



UNIVERSITAT DE
BARCELONA

Expresión del gen de la proteína MxA como biomarcador de respuesta al interferón beta en pacientes con esclerosis múltiple

Elisabet Matas Martín

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

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

WARNING. On having consulted this thesis you're accepting the following use conditions: Spreading this thesis by the TDX (www.tdx.cat) service and by the UB Digital Repository (diposit.ub.edu) has been authorized by the titular of the intellectual property rights only for private uses placed in investigation and teaching activities. Reproduction with lucrative aims is not authorized nor its spreading and availability from a site foreign to the TDX service or to the UB Digital Repository. Introducing its content in a window or frame foreign to the TDX service or to the UB Digital Repository is not authorized (framing). Those rights affect to the presentation summary of the thesis as well as to its contents. In the using or citation of parts of the thesis it's obliged to indicate the name of the author.



UNIVERSITAT DE
BARCELONA

TESIS DOCTORAL

EXPRESIÓN DEL GEN DE LA PROTEÍNA MxA COMO
BIOMARCADOR DE RESPUESTA AL INTERFERÓN
BETA EN PACIENTES CON ESCLEROSIS MÚLTIPLE

Doctorando

Elisabet Matas Martín

Directores

Dr. Sergio Martínez Yélamos

Dr. Francisco Rubio Borrego

**Programa Doctorat de Medicina
Universitat de Barcelona
2016**



Sergio Martínez Yélamos, Profesor Asociado de la Facultad de Medicina de la Universitat de Barcelona y Francisco Rubio Borrego, Profesor Titular de la Facultad de Medicina de la Universidad de Barcelona

CERTIFICAMOS:

que la memoria titulada “**Expresión del gen de la proteína MxA como biomarcador de respuesta al interferón beta en pacientes con Esclerosis Múltiple**”, presentada por Elisabet Matas Martín para optar al grado de Doctor en Medicina por la Universitat de Barcelona, ha sido realizada bajo nuestra dirección y reúne las condiciones necesarias para ser defendida ante el Tribunal correspondiente.

Dr. Sergio Martínez Yélamos

Dr. Francisco Rubio Borrego

ÍNDICE

ÍNDICE

I. ABREVIATURAS.....	13
II. INTRODUCCIÓN.....	17
1 Esclerosis Múltiple.....	19
1.1 Definición.....	19
1.2 Fisiopatología de la EM.....	19
1.3 Formas de EM.....	20
1.4 Historia natural de la EM.....	21
1.5 Tratamientos disponibles.....	22
1.6 Biomarcadores	23
2 Interferón- β	24
2.1 Introducción.....	24
2.2 Mecanismo de acción.....	25
2.3 Tipos de Interferón- β	27
2.4 Eficacia del Interferón- β : estudios pivote.....	28
2.5 Causas de pérdida de eficacia del Interferón- β	29
3 Anticuerpos frente al Interferón- β	31
3.1 Definición y tipos.....	31
3.2 BAbs.....	32
3.3 NAbs.....	32
3.4 Impacto de los NAbs en la EM.....	34
3.5 Evaluación de los NAbs.....	35
4 <i>Myxovirus resistance A</i> (MxA).....	36
4.1 Introducción.....	36
4.2 Evaluación de MxA.....	36
4.3 <i>IFN signature</i>	38
4.4 Utilidad clínica de la expresión de la MxA.....	39

III. HIPÓTESIS.....	41
IV. OBJETIVOS.....	45
V. PACIENTES, MATERIAL Y MÉTODOS.....	49
VI. RESULTADOS.....	53
1. Trabajo 1: Baseline MxA mRNA expression predicts Interferon Beta response in multiple sclerosis patients.....	55
2. Trabajo 2: Absence of MxA induction is related to a poor clinical response to interferon beta treatment in multiple sclerosis patients.....	63
3. Trabajo 3: MxA mRNA expression as a biomarker of interferon Beta response in multiple sclerosis patients.....	73
VII. DISCUSIÓN.....	81
1. Resumen de los resultados y discusión conjunta.....	83
2. Relevancia.....	87
3. Limitaciones.....	87
4. Perspectivas de futuro.....	88
VIII. CONCLUSIONES.....	89
IX. BIBLIOGRAFÍA.....	93

I. ABREVIATURAS

A-549	Línea de células de carcinoma pulmonar
BAbs	Anticuerpos anti-interferón (<i>Binding antibodies</i>)
BOC	Bandas oligoclonales de IgG
cDNA	DNA complementario
CHO-K1	Células de ovario de hámster chino
CIS	Síndrome clínico aislado
CPE	Efecto citopático
CXCL13	Quimiocina CXC ligando 13
EDMUS	<i>European Database for Multiple Sclerosis</i>
EDSS	<i>Expanded Disability Status Scale</i>
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético
EIA	Enzima inmunoensayo
ELISA	Ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas
EM	Esclerosis Múltiple
EMRR	Esclerosis múltiple remitente recurrente
EMSP	Esclerosis múltiple secundaria progresiva
EMPP	Esclerosis múltiple primaria progresiva
EMPR	Esclerosis múltiple progresiva con brotes
GAS	Secuencias activadas por interferón gamma
GFAP	Proteína ácida fibrilar glial
IFNAR-1	subunidad de receptor Interferón- α tipo 1
IFNAR-2	subunidad de receptor Interferón- α tipo 2
IFN	Interferón
IFN-β	Interferón beta
IFN-α	Interferón alfa
IFN-γ	Interferón gamma
IM	Intramuscular
IRF-1	Factor regulador del Interferón 1
IRF-2	Factor regulador del interferón 2
IRF-9	Factor regulador del interferón 9
IRM	Resonancia magnética
IRSE	Elementos de respuesta estimulados por Interferón

