de miRNAs en un grup de 20 pacients tractats amb acetat de glatiràmer i 18 pacients tractats amb interferó- β per a valorar l'impacte que podria tenir el tractament immunomodulador en l'expressió dels miRNAs. Van observar que l'expressió dels anteriors miRNAs no era diferent entre pacients tractats amb interferó- β i pacients no tractats, però sí que l'expressió dels miR-142-3p i miR-146a estava significativament disminuïda en pacients tractats amb acetat de glatiràmer, fet que suggereix, en part, que aquest tractament pot restaurar l'expressió d'alguns miRNAs desregulats en l'EM.

Guerau-de-Arellano *et al.* (2011) van estudiar l'expressió de 677 miRNAs en cèl·lules mononucleades de sang perifèrica de controls sans i 22 pacients amb EM amb formes remitent-recurrent, primària progressiva i secundària progressiva sense tractament immunomodulador. Van trobar que els miR-128, miR-27b i miR-340 estaven expressats en pacients amb EM comparats amb controls i que aquesta sobreexpressió, en el model animal de EAE, estimulava la resposta proinflamatòria Th1. A més van observar que tractant les cèl·lules T dels pacients amb EM amb inhibidors específics d'aquests miRNAs, es restaurava la producció de citocines antiinflamatòries Th2. Aquesta dada contribueix a la possibilitat d'usar els miRNAs com a dianes terapèutiques en l'EM.

Fenoglio *et al.* (2011) van estudiar l'expressió d'alguns miRNAs en cèl·lules T CD4+ de sang perifèrica de controls sans i 29 pacients amb formes remitents-recurrents, secundàries progressives i primàries progressives d'EM sense tractament immunomodulador previ. Van trobar que els dels miR-21, miR-146a i miR-146b estaven sobreexpressats en pacients amb EM remitent-recurrent comparats amb els controls sans. No es van trobar diferències amb altres formes clíniques d'EM ni tampoc en l'expressió dels miR-150 i miR-155.

Siegel *et al.* (2012) van estudiar els patrons d'expressió de 900 miRNAs circulants en plasma de controls i 4 pacients amb EM. Van identificar 6 miRNAs (miR-614, miR-572, miR-648, miR-1826, miR-422a i miR-22) que estaven sobreexpressats en pacients amb EM i 1 miRNA (miR-1979) que presentava una expressió disminuïda.

Haghikia *et al.* (2012) van avaluar per primera vegada l'expressió de 760 miRNA en el LCR obtingut de forma rutinària en el procés diagnòstic d'una cohort àmplia de pacients amb EM i d'altres malalties neurològiques i psiquiàtriques, algunes amb perfil patogènic immunològic i d'altres amb perfil neurodegeneratiu. Inicialment es va analitzar una cohort formada pel conjunt de LCR de 10 pacients amb EM i 10 pacients amb les altres malalties i, posteriorment, es van validar els resultats en una cohort més àmplia formada per 53 pacients amb EM (17 formes remitent-recurrent, 30 formes secundària progressiva, 6 formes primària progressiva) i 39 pacients amb altres malalties neurològiques o psiquiàtriques. En aquest estudi els autors van identificar 3 miRNAs (miR-922, miR-181c, miR-633) que estaven expressats de forma diferent en els dos grups de pacients. A més el miR-181c i miR-633 diferenciaven formes remitent-recurrent de la secundària progressiva amb una sensibilitat del 69% i una especificitat del 82%. Malgrat aquests resultats, cap dels miRNAs correlacionaven amb la duració de la malaltia, edat, gènere o paràmetres bioquímics del LCR com nombre de cèl·lules o la quantitat de proteïnes. En el treball els autors reflexionen sobre d'origen d'aquests miRNAs detectats en LCR però no poden concloure si estan originats en el SNC o a nivell perifèric i posteriorment han travessat la barrera hematoencefàlica lesionada pels fenòmens inflamatoris propis de la malaltia. Finalment els autors indiquen que calen més estudis tant per validar aquestes troballes com per relacionar aquests resultats amb els dels treballs que analitzen els miRNAs a nivell perifèric o en les pròpies lesions d'EM.

Lorenzi *et al.* (2012) van estudiar l'expressió del miR-15a i miR-16-1 i del gen BCL2 (implicat en processos d'apoptosi cel·lular) en cèl·lules mononucleades de sang perifèrica CD4+ i CD8+ en controls i 15 pacients amb EM remitent-recurrent que no havien rebut tractament amb esteroides. Van trobar que

l'expressió dels miRNAs esmentats estava disminuïda i la del gen BCL2 sobreexpressada en cèl·lules CD4+ de pacients comparats amb controls.

Martinelli-Boneschi *et al.* (2012) van estudiar el perfil d'expressió de 1145 miRNAs en cèl·lules mononucleades de sang perifèrica inicialment en una cohort formada per controls i 19 pacients amb EM (7 forma remitent-recurrent, 6 forma secundària progressiva i 6 forma primària progressiva) que posteriorment foren validades en una cohort independent formada per controls i 10 pacients amb EM (5 forma remitent-recurrent, 2 forma secundària progressiva i 3 forma primària progressiva). En ambdues cohorts, hi havia pacients amb EM no tractats i amb diferents tipus de tractaments immunomoduladors. Els autors van trobar 104 miRNAs desregulats de forma diferent en pacients i en controls (45 estaven sobreexpressats i 59 tenien una expressió disminuïda), dels quals el let-7g i el miR-150 es varen validar en la segona cohort. No van trobar correlació entre l'expressió de miRNAs i el gènere o la duració de la malaltia.

Sievers *et al.* (2012) van estudiar l'expressió de 1059 miRNAs en limfòcits B d'una cohort inicial formada per 10 pacients amb EM remitent-recurrent no tractats amb immunomoduladors en els darrers 6 mesos, 10 pacients amb EM remitent-recurrent tractats amb natalizumab i 10 controls sans. Posteriorment es van validar els resultats en una cohort més àmplia amb 7 controls sans i 30 pacients més. Van trobar 49 miRNAs amb una expressió disminuïda en pacients no tractats comparats amb controls sans i 10 miRNAs que estaven sobreexpressats en pacients tractats amb natalizumab, dels quals el miR-19b i miR-106b foren validats en la segona cohort. Els autors conclouen que hi ha una desregulació en diferents miRNAs de limfòcits B en pacients amb EM remitent-recurrent i que el tractament amb natalizumab modula l'expressió d'alguns miRNAs desregulats en aquests pacients.

Gandhi *et al.* (2013) en un treball més recent i amb correlacions amb variables clíniques, van estudiar els patrons d'expressió de 368 miRNAs en plasma de controls i 19 pacients amb EM (10 formes remitent-recurrent i 9 formes secundàries progressives) que no havien rebut tractament immunomodulador ni esteroides en els mesos previs, i posteriorment es van validar 19 miRNAs

mitjançant RT-PCR en una cohort independent de 50 pacients amb EM remitent-recurrent, 51 pacients amb EM secundària progressiva i 32 controls. En la primera fase (cohort d'identificació) van identificar 29 miRNAs amb expressió diferenciada entre EMRR i controls, 35 miRNAs amb expressió diferenciada entre EMSP i controls, i 16 miRNAs amb expressió diferenciada entre EMRR i EMSP. Posteriorment es van seleccionar un conjunt de 19 miRNAs de la cohort inicial d'identificació que eren comuns entre les diferents comparacions de grups i el miR-145 per les troballes prèvies descrites a la literatura (Keller *et al.* 2009) i es van validar en la cohort independent més àmplia descrita prèviament. Les troballes més significatives foren que van trobar diferències en l'expressió de diferents miRNAs entre diferents grups de subjectes: miR-92a-1*, miR-145, miR-886-5p, miR-30e, miR-22, miR-210 i miR-221 entre pacients EMRR i controls; let-7a i miR-886-5p entre pacients EMSP i controls; miR-92a-1*, let-7c, let-7d, miR-454 i miR-145 entre pacients EMRR i pacients EMSP. Una dada important fou que l'expressió dels miR-92a-1* i miR-454 es van trobar associats a la discapacitat dels pacients mesurada per EDSS i amb la duració de la malaltia. En el treball també es va comparar l'expressió de miRNAs circulants en pacients amb EM amb pacients amb ELA i van trobar que el miR-92a-1* i la família de let-7 estan expressats de forma diferent entre pacients EMRR i ELA però no entre pacients EMSP i ELA, fet que suggereix que poden existir possibles processos patogènics similars entre formes progressives d'EM i ELA. Els miRNAs que els autors van trobar desregulats en diferents formes d'EM estan implicats en diferents processos inflamatoris i neurodegeneratius: expressió de CD4+ (miR-145), producció de IL-10 (miR-30e), producció de IL-12 (família let-7 i miR-92a-1*), proliferació i activació de cèl·lules T (miR-221 i miR-210), activació de macròfags i micròglia (família let-7), diferenciació cel·lular i neurogènesi (família let-7). En relació amb algunes de les troballes d'aquest treball, en la literatura també s'ha trobat que el miR-22 està sobreexpressat en lesions d'EM (Junker *et al.* 2009). La importància d'aquest treball recau en que els autors, primer, van identificar diferents patrons d'expressió de miRNAs implicats en processos neuroinflamatoris i neurodegeneratius entre diferents formes d'EM i controls sans; segon, que alguns miRNAs correlacionaven amb variables clíniques com discapacitat mesurada mitjançant EDSS i duració de la malaltia; i

tercer, que l'expressió alguns miRNAs no es va trobar diferent entre formes progressives d'EM i una altra malaltia neurodegenerativa d'etiologia diferent, com és l'ELA, suggerint mecanismes patogènics similars.

Aquest treball, juntament amb els altres, suggereixen que els miRNA poden ser uns potencials bons biomarcadors pel diagnòstic d'EM, formes clíniques, pronòstic i evolució de la mateixa i també, possiblement de monitorització i de resposta a tractament. No obstant això calen més estudis per validar els resultats que s'han trobat fins ara i cal també identificar les dianes i les vies immunològiques on actuen aquestes molècules.

Fenoglio *et al.* (2013) van estudiar l'expressió de 88 miRNAs en sèrum de controls i pacients amb EM sense tractament immunomodulador les setmanes anteriors a l'anàlisi. Inicialment es va estudiar una cohort de 7 pacients (3 forma remitent-recurrent i 4 forma primària progressiva) i posteriorment es van validar els resultats en una cohort independent formada per controls, 15 pacients amb EM remitent-recurrent i 13 pacients amb EM primària progressiva. Els autors van identificar 3 miRNAs (miR-15b, miR-23a i miR-223) que tenien una expressió disminuïda en pacients amb EM i van observar una correlació significativa entre els nivells dels miRNAs i la discapacitat mesurada mitjançant EDSS en els pacients amb EM primària progressiva. No van trobar correlació entre els nivells de miRNAs i l'edat, el gènere ni la duració de la malaltia.

Yang *et al.* (2013) van estudiar l'expressió de 754 miRNAs en cèl·lules mononucleades de sang perifèrica de controls i pacients xinesos amb EM remitent-recurrent en brot sense tractament immunomodulador previ. Inicialment es va estudiar una cohort de 10 pacients i 10 controls i posteriorment es van validar en una segona cohort independent de 40 pacients amb EM i 40 controls. En la cohort inicial 9 miRNAs estaven sobreexpressats i 6 miRNAs tenien una expressió disminuïda en pacients comparats amb controls, i en la segona cohort es van validar 6 miRNAs (miR-125a, miR-200c, miR-146b, miR-328, miR-199a, miR-152) que estaven expressats de forma diferent entre pacients amb EM i controls. Els autors conclouen que es poden diferenciar clarament pacients xinesos amb EM de controls sans basats en un patró d'expressió de miRNAs específic.

Hecker *et al.* (2013) van realitzar un estudi longitudinal sobre els canvis d'expressió de miRNAs com a resposta al tractament immunomodulador amb interferó- β en pacients amb EM. Van analitzar el comportament de l'expressió de 651 miRNAs i 19000 mRNAs en cèl·lules mononucleades de sang perifèrica en 4 pacients amb EM i 2 pacients amb síndrome clínicament aïllada abans d'iniciar tractament amb interferó- β i prospectivament als 2, 4 i 30 dies. Van observar que la sobreexpressió de gens de resposta a interferó- β es correlacionava amb una expressió disminuïda de diferents miRNAs, en el que estaven inclosos diferents membres de la família del miR-29 que estan associats a processos apoptòtics i bucles de retroalimentació dels interferons. Els autors conclouen que diferents patrons d'expressió de miRNA en sang perifèrica poden ésser d'utilitat com a biomarcadors de resposta a tractament amb interferó- β i, fins i tot, predir l'activitat i progressió individual de la malaltia.

Jernås *et al.* (2013) van estudiar l'expressió de diferents mRNAs i d'aproximadament 1000 miRNAs en cèl·lules T de sang perifèrica de controls i 11 pacients amb EM remitent-recurrent en tractament amb interferó- β en la cohort inicial i posteriorment es van validar els resultats en una altra cohort independent amb controls sans i 16 pacients amb EM remitent-recurrent. Van identificar 2452 gens i 21 miRNAs que s'expressaven de forma diferent en pacients que en controls, la majoria dels quals estaven implicats en les vies del sistema immunològic. Els principals miRNAs que es van trobar diferenciats foren el miR-494 i miR-197.

Keller *et al.* (2013) van estudiar l'expressió de miRNAs en sang total de controls, 25 pacients amb síndrome clínicament aïllada i 25 pacients amb EM, tots ells sense tractament immunomodulador ni esteroides previs, i posteriorment es van validar els resultats en una altra cohort independent. Es van utilitzar els mètodes habituals d'anàlisi utilitzats en aquests tipus d'estudis i també un sistema de seqüenciació de nova generació. Els autors van trobar que s'identificaven diferents miRNAs desregulats segons el mètode d'anàlisi utilitzat. D'aquests, 3 miRNAs estaven sobreexpressats (miR-16-2-3p) o amb expressió disminuïda (miR-20a-5p, miR-7-1-3p) en els dos mètodes. Altres 5 miRNAs, dels que estaven

significativament desregulats, mantenien la mateixa direcció de l'expressió en els dos mètodes d'anàlisi.

Søndergaard *et al.* (2013) van estudiar -inicialment una cohort d'identificació i posteriorment en una cohort de validació- l'expressió de miRNAs en cèl·lules mononuclears de sang perifèrica, plasma i sèrum de controls i pacients amb EM remitent-recurrent sense tractament immunomodulador de base i en fase d'estabilitat de la malaltia. Entre els miRNAs validats, l'expressió del let-7d correlacionava amb els nivells d'IL-1B proinflamatòria i el miR-145 estava sobreexpressat en pacients amb EM. Els nivells d'expressió dels miRNAs no es van poder correlacionar amb el temps des del darrer brot ni amb les lesions realçades amb gadolini a la RM dels pacients.

Meira *et al.* (2014), del mateix grup de Sievers *et al.* (2012) van estudiar l'expressió del miR-126 en cèl·lules T CD4+ de controls, 12 pacients amb EM remitent-recurrent no tractats i 24 pacients amb EM tractats amb natalizumab. Van observar que aquest miRNA presentava una expressió disminuïda en pacients tractats amb natalizumab comparats amb pacients no tractats, que l'expressió del miR-126 augmentava durant els brots (estudiat en 2 pacients de la cohort) i que l'expressió del miRNA es correlacionava amb l'expressió d'un gen que es lliga al promotor de la seqüència del virus JC, responsable de la leucoencefalopatia multifocal progressiva, complicació més greu d'aquest tractament. D'aquesta manera els autors proposen que el miR-126 està implicat en el mecanisme d'acció del natalizumab, no només en el seu efecte terapèutic sinó també en els seus potencials efectes adversos.

Zhang *et al.* (2014) en un estudi en població xinesa, van investigar inicialment l'expressió de 8 miRNAs (miR-155, miR-326, miR-146a, miR-150, miR-181a, miR-181b, miR-124, miR-92a) en sèrum de 31 pacients amb EM (14 en fase de brot i 17 en fase de remissió), 32 pacients en fase aguda de síndrome de Guillain-Barré i controls. Cap dels pacients havia rebut tractament immunomodulador 3 setmanes abans de l'estudi. Van trobar que 5 d'aquests miRNAs estaven més sobreexpressats en pacients amb EM que en els altres grups, però el que es sobreexpressava més era el miR-155 i sobretot en el grup de pacients amb EM en

brot. Posteriorment van estudiar l'expressió de miR-155 en ratolins amb EAE i van trobar que la seva expressió es correlacionava amb el nombre de cèl·lules Th1 i Th17 i amb la severitat de la malaltia en els animals: els ratolins amb menys expressió de miR-155 tenien menys cèl·lules Th1 i Th17 i una EAE més lleu, i els ratolins amb sobreexpressió de miR-155 tenien més cèl·lules i una forma més agressiva de la malaltia. Amb aquestes troballes els autors suggereixen que el miR-155 estimula la diferenciació de cèl·lules Th1 i Th17 que mantenen la resposta inflamatòria en la EAE i que agreuja la malaltia. Els autors proposen el miR-155 com a potencial diana terapèutica per l'EM.

Taula 4. Resum dels treballs publicats en relació a EM i miRNAs.

Autors (any)	Mostra biològica	Subjectes	miRNAs destacats
Otaegui <i>et al.</i> (2009)	PBMC	21 pacients EM en brot/remissió Controls	miR-18b miR-96 miR-599
Keller <i>et al.</i> (2009)	PBMC	20 pacients EMRR (AG i IFN) Controls	miR-145
Du <i>et al.</i> (2009)	PBMC	Pacients xinesos EM Pacients xinesos NMO EAE	miR-326
Junker <i>et al.</i> (2009)	Teixit cerebral	Lesions actives i inactives d'EM	miR-34a miR-155 miR-326 miR-650
Lindberg <i>et al.</i> (2010)	Cèl. CD4+ Cèl. CD8+ Cèl. B	23 pacients Controls	miR-1 miR-17-5p miR-126 miR-193a miR-497
Cox <i>et al.</i> (2010)	Sang total	59 pacients (24 EMRR, 17 EMSP, 18 EMPP) Controls	miR-17 miR-20a
De Santis <i>et al.</i> (2010)	Cèl. Treg CD4+CD25+	12 pacients EMRR Controls	miR-106b miR-25
Paraboschi <i>et al.</i> (2011)	PBMC	Pacients EMRR Controls	let-7f miR-19a miR-92a miR-155
Waschbisch <i>et al.</i> (2011)	PBMC	36 pacients EMRR 20 pacients AG 18 pacients IFN Controls	miR-20b miR-142-3p miR-146a miR-155 miR-326
Guerau-de- Arellano <i>et al.</i> (2011)	PBMC	22 pacients (EMRR, EMSP, EMPP) Controls	miR-27b miR-128 miR-340
Fenoglio <i>et al.</i> (2011)	Cèl. T CD4+	29 pacients (EMRR, EMSP, EMPP) Controls	miR-21 miR-146a miR-146b miR-150 miR-155
Siegel <i>et al.</i> (2012)	Plasma	4 pacients EM Controls	miR-22 miR-422a miR-572 miR-614 miR-648 miR-1826 miR-1979
Haghikia <i>et al.</i> (2012)	LCR	53 pacients (17 EMRR, 30 EMSP, 6 EMPP) 39 pacients altres malalties neurològiques i psiquiàtriques	miR-181c miR-633 miR-922
Lorenzi <i>et al.</i> (2012)	PBMC	15 pacients EMRR Controls	miR-15a miR-16-1

Taula 4 (continuació). Resum dels treballs publicats en relació a EM i miRNAs.

Autors (any)	Mostra biològica	Subjectes	miRNAs destacats
Siegel <i>et al.</i> (2012)	Plasma	4 pacients EM Controls	miR-22 miR-422a miR-572 miR-614 miR-648 miR-1826 miR-1979
Haghikia <i>et al.</i> (2012)	LCR	53 pacients (17 EMRR, 30 EMSP, 6 EMPP) 39 pacients altres malalties neuroològiques i psiquiàtriques	miR-181c miR-633 miR-922
Lorenzi <i>et al.</i> (2012)	PBMC	15 pacients EMRR Controls	miR-15a miR-16-1
Martinelli- Boneschi <i>et al.</i> (2012)	PBMC	29 pacients (12 EMRR, 8 EMSP, 9 EMPP) Controls	Let-7g miR-150
Sievers <i>et al.</i> (2012)	Limfòcits B	40 pacients EMRR (30 no TIM, 10 NTZ) Controls	miR-19b miR-106b
Gandhi <i>et al.</i> (2013)	Plasma	120 pacients (60 EMRR, 60 EMSP) Controls	let-7a let-7c let-7d miR-22 miR-30e miR-92-a-1* miR-145 miR-210 miR-221 miR-454 miR-886-5p
Fenoglio <i>et al.</i> (2013)	Sèrum	35 pacients (18 EMRR, 17 EMPP) Controls	miR-15b miR-23a miR-223
Yang <i>et al.</i> (2013)	PBMC	50 pacients EM xinesos Controls	miR-125a miR-146b miR-152 miR-199a miR-200c miR-328
Hecker <i>et al.</i> (2013)	PBMC	4 pacients EM + 2 pacients SCA amb IFN	miR-29
Jernås <i>et al.</i> (2013)	Sang total	27 pacients EMRR Controls	miR-197 miR-494
Keller <i>et al.</i> (2013)		15 pacients SCA + 25 pacients EM Controls	miR-7-1-3p miR-16-2-3p miR-20a-5p
Søndergaard <i>et al.</i> (2013)	PBMC, plasma, sèrum	Pacients EMRR Controls	Let-7d miR-145
Meira <i>et al.</i> (2014)	Cèl. T CD4+	12 pacients EMRR no TIM 24 pacients EMRR amb NTZ Controls	miR-126
Zhang <i>et al.</i> (2014)	Sèrum	31 pacients xinesos EM brot/remissió Controls	miR-155

2. HIPÒTESIS i OBJECTIUS

2.1. HIPÒTESIS

Les hipòtesis d'aquesta tesi són:

- 1- L'estudi de l'expressió de microRNAs en el líquid cefaloraquidi de pacients en les fases inicials d'esclerosi múltiple ens permet identificar un perfil específic de microRNAs útil per al diagnòstic de la malaltia, que podria ésser usat com a biomarcador de diagnòstic de la malaltia.

- 2- Existeix un perfil específic d'expressió de microRNAs en el líquid cefaloraquidi de pacients amb esclerosi múltiple que està associat a la presència de bandes oligoclonals d'IgM lípidespecífiques relacionades amb formes de la malaltia de pitjor pronòstic evolutiu, i que podria ésser usat com a biomarcador de pronòstic de la malaltia.

2.2. OBJECTIUS

Els objectius d'aquesta tesi són:

2.2.1. Objectius principals

- 1- Explorar si l'anàlisi de microRNAs en el líquid cefaloraquidi és viable i pot ser una eina útil per a l'estudi de factors diagnòstics i pronòstics per a l'esclerosi múltiple.
- 2- Identificar un perfil de microRNAs en el líquid cefaloraquidi de pacients amb esclerosi múltiple diferenciat del de pacients afectats d'altres malalties neurològiques.
- 3- Identificar un perfil de microRNAs en el líquid cefaloraquidi de pacients amb esclerosi múltiple que permeti diferenciar les formes de la malaltia amb bandes oligoclonals d'IgM lípidespecífiques positives en líquid cefaloraquidi, que s'han associat a formes de la malaltia de pitjor pronòstic.

2.2.2. Objectius secundaris

- 1- Explorar la relació de l'expressió dels microRNAs en el líquid cefaloraquidi dels pacients amb esclerosi múltiple i la seva forma de presentació clínica i radiològica, i evolució clínica als 12 mesos de seguiment.

3. *PACIENTS i MÈTODES*

3.1. PACIENTS

3.1.1. Disseny

Estudi clínic observacional, descriptiu, longitudinal i exploratori en dues etapes sobre l'expressió diferenciada de miRNAs d'una cohort de pacients afectats d'EM respecte a pacients afectats d'altres malalties neurològiques i en funció de la presència o absència de BOCM_LE en LCR.

3.1.2. Subjectes de l'estudi

Tots els subjectes que van participar en l'estudi foren visitats en el Servei de Neurologia de l'Hospital Universitari Dr. Josep Trueta de Girona i a la Unitat de Neuroimmunologia i Esclerosi Múltiple (UNIAM) del mateix centre.

La UNIAM és la unitat multidisciplinària de referència de la província de Girona que s'encarrega del maneig clínic i assistencial (diagnòstic, seguiment i tractament), de la recerca i de la formació dels pacients i familiars afectats d'esclerosi múltiple i d'altres malalties de base neuro-immunològica del sistema nerviós central. Actualment, hi ha registrada en la base de dades més de 880 pacients i es dona suport i seguiment assistencial prospectiu a uns 600 pacients.

Des de mitjans de 2011, la UNIAM disposa d'una col·lecció de mostres de pacients amb EM i d'altres malalties neurològiques (de base inflamatòria i d'altres etiologies) que en el seu procés diagnòstic han requerit d'una anàlisi de sang i de LCR per arribar a un diagnòstic definitiu. Actualment aquesta col·lecció de mostres biològiques, anomenada *BioEM*, forma part del Biobanc (Ley 14/2007; Real Decreto 1716/2011) de l'Institut d'Investigació Biomèdica de Girona (IDIBGI).

Tots els pacients que han participat en aquesta col·lecció de mostres biològiques han signat els corresponents consentiments informats (Annex 3 i Annex 4) aprovats pel CEIC de l'Hospital Universitari Dr. Josep Trueta de Girona (Decret 406/2006) i se'ls garanteix que es respecten els principis fonamentals de la Declaració de Hèlsinki (World Medical Association 2013) així com la legislació vigent sobre la confidencialitat de les dades personals i normes ètiques sobre estudis clínics de protecció de dades (Ley Orgánica 15/1999; Real Decreto 1720/2007). Sempre que ha estat possible, s'ha recollit per a cadascun dels pacients plasma, sèrum, DNA, cèl·lules mononucleades de sang perifèrica (PBMC), RNA, LCR i cèl·lules de LCR.

Amb data 1 d'abril de 2014, aquesta col·lecció disposava del següent nombre i tipus de mostres:

- mostres de plasma, sèrum, DNA, PBMC, RNA i LCR obtingudes de 285 extraccions diferents
- 266 mostres totals de plasma
- 273 mostres totals de sèrum
- 236 mostres totals de cèl·lules mononucleades de sang perifèrica
- 181 mostres totals de LCR
- 181 mostres de DNA de pacients diferents
- 74 mostres de RNA de pacients diferents
- 156 mostres de cèl·lules mononucleades de sang perifèrica de pacients diferents
- 175 mostres de LCR de pacients diferents
- mostres de 208 pacients diferents
- mostres de 112 pacients amb EM o SCA
- mostres de 96 pacients afectats d'altres malalties neurològiques

3.1.2.1. Criteris d'inclusió i exclusió dels subjectes de l'estudi

Criteris d'inclusió

- Pacients entre 18 i 65 anys.
- Pacients que per motius diagnòstics se'ls va realitzar una punció lumbar i estudi de LCR.
- Pacients que van signar el corresponent consentiment informat per a l'obtenció de mostres biològiques de sang i LCR.
- Pacients amb EMRR segons criteris de McDonald 2010 revisats, pacients amb SCA amb criteris de disseminació en espai per RM i pacients amb d'altres malalties neurològiques del SNC.

Criteris d'exclusió

- Pacients amb formes secundàries progressives o primàries progressives d'EM.
- Pacients que han rebut tractament immunomodulador durant els 90 dies anteriors a la inclusió de l'estudi.
- Pacients diagnosticats d'alguna malaltia neurodegenerativa.
- Pacients diagnosticats d'una malaltia psiquiàtrica greu.
- Pacients amb antecedent de traumatisme cranioencefàlic greus.
- Pacients embarassades o lactants.
- Pacients que no poden realitzar una RM.

3.1.2.2. Grups de pacients

Els subjectes analitzats a l'estudi es van classificar en dos grups:

- Grup "EM": format per pacients diagnosticats d'EM segons criteris de McDonald 2010 revisats i forma clínica remitent-recurrent, i pacients amb SCA amb criteris de disseminació en espai per RM, als quals es va realitzar una punció lumbar per estudi del LCR.

- Grup "Control": format per pacients afectats d'altres malalties neurològiques diferents del grup "EM" que foren estudiats al Servei de Neurologia o a la UNIEM i que per motius diagnòstics van requerir d'una punció lumbar per estudi del LCR.

3.1.2.3. Cohorts d'estudi

Per a l'estudi dels miRNAs es van utilitzar dues cohorts:

- Cohort d'identificació: cohort inicial formada per 5 subjectes del grup "Control" i 9 pacients del grup "EM".
- Cohort de validació: cohort posterior formada per 32 subjectes del grup "Control" i 29 pacients del grup "EM".

3.1.3. Variables d'estudi

Les variables analitzades en aquest estudi es poden agrupar en 3 grans blocs: variables clíniques, variables d'anàlisi de LCR i variables radiològiques. A continuació s'explica amb detall cadascuna d'elles.

3.1.3.1. Variables clíniques

Grup "EM":

- *Edat*: Edat en el moment del diagnòstic (anys)
- *Edat debut*: Edat en el moment del primer brot de la malaltia (anys)
- *Sexe*: Sexe (dona, home)
- *Topografia debut*: Localització clínica del brot en el moment del debut de la malaltia (nervi òptic, tronc, medul·la, hemisfèric, poliregional)

- *Brots*: Nombre total de brots, des del primer brot fins als 12 mesos de seguiment
- *EDSS basal*: Mesura de la discapacitat en el moment basal (EDSS)
- *EDSS 12m*: Mesura de la discapacitat als 12 mesos de seguiment (EDSS)
- *TIM*: Inici del tractament durant els 12 mesos de seguiment (sí/no)
- *TIM_t*: Temps en tractament durant els 12 mesos de seguiment (mesos)

Grup "Control":

En el grup "Control" es van recollir les variables clíniques següents:

- *Edat*: Edat en el moment del diagnòstic (anys)
- *Sexe*: Sexe (dona, home)
- *Diagnòstic*: Diagnòstic de la malaltia

3.1.3.2. Variables d'anàlisi de LCR

Grup "EM" i grup "Control":

- *BOCG*: Presència o absència de BOCG en LCR
- *BOCM_LE*: Presència o absència de BOCM_LE en LCR
- *Índex IgG*: Índex IgG en LCR, segons la fórmula següent

$$\text{Índex IgG} = \frac{\text{IgG LCR} \times \text{albúmina sèrum}}{\text{IgG sèrum} \times \text{albúmina LCR}}$$

3.1.3.3. Variables radiològiques

Grup "EM":

- *C_Barkhof*: Nombre de Criteris de Barkhof (Annex 2) (1-2, 3-4)
- *Lesions T2*: Nombre de lesions hiperintenses en T2/FLAIR (<9, ≥9)
- *Lesions Gd+*: Nombre de lesions realçades amb gadolini
- *Lesions infratentorials*: Presència o absència de lesions infratentorials
- *Lesions hipointenses T1*: Presència o absència de lesions hipointenses en T1
- *Lesions cranials*: Nombre de lesions cranials en T2/FLAIR
- *Volum T2*: Volum lesional en T2/FLAIR (ml)
- *SG_FAST*: Volum de substància gris mitjançant el mètode FAST (ml)
- *SB_FAST*: Volum de substància blanca mitjançant el mètode FAST (ml)
- *BPF_FAST*: Atròfia cerebral mitjançant el mètode FAST (BPF)
- *SG_SPM*: Volum de substància gris mitjançant el mètode SPM8 (ml)
- *SB_SPM*: Volum de substància blanca mitjançant el mètode SPM8 (ml)
- *BPF_SPM*: Atròfia cerebral mitjançant el mètode SPM8 (BPF)

El càlcul de BPF es va realitzar segons la fórmula següent:

$$BPF = \frac{SB + SG}{SB + SG + LCR}$$

Grup "Control":

En el grup "Control" no es van obtenir dades radiològiques en no tractar-se de pacients amb EM o SCA.

3.2. MÈTODES

3.2.1. Protocol de la recollida de mostres

Les mostres analitzades en aquest estudi s'han recollit seguint el procediment del projecte *BioEM*, aprovat pel CEIC de l'Hospital Universitari Dr. Josep Trueta de Girona, prèviament comentat.

Als pacients que, per motius diagnòstics, se'ls ha de realitzar una extracció de sang i una punció lumbar, se'ls recullen més tubs extres de mostres de sang i de LCR, prèvia informació i signatura del consentiment informat corresponent. En total s'extreuen entre 10 i 15 ml de LCR. Les mostres de sang i LCR que no s'utilitzen pel procés diagnòstic rutinari queden incloses a la col·lecció del projecte *BioEM* i al Biobanc de l'IDIBGI.

Pel que fa a la mostra de sang s'extreuen:

- 2 tubs d'EDTA, que un cop centrifugats ens permetran obtenir plasma i cèl·lules de la capa leucocitària a partir de la qual obtindrem DNA.
- 2 tubs amb gel separador, que un cop centrifugats ens permet obtenir sèrum
- 3 tubs amb Ficoll™, amb els quals després de diferents processos de centrifugació i rentat amb sèrum fisiològic aconseguim la separació de cèl·lules mononucleades de sang perifèrica (PBMC per les seves sigles en anglès) que inclouen limfòcits (cèl·lules T, cèl·lules B, cèl·lules NK), monòcits i cèl·lules dendrítiques.

Pel que fa a la mostra de LCR, i després d'un procés de centrifugació a 400g, s'obté LCR lliure de cèl·lules i cèl·lules aïllades de LCR.

3.2.2. Tècniques de detecció de BOCG, BOCM i càlcul de l'índex IgG

Determinació de les BOCG i càlcul de l'índex IgG

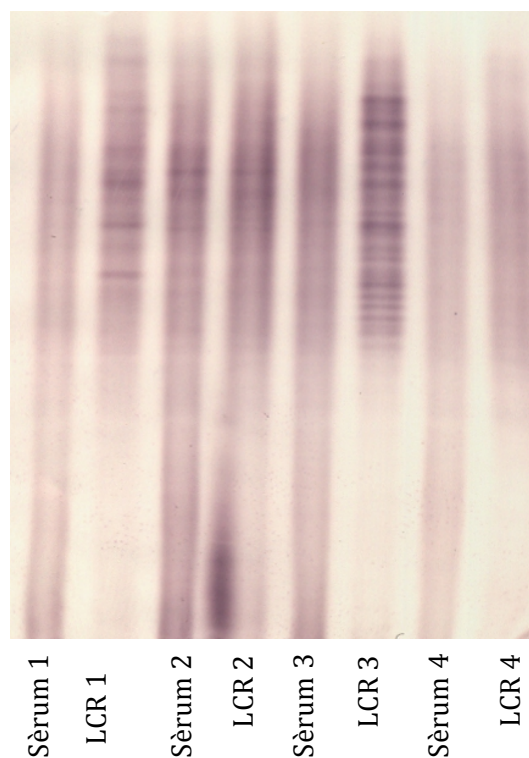
La metodologia utilitzada per la determinació de les bandes oligoclonals d'IgG (BOCG) consisteix en la separació per isoelectroenfoc (IEF) seguit d'immunodetecció.

El sistema de IEF permet la separació de les proteïnes per punt isoelèctric (pH en el que la càrrega de la proteïna és 0). Per aconseguir-ho se separen les proteïnes sobre un gel d'agarosa i *Pharmalytes*® (GE Healthcare, Alemanya) d'un rang de pH 3-10, responsables de crear un gradient de pH en el moment que passi corrent elèctric a través del gel. Les proteïnes contingudes en el sèrum i el LCR es desplaçaran sobre el gradient de pH fins a aturar-se en el punt on la seva càrrega sigui 0.

Per a la realització de la tècnica cal inicialment quantificar la concentració d'IgG en LCR i en sèrum mitjançant el sistema de nefelometria. Per tal de poder comparar la presència de bandes entre sèrum i LCR és necessari diluir el sèrum per tal d'ajustar la concentració a la del LCR.

Seguidament es separa la mostra de sèrum i LCR mitjançant IEF.

Finalitzat aquest procés es transfereixen les proteïnes a una membrana de nitrocel·lulosa. Seguidament es bloqueja la membrana amb una solució de llet en pols al 2%. A continuació, per tal de detectar específicament la nostra proteïna d'interès, s'incuba amb anticòs antiIgG humana (Jackson ImmunoResearch, UK) unida a fosfatasa alcalina, i finalment es revela amb 5-bromo-4-cloro-3-indolilfosfat (BCIP) i nitroblau de tetrazoli (NBT) (figura 14).

Figura 14. Exemple de resultats de diferents patrons d'anàlisi de BOCG.