ISG	Genes estimulados por interferón
ISGF-3	Factor génico 3 estimulado por interferón
JAK-1	<i>Janus Activated Kinase</i> /Cinasa activada Janus tipo 1
LCR	Líquido cefalorraquídeo
LU	Unidades de laboratorio
mcg	microgramos
MIU	millones de unidades internacionales
mL	Mililitro
MMPs	Metaloproteinasas de matriz extracelular
mRNA	RNA mensajero
MxA	<i>Myxovirus resistance A</i>
MXA	<i>Myxovirus resistance protein A</i>
NAbs	Anticuerpos neutralizantes anti-interferón
NMO	Neuromielitis óptica de Devic
NF-L	Neurofilamentos de cadena ligera
NF-H	Neurofilamentos de cadena pesada
NGF	Factor de crecimiento neuronal
OAS1	2'-5'-oligoadenilato sintetasa 1
OMS	Organización mundial de la salud
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
qc-PCR	Reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa-competitiva
RT-PCR	Reacción en cadena de la polimerasa a tiempo real
SC	Subcutáneo
SNC	Sistema nervioso central
STAT-1	transductor de señal y activador de la transcripción 1
STAT-2	transductor de señal y activador de la transcripción 2
STAT-3	transductor de señal y activador de la transcripción 3
S100B	Proteína de unión al Calcio tipo B
Tyk2	Tirosin cinasa asociada al receptor del IFN tipo 2
VCAM-1	molécula de adhesión vascular 1
VLA-4	Integrina $\alpha 4\beta 1$
YKL-40	<i>Chitinase-3-like 1</i>

II. INTRODUCCIÓN

1. Esclerosis Múltiple

1.1 Definición

La esclerosis múltiple (EM) es una enfermedad desmielinizante, crónica y autoinmune que afecta al sistema nervioso central (SNC). Se caracteriza por la presencia de inflamación, desmielinización, pérdida axonal y gliosis detectadas en muestras anatomopatológicas. Afecta principalmente a adultos jóvenes y es una de las principales causas de discapacidad en ese rango de edad (1). La prevalencia media actual en España se estima en 60-65 casos/100.000 habitantes, con una incidencia media de alrededor de 3,5 casos por 100.000 habitantes-año (2,3). Su causa es desconocida aunque se acepta que la interacción de factores ambientales junto con cierta predisposición genética genera una alteración en la respuesta inmune que desencadena el desarrollo de la enfermedad.

1.2 Fisiopatología de la EM

La EM se caracteriza por la presencia de lesiones en forma de placa localizadas principalmente en la sustancia blanca del SNC y que presentan una disposición perivenular. Se caracterizan por una infiltración linfo-monocitaria, desmielinización, daño axonal, gliosis y pérdida de oligodendrocitos. Además de la sustancia blanca, también se encuentran lesiones en otras áreas del cerebro como en córtex o nervios y tractos ópticos.

Se considera una enfermedad mediada por el sistema inmunitario: los linfocitos T autorreactivos contra antígenos del SNC, como podrían ser antígenos de la mielina, se activarían en la periferia a través de, probablemente, mecanismos de mimetismo molecular o de activación policlonal por antígenos virales o bacterianos. Estas células T activadas producirían citocinas inflamatorias que activarían las células endoteliales, dando lugar a una mayor expresión de moléculas de adhesión que facilitarían la extravasación de células inflamatorias al SNC. Durante este proceso, se activan otros mediadores de la inflamación como las metaloproteinasas de matriz extracelular (MMPs) que favorecerían la degradación de la barrera hematoencefálica, facilitando la migración de las células inflamatorias. Una vez en el SNC, las células T autorreactivas reconocen el antígeno y se desencadena una respuesta inflamatoria mediada por citocinas de tipo Th1, dando lugar a la

activación de macrófagos y células B, que permitirán un segundo reclutamiento de células inflamatorias así como una secreción de mediadores citotóxicos como óxido nítrico y radicales libres que lesionarán la vaina de mielina. Las células B, tras diferenciarse a células plasmáticas, secretarán anticuerpos y activarán el complemento, contribuyendo al proceso de desmielinización. También se reconoce la participación tanto de las células del tipo CD4 Th2 como de las células T CD8 y otro fenotipo, el Th17, que también contribuye al proceso inflamatorio gracias al incremento del reclutamiento de células CD4. En cuanto al daño axonal, se correlaciona con la inflamación aunque no siempre se relaciona con la desmielinización activa y se ha detectado ya en las fases precoces de la enfermedad. Diversos estudios sugieren que la degeneración axonal es el principal determinante de la progresión de la discapacidad (4,5). Generalmente se produce por un daño directo sobre el axón de las células CD8, macrófagos y microglia por el ambiente inflamatorio producido por las citocinas y otros factores solubles, o también por la falta de soporte trófico del axón debido a la pérdida de mielina. En la EM se detecta remielinización a través de los progenitores de los oligodendrocitos, lo que permite a algunos axones recuperar su capacidad de transmitir los potenciales de acción. En ocasiones esta remielinización puede ser incompleta, lo que puede ser debido a episodios repetidos de desmielinización, a la presencia de factores tóxicos que inhiben la migración de células progenitoras a la lesión o a la hiperplasia de astrocitos y gliosis que supone una barrera física para la llegada tanto de factores tróficos como de células progenitoras (1,6).

1.3 Formas de EM

Históricamente se reconocen varias formas de enfermedad que se distinguen por la presencia de brotes y de progresión. Se define como brote la aparición o empeoramiento de una disfunción neurológica de más de 24 horas de duración, precedida de un periodo de estabilidad y en ausencia de fiebre (7). En 1996, se llegó a un consenso que permitió la estandarización de la terminología utilizada para describir las diferentes formas de enfermedad (8). Las diferentes categorías fueron:

EM Remitente Recurrente (EMRR): brotes definidos, con recuperación completa o con secuelas, y periodos entre brotes caracterizados por ausencia de progresión.

EM Secundaria Progresiva (EMSP): curso inicial RR que se continúa con progresión con o sin brotes y con remisiones y estabilizaciones ocasionales

EM Primaria progresiva (EMPP): enfermedad progresiva desde el inicio. Ocasionales estabilizaciones y mejorías temporales permitidas.

EM Progresiva con brotes (EMPR): enfermedad progresiva desde el inicio con claros brotes durante el curso de la enfermedad. Los periodos entre brotes se caracterizan por progresión continua.

Recientemente se ha llegado a un nuevo consenso (9) en el que se establecen dos fenotipos principales: enfermedad con brotes (EMRR o síndrome clínico aislado (CIS)) y progresiva (EMPP o EMSP). En función de la actividad, ya sea radiológica o en forma de brotes, se subclasifican en enfermedad activa o no activa. Así, con la nueva clasificación, nos encontraríamos con diferentes fenotipos: CIS no activo o activo (en el caso del CIS activo se podría considerar EMRR si cumpliera criterios diagnósticos de EM (10)), EMRR no activa o activa, enfermedad progresiva activa con progresión o sin progresión y enfermedad progresiva no activa con y sin progresión (estable). La utilización de marcadores de actividad y de progresión facilitará el diseño y reclutamiento en ensayos clínicos así como estudios para evaluar la decisión de discontinuar tratamientos.

1.4 Historia Natural de la EM

La EM es una enfermedad con un comportamiento heterogéneo y diferentes fenotipos clínicos que oscila entre formas benignas y formas altamente agresivas. Alrededor de un 80% de los pacientes presentarán un episodio de déficit neurológico focal agudo como debut de la enfermedad mientras que el 20% restante lo hará en forma de enfermedad progresiva desde el inicio. Aproximadamente un 65% de los pacientes con forma EMRR desarrollarán una forma progresiva en el curso de su enfermedad. Tanto en el caso de las formas progresivas desde el inicio como en las secundarias, la progresión suele iniciarse hacia los 40 años, sucediendo esto de forma relativamente independiente a la edad de inicio de los síntomas (11).

En cuanto a la tasa anualizada de brotes, se estima: que se encuentra entre 0.3 y 1.1 brotes/año en función de que la serie estudiada sea retrospectiva o prospectiva (12,13), que es menor en pacientes con inicio de la enfermedad a edades más avanzadas (14) y que esta tasa tiende a disminuir conforme avanza la enfermedad (12). Recientes estudios han documentado una tendencia al descenso en la tasa anualizada de brotes respecto a la descrita en los estudios iniciales

(15). Se acepta en general que una tasa de 0.5 brotes/año sería representativa para los pacientes con formas EMRR (1).

Respecto a la supervivencia, diversos estudios muestran que la mediana del tiempo desde el debut hasta la muerte en pacientes con EM es de 31 años, lo que representa una disminución en la esperanza de vida de unos 5-10 años con respecto a la población general, debida generalmente a las complicaciones en pacientes discapacitados y a las derivadas de la inmovilización. Esta diferencia parece estar disminuyendo progresivamente en las últimas décadas (1).

En cuanto a los factores pronósticos que pueden ayudar a predecir que pacientes van a desarrollar antes una mayor discapacidad o una forma progresiva, se han llevado a cabo diferentes estudios tanto en series hospitalarias como de base poblacional. Se acepta que los varones, el inicio tardío de la EM, el intervalo menor entre el inicio de la EM y el siguiente brote, el mayor número de brotes en los primeros 2 o 5 años y los pacientes con formas de EMPP alcanzan antes una mayor discapacidad. El brote de inicio multifocal y la recuperación con secuelas se asocian también a una mayor discapacidad. Respecto a los síntomas de inicio, los pacientes con neuritis óptica o síntomas sensitivos se asocian a una evolución más lenta de la discapacidad. (13,16-19). En cualquier caso, estos factores son solo orientativos. La EM es una enfermedad que muestra una gran variabilidad interindividual en su comportamiento, lo que hace difícil prever el curso clínico de cada paciente.

1.5 Tratamientos disponibles

En la actualidad, existen diversos fármacos disponibles para el tratamiento de las formas de EM con actividad, con diferente perfil de seguridad y de eficacia.

Los primeros fármacos que se ensayaron durante la década de los 80 fueron principalmente inmunosupresores, entre ellos la Azatioprina, Ciclosporina o Ciclofosfamida (20) y posteriormente, a principios de los 90, la Mitoxantrona (1,21). No fue hasta mediados de los 90 cuando se publicaron los primeros resultados de eficacia del Interferón beta (IFN- β) como tratamiento de la EM. A lo largo de los años posteriores se aprobaron las distintas formas de Interferón beta (IFN- β -1a intramuscular, IFN- β -1a e IFN- β -1b subcutáneos) (22-24) y en el año 2001, el tratamiento con Acetato de glatiramero en Europa (25). A lo largo del siglo XXI han aparecido nuevos fármacos con un perfil de eficacia superior a los utilizados hasta entonces pero también con mayor riesgo de

efectos adversos. El primero de ellos fue el Natalizumab (26,27), apareciendo posteriormente el Fingolimod (28,29) y a lo largo del 2013-14 se ha aprobado el uso de la Teriflunomida (30,31), el Dimetil Fumarato (32,33) y el Alemtuzumab (34,35) en Europa para formas de EMRR. Así mismo, durante el 2014 también se ha aprobado el uso del Peginterferon beta-1a, una forma de Interferón pegilado con una eficacia similar al resto de Interferones pero con una frecuencia de administración inferior (36).

1.6 Biomarcadores

Se define biomarcador como una característica que puede evaluarse y medirse de forma objetiva y que proporciona información sobre procesos biológicos normales o patológicos o sobre la respuesta farmacológica a una intervención terapéutica (37). La investigación de biomarcadores en EM se ha convertido en un objetivo de gran interés en las últimas décadas, con tres áreas de investigación principal: la búsqueda de biomarcadores de susceptibilidad de la enfermedad, es decir, que permitan predecir qué individuos tienen mayor riesgo de desarrollar una EM, biomarcadores de progresión que nos permitirían seleccionar aquellos pacientes con mayor riesgo de desarrollar una forma progresiva o más agresiva de la enfermedad y biomarcadores de respuesta al tratamiento, lo que nos facilitaría la selección de tratamientos más adecuados para cada paciente (38,39).