Mostra 1. Patró positiu: Presència de bandes en LCR, absència en sèrum.

Mostra 2. Patró en mirall: Presència de bandes en LCR i presència de les mateixes bandes en sèrum.

Mostra 3. Patró positiu més que: Presència d'almenys dues bandes més en LCR que en sèrum.

Mostra 4. Patró negatiu: Absència de bandes en LCR i en sèrum.

Pel càlcul de l'índex *IgG* es disposa de la quantificació de *IgG* i albúmina tant en sèrum com en LCR, i s'aplica la fórmula següent:

$$\text{Índex } IgG = \frac{IgG \text{ LCR} \times \text{albúmina sèrum}}{IgG \text{ sèrum} \times \text{albúmina LCR}}$$

Determinació de les BOCM

La metodologia utilitzada per la determinació de les bandes oligoclonals de IgM (BOCM) és la següent:

Es quantifica la concentració d'IgM en LCR i sèrum mitjançant un sistema de nefelometria. Es dilueix el sèrum per a igualar la seva concentració a la del LCR i permetre una correcta observació del perfil. En aquest cas cal reduir la IgM amb ditioteitrol (DTT) amb una incubació de 30 minuts. La IgM és una immunoglobulina pentamèrica que té un volum considerablement gran, per això cal fer un pas previ de reducció per tal que quedi amb un estructura monomèrica.

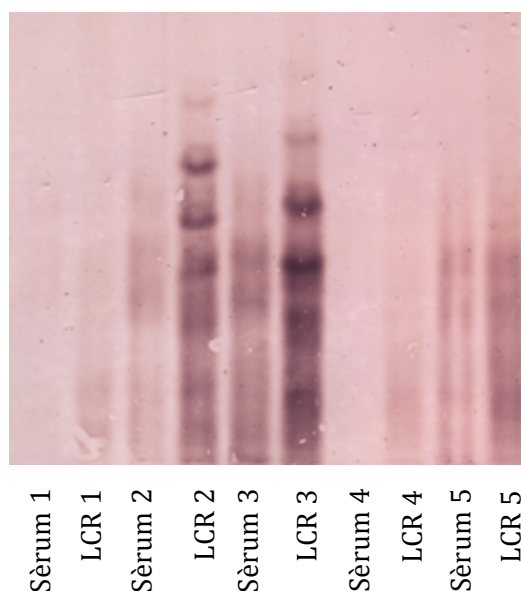
Seguidament, es separen les proteïnes pel seu punt isoelèctric en un gel d'agarosa que conté un gradient de *Pharmalytes*® (GE Healthcare, Alemanya) de pH 5-8 utilitzant el sistema d'IEF. Un cop acabada la separació, es transfereixen les proteïnes a una membrana de nitrocel·lulosa. Després del bloqueig de la membrana amb una solució de llet en pols al 2%, es realitza la immunodetecció amb l'anticòs antiIgM humana (Sigma-Aldrich, Espanya). Finalment, prèvia incubació amb estreptavidina marcada amb fosfatasa alcalina, per incrementar el senyal, es revela amb BCIP i NBT.

Les mostres de LCR de pacients amb BOCM positives es van enviar al Servei d'Immunologia de l'Hospital Ramon y Cajal de Madrid (Dra. Luisa María Villar) per a la determinació de l'especificitat de les IgM per a lípids de la mielina. La tècnica consisteix en repetir el mateix procés de tractament del LCR amb DTT per a la seva reducció i separació per IEF en un gel d'agarosa. En el moment de fer la transferència a la membrana de nitrocel·lulosa, se n'utilitza una prèviament tractada amb fosfatidilcolina, de manera que la membrana conté una capa homogènia d'aquest lípid de la mielina. Només les IgM que tinguin especificitat per aquest tipus de lípid es mantenen unides a la membrana i, per tant, seran detectades en el moment del revelatge.

Per a la observació d'aquestes bandes es continua amb el procés abans esmentat. S'incuba amb anticòs específic per IgM i marcat amb botina, posteriorment es

realitza una segona incubació amb estreptavidina marcada amb fosfatasa alcalina sobre la qual es produirà el revelatge amb BCIP i NBT (figura 15).

Figura 15. Exemple de resultats de diferents patrons d'anàlisi de BOCM.



Mostra 1. Patró negatiu: Absència de bandes en LCR, absència en sèrum.

Mostra 2. Patró positiu: Presència de bandes en LCR i absència en sèrum.

Mostra 3. Patró positiu més que: Presència d'almenys dues bandes més en LCR que en sèrum.

Mostra 4. Patró negatiu: Absència de bandes en LCR i en sèrum.

Mostra 5. Patró negatiu en mirall: Presència de bandes en LCR i les mateixes en sèrum

3.2.3. Tècniques de detecció i quantificació dels miRNAs

Extracció, retrotranscripció i preamplificació de miRNAs de LCR

L'extracció de RNA es realitzà a partir de 300 µl de líquid cefaloraquidi (LCR) amb el Kit d'aïllament mirVana® PARIS (Applied Biosystems, Alemanya) i seguint les instruccions del fabricant. Els miRNAs de LCR van ser retrotranscrits (pas de RNA a cDNA) i preamplificats (increment proporcional del nombre de còpies de cada molècula RNA original) abans de l'anàlisi. La detecció i quantificació de cada molècula es va dur a terme mitjançant la reacció en cadena

de la polimerasa a temps real (RT-PCR) i mitjançant sondes i encebadors específics (Applied Biosystems, Alemanya). Per la reacció de retrotranscripció s'utilitzaren els reactius TaqMan® miRNA Reverse Transcription Kit i Megaplex™ RT Primers per miRNAs humans, dissenyats per convertir fins a 754 espècies miRNA a cDNA abans de l'anàlisi via RT-PCR. El producte de la reacció es dilueix abans de la preamplificació que es realitzà mitjançant el TaqMan® PreAmp Màster Mix i el Megaplex™ PreAmp Primers, que proporcionen una preamplificació opcional necessària quan la sensibilitat del mètode és especialment important, o quan la quantitat d'RNA a la mostra original és molt limitada.

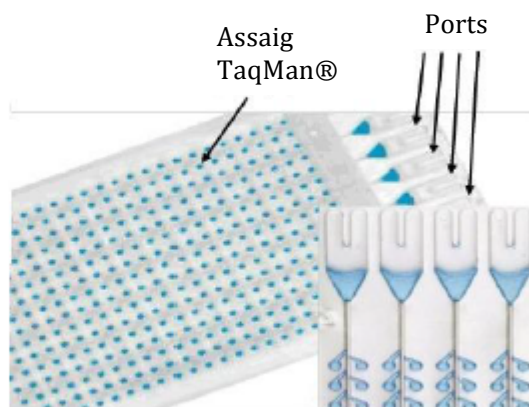
Es controla el resultat del procés d'extracció, retrotranscripció i preamplificació amb l'anàlisi de diversos miRNAs mitjançant RT-PCR.

Identificació de miRNAs mitjançant targetes microfluídiques o bioxips de baixa densitat basats en sondes TaqMan® (TLDA)

S'analitzà l'expressió de 754 espècies miRNA en mostres de LCR de pacients amb EM i subjectes control utilitzant el sistema de targetes microfluídiques, també coneguts com a bioxips de baixa densitat basats en sondes TaqMan® (TLDA, Applied Biosystems, Alemanya). El processament i lectura de les TLDA s'ha realitzat en un termociclador ABI Prism 7900HT®, d'Applied BioSystems. El grau de detecció de cada un dels miRNAs a la mostra estudiada s'obté mitjançant el software Relative Quantification® versió 2.2.2 i es representa a través de cada valor independent, normalitzat a través del valor llindar de cicle tèrmic (Ct) pel total de mostres. El Ct de cada miRNA es determina en el número de cicles en el qual l'emissió d'intensitat del marcador fluorescent FAM s'eleva per damunt del llindar mínim de detecció, relatiu al soroll de fons assignat prèviament, en la fase exponencial de la PCR. Els valors de Ct són inversament proporcionals, per tant, al nombre de seqüències miRNA de cada classe. Per a l'anàlisi dels resultats TLDA i la selecció de potencials dianes es va utilitzar el paquet bioinformàtic HTqPCR del programa estadístic R que també permet la detecció dels miRNAs de referència (normalitzadors o control endògens, en aquest cas, el miR-17), útils

per la subseqüent validació sense necessitat d'analitzar tots els miRNAs en totes les mostres.

Figura 16. Esquema de la placa TLDA, assaig TaqMan®.



Validació de resultats mitjançant RT-PCR i sondes TaqMan®

L'anàlisi de la presència d'uns determinats miRNAs al LCR, preseleccionats per la seva potencial rellevància en la MS, es va dur a terme en una cohort més àmplia, incloent els participants seleccionats per la mostra d'identificació, amb l'objectiu de validar els canvis en la concentració en LCR dels miRNAs prèviament identificats. Per l'estudi de validació es van reanalitzar mitjançant RT-PCR i assajos d'hidròlisi TaqMan individuals (Applied Biosystems) els miRNAs que van mostrar canvis entre pacients amb EM i subjectes control a la subcohort d'identificació amb un valor $p < 0,2$. El producte final de la preamplificació es va diluir 1:100 per tal d'obtenir una concentració de cDNA adequada. L'anàlisi es va dur a terme amb un equip Light Cycler 480 II Real-Time PCR System (Roche Diagnostics, Suïssa) i sondes d'hidròlisi TaqMan®.

També es van analitzar utilitzant la mateixa metodologia miRNAs que en la literatura s'havien associat en varis treballs a EM. Els valors obtinguts es van normalitzar mitjançant els valors Ct del miRNA de referència miR-17 segons la

fórmula del $2^{-\Delta Ct}$, on ΔCt equival a la diferència entre el Ct del gen diana i el Ct del miRNA de referència per cada mostra.

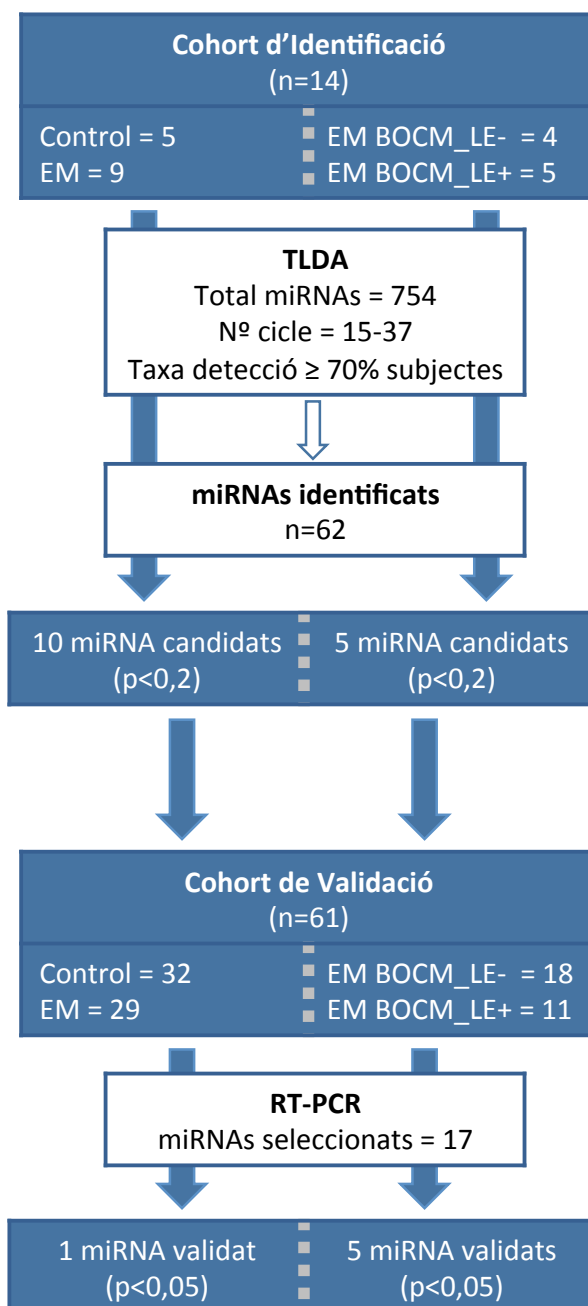
Descripció de l'acció biològica dels miRNAs

Un cop identificats els miRNAs rellevants es va valorar la seva possible implicació amb l'EM, per això es va realitzar recerca bibliogràfica i bases de dades on es recullen dades experimentals i obtingudes “*in silico*” referents a la funció dels miRNAs.

Per aquesta part, es van utilitzar els recursos informàtics disponibles online: miRsearch2.0, Dianalabs, miRDB, IPA i Pubmed.

3.2.4. Seqüència de l'estudi dels miRNAs

La seqüència seguida per a la identificació i quantificació dels miRNAs en aquest estudi està esquematitzada en la figura 17.

Figura 17. Diagrama de flux de l'estudi dels miRNAs.

3.2.5. Obtenció de variables clíniques

Totes les variables clíniques es van recollir de la història clínica informatitzada de pacients que s'utilitza a l'Hospital Universitari Dr. Josep Trueta de Girona i de la base de dades específica que disposa la UNIEM. Les dades clíniques foren obtingudes per neuròlegs experts en esclerosi múltiple.

3.2.6. Obtenció de variables radiològiques

Per a l'anàlisi radiològica es van analitzar les imatges cerebrals i medul·lars obtingudes mitjançant les seqüències PD, T1, T2, FLAIR i T1 postgadolini en aparells de RM de 1.5 Tesla.

L'avaluació de les imatges de RM dels pacients EM fou realitzada per una neuroradiòloga experta qui fou l'encarregada d'identificar i anotar el nombre de lesions totals i la seva localització en FLAIR, el nombre de lesions totals en T1 realçades amb gadolini, el nombre de Criteris de Barkhof (Barkhof *et al.* 1997) que complia cada pacient (segons estan descrits a l'Annex 2) i la presència i absència tant de lesions a nivell infratentorial com de lesions hipointenses en T1.

Càlcul de volumetria i identificació de lesions cranials

Es va poder realitzar un càlcul de volumetria i d'identificació de lesions cranials semiautomàtic en 24 pacients EM. Aquests estudis constaven de volums 3D formats per 44 imatges. El càlcul del volum de cadascun d'aquests 24 estudis es va realitzar utilitzant mètodes de processament i segmentació d'imatges automàtics.

El procediment que es va seguir consta de diferents fases. En primer lloc, per cadascuna de les imatges de la seqüència PD, es van eliminar totes les parts de l'adquisició no específiques del cervell (p. ex. parts del coll, ulls, greix o ossos). Aquesta tasca es va portar a terme utilitzant el conegut programari *Brain Extraction Tool* (Smith 2002). Degut a que la referència espacial (posicionament) de totes les modalitats d'imatge no era la mateixa, es va realitzar un coregistre entre les modalitats per establir un mateix espai de referència. Per tots els pacients, les modalitats T1 i FLAIR van ésser coregistrades a l'espai inicial de les modalitats PD i T2, utilitzant un mètode de registre no rígid afí (Rueckert *et al.* 1999). Un cop registrades totes les modalitats, es va utilitzar la màscara del cervell obtinguda anteriorment per extreure igualment de la resta de modalitats totes les parts que no eren específicament teixit. A continuació, per cadascun dels casos es va procedir a corregir les desviacions en intensitats degudes a la mateixa adquisició o a petits moviments del pacient. Aquest procediment es va

realitzar processant cada una de les imatges amb un filtre anisotròpic i un mètode de normalització d'intensitats descrit prèviament (Sled *et al.* 1998).

Un cop processades totes les imatges, es va procedir a anotar les lesions de matèria blanca. Aquest procés es va realitzar de forma semiautomàtica. Cada una de les imatges T1 i FLAIR va ser processada mitjançant un mètode de segmentació automàtica de lesions (Cabezas *et al.* 2014). Seguidament, els resultats d'aquesta segmentació automàtica van ser refinats manualment per la neuroradiòloga experta sobre les imatges FLAIR originals.

Diferents estudis han demostrat l'impacte que tenen les lesions de substància blanca en els mètodes de segmentació automàtics utilitzats en el càlcul del volum de teixits (Chard *et al.* 2010; Battaglini *et al.* 2012; Gelineau-Morel *et al.* 2012). Per evitar aquestes desviacions en l'estimació de la volumetria, les imatges T1 foren processades utilitzant un mètode descrit prèviament (Chard *et al.* 2010) que consisteix en omplir els vòxels amb lesions amb intensitats semblants a la resta del teixit de matèria blanca.

Finalment, cadascuna d'aquestes imatges es va segmentar utilitzant tant el mètode de segmentació de teixits FAST (Zhang *et al.* 2001) com el mètode SPM8 (Ashburner i Friston 2005). A partir del resultat de la segmentació, es van calcular els volums de cada teixit, multiplicant el nombre de vòxels segmentats com a substància blanca (SB), substància gris (SG) i LCR per la mida de cada vòxel (0,003 ml). També per a cada pacient es va calcular el coeficient BPF, com a indicador global d'atròfia cerebral, seguint la següent fórmula prèviament descrita:

$$BPF = \frac{SB + SG}{SB + SG + LCR}$$

3.3. ANÀLISI ESTADÍSTICA

Les anàlisis estadístiques emprades en aquesta tesi doctoral es poden dividir en quatre grans apartats:

1. Descripció dels subjectes d'estudi
2. Identificació i validació dels miRNAs
3. Avaluació dels miRNAs com a biomarcadors de diagnòstic o de mal pronòstic
4. Relació entre l'expressió dels miRNAs i variables clíniques, d'anàlisi de LCR i radiològiques en els pacients amb EM

Per a determinar la prova estadística més adequada en cadascuna de les anàlisis, és necessari comprovar prèviament la hipòtesis de normalitat de les dades. En cas que les dades segueixin una distribució normal o es disposi d'una mostra de més de 30 individus en cada grup és pertinent utilitzar els testos paramètrics. Per contra, es pot realitzar una transformació de les dades (família de transformacions de Box-Cox) o emprar mètodes no paramètrics (Martínez-González *et al.* 2006). Per a comprovar la hipòtesis de normalitat i tenint en compte que es disposa d'una mostra de mida reduïda, s'ha utilitzat el test de Shapiro-Wilk (Razali i Wah 2011).

En el nostre estudi, després de comprovar que les variables estudiades no seguien una distribució normal i/o la mida de la mostra era molt reduïda, s'han aplicat els següents mètodes estadístics (descriptius i inferencials) que es descriuen a continuació.

3.3.1. Descripció dels subjectes d'estudi

La informació continguda en les variables d'estudi s'ha resumit mitjançant el càlcul dels estadístics descriptius. En les variables numèriques s'ha utilitzat la mediana (md) com a estadístic de tendència central i el recorregut interquartílic

(RIQ) com a mesura de dispersió. I en les variables categòriques, s'ha calculat la freqüència absoluta i relativa per a cadascuna de les categories.

La homogeneïtat de les característiques basals entre els diferents grups d'estudi ("Control vs. EM" o "BOCM_LE- vs. BOCM_LE+") s'ha comprovat mitjançant el test de U de Mann-Whitney per a les variables numèriques i el test Xi-quadrat o test exacte de Fisher per a les variables categòriques.

3.3.2. Identificació i validació dels miRNAs

En la fase d'identificació es van utilitzar el paquet bioinformàtic HTqPCR del programa estadístic R per a la selecció del miRNA normalitzador (miR-17) i s'ha calculat el canvi d'expressió de les dades normalitzades mitjançant el test de Wilcoxon.

En la fase de validació, s'ha aplicat el test no paramètric U de Mann-Whitney per avaluar si existien diferències estadísticament significatives en els valors centrals de l'expressió normalitzada dels miRNAs entre els diferents grups d'estudi ("Controls vs. EM" o "BOCM_LE- vs. BOCM_LE+").

3.3.3. Capacitat discriminatòria dels miRNAs

L'avaluació dels miRNAs com a potencials biomarcadors de diagnòstic d'esclerosi múltiple o de pronòstic de la malaltia associat a la presència de BOCM_LE positives en LCR, s'ha examinat mitjançant el mètode de la corba ROC.

La precisió global de cadascun dels miRNAs, és a dir, la capacitat del miRNA per distingir entre dos estats de salut s'ha mesurat a través de l'estimació de l'àrea sota la corba ROC (AUC) i el seu corresponent interval de confiança al 95% (IC95%). Com a regla general, es considera que un valor de AUC entre 0,5 i 0,7 indica una baixa precisió, moderada entre 0,7 i 0,9, i alta si és superior a 0,9 (Swets 1988; Fischer *et al.* 2003). A més a més, si l'interval de confiança no

inclou el valor 0,5, llavors es pot considerar que és un “bon biomarcador” (Burgueño *et al.* 1995).

Per aquells miRNAs que presentaven una capacitat discriminatòria acceptable, s’ha determinat el punt de tall òptim, com aquell que maximitza la sensibilitat i l’especificitat.

3.3.4. Relació dels miRNAs amb variables clíniques, d’anàlisi de LCR i radiològiques

En els pacients EM s’ha estudiat la relació entre l’expressió de cadascun dels miRNAs i varies variables clíniques, d’anàlisi de LCR i radiològiques:

Per a estudiar la relació de l’expressió dels miRNAs amb les variables categòriques s’ha utilitzat el test U Mann-Whitney per a variables dicotòmiques i el test de Kruskal-Wallis en el cas de variables amb més de 2 categories.

La relació de l’expressió dels miRNAs amb les variables numèriques s’ha quantificat a través del coeficient de Spearman (rho de Spearman), considerant un valor inferior a |0,3| com una associació dèbil, moderada entre |0,3–0,7| i forta entre |0,7–1,0|.

En totes les anàlisis estadístiques s’ha establert un nivell de significació del 5%. Els programes estadístics utilitzats han estat: IBM SPSS v21 (IBM Corp. Released 2012) i el programa R (R Development Core Team 2013), amb paquet HTqPCR per a la fase d’identificació dels miRNAs i el paquet pROC per a les anàlisis ROC (Robin *et al.* 2011).

4. RESULTATS

4.1. DESCRIPCIÓ DELS SUBJECTES D'ESTUDI

Es varen incloure en l'estudi un total de 61 subjectes diagnosticats al Servei de Neurologia de l'Hospital Universitari Dr. Josep Trueta de Girona i a la Unitat de Neuroimmunologia i Esclerosi Múltiple (UNIEM) del mateix centre entre el 15 de Juliol de 2011 i el 15 de gener de 2013.

4.1.1. Descripció dels pacients del grup "EM"

El grup "EM" estava format per 29 pacients (23 dones i 6 homes) amb una mediana d'edat de 40 anys i un recorregut interquartílic de 16 anys. En el moment de realització de la punció lumbar, 15 pacients presentaven una EMRR per criteris revisats de McDonald 2010 i 14 pacients una SCA amb criteris radiològics de disseminació en espai i BOCG positives.

Tots els pacients van presentar BOCG positives i/o bé un índex IgG superior a 0,7. En concret, un 89,7% dels pacients van presentar BOCG positives (n=26) i dels 27 pacients amb informació disponible sobre l'índex IgG, un 66,7% van mostrar un valor superior a 0,7 (n=27). La mediana i recorregut interquartílic de l'índex IgG fou de 0,75 i 0,42, respectivament. Un 37,9% dels pacients van presentar BOCM lípidespecífiques (n=11) (taula 5).

La majoria dels pacients presentaven 3 o 4 criteris de Barkhof (n=25, 86,2%), més de 9 lesions en T2 (n=22, 75,9%), presència de lesions infratentorials (n=24, 82,8%) i absència de lesions hipointenses en T1 (n=23, 79,3%) (taula 5).

Taula 5. Característiques del grup "EM".

grup "EM" (n=29)	
Sexe	
Dona	23 (79,3%)
Home	6 (20,7%)
Edat	40 (16)
Edat debut	38 (16)
Topografia debut	
Nervi òptic	6 (20,7%)
Tronc	6 (20,7%)
Medul·la	12 (41,4%)
Hemisfèric	3 (10,3%)
Poliregional	2 (6,9%)
Debut Nervi òptic	
Sí	6 (20,7%)
No	21 (72,4%)
Debut Infratentorial	
Sí	18 (62,1%)
No	9 (31%)
Brots	1 (1)
EDSS basal	2 (1,5)
EDSS 12m	1,5 (0,8)
TIM	
Sí	24 (82,8%)
No	5 (17,2%)
TIM_t	9 (3)
Índex IgG	0,753 (0,419)
BOCG	
Positiu	26 (89,7%)
Negatiu	3 (10,3%)
BOCM_LE	
Positiu	11 (37,9%)
Negatiu	18 (62,1%)
C_Barkhof	
1-2	4 (13,8%)
3-4	25 (86,2%)
Lesions T2	
<9	7 (24,1%)
≥9	22 (75,9%)
Lesions Gd+	0 (2)
Lesions infratentorials	
Presència	24 (82,8%)
Absència	5 (17,2%)
Lesions hipointenses T1	
Presència	6 (20,7%)
Absència	23 (79,3%)

Taula 5 (continuació). Característiques del grup “EM”.

grup “EM” (n=29)	
Lesions cranials [#]	32 (20)
Volum T2 [#]	4,993 (7,804)
SG_FAST [#]	503,334 (101,441)
SB_FAST [#]	743,295 (116,504)
BPF_FAST [#]	0,823 (0,042)
SG_SPM [#]	626,262 (92,921)
SB_SPM [#]	555,915 (104,147)
BPF_SPM [#]	0,797 (0,024)

Els valors estan expressats com mediana (RIQ) per a les variables numèriques i com freqüència absoluta (freqüència relativa) per a les variables categòriques.

[#]n=18.

4.1.2. Descripció dels subjectes del grup “Control”

En el grup “Control” es van incloure 32 subjectes diagnosticats de diverses malalties neurològiques diferents d’EMRR i SCA amb criteris radiològics de disseminació en espai i BOCG positives, dels quals 10 eren homes i 22 eren dones. La mediana d’edat d’aquests subjectes fou de 39 anys amb un rang d’edat entre 18 i 65 anys (taula 6). Tan sols 1 subjecte va presentar BOCG positives i la mediana i rang interquartílic de l’índex IgG foren 0,53 i 0,11, respectivament.

Taula 6. Descripció del grup "Control" segons sexe, edat i diagnòstic.

Sexe	Edat (anys)	Diagnòstic
Dona	34	Cefalea*
Dona	38	Cefalea*
Dona	40	Cefalea
Home	22	Cerebelitis post-infecciosa
Home	47	Encefalitis de causa no filiada
Dona	34	Hipertensió endocranial benigne*
Home	35	Hipertensió endocranial benigne
Home	36	Hipertensió endocranial benigne
Dona	40	Hipoacúsia de causa no filiada*
Dona	53	Leucoencefalopatia idiopàtica
Dona	53	Leucoencefalopatia idiopàtica
Home	34	Mielitis idiopàtica
Dona	32	Mielopatia idiopàtica
Dona	42	Mielopatia idiopàtica
Dona	44	Mielopatia idiopàtica
Dona	65	Mielopatia per embòlia fibrocartilaginosa
Home	49	Multineuritis post-infecciosa
Dona	29	Neuropatia òptica idiopàtica
Dona	33	Neuropatia òptica idiopàtica
Dona	45	Neuropatia òptica idiopàtica
Dona	46	Neuropatia òptica isquèmica
Dona	59	Neuropatia òptica isquèmica
Dona	36	Paquimeningitis hipertròfica idiopàtica
Home	32	Pseudotumor orbitari
Home	41	Rombencefalitis de causa no filiada
Home	44	Rombencefalitis de causa no filiada
Dona	33	Síntomes paroxístics
Dona	18	Síndrome conversiva
Dona	27	Síndrome conversiva
Dona	44	Síndrome conversiva*
Home	41	Síndrome Guillain-Barré
Dona	33	Síndrome Vogt-Koyanagi-Harada

* Subjectes que van formar part de l'anàlisi de la cohort inicial d'identificació.

4.2. ESTUDI D'IDENTIFICACIÓ DE miRNAs

L'estudi de miRNAs es va realitzar, segons la metodologia establerta per aquests tipus d'anàlisis, en dues fases: (1a), en una cohort inicial d'identificació de miRNAs candidats formada per pocs subjectes i (2a), en una cohort de validació de possible miRNAs candidats formada per més nombre de subjectes.

4.2.1. Descripció dels subjectes

La cohort inicial d'identificació estava formada per 14 subjectes (5 en el grup "Control" i 9 en el grup "EM") dels quals tots eren dones. Les variables que mostraren diferències estadísticament significatives foren l'índex IgG ($p=0,004$) i el percentatge de BOCG positives ($p<0,001$). En el grup "Control", cap dels subjectes van presentar BOCG ni BOCM_LE positives. Per contra, en el grup "EM", 5 pacients tenien BOCM_LE positives i 4 BOCM_LE negatives (taula 7).

Taula 7. Característiques basals del grup "Control" i grup "EM" de la cohort d'identificació.

<i>Cohort Identificació</i>	Control (n=5)	EM (n=9)	valor p*
Sexe Dona	5 (100%)	9 (100%)	-
Edat	38,000 (8)	39,000 (17)	1,000
Índex IgG	0,543 (0,09)	0,753 (0,42)	0,004
BOCG			<0,001
Positiu	0 (0%)	9 (100%)	
Negatiu	5 (100%)	0 (0%)	
BOCM_LE			0,086
Positiu	0 (0%)	5 (55,6%)	
Negatiu	5 (100%)	4 (44,4%)	

Els valors estan expressats com mediana (RIQ) per a les variables numèriques i com freqüència absoluta (freqüència relativa) per les variables categòriques.

**Test U-Mann Whitney per les variables numèriques. Test Fisher o Xi-quadrat per a les variables categòriques.*

L'anàlisi detallat de les característiques demogràfiques, clíniques, d'anàlisi de LCR i radiològiques dels pacients del grup "EM" en funció de la positivitat o negativitat de BOCM_LE va mostrar que no hi havia diferències estadísticament significatives en cap de les variables estudiades (taula 8).

Taula 8. Característiques dels pacients del grup "EM" amb BOCM_LE negatives i BOCM_LE positives de la cohort d'identificació.

<i>Grup EM Cohort Identificació</i>	BOCM_LE- (n=4)	BOCM_LE+ (n=5)	valor p*
Sexe Dona	4 (100%)	5 (100%)	-
Edat	39,500 (12)	35,000 (25)	0,730
Edat debut	38,500 (12)	34,000 (25)	0,730
Topografia debut			1,000
Nervi òptic	1 (25%)	1 (20%)	
Tronc	1 (25%)	0 (0%)	
Medul·la	2 (50%)	3 (60%)	
Hemisfèric	0 (0%)	0 (0%)	
Poliregional	0 (0%)	1 (20%)	
Debut Nervi òptic			1,000
Sí	1 (25%)	1 (25%)	
No	3 (75%)	3 (75%)	
Debut Infratentorial			1,000
Sí	3 (75%)	3 (75%)	
No	1 (25%)	1 (25%)	
Brots	1 (2)	1 (1)	0,905
EDSS basal	1,5 (1,1)	2,5 (1,8)	0,730
EDSS 12m	2 (0,4)	1,5 (1,5)	0,556
TIM			1,000
Sí	3 (75%)	4 (80%)	
No	1 (25%)	1 (20%)	
TIM_t	10,0 (1,0)	8,5 (3)	0,229
Índex IgG	0,710 (0,46)	0,983 (1,39)	0,413
BOCG			-
Positiu	4 (100%)	5 (100%)	
Negatiu	0 (0%)	0 (0%)	
C_Barkhof			1,000
1-2	1 (25%)	1 (20%)	
3-4	3 (75%)	4 (80%)	
Lesions T2			1,000
<9	1 (25%)	1 (20%)	
≥9	3 (75%)	4 (80%)	
Lesions Gd+	1,0 (1,0)	1,0 (4)	0,786

Taula 8 (continuació). Característiques dels pacients del grup “EM” amb BOCM_LE negatives i BOCM_LE positives de la cohort d’identificació.

Grup EM Cohort Identificació	BOCM_LE- (n=4)	BOCM_LE+ (n=5)	valor p*
Lesions infratentorials			-
Presència	4 (100%)	5 (100%)	
Absència	0 (0%)	0 (0%)	
Lesions hipointenses T1			0,444
Presència	1 (25%)	0 (0%)	
Absència	3 (75%)	5 (100%)	

Els valors estan expressats com mediana (RIQ) per a les variables numèriques i com freqüència absoluta (freqüència relativa) per a les variables categòriques.

**Test U-Mann Whitney per a les variables numèriques. Test Fisher o Xi-quadrat per a les variables categòriques.*

4.2.2. Estudi d’identificació de miRNAs candidats

Per a la identificació de l’expressió de miRNAs en la cohort inicial d’identificació es va realitzar l’anàlisi de les TLDA en els 5 subjectes del grup “Control” i en els 9 pacients del grup “EM”.

Es van analitzar un total de 754 miRNAs, dels quals 61 foren detectats amb valors d’expressió fiables (entre el 15è i 37è cicle) amb un mínim del 70% dels subjectes inclosos en les TLDA (taula 9).

Taula 9. miRNAs circulants identificats en la cohort d'identificació amb valors d'expressió fiables.

miRNAs identificats	Nombre de Cicle
miR-302c, miR-628-5p	15-20
miR-17, miR-19b, miR-21, miR-106a, miR-150, miR-204, miR-378	20-30
miR-9#, miR-20a, miR-20b, miR-24, miR-29a, miR-30a-3p, miR-30a-5p, miR-30b, miR-30c, miR-30e-3p, miR-92a, miR-100, miR-106b, miR-125b, miR-133a, miR-143, miR-146a, miR-191, miR-197, miR-203, miR-206, miR-222, miR-223, miR-320, miR-342-3p, miR-483-5p, miR-520c-3p, miR-520d-3p, miR-573, miR-574-3p, miR-581, miR-625#, miR-872, miR-885-5p, let-7b, let-7c, U6 snRNA	30-33
miR-16, miR-19a, miR-19b-1#, miR-29c, miR-126, miR-145, miR-184, miR-186, miR-190b, miR-193-5p, miR-202, miR-328, miR-484, miR-601, miR-875-5p	33-37

En primer lloc, es va realitzar un anàlisi per identificar un conjunt inicial de miRNAs que permetessin diferenciar entre els pacients del grup "EM" i del grup "Control".

Dels 61 miRNAs detectats en LCR, 5 d'ells van presentar una expressió diferenciada estadísticament significativa ($p < 0,05$) entre els dos grups: els miR-203, miR-21 i miR-520c-3p tenien una sobreexpressió en el grup "EM", i els miR-140 i miR-126 tenien una expressió disminuïda en el mateix grup respecte al grup "Control". Per altra banda, si es fixa un valor p entre 0,05 i 0,2, es pot incloure dins d'aquest conjunt de miRNAs candidats els cinc següents: miR-191 i miR-30a-5p que estaven sobreexpressats en el grup "EM", i els miR-199a-3p, miR-378 i miR-143 que tenien una expressió disminuïda en el mateix grup respecte al grup "Control" (taula 10).

Taula 10. miRNAs amb expressió diferenciada en la cohort d'identificació entre el grup "EM" i el grup "Control".

EM vs. Control	
miR-203	5,2 (0,004)
miR-21	2,8 (0,026)
miR-140	- 2,8 (0,033)
miR-126	- 2,9 (0,040)
miR-520c-3p	5,7 (0,046)
miR-191	2,3 (0,094)
miR-199a-3p	- 2,2 (0,102)
miR-378	- 931,8 (0,120)
miR-30a-5p	6,6 (0,158)
miR-143	- 1,8 (0,188)

Els valors estan representats com canvi d'expressió (valor p).

En segon lloc, es va realitzar un anàlisi per identificar en el grup "EM", alguns miRNAs candidats que poguessin diferenciar entre els pacients que tenien BOCM_LE en LCR positives dels que les tenien negatives.

Dels 61 miRNAs detectats en LCR, 5 d'ells van presentar una expressió diferenciada entre aquests dos grups: els miR-365, miR-328 i miR-191 tenien una sobreexpressió en pacients EM i BOCM_LE positives ($p=0,028$, $p=0,143$ i $p=0,167$, respectivament), i els miR-19a i miR-143 tenien una expressió disminuïda en pacients EM i BOCM_LE positives (ambdós amb $p=0,114$), respecte als pacients amb BOCM_LE negatives (taula 11).

Taula 11. miRNAs amb expressió diferenciada en la cohort d'identificació entre pacients del grup "EM" amb BOCM_LE positives i BOCM_LE negatives.

BOCM_LE+ vs. BOCM_LE-	
miR-365	4,0 (0,028)
miR-19a	- 2,9 (0,114)
miR-143	- 2,0 (0,114)
miR-328	2,9 (0,143)
miR-191	2,2 (0,167)

Els valors estan representats com a canvi d'expressió (valor *p*).