En la actualidad, se han validado escasos biomarcadores y se utilizan en la práctica clínica habitual. El uso de la detección de las bandas oligoclonales de IgG (BOC) o el índice IgG elevado en líquido cefalorraquídeo (LCR) se remonta a la década de los 60, no siendo hasta los 80 cuando las BOC fueron incluidas en los criterios diagnósticos de Poser (40). Su utilidad en la actualidad se centra tanto en el diagnóstico de la EM como en su uso como factor pronóstico de conversión de CIS a EM definida (41). Así mismo, se ha observado que la presencia de bandas oligoclonales de IgM también predecirían la conversión de CIS a EM definida y que supondría un mayor riesgo de brotes y de progresión de la enfermedad (42,43). Recientemente se han estudiado otros biomarcadores en LCR, entre ellos los de daño axonal como la detección de neurofilamentos tanto de cadena ligera (NF-L) como pesada (NF-H), ambos incrementados en pacientes con EM comparados con controles sanos (44). La detección de NFL-L al diagnóstico es un factor predictivo de severidad y de paso a formas progresivas así como de conversión de CIS a EM definida (45,46). Otros marcadores de daño neuronal y glial como la Proteína ácida fibrilar glial (GFAP) muestra niveles incrementados en

pacientes con EM, correlacionándose con la presencia de mayor discapacidad (46,47). También se ha estudiado el YKL-40 (*Chitinase-3-like 1*), expresado por la microglia y por los astrocitos activados, como biomarcador en la EM. La detección de títulos elevados se asoció con mayor probabilidad de conversión a EM y con mayor y más rápida progresión de la discapacidad (46,48). Otros biomarcadores como la CXCL13 (quimiocina CXC ligando 13), S100B (proteína de unión al calcio tipo B) u otros están siendo investigados aunque algunos de ellos muestran ciertas limitaciones como su incremento en el contexto de otras enfermedades inflamatorias o coincidiendo con los brotes, lo que disminuiría su potencial utilidad. En cuanto a los biomarcadores de respuesta al tratamiento, en la actualidad ninguno ha proporcionado suficiente valor predictivo para poder ser aplicado en la práctica clínica. Únicamente la detección de anticuerpos neutralizantes frente al IFN- β o frente al Natalizumab se utilizan de forma habitual, aunque su capacidad predictiva es baja puesto que la falta de eficacia aparece antes de que éstos se detecten.

2. Interferón- β

2.1 Introducción

El interferón (IFN) endógeno es una citoquina que pertenece a la familia del interferón tipo 1 y que actúa a través de su unión a un receptor de elevada afinidad en la superficie celular. Esto provoca la transcripción de factores que modifican la expresión génica, dando lugar a proteínas que son responsables del efecto antiviral, antiproliferativo y antiinflamatorio observado.

Como tratamiento para la EM, los interferones empezaron a utilizarse en la década de los 80, basándose principalmente en su efecto antiviral. Inicialmente se utilizaron los diferentes tipos de interferón, tanto beta como alfa y gamma, de forma indistinta por vía intratecal y sistémica. Tras varios estudios piloto se determinó que el uso del interferón beta recombinante era efectivo por vía parenteral, a diferencia del interferón alfa cuyos resultados no fueron concluyentes (49,50) y el interferón gamma con efectos perjudiciales (51).

Posteriormente se llevaron a cabo los diferentes estudios pivotaes que permitieron la aprobación por las autoridades sanitarias del uso del IFN- β para la EM (22-24).

2.2 Mecanismo de acción

Los interferones juegan un papel importante en la inmunidad innata, inhibiendo la replicación de patógenos virales, bacterianos y parásitos, pero también en la comunicación entre inmunidad innata y adaptativa para preservar la integridad inmunológica. Se trata de una compleja familia de citoquinas que se clasifican en tres grupos: tipo I, tipo II y tipo III. El interferón beta pertenece al tipo I, así como también el interferón alfa (IFN- α) y otros, mientras que el interferón gamma (IFN- γ) pertenecería al grupo II. Su acción depende principalmente de varios mecanismos: la inhibición de la activación de las células T, la modulación de la producción de citoquinas y la reducción en la migración de las células T (1,52-54). Respecto al primer punto, el interferón beta reduce los niveles de expresión de moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad tipo II en las células presentadoras de antígeno, lo que da lugar a una disminución en la activación de las células T (55). Esto impediría la llegada de células T y la posterior presentación antigénica en el SNC, dificultando la amplificación de la respuesta inmune. Además, el IFN- β reduce la expresión de moléculas coestimuladoras que participan en el proceso de presentación antigénica (como CD80 o CD28), dando lugar a un descenso en la capacidad de activación de células T (56). En cuanto al segundo punto, el Interferón produciría un cambio en la respuesta inflamatoria a un perfil Th2 con secreción de citoquinas antiinflamatorias (IL-4, IL-10) y una disminución en la secreción de citoquinas proinflamatorias del tipo Th1 (IL-2, IL-12, IL-17, IFN- γ) (57). También se ha observado que disminuye la expresión de la Integrina $\alpha 4\beta 1$ (VLA-4) en la superficie de las células T y de MMPs, responsables de facilitar la degradación de la barrera hematoencefálica (58). Por otra parte incrementa el desprendimiento de moléculas de adhesión vascular tipo 1 (VCAM-1) del endotelio, aumentando la concentración de VCAM-1 solubles a los que se unirán los linfocitos a través del VLA-4, generando así un mecanismo de engaño y reduciendo su unión con el VCAM-1 del endotelio (59). Además, se sugiere que podría haber una disminución en la transcripción génica de moléculas de adhesión, dando todo esto lugar a una reducción en la migración de células inflamatorias a través de la barrera hematoencefálica, lo que correspondería al tercer punto (60). Otros mecanismos implicados incluirían un incremento en la producción de células CD56^{bright}NK, encargadas de la secreción de citocinas antiinflamatorias, particularmente IL-10 y de controlar las respuestas inmunes a través de su interacción con las células T en tejido linfoide y en SNC (61). Por otra parte, se postula un potencial efecto favorecedor de la reparación a nivel del SNC a través del fomento de la expresión del factor de crecimiento neuronal (NGF) (62).