4.3. ESTUDI DE VALIDACIÓ DE miRNAs

4.3.1. Descripció dels subjectes

La cohort de validació va constar de 32 subjectes en el grup “Control” i 29 pacients en el grup “EM”. A la taula 12 es presenten les característiques basals demogràfiques i d’anàlisi de LCR dels dos grups. Les variables que van presentar diferències estadísticament significatives entre els dos grups foren l’índex IgG ($p<0,001$), el percentatge de BOCG positives ($p<0,001$) i el percentatge de BOCM_LE ($p<0,001$). En el grup “Control”, 1 subjecte va presentar BOCG positives i cap subjecte va presentar BOCM_LE. Dels 29 pacients del grup “EM”, 11 tenien BOCM_LE positives i 18 tenien BOCM_LE negatives.

Taula 12. Característiques basals del grup “Control” i grup “EM” de la cohort de validació.

<i>Cohort Validació</i>	Control (n=32)	EM (n=29)	valor p*
Sexe			0,349
Dona	22 (68,8%)	23 (79,3%)	
Home	10 (31,2%)	6 (20,7%)	
Edat	39,000 (12)	40,000 (16)	0,800
Índex IgG	0,530 (0,11)	0,753 (0,49)	<0,001
BOCG			<0,001
Positiu	1 (3,1%)	26 (89,7%)	
Negatiu	31 (96,9%)	3 (10,3%)	
BOCM_LE			<0,001
Positiu	0 (0%)	11 (37,9%)	
Negatiu	32 (100%)	18 (62,1%)	

Els valors estan expressats com mediana (RIQ) per a les variables numèriques i com freqüència absoluta (freqüència relativa) per a les variables categòriques.

**Test U-Mann Whitney per a les variables numèriques. Test Fisher o Xi-quadrat per a les variables categòriques.*

L'anàlisi detallat de les característiques demogràfiques, clíniques, d'anàlisi de LCR i radiològiques dels pacients del grup "EM" en funció de la positivitat o negativitat de BOCM_LE va mostrar que no hi havia diferències estadísticament significatives en cap de les variables estudiades (taula 13).

Taula 13. Característiques basals dels pacients del grup "EM" amb BOCM_LE negatives i BOCM_LE positives de la cohort de validació.

Grup EM Cohort Validació	BOCM_LE- (n=18)	BOCM_LE+ (n=11)	valor p*
Sexe			1,000
Dona	14 (77,8%)	9 (81,8%)	
Home	4 (22,2%)	2 (18,2%)	
Edat	41,000 (21)	37,000 (11)	0,363
Edat debut	38,500 (22)	36,000 (11)	0,740
Topografia debut			0,427
Nervi òptic	3 (16,7%)	3 (27,3%)	
Tronc	5 (27,8%)	1 (9,1%)	
Medul·la	6 (33,3%)	6 (54,5%)	
Hemisfèric	3 (16,7%)	0 (0%)	
Poliregional	1 (5,6%)	1 (9,1%)	
Debut Nervi òptic			0,638
Sí	3 (17,6%)	3 (30%)	
No	14 (82,4%)	7 (70%)	
Debut Infratentorial			1,000
Sí	11 (64,7%)	7 (70%)	
No	6 (35,3%)	3 (30%)	
Brots	1,0 (1,0)	1,0 (1,0)	0,642
EDSS basal	2,5 (1,5)	2,0 (1,5)	0,112
EDSS 12m	2,0 (0,5)	1,5 (1,0)	0,112
TIM			1,000
Sí	15 (83,3%)	9 (81,8%)	
No	3 (16,7%)	2 (18,2%)	
TIM_t	9,0 (3,0)	9,0 (2,0)	0,446
Índex IgG	0,767 (0,48)	0,749 (0,33)	0,610
BOCG			0,268
Positiu	15 (83,8%)	11 (100%)	
Negatiu	3 (16,2%)	0 (0%)	
C_Barkhof			1,000
1-2	3 (16,7%)	1 (9,1%)	
3-4	15 (83,3%)	10 (90,9%)	
Lesions T2			0,677
<9	5 (27,8%)	2 (18,2%)	
≥9	13 (72,2%)	9 (81,8%)	
Lesions Gd+	0,0 (2)	0,5 (3)	0,941

Taula 13 (continuació). Característiques basals dels pacients del grup “EM” amb BOCM_LE negatives i BOCM_LE positives de la cohort de validació.

<i>Grup EM Cohort Validació</i>	BOCM_LE- (n=18)	BOCM_LE+ (n=11)	valor p*
Lesions infratentorials			1,000
Presència	15 (83,3%)	9 (81,8%)	
Absència	3 (16,7%)	2 (18,2%)	
Lesions hipointenses T1			0,362
Presència	5 (27,8%)	1 (9,1%)	
Absència	13 (72,2%)	10 (90,9%)	
Lesions cranials#	33 (37)	31 (14)	1,000
Volum T2#	8,913 (12,25)	4,143 (3,19)	0,258
SG_FAST#	502,293 (170,70)	514,641 (84,76)	0,796
SB_FAST#	703,713 (153,51)	744,711 (123,73)	0,605
BPF_FAST#	0,827 (0,05)	0,818 (0,043)	0,546
SG_SPM#	609,864 (145,96)	640,683 (68,11)	0,796
SB_SPM#	533,229 (124,12)	559,779 (100,31)	0,931
BPF_SPM#	0,799 (0,03)	0,795 (0,02)	0,863

Els valors estan expressats com mediana (RIQ) per a les variables numèriques i com freqüència absoluta (freqüència relativa) per a les variables categòriques.

**Test U-Mann Whitney o Kruskal-Wallis per a les variables numèriques. Test Fisher o Xi-quadrat per a les variables categòriques.*

#n=18.

4.3.2. Estudi de validació de miRNAs candidats

Es va realitzar un anàlisi de validació en aquesta cohort dels miRNAs amb expressió diferenciada que foren identificats en la cohort inicial d'identificació tant entre els grups “EM” i “Control” com entre els pacients amb EM i BOCM_LE positives i negatives.

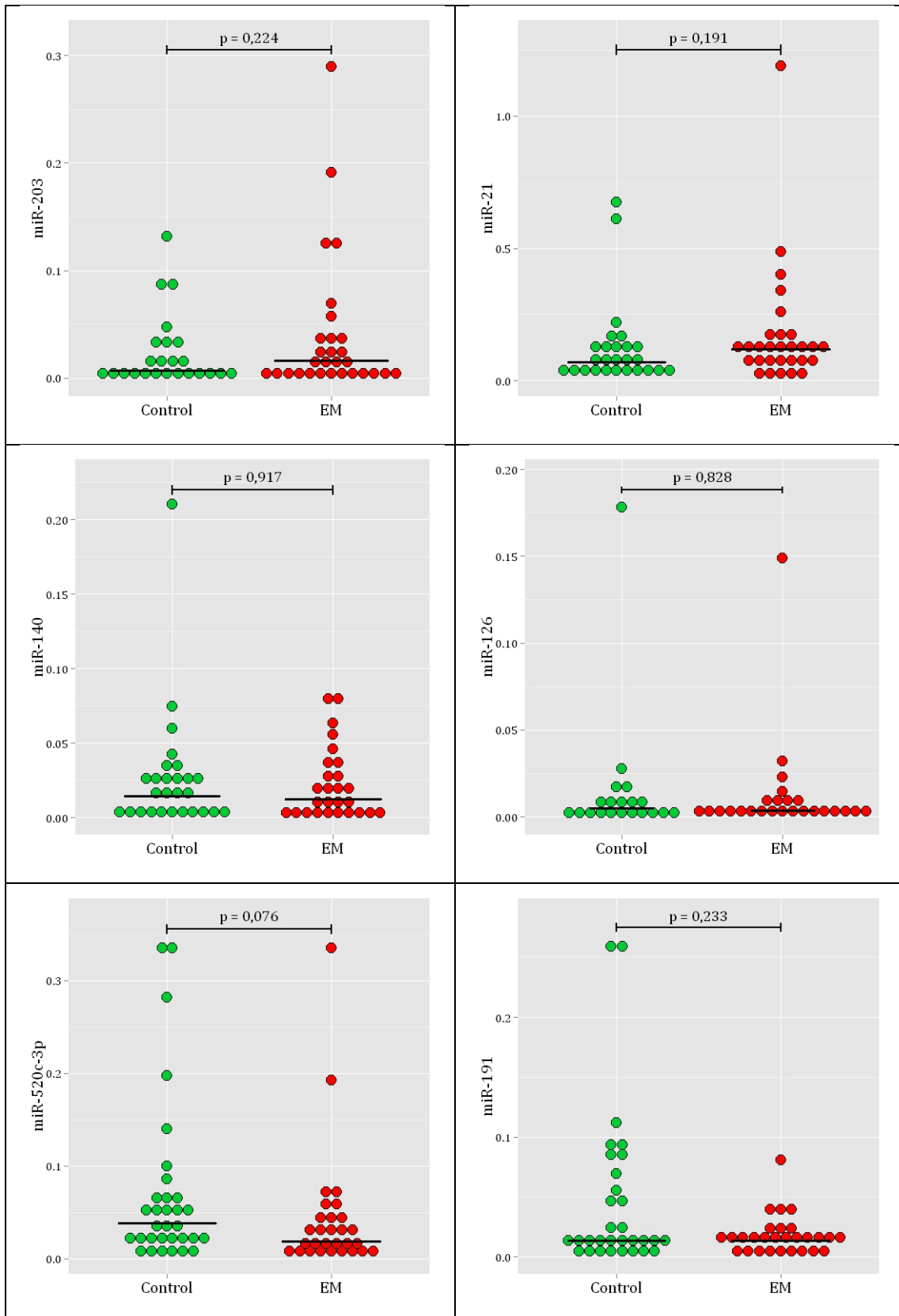
Per aquest anàlisi de validació es varen seleccionar un total de 17 miRNAs, seguint els 2 següents criteris: (1) els miRNAs que en la cohort d'identificació havien presentat una expressió diferenciada estadísticament significativa ($p \leq 0,20$) i (2) una conjunt de miRNAs ja descrits prèviament a la literatura relacionats amb EM i amb processos inflamatoris. Dins del primer grup, es troben els miR-203, miR-21, miR-140, miR-126, miR-520c-3p i miR-365 amb un valor $p < 0,05$ i els miR-191, miR-199a-3p, miR-378, miR-30a-5p, miR-143, miR-

19a i miR-328 amb un nivell de significació entre 0,05 i 0,2. Dins del segon grup, es van incloure els 4 següents miRNAs: miR-155, miR-146a, miR-142-3p i miR-106a.

A la figura 18 i a la taula 14 es mostren els resultats de l'anàlisi d'aquests 17 miRNAs entre el grup "Control" i el grup "EM". En aquesta anàlisi només es van observar diferències estadísticament significatives en l'expressió del miR-106a ($p=0,032$), mostrant una disminució de l'expressió en el grup "EM".

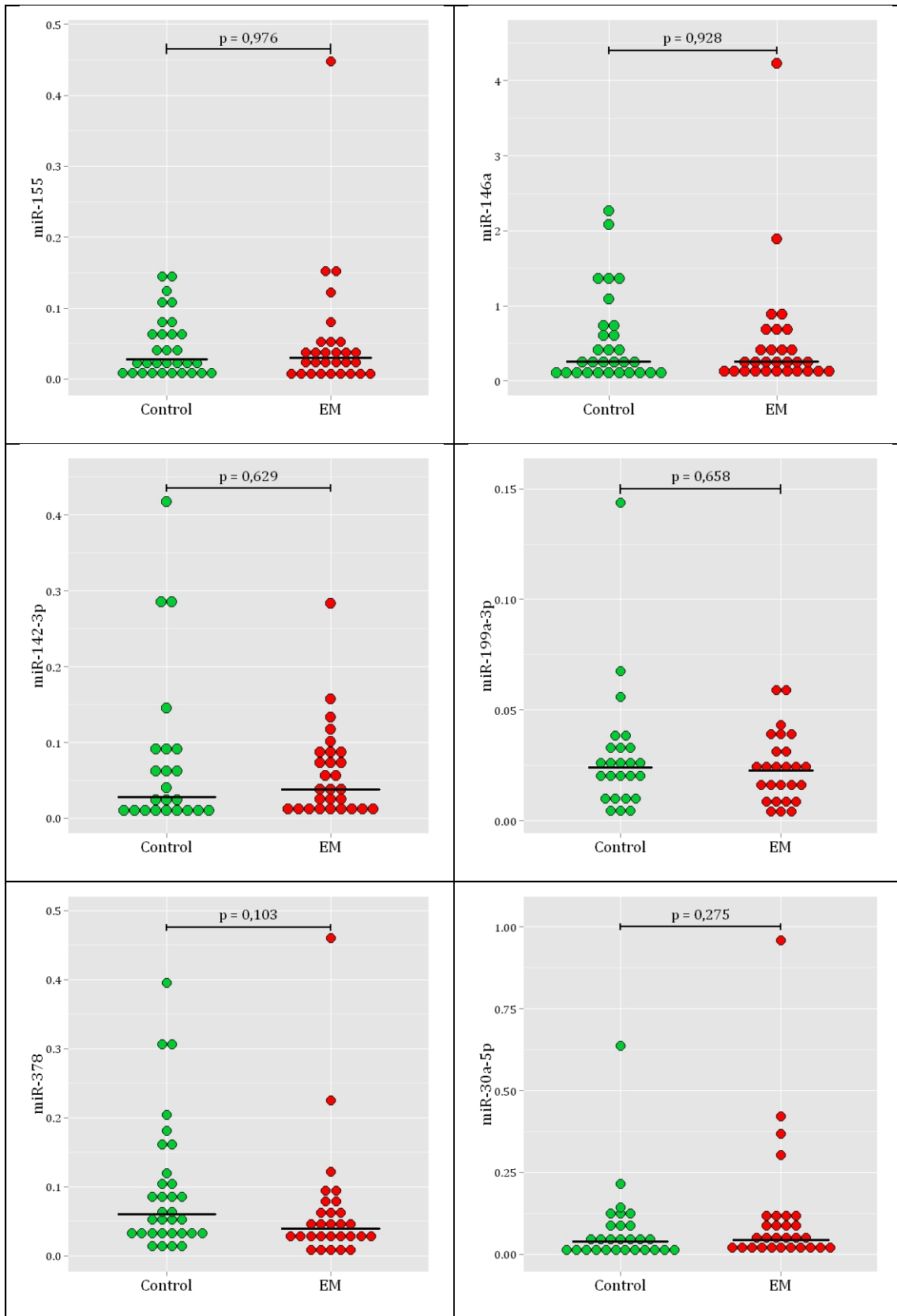
A la figura 19 i a la taula 15 es mostren els resultats de l'anàlisi d'aquests 17 miRNAs entre els pacients del grup "EM" amb BOCM_LE negatives i amb BOCM_LE positives. En aquesta segona anàlisi es van observar diferències estadísticament significatives en l'expressió del miR-203, miR-520c-3p, miR-155, miR-142-3p i miR-106a, mostrant tots ells una sobreexpressió en els pacients amb EM i BOCM_LE positives.

Figura 18. Resultats de validació dels miRNAs seleccionats entre el grup “Control” i el grup “EM”.



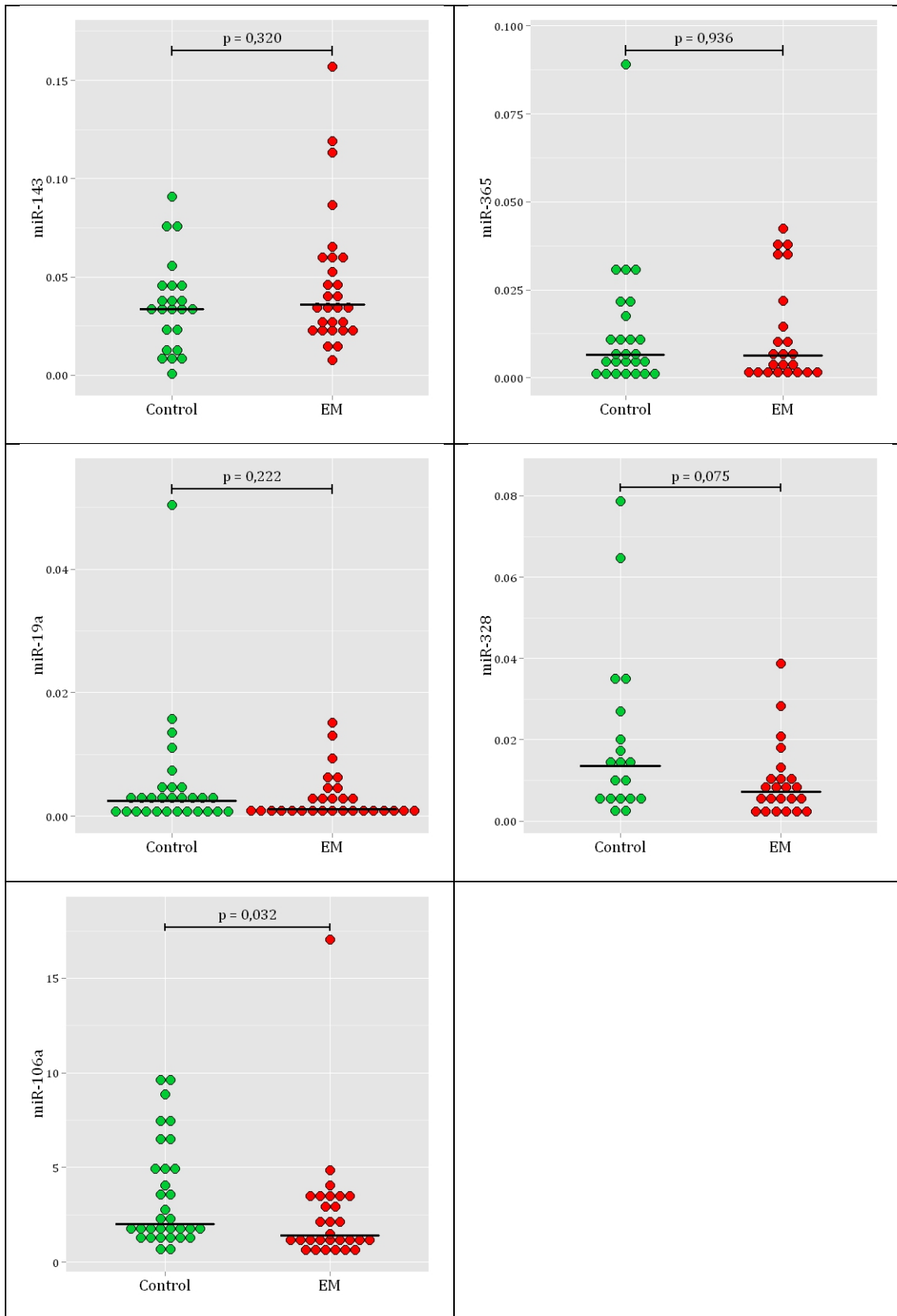
Nivells individuals d'expressió dels miRNAs en la cohort de validació. El valor p està calculat utilitzant el Test U-Mann Whitney.

Figura 18 (continuació). Resultats de validació dels miRNAs seleccionats entre el grup "Control" i el grup "EM".



Nivells individuals d'expressió dels miRNAs en la cohort de validació. El valor p està calculat utilitzant el Test U-Mann Whitney.

Figura 18 (continuació). Resultats de validació dels miRNAs seleccionats entre el grup "Control" i el grup "EM".



Nivells individuals d'expressió dels miRNAs en la cohort de validació. El valor p està calculat utilitzant el Test U-Mann Whitney.

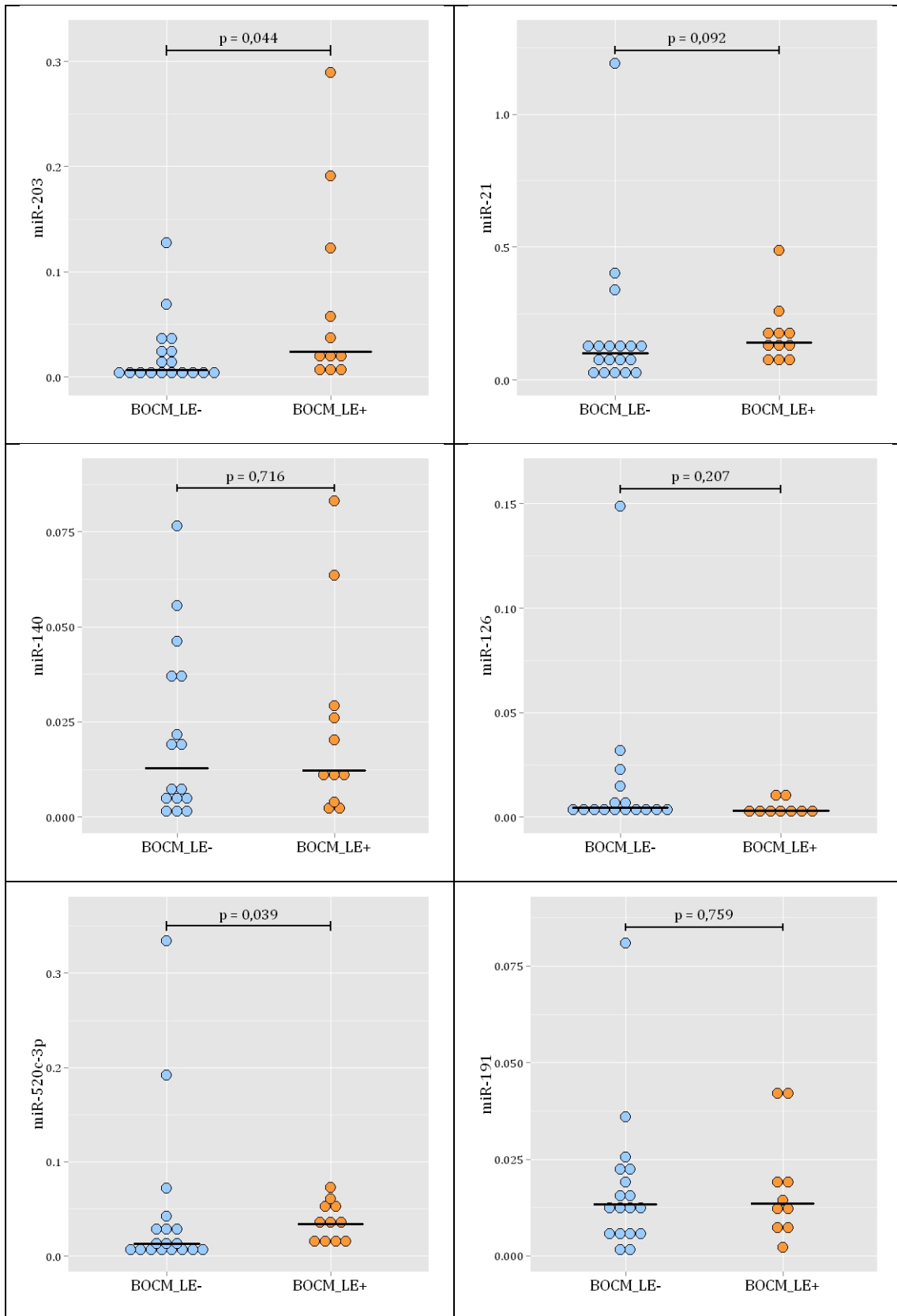
Taula 14. Resultats de validació dels miRNAs seleccionats entre el grup “Control” i grup “EM”.

	Control (n=32)	EM (n=29)	valor p*
miR-203	0,007 (0,030)	0,016 (0,031)	0,224
miR-21	0,070 (0,089)	0,118 (0,105)	0,191
miR-140	0,017 (0,026)	0,012 (0,032)	0,917
miR-126	0,005 (0,009)	0,004 (0,005)	0,828
miR-520c-3p	0,038 (0,048)	0,018 (0,034)	0,076
miR-191	0,014 (0,061)	0,013 (0,015)	0,233
miR-155	0,028 (0,056)	0,030 (0,039)	0,976
miR-146a	0,257 (0,614)	0,255 (0,393)	0,928
miR-142-3p	0,028 (0,085)	0,038 (0,072)	0,629
miR-199a-3p	0,024 (0,023)	0,023 (0,024)	0,658
miR-378	0,061 (0,088)	0,040 (0,047)	0,103
miR-30a-5p	0,040 (0,086)	0,043 (0,095)	0,257
miR-143	0,034 (0,033)	0,036 (0,035)	0,320
miR-365	0,007 (0,016)	0,006 (0,020)	0,936
miR-19a	0,003 (0,004)	0,001 (0,003)	0,222
miR-328	0,014 (0,022)	0,007 (0,008)	0,075
miR-106a	2,027 (3,386)	1,424 (2,461)	0,032

Els valors estan expressats com a mediana (RIQ).

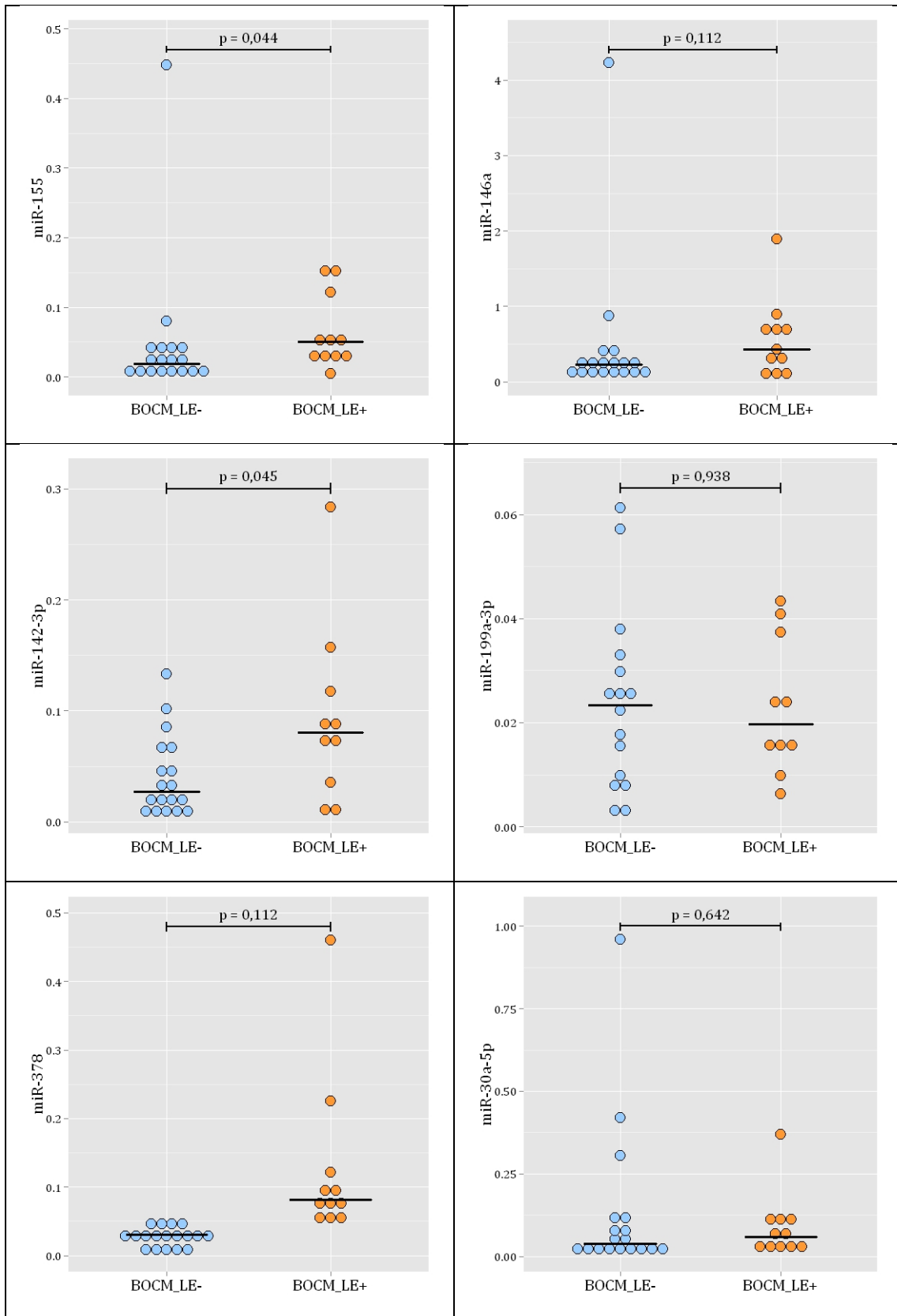
**Test U-Mann Whitney.*

Figura 19. Resultats de validació dels miRNAs seleccionats entre els pacients del grup “EM” amb BOCM_LE negatives i BOCM_LE positives.



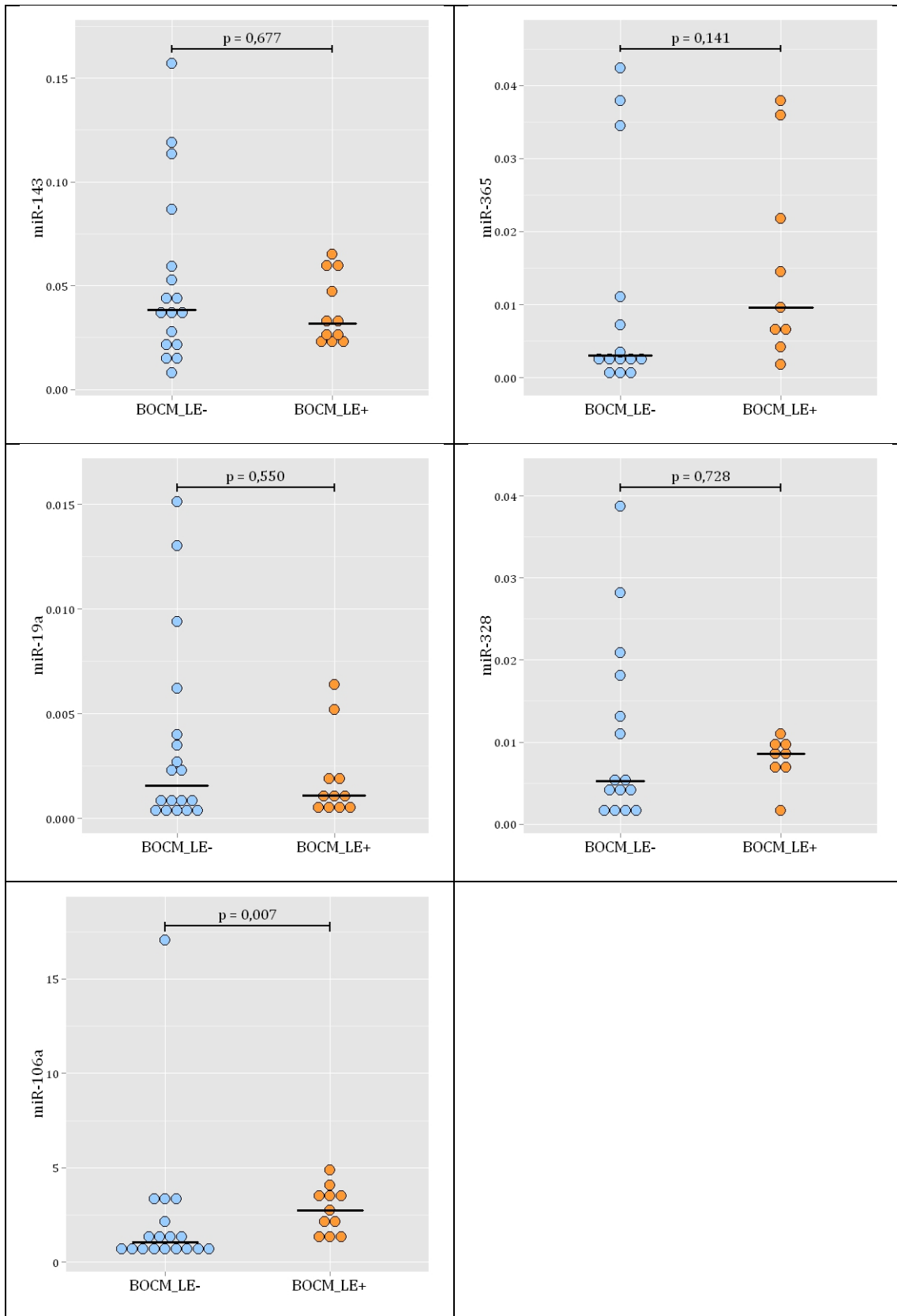
Nivells individuals d'expressió dels miRNA en la cohort de validació. El valor p està calculat utilitzant el Test U-Mann Whitney.

Figura 19 (continuació). Resultats de validació dels miRNAs seleccionats entre els pacients del grup “EM” amb BOCM_LE negatives i BOCM_LE positives.



Nivells individuals d'expressió dels miRNA en la cohort de validació. El valor p està calculat utilitzant el Test U-Mann Whitney.

Figura 19 (continuació). Resultats de validació dels miRNAs seleccionats entre els pacients del grup “EM” amb BOCM_LE negatives i BOCM_LE positives.



Nivells individuals d'expressió dels miRNA en la cohort de validació. El valor p està calculat utilitzant el Test U-Mann Whitney.

Taula 15. Resultats de validació dels miRNAs seleccionats entre els pacients del grup “EM” amb BOCM_LE negatives i BOCM_LE positives.

	BOCM_LE- (n=18)	BOCM_LE+ (n=11)	valor p*
miR-203	0,007 (0,024)	0,024 (0,114)	0,044
miR-21	0,101 (0,110)	0,142 (0,091)	0,092
miR-140	0,013 (0,034)	0,012 (0,025)	0,716
miR-126	0,005 (0,010)	0,003 (0,005)	0,207
miR-520c-3p	0,013 (0,029)	0,034 (0,038)	0,039
miR-191	0,013 (0,016)	0,014 (0,018)	0,759
miR-155	0,019 (0,029)	0,050 (0,094)	0,044
miR-146a	0,229 (0,181)	0,432 (0,587)	0,112
miR-142-3p	0,027 (0,051)	0,081 (0,097)	0,045
miR-199a-3p	0,023 (0,023)	0,020 (0,025)	0,938
miR-378	0,034 (0,045)	0,053 (0,062)	0,112
miR-30a-5p	0,037 (0,093)	0,058 (0,095)	0,642
miR-143	0,038 (0,051)	0,032 (0,034)	0,677
miR-365	0,003 (0,015)	0,010 (0,024)	0,141
miR-19a	0,002 (0,004)	0,001 (0,001)	0,550
miR-328	0,005 (0,016)	0,009 (0,003)	0,728
miR-106a	1,065 (1,670)	2,751 (2,181)	0,007

Els valors estan expressats com mediana (RIQ).

** Test U-Mann Whitney.*

4.4. CAPACITAT DE DISCRIMINACIÓ DELS miRNAs

Es va realitzar un anàlisi ROC dels miRNAs candidats per evaluar els seu valor diferencial i el seu possible paper com a biomarcadors.

A la taula 16 es presenta l'anàlisi ROC dels miRNAs seleccionats prèviament mostrant l'àrea sota la corba ROC (AUC) i el seu corresponent interval de confiança al 95% (IC95%).

Taula 16. AUC i IC95% de l'anàlisi ROC entre els grups "Control" i "EM", i pacients EM amb BOCM_LE negatives i BOCM_LE positives.