Los efectos del IFN- β dependen de su unión a un receptor específico en la superficie celular, formado por un complejo de subunidades de receptor IFN- α tipo 1 (IFNAR-1) y tipo 2 (IFNAR-2). Tras esta unión, se produce la heterodimerización del receptor y la activación de la cinasa activada Janus tipo 1 (JAK-1) y de la tirosin cinasa asociada al receptor del IFN tipo 2 (Tyk2), iniciando una cascada de segundos mensajeros intracelulares que derivan en dos vías: la primera conduce a la activación de la transcripción del factor génico 3 estimulado por interferón (ISGF-3), un complejo formado por los transductores de señal y activadores de la transcripción STAT-1 y STAT-2 fosforilados junto al factor regulador de IFN 9 (IRF-9). Este complejo se translocaría al núcleo y se uniría a los elementos de respuesta estimulados por IFN (IRSE) presente en múltiples genes. La segunda vía implica heterodímeros de STAT-1/2 y de STAT-2/3 y homodímeros de STAT-1 que se unen a las secuencias activadas por interferón gamma (GAS). Finalmente, los productos derivados de la activación de ISRE y de GAS provocan cambios en una gran variedad de genes, conocidos como genes estimulados por IFN (ISG), dando lugar a cambios en su transcripción. (Fig. 1.)

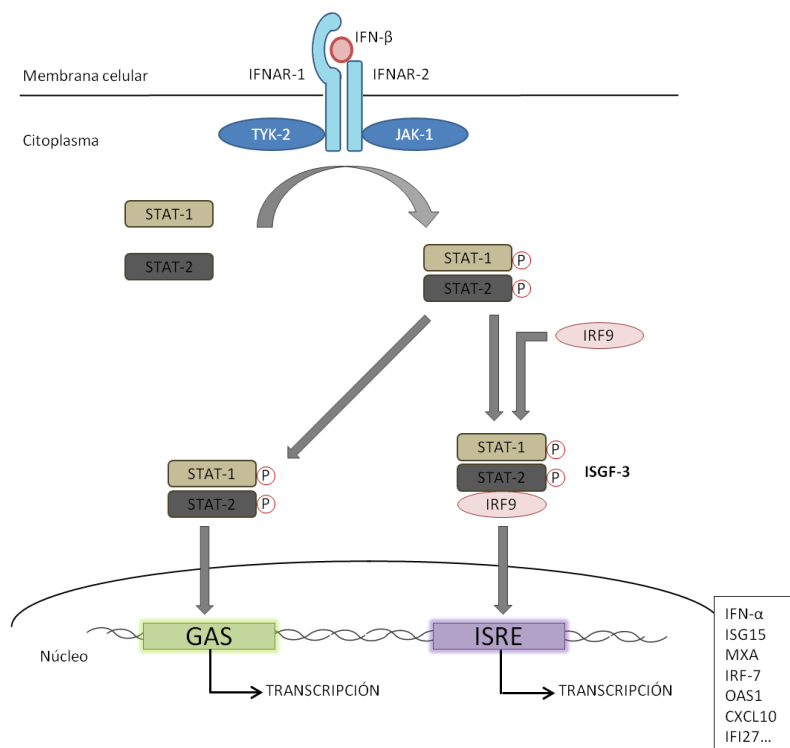


Figura 1: Receptor y vía de señalización del interferón tipo I

Ejemplos de estos genes serían los que transcriben proteínas tales como IFN- α , ISG15, MxA (*Mixovirus resistance A*), IRF-7 u OAS1 (2'-5'-oligo-adenilato sintetasa 1). También incluye genes como el de IRF-1 (*IFN regulatory factor-1*), el primer regulador positivo de la transcripción del Interferón tipo I, el de IRF-2, un inhibidor de la transcripción del Interferón tipo I (encargado de devolver la transcripción de los genes estimulados por el Interferón a su nivel basal) y hasta el propio gen del IFN- β (63-66).

2.3 Tipos de Interferón- β

Actualmente se dispone de cuatro productos diferentes de IFN- β recombinante aprobados para el tratamiento de la EM: Rebif (IFN- β -1a subcutáneo administrado 3 veces/semana, con presentación de dos dosis, 22 y 44 mcg), Betaferon/Extavia (IFN- β -1b subcutáneo administrado cada 48h, presentado a dosis de 250 mcg/ml) Avonex (IFN- β -1a intramuscular administrado 1 vez por/semana a dosis de 30 mcg/ml) y Plegridy (IFN- β -1a pegilado administrado por vía subcutánea quincenalmente a dosis de 125 mcg), este último aprobado durante el año 2014.

El IFN- β -1a se produce por tecnología de ADN recombinante en células de ovario de hámster chino (CHO-K1) como un polipéptido glicosilado con una única cadena que contiene 166 aminoácidos, con una masa molecular de 22.500 Daltons. El IFN- β -1b se sintetiza por ingeniería genética a partir de una cepa de *Escherichia coli* como una cadena simple no glicosilada de 165 aminoácidos, con un peso molecular de 18.510 Daltons. Contiene una sustitución de aminoácidos (cisteína en lugar de serina) en la posición 17 lo que hace que falte la metionina en la N-terminal. Por lo tanto, aunque ambas proteínas recombinantes sufren cambios estructurales durante el proceso de purificación, el IFN- β -1a se asemeja más a la forma nativa del IFN- β humano. No se han demostrado grandes diferencias entre el IFN- β -1a y el IFN- β -1b en lo que respecta a su actividad biológica ni en su farmacocinética. Aunque los productos difieren en la ruta de administración y en la dosis, todos han demostrado ser clínicamente beneficiosos en pacientes con EMRR (22-24). En cuanto al IFN- β -1a pegilado, se ha desarrollado al añadir una cadena de polietilenglicol a la molécula de IFN- β -1a, proceso conocido como pegilación. Esto permite cambiar las características farmacocinéticas y farmacodinámicas, prolongando la vida media y el periodo de exposición (36).