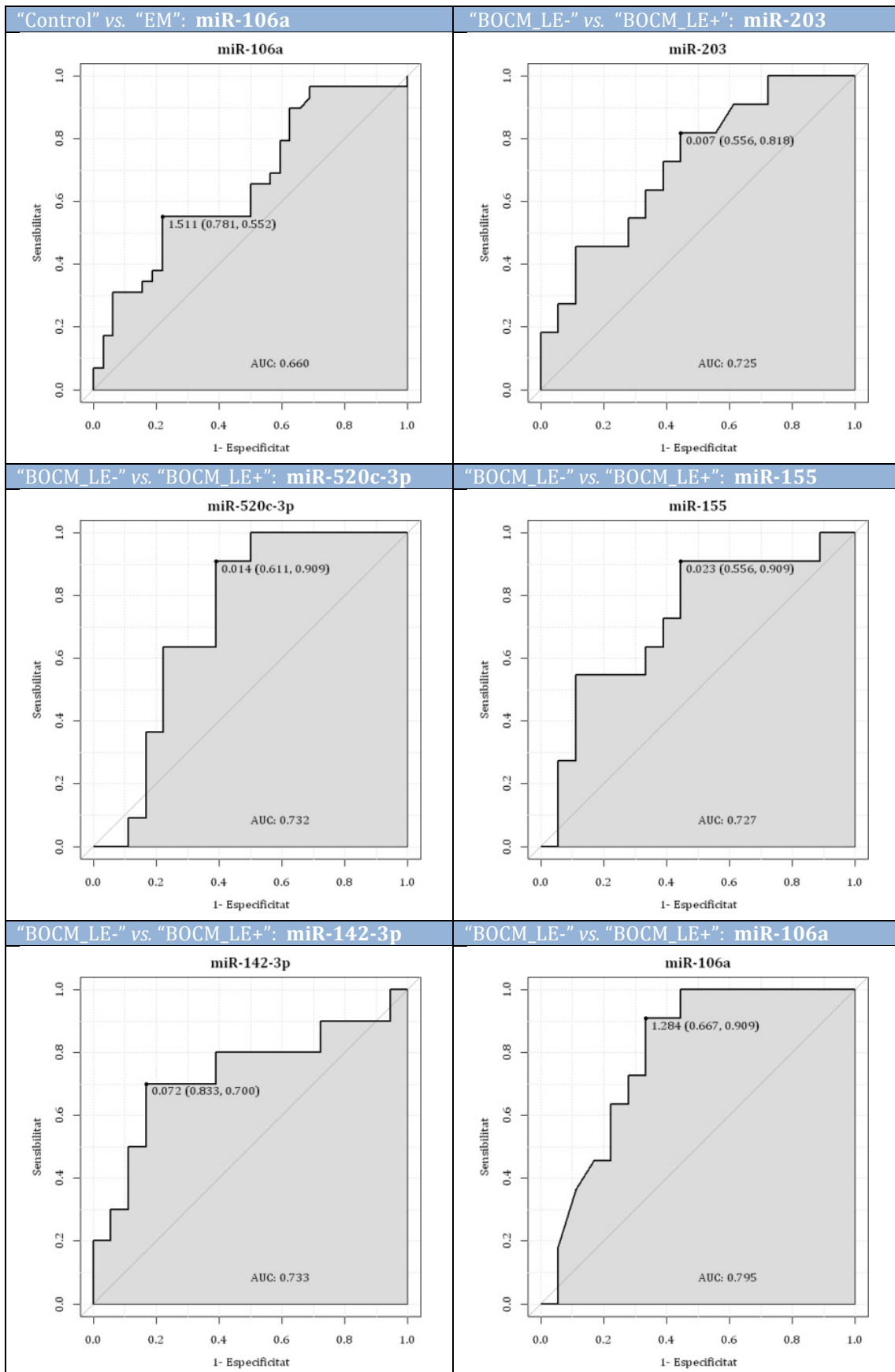
miRNA	Control vs. EM		BOCM_LE- vs. BOCM_LE+	
	AUC	IC95%	AUC	IC95%
miR-203	0,5977	(0,4402 - 0,7552)	0,7247	(0,5342 - 0,9153)
miR-21	0,6028	(0,4474 - 0,7582)	0,6919	(0,4958 - 0,8881)
miR-140	0,4918	(0,3337 - 0,6498)	0,4574	(0,2268 - 0,6880)
miR-126	0,5190	(0,3386 - 0,6994)	0,6597	(0,4289 - 0,8905)
miR-520c-3p	0,6325	(0,4909 - 0,7742)	0,7323	(0,5449 - 0,9197)
miR-191	0,5904	(0,4419 - 0,7390)	0,5361	(0,3055 - 0,7668)
miR-155	0,4978	(0,3477 - 0,6478)	0,7273	(0,5278 - 0,9267)
miR-146a	0,5069	(0,3555 - 0,6583)	0,6818	(0,4642 - 0,8994)
miR-142-3p	0,5396	(0,3719 - 0,7073)	0,7333	(0,5113 - 0,9553)
miR-199a-3p	0,5362	(0,3741 - 0,6982)	0,4906	(0,2560 - 0,7253)
miR-378	0,6218	(0,4791 - 0,7644)	0,6818	(0,4771 - 0,8865)
miR-30a-5p	0,5874	(0,4362 - 0,7387)	0,553	(0,3305 - 0,7755)
miR-143	0,5815	(0,4206 - 0,7424)	0,5481	(0,3250 - 0,7713)
miR-365	0,5067	(0,3382 - 0,6752)	0,6905	(0,4628 - 0,9181)
miR-19a	0,5933	(0,4446 - 0,7421)	0,5707	(0,3543 - 0,7871)
miR-328	0,6613	(0,4925 - 0,8302)	0,5458	(0,2883 - 0,8034)
miR-106a	0,6600	(0,5212 - 0,7989)	0,7955	(0,6319 - 0,9591)

Dels 17 miRNAs candidats, tan sols un d'ells (miR-106a) va mostrar un poder de discriminació acceptable entre el grup "Control" i el grup "EM" (n=61; AUC=0,6600; IC95%: 0,5212-0,7989). D'altra banda, 5 dels miRNAs analitzats mostren una capacitat de discriminació moderada entre els pacients EM amb BOCM_LE negatives i BOCM_LE positives: miR-203 (n=29; AUC=0,7247; IC95%:

0,5342-0,9153), miR-520c-3p (n=29; AUC=0,7323; IC95%: 0,5449-0,9197), miR-155 (n=29; AUC=0,7273; IC95%: 0,5278-0,9267), miR-142-3p (n=28; AUC=0,7333; IC95%: 0,5113-0,9553) i miR-106a (n=29; AUC=0,7955; IC95%: 0,6319-0,9591).

A la figura 20 es mostren les corbes ROC pel conjunt de miRNAs que van presentar una bona capacitat de discriminació entre els diferents grups estudiats, així com el punt de tall que maximitza la seva sensibilitat i la seva especificitat.

Figura 20. Corbes ROC dels miRNAs amb bona capacitat de discriminació.



4.5. RELACIÓ ENTRE L'EXPRESSIÓ DELS miRNAs I VARIABLES CLÍNiques, D'ANÀLISI DE LCR I RADIOLÒGIQUES

A continuació es presenten els resultats corresponents a l'estudi d'associació entre l'expressió dels 17 miRNAs estudiats i les diferents variables clíniques, d'anàlisi de LCR i radiològiques analitzades en el grup "EM".

En l'anàlisi de correlació no es van trobar associacions estadísticament significatives entre cap de les variables analitzades i l'expressió del miR-203, miR-140, miR-126, miR-520c-3p, miR-146a, miR-378, miR-30a-5p, miR-143, miR-365 i miR-19a (taula 17).

Els miRNAs que van presentar algunes correlacions positives estadísticament significatives foren el miR-21 (amb el nombre de lesions realçades amb gadolini, $\rho=0,418$), miR-155 (amb el BPF mitjançant el mètode FAST, $\rho=0,541$), miR-142-3p (amb el BPF mitjançant el mètode FAST, $\rho=0,602$), miR-199a-3p (amb el nombre de lesions realçades amb gadolini, $\rho=0,429$; i la mesura de quantificació de substància gris mitjançant el mètode FAST, $\rho=0,536$), miR-328 (amb el nombre de lesions realçades amb gadolini, $\rho=0,439$; i la mesura de quantificació de substància gris mitjançant els mètodes FAST i SPM8, $\rho=0,744$ i $\rho=0,640$, respectivament) i miR-106a (amb el nombre de lesions realçades amb gadolini, $\rho=0,429$). El miR-191 va presentar una correlació negativa estadísticament significatives amb el nombre de lesions cranials en T2 ($\rho=-0,497$).

Alguns d'aquests mateixos miRNAs (miR-155, miR-199a-3p, miR-328 i miR-106a) juntament amb d'altres (miR-520c-3p, miR-146a, miR-378 i miR-143) van presentar algunes correlacions al límit de la significació ($0,05 \leq p < 0,10$) amb diferents variables analitzades, sobretot radiològiques.

Taula 17. Anàlisi de correlació entre els miRNAs i les variables clíniques, d'anàlisi de LCR i radiològiques.

	miR-203		miR-21		miR-140	
	Rho Spearman	valor <i>p</i>	Rho Spearman	valor <i>p</i>	Rho Spearman	valor <i>p</i>
Brots	-0,130	0,501	-0,251	0,189	-0,192	0,338
TIM_t	-0,145	0,500	0,128	0,551	-0,190	0,396
EDSS basal	-0,015	0,939	-0,095	0,626	0,045	0,823
EDSS 12m	-0,103	0,596	-0,084	0,663	0,104	0,604
Índex IgG	-0,229	0,250	-0,289	0,143	-0,253	0,222
Lesions cranials	-0,148	0,558	0,318	0,198	-0,090	0,723
Volum T2	-0,104	0,680	0,081	0,751	-0,003	0,990
Lesions Gd+	0,147	0,464	0,418	0,030	0,216	0,300
SG_FAST	0,227	0,365	0,178	0,481	0,075	0,766
SB_FAST	0,240	0,338	0,320	0,195	0,383	0,117
BPF_FAST	0,153	0,546	0,307	0,216	0,416	0,086
SG_SPM8	0,311	0,209	0,249	0,319	0,156	0,537
SB_SPM8	0,177	0,483	0,124	0,624	0,154	0,542
BPF_SMP8	-0,032	0,900	0,159	0,529	0,218	0,385

Taula 17 (continuació). Anàlisi de correlació entre els miRNAs i les variables clíniques, d'anàlisi de LCR i radiològiques.

	miR-126		miR-520c-3p		miR-191	
	Rho Spearman	valor <i>p</i>	Rho Spearman	valor <i>p</i>	Rho Spearman	valor <i>p</i>
Brots	-0,163	0,438	-0,190	0,323	-0,118	0,548
TIM_t	0,186	0,443	0,118	0,583	-0,284	0,189
EDSS basal	-0,324	0,114	0,182	0,344	0,147	0,457
EDSS 12m	0,039	0,854	-0,071	0,714	-0,061	0,758
Índex IgG	-0,104	0,627	-0,052	0,798	0,230	0,257
Lesions cranials	-0,108	0,680	0,430	0,075	-0,497	0,042
Volum T2	0,092	0,725	0,071	0,779	-0,208	0,422
Lesions Gd+	0,238	0,273	0,342	0,081	-0,130	0,519
SG_FAST	-0,200	0,442	0,337	0,171	-0,279	0,277
SB_FAST	-0,155	0,554	0,370	0,130	-0,074	0,779
BPF_FAST	0,092	0,727	-0,044	0,861	0,377	0,136
SG_SPM8	-0,209	0,422	0,387	0,113	-0,301	0,240
SB_SPM8	-0,304	0,235	0,309	0,213	-0,221	0,395
BPF_SMP8	-0,123	0,639	-0,057	0,823	0,243	0,348

Taula 17 (continuació). Anàlisi de correlació entre els miRNAs i les variables clíniques, d'anàlisi de LCR i radiològiques.

	miR-155		miR-146a		miR-142-3p	
	Rho Spearman	valor <i>p</i>	Rho Spearman	valor <i>p</i>	Rho Spearman	valor <i>p</i>
Brots	-0,320	0,090	-0,183	0,341	-0,109	0,581
TIM_t	-0,157	0,465	-0,095	0,660	-0,182	0,406
EDSS basal	0,150	0,439	-0,062	0,749	-0,001	0,995
EDSS 12m	-0,142	0,464	-0,007	0,971	-0,142	0,471
Índex IgG	-0,058	0,774	-0,031	0,879	-0,165	0,419
Lesions cranials	0,095	0,708	0,200	0,425	0,056	0,830
Volum T2	-0,098	0,699	0,141	0,476	-0,245	0,343
Lesions Gd+	0,151	0,452	0,193	0,335	0,216	0,289
SG_FAST	-0,069	0,785	-0,187	0,458	0,277	0,282
SB_FAST	-0,065	0,798	-0,084	0,742	0,404	0,107
BPF_FAST	0,541	0,021	0,420	0,083	0,602	0,010
SG_SPM8	-0,102	0,687	-0,326	0,345	0,375	0,138
SB_SPM8	-0,228	0,363	-0,292	0,240	0,255	0,323
BPF_SMP8	0,348	0,157	0,261	0,295	0,412	0,101

Taula 17 (continuació). Anàlisi de correlació entre els miRNAs i les variables clíniques, d'anàlisi de LCR i radiològiques.

	miR-199a-3p		miR-378		miR-30a-5p	
	Rho Spearman	valor <i>p</i>	Rho Spearman	valor <i>p</i>	Rho Spearman	valor <i>p</i>
Brots	-0,262	0,196	-0,270	0,157	-0,103	0,593
TIM_t	0,391	0,072	0,105	0,626	0,294	0,163
EDSS basal	-0,057	0,781	-0,007	0,972	-0,182	0,345
EDSS 12m	0,183	0,371	-0,127	0,512	-0,081	0,676
Índex IgG	-0,325	0,121	-0,095	0,636	-0,119	0,554
Lesions cranials	0,295	0,286	0,179	0,476	0,184	0,465
Volum T2	0,182	0,516	0,057	0,823	0,131	0,604
Lesions Gd+	0,429	0,037	0,334	0,089	0,135	0,503
SG_FAST	0,536	0,040	0,217	0,387	-0,115	0,651
SB_FAST	0,439	0,101	0,214	0,394	-0,193	0,443
BPF_FAST	-0,066	0,815	0,195	0,439	0,073	0,772
SG_SPM8	0,218	0,385	0,218	0,385	-0,176	0,484
SB_SPM8	0,116	0,648	0,116	0,648	-0,251	0,316
BPF_SPM8	-0,196	0,483	0,066	0,794	0,020	0,938

Taula 17 (continuació). Anàlisi de correlació entre els miRNAs i les variables clíniques, d'anàlisi de LCR i radiològiques.

	miR-143		miR-365		miR-19a	
	Rho Spearman	valor <i>p</i>	Rho Spearman	valor <i>p</i>	Rho Spearman	valor <i>p</i>
Brots	-0,039	0,843	-0,016	0,943	-0,120	0,534
TIM_t	0,111	0,614	-0,112	0,660	0,012	0,954
EDSS basal	-0,067	0,735	0,085	0,701	-0,143	0,461
EDSS 12m	-0,009	0,962	0,239	0,273	0,243	0,204
Índex IgG	-0,144	0,474	-0,321	0,135	-0,078	0,699
Lesions cranials	0,162	0,520	0,259	0,371	0,016	0,950
Volum T2	0,259	0,299	0,266	0,358	0,137	0,589
Lesions Gd+	-0,063	0,758	0,083	0,722	0,313	0,112
SG_FAST	-0,115	0,651	0,306	0,288	-0,137	0,589
SB_FAST	0,044	0,861	0,055	0,852	0,060	0,813
BPF_FAST	-0,235	0,349	0,198	0,497	0,301	0,224
SG_SPM8	-0,020	0,938	0,165	0,573	-0,069	0,784
SB_SPM8	0,032	0,900	-0,011	0,970	-0,150	0,552
BPF_SPM8	-0,119	0,639	-0,097	0,742	0,104	0,683

Taula 17 (continuació). Anàlisi de correlació entre els miRNAs i les variables clíniques, d'anàlisi de LCR i radiològiques.

	miR-328		miR-106a	
	Rho Spearman	valor <i>p</i>	Rho Spearman	valor <i>p</i>
Brots	-0,373	0,079	-0,193	0,317
TIM_t	0,049	0,846	0,144	0,501
EDSS basal	0,208	0,341	-0,041	0,834
EDSS 12m	0,013	0,954	-0,107	0,582
Índex IgG	0,098	0,664	-0,378	0,052
Lesions cranials	0,318	0,247	0,376	0,124
Volum T2	0,063	0,825	0,001	0,997
Lesions Gd+	0,439	0,046	0,429	0,026
SG_FAST	0,744	0,001	0,292	0,239
SB_FAST	0,461	0,084	0,409	0,092
BPF_FAST	0,330	0,229	0,168	0,505
SG_SPM8	0,640	0,010	0,321	0,194
SB_SPM8	0,418	0,121	0,291	0,241
BPF_SPM8	0,213	0,447	0,156	0,537

En l'anàlisi de l'expressió de diferents miRNAs en funció de diferents variables clíniques i radiològiques no es van trobar diferències estadísticament significatives entre cap de les variables analitzades i l'expressió dels miR-203, miR-191, miR-155, miR-30a-5p, miR-143 i miR-106 (taula 18).

Els miRNAs que van presentar algunes diferències estadísticament significatives foren els miR-21 (amb la forma de debut infratentorial), miR-140 (amb la topografia de brot, i la forma de debut de nervi òptic i infratentorial), miR-126 (amb la forma de debut infratentorial), miR-520c-3p (amb el nombre de criteris de Barkof), miR-146a (amb el nombre de lesions en T2), miR-142-3p (amb la presència o absència de lesions hipointenses en T1), miR-199a-3p (amb la forma de debut infratentorial), miR-378 (amb la forma de debut de nervi òptic i infratentorial), miR-365 (amb la topografia de brot, i la forma de debut de nervi òptic i infratentorial), miR-19a (amb la topografia de brot, i amb la forma de debut de nervi òptic i infratentorial) i miR-328 (amb la forma de debut infratentorial). Alguns d'aquests mateixos miRNAs (miR-21, miR-140, miR-146a, miR-365, miR-328) juntament amb d'altres (miR-203, miR-155, miR-106a) van presentar algunes diferències al límit de la significació ($0,05 \leq p < 0,10$) amb diferents variables analitzades sobretot radiològiques.

Taula 18. Anàlisi d'expressió diferenciada entre els miRNAs i les variables clíniques i radiològiques.

	miR-203		miR-21		miR-140	
	Mediana (RIQ)	valor <i>p</i>	Mediana (RIQ)	valor <i>p</i>	Mediana (RIQ)	valor <i>p</i>
Topografia debut		0,741		0,328		0,031
Nervi òptic	0,022 (0,133)		0,220 (0,579)		0,051 (0,067)	
Tronc	0,006 (0,020)		0,111 (0,155)		0,005 (0,026)	
Medul·la	0,019 (0,047)		0,100 (0,104)		0,012 (0,016)	
Hemisfèric	0,036 (0,010)		0,118 (0,111)		0,046 (0,020)	
Poliregional	0,011 (0,010)		0,087 (0,113)		0,004 (0,005)	
Debut Nervi òptic		0,441		0,085		0,025
Sí	0,022 (0,133)		0,220 (0,579)		0,051 (0,067)	
No	0,011 (0,031)		0,117 (0,081)		0,012 (0,022)	
Debut Infratentorial		0,275		0,046		0,002
Sí	0,009 (0,036)		0,101 (0,090)		0,010 (0,017)	
No	0,026 (0,072)		0,182 (0,309)		0,047 (0,055)	
TIM		0,295		0,382		0,606
Sí	0,017 (0,045)		0,125 (0,097)		0,012 (0,033)	
No	0,005 (0,027)		0,060 (0,612)		0,018 (0,047)	
C_Barkhof		0,082		0,142		0,243
1-2	0,004 (0,027)		0,059 (0,090)		0,001 (0,012)	
3-4	0,018 (0,040)		0,118 (0,098)		0,020 (0,034)	
Lesions T2		0,165		0,409		0,798
<9	0,037 (0,123)		0,064 (0,110)		0,014 (0,031)	
≥9	0,009 (0,019)		0,125 (0,087)		0,012 (0,030)	
Lesions infratentorials		0,933		0,448		0,186
Presència	0,017 (0,031)		0,117 (0,082)		0,011 (0,027)	
Absència	0,008 (0,108)		0,182 (0,238)		0,022 (0,049)	
Lesions hipointenses T1		0,102		0,212		0,099
Presència	0,006 (0,010)		0,101 (0,089)		0,004 (0,010)	
Absència	0,018 (0,051)		0,135 (0,118)		0,019 (0,034)	

Valor *p* s'ha obtingut amb el Test U Mann-Whitney o Kruskal-Wallis.

Taula 18 (continuació). Anàlisi d'expressió diferenciada entre els miRNAs i les variables clíniques i radiològiques.

	miR-126		miR-520c-3p		miR-191	
	Mediana (RIQ)	valor <i>p</i>	Mediana (RIQ)	valor <i>p</i>	Mediana (RIQ)	valor <i>p</i>
Topografia debut		0,256		0,795		0,516
Nervi òptic	0,008 (0,023)		0,032 (0,114)		0,021 (0,028)	
Tronc	0,003 (0,077)		0,021 (0,073)		0,013 (0,031)	
Medul·la	0,003 (0,003)		0,016 (0,018)		0,011 (0,014)	
Hemisfèric	0,009 (0,011)		0,042 (0,031)		0,015 (0,005)	
Poliregional	0,003 (0,001)		0,031 (0,036)		0,010 (0,003)	
Debut Nervi òptic		0,080		0,441		0,295
Sí	0,008 (0,023)		0,018 (0,030)		0,021 (0,028)	
No	0,003 (0,004)		0,032 (0,114)		0,013 (0,014)	
Debut Infratentorial		0,039		0,253		0,181
Sí	0,003 (0,004)		0,016 (0,024)		0,012 (0,014)	
No	0,008 (0,019)		0,034 (0,052)		0,016 (0,018)	
TIM		0,192		0,448		0,137
Sí	0,003 (0,003)		0,028 (0,035)		0,013 (0,012)	
No	0,007 (0,018)		0,018 (0,017)		0,020 (0,018)	
C_Barkhof		0,803		0,030		0,874
1-2	0,005 (0,004)		0,008 (0,015)		0,013 (0,021)	
3-4	0,003 (0,007)		0,029 (0,040)		0,013 (0,015)	
Lesions T2		0,621		0,280		0,533
<9	0,006 (0,008)		0,012 (0,058)		0,012 (0,013)	
≥9	0,003 (0,005)		0,028 (0,031)		0,014 (0,016)	
Lesions infratentorials		0,974		0,556		0,264
Presència	0,003 (0,009)		0,022 (0,035)		0,013 (0,013)	
Absència	0,004 (0,004)		0,014 (0,050)		0,022 (0,026)	
Lesions hipointenses T1		0,303		1,000		0,566
Presència	0,003 (0,004)		0,020 (0,027)		0,012 (0,010)	
Absència	0,004 (0,008)		0,018 (0,046)		0,014 (0,017)	

Valor *p* s'ha obtingut amb el Test U Mann-Whitney o Kruskal-Wallis.

Taula 18 (continuació). Anàlisi d'expressió diferenciada entre els miRNAs i les variables clíniques i radiològiques.

	miR-155		miR-146a		miR-142-3p	
	Mediana (RIQ)	valor <i>p</i>	Mediana (RIQ)	valor <i>p</i>	Mediana (RIQ)	valor <i>p</i>
Topografia debut		0,851		0,231		0,664
Nervi òptic	0,087 (0,220)		0,530 (2,257)		0,073 (0,176)	
Tronc	0,036 (0,045)		0,317 (0,329)		0,022 (0,084)	
Medul·la	0,027 (0,027)		0,183 (0,258)		0,038 (0,064)	
Hemisfèric	0,040 (0,015)		0,258 (0,316)		0,062 (0,042)	
Poliregional	0,034 (0,040)		0,149 (0,299)		-	
Debut Nervi òptic		0,408		0,125		0,441
Sí	0,087 (0,220)		0,530 (2,257)		0,073 (0,176)	
No	0,030 (0,029)		0,255 (0,290)		0,035 (0,069)	
Debut Infratentorial		0,433		0,076		0,348
Sí	0,029 (0,031)		0,237 (0,303)		0,035 (0,070)	
No	0,040 (0,139)		0,432 (1,138)		0,071 (0,113)	
TIM		0,978		1,000		0,264
Sí	0,029 (0,038)		0,257 (0,290)		0,049 (0,072)	
No	0,042 (0,245)		0,197 (2,463)		0,035 (0,048)	
C_Barkhof		0,060		0,160		0,110
1-2	0,009 (0,031)		0,165 (0,178)		0,020 (0,031)	
3-4	0,031 (0,039)		0,259 (0,501)		0,056 (0,072)	
Lesions T2		0,165		0,021		0,717
<9	0,013 (0,037)		0,197 (0,174)		0,041 (0,078)	
≥9	0,031 (0,038)		0,325 (0,544)		0,035 (0,071)	
Lesions infratentorials		0,674		0,145		0,447
Presència	0,029 (0,040)		0,243 (0,288)		0,035 (0,071)	
Absència	0,041 (0,085)		0,432 (1,127)		0,074 (0,113)	
Lesions hipointenses T1		0,773		0,773		0,017
Presència	0,025 (0,030)		0,255 (0,475)		0,016 (0,014)	
Absència	0,031 (0,042)		0,214 (0,383)		0,067 (0,079)	

Valor *p* s'ha obtingut amb el Test U Mann-Whitney o Kruskal-Wallis.

Taula 18 (continuació). Anàlisi d'expressió diferenciada entre els miRNAs i les variables clíniques i radiològiques.

	miR-199a-3p		miR-378		miR-30a-5p	
	Mediana (RIQ)	valor <i>p</i>	Mediana (RIQ)	valor <i>p</i>	Mediana (RIQ)	valor <i>p</i>
Topografia debut		0,285		0,174		0,515
Nervi òptic	0,031 (0,032)		0,068 (0,158)		0,078 (0,285)	
Tronc	0,015 (0,021)		0,038 (0,084)		0,079 (0,147)	
Medul·la	0,017 (0,018)		0,032 (0,026)		0,032 (0,054)	
Hemisfèric	0,025 (0,018)		0,069 (0,024)		0,075 (0,155)	
Poliregional	0,021 (0,033)		0,053 (0,086)		0,193 (0,349)	
Debut Nervi òptic		0,199		0,018		0,175
Sí	0,031 (0,032)		0,068 (0,158)		0,078 (0,285)	
No	0,020 (0,018)		0,032 (0,032)		0,036 (0,080)	
Debut Infratentorial		0,030		0,012		0,194
Sí	0,016 (0,018)		0,032 (0,032)		0,036 (0,069)	
No	0,025 (0,030)		0,069 (0,058)		0,075 (0,228)	
TIM		0,515		0,801		0,933
Sí	0,024 (0,021)		0,041 (0,046)		0,051 (0,085)	
No	0,013 (0,024)		0,035 (0,241)		0,038 (0,525)	
C_Barkhof		0,172		0,109		0,227
1-2	0,013 (0,009)		0,028 (0,023)		0,029 (0,054)	
3-4	0,025 (0,024)		0,052 (0,051)		0,058 (0,098)	
Lesions T2		0,778		0,409		0,672
<9	0,024 (0,023)		0,029 (0,034)		0,043 (0,055)	
≥9	0,022 (0,028)		0,047 (0,047)		0,048 (0,100)	
Lesions infratentorials		0,850		0,634		0,634
Presència	0,023 (0,019)		0,037 (0,042)		0,051 (0,099)	
Absència	0,016 (0,044)		0,053 (0,054)		0,038 (0,230)	
Lesions hipointenses T1		0,352		0,733		0,254
Presència	0,016 (0,022)		0,041 (0,030)		0,024 (0,106)	
Absència	0,023 (0,024)		0,035 (0,058)		0,058 (0,084)	

Valor *p* s'ha obtingut amb el Test U Mann-Whitney o Kruskal-Wallis.

Taula 18 (continuació). Anàlisi d'expressió diferenciada entre els miRNAs i les variables clíniques i radiològiques.

	miR-143		miR-365		miR-19a	
	Mediana (RIQ)	valor <i>p</i>	Mediana (RIQ)	valor <i>p</i>	Mediana (RIQ)	valor <i>p</i>
Topografia debut		0,625		0,033		0,007
Nervi òptic	0,059 (0,089)		0,030 (0,028)		0,004 (0,006)	
Tronc	0,038 (0,035)		0,002 (0,002)		0,001 (0,001)	
Medul·la	0,029 (0,026)		0,004 (0,005)		0,001 (0,002)	
Hemisfèric	0,036 (0,068)		0,023 (0,023)		0,009 (0,006)	
Poliregional	0,043 (0,024)		-		0,0005 (0,001)	
Debut Nervi òptic		0,219		0,024		0,022
Sí	0,059 (0,089)		0,030 (0,028)		0,004 (0,006)	
No	0,036 (0,030)		0,003 (0,006)		0,001 (0,002)	
Debut Infratentorial		0,181		0,004		<0,001
Sí	0,035 (0,029)		0,003 (0,005)		0,001 (0,001)	
No	0,036 (0,090)		0,028 (0,026)		0,005 (0,009)	
TIM		0,954		0,801		0,933
Sí	0,036 (0,033)		0,007 (0,023)		0,001 (0,003)	
No	0,025 (0,095)		0,004 (0,020)		0,002 (0,007)	
C_Barkhof		0,776		0,097		0,784
1-2	0,032 (0,075)		0,002 (0,003)		0,001 (0,005)	
3-4	0,036 (0,034)		0,007 (0,032)		0,001 (0,003)	
Lesions T2		0,806		0,708		0,636
<9	0,042 (0,051)		0,004 (0,015)		0,001 (0,002)	
≥9	0,034 (0,035)		0,007 (0,026)		0,001 (0,004)	
Lesions infratentorials		0,173		0,446		0,129
Presència	0,053 (0,106)		0,005 (0,010)		0,001 (0,003)	
Absència	0,035 (0,037)		0,022 (0,034)		0,002 (0,010)	
Lesions hipointenses T1		0,530		0,569		0,414
Presència	0,033 (0,030)		0,004 (0,005)		0,001 (0,003)	
Absència	0,036 (0,036)		0,006 (0,026)		0,001 (0,005)	

Valor *p* s'ha obtingut amb el Test U Mann-Whitney o Kruskal-Wallis.

Taula 18 (continuació). Anàlisi d'expressió diferenciada entre els miRNAs i les variables clíniques i radiològiques.

	miR-328		miR-106a	
	Mediana (RIQ)	valor <i>p</i>	Mediana (RIQ)	valor <i>p</i>
Topografia debut		0,324		0,831
Nervi òptic	0,010 (0,017)		2,088 (6,810)	
Tronc	0,008 (0,016)		1,553 (2,674)	
Medul·la	0,005 (0,006)		1,262 (2,589)	
Hemisfèric	0,013 (0,012)		1,474 (0,493)	
Poliregional	0,005 (0,008)		1,386 (1,397)	
Debut Nervi òptic		0,154		0,376
Sí	0,010 (0,017)		2,088 (6,810)	
No	0,005 (0,009)		1,292 (2,461)	
Debut Infratentorial		0,049		0,495
Sí	0,005 (0,007)		1,262 (2,531)	
No	0,011 (0,017)		1,474 (2,588)	
TIM		0,745		0,978
Sí	0,008 (0,010)		1,449 (2,369)	
No	0,007 (0,018)		1,292 (9,686)	
C_Barkhof		0,557		0,109
1-2	0,005 (0,003)		0,979 (0,693)	
3-4	0,009 (0,011)		2,085 (2,538)	
Lesions T2		0,366		0,381
<9	0,005 (0,004)		1,157 (2,683)	
≥9	0,009 (0,011)		1,779 (2,496)	
Lesions infratentorials		1,000		0,716
Presència	0,008 (0,011)		1,688 (2,443)	
Absència	0,007 (0,006)		1,424 (2,441)	
Lesions hipointenses T1		0,138		0,546
Presència	0,002 (0,020)		1,558 (1,538)	
Absència	0,008 (0,006)		1,424 (2,639)	

Valor *p* s'ha obtingut amb el Test U Mann-Whitney o Kruskal-Wallis.

5. *DISCUSSIÓ*

Aquesta tesi doctoral ha permès identificar un perfil de miRNAs en el LCR en pacients amb esclerosi múltiple amb una expressió diferenciada de la de pacients afectats d'altres malalties neurològiques, i també en un subgrup de pacients amb esclerosi múltiple amb presència de bandes oligoclonals d'IgM lípidespecífiques en LCR, que s'ha associat a formes clíniques més severa de la malaltia. Els resultats d'aquest treball permeten suggerir alguns miRNAs com a potencials biomarcadors de diagnòstic i de pronòstic de la malaltia. També, alguns dels miRNAs identificats s'han pogut associar a algunes variables clíniques i radiològiques dels pacients amb esclerosi múltiple en fases inicials de la malaltia.

5.1. ELS miRNAs I LA LITERATURA PRÈVIA

Els miRNAs són un tipus de molècules de RNA no codificant d'una longitud d'entre 19 i 24 parells de bases, altament estables i filogenèticament ben conservats, que s'han identificat en diferents éssers vius incloent els mamífers i els ésser humans, i que intervenen en la regulació posttranscripcional de fins un 60% dels gens que codifiquen per proteïnes. La funció dels miRNAs està inclosa dins els sistemes de regulació epigenètica de l'expressió dels gens juntament amb la metilació del DNA i la modificació de les histones (Koch *et al.* 2013). Tenen un paper primordial en processos cel·lulars i de desenvolupament (Bartel 2004). Des que es va descobrir el primer miRNA al 1993 en el *C.elegans* (Lee *et al.* 1993), se n'han descrit fins a l'actualitat més de 23.000 dels quals 2.578 són en humans (www.mirbase.org). Aquestes molècules han despertat l'interès de la comunitat científica i han començat a ésser estudiats de forma molt extensa i s'han implicat progressivament de forma important en diferents processos oncològics, inflamatoris i neurodegeneratius i, en diferents malalties oncològiques, cardiovasculars, autoimmunitàries, psiquiàtriques i neurològiques (Esteller 2011; Maciotta *et al.* 2013).

Els miRNAs tenen un potencial paper com a biomarcadors per ésser usats a la clínica degut a la seva alta estabilitat i la seva possible detecció en diferents fluids i teixits. Els diversos treballs realitzats fins a l'actualitat situen els miRNAs com a possibles biomarcadors de diagnòstic, pronòstic, monitorització i evolució de les patologies i de resposta terapèutica (Forsheew *et al.* 2012; Murtaza *et al.* 2013), tot i que actualment podríem dir que estem a l'inici d'entendre el paper que els miRNAs tenen tant a nivell fisiològic com patogènic. També es postulen com a possibles dianes terapèutiques en algunes malalties. En patologia oncològica ja s'utilitza algun miRNA de forma quasi rutinària com a biomarcador diagnòstic i pronòstic (Suzuki *et al.* 2013; Gounaris-Shannon i Chevassut 2013).

Els darrers anys s'han estudiat els miRNAs en diferents malalties de patogènia bàsicament neurodegenerativa com la malaltia d'Alzheimer, demència fronto-temporal, la malaltia de Parkinson, l'esclerosi lateral amiotròfica i la malaltia de Huntington (Maciotta *et al.* 2013; Sheinerman i Umansky 2013), tant en diferents models animals i cultius cel·lulars, com en mostres biològiques (sang, plasma, cèl·lules, LCR i teixit neurològic) de pacients afectats. També s'ha estudiat, i de forma extensa en els darrers 5 anys, el rol dels miRNAs en l'esclerosi múltiple com a malaltia de base autoimmunitària i neurodegenerativa (Otaegui *et al.* 2009; Du *et al.* 2009; Junker *et al.* 2009; Keller *et al.* 2009; Lindberg *et al.* 2010; Cox *et al.* 2010; De Santis *et al.* 2010; Waschbisch *et al.* 2011; Guerau-de-Arellano *et al.* 2011; Fenoglio *et al.* 2011; Paraboschi *et al.* 2011; Sievers *et al.* 2012; Siegel *et al.* 2012; Haghikia *et al.* 2012; Lorenzi *et al.* 2012; Martinelli-Boneschi *et al.* 2012; Gandhi *et al.* 2013; Hecker *et al.* 2013; Fenoglio *et al.* 2013; Jernås *et al.* 2013; Yang *et al.* 2013; Søndergaard *et al.* 2013; Meira *et al.* 2014). Els resultats d'aquests treballs suggereixen que els miRNAs tenen un paper important en la patogènia de la malaltia i que potencialment en el futur podrien considerar-se com a biomarcadors de diagnòstic, pronòstic, monitoratge, resposta terapèutica i, fins i tot, com a futures dianes terapèutiques.

En el treball realitzat en aquesta tesi s'han identificat i validat diferents miRNAs en LCR relacionats amb l'EM, alguns dels quals no s'havien associat prèviament a la malaltia. Un d'ells (miR-106a) es proposa com a potencial biomarcador de diagnòstic d'EM i cinc (miR-203, miR-520c-3p, miR-155, miR-142-3p i miR-

106a) com a potencials biomarcadors de formes agressives de la malaltia per haver-se trobat expressats de forma diferenciada en pacients amb presència de bandes oligoclonals d'IgM lípidespecífiques. Alguns d'ells s'han descrit prèviament en pacients o lesions d'EM o relacionats amb diferents processos inflamatoris, tal com es discutirà més endavant.