2.4 Eficacia del Interferón-β: estudios pivote

El primer Interferón para el tratamiento de la EM que fue aprobado por las autoridades sanitarias fue el Betaferon. El estudio de fase III que permitió la aprobación del mismo se llevó a cabo de forma simultánea en Canadá y EEUU (22), reclutándose 372 pacientes que habían presentado dos brotes en los dos años previos y con un EDSS (*Expanded disability status scale*) basal inferior a 5,5. Los pacientes que recibieron 8 MIU (250mcg) de IFN-β1b, alcanzaron los objetivos primarios (tasa de brotes y número de pacientes libres de brotes) y los secundarios (reducción en la tasa de brotes, incremento en el tiempo hasta el siguiente brote y reducción en la proporción de brotes moderados o severos), con resultados que alcanzaron la significación estadística. Un segundo estudio prolongando el seguimiento fue publicado en el año 1995 (67), demostrando que se mantenía la reducción en la tasa de brotes, aunque el mayor efecto del fármaco se alcanzaba durante el primer año. Por otra parte, se demostró una reducción significativa de la carga de lesiones en T2 detectadas por resonancia magnética cerebral (IRM) en los pacientes tratados con IFN-β1b comparado con placebo (68). Estas diferencias se mantuvieron a lo largo del seguimiento, aunque del mismo modo, el mayor efecto se alcanzó durante el primer año de tratamiento. No se pudo demostrar efecto significativo en la progresión de la discapacidad tanto en el estudio inicial como en la extensión posterior.

En 1994 se comunicaron los resultados del estudio que permitió la aprobación de Avonex®, siendo publicados unos años después (23). Fue nuevamente un estudio en fase III en el que se incluyeron 301 pacientes con EMRR que habían presentado dos brotes en los tres años previos y con un EDSS basal entre 1 y 3,5. El objetivo primario fue la discapacidad y la reducción en la tasa de brotes fue el objetivo secundario. El estudio fue interrumpido de forma prematura tras un análisis intermedio, lo que redujo la potencia de los resultados. Los resultados mostraron un enlentecimiento en la acumulación de discapacidad (definida como aumento de un punto en el EDSS sostenido durante más de 6 meses) aunque modesto, así como una reducción en la tasa anualizada de brotes en pacientes tratados comparado con placebo (con una diferencia del 31%, $p=0.002$) No se encontraron diferencias estadísticamente significativas en el tiempo hasta el siguiente brote en ambos brazos. Sí se demostró una reducción en el número de pacientes con captaciones de Gadolinio, una reducción en el número y volumen de lesiones que captaban así como también una reducción tanto en el número como en el tamaño de lesiones en T2 comparado con placebo (23,68).

El tercer fármaco aprobado fue el Rebif® tras publicarse los resultados de su ensayo clínico clave (24) en el que se incluyeron 560 pacientes con EMRR que hubieran presentado dos o más brotes en los dos años previos y con un EDSS basal inferior a 5,0. El estudio contó con un brazo placebo y con dos dosis de tratamiento, 6 o 12 MIU (22 o 44 mcg), alcanzándose el objetivo primario que fue la reducción en la tasa de brotes en ambas dosis (reducción del 33% en la dosis de 12 MIU comparado con placebo). También se demostró un mayor porcentaje de pacientes libres de brotes en los grupos tratados durante los dos años del estudio, una reducción en la severidad de los brotes y un incremento en el tiempo hasta progresión de la discapacidad. En cuanto a los resultados de IRM, se observó una reducción en el número de lesiones activas (con captación de Gadolinio) por paciente en los grupos tratados comparado con placebo. Posteriormente se llevó a cabo una extensión en abierto en la que los pacientes del grupo placebo se aleatorizaron a los dos brazos de tratamiento (70) mostrando un mayor beneficio aunque marginal de la dosis alta en cuanto a la tasa de brotes y también, aunque en este caso de mayor magnitud, en los efectos en la IRM. Fue en esta segunda evaluación en la que se publicó por primera vez que la presencia de anticuerpos neutralizantes frente al Interferón- β reducía el beneficio clínico en lo que a la tasa de brotes se refería.

Recientemente se han publicado los resultados del estudio ADVANCE que ha permitido la aprobación del uso del interferón pegilado para la EMRR (36). Se trata de un estudio en fase III en el que se evaluó la administración de interferón- β -1a pegilado a dosis de 125mcg/15 días y 125mcg/4semanas frente a placebo. Se observó una disminución tanto en la tasa de brotes como en el riesgo de progresión de la discapacidad y en el número de lesiones en IRM a las 48 semanas en los brazos tratados comparado con placebo. La administración quincenal mostró mayor efecto en lo que a la reducción de la tasa anualizada de brotes y a las medidas de IRM se refiere (aunque no se realizó una comparación directa), lo que motivó la final aprobación de esta dosificación. Posteriormente se publicaron los resultados a dos años, tras los que se mantenía el efecto con similar perfil de seguridad que tras un año de tratamiento (71).

2.5 Causas de pérdida de eficacia del Interferón- β

Desde su introducción en los 90 el IFN- β ha sido uno de los tratamientos más ampliamente utilizados para la EM, pero desafortunadamente no todos los pacientes responden de forma adecuada. Según los diferentes estudios y según el criterio utilizado para definir la respuesta, se

considera que alrededor de un 40% de los pacientes no responden al tratamiento (72). Se discuten varios mecanismos para explicar la falta de eficacia al IFN- β . En primer lugar, nos encontramos con que la falta de respuesta puede ser consecuencia de un fallo directo del fármaco para ejercer su función. Esto suele ser debido a características genéticas basales o respuestas farmacodinámicas propias del paciente que dan lugar a diferencias interindividuales en la respuesta al interferón. Los estudios dirigidos a evaluar esto se han centrado principalmente en lo que se ha llamado *IFN signature*, que se corresponde con el perfil de genes que conforman la vía de respuesta a la inducción del interferón tipo I. Más adelante entraremos en detalle en esta vía de respuesta metabólica (73,74).