En els diferents treballs realitzats tant en EM com en d'altres malalties, els resultats dels miRNAs desregulats en diferents mostres biològiques de pacients comparats amb controls no són homogenis i, en alguns casos, fins i tot contradictoris. Això és degut a la influència de diferents variables relacionades amb els tipus de mostres biològiques analitzades (sang, sèrum, LCR, cèl·lules, teixit, etc.), els fenotips de pacients analitzats, les fases de la malaltia en què els pacients es poden trobar, els tractaments rebuts pels pacients, la tècnica utilitzada en l'anàlisi de les mostres i la metodologia utilitzada en l'anàlisi de resultats. Totes aquestes variables poden influenciar en els resultats obtinguts en una cohort de pacients determinada. Per intentar homogeneïtzar els mètodes tècnics, diferents autors estan fent propostes per intentar estandarditzar la metodologia i l'anàlisi de miRNAs en diferents mostres biològiques (Machida *et al.* 2013; Sheinerman i Umansky 2013).

Actualment només s'ha publicat un treball en EM on s'investiga el paper dels miRNAs en LCR (Haghikia *et al.* 2012). Aquests autors identifiquen els miR-922, miR-181c i miR-633 com a desregulats en pacients amb EM comparats amb controls afectats d'altres malalties neurològiques. En el treball d'aquesta tesi no s'han detectat expressió d'aquests miRNAs ni en pacients del grup "EM" ni en els subjectes del grup "Control" afectats d'altres malalties neurològiques. Aquestes discrepàncies poden ser degudes a la diferent metodologia utilitzada en els dos estudis, al tipus de mostres utilitzades per l'anàlisi (en el treball de Haghikia *et al.* (2012) van utilitzar mostres combinades de LCR de diferents pacients, mentre que en aquest treball de tesi doctoral es va analitzar cada mostra de forma independent), als diferents tipus de pacients analitzats (en el treball de Haghikia *et al.* (2012) es van analitzar pacients amb EMRR, EMSP i EMPP amb una duració de la malaltia d'entre 1 a 34 anys; mentre que en aquest treball de tesi doctoral tots els pacients foren estudiats en els estadis inicials d'EMRR o en una SCA amb

critèris de disseminació en espai per RM que no havien rebut tractament immunomodulador prèviament a l'anàlisi).

De fet, el treball realitzat en aquesta tesi, comparat amb d'altres treballs publicats, té la característica d'analitzar l'expressió de miRNAs en pacients amb EM en mostres de LCR obtingudes en les fases inicials de la malaltia (durant els primers 3 anys després del debut) sense que haguessin rebut prèviament tractament immunomodulador.

L'anàlisi de miRNAs en EM en mostres de LCR de qualitat no és comú per la dificultat d'obtenir-les i de processar-les adequadament (Freedman *et al.* 2005). Tal com s'ha dit anteriorment, hi ha una gran quantitat de miRNAs que s'han identificat en humans i varis d'ells en mostres biològiques de sang, plasma i cèl·lules mononucleades de pacients amb EM. No obstant això, degut a la poca experiència que existeix en l'estudi d'aquestes molècules en LCR de pacients amb EM, el disposar de dades sobre quins miRNAs s'expressen en el LCR d'aquests pacients és important per tal de focalitzar les tècniques d'anàlisi en alguns miRNAs específics i d'aquesta manera reduir el temps d'anàlisi i els costos. En aquest treball s'han pogut identificar 61 miRNAs en el LCR dels pacients amb uns nivells d'expressió acceptables.

5.2. MOSTRES ESTUDIADAES

Aquest treball de tesi doctoral s'ha pogut dur a terme gràcies a la creació, des de la Unitat de Neuroimmunologia i Esclerosi múltiple, d'una col·lecció de mostres biològiques de pacients amb sospita o diagnòstic d'EM i d'altres malalties neurològiques. Les col·leccions de mostres biològiques i els biobancs permeten realitzar estudis d'investigació clínica en factors bioquímics i moleculars en varies malalties amb garanties de qualitat de les mostres.

La col·lecció de què disposem consta actualment de prop de 1.000 mostres biològiques entre plasma, sèrum, cèl·lules mononucleades de sang perifèrica i LCR corresponents a més de 200 pacients diferents, i és la base per haver pogut fer aquest i d'altres treballs que actualment s'estan duent a terme i de nous que es realitzaran en un futur. Aquesta col·lecció de mostres i el projecte que constitueix aquesta tesi doctoral estan aprovats pel CEIC de l'Hospital Universitari Dr. Josep Trueta de Girona i segueixen la normativa vigent requerida. La col·lecció de mostres forma part del Biobanc de l'Institut d'Investigació Biomèdica de Girona. Per poder dur a terme investigació clínica en factors bioquímics i genètics de diferents malalties, és imprescindible disposar de mostres biològiques de qualitat i de dades clíniques fiables i prospectives. La Unitat de Neuroimmunologia i Esclerosi Múltiple del Servei de Neurologia de l'Hospital Universitari Dr. Josep Trueta disposa d'aquestes dues característiques.

El treball presentat en aquesta tesi es basa en l'anàlisi de les mostres de LCR de pacients amb EM i altres malalties neurològiques que per motius diagnòstics van requerir de la realització d'una punció lumbar i d'un anàlisi de LCR. El fet d'haver realitzat el treball en LCR el fa especialment important ja que sovint no es disposa d'aquest tipus de mostres per desenvolupar recerca bàsica i clínica en diverses malalties neurodegeneratives.

Les mostres obtingudes i analitzades en aquest treball de tesi doctoral van provenir de pacients que foren diagnosticats d'EMRR o de SCA amb criteris de disseminació en espai per RM i d'altres pacients afectats de diverses malalties neurològiques que van formar part del grup "Control". Cal dir que obtenir mostres de LCR de subjectes sans és extremadament difícil i complex i, segons el nostre coneixement, no existeix avui en dia cap col·lecció de mostres biològiques de LCR de subjectes completament sans. El grup "Control" utilitzat en aquest treball estava format per pacients que per motius diagnòstics van requerir d'una punció lumbar per fer un anàlisi del seu LCR. Van consistir en pacients amb malalties de diferent patogènia (cefalea, hipertensió endocranial benigne, síndrome conversiva, processos d'origen isquèmic, mielopatia i neuropatia òptica idiopàtiques, encefalopatia de causa post-infecciosa o de causa no filiada i d'altres). Per a l'anàlisi inicial dels miRNAs es van utilitzar subjectes del grup

“Control” amb un perfil patogènic de malaltia menys inflamatori-infecció, i per a l’anàlisi posterior de validació, tots els subjectes del grup.

5.3. ESTUDI D’IDENTIFICACIÓ DE miRNAs CANDIDATS

Els objectius principals d’aquesta tesi van ser, d’una banda, intentar identificar un perfil de miRNAs específic que ens permetés diferenciar els pacients afectats d’EM dels afectats d’altres malalties neurològiques del SNC (identificació de miRNAs com a biomarcadors de diagnòstic) i, d’altra banda, intentar identificar un perfil de miRNAs específic per un subgrup de pacients amb EM amb una forma clínica més severa de la malaltia associada a la presència de bandes oligoclonals d’IgM lípidespecífiques en LCR (identificació de miRNAs com a biomarcadors de pronòstic).

Per realitzar l’anàlisi que permetés acomplir els dos objectius principals plantejats en aquesta tesi, es va estudiar l’expressió de miRNAs inicialment en una cohort amb pocs subjectes i posteriorment es va realitzar un estudi de validació dels miRNAs candidats en una segona cohort amb més subjectes.

L’anàlisi inicial de miRNAs en la cohort d’identificació va permetre identificar 5 miRNAs (miR-203, miR-21, miR-140, miR-126, miR-520c-3p) amb expressió diferenciada estadísticament significativa entre pacients EM i subjectes del grup “Control”, i el miR-365 entre pacients amb presència o absència de bandes oligoclonals d’IgM lípidespecífiques. Posteriorment, a l’estudi de validació amb 61 individus es van analitzar els miRNAs que havien tingut una expressió diferenciada amb una significació $p < 0,2$ i altres miRNAs que a la literatura prèviament s’havien implicat en EM o inflamació (miR-155, miR-146a, miR-142-3p i miR-106a). D’aquesta anàlisi de validació es va obtenir que el miR-106a tenia una expressió estadísticament significativa diferent entre pacients del grup “EM” i subjectes del grup “Control”, i per tant podria ser un bon marcador pel

diagnòstic d'EM. Per altra banda, els miRNA-203, miR-520c-3p, miR-155, miR-142-3p i també el miR-106a van mostrar una expressió estadísticament significativa diferent entre pacients amb EM i BOCM_LE positives i pacients amb EM i BOCM_LE negatives, i van indicar, per tant, el seu potencial com a biomarcadors de pronòstic.

L'EM és una malaltia patogènicament i clínicament molt heterogènia, amb diverses i diferents formes de presentació clínica, fenotips clínics, graus d'activitat inflamatòria, graus de progressió clínica, símptomes tant físics com cognitius i tipus de resposta terapèutica als fàrmacs actualment utilitzats (Sospedra i Martin 2005; Compston *et al.* 2005; Compston i Coles 2008; Fernández *et al.* 2011). En el moment del diagnòstic és molt difícil preveure com evolucionarà cada pacient de forma individual i com respondrà als diferents tractament disponibles. Avui en dia no disposem de bons biomarcadors pronòstics de la malaltia. El biomarcador que actualment ofereix una millor informació pronòstica, al menys a curt i mitjà termini, és la RM tot i que té més valor en la fase inflamatòria de la malaltia i menys en la fase progressiva.

Un nou biomarcador que en els darrers anys s'està posicionant com a pronòstic de mala evolució clínica i radiològica de l'EM és la presència de bandes oligoclonals d'IgM lípidespecífiques en el LCR dels pacients. El 40% dels pacients amb EM tenen BOCM i, d'aquestes, el 80% són lípidespecífiques (Villar *et al.* 2002a; Villar *et al.* 2005; Jongen *et al.* 2007; Villar *et al.* 2009b). Les BOCM_LE s'han associat en diferents treballs a una mala evolució clínica d'EM a mig terme (Villar *et al.* 2003; Villar *et al.* 2005; Thangarajh *et al.* 2008) i a una mala evolució tant clínica com radiològica dels SCA a mitjà termini (Villar *et al.* 2002b; Boscá *et al.* 2010; Magraner *et al.* 2012). Cal remarcar que la presència de BOCM_LE en LCR permeten diferenciar un subgrup de pacients que tindran una pitjor evolució de la malaltia a mig-llarg terme, ja que a nivell basal els autors no han pogut apreciar diferències clíniques ni radiològiques entre els pacients amb presència o absència de BOCM_LE, tal i com passa amb la nostra cohort d'estudi.

En el treball d'aquesta tesi s'ha utilitzat la presència o absència de BOCM_LE en LCR per dividir els pacients amb EM en dos grups i s'ha realitzat una anàlisi de

miRNAs en LCR per identificar els que tenien una expressió diferenciada entre els dos grups. Els pacients amb EM analitzats no van presentar diferències estadísticament significatives en variables demogràfiques, clíniques i de RM en el moment basal ni clíniques en el seguiment a 12 mesos (nombre de brots, discapacitat, necessitat i temps de tractament immunomodulador). Aquestes troballes estan en consonància amb les dades prèvia esmentades sobre el comportament dels pacients amb BOCM_LE a nivell basal i amb seguiment a curt terme. Possiblement amb un seguiment més llarg dels nostres pacients podríem trobar diferències clíniques i radiològiques diferents segons la presència o absència de BCOM_LE.

L'estudi de miRNAs en els pacients amb EM va poder identificar-ne alguns amb una expressió estadísticament diferent depenent de la presència o absència de BOCM_LE en LCR (miR-203, miR-520c-3p, miR-155, miR-142-3p, miR-106a). És la primera vegada que es descriu a la literatura un patró de miRNAs específic en LCR de pacients en fases inicials de formes remitent-recurrent d'EM segons una variable d'evolució pronòstica com és la presència o absència de BOCM_LE. Els diferents estudis de miRNAs publicats fins a l'actualitat en EM s'han realitzat en diferents formes de la malaltia i amb diferents temps d'evolució però en cap d'ells s'ha centrat l'estudi en les fases inicials de la malaltia. La gran majoria d'aquests treballs tampoc han estudiat específicament l'associació de l'expressió dels miRNAs amb variables de mal pronòstic molecular o radiològic. En el treball de Søndergaard *et al.* (2013) s'adreça parcialment aquest aspecte però no troba associació entre l'expressió dels miR-let-7d i miR-145, i les lesions realçades amb gadolini. En alguns estudis no s'ha controlat específicament el tractament immunomodulador dels pacients i en altres s'ha analitzat la variació de l'expressió de diferents miRNAs com a resposta a diferents tractament immunomoduladors (interferó β , acetat de glatiràmer o natalizumab) (Waschbisch *et al.* 2011; Sievers *et al.* 2012; Hecker *et al.* 2013; Meira *et al.* 2014). En aquest treball de tesi tots els pacients estaven lliures de tractament immunomodulador per tal d'evitar la interferència del mateix en els resultats d'expressió dels miRNAs.

5.4. CAPACITAT DE DISCRIMINACIÓ DELS miRNAs

Amb els resultats obtinguts de l'anàlisi de les dades del treball, finalment es va voler estudiar, mitjançant una anàlisi ROC, si els miRNAs candidats tenien capacitat per discriminar entre els diferents grups de subjectes estudiats. Es va veure que el miR-106 mostrava un acceptable poder de discriminació entre pacients del grup "EM" i els subjectes del grup "Control", confirmant així la seva potencial utilitat com a biomarcador de diagnòstic en EM.

Els miR-203, miR-520c-3p, miR-155, miR-142-3p i miR-106a mostraven una bona capacitat de discriminació entre els pacients amb BOCM_LE positives i negatives, de manera que potencialment permetrien discriminar entre els pacients amb millor i pitjor pronòstic evolutiu.

5.5. DESCRIPCIÓ DELS miRNAs DESTACATS PRÈVIAMENT RELACIONATS AMB L'EM (miR-155 i miR-142-3p)

Diferents autors han observat sobre-expressió del miR-155 i miR-142-3p en EM o relacionats amb desregulació dels sistema immunitari.

El miR-155 és un dels primers miRNAs associats a la inflamació degut a la seva important sobre-expressió en múltiples línies cel·lulars associades al lligand del receptor *toll-like*, citocines proinflamàtores i antígens específics (Thamilarasan *et al.* 2012). També ha estat associat en múltiples treballs a l'EM tant en sang i plasma de pacients (Paraboschi *et al.* 2011; Waschbisch *et al.* 2011; Siegel *et al.* 2012; Zhang *et al.* 2014) com en lesions actives d'EM (Junker *et al.* 2009) i també en el model animal d'encefalomielitis al·lèrgica experimental (Zhang *et al.* 2014) on els ratolins sense miR-155 presentaven un curs més lent i menys sever de la malaltia amb menys fenòmens inflamatoris en el SNC (Murugaiyan i Beynon

2011). No obstant això, també altres treballs que han investigat específicament el paper d'aquest miRNA en EM no han trobat diferències entre pacients i controls (Fenoglio *et al.* 2011). S'ha vist que l'expressió de miR-155 està regulada per STAT3 en cèl·lules Th17, que és una via inflamatòria implicada en la patogènia de l'EM (Escobar *et al.* 2013).

L'expressió de miR-142-3p està relacionada amb el correcte desenvolupament de les cèl·lules hematopoètiques (Sun *et al.* 2010), i la seva expressió en teixits es considera un marcador d'inflamació tant aguda com crònica (Joyce *et al.* 2011). La sobreexpressió de miR-142-3p s'ha associat també a la tolerància immunitària ja que s'ha trobat inhibida per FOXP3, fet que produeix un increment d'AMP cíclic i una supressió de la funció de les cèl·lules T reguladores (Huang *et al.* 2009). La sobreexpressió d'aquest miRNA s'ha trobat associada a obesitat infantil i adulta, com a model d'inflamació crònica (Prats-Puig *et al.* 2013; Ortega *et al.* 2013) En EM s'ha vist sobreexpressat en cèl·lules mononucleades de sang perifèrica en pacients amb EM i també normalitzada després de tractament amb acetat de glatiràmer (Waschbisch *et al.* 2011).

En aquest treball s'ha trobat sobre-expressió d'aquests dos miRNAs en pacients amb EM però sobretot en pacients amb BOCM_LE positives en LCR, que són pacients que s'han associat a una forma més agressiva de la malaltia. Aquestes troballes reforcen les dades de la participació d'aquests miRNAs en EM i en vies proinflamatòries.

5.6. DESCRIPCIÓ DELS miRNAs DESTACATS NO PRÈVIAMENT RELACIONATS AMB L'EM (miR-203, miR-520c-3p i miR-106a)

Els miR-203, miR-520c-3p i miR-106a no s'han vist implicats prèviament amb EM però sí amb diferents vies proinflamatores i en malalties de patogènia immunològica.

El miR-203 s'ha vist sobreexpressat en psoriasis i artritis reumatoide, malalties amb alt component inflamatori com en l'EM (Hoffmann *et al.* 2007). En aquest treball s'ha trobat sobreexpressió en pacients amb EM més alta severitat com són els que presenten BOCM_LE positives. Una de les dianes del miR-203 és el supressor de senyalització de citocines 3 (SOCS3) que és un regulador negatiu de la via de STAT3 que s'activa per citocines proinflamatores, com IL-6 i interferó, i que té funcions importants en la regulació de la immunitat innata i adaptativa i també en la diferenciació, creixement i supervivència cel·lular (Kubo *et al.* 2003). SOCS3 s'ha relacionat amb EM i altres malalties immunitàries del SNC, i s'expressa en cèl·lules immunitàries i altres cèl·lules del SNC. SOCS3 té un paper molt important en els processos immunològics dins del SNC, participant en la producció de citocines proinflamatores, en l'activació de la micròglia, macròfags i astròcits, en la infiltració de cèl·lules immunitàries i en l'autoimmunitat.

El clúster del miR-520 s'ha vist implicat en el cicle cel·lular i s'ha vist intensament expressat en cèl·lules mare embrionàries humanes indiferenciades (Ren *et al.* 2009). El miR-520c s'ha vist desregulat en diferents tipus de càncer (expressió disminuïda en limfoma (Mazan-Mamczarz *et al.* 2014) i incrementada en càncer gàstric i prostàtic (Golestaneh *et al.* 2012; Iczkowski 2010). En diferents treballs s'ha relacionat el miRNA-520c amb CD44 i ha bloquejat la seva translació. En diferents treballs s'ha observat que CD44 tenen un rol primordial en la regulació de l'EAE i l'EM (Guan *et al.* 2011). CD44 té poca expressió en astròcits i micròglia però s'ha trobat una sobreexpressió en lesions desmielinitzants (Tuohy *et al.* 2004). Recentment s'ha observat en EAE que en

ratolins deficitaris en CD44 tenen una forma més agressiva de la malaltia i tenen un increment del nombre de cèl·lules immunitàries en el SNC, un increment d'anticossos anti-MOG i una elevada producció de citocines pro-inflamatòries. Aquestes dades suggereixen que CD44 té una funció protectora en la EAE (Flynn *et al.* 2013).

El miR-106a s'ha vist desregulat de forma diferent en varis tipus de càncer (Li *et al.* 2014) i en d'altres malalties de patogènia inflamatòria com la malaltia de Crohn (Lin *et al.* 2013) Aquest miRNA està relacionat amb la inflamació per la via de la regulació de l'expressió d'IL-10, un modulador clau del sistema immunitari. S'ha proposat que el miR-106a és un regulador fi de l'expressió de IL-10 davant la resposta a estímuls externs. En d'altres treballs s'ha observat una relació inversa entre els nivells de miR-106a i els nivells de STAT3 (Zhang *et al.* 2013) fet que implica la participació d'aquest miRNA en la regulació de la via inflamatòria.

Les dades del present treball mostren el miR-106a amb una expressió disminuïda en pacients amb EM i una sobreexpressió en pacients amb BOCM_LE positives en LCR. Una possible explicació podria ser que trobem una expressió disminuïda en pacients amb EM perquè, com és conegut, el miR-106a està implicat en molt diverses malalties incloses les que tenen una patogènia inflamatòria i alguns dels subjectes del grup "Control" utilitzats en aquest estudi poden tenir patologies amb una base patogènica també inflamatòria diferent de l'EM que doni lloc a uns nivells d'expressió reduïts d'alguns miRNAs en els pacients amb EM. Ara bé, quan es comparen els pacients amb EM amb BOCM_LE positives o negatives en LCR, l'expressió del miR-106a és diferent en els dos grups i més elevada en els que tenen una patogènia més inflamatòria com són els de les BOCM_LE positives.

5.7. RELACIÓ ENTRE L'EXPRESSIONI DELS miRNAs I VARIABLES CLÍNQUES, D'ANÀLISI DE LCR I RADIOLÒGIQUES

Els estudis realitzats fins a l'actualitat sobre miRNAs i EM s'han centrat bàsicament en identificar quins miRNAs estan desregulats en pacients amb EM comparats amb subjectes controls en diferents tipus de mostres biològiques però pocs treballs han investigat la seva associació amb variables clíniques i d'altres exploracions complementàries. Els pocs treballs que ho han fet han buscat l'associació amb variables demogràfiques dels pacients, variables clíniques com els anys de duració de la malaltia o la discapacitat mesurada mitjançant EDSS o característiques bioquímiques bàsiques de l'anàlisi de LCR. Mentre alguns treballs no han trobat associació amb aquestes variables (Haghikia *et al.* 2012; Martinelli-Boneschi *et al.* 2012b; Søndergaard *et al.* 2013), d'altres sí que han trobat alguna associació amb la discapacitat física o amb els anys de duració de la malaltia (Du *et al.* 2009; Gandhi *et al.* 2013; Fenoglio *et al.* 2013). Cal destacar que en aquests casos que s'ha trobat associació amb variables clíniques, els pacients estudiats portaven més de quatre anys d'evolució de la malaltia i tenien formes clíniques secundària o primària progressives amb discapacitats físiques significativament més elevades.

En el treball realitzat en aquesta tesi s'ha estudiat l'associació entre l'expressió de diferents miRNAs i variables clíniques, d'estudi de LCR i radiològiques, i s'han observat algunes associacions amb variables clíniques i, per primera vegada a la literatura, amb variables de neuroimatge.

Es van observar 3 miRNAs (miR-140, miR-365 i miR-19a) que mostraven expressió diferenciada en funció de la topografia del brot. Tots ells presentaven valors més elevats en formes de debut de neuritis òptica. A més, el miR-140 mostrava tendència a associar-se a menys lesions hipointenses en T1 i a menys atrofia cerebral (mesurada mitjançant el BPF), característiques que poden suggerir un comportament menys agressiu del debut de la malaltia.

El miR-191 es va correlacionar inversament amb el nombre de lesions cranials i és un miRNA que mostra tendència a estar disminuït en els pacients BOCM_LE positius. Nivells baixos d'aquest miRNA s'han relacionat amb malaltia d'Alzheimer, malaltia de patogènia neurodegenerativa, i també s'han observat nivells disminuïts de miR-191 en cèl·lules T reguladores de diabetis tipus I, malaltia de patogènia autoimmunitària (Hezova *et al.* 2010; Kumar *et al.* 2013).

Els miR-155, miR-142-3p, miR-199a-3p, miR-328 i miR-106a s'associen positivament amb variables que indiquen menys atrofia cerebral, és a dir que nivells més alts d'aquests miRNAs es van associar a menys atrofia (nivells més alts de BPF, SG i SB). Aquests miRNAs s'han associat en treballs previs a fenòmens inflamatoris i, de fet, en el present treball s'associen també a variables que indiquen més inflamació en els pacients (miR-155 tendència a associar-se amb més nombre de criteris de Barkhof; miR-199a-3p associat a més lesions realçades amb gadolini i tendència a associar-se a més necessitat de tractament immunomodulador; miR-328 s'associa a més lesions realçades amb gadolini i tendència a associar-se a més brots de la malaltia). Una possible explicació per aquestes troballes podria ser que els resultats de les mesures d'atrofia associades a aquests miRNAs indiquen una falsa preservació del parènquima degut als fenòmens inflamatoris dels pacients. Uns resultats similars ocorren amb el miR-106a que s'ha associat a més lesions realçades amb gadolini i una tendència a que la substància blanca es preservi més.

Els miR-21, miR-199a-3p, miR-328 i miR-106a es van correlacionar positivament amb el número de lesions realçades amb gadolini. El miR-21 s'ha relacionat amb activació de les cèl·lules T i s'han observat nivells elevats en psoriasi (Meisgen *et al.* 2012; Sawant *et al.* 2013) i també en treballs previs en cèl·lules mononucleades de sang perifèrica de pacients amb EM remitent-recurrent (Fenoglio *et al.* 2011). Per la seva banda, el miR-199a-3p actua inhibint l'expressió de CD44, una molècula que ha demostrat tenir un patró protector en el desenvolupament del model animal d'EM, on els ratolins amb dèficit de CD44 mostren una clínica més agressiva (Flynn *et al.* 2013). També el miR-328 sembla estar relacionat amb l'expressió de CD44 (Boissonneault *et al.* 2009). Per la seva banda, s'ha descrit un paper del miR-106a en la regulació de IL-10, un

modulador clau del sistema immune (Lin *et al.* 2013) i s'ha proposat com a regulador de STAT3 que està implicat en vies inflamatòries (Zhang *et al.* 2013).

El miR-520c-3p es va mostrar associat a presentar més nombre de criteris de Barkhof i tendència a presentar més lesions cerebrals i lesions realçades amb gadolini. El clúster del miR-520 s'ha vist desregulat en diferents malalties (Iczkowski 2010; Golestaneh *et al.* 2012; Mazan-Mamczarz *et al.* 2014) i s'ha relacionat amb la molècula CD44 que té un paper important en la patogènia de l'EM i la EAE (Tuohy *et al.* 2004; Guan *et al.* 2011; Flynn *et al.* 2013).

L'expressió del miR-146a, relacionat prèviament amb EM (Fenoglio *et al.* 2011; Waschbisch *et al.* 2011), es va associar a pacients amb càrrega lesional més alta a la RM.

Tenint en compte les troballes globals d'aquest treball de tesi doctoral es pot suggerir que la regulació epigenètica mitjançant els microRNAs de les vies inflamatòries semblen ser les responsables de la patogènia de l'esclerosi múltiple en les formes clíniques més severes de la malaltia associades a la presència de bandes oligoclonals d'IgM lípidespecífiques en LCR. En concret, aquests pacients tenen una expressió incrementada d'alguns miRNAs que s'han implicat en aquestes vies inflamatòries, com són els miR-203, miR-520c-3p, miR-155, miR-142-3p i miR-106a.

5.8. LIMITACIONS

El treball que es presenta en aquesta tesi doctoral consisteix en un estudi pilot sobre la presència de miRNAs en el LCR de pacients amb EM, i més concretament, d'aquell subgrup de pacients amb BOCM_LE positives, que han estat associades a formes més agressives de la malaltia.

Aquest estudi ha permès identificar un miRNA (miRNA-106a) com a potencial biomarcador en LCR del diagnòstic d'EM, i un grup de miRNAs (miR-203, miR-520c-3p, miR-155, miR-142-3p i miR-106a) com a potencials biomarcadors en LCR de formes més agressives de la malaltia.

Les limitacions principals d'aquest treball de tesi doctoral es poden agrupar en:

1. Mida de la mostra

La mida de la mostra és reduïda atès que es tracta d'un estudi pilot.

2. Distribució geogràfica dels pacients

La distribució geogràfica dels pacients es limita a l'entorn de la província de Girona, fet que no permet descartar la influència de possibles factors ambientals i fins i tot genètics en els resultats obtinguts.

3. Característiques dels subjectes control

El grup de subjectes control d'aquest treball està format per pacients amb altres malalties neurològiques als quals, per motius diagnòstics, se'ls ha realitzat una punció lumbar. No són el que podria anomenar-se *subjectes control purs*, ja que l'obtenció de mostres de LCR d'aquest tipus de subjectes és molt complexa perquè cal obtenir la mostra a través d'una punció lumbar, una tècnica mitjanament agressiva, amb potencials efectes adversos i que no es realitza en subjectes sans si no hi ha una raó mèdica per realitzar-la. Aquesta és una limitació que acostuma a anar associada a tots els estudis on la mostra utilitzada és el LCR i és extremadament difícil trobar estudis realitzats amb un grup format per *subjectes control purs*.

Aquesta manca de *subjectes control purs* podria fer que l'expressió de diferents miRNAs fos similar entre pacients amb EM i pacients afectats d'altres malalties neurològiques amb afectació del SNC i, per tant, influir en els resultats obtinguts en aquest treball de tesi doctoral.

Per tal de minimitzar l'efecte d'aquests subjectes control no sans, es van escollir individus amb malalties de patogènia menys inflamatòria per a la cohort d'identificació. Per altra banda, el grup control de la cohort de validació estava format per subjectes amb diverses malalties de diferent patogènia per tal de diluir l'efecte dels miRNAs desregulats en cadascuna de les diferents malalties.

4. Temps de seguiment de la cohort

El temps de seguiment de la cohort de pacients amb EM analitzada en aquest treball ha estat de curta durada (12 mesos). Aquest fet podria explicar els pocs resultats obtinguts referents a l'associació de l'expressió de miRNAs amb diferents variables clíniques i radiològiques dels pacients.

5.9. PERSPECTIVES DE FUTUR

Aquest estudi pilot ha permès iniciar una nova línia d'investigació en el nostre grup de recerca sobre el paper dels miRNAs en l'EM.

En aquest sentit, les perspectives de futur que es plantegen sobre aquesta línia de recerca i com a continuació d'aquest treball de tesi doctoral són:

1. Ampliació de la mida de la mostra

A l'inici d'aquest estudi pilot, el nombre de mostres de les que disposàvem a la col·lecció de mostres biològiques del grup de recerca era reduït, fet que ens va limitar el nombre de pacients a incloure en l'estudi. Però la recollida de mostres ha continuat, i actualment la col·lecció conté mostres de més de 200 pacients, la qual cosa ens permetrà en el futur validar aquests resultats en un nombre més ampli de pacients.

2. Validació dels resultats en altres cohorts

Es realitzarà una validació dels resultats obtinguts en aquest treball en d'altres cohorts de pacients d'altres grups col·laboradors per tal de descartar que aquests resultats actuals no siguin específics de la població analitzada o influenciats per factors ambientals o genètics de l'entorn immediat.

3. Obtenció de mostres de subjectes control

Malgrat la necessitat de realitzar una punció lumbar per obtenir una mostra, l'estudi del LCR és molt important en neurologia i ens permet obtenir una informació molt valuosa i aprofundir en el coneixement tant de la fisiologia normal del SNC com de la patogènia de les diferents malalties neurològiques. Tot i que la tècnica de la punció lumbar no està exempta de potencials efectes adversos, aquest són poc freqüents i la majoria d'ells són transitoris i d'intensitat lleu.

Per tal de millorar la qualitat de les mostres control utilitzats per als nostres estudis, hem iniciat una col·laboració amb el Servei d'Anestèsia del nostre

centre per coordinar la recollida de mostres de LCR en aquells individus al que se'ls ha de realitzar una intervenció quirúrgica de traumatologia o d'urologia i, per aquest motiu, se'ls ha d'administrar anestèsia peridural. L'objectiu consisteix en recollir mostres de LCR de pacients que no pateixin cap malaltia neurològica i que, per tant, poden presentar unes característiques de LCR més semblant a *subjectes control purs*.

4. Seguiment longitudinal de la cohort

La cohort de pacients se seguirà de forma prospectiva tant des del punt de vista clínic com radiològic i s'analitzarà l'associació de l'expressió dels miRNAs amb les diferents variables clíniques i radiològiques als 2 i 5 anys (com a mínim). D'aquesta manera es podrà valorar si els miRNAs suggerits com a potencials biomarcadors de pronòstic confirmen el seu paper a migllarg termini.

5. Estudi de miRNAs en diferents formes clíniques d'EM

En aquest treball s'ha estudiat l'expressió de miRNAs en LCR en pacients amb formes remitent-recurrent d'EM i síndromes clínicament aïllades amb criteris de disseminació en espai per RM.

En el futur immediat es vol estudiar també l'expressió de miRNAs en el LCR de pacients amb formes clíniques progressives de la malaltia (EMSP i EMPP) per analitzar el paper dels miRNAs com a potencials biomarcadors de pronòstic en aquestes formes d'EM i, també, per intentar identificar si existeix algun perfil de miRNAs que pogués ésser biomarcador de forma clínic d'EM. Si això fos així, seria una informació molt valuosa que podria tenir implicacions diagnòstiques, pronòstiques i de maneig clínic i terapèutic en la pràctica clínic.

6. Estudi de miRNAs com a biomarcadors de resposta terapèutica

Un altre tipus d'estudi que es pretén realitzar és l'anàlisi de miRNAs en LCR de pacients amb EM tractats amb diferents fàrmacs immunomoduladors.

Com ja s'ha comentat, en l'EM s'utilitzen diferents teràpies; sortosament, en els darrers anys s'han desenvolupat diferents tractaments que han demostrat ésser eficaços per reduir l'activitat de la malaltia. No obstant això, la resposta terapèutica i el perfil d'efectes adversos dels diferents tractaments és variable i encara existeix un bon grup de pacients que tenen una resposta terapèutica subòptima. Diversos treballs que s'han anat realitzant en els darrers anys, suggereixen que l'epigenètica –i per tant, el paper dels miRNAs, entre d'altres– pot explicar part d'aquesta variabilitat individual en la resposta i tolerància als diversos i diferents tractaments.

L'objectiu a llarg termini és aconseguir una medicina personalitzada, que significa identificar el millor tractament, a la dosi més adequada, amb els menors efectes adversos i amb el menor cost, per a un determinat pacient en el moment precís de la fase de la malaltia en què es troba.

La identificació de miRNAs com a potencials biomarcadors de resposta terapèutica en EM ha estat, fins ara, molt poc estudiada. L'aprofundiment en aquesta línia de recerca i els resultats que se'n puguin derivar tenen evidents implicacions per al maneig dels pacients i per a l'estructuració de l'aproximació terapèutica i sanitària de la malaltia.

7. Estudi de miRNAs en sèrum de pacients amb EM

El tipus de mostra biològica a estudiar és important, entre d'altres raons, per la facilitat al seu accés. El LCR s'ha d'obtenir mitjançant una punció lumbar, que és una tècnica mitjanament agressiva i incòmode, fet que dificulta l'obtenció de mostres seriades en un mateix pacient. La utilització de mostres de sang o sèrum per a l'anàlisi de miRNAs, o d'altres biomarcadors moleculars, facilitaria l'obtenció de mostres i el seu estudi longitudinal en el temps. Altres autors han estudiat el paper dels miRNAs i d'altres molècules en sang perifèrica tant en l'EM com en d'altres malalties neurodegeneratives. En futurs projectes en pacients amb EM s'estudiarà la relació que existeix entre la desregulació dels miRNAs en el LCR i la que existeix en la sang o el sèrum, i la seva evolució a nivell perifèric al llarg del temps.

7. CONCLUSIONS

Les conclusions derivades de l'estudi realitzat en aquesta tesi doctoral són:

- 1- Els microRNAs poden ésser detectats en el líquid cefaloraquidi dels pacients amb esclerosi múltiple i la seva anàlisi pot ser una eina útil per a l'estudi de factors diagnòstics i pronòstics d'aquesta malaltia.
- 2- El miR-106a es proposa com a potencial biomarcador en líquid cefaloraquidi del diagnòstic d'esclerosi múltiple.
- 3- Els miR-203, miR-520c-3p, miR-155, miR-142-3p i miR-106a es proposen com a potencials biomarcadors en líquid cefaloraquidi associats a la presència de bandes oligoclonals d'IgM lípidespecífiques que s'han relacionat amb formes més agressives d'esclerosi múltiple remitent-recurrent o síndromes clínicament aïllades amb criteris de disseminació en espai per ressonància magnètica.
- 4- L'expressió d'alguns microRNAs en líquid cefaloraquidi (miR-203, miR-21, miR-140, miR-126, miR-520c-3p, miR-191, miR-155, miR-146a, miR-142-3p, miR-199a-3p, miR-378, miR-365, miR-19a, miR-328, miR-106a) s'associen a algunes variables clíniques (com la topografia del brot) i radiològiques (com el nombre de criteris de Barkhof, nombre de lesions cranials, nombre de lesions realçades amb gadolini, nombre de lesions hipointenses en T1, atròfia cerebral) dels pacients amb esclerosi múltiple en fases inicials de la malaltia.

7. REFERÈNCIES BIBLIOGRÀFIQUES

- Agosta F, Filippi M. MRI of spinal cord in multiple sclerosis. *J Neuroimaging*. 2007;17 Suppl 1:46S–49S.
- Agència d'Informació, Avaluació i Qualitat en Salut. Guía de práctica clínica sobre la atención a las personas con esclerosis múltiple. Barcelona: AIAQS; 2012.
http://www20.gencat.cat/docs/canalsalut/Home%20Canal%20Salut/Professionals/guies_practica_clinica/03_directori/Documents/estatics/gpc_esclerosis_multiple_aiaqs2012es_completa.pdf. [Consulta: 23 juny 2014].
- Allison RS, Millar JH. Prevalence of disseminated sclerosis in Northern Ireland. *Ulster Med J*. 1954 Mar;23(Suppl. 2):1–27.
- Álvarez-Cermeño J, Arroyo R, Arbizu T. Guía oficial para el diagnóstico y tratamiento de la esclerosis múltiple. Barcelona: Prous Sci; 2007.
- Amarilyo G, La Cava A. miRNA in systemic lupus erythematosus. *Clin Immunol*. 2012 Jul;144(1):26–31.
- Amato MP, Ponziani G, Rossi F, Liedl CL, Stefanile C, Rossi L. Quality of life in multiple sclerosis: the impact of depression, fatigue and disability. *Mult Scler*. 2001 Oct;7(5):340–4.
- Amato MP, Ponziani G, Siracusa G, Sorbi S. Cognitive Dysfunction in Early-Onset Multiple Sclerosis. *Arch Neurol*. 2001 Oct;58(10):1602-6.
- 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 Feb;52(2):168-72.
- Andersson M, Alvarez-Cermeño J, Bernardi G, Cogato I, Fredman P, Frederiksen J, et al. Cerebrospinal fluid in the diagnosis of multiple sclerosis: a consensus report. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. 1994 Aug;57(8):897-

902. Review. Erratum in: *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. 2011 Jul;82(7):826.
- Andlin-Sobocki P, Jönsson B, Wittchen H-U, Olesen J. Cost of disorders of the brain in Europe. *Eur J Neurol*. 2005 Jun;12 Suppl 1:1-27.
- 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 Mar;13(2):262-4.
- Aronson KJ. Quality of Life Among Persons with Multiple Sclerosis and their Caregivers. *Neurology*. 1997 Jan;48(1):74-80.
- Ascherio A, Munger KL. Environmental risk factors for multiple sclerosis. Part I: the role of infection. *Ann Neurol*. 2007 Apr;61(4):288-99.
- Ashburner J, Friston KJ. Unified segmentation. *Neuroimage*. 2005 Jul;26(3):839-51.
- Atkinson AJ, Colburn WA, DeGruttola VG, DeMets DL, Downing GJ, Hoth DF, et al. Biomarkers and surrogate endpoints: preferred definitions and conceptual framework. *Clin Pharmacol Ther*. 2001 Mar;69(3):89-95.
- Banks WA. Developing drugs that can cross the blood-brain barrier: applications to Alzheimer's disease. *BMC Neurosci*. 2008 Dec 10;9 Suppl 3:S2.
- Baranzini SE, Hauser SL. Large-scale gene-expression studies and the challenge of multiple sclerosis. *Genome Biol*. 2002 Sep 16;3(10):reviews1027.
- Baranzini SE, Nickles D. Genetics of multiple sclerosis: swimming in an ocean of data. *Curr Opin Neurol*. 2012 Jun;25(3):239-45.
- Barkhof F, Filippi M, Miller DH, Scheltens P, Campi A, Polman CH, et al. Comparison of MRI criteria at first presentation to predict conversion to clinically definite multiple sclerosis. *Brain*. 1997 Nov;120(11):2059-69.

- Bartel DP. MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function. *Cell*. 2004;116(2):281–97.
- Battaglini M, Jenkinson M, De Stefano N. Evaluating and reducing the impact of white matter lesions on brain volume measurements. *Hum Brain Mapp*. 2012 Sep;33(9):2062–71.
- Beecham AH, Patsopoulos NA, Xifara DK, Davis MF, Kempainen A, Cotsapas C, et al. Analysis of immune-related loci identifies 48 new susceptibility variants for multiple sclerosis. *Nat Genet*. Nature Publishing Group; 2013 Nov 29;45(11):1353–60.
- Benito-León J, Martín E, Vela L, Villar ME, Felgueroso B, Marrero C, et al. Multiple sclerosis in Móstoles, central Spain. *Acta Neurol Scand*. 1998 Oct 22;98(4):238–42.
- Benito-León J, Morales JM, Rivera-Navarro J. Health-related quality of life and its relationship to cognitive and emotional functioning in multiple sclerosis patients. *Eur J Neurol*. 2002 Sep;9(5):497–502.
- Bertolotto A, Gilli F. Interferon-beta responders and non-responders. A biological approach. *Neurol Sci*. 2008 Sep;29 Suppl 2:S216-7.
- Boissonneault V, Plante I, Rivest S, Provost P. MicroRNA-298 and microRNA-328 regulate expression of mouse beta-amyloid precursor protein-converting enzyme 1. *J Biol Chem*. 2009 Jan 23;284(4):1971–81.
- Boscá I, Magraner MJ, Coret F, Álvarez-Cermeño JC, Simó-Castelló M, Villar LM, et al. The risk of relapse after a clinically isolated syndrome is related to the pattern of oligoclonal bands. *J Neuroimmunol*. 2010;226(1):143–6.
- Bosca I, Villar LM, Coret F, Magraner MJ, Simó-Castelló M, Alvarez-Cermeño JC, et al. Response to interferon in multiple sclerosis is related to lipid-specific oligoclonal IgM bands. *Mult Scler*. 2010 Jul;16(7):810–5.

- Briasoulis A, Tousoulis D, Vogiatzi G, Siasos G, Papageorgiou N, Oikonomou E, et al. MicroRNAs: Biomarkers for cardiovascular disease in patients with diabetes mellitus. *Curr Top Med Chem*. 2013 Jan;13(13):1533–9.
- Brosnan CF, Raine CS. Mechanisms of Immune Injury in Multiple Sclerosis. *Brain Pathol*. 1996 Jul;6(3):243–57.
- Brosnan CF, Raine CS. The astrocyte in multiple sclerosis revisited. *Glia*. 2013 Apr;61(4):453–65.
- Brück W. The pathology of multiple sclerosis is the result of focal inflammatory demyelination with axonal damage. *J Neurol*. 2005 Nov;252 Suppl v3–9.
- Budde H, Schmitt S, Fitzner D, Opitz L, Salinas-Riester G, Simons M. Control of oligodendroglial cell number by the miR-17-92 cluster. *Development*. 2010 Jul;137(13):2127–32.
- Bufill E, Blesa R, Galan I, Dean G. Prevalence of multiple sclerosis in the region of Osona, Catalonia, northern Spain. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. 1995 May;58(5):577–81.
- Burgueño MJ, García-Bastos JL, González-Buitrago JM. Las curvas ROC en la evaluación de las pruebas diagnósticas. *Med Clin (Barc)*. 1995 May 6;104(17):661–70.
- Burton JM, Kimball S, Vieth R, Bar-Or A, Dosch H-M, Cheung R, et al. A phase I/II dose-escalation trial of vitamin D3 and calcium in multiple sclerosis. *Neurology*. 2010 Jun 8;74(23):1852–9.
- Bushati N, Cohen SM. MicroRNAs in neurodegeneration. *Curr Opin Neurobiol*. 2008 Jun;18(3):292–6.
- Cabezas M, Oliver A, Roura E, Freixenet J, Vilanova JC, Ramió-Torrentà L, et al. Automatic multiple sclerosis lesion detection in brain MRI by FLAIR thresholding. *Comput Methods Programs Biomed*. 2014 Jul;115(3):147–61.

- Cao X, Yeo G, Muotri AR, Kuwabara T, Gage F. Noncoding RNAs in the mammalian central nervous system. *Annu Rev Neurosci.* 2006 Jan;29:77–103.
- Carlsen AL, Schetter AJ, Nielsen CT, Lood C, Knudsen S, Voss A, et al. Circulating microRNA expression profiles associated with systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum.* 2013;65(5):1324–34.
- Casado V, Martínez-Yélamos S, Martínez-Yélamos A, Carmona O, Alonso L, Romero L, et al. Direct and indirect costs of Multiple Sclerosis in Baix Llobregat (Catalonia, Spain), according to disability. *BMC Health Serv Res.* 2006 Nov 1;6:143.
- Chang A, Smith MC, Yin X, Fox RJ, Staugaitis SM, Trapp BD. Neurogenesis in the chronic lesions of multiple sclerosis. *Brain.* 2008 Sep;131(9):2366–75.
- Chard DT, Griffin CM, Parker GJM, Kapoor R, Thompson AJ, Miller DH. Brain atrophy in clinically early relapsing-remitting multiple sclerosis. *Brain.* 2002;125(2):327–37.
- Chard DT, Jackson JS, Miller DH, Wheeler-Kingshott CAM. Reducing the impact of white matter lesions on automated measures of brain gray and white matter volumes. *J Magn Reson Imaging.* 2010 Jul;32(1):223–8.
- Comabella M, Fernández M, Martín R, Rivera-Vallvé S, Borrás E, Chiva C, et al. Cerebrospinal fluid chitinase 3-like 1 levels are associated with conversion to multiple sclerosis. *Brain.* 2010;133(4):1082–93.
- Compston A, Coles A. Multiple sclerosis. *Lancet.* 2008;372:1502–17.
- Compston A, McDonald IR, Noseworthy J, Lassmann H, Miller DH, Smith KJ, et al. *McAlpine's multiple sclerosis.* 4a ed. London: Churchill Livingstone; 2005.
- Confavreux C, Vukusic S, Moreau T, Adeleine P. Relapses and progression of disability in multiple sclerosis. *N Engl J Med.* 2000;343(20):1430–8.

- Confavreux C, Vukusic S. Natural history of multiple sclerosis: a unifying concept. *Brain*. 2006 Mar;129(3):606–16.
- Confavreux C, Vukusic S, Adeleine P. Early clinical predictors and progression of irreversible disability in multiple sclerosis: an amnesic process. *Brain*. 2003 Apr;126(4):770-82.
- Cook SD. *Handbook of Multiple Sclerosis*. 3a ed. New York: Marcel Dekker; 2001.
- Cox MB, Cairns MJ, Gandhi KS, Carroll AP, Moscovis S, Stewart GJ, et al. MicroRNAs miR-17 and miR-20a inhibit T cell activation genes and are under-expressed in MS whole blood. *PLoS One*. 2010 Aug;5(8):e12132.
- Czech MP. MicroRNAs as therapeutic targets. *N Engl J Med*. 2006 Mar 16;354(11):1194-5.
- Dalton CM, Chard DT, Davies GR, Miszkiel KA, Altmann DR, Fernando K, et al. Early development of multiple sclerosis is associated with progressive grey matter atrophy in patients presenting with clinically isolated syndromes. *Brain*. 2004;127(5):1101–7.
- Danborg PB, Simonsen AH, Waldemar G, Heegaard NHH. The potential of microRNAs as biofluid markers of neurodegenerative diseases - a systematic review. *Biomarkers*. 2014 Mar 29;5804:1–10.
- Davies GR, Ramió-Torrentà L, Hadjiprocopis A, Chard DT, Griffin CM, Rashid W, Barker GJ, Kapoor R, Thompson AJ, Miller DH. Evidence for grey matter MTR abnormality in minimally disabled patients with early relapsing-remitting multiple sclerosis. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. 2004 Jul;75(7):998-1002.
- De Santis G, Ferracin M, Biondani a, Caniatti L, Rosaria Tola M, Castellazzi M, et al. Altered miRNA expression in T regulatory cells in course of multiple sclerosis. *J Neuroimmunol*. 2010 Sep 14;226(1-2):165-71.

- Decret 406/2006, de 24 d'octubre, pel qual es regulen els requisits i el procediment d'acreditació dels comitès d'ètica d'investigació clínica. (DOGC [en línia], núm 4748, 26-10-2006, pàg. 44904-44909). <<http://portaldogc.gencat.cat/utillsEADOP/PDF/4748/552754.pdf>>. [Consulta: 23 juny 2014].
- Degenhardt A, Ramagopalan S V, Scalfari A, Ebers GC. Clinical prognostic factors in multiple sclerosis: a natural history review. *Nat Rev Neurol*. 2009;5(12):672-82.
- Dobson R, Ramagopalan S, Davis A, Giovannoni G. Cerebrospinal fluid oligoclonal bands in multiple sclerosis and clinically isolated syndromes: a meta-analysis of prevalence, prognosis and effect of latitude. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. 2013 Aug;84(8):909-14.
- Du C, Liu C, Kang J, Zhao G, Ye Z, Huang S, et al. MicroRNA miR-326 regulates TH-17 differentiation and is associated with the pathogenesis of multiple sclerosis. *Nat Immunol*. 2009 Dec;10(12):1252-9.
- Dyment DA, Ebers GC, Sadovnick AD. Genetics of multiple sclerosis. *Lancet Neurol*. 2004 Feb;3(2):104-10.
- Eacker SM, Dawson TM, Dawson VL. Understanding microRNAs in neurodegeneration. *Nat Rev Neurosci*. 2009 Dec;10(12):837-41.
- Ebers GC, Yee IM, Sadovnick AD, Duquette P. Conjugal multiple sclerosis: population-based prevalence and recurrence risks in offspring. Canadian Collaborative Study Group. *Ann Neurol*. 2000 Dec;48(6):927-31.
- Ebert MS, Sharp PA. MicroRNA sponges: progress and possibilities. *RNA*. 2010 Nov 1;16(11):2043-50.
- Elhami SR, Mohammad K, Sahraian MA, Eftekhari H. A 20-year incidence trend (1989-2008) and point prevalence (March 20, 2009) of multiple sclerosis in Tehran, Iran: a population-based study. *Neuroepidemiology*. 2011;36(3):141-7.

- Elmén J, Lindow M, Schütz S, Lawrence M, Petri A, Obad S, Lindholm M, Hedtjärn M, Hansen HF, Berger U, Gullans S, Kearney P, Sarnow P, Straarup EM, Kauppinen S. LNA-mediated microRNA silencing in non-human primates. *Nature*. 2008 Apr 17;452(7189):896-9.
- Emery B. Regulation of oligodendrocyte differentiation and myelination. *Science*. 2010 Nov 5;330(6005):779-82.
- Escobar T, Yu CR, Muljo SA, Egwuagu CE. STAT3 activates miR-155 in Th17 cells and acts in concert to promote experimental autoimmune uveitis. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2013;54(6):4017-25.
- Esteller M. Non-coding RNAs in human disease. *Nat Rev Genet*. 2011 Nov 18;12(12):861-74.
- Fenoglio C, Cantoni C, De Riz M, Ridolfi E, Cortini F, Serpente M, Villa C, Comi C, Monaco F, Mellesi L, Valzelli S, Bresolin N, Galimberti D, Scarpini E. Expression and genetic analysis of miRNAs involved in CD4+ cell activation in patients with multiple sclerosis. *Neurosci Lett*. 2011 Oct 17;504(1):9-12.
- Fenoglio C, Ridolfi E, Cantoni C, De Riz M, Bonsi R, Serpente M, et al. Decreased circulating miRNA levels in patients with primary progressive multiple sclerosis. *Mult Scler*. 2013 Dec;19(14):1938-42.
- Fernández Ó, Arroyo-González R, Rodríguez-Antigüedad A, García-Merino JA, Comabella M, Villar LM, et al. Biomarcadores en esclerosis múltiple. *Rev Neurol*. 2013 Apr 1;56(7):375-90.
- Fernández O, Fernández V, Guerrero M, León A, López-Madróna JC, Alonso A, et al. Multiple sclerosis prevalence in Malaga, Southern Spain estimated by the capture-recapture method. *Mult Scler*. 2012 Mar;18(3):372-6.
- Fernández O, Fernández V, Guerrero M. *Esclerosis Múltiple*. 3rd ed. Italy: Momento Médico; 2011.

- Fernández O, Luque G, San Román C, Bravo M, Dean G. The prevalence of multiple sclerosis in the Sanitary District of Vélez-Málaga, southern Spain. *Neurology*. 1994 Mar;44(3 Pt 1):425-9.
- Ferraro D, Simone AM, Bedin R, Galli V, Vitetta F, Federzoni L, et al. Cerebrospinal fluid oligoclonal IgM bands predict early conversion to clinically definite multiple sclerosis in patients with clinically isolated syndrome. *J Neuroimmunol*. 2013;257(1-2):76-81.
- Feuillet L, Reuter F, Audoin B, Malikova I, Barrau K, Cherif AA, et al. Early cognitive impairment in patients with clinically isolated syndrome suggestive of multiple sclerosis. *Mult Scler*. 2007 Jan 1;13(1):124-7.
- Fiedler J, Thum T. MicroRNAs in myocardial infarction. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2013 Feb ;33(2):201-5.
- Filippi M, Rocca MA. MR imaging of multiple sclerosis. *Radiology*. 2011 Jun;259(3):659-81.
- Filková M, Jünger A, Gay RE, Gay S. MicroRNAs in rheumatoid arthritis: potential role in diagnosis and therapy. *BioDrugs*. 2012 Jun 1;26(3):131-41.
- Fischer JE, Bachmann LM, Jaeschke R. A readers' guide to the interpretation of diagnostic test properties: clinical example of sepsis. *Intensive Care Med*. 2003 Jul;29(7):1043-51
- Fisher E, Rudick RA, Simon JH, Cutter G, Baier M, Lee JC, Miller D, Weinstock-Guttman B, Mass MK, Dougherty DS, Simonian NA. Eight-year follow-up study of brain atrophy in patients with MS. *Neurology*. 2002 Nov 12;59(9):1412-20.
- Fisniku LK, Brex PA, Altmann DR, Miszkiel KA, Benton CE, Lanyon R, et al. Disability and T2 MRI lesions: a 20-year follow-up of patients with relapse onset of multiple sclerosis. *Brain*. 2008 Mar;131(3):808-17.

- Flynn KM, Michaud M, Madri JA. CD44 deficiency contributes to enhanced experimental autoimmune encephalomyelitis: A role in immune cells and vascular cells of the blood-brain barrier. *Am J Pathol.* 2013;182(4):1322–36.
- Forsheew T, Murtaza M, Parkinson C, Gale D, Tsui DW, Kaper F, Dawson SJ, Piskorz AM, Jimenez-Linan M, Bentley D, Hadfield J, May AP, Caldas C, Brenton JD, Rosenfeld N. Noninvasive identification and monitoring of cancer mutations by targeted deep sequencing of plasma DNA. *Sci Transl Med.* 2012 May 30;4(136):136ra68.
- Freedman MS, Thompson EJ, Deisenhammer F, Giovannoni G, Grimsley G, Keir G, et al. Recommended standard of cerebrospinal fluid analysis in the diagnosis of multiple sclerosis: a consensus statement. *Arch Neurol.* American Medical Association; 2005 Jun 1;62(6):865–70.
- Fuhr P, Borggreffe-Chappuis A, Schindler C, Kappos L. Visual and motor evoked potentials in the course of multiple sclerosis. *Brain.* 2001 Nov;124(Pt 11):2162-8.
- Furer V, Greenberg JD, Attur M, Abramson SB, Pillinger MH. The role of microRNA in rheumatoid arthritis and other autoimmune diseases. *Clin Immunol.* 2010 Jul;136(1):1–15.
- Gama PD, Machado Ldos R, Livramento JA, Gomes HR, Adoni T, Lino AM, et al. Study of oligoclonal bands restricted to the cerebrospinal fluid in multiple sclerosis patients in the city of São Paulo. *Arq Neuropsiquiatr.* 2009 Dec;67(4):1017-22.
- Gandhi R, Healy B, Gholipour T, Egorova S, Musallam A, Hussain MS, et al. Circulating microRNAs as biomarkers for disease staging in multiple sclerosis. *Ann Neurol.* 2013 Jun;73(6):729–40.
- García-Barragán N, Villar LM, Espiño M, Sádaba MC, González-Porqué P, Alvarez-Cermeño JC. Multiple sclerosis patients with anti-lipid oligoclonal IgM

- show early favourable response to immunomodulatory treatment. *Eur J Neurol.* 2009 Mar ;16(3):380–5.
- Gelineau-Morel R, Tomassini V, Jenkinson M, Johansen-Berg H, Matthews PM, Palace J. The effect of hypointense white matter lesions on automated gray matter segmentation in multiple sclerosis. *Hum Brain Mapp.* 2012 Dec;33(12):2802–14.
- Giorgio A, Battaglini M, Smith SM, De Stefano N. Brain atrophy assessment in multiple sclerosis: importance and limitations. *Neuroimaging Clin N Am.* 2008 Nov;18(4):675–686, xi.
- Golestaneh AF, Atashi A, Langroudi L, Shafiee A, Ghaemi N, Soleimani M. miRNAs expressed differently in cancer stem cells and cancer cells of human gastric cancer cell line MKN-45. *Cell Biochem Funct.* 2012 Jul;30(5):411–8.
- Gordon-Lipkin E, Chodkowski B, Reich DS, Smith SA, Pulicken M, Balcer LJ, et al. Retinal nerve fiber layer is associated with brain atrophy in multiple sclerosis. *Neurology.* 2007;69(16):1603–9.
- Gounaris-Shannon S, Chevassut T. The Role of miRNA in Haematological Malignancy. *Bone Marrow Res.* 2013 Jan;2013:2013:269107.
- Guan H, Nagarkatti PS, Nagarkatti M. CD44 Reciprocally regulates the differentiation of encephalitogenic Th1/Th17 and Th2/regulatory T cells through epigenetic modulation involving DNA methylation of cytokine gene promoters, thereby controlling the development of experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Immunol.* 2011 Jun 15;186(12):6955–64.
- Guay C, Regazzi R. Circulating microRNAs as novel biomarkers for diabetes mellitus. *Nat Rev Endocrinol.* 2013 Sep;9(9):513–21.

- Guerau-de-Arellano M, Smith KM, Godlewski J, Liu Y, Winger R, Lawler SE, et al. Micro-RNA dysregulation in multiple sclerosis favours pro-inflammatory T-cell-mediated autoimmunity. *Brain*. 2011 Dec;134(Pt 12):3578–89.
- Gunnarsson M, Malmeström C, Axelsson M, Sundström P, Dahle C, Vrethem M, et al. Axonal damage in relapsing multiple sclerosis is markedly reduced by natalizumab. *Ann Neurol*. 2011 Jan 8;69(1):83–9.
- Haghikia A, Haghikia A, Hellwig K, Baraniskin A, Holzmann A, Décard BF, Thum T, Gold R. Regulated microRNAs in the CSF of patients with multiple sclerosis: a case-control study. *Neurology*. 2012 Nov 27;79(22):2166-70.
- Hampel H, Trojanowski JQ, Ziemann U, Wahl M, Hattingen E, Tumani H. Development of biomarkers for multiple sclerosis as a neurodegenerative disorder. *Prog Neurobiol*. 2011;95(4):670–85.
- Han L, Witmer PD, Casey E, Valle D, Sukumar S. DNA methylation regulates MicroRNA expression. *Cancer Biol Ther*. 2007 Aug;6(8):1284-8.
- Handel A, Williamson A, Disanto G. An updated meta-analysis of risk of multiple sclerosis following infectious mononucleosis. *PLoS One*. 2010 Sep 1;5(9). pii: e12496.
- Harrer A, Tumani H, Niendorf S, Lauda F, Geis C, Weishaupt A, et al. Cerebrospinal fluid parameters of B cell-related activity in patients with active disease during natalizumab therapy. *Mult Scler*. 2013 Aug 1;19(9):1209–12.
- Hauptman N, Glavac D. MicroRNAs and long non-coding RNAs: prospects in diagnostics and therapy of cancer. *Radiol Oncol*. 2013 Jan;47(4):311–8.
- Hauser SL, Oksenberg JR. The neurobiology of multiple sclerosis: genes, inflammation, and neurodegeneration. *Neuron*. 2006 Oct 5;52(1):61-76.
- Hauser SL, Chan JR, Oksenberg JR. Multiple sclerosis: Prospects and promise. *Ann Neurol*. 2013 Sep;74(3):317–27.

- He L, Hannon GJ. MicroRNAs: small RNAs with a big role in gene regulation. *Nat Rev Genet.* 2004 Jul 5(7):522–31.
- Hecker M, Thamilarasan M, Koczan D, Schröder I, Flechtner K, Freiesleben S, et al. MicroRNA expression changes during interferon-beta treatment in the peripheral blood of multiple sclerosis patients. *Int J Mol Sci.* 2013 Jan;14(8):16087–110.
- Hezova R, Slaby O, Faltejskova P, Mikulkova Z, Buresova I, Raja KRM, et al. microRNA-342, microRNA-191 and microRNA-510 are differentially expressed in T regulatory cells of type 1 diabetic patients. *Cell Immunol.* 2010 Jan;260(2):70–4.
- Hoffmann T, Sonkoly E, Homey B, Scheckenbach K, Gwosdz C, Bas M, et al. Aberrant cytokine expression in serum of patients with adenoid cystic carcinoma and squamous cell carcinoma of the head and neck. *Head Neck.* 2007;29(5):472–8.
- Huang B, Zhao J, Lei Z, Shen S, Li D, Shen GX, Zhang GM, Feng ZH. miR-142-3p restricts cAMP production in CD4+CD25- T cells and CD4+CD25+ TREG cells by targeting AC9 mRNA. *EMBO Rep.* 2009 Feb;10(2):180-5.
- Huang J, Wang Y, Guo Y, Sun S. Down-regulated microRNA-152 induces aberrant DNA methylation in hepatitis B virus-related hepatocellular carcinoma by targeting DNA methyltransferase 1. *Hepatology.* 2010 Jul;52(1):60–70.
- IBM Corp. Released 2012. IBM SPSS Statistics for Windows, Version 21.0. Armonk, NY:IBM Corp, 2012.
- Iczkowski K a. Cell adhesion molecule CD44: its functional roles in prostate cancer. *Am J Transl Res.* 2010 Jan;3(1):1–7.
- Im H-I, Kenny PJ. MicroRNAs in neuronal function and dysfunction. *Trends Neurosci.* 2012 May 5;35(5):325–34.

- Jackson AL, Linsley PS. Recognizing and avoiding siRNA off-target effects for target identification and therapeutic application. *Nat Rev Drug Discov.* 2010 Jan;9(1):57–67.
- Jakovcevski M, Akbarian S. Epigenetic mechanisms in neurological disease. *Nat Med.* 2012 Aug;18(8):1194-204.
- Jernås M, Malmeström C, Axelsson M, Nookaew I, Wadenvik H, Lycke J, et al. MicroRNA regulate immune pathways in T-cells in multiple sclerosis (MS). *BMC Immunol.* 2013 Jul 29;14:32.
- Jin XF, Wu N, Wang L, Li J. Circulating MicroRNAs: A Novel Class of Potential Biomarkers for Diagnosing and Prognosing Central Nervous System Diseases. *Cell Mol Neurobiol.* 2013 Jul;33(5):601-13.
- Jongen PJH, Lycklama a Nijeholt G, Lamers KJB, Doesburg WH, Barkhof F, Lemmens WA, et al. Cerebrospinal fluid IgM index correlates with cranial MRI lesion load in patients with multiple sclerosis. *Eur Neurol.* 2007;58(2):90–5.
- Joyce CE, Zhou X, Xia J, Ryan C, Thrash B, Menter A, et al. Deep sequencing of small RNAs from human skin reveals major alterations in the psoriasis miRNAome. *Hum Mol Genet.* 2011;20(20):4025–40.
- Jung P, Beyerle A, Ziemann U. Multimodal evoked potentials measure and predict disability progression in early relapsing-remitting multiple sclerosis. *Mult Scler.* 2008 May;14(4):553-6.
- Junker A, Hohlfeld R, Meinel E. The emerging role of microRNAs in multiple sclerosis. *Nat Rev Neurol.* 2011 Jan;7(1):56-9.
- Junker A, Krumbholz M, Eisele S, Mohan H, Augstein F, Bittner R, et al. MicroRNA profiling of multiple sclerosis lesions identifies modulators of the regulatory protein CD47. *Brain.* 2009 Dec;132(Pt 12):3342–52.

- Kappos L, Moeri D, Radue EW, Schoetzau A, Schweikert K, Barkhof F, et al. Predictive value of gadolinium-enhanced magnetic resonance imaging for relapse rate and changes in disability or impairment in multiple sclerosis: a meta-analysis. Gadolinium MRI Meta-analysis Group. *Lancet*. 1999 Mar 20;353(9157):964–9.
- Katsavos S, Anagnostouli M. Biomarkers in Multiple Sclerosis: An Up-to-Date Overview. *Mult Scler Int*. 2013;2013:340508.
- Keller A, Leidinger P, Lange J, Borries A, Schroers H, Scheffler M, Lenhof HP, Ruprecht K, Meese E. Multiple sclerosis: microRNA expression profiles accurately differentiate patients with relapsing-remitting disease from healthy controls. *PLoS One*. 2009 Oct 13;4(10):e7440.
- Keller A, Leidinger P, Steinmeyer F, Stähler C, Franke A, Hemmrich-Stanisak G, et al. Comprehensive analysis of microRNA profiles in multiple sclerosis including next-generation sequencing. *Mult Scler*. 2014 Mar;20(3):295-303.
- Kim GH. MicroRNA regulation of cardiac conduction and arrhythmias. *Transl Res*. 2013 May;161(5):381–92.
- Kobelt G, Berg J, Lindgren P, Fredrikson S, Jönsson B. Costs and quality of life of patients with multiple sclerosis in Europe. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. 2006a Aug 1;77(8):918–26.
- Kobelt G, Berg J, Lindgren P, Izquierdo G, Sánchez-Soliño O, Pérez-Miranda J, et al. Costs and quality of life of multiple sclerosis in Spain. *Eur J Health Econ*. 2006b Sep;7 Suppl 2:S65–74.
- Koch MW, Metz LM, Kovalchuk O. Epigenetics and miRNAs in the diagnosis and treatment of multiple sclerosis. *Trends Mol Med*. 2013 Jan;19(1):23–30.
- Kolshus E, Dalton VS, Ryan KM, McLoughlin DM. When less is more - microRNAs and psychiatric disorders. *Acta Psychiatr Scand*. 2014 Apr;129(4):241–56.

- Kong W, Zhao JJ, He L, Cheng JQ. Strategies for profiling microRNA expression. *J Cell Physiol.* 2009 Jan;218(1):22-5.
- Kosaka N, Yoshioka Y, Hagiwara K, Tominaga N, Katsuda T, Ochiya T. Trash or Treasure: extracellular microRNAs and cell-to-cell communication. *Front Genet.* 2013 Sep 5;4:173.
- Kozomara A, Griffiths-Jones S. miRBase: annotating high confidence microRNAs using deep sequencing data. *Nucleic Acids Res.* 2014 Jan;42(Database issue):D68-73.
- Kremenutzky M, Cottrell D, Rice G, Hader W, Baskerville J, Koopman W, et al. The natural history of multiple sclerosis: a geographically based study. 7. Progressive-relapsing and relapsing-progressive multiple sclerosis: a re-evaluation. *Brain.* 1999 Oct;122 (Pt 10):1941-50.
- Kubo M, Hanada T, Yoshimura A. Suppressors of cytokine signaling and immunity. *Nat Immunol.* 2003;4(12):1169-76.
- Kuhle J, Leppert D, Petzold A, Regeniter A, Schindler C, Mehling M, et al. Neurofilament heavy chain in CSF correlates with relapses and disability in multiple sclerosis. *Neurology.* 2011;76(14):1206-13.
- Kuhlmann T, Lingfeld G, Bitsch A. Acute axonal damage in multiple sclerosis is most extensive in early disease stages and decreases over time. *Brain.* 2002 Oct;125(Pt 10):2202-12.
- Kumar M, Nath S, Prasad HK, Sharma GD, Li Y. MicroRNAs: a new ray of hope for diabetes mellitus. *Protein Cell.* 2012 Oct [cited 2014 Jan 15];3(10):726-38. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23055040>
- Kumar P, Dezso Z, MacKenzie C, Oestreicher J, Agoulnik S, Byrne M, et al. Circulating miRNA biomarkers for Alzheimer's disease. *PLoS One.* 2013 Jul 29;8(7):e69807.

- Kurtzke JF. Rating neurologic impairment in multiple sclerosis: an expanded disability status scale (EDSS). *Neurology*. 1983;33(11):1444–52.
- Kutzelnigg A, Lucchinetti CF, Stadelmann C, Brück W, Rauschka H, Bergmann M, et al. Cortical demyelination and diffuse white matter injury in multiple sclerosis. *Brain*. 2005 Nov 1;128(Pt 11):2705–12.
- Lechner-Scott J, Spencer B, de Malmanche T, Attia J, Fitzgerald M, Trojano M, et al. The frequency of CSF oligoclonal banding in multiple sclerosis increases with latitude. *Mult Scler*. 2012 Jul 1;18(7):974–82.
- Lee RC, Feinbaum RL, Ambros V. The *C. elegans* heterochronic gene *lin-4* encodes small RNAs with antisense complementarity to *lin-14*. *Cell*. 1993 Dec 3;75(5):843–54.
- Lee Y, Ahn C, Han J, Choi H, Kim J, Yim J, et al. The nuclear RNase III Drosha initiates microRNA processing. *Nature*. 2003 Sep 25;425(6956):415–9.
- Leray E, Yaouanq J, Le Page E, Coustans M, Laplaud D, Oger J, et al. Evidence for a two-stage disability progression in multiple sclerosis. *Brain*. 2010;133(Pt 7):1900–13.
- Letzen B, Liu C, Thakor N, Gearhart J. MicroRNA expression profiling of oligodendrocyte differentiation from human embryonic stem cells. *PLoS One*. 2010 May 5;5(5):e10480.
- Ley 14/2007, 3 de julio, de Investigación biomédica. (BOE [en línia], núm. 159, 4-7-2007, pàg. 28826-28848).
<<http://www.boe.es/boe/dias/2007/07/04/pdfs/A28826-28848.pdf>>.
[Consulta: 23 juny 2014].
- Ley Orgánica 15/1999, 13 de diciembre, de Protección de Datos de Carácter Personal. (BOE [en línia], núm 298, 14-12-1999, pàg. 43088-43099).
<<https://www.boe.es/boe/dias/1999/12/14/pdfs/A43088-43099.pdf>>. [Consulta: 23 juny 2014].

- Li B, Dong H, Zhang J, Song X, Guo L. Cerebrospinal fluid IgG profiles and oligoclonal bands in Chinese patients with multiple sclerosis. *Acta Neurol Scand.* 2007 May;115(5):319–24.
- Li J-S, Yao Z-X. MicroRNAs: novel regulators of oligodendrocyte differentiation and potential therapeutic targets in demyelination-related diseases. *Mol Neurobiol.* 2012 Feb;45(1):200–12.
- Li P, Xu Q, Zhang D, Li X, Han L, Lei J, et al. Upregulated miR-106a plays an oncogenic role in pancreatic cancer. *FEBS Lett. Federation of European Biochemical Societies;* 2014 Mar 3;588(5):705–12.
- Li YY, Cui JG, Dua P, Pogue AI, Bhattacharjee S, Lukiw WJ. Differential expression of miRNA-146a-regulated inflammatory genes in human primary neural, astroglial and microglial cells. *Neurosci Lett.* 2011 Jul 20;499(2):109-13.
- Lin J, Cao Q, Zhang J, Li Y, Shen B, Zhao Z, et al. MicroRNA expression patterns in indeterminate inflammatory bowel disease. *Mod Pathol.* 2013 Jan;26(1):148–54.
- Lin R, Charlesworth J, van der Mei I, Taylor B V. The genetics of multiple sclerosis. *Pract Neurol.* 2012 Oct;12(5):279–88.
- Lincoln MR, Montpetit A, Cader MZ, Saarela J, Dyment DA, Tiislar M, Ferretti V, Tienari PJ, Sadovnick AD, Peltonen L, Ebers GC, Hudson TJ. A predominant role for the HLA class II region in the association of the MHC region with multiple sclerosis. *Nat Genet.* 2005 Oct;37(10):1108-12.
- Lindberg RLP, Hoffmann F, Mehling M, Kuhle J, Kappos L. Altered expression of miR-17-5p in CD4+ lymphocytes of relapsing-remitting multiple sclerosis patients. *Eur J Immunol.* 2010 Mar;40(3):888–98.
- Liu C, Zhao X. MicroRNAs in adult and embryonic neurogenesis. *Neuromolecular Med.* 2009;11(3):141-52.