La falta de respuesta al interferón puede producirse también tras un periodo de respuesta óptima, considerándose entonces sus mecanismos como adquiridos. Entre éstos destacan los inmunogénicos, significativamente influidos por la dosis, la vía o la frecuencia de administración y por la presencia de contaminantes. Nos encontramos así con el desarrollo de anticuerpos frente al interferón como paradigma de la pérdida de respuesta al interferón por estos motivos. (Fig.2) La aparición de receptores de baja afinidad o de receptores solubles serían otros mecanismos de respuesta subóptima adquirida al interferón.

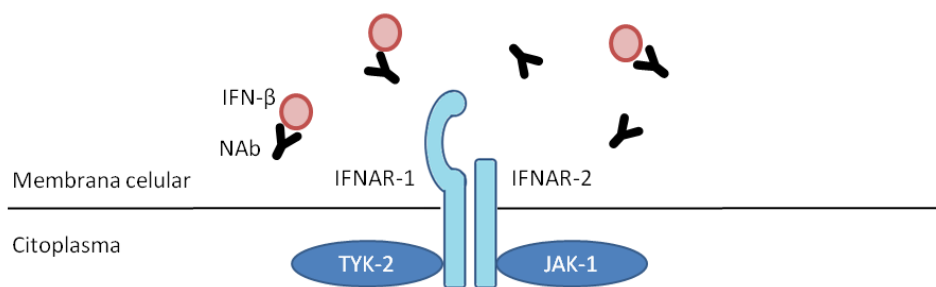


Fig 2. La aparición de anticuerpos neutralizantes frente a IFN- β dificultaría su unión al receptor específico

El receptor específico del interferón está formado por dos subunidades, IFNAR1 e IFNAR2. Cuando el Interferón se une al receptor, lo hace inicialmente con la subunidad IFNAR2 reclutando posteriormente la otra subunidad que proporciona estabilidad a la unión, dando finalmente lugar a

la cascada de respuesta. Existen tres isoformas diferentes de la subunidad IFNAR2 que se diferencian en su capacidad de señalización y en su extremo carboxiterminal. La forma completa, conocida como IFNAR2.2, es la que se reconoce como funcional, presentando residuos en la parte citoplasmática. La forma IFNAR2.1 carece de los residuos citoplasmáticos y muestra dificultades para transducir la respuesta pudiendo en ocasiones ser incapaz de transmitirla. La tercera isoforma, IFNAR2.3 carece del dominio transmembrana además del citoplasmático, conformando una subunidad soluble. La unión del interferón a estas subunidades no funcionales, así como la variabilidad en la expresión y concentración de las mismas, podría ser responsable de la modulación de las respuestas celulares al IFN tipo I (54). (Fig 3)

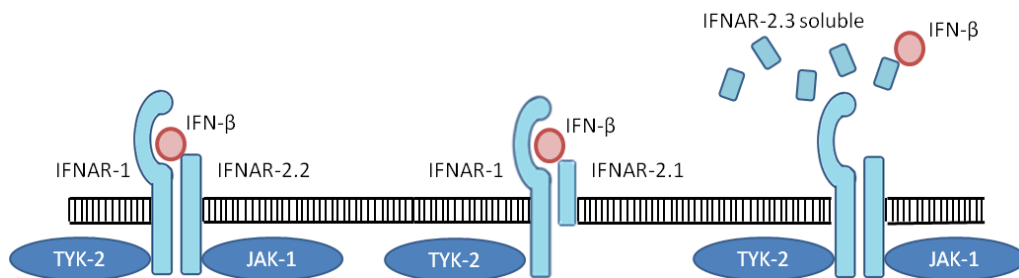


Fig 3. Diferentes isoformas de la subunidad IFNAR 2.

3. Anticuerpos frente al IFN-β

3.1 Definición y tipos

Dada la naturaleza proteica del interferón, se ha descrito ampliamente el desarrollo de anticuerpos frente al mismo, con un impacto variable sobre la eficacia del tratamiento.

En general se describen dos tipos de anticuerpos, ambos IgG: los que se unen a la molécula, conocidos como *Binding antibodies* (BAbs) y un subtipo de estos que sí interfieren con su función, conocidos como anticuerpos neutralizantes, *Neutralizing antibodies* (NAbs).

3.2 BAbs

Los BAbs se desarrollan en un elevado porcentaje de pacientes al iniciar el tratamiento con IFN- β , sin que en muchas ocasiones se evidencien modificaciones en su efecto biológico. Esto se debe a que se unen a epítopos que no se implican en la unión del interferón a su receptor. Según los estudios, se observa una frecuencia de BAbs de hasta un 80% a los 6 meses de iniciarse el tratamiento, aunque en la mayoría de los casos desaparecen con el tiempo. Alrededor de un 50% de estos pacientes también desarrollarán NAbs durante el tratamiento con IFN- β (75,76).

Se han descrito diversos métodos para estudiar la presencia de BAbs, siendo la realización de un ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA) el más habitual. En la actualidad, la determinación de los BAbs se realiza con el objetivo de hacer un screening de la presencia de anticuerpos frente al Interferón. En caso de resultar positivo, se procedería a investigar la presencia de NAbs (77).

3.3 NAbs

Se diferencian de los BAbs porque bloquean la interacción del Interferón con su receptor, ya sea por su afinidad sobre la zona específica de unión al receptor o porque inducen cambios conformacionales en la molécula que dan lugar a su inactivación (78).