- Liu XS, Chopp M, Zhang RL, Zhang ZG. MicroRNAs in cerebral ischemia-induced neurogenesis. *J Neuropathol Exp Neurol*. 2013 Aug;72(8):718–22.
- Lorenzen J, Kumarswamy R, Dangwal S, Thum T. MicroRNAs in diabetes and diabetes-associated complications. *RNA Biol*. 2012 Jun;9(6):820–7.
- Lorenzi JCC, Brum DG, Zanette DL, de Paula Alves Souza A, Barbuzano FG, Dos Santos AC, et al. miR-15a and 16-1 are downregulated in CD4+ T cells of multiple sclerosis relapsing patients. *Int J Neurosci*. 2012 Aug;122(8):466–71.
- Losseff NA, Webb SL, O’Riordan JI, Page R, Wang L, Barker GJ, et al. Spinal cord atrophy and disability in multiple sclerosis. A new reproducible and sensitive MRI method with potential to monitor disease progression. *Brain*. 1996 Jun;119 (Pt 3):701–8.
- Lu LF, Thai TH, Calado DP, Chaudhry A, Kubo M, Tanaka K, Loeb GB, Lee H, Yoshimura A, Rajewsky K, Rudensky AY. Foxp3-dependent microRNA155 confers competitive fitness to regulatory T cells by targeting SOCS1 protein. *Immunity*. 2009 Jan 16;30(1):80-91.
- Lu X, Kakkar V. The roles of microRNAs in atherosclerosis. *Curr Med Chem*. 2014;21(13):1531-43.
- Lu Y, Xiao J, Lin H, Bai Y, Luo X, Wang Z, Yang B. A single anti-microRNA antisense oligodeoxyribonucleotide (AMO) targeting multiple microRNAs offers an improved approach for microRNA interference. *Nucleic Acids Res*. 2009 Feb;37(3):e24.
- Lublin FD, Reingold SC. Defining the clinical course of multiple sclerosis: Results of an international survey. *Neurology*. 1996 Apr 1;46(4):907–11.
- Lublin FD, Reingold SC, Cohen JA, Cutter GR, Sørensen PS, Thompson AJ, et al. Defining the clinical course of multiple sclerosis: The 2013 revisions. *Neurology*. 2014 May 28. pii:10.1212/WNL.0000000000000560. [Epub ahead of print].

- Lujambio A, Ropero S, Ballestar E, Fraga MF, Cerrato C, Setién F, et al. Genetic unmasking of an epigenetically silenced microRNA in human cancer cells. *Cancer Res.* 2007 Feb 15;67(4):1424-9. Erratum in: *Cancer Res.* 2007 Apr 1;67(7):3492. Gitt, Anna.
- Ma L, Reinhardt F, Pan E, Soutschek J, Bhat B, Marcusson EG, et al. Therapeutic silencing of miR-10b inhibits metastasis in a mouse mammary tumor model. *Nat Biotechnol.* 2010 Apr;28(4):341-7.
- Machida A, Ohkubo T, Yokota T. Circulating microRNAs in the cerebrospinal fluid of patients with brain diseases. *Methods Mol Biol.* 2013;1024:203-9.
- Maciotta S, Meregalli M, Torrente Y. The involvement of microRNAs in neurodegenerative diseases. *Front Cell Neurosci.* 2013 Dec 19;7:265.
- Maffioletti E, Tardito D, Gennarelli M, Bocchio-Chiavetto L. Micro spies from the brain to the periphery: new clues from studies on microRNAs in neuropsychiatric disorders. *Front Cell Neurosci.* 2014 Mar 11;8:75.
- Magraner MJ, Bosca I, Simó-Castelló M, García-Martí G, Alberich-Bayarri A, Coret F, et al. Brain atrophy and lesion load are related to CSF lipid-specific IgM oligoclonal bands in clinically isolated syndromes. *Neuroradiology.* 2012 Jan;54(1):5-12.
- Manouchehrinia A, Tench CR, Maxted J, Bibani RH, Britton J, Constantinescu CS. Tobacco smoking and disability progression in multiple sclerosis: United Kingdom cohort study. *Brain.* 2013 Jul;136(Pt 7):2298-304.
- Martinelli-Boneschi F, Fenoglio C, Brambilla P, Sorosina M, Giacalone G, Esposito F, Serpente M, Cantoni C, Ridolfi E, Rodegher M, Moiola L, Colombo B, De Riz M, Martinelli V, Scarpini E, Comi G, Galimberti D. MicroRNA and mRNA expression profile screening in multiple sclerosis patients to unravel novel pathogenic steps and identify potential biomarkers. *Neurosci Lett.* 2012 Feb 2;508(1):4-8.

- Martínez-González M, Villegas A, Fajardo F. Bioestadística amigable. 2a ed. Madrid: Díaz de Santos; 2006.
- Mazan-Mamczarz K, Zhao XF, Dai B, Steinhardt JJ, Peroutka RJ, Berk KL, et al. Down-regulation of eIF4GII by miR-520c-3p represses diffuse large B cell lymphoma development. *PLoS Genet*. 2014 Jan 30;10(1):e1004105.
- Meira M, Sievers C, Hoffmann F, Derfuss T, Kuhle J, Kappos L, et al. MiR-126: a novel route for natalizumab action? *Mult Scler*. 2014 Mar 5. [Epub ahead of print].
- Meisgen F, Xu N, Wei T, Janson PC, Obad S, Broom O, et al. MiR-21 is up-regulated in psoriasis and suppresses T cell apoptosis. *Exp Dermatol*. 2012 Apr;21(4):312-4.
- Melo S, Villanueva A. Small molecule enoxacin is a cancer-specific growth inhibitor that acts by enhancing TAR RNA-binding protein 2-mediated microRNA processing. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2011 Mar 15;108(11):4394-9.
- Mercer T, Dinger M, Mattick J. Long non-coding RNA: insights into functions. *Nat Rev Genet*. 2009 Mar;10(3):155-9.
- Mero I-L, Gustavsen MW, Sæther HS, Flåm ST, Berg-Hansen P, Søndergaard HB, et al. Oligoclonal band status in Scandinavian multiple sclerosis patients is associated with specific genetic risk alleles. *PLoS One*. 2013 Jan;8(3):e58352.
- Miller DH, Barkhof F, Frank JA, Parker GJM, Thompson AJ. Measurement of atrophy in multiple sclerosis: pathological basis, methodological aspects and clinical relevance. *Brain*. 2002;125(Pt 8):1676-95.
- Modrego PJ, Pina MA. Trends in prevalence and incidence of multiple sclerosis in Bajo Aragón, Spain. *J Neurol Sci*. 2003;216(1):89-93.

- Moisan J, Grenningloh R, Bettelli E, Oukka M, Ho IC. Ets-1 is a negative regulator of Th17 differentiation. *J Exp Med*. 2007 Nov 26;204(12):2825-35.
- Mraz M, Pospisilova S, Malinova K, Slapak I, Mayer J. MicroRNAs in chronic lymphocytic leukemia pathogenesis and disease subtypes. *Leuk Lymphoma*. 2009 Mar;50(3):506-9.
- Multiple Sclerosis International Federation. Atlas of MS 2013. Mapping Multiple Sclerosis around the world. 2013th ed. London: Summers Editorial & Design; 2013.
- Munger KL, Levin LI, Hollis BW, Howard NS, Ascherio A. Serum 25-hydroxyvitamin D levels and risk of multiple sclerosis. *JAMA*. 2006 Dec 20;296(23):2832-8.
- Murtaza M, Dawson S, Tsui D, Gale D. Non-invasive analysis of acquired resistance to cancer therapy by sequencing of plasma DNA. *Nature*. 2013 May 2;497(7447):108-12.
- Murugaiyan G, Beynon V, Mittal A, Joller N, Weiner HL. Silencing microRNA-155 ameliorates experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Immunol*. 2011 Sep 1;187(5):2213-21.
- Nakasa T, Miyaki S, Okubo A, Hashimoto M, Nishida K, Ochi M, et al. Expression of microRNA-146 in rheumatoid arthritis synovial tissue. *Arthritis Rheum*. 2008 May;58(5):1284-92.
- O'Connell RM, Rao DS, Chaudhuri AA, Baltimore D. Physiological and pathological roles for microRNAs in the immune system. *Nat Rev Immunol*. 2010 Feb;10(2):111-22.
- Oldenborg P, Zheleznyak A, Fang Y. Role of CD47 as a marker of self on red blood cells. *Science* 2000 Jun 16;288(5473):2051-4.

- Oreja-Guevara C, Noval S, Alvarez-Linera J, Gabaldón L, Manzano B, Chamorro B, et al. Clinically Isolated Syndromes Suggestive of Multiple Sclerosis: An Optical Coherence Tomography Study. *PLoS ONE*. 2012;7(3):e33907.
- Oreja-Guevara C, Noval S, Manzano B, Diez-Tejedor E. Neuritis óptica asociada o no a esclerosis múltiple: estudio estructural y funcional. *Neurología*. 2010 Mar;25(2):78-82.
- Ortega FJ, Mercader JM, Catalán V, Moreno-Navarrete JM, Pueyo N, Sabater M, et al. Targeting the circulating microRNA signature of obesity. *Clin Chem*. 2013 May;59(5):781–92.
- Otaegui D, Baranzini SE, Armañanzas R, Calvo B, Muñoz-Culla M, Khankhanian P, et al. Differential micro RNA expression in PBMC from multiple sclerosis patients. *PLoS One*. 2009 Jan;4(7):e6309.
- Otero S, Batlle J, Bonaventura I, Brieva L, Bufill E, Cano A, et al. Situación epidemiológica actual de la esclerosis múltiple: pertinencia y puesta en marcha de un registro poblacional de nuevos casos en Cataluña. *Rev Neurol*. 2010 May 16;50(10):623–33.
- Otero-Romero S, Roura P, Solà J, Altimiras J, Sastre-Garriga J, Nos C, et al. Increase in the prevalence of multiple sclerosis over a 17-year period in Osona, Catalonia, Spain. *Mult Scler*. 2013 Feb;19(2):245–8.
- Palanichamy JK, Rao DS. miRNA dysregulation in cancer: towards a mechanistic understanding. *Front Genet*. 2014 Mar 18;5:54.
- Pan Y, Zhang Y, Jia T, Zhang K, Li J, Wang L. Development of a microRNA delivery system based on bacteriophage MS2 virus-like particles. *FEBS J*. 2012 Apr;279(7):1198–208.
- Paraboschi EM, Soldà G, Gemmati D, Orioli E, Zeri G, Benedetti MD, et al. Genetic association and altered gene expression of mir-155 in multiple sclerosis patients. *Int J Mol Sci*. 2011 Jan;12(12):8695–712.

- Patsopoulos NA, Barcellos LF, Hintzen RQ, Schaefer C, van Duijn CM, Noble JA, et al. Fine-Mapping the Genetic Association of the Major Histocompatibility Complex in Multiple Sclerosis: HLA and Non-HLA Effects. *PLoS Genet.* 2013 Nov;9(11):e1003926.
- Pauley KM, Cha S, Chan EK. MicroRNA in autoimmunity and autoimmune diseases. *J Autoimmun.* 2009 May-Jun;32(3-4):189-94.
- Pauley KM, Satoh M, Chan AL, Bubb MR, Reeves WH, Chan EK. Upregulated miR-146a expression in peripheral blood mononuclear cells from rheumatoid arthritis patients. *Arthritis Res Ther.* 2008 Jan;10(4):R101.
- Pedersen I, Cheng G, Wieland S. Interferon modulation of cellular microRNAs as an antiviral mechanism. *Nature.* 2007 Oct 18;449(7164):919-22.
- Pekow JR, Kwon JH. MicroRNAs in inflammatory bowel disease. *Inflamm Bowel Dis.* 2012 Jan;18(1):187-93.
- Perini P, Ranzato F, Calabrese M, Battistin L, Gallo P. Intrathecal IgM production at clinical onset correlates with a more severe disease course in multiple sclerosis. *J Neurol Neurosurg Psychiatry.* 2006;77(8):953-5.
- Petzold A, de Boer JF, Schippling S, Vermersch P, Kardon R, Green A, et al. Optical coherence tomography in multiple sclerosis: a systematic review and meta-analysis. *Lancet Neurol.* 2010;9(9):921-32.
- Petzold A. Intrathecal oligoclonal IgG synthesis in multiple sclerosis. *J Neuroimmunol.* 2013 Sep 15;262(1-2):1-10.
- Piaton G, Williams A, Seilhean D, Lubetzki C. Remyelination in multiple sclerosis. *Prog Brain Res.* 2009;175:453-64.
- Pittock SJ, Mayr WT, McClelland RL, Jorgensen NW, Weigand SD, Noseworthy JH, et al. Change in MS-related disability in a population-based cohort: A 10-year follow-up study. *Neurology.* 2004 Jan 12;62(1):51-9.

- Polman CH, Reingold SC, Banwell B, Clanet M, Cohen JA, Filippi M, et al. Diagnostic criteria for multiple sclerosis: 2010 revisions to the McDonald criteria. *Ann Neurol*. 2011 Feb;69(2):292–302.
- Ponomarev E, Veremeyko T, Weiner H. MicroRNAs are universal regulators of differentiation, activation, and polarization of microglia and macrophages in normal and diseased CNS. *Glia*. 2013 Jan;61(1):91-103.
- Ponomarev ED, Veremeyko T, Barteneva N, Krichevsky AM, Weiner HL. MicroRNA-124 promotes microglia quiescence and suppresses EAE by deactivating macrophages via the C/EBP- α -PU.1 pathway. *Nat Med*. 2011 Jan;17(1):64-70.
- Portela A, Esteller M. Epigenetic modifications and human disease. *Nat Biotechnol*. 2010 Oct;28(10):1057-68.
- Poser CM, Paty DW, Scheinberg L, McDonald WI, Davis FA, Ebers GC, et al. New diagnostic criteria for multiple sclerosis: guidelines for research protocols. *Ann Neurol*. 1983 Mar;13(3):227–31.
- Prats-Puig A, Ortega FJ, Mercader JM, Moreno-Navarrete JM, Moreno M, Bonet N, et al. Changes in Circulating MicroRNAs Are Associated With Childhood Obesity. *J Clin Endocrinol Metab*. 2013 Oct;98(10):1655–60.
- Pugliatti M, Riise T, Sotgiu MA, Sotgiu S, Satta WM, Mannu L, et al. Increasing incidence of multiple sclerosis in the province of Sassari, northern Sardinia. *Neuroepidemiology*. 2005 Jan 2;25(3):129–34.
- Pugliatti M, Rosati G, Carton H, Riise T, Drulovic J, Vécsei L, et al. The epidemiology of multiple sclerosis in Europe. *Eur J Neurol*. 2006 Jul;13(7):700–22.
- Pulicken M, Gordon-Lipkin E, Balcer LJ, Frohman E, Cutter G, Calabresi PA. Optical coherence tomography and disease subtype in multiple sclerosis. *Neurology*. 2007;69(22):2085–92.

- R Development Core Team. R: A language and environment for statistical computing, reference index version 3.0.2. Vienna (Austria): R Foundation for Statistical Computing; 2013.
- Rainer J, Ploner C, Jesacher S, Ploner A, Eduardoff M, Mansha M, et al. Glucocorticoid-regulated microRNAs and mirtrons in acute lymphoblastic leukemia. *Leukemia*. 2009 Apr;23(4):746-52.
- Ramagopalan SV, Knight JC, Ebers GC. Multiple sclerosis and the major histocompatibility complex. *Curr Opin Neurol*. 2009 Jun;22(3):219-25.
- Ramió-Torrentà L, Sastre-Garriga J, Ingle GT, Davies GR, Ameen V, Miller DH, et al. Abnormalities in normal appearing tissues in early primary progressive multiple sclerosis and their relation to disability: a tissue specific magnetisation transfer study. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. 2006 Jan;77(1):40-5.
- Rao SM, Leo GJ, Ellington L, Nauertz T, Bernardin L, Unverzagt F. Cognitive dysfunction in multiple sclerosis. II. Impact on employment and social functioning. *Neurology*. 1991 May;41(5):692-6.
- Razali NM, Wah YB. Power comparisons of Shapiro-Wilk, Kolmogorov-Smirnov, Lilliefors and Anderson-Darling tests. *J Stat Model Anal*. 2011;2(1):21-33.
- Real Decreto 1716/2011, de 18 de noviembre, por el que se establecen los requisitos básicos de autorización y funcionamiento de los biobancos con fines de investigación biomédica y del tratamiento de las muestras biológicas de origen humano, y se regula el funcionamiento y organización del Registro Nacional de Biobancos para investigación biomédica. (BOE [en línia], núm 290, 2-12-2011, pàg. 128434-128454). <<http://www.boe.es/boe/dias/2011/12/02/pdfs/BOE-A-2011-18919.pdf>>. [Consulta: 23 juny 2014].

Real Decreto 1720/2007, de 21 de diciembre, por el que se aprueba el Reglamento de desarrollo de la Ley Orgánica 15/1999, de 13 de diciembre, de protección de datos de carácter personal. (BOE [en línia], núm 17, 19-1-2008, pàg. 4103-4136).

<<https://www.boe.es/boe/dias/2008/01/19/pdfs/A04103-04136.pdf>>. [Consulta: 23 juny 2014].

Reinhart BJ, Slack FJ, Basson M, Pasquinelli AE, Bettinger JC, Rougvie AE, et al. The 21-nucleotide let-7 RNA regulates developmental timing in *Caenorhabditis elegans*. *Nature*. 2000 Feb 24;403(6772):901–6.

Ren J, Jin P, Wang E, Marincola FM, Stroncek DF. MicroRNA and gene expression patterns in the differentiation of human embryonic stem cells. *J Transl Med*. 2009 Mar 23;7:20.

Riccitelli G, Rocca MA, Pagani E, Rodegher ME, Rossi P, Falini A, et al. Cognitive impairment in multiple sclerosis is associated to different patterns of gray matter atrophy according to clinical phenotype. *Hum Brain Mapp*. 2011 Oct;32(10):1535–43.

Rico A, Audoin B, Franques J, Eusebio A, Reuter F, Malikova I, et al. Motor evoked potentials in clinically isolated syndrome suggestive of multiple sclerosis. *Mult Scler*. 2009 Mar;15(3):355-62.

Ridolfi E, Fenoglio C, Cantoni C, Calvi A, De Riz M, Pietroboni A, et al. Expression and Genetic Analysis of MicroRNAs Involved in Multiple Sclerosis. *Int J Mol Sci*. 2013 Jan;14(3):4375–84.

Río J, Castelló J, Rovira A, Tintoré M, Sastre-Garriga J, Horga A, et al. Measures in the first year of therapy predict the response to interferon beta in MS. *Mult Scler*. 2009;15(7):848–53.

Río J, Comabella M, Montalban X. Predicting responders to therapies for multiple sclerosis. *Nat Rev Neurol*. 2009b;5(10):553–60.

- Río J, Nos C, Tintoré M, Téllez N, Galán I, Pelayo R, et al. Defining the response to interferon-beta in relapsing-remitting multiple sclerosis patients. *Ann Neurol*. 2006 Feb;59(2):344-52.
- Robin X, Turck N, Hainard A, Tiberti N, Lisacek F, Sanchez J-C, et al. pROC: an open-source package for R and S+ to analyze and compare ROC curves. *BMC Bioinformatics*. 2011 Mar 17;12:77.
- Rosati G. The prevalence of multiple sclerosis in the world: an update. *Neurol Sci*. 2001 Apr;22(2):117-39.
- Rotllan N, Fernández-Hernando C. MicroRNA Regulation of Cholesterol Metabolism. *Cholesterol*. 2012 Jan;2012:847849.
- Rovira A, León A. MR in the diagnosis and monitoring of multiple sclerosis: an overview. *Eur J Radiol*. 2008;67(3):409-14.
- Rudick RA. The elusive biomarker for personalized medicine in multiple sclerosis: the search continues. *Neurology*. 2012 Aug 7;79(6):498-9.
- Rueckert D, Sonoda LI, Hayes C, Hill DL, Leach MO, Hawkes DJ. Nonrigid registration using free-form deformations: application to breast MR images. *IEEE Trans Med Imaging*. 1999 Aug;18(8):712-21.
- Runmarker B, Andersen O. Prognostic factors in a multiple sclerosis incidence cohort with twenty-five years of follow-up. *Brain*. 1993 Feb;116(1):117-34.
- Sádaba MC, González Porqué P, Masjuan J, Álvarez-Cermeño JC, Bootello A, Villar LM. An ultrasensitive method for the detection of oligoclonal IgG bands. *J Immunol Methods*. 2004 Jan;284(1-2):141-5.
- Sádaba MC, Tzartos J, Paíno C, García-Villanueva M, Álvarez-Cermeño JC, Villar LM, et al. Axonal and oligodendrocyte-localized IgM and IgG deposits in MS lesions. *J Neuroimmunol*. 2012 Jun 15;247(1-2):86-94.

- Sadovnick A, Baird P. Multiple sclerosis. Updated risks for relatives. *Am J Med Genet.* 1988 Mar;29(3):533-41.
- Sala V, Bergerone S, Gatti S, Gallo S, Ponzetto A, Ponzetto C, et al. MicroRNAs in myocardial ischemia: identifying new targets and tools for treating heart disease. *New frontiers for miR-medicine. Cell Mol Life Sci.* 2014 Apr;71(8):1439-52.
- Salzer J, Hallmans G, Nyström M, Stenlund H, Wadell G, Sundström P. Smoking as a risk factor for multiple sclerosis. *Mult Scler.* 2013 Jul;19(8):1022-7.
- Salzer J, Svenningsson A, Sundström P. Neurofilament light as a prognostic marker in multiple sclerosis. *Mult Scler.* 2010;16(3):287-92.
- Salzman DW, Weidhaas JB. SNPing cancer in the bud: MicroRNA and microRNA-target site polymorphisms as diagnostic and prognostic biomarkers in cancer. *Pharmacol Ther.* 2013;137(1):55-63.
- Sastre-Garriga J, Ingle GT, Chard DT, Cercignani M, Ramió-Torrentà L, Miller DH, et al. Grey and white matter volume changes in early primary progressive multiple sclerosis: a longitudinal study. *Brain.* 2005 Jun;128(Pt 6):1454-60.
- Sawant D V, Wu H, Kaplan MH, Dent AL. The Bcl6 target gene microRNA-21 promotes Th2 differentiation by a T cell intrinsic pathway. *Mol Immunol.* 2013 Jul;54(3-4):435-42.
- Sawcer S, Hellenthal G, Pirinen M. Genetic risk and a primary role for cell-mediated immune mechanisms in multiple sclerosis. *Nature.* 2011 Aug 10;476(7359):214-9.
- Sayed ASM, Xia K, Salma U, Yang T, Peng J. Diagnosis, Prognosis and Therapeutic Role of Circulating miRNAs in Cardiovascular Diseases. *Heart Lung Circ.* 2014 Jun;23(6):503-510.

- Schlaeger R, D'Souza M, Schindler C, Grize L, Kappos L, Fuhr P. Combined evoked potentials as markers and predictors of disability in early multiple sclerosis. *Clin Neurophysiol.* 2012 Feb;123(2):406-10.
- Schwarzenbach H, Nishida N, Calin GA, Pantel K. Clinical relevance of circulating cell-free microRNAs in cancer. *Nat Rev Clin Oncol.* 2014 Mar;11(3):145-56.
- Scott GK, Mattie MD, Berger CE, Benz SC, Benz CC. Rapid alteration of microRNA levels by histone deacetylase inhibition. *Cancer Res.* 2006 Feb;66(3):1277-81.
- Sharief MK, Keir G, Thompson EJ. Intrathecal synthesis of IgM in neurological diseases: A comparison between detection of oligoclonal bands and quantitative estimation. *J Neurol Sci.* 1990;96(2):131-42.
- Sheinerman KS, Umansky SR. Circulating cell-free microRNA as biomarkers for screening, diagnosis and monitoring of neurodegenerative diseases and other neurologic pathologies. *Front Cell Neurosci.* 2013 Sep 10;7:150.
- Shen J, Stass SA, Jiang F. MicroRNAs as potential biomarkers in human solid tumors. *Cancer Lett.* 2013 Feb 28;329(2):125-36.
- Shen Q, Temple S. Fine control: microRNA regulation of adult neurogenesis. *Nat Neurosci.* 2009 Apr;12(4):369-70.
- Siegel SR, Mackenzie J, Chaplin G, Jablonski NG, Griffiths L. Circulating microRNAs involved in multiple sclerosis. *Mol Biol Rep.* 2012 May;39(5):6219-25.
- Sievers C, Meira M, Hoffmann F, Fontoura P, Kappos L, Lindberg RLPP. Altered microRNA expression in B lymphocytes in multiple sclerosis: towards a better understanding of treatment effects. *Clin Immunol.* 2012 Jul;144(1):70-9.

- Simpson Jr S, Blizzard L, Otahal P, Van der Mei I, Taylor B. Latitude is significantly associated with the prevalence of multiple sclerosis: a meta-analysis. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. 2011 Oct;82(10):1132-41.
- Simpson S, Taylor B, Blizzard L, Ponsonby A-L, Pittas F, Tremlett H, et al. Higher 25-hydroxyvitamin D is associated with lower relapse risk in multiple sclerosis. *Ann Neurol*. 2010 Aug;68(2):193–203.
- Singh RP, Massachi I, Manickavel S, Singh S, Rao NP, Hasan S, et al. The role of miRNA in inflammation and autoimmunity. *Autoimmun Rev*. 2013 Oct;12(12):1160–5.
- Sled JG, Zijdenbos AP, Evans AC. A nonparametric method for automatic correction of intensity nonuniformity in MRI data. *IEEE Trans Med Imaging*. 1998 Feb;17(1):87–97.
- Smith SM. Fast robust automated brain extraction. *Hum Brain Mapp*. 2002 Nov;17(3):143–55.
- Smolders J, Menheere P, Kessels A, Damoiseaux J, Hupperts R. Association of vitamin D metabolite levels with relapse rate and disability in multiple sclerosis. *Mult Scler*. 2008 Nov;14(9):1220–4.
- Solomon AJ, Klein EP, Bourdette D. “Undiagnosing” multiple sclerosis: the challenge of misdiagnosis in MS. *Neurology*. 2012 Jun 12;78(24):1986–91.
- Søndergaard HB, Hesse D, Krakauer M, Sørensen PS, Sellebjerg F. Differential microRNA expression in blood in multiple sclerosis. *Mult Scler*. 2013 Dec;19(14):1849–57.
- Sormani MP, Bonzano L, Roccatagliata L, Mancardi GL, Uccelli A, Bruzzi P. Surrogate endpoints for EDSS worsening in multiple sclerosis. A meta-analytic approach. *Neurology*. 2010;75(4):302–9.

- Sormani MP, De Stefano N. Defining and scoring response to IFN- β in multiple sclerosis. *Nat Rev Neurol*. 2013a Sep;9(9):504–12.
- Sormani MP, Rio J, Tintorè M, Signori A, Li D, Cornelisse P, et al. Scoring treatment response in patients with relapsing multiple sclerosis. *Mult Scler*. 2013b Apr;19(5):605–12.
- Sormani MP, Signori A, Stromillo M, De Stefano N. Refining response to treatment as defined by the Modified Rio Score. *Mult Scler*. 2013c Aug;19(9):1246–7.
- Sormani MP, Stubinski B, Cornelisse P, Rocak S, Li D, De Stefano N. Magnetic resonance active lesions as individual-level surrogate for relapses in multiple sclerosis. *Mult Scler*. 2011;17(5):541–9.
- Sospedra M, Martin R. Immunology of multiple sclerosis. *Annu Rev Immunol*. 2005 Jan;23:683–747.
- Stanczyk J, Pedrioli DML, Brentano F, Sanchez-Pernaute O, Kolling C, Gay RE, et al. Altered expression of MicroRNA in synovial fibroblasts and synovial tissue in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum*. 2008 Apr;58(4):1001–9.
- Stenvang J, Lindow M, Kauppinen S. Targeting of microRNAs for therapeutics. *Biochem Soc Trans*. 2008 Dec;36(Pt 6):1197-200.
- Sun W, Shen W, Yang S, Hu F, Li H, Zhu T-H. miR-223 and miR-142 attenuate hematopoietic cell proliferation, and miR-223 positively regulates miR-142 through LMO2 isoforms and CEBP- β . *Cell Res*. 2010;20(10):1158–69.
- Sun X, Belkin N, Feinberg MW. Endothelial microRNAs and atherosclerosis. *Curr Atheroscler Rep*. 2013 Dec;15(12):372.
- Suzuki H, Maruyama R, Yamamoto E, Kai M. Epigenetic alteration and microRNA dysregulation in cancer. *Front Genet*. 2013 Dec 3;4:258.

- Swets JA. Measuring the accuracy of diagnostic systems. *Science*. 1988;240(4857):1285–93.
- Szulwach KE, Li X, Smrt RD, Li Y, Luo Y, Lin L, et al. Cross talk between microRNA and epigenetic regulation in adult neurogenesis. *J Cell Biol*. 2010 Apr 5;189(1):127–41.
- Tan JR, Koo YX, Kaur P, Liu F, Armugam A, Wong PT-H, et al. microRNAs in stroke pathogenesis. *Curr Mol Med*. 2011 Mar;11(2):76–92.
- Taveggia C, Feltri M, Wrabetz L. Signals to promote myelin formation and repair. *Nat Rev Neurol*. 2010 May;6(5):276-87.
- Tessitore A, Cicciarelli G, Del Vecchio F, Gaggiano A, Verzella D, Fischietti M, et al. MicroRNAs in the DNA Damage/Repair Network and Cancer. *Int J Genomics*. 2014 Jan;2014:820248.
- Teunissen CE, Khalil M. Neurofilaments as biomarkers in multiple sclerosis. *Mult Scler*. 2012 May;18(5):552–6.
- Thai T, Calado D, Casola S, Ansel K. Regulation of the germinal center response by microRNA-155. *Science*. 2007 Apr 27;316(5824):604-8.
- Thamilarasan M, Koczan D, Hecker M, Paap B, Zettl UK. MicroRNAs in multiple sclerosis and experimental autoimmune encephalomyelitis. *Autoimmun Rev*. 2012 Jan;11(3):174-9.
- Thangarajh M, Gomez-Rial J, Hedström AK, Hillert J, Alvarez-Cermeño JC, Masterman T, et al. Lipid-specific immunoglobulin M in CSF predicts adverse long-term outcome in multiple sclerosis. *Mult Scler*. 2008 Nov;14(9):1208–13.
- Tintoré M, Rovira A, Brieva L, Grivé E, Jardí R, Borrás C, et al. Isolated demyelinating syndromes: comparison of CSF oligoclonal bands and different MR imaging criteria to predict conversion to CDMS. *Mult Scler*. 2001 Dec;7(6):359–63.

- Tintoré M, Rovira A, Río J, Nos C, Grivé E, Téllez N, et al. Baseline MRI predicts future attacks and disability in clinically isolated syndromes. *Neurology*. 2006 Sep 26;67(6):968–72.
- Tintoré M, Rovira A, Río J, Tur C, Pelayo R, Nos C, et al. Do oligoclonal bands add information to MRI in first attacks of multiple sclerosis? *Neurology*. 2008;70(13 Pt 2):1079–83.
- Tola Arribas MA, Yugueros MI, Fernández-Buey N, Fernández-Herranz R. Prevalence of multiple sclerosis in Valladolid, northern Spain. *J Neurol*. 1999 Mar 29;246(3):170–4.
- Toledo J, Sepulcre J, Salinas-Alaman A, García-Layana A, Murie-Fernandez M, Bejarano B, et al. Retinal nerve fiber layer atrophy is associated with physical and cognitive disability in multiple sclerosis. *Mult Scler*. 2008;14(7):906–12.
- Trapp BD, Peterson J, Ransohoff RM, Rudick R, Mörk S, Bö L. Axonal transection in the lesions of multiple sclerosis. *N Engl J Med*. 1998 Jan 29;338(5):278–85.
- Tufekci KU, Oner MG, Genc S, Genc K. MicroRNAs and Multiple Sclerosis. *Autoimmune Dis*. 2010 Nov 11;2011:807426.
- Tuohy TMF, Wallingford N, Liu Y, Chan FH, Rizvi T, Xing R, et al. CD44 overexpression by oligodendrocytes: a novel mouse model of inflammation-independent demyelination and dysmyelination. *Glia*. 2004;47(4):335–45.
- Urdinguio RG, Sanchez-Mut J V, Esteller M. Epigenetic mechanisms in neurological diseases: genes, syndromes, and therapies. *Lancet Neurol*. 2009 Nov;8(11):1056–72.
- Valadi H, Ekström K, Bossios A, Sjöstrand M, Lee JJ, Lötvall JO. Exosome-mediated transfer of mRNAs and microRNAs is a novel mechanism of genetic exchange between cells. *Nat Cell Biol*. 2007 Jun;9(6):654–9.

- Villar LM, Álvarez-Cermeño JC, Gasalla T. Bandas oligoclonales en la esclerosis múltiple. Badalona: Euromedicine. Ediciones Médicas; 2009a.
- Villar LM, González-Porqué P, Masjuán J, Alvarez-Cermeño JC, Bootello A, Keir G. A sensitive and reproducible method for the detection of oligoclonal IgM bands. *J Immunol Methods*. 2001 Dec 1;258(1-2):151-5.
- Villar LM, Espiño M, Cavanillas ML, Roldán E, Urcelay E, de la Concha EG, et al. Immunological mechanisms that associate with oligoclonal IgM band synthesis in multiple sclerosis. *Clin Immunol*. 2010;137(1):51-9.
- Villar LM, García-Sánchez MI, Costa-Frossard L, Espiño M, Roldán E, Páramo D, et al. Immunological markers of optimal response to natalizumab in multiple sclerosis. *Arch Neurol*. 2012 Feb 13;69(2):191-7.
- Villar LM, Masjuan J, Gonzalez-Porqué P, Plaza J, Sádaba MC, Roldán E, et al. Intrathecal IgM synthesis in neurologic diseases: Relationship with disability in MS. *Neurology*. 2002a Mar 12;58(5):824-6.
- Villar LM, Masjuan J, González-Porqué P, Plaza J, Sádaba MC, Roldán E, et al. Intrathecal IgM synthesis is a prognostic factor in multiple sclerosis. *Ann Neurol*. 2003 Feb;53(2):222-6.
- Villar LM, Masjuan J, Gonzalez-Porqué P, Plaza J, Sádaba MC, Roldán E, et al. Intrathecal IgM synthesis predicts the onset of new relapses and a worse disease course in MS. *Neurology*. 2002b Aug 27;59(4):555-9.
- Villar LM, Masterman T, Casanova B, Gómez-Rial J, Espiño M, Sádaba MC, et al. CSF oligoclonal band patterns reveal disease heterogeneity in multiple sclerosis. *J Neuroimmunol*. 2009b;211(1-2):101-4.
- Villar LM, Sádaba MC, Roldán E, Masjuan J, González-Porqué P, Villarrubia N, et al. Intrathecal synthesis of oligoclonal IgM against myelin lipids predicts an aggressive disease course in MS. *J Clin Invest*. 2005 Jan 3;115(1):187-94.

- Villoslada P. Biomarkers for multiple sclerosis. *Drug News Perspect.* 2010 Nov;23(9):585–95.
- Vinuesa CG, Rigby RJ, Yu D. Logic and extent of miRNA-mediated control of autoimmune gene expression. *Int Rev Immunol.* 2009 Jan;28(3-4):112–38.
- Von Glehn F, Farias AS, de Oliveira ACP, Damasceno A, Longhini ALF, Oliveira EC, et al. Disappearance of cerebrospinal fluid oligoclonal bands after natalizumab treatment of multiple sclerosis patients. *Mult Scler.* 2012 Jul;18(7):1038–41.
- Waschbisch A, Atiya M, Linker R a, Potapov S, Schwab S, Derfuss T. Glatiramer acetate treatment normalizes deregulated microRNA expression in relapsing remitting multiple sclerosis. *PLoS One.* 2011 Jan;6(9):e24604.
- Weber JA, Baxter DH, Zhang S, Huang DY, Huang KH, Lee MJ, et al. The microRNA spectrum in 12 body fluids. *Clin Chem.* 2010;56(11):1733–41.
- Weinshenker BG, Bass B, Rice GP, Noseworthy J, Carriere W, Baskerville J, et al. The natural history of multiple sclerosis: a geographically based study. I. Clinical course and disability. *Brain.* 1989 Feb;112 (Pt 1):133-46.
- Weinshenker BG. The natural history of multiple sclerosis: update 1998. *Semin Neurol.* 1998;18(3):301-7.
- Williams MD, Mitchell GM. MicroRNAs in insulin resistance and obesity. *Exp Diabetes Res.* 2012 Jan;2012:484696.
- Wingerchuk DM, Lennon VA, Lucchinetti CF, Pittock SJ, Weinshenker BG. The spectrum of neuromyelitis optica. *Lancet Neurol.* 2007;6(9):805–15.
- World Medical Association. Declaration of Helsinki: ethical principles for medical research involving human subjects (2013). <<http://www.wma.net/en/30publications/10policies/b3/index.html.pdf>>. [Consulta: 23 juny 2014].

- Wu Y, Crawford M, Yu B, Mao Y, Nana-Sinkam SP, Lee LJ. MicroRNA delivery by cationic lipoplexes for lung cancer therapy. *Mol Pharm.* American Chemical Society; 2011 Aug;8(4):1381-9.
- Xi JJ. MicroRNAs in Cancer. *Cancer Treat Res.* 2013 Jan;158:119-37.
- Xiao C, Rajewsky K. MicroRNA control in the immune system: basic principles. *Cell.* 2009 Jan 9;136(1):26-36.
- Xu N, Brodin P, Wei T, Meisgen F, Eidsmo L, Nagy N, et al. MiR-125b, a microRNA downregulated in psoriasis, modulates keratinocyte proliferation by targeting FGFR2. *J Invest Dermatol.* 2011 Jul;131(7):1521-9.
- Yamagiwa S, Gray J. A role for TGF- β in the generation and expansion of CD4+ CD25+ regulatory T cells from human peripheral blood. *J Immunol.* 2001 Jun 15;166(12):7282-9.
- Yamao T, Noguchi T, Takeuchi O. Negative regulation of platelet clearance and of the macrophage phagocytic response by the transmembrane glycoprotein SHPS-1. *J Biol Chem.* 2002 Oct 18;277(42):39833-9.
- Yang D, Wang W-Z, Zhang X-M, Yue H, Li B, Lin L, et al. MicroRNA Expression Aberration in Chinese Patients with Relapsing Remitting Multiple Sclerosis. *J Mol Neurosci.* 2014 Jan;52(1):131-7.
- Yates L a, Norbury CJ, Gilbert RJC. The long and short of microRNA. *Cell.* 2013 Apr 25;153(3):516-9.
- Zare-Shahabadi A, Renaudineau Y, Rezaei N. MicroRNAs and multiple sclerosis: from physiopathology toward therapy. *Expert Opin Ther Targets.* 2013;17(12):1497-507.
- Zhang J, Cheng Y, Cui W, Li M, Li B, Guo L. MicroRNA-155 modulates Th1 and Th17 cell differentiation and is associated with multiple sclerosis and experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Neuroimmunol.* 2014 Jan 15;266(1-2):56-63.

- Zhang M, Ye Y, Cong J, Pu D, Liu J, Hu G, et al. Regulation of STAT3 by miR-106a is linked to cognitive impairment in ovariectomized mice. *Brain Res.* 2013 Mar 29;1503:43–52.
- Zhang Y, Brady M, Smith S. Segmentation of brain MR images through a hidden Markov random field model and the expectation-maximization algorithm. *IEEE Trans Med Imaging.* 2001 Jan;20(1):45–57.
- Zhao S, Wang Y, Liang Y, Zhao M, Long H, Ding S, et al. MicroRNA-126 regulates DNA methylation in CD4+ T cells and contributes to systemic lupus erythematosus by targeting DNA methyltransferase 1. *Arthritis Rheum.* 2011 May;63(5):1376–86.
- Zhao X, He X, Han X, Yu Y, Ye F, Chen Y. MicroRNA-mediated control of oligodendrocyte differentiation. *Neuron.* 2010 Mar 11;65(5):612-26.
- Zibert JR, Løvendorf MB, Litman T, Olsen J, Kaczkowski B, Skov L. MicroRNAs and potential target interactions in psoriasis. *J Dermatol Sci.* 2010 Jun;58(3):177-85.

8. ANNEXOS

8.1. ANNEX 1: Escala ampliada de discapacitat de Kurtzke (EDSS) (Kurtzke 1983)

SISTEMES FUNCIONALS (SF)

PIRAMIDAL

0. Normal
1. Signes anormals sense discapacitat
2. Discapacitat mínima
3. Paraparèsia o hemiparèsia lleu o moderada. Monoparèsia greu
4. Paraparèsia o hemiparèsia greu. Monoplegia o tetraparèsia moderada
5. Paraplegia o hemiplegia. Tetraparèsia severa
6. Tetraplegia

CEREBEL

0. Normal
1. Signes anormals sense discapacitat
2. Atàxia lleugera
3. Atàxia moderada de les extremitats o del tronc
4. Atàxia severa de totes les extremitats
5. Incapaç de realitzar moviments coordinats degut a l'atàxia

TRONC DE L'ENCÈFAL

0. Normal
1. Només signes
2. Nistagme moderat o qualsevol altre tipus de discapacitat
3. Nistagme sever, paràlisis extraocular severa o moderada discapacitat deguda a altres parells cranials
4. Disàrtria severa o qualsevol altre tipus de discapacitat.
5. Discapacitat per ingerir o parlar

SENSIBILITAT

0. Normal
1. Alteració de la sensibilitat vibratòria o grafestèsia en 1 o 2 extremitats
2. Disminució lleugera de la sensibilitat tàctil, dolorosa o de la posicional i/o disminució lleugera de la sensibilitat vibratòria en una o dues extremitats, o de la vibratòria o grafestèsia en 3 o 4 extremitats
3. Íd. moderada, inclosa alteració de la sensibilitat propioceptiva en 3 o 4 extremitats
4. Íd. intensa, o bé greu alteració de la sensibilitat propioceptiva en més de dues 2 extremitats
5. Pèrdua de la sensibilitat en 1 o 2 extremitats o bé disminució moderada de la sensibilitat tàctil o dolorosa i/o pèrdua de la sensibilitat posicional en més de 2 extremitats
6. Pèrdua de sensibilitat pràcticament total per sota del cap

BUFETA I INTESTÍ

0. Funció normal
1. Lleuger degoteig a l'inici de la micció, urgència miccional o retenció urinària. Lleuger estrenyiment sense incontinència
2. Moderat degoteig a l'inici de la micció, urgència miccional, retenció urinària o incontinència urinària poc freqüent. Estrenyiment moderat sense incontinència
3. Incontinència urinària o fecal de menys d'1 episodi setmanal
4. Incontinència urinària o fecal de varis episodis setmanals però no diaris
5. Incontinència urinària o fecal diària
6. Pèrdua total de control urinari o fecal

VISIÓ

0. Normal
1. Escotoma amb agudesa visual (corregida) superior a 20/30
2. Escotoma amb agudesa visual màxima corregida entre 20/30 i 20/59 en el pitjor ull
3. Escotoma o alteració del camp visual amb agudesa visual màxima corregida entre 20/60 i 20/99 en el pitjor ull
4. Íd. entre 20/100 i 20/200; o bé igual que un grau 3 però juntament amb màxima agudesa visual en el millor ull de 20/60 o inferior
5. Íd. en l'ull que està pitjor amb agudesa inferior a 20/200; o bé igual que un grau 4 però juntament amb màxima agudesa en el millor ull de 20/60 o inferior
6. Grau 5 però juntament amb màxima agudesa en el millor ull de 20/60 o inferior

FUNCIONS MENTALS

0. Normal
1. Únicament alteració de l'estat d'ànim (no afecta a la puntuació EDSS)
2. Lleugera alteració cognitiva
3. Moderada alteració cognitiva
4. Marcada alteració cognitiva
5. Demència

EDSS

- 0** Examen neurològic normal (a SF tot grau 0).
- 1.0** Sense discapacitat, mínims signes en un SF (per exemple, grau 1).
- 1.5** Sense discapacitat, mínims signes en més d'un SF (més d'1 SF grau 1).
Exclou funció cerebral grau 1.
- 2.0** Mínima discapacitat en un SF (un SF grau 2, altres 0 o 1).
- 2.5** Mínima discapacitat en dos SF (dos SF grau 2, altres 0 o 1).
- 3.0** Moderada discapacitat en un SF (un SF grau 3, altres 0 o 1) o lleu discapacitat en tres o quatre SF grau 2, altres 0 o 1) encara que plenament ambulant.
- 3.5** Totalment ambulant però amb moderada discapacitat en un SF (un grau 3) i un o dos SF grau 2; o dos SF grau 3, o cinc SF grau 2 (altres 0 o 1).
- 4.0** Completament ambulant sense assistència, autosuficient durant 12 hores diàries malgrat una discapacitat relativament greu consistent en un SF grau 4 (altres 0 o 1) o combinacions de graus menors excedint els límits dels graus previs. Capaç de caminar sense ajuda o descans uns 500 metres.
- 4.5** Completament ambulant sense ajuda, autosuficient la major part del dia, sense assistència, capaç de treballar durant la jornada completa, però té alguna limitació en l'activitat total o pot necessitar assistència mínima; caracteritzat per una discapacitat relativament greu, consistent generalment en un SF grau 4 (altres 0 o 1), o combinacions de graus menors excedint els límits dels graus previs. Capaç de caminar sense ajuda o descans uns 300 metres.

- 5.0** Ambulant, capaç de caminar sense ajuda o descans 200 metres; discapacitat suficientment greu com per impedir-li les activitats del dia sencer (per exemple, treballar el dia complet sense mesures especials). Equivalents habituals a SF grau 5 només (altres 0 o 1), o combinacions de graus menors, generalment excedint les especificacions de l'apartat 4.0.
- 5.5** Capaç de caminar 100 metres sense ajuda ni descans, discapacitat suficientment greu com per impedir les activitats del dia sencer. Equivalents habituals a SF un grau 5 només (altres 0 o 1), o combinacions de graus menors, excedint generalment els de l'apartat 4.0.
- 6.0** Necessita ajuda intermitent o constant (bastó, crosses) per caminar 100 metres amb o sense descans. Generalment equivalent en els SF a combinacions amb més de dos SF grau 3+.
- 6.5** Necessita ajuda bilateral constant (bastó, crosses, etc.) per caminar 20 metres sense descans. Equivalent a combinacions de més de dos graus 3+ en els SF.
- 7.0** Incapaç de caminar més de 5 metres encara que sigui amb ajuda. Bàsicament depenent de la cadira de rodes. Capaç de traslladar-se en la cadira de rodes unes 12 hores al dia. Equivalent a combinacions de més d'un grau 4+ en els SF i molt rarament grau 5 només piramidal.
- 7.5** Incapaç de pujar més d'unes poques escales. Depenent de la cadira de rodes; pot necessitar ajuda per traslladar-se amb la cadira de rodes; és capaç de moure les rodes d'una cadira estàndard, però no pot fer-ho durant tot el dia; pot necessitar cadira motoritzada. Equivalent a combinacions de més d'un grau 4+ dels SF.

- 8.0** Bàsicament enllitat o dependent de cadira de rodes o en cadira, però capaç de mantenir-se fora del llit gran part del dia; capaç de realitzar moltes de les funcions de la seva autocura personal; generalment conserva l'ús efectiu de les extremitats superiors. Equivalent a combinacions de grau 4+ en varis SF.
- 8.5** Bàsicament enllitat la major part del dia; pot utilitzar parcialment les extremitats superiors i realitzar algunes funcions d'auto-cura personal. Equivalent a combinacions de grau 4+ en varis SF.
- 9.0** Pacient prostrat al llit; pot comunicar-se i menjar. Equivalent a combinacions de grau 4+ en la majoria dels SF.
- 9.5** Pacient totalment impossibilitat; incapaç de comunicar-se ni menjar. Equivalent a combinacions de grau 4+ en quasi tots els SF.
- 10** Defunció per EM.

8.2. ANNEX 2: Criteris de Barkhof (Barkhof *et al.* 1997)

- ≥ 9 lesions hiperintenses en T2 o ≥ 1 lesió en T1 realçada amb gadolini
- ≥ 3 lesions periventriculars
- ≥ 1 lesió infratentorial
- ≥ 1 lesió juxtacortical

8.3. ANNEX 3: Full informatiu i Consentiment informat per pacient amb malaltia inflamatòria-desmielinitzant del SNC



FULL D'INFORMACIÓ AL PACIENT AMB MALALTIA INFLAMATÒRIA-DESMIELINITZANT DEL SNC.

CONSENTIMENT INFORMAT

ESTUDI: Determinació de marcadors biològics (genètics i bioquímics) en Esclerosi Múltiple i altres malalties inflamatòries i desmielinitzants del sistema nerviós central.

INVESTIGADOR: Dr. Lluís Ramió i Torrentà
Unitat de Neuroimmunologia i Esclerosi Múltiple
Servei de Neurologia
Hospital Universitari Dr. Josep Trueta
Avda. de França s/n
17001- Girona

Cognoms:

Nom: Data:

Codi:

1. INFORMACIÓ AL PACIENT PARTICIPANT

1.1. INFORMACIÓ GENERAL

Ens dirigim a vostè per informar-lo sobre un projecte que duu a terme la Unitat de Neuroimmunologia i Esclerosi Múltiple de l'Hospital Universitari Dr. Josep Trueta, al qual se'l convida a participar. L'estudi ha estat ja revisat i aprovat pel Comitè Ètic de Investigació Clínica (CEIC) d'aquest hospital.

La col·laboració que li sol·licitem consisteix en la recollida d'una mostra de sang i una de líquid cefaloraquidi (LCR), però abans de res, necessitem el seu consentiment lliure i voluntari. Per això volem proporcionar-li la informació

correcta i suficient per que pugui valorar si vol o no participar en l'estudi. Per tant, llegeixi aquesta fulla informativa amb atenció i nosaltres li aclarirem els dubtes que li puguin sorgir.

Pot consultar la decisió amb les persones que consideri oportunes.

1.2. PARTICIPACIÓ VOLUNTÀRIA

Ha de saber que la seva participació en aquest estudi és voluntària i que pot decidir no participar o canviar la seva decisió i retirar el consentiment en qualsevol moment, sense que per això s'alteri la relació amb el seu metge ni es produeixi cap perjudici en el seu tractament.

En qualsevol moment pot sol·licitar informació complementària a l'equip del Dr. Lluís Ramió mitjançant el telèfon: 972 940200 ext. 2661 o a uniem.girona.ics@gencat.cat

1.3. DESCRIPCIÓ I OBJETIU DEL ESTUDI

Vostè està essent estudiat perquè els símptomes que té poden suggerir als metges que l'atenen que tingui una malaltia inflamatòria-desmielinitzant del sistema nerviós central. Una d'aquestes malalties és l'esclerosi múltiple tot i que hi ha altres malalties que poden donar uns símptomes semblants. Mitjançant aquestes i altres proves que li realitzaran els seus metges es pretén arribar al diagnòstic definitiu de la malaltia que vostè pateix.

L'esclerosi múltiple és una malaltia autoimmune complexa de causa desconeguda, però en la que es creu que tant factors ambientals com genètics participen en el seu desenvolupament. Els símptomes de la malaltia són causats per inflamacions i lesions a les neurones a nivell de sistema nerviós central (cervell, medul·la espinal i nervi òptic). Una de les tècniques utilitzades pel seu diagnòstic és la determinació de bandes oligoclonals d'IgG en LCR. Aquest, és un material molt important ja que es troba dins del SNC i és el material biològic més proper a l'entorn on es produeix la malaltia. En els últims anys una nova determinació ha adquirit importància, la determinació de bandes oligoclonals d'IgM que a més de reforçar el diagnòstic ens pot donar una idea de l'evolució i pronòstic de la malaltia.

A més a més, recentment s'han descrit gens que incrementen la susceptibilitat a desenvolupar la malaltia. El coneixement de les modificacions genètiques presents en cada pacient junt amb les seves característiques clíniques ens permetrà entendre millor el paper de cada un d'aquests gens en la causa de la malaltia.

Per això li demanem el seu consentiment per recollir líquid cefaloraquidi i sang, a partir de la qual obtindrem sèrum, plasma i material per a estudis genètics. Aquestes mostres seran degudament processades i guardades.

El material biològic no utilitzat en aquest estudi, s'emmagatzemarà per utilitzar-lo en futurs estudis si apareixen noves dades sobre aquesta malaltia o noves tècniques d'anàlisi i diagnòstic, tant en el nostre centre com per

tercers, sempre amb el vistiplau de la Unitat de Neuroimmunologia i Esclerosi Múltiple i del Comitè d'Ètic d'Investigació Clínica. No descartem que, en un futur, aquest material biològic es pugui introduir en un Biobanc tenint com a finalitat la investigació biomèdica.

1.4. MÈTODE D'OBTENCIÓ DE MOSTRES, PROCEDIMENTS I RISC ASSOCIAT

La mostra s'obté mitjançant una extracció de sang rutinària amb el risc associat a tota extracció (p. ex. dolor de menor importància, hematoma, infecció).

Referent al líquid cefaloraquídi, s'aprofitarà l'extracció realitzada pel diagnòstic per recollir un tub extra, evitant així un risc afegit per vostè. El risc de complicacions d'una punció lumbar és baix (dolor en el lloc de la punció, dolor radicular, hematoma, cefalea post-puncional, infecció) i es prendran les precaucions adequades per minimitzar aquests riscos (anestèsia local, posició en decúbit lateral, desinfecció, utilització d'agulla fina, repòs relatiu, ingesta abundant d'aigua).

Només en casos en els que no es disposi d'aquesta mostra es proposarà realitzar una nova punció lumbar, sempre previ a la seva acceptació.

Les mostres obtingudes seran etiquetades amb un codi per mantenir la confidencialitat del subjecte participant en l'estudi. Per la Llei de Biomedicina de 2007 (Llei 14/2007 de Investigació Biomèdica) la mostra sobrant de l'estudi serà utilitzada per futurs projectes relacionats amb aquest projecte o bé destruïda, segons la seva voluntat.

1.5. BENEFICIS

Probablement vostè no rebi cap benefici directa amb la seva participació en aquest projecte, però sí la satisfacció d'haver col·laborat en un projecte d'investigació que pot millorar el benestar i el tractament a pacients afectats de malalties inflamatòries-desmielinitzants del SNC.

Qualsevol troballa que es pugui aplicar al curs de la seva malaltia li serà indicada.

Vostè té dret a conèixer els resultats dels estudis que s'obtinguin a partir de l'anàlisi de les mostres donades. I també té dret a la no informació d'aquests resultats.

En el cas de resultats genètics rellevants per vostè o la seva família ens comprometem a oferir-li consell genètic.

1.6. CONFIDENCIALITAT

Les dades recollides seran estrictament confidencials. Només s'autoritzarà per la recollida de dades del seu historial mèdic a persones sotmeses al

secret professional sempre amb el previ coneixement del Dr. Ramió. Les mostres seran codificades per respectar l'anonimat.

En cap cas el seu nom apareixerà en la publicació dels resultats.

La seva privacitat està protegida per les lleis nacionals (LO15/1999, LGC5/2002 i per la llei 14/2007 de Investigació Biomèdica) i europea (95/46/CE). Aquestes lleis volen ajudar als investigadors a evitar accessos involuntaris a informació que podria exposar als pacients o a les seves famílies a efectes adversos econòmics, legals, psicològics i/o socials.

D'acord amb la llei LO15/1999, vostè pot exercir el seu dret a l'accés, modificació, oposició i cancel·lació de les seves dades. I també pot sol·licitar la destrucció de les seves mostres.

1.7. COMPENSACIÓ ECONÒMICA

La donació i la utilització de mostres biològiques humanes són gratuïtes. Per tant, per la seva participació en l'estudi no rebrà cap compensació econòmica.

En el cas que es produís un desenvolupament comercial dels coneixements generats, els possibles beneficis que es podrien rebre anirien íntegrament a cobrir els objectius científics del grup de investigació. Firmant aquest consentiment vostè renuncia als drets sobre qualsevol ús comercial amb la informació o mostres que vostè està cedint.

2. CONSENTIMENT INFORMAT

Jo

- He llegit el full informatiu que se m'ha entregat
- He pogut fer preguntes sobre l'estudi
- He rebut suficient informació sobre l'estudi
- He parlat amb:(nom del investigador).....
- Comprendc que la meva participació és voluntària
- Comprendc que les mostres obtingudes seran etiquetades amb un codi per mantenir la confidencialitat de les meves dades i que, d'acord amb la Llei de Biomedicina de 2007 (Llei 14/2007 de Investigació Biomèdica) la mostra sobrant de l'estudi serà utilitzada per futurs projectes relacionats amb aquest projecte o amb la seva malaltia o bé destruïda, segons la meva voluntat.
- Comprendc que puc revocar el meu consentiment en qualsevol moment, sense haver de donar explicacions i sense que això alteri la meva assistència sanitària.

Accedeix a que els investigadors principals del projecte (a l'equip Dr. Lluís Ramió) puguin contactar amb vostè en un futur si ho consideren oportú?

Sí

No

I lliurement, dono la meva conformitat per participar en l'estudi amb mostres de:

Sang

Líquid cefaloraquidi

Permeto que les meves mostres siguin utilitzades en investigacions futures relacionades amb la malaltia pel grup o per tercers i/o introduïdes en Biobanc

Permeto la utilització de les mostres en projectes futurs i/o per tercers

Permeto la introducció de les mostres en Biobanc

No permeto la utilització de les mostres en futurs projectes i/o per tercers ni que s'introdueixin en Biobanc

Firma del pacient:

Firma de l'investigador:

Data: ___ / ___ / ___

Data: ___ / ___ / ___

CONSENTIMENT INFORMAT DEL FAMILIAR RESPONSABLE O REPRESENTANT LEGAL

Jo (nom i cognoms)en qualitat de
 (relació amb el participant) de
 (nom i cognoms del participant)

- He llegit el full informatiu que se m'ha entregat
- He pogut fer preguntes sobre l'estudi
- He rebut suficient informació sobre l'estudi
- He parlat amb:(nom del investigador).....
- Comprenc que la meva participació és voluntària
- Comprenc que les mostres obtingudes seran etiquetades amb un codi per mantenir la confidencialitat de les meves dades i que, d'acord amb la Llei de Biomedicina de 2007 (Llei 14/2007 de Investigació Biomèdica) la mostra sobrant de l'estudi serà utilitzada per futurs projectes relacionats amb aquest projecte o amb la seva malaltia o bé destruïda, segons la meva voluntat.
- Comprenc que puc revocar el meu consentiment en qualsevol moment, sense haver de donar explicacions i sense que això alteri la meva assistència sanitària.

Accedeix a que els investigadors principals del projecte (a l'equip del Dr. Lluís Ramió) puguin contactar amb vostè en un futur si ho consideren oportú?

Sí

No

I lliurement, dono la meva conformitat per participar en l'estudi amb mostres de:

Sang

Líquid cefaloraquidi

Permeto que les meves mostres siguin utilitzades en investigacions futures relacionades amb la malaltia pel grup o per tercers i/o introduïdes en Biobanc

Permeto la utilització de les mostres en projectes futurs i/o per tercers

Permeto la introducció de les mostres en Biobanc

No permeto la utilització de les mostres en futurs projectes i/o per tercers ni que s'introdueixin en Biobanc

Firma del pacient:

Firma de l'investigador:

Data: __ __ / __ __ / __ __

Data: __ __ / __ __ / __ __

CONSENTIMENT INFORMAT SIGNAT DAVANT TESTIMONI

Jo (nom i cognoms) declaro sota la meua responsabilitat que (nom i cognoms del participant) ha llegit o se li ha llegit en cas de que no pugui llegir, el full d'informació i consentiment que se li ha entregat

- He llegit el full informatiu que se m'ha entregat
- He pogut fer preguntes sobre l'estudi
- He rebut suficient informació sobre l'estudi
- He parlat amb:(nom del investigador).....
- Comprendc que la meua participació és voluntària
- Comprendc que les mostres obtingudes seran etiquetades amb un codi per mantenir la confidencialitat de les meves dades i que, d'acord amb la Llei de Biomedicina de 2007 (Llei 14/2007 de Investigació Biomèdica) la mostra sobrant de l'estudi serà utilitzada per futurs projectes relacionats amb aquest projecte o amb la seva malaltia o bé destruïda, segons la meua voluntat.
- Comprendc que puc revocar el meu consentiment en qualsevol moment, sense haver de donar explicacions i sense que això alteri la meua assistència sanitària.

Accedeix a que els investigadors principals del projecte (a l'equip del Dr. Lluís Ramió) puguin contactar amb vostè en un futur si ho consideren oportú?

Sí

No

I lliurement, dono la meua conformitat per participar en l'estudi amb mostres de:

Sang

Líquid cefaloraquidi

Permeto que les meves mostres siguin utilitzades en investigacions futures relacionades amb la malaltia pel grup o per tercers i/o introduïdes en Biobanc

Permeto la utilització de les mostres en projectes futurs i/o per tercers

Permeto la introducció de les mostres en Biobanc

No permeto la utilització de les mostres en futurs projectes i/o per tercers ni que s'introdueixin en Biobanc

Firma del pacient:

Firma de l'investigador:

Data: __ __ / __ __ / __ __

Data: __ __ / __ __ / __ __

8.4. ANNEX 4: Full informatiu i Consentiment informat per pacient amb altres malalties neurològiques



FULL D'INFORMACIÓ AL PACIENT AMB ALTRES MALALTIES NEUROLÒGIQUES

ESTUDI: Determinació de marcadors biològics (genètics i bioquímics) en Esclerosi Múltiple i altres malalties inflamatòries i desmielinitzants del sistema nerviós central.

INVESTIGADOR: Dr. Lluís Ramió i Torrentà
Unitat de Neuroimmunologia i Esclerosi Múltiple
Servei de Neurologia
Hospital Universitari Dr. Josep Trueta
Avda. de França s/n
17001- Girona

Cognoms:

Nom: Data:

Codi:

1. INFORMACIÓ AL PACIENT PARTICIPANT

1.1. INFORMACIÓ GENERAL

Ens dirigim a vostè per informar-lo sobre un projecte que duu a terme la Unitat de Neuroimmunologia i Esclerosi Múltiple de l'Hospital Universitari Dr. Josep Trueta, al qual se'l convida a participar. L'estudi ha estat ja revisat i aprovat pel Comitè Ètic de Investigació Clínica (CEIC) d'aquest hospital.

La col·laboració que li sol·licitem consisteix en la recollida d'una mostra de sang i una de líquid cefaloraquidi (LCR), però abans de res, necessitem el seu consentiment lliure i voluntari. Per això volem proporcionar-li la informació correcta i suficient per que pugui valorar si vol o no participar en l'estudi. Per

tant, llegeixi aquesta fulla informativa amb atenció i nosaltres li aclarirem els dubtes que li puguin sorgir.

Pot consultar la decisió amb les persones que consideri oportunes.

1.2. PARTICIPACIÓ VOLUNTÀRIA

Ha de saber que la seva participació en aquest estudi és voluntària i que pot decidir no participar o canviar la seva decisió i retirar el consentiment en qualsevol moment, sense que per això s'alteri la relació amb el seu metge ni es produeixi cap perjudici en el seu tractament.

En qualsevol moment pot sol·licitar informació complementària a l'equip del Dr. Lluís Ramió mitjançant el telèfon: 972 940200 ext. 2661 o a uniem.girona.ics@gencat.cat

1.3. DESCRIPCIÓ I OBJECTIU DEL ESTUDI

Vostè està essent estudiat perquè els símptomes que té poden suggerir als metges que l'atenen que pateix una determinada malaltia neurològica o bé per tal de descartar-ne altres, i per això li realitzen una punció lumbar, on li extrauran líquid cefaloraquídi. Aquest líquid està en contacte amb el sistema nerviós central (SNC) i per tant és de gran vàlua per estudiar moltes malalties neurològiques.

La malaltia que els neuròlegs sospiten que vostè té necessita ésser estudiada en profunditat i pot tenir símptomes semblants a malalties neurològiques de base autoimmune, que són la base de la recerca del nostre grup d'investigació. Per a qualsevol estudi científic es necessiten mostres de pacients que no pateixen la malaltia que es vol estudiar (població control) i també de pacients amb malalties que comparteixin algunes característiques amb la malaltia d'estudi, per tal de confirmar l'especificitat dels resultats obtinguts. És per això, que li demanem el seu consentiment per recollir líquid cefaloraquídi i sang, a partir de la qual obtindrem sèrum, plasma i material per a estudis genètics. Aquestes mostres seran degudament processades i guardades.

El material biològic no utilitzat en aquest estudi, s'emmagatzemarà per utilitzar-lo en futurs estudis si apareixen noves dades sobre aquesta malaltia o noves tècniques d'anàlisi i diagnòstic, tant en el nostre centre com per tercers, sempre amb el vistiplau de la Unitat de Neuroimmunologia i Esclerosi Múltiple i del Comitè d'Ètic d'Investigació Clínica. No descartem que, en un futur, aquest material biològic es pugui introduir en un Biobanc tenint com a finalitat la investigació biomèdica.

1.4. MÈTODE D'OBTENCIÓ DE MOSTRES, PROCEDIMENTS I RISC ASSOCIAT

La mostra s'obté mitjançant una extracció de sang rutinària amb el risc associat a tota extracció (p. ex. dolor de menor importància, hematoma, infecció).

Referent al líquid cefaloraquídi, s'aprofitarà l'extracció realitzada pel diagnòstic per recollir un tub extra, evitant així un risc afegit per vostè. El risc de complicacions d'una punció lumbar és baix (dolor en el lloc de la punció, dolor radicular, hematoma, cefalea post-puncional, infecció) i es prendran les precaucions adequades per minimitzar aquests riscos (anestèsia local, posició en decúbit lateral, desinfecció, utilització d'agulla fina, repòs relatiu, ingesta abundant d'aigua).

Només en casos en els que no es disposi d'aquesta mostra es proposarà realitzar una nova punció lumbar, sempre previ a la seva acceptació.

Les mostres obtingudes seran etiquetades amb un codi per mantenir la confidencialitat del subjecte participant en l'estudi. Per la Llei de Biomedicina de 2007 (Llei 14/2007 de Investigació Biomèdica) la mostra sobrant de l'estudi serà utilitzada per futurs projectes relacionats amb aquest projecte o bé destruïda, segons la seva voluntat.

1.5. BENEFICIS

Probablement vostè no rebi cap benefici directa amb la seva participació en aquest projecte, però sí la satisfacció d'haver col·laborat en un projecte d'investigació que pot millorar el benestar i el tractament a pacients afectats de malalties inflamatòries-desmielinitzants del SNC.

Qualsevol troballa que es pugui aplicar al curs de la seva malaltia li serà indicada.

Vostè té dret a conèixer els resultats dels estudis que s'obtinguin a partir de l'anàlisi de les mostres donades. I també té dret a la no informació d'aquests resultats.

En el cas de resultats genètics rellevants per vostè o la seva família ens comprometem a oferir-li consell genètic.

1.6. CONFIDENCIALITAT

Les dades recollides seran estrictament confidencials. Només s'autoritzarà per la recollida de dades del seu historial mèdic a persones sotmeses al secret professional sempre amb el previ coneixement del Dr. Ramió. Les mostres seran codificades per respectar l'anonimat.

En cap cas el seu nom apareixerà en la publicació dels resultats.

La seva privacitat està protegida per les lleis nacionals (LO15/1999, LGC5/2002 i per la llei 14/2007 de Investigació Biomèdica) i europea (95/46/CE). Aquestes lleis volen ajudar als investigadors a evitar accessos involuntaris a informació que podria exposar als pacients o a les seves famílies a efectes adversos econòmics, legals, psicològics i/o socials.

D'acord amb la llei LO15/1999, vostè pot exercir el seu dret a l'accés, modificació, oposició i cancel·lació de les seves dades. I també pot sol·licitar la destrucció de les seves mostres.

1.7. COMPENSACIÓ ECONÒMICA

La donació i la utilització de mostres biològiques humanes són gratuïtes. Per tant, per la seva participació en l'estudi no rebrà cap compensació econòmica.

En el cas que es produís un desenvolupament comercial dels coneixements generats, els possibles beneficis que es podrien rebre anirien íntegrament a cobrir els objectius científics del grup de investigació. Firmant aquest consentiment vostè renuncia als drets sobre qualsevol ús comercial amb la informació o mostres que vostè està cedint.

2. CONSENTIMENT INFORMAT

Jo

- He llegit el full informatiu que se m'ha entregat
- He pogut fer preguntes sobre l'estudi
- He rebut suficient informació sobre l'estudi
- He parlat amb:(nom del investigador).....
- Comprendc que la meva participació és voluntària
- Comprendc que les mostres obtingudes seran etiquetades amb un codi per mantenir la confidencialitat de les meves dades i que, d'acord amb la Llei de Biomedicina de 2007 (Llei 14/2007 de Investigació Biomèdica) la mostra sobrant de l'estudi serà utilitzada per futurs projectes relacionats amb aquest projecte o amb la malaltia o bé destruïda, segons la meva voluntat.
- Comprendc que puc revocar el meu consentiment en qualsevol moment, sense haver de donar explicacions i sense que això alteri la meva assistència sanitària.

Accedeix a que els investigadors principals del projecte (a l'equip Dr. Lluís Ramió) puguin contactar amb vostè en un futur si ho consideren oportú?

Sí

No

I lliurement, dono la meva conformitat per participar en l'estudi amb mostres de:

Sang

Líquid cefaloraquidi

Permeto que les meves mostres siguin utilitzades en investigacions futures relacionades amb la malaltia pel grup o per tercers i/o introduïdes en Biobanc

Permeto la utilització de les mostres en projectes futurs i/o per tercers

Permeto la introducció de les mostres en Biobanc

No permeto la utilització de les mostres en futurs projectes i/o per tercers ni que s'introdueixin en Biobanc

Firma del pacient:

Firma de l'investigador:

Data: ___ / ___ / ___

Data: ___ / ___ / ___

CONSENTIMENT INFORMAT DEL FAMILIAR RESPONSABLE O REPRESENTANT LEGAL

Jo (nom i cognoms)en qualitat de
 (relació amb el participant) de
 (nom i cognoms del participant)

- He llegit el full informatiu que se m'ha entregat
- He pogut fer preguntes sobre l'estudi
- He rebut suficient informació sobre l'estudi
- He parlat amb:(nom del investigador).....
- Comprenc que la meva participació és voluntària
- Comprenc que les mostres obtingudes seran etiquetades amb un codi per mantenir la confidencialitat de les meves dades i que, d'acord amb la Llei de Biomedicina de 2007 (Llei 14/2007 de Investigació Biomèdica) la mostra sobrant de l'estudi serà utilitzada per futurs projectes relacionats amb aquest projecte o amb la malaltia o bé destruïda, segons la meva voluntat.
- Comprenc que puc revocar el meu consentiment en qualsevol moment, sense haver de donar explicacions i sense que això alteri la meva assistència sanitària.

Accedeix a que els investigadors principals del projecte (a l'equip del Dr. Lluís Ramió) puguin contactar amb vostè en un futur si ho consideren oportú?

Sí

No

I lliurement, dono la meva conformitat per participar en l'estudi amb mostres de:

Sang

Líquid cefaloraquidi

Permeto que les meves mostres siguin utilitzades en investigacions futures relacionades amb la malaltia pel grup o per tercers i/o introduïdes en Biobanc

Permeto la utilització de les mostres en projectes futurs i/o per tercers

Permeto la introducció de les mostres en Biobanc

No permeto la utilització de les mostres en futurs projectes i/o per tercers ni que s'introdueixin en Biobanc

Firma del pacient:

Firma de l'investigador:

Data: __ __ / __ __ / __ __

Data: __ __ / __ __ / __ __

CONSENTIMENT INFORMAT SIGNAT DAVANT TESTIMONI

Jo (nom i cognoms) declaro sota la meua responsabilitat que (nom i cognoms del participant) ha llegit o se li ha llegit en cas de que no pugui llegir, el full d'informació i consentiment que se li ha entregat

- He llegit el full informatiu que se m'ha entregat
- He pogut fer preguntes sobre l'estudi
- He rebut suficient informació sobre l'estudi
- He parlat amb:(nom del investigador).....
- Comprenc que la meua participació és voluntària
- Comprenc que les mostres obtingudes seran etiquetades amb un codi per mantenir la confidencialitat de les meves dades i que, d'acord amb la Llei de Biomedicina de 2007 (Llei 14/2007 de Investigació Biomèdica) la mostra sobrant de l'estudi serà utilitzada per futurs projectes relacionats amb aquest projecte o amb la malaltia o bé destruïda, segons la meua voluntat.
- Comprenc que puc revocar el meu consentiment en qualsevol moment, sense haver de donar explicacions i sense que això alteri la meua assistència sanitària.

Accedeix a que els investigadors principals del projecte (a l'equip del Dr. Lluís Ramió) puguin contactar amb vostè en un futur si ho consideren oportú?

Sí

No

I lliurement, dono la meua conformitat per participar en l'estudi amb mostres de:

Sang

Líquid cefaloraquidi

Permeto que les meves mostres siguin utilitzades en investigacions futures relacionades amb la malaltia pel grup o per tercers i/o introduïdes en Biobanc

Permeto la utilització de les mostres en projectes futurs i/o per tercers

Permeto la introducció de les mostres en Biobanc

No permeto la utilització de les mostres en futurs projectes i/o per tercers ni que s'introdueixin en Biobanc

Firma del pacient:

Firma de l'investigador:

Data: __ __ / __ __ / __ __

Data: __ __ / __ __ / __ __