La frecuencia de NAbs es muy variable y oscila entre un 2 y un 42% en función de la preparación y de los diferentes estudios (54,79). Generalmente se detectan a partir de los 6-12 meses del inicio del tratamiento y pueden persistir por un tiempo variable. Después de 24 meses de tratamiento, solo un escaso número de pacientes desarrolla NAbs de novo. Por otra parte, su efecto sobre la eficacia del IFN- β generalmente no se detecta hasta pasados 12-18 meses del inicio del tratamiento, lo que explica que su impacto clínico no se detectara en los ensayos clínicos pivote, siendo necesarios estudios más prolongados para poder percibir su efecto en la clínica. (54,77,78,80-82)

Se han descrito diferencias en la frecuencia de NAbs en función de la preparación utilizada: la menos inmunogénica es el IFN- β -1a administrado por vía intramuscular. Sólo un 5% (entre un 2 y un 6% en función del estudio) de los pacientes desarrollan NAbs, mientras que con el IFN- β -1a subcutáneo alrededor de un 20% los desarrollan y con el IFN- β -1b subcutáneo se detectan en un

40% de los pacientes (78,83). Existen diferentes causas que explicarían estas diferencias: en primer lugar el tipo de Interferón utilizado. La falta de glicosilación del IFN- β -1b favorece la exposición de dominios hidrófobos de la molécula lo que provoca la formación de agregados, facilitando el desarrollo de anticuerpos. Las diferencias de inmunogenicidad entre las dos presentaciones de IFN- β -1a pueden ser debidas a modificaciones posttranscripcionales, o a variaciones en las condiciones de almacenamiento y de purificación. Por otra parte se ha postulado que la vía de administración también puede influir en la inmunogenicidad, siendo probablemente la vía subcutánea más inmunogénica que la intramuscular. Sin embargo, en un estudio se evaluó la administración de Avonex semanalmente y de Betaferon a días alternos, ambos por vía intramuscular y se observó que los pacientes que recibieron Betaferon desarrollaron anticuerpos con más frecuencia. La dosis también se ha sugerido como factor influyente en la inmunogenicidad aunque los resultados de los estudios tampoco son concluyentes y por ejemplo, en el caso de Rebif, no muestran diferencias en el porcentaje de pacientes con NAb y la dosis recibida. La frecuencia de administración es otro parámetro que se ha considerado en el desarrollo de anticuerpos, proponiendo que a mayor frecuencia de administración, mayor frecuencia de NAb. Los resultados de los estudios con Rebif no fueron determinantes ya que los pacientes con una administración semanal desarrollaban anticuerpos con menor frecuencia que aquellos que se administraron el fármaco 3 veces/semana pero esto sólo era así en el caso de la dosis de 22mcg y no era reproducible en la dosis más alta (54,78,83-85).

Por otra parte, se ha descrito reacciones cruzadas entre los NAb frente al IFN- β -1a y IFN- β -1b, por lo que un cambio en el tipo de interferón utilizado no parece que vaya a beneficiar a los pacientes que ya hayan desarrollado NAb (78,84,86). En cuanto a la persistencia de los NAb a lo largo del tiempo, se ha detectado que con una elevada frecuencia los NAb se negativizan a lo largo del tratamiento, llegando hasta un 50% en función del estudio. Esto es más frecuente en pacientes con títulos bajos, en aquellos tratados por vía subcutánea y en los tratados con IFN- β -1b. Incluso se ha observado que pacientes con títulos positivos de forma repetida pueden llegar a negativizarse de forma tardía, hasta después de 4 años de tratamiento (78,82,87).

3.4 Impacto de los NAbS en la EM

El papel de los NAbS en la práctica clínica ha sido difícil de definir debido a varias razones, entre ellas, la utilización de diferentes puntos de corte y métodos de cuantificación que dificultan la comparación de los resultados, la repercusión clínico-radiológica tardía o la duración variable de los estudios. Todo esto ha provocado discrepancias en los neurólogos que han llevado a retrasar la aceptación de que el desarrollo de NAbS es un hándicap en los pacientes tratados con IFN- β (88).

Diversos estudios han evaluado la repercusión tanto clínica como radiológica de los NAbS. Ya en los estudios para la aprobación de las diferentes preparaciones se evaluó la frecuencia de aparición de los NAbS. En el estudio de fase III del IFN- β -1b, los pacientes con NAbS tenían una tasa anualizada de brotes significativamente mayor en el segundo y tercer año comparado con los pacientes sin NAbS (22). En el estudio del Rebif[®] (24) no se observaron diferencias en la tasa de brotes durante los primeros dos años mientras que en el estudio de extensión (70) se observó una clara disminución de la eficacia del fármaco en los pacientes que habían desarrollado NAbS. En el estudio de Avonex[®] (89) no se encontró correlación entre brotes y NAbS aunque finalizó con tan solo dos años de seguimiento. De estos resultados se puede concluir que las consecuencias de los NAbS no se observan hasta pasados por lo menos 18 meses de tratamiento con IFN- β . En el año 2003, se publicó un estudio observacional no aleatorizado en el que se realizó el seguimiento de más de 500 pacientes tratados con IFN- β durante 5 años. Detectaron un mayor porcentaje de pacientes libres de brotes y un mayor tiempo hasta el siguiente brote en los pacientes sin NAbS comparado con aquellos en los que sí se detectaron NAbS. En cuanto a la discapacidad, no se encontraron diferencias significativas entre ambos grupos (90). Estudios posteriores han investigado el impacto de los NAbS en pacientes tratados con IFN- β , detectando una reducción de la eficacia clínica en lo que a los brotes se refiere. Sin embargo, no se ha podido demostrar un efecto estadísticamente significativo de los NAbS en la progresión de la discapacidad en la mayoría de estos estudios, debido probablemente a un seguimiento corto (76,86,91-94). En cuanto a las medidas de IRM, tanto en los estudios que permitieron la aprobación de los interferones como en otros posteriores, se ha demostrado un efecto negativo de los NAbS sobre las medidas de IRM, tanto en la aparición de nuevas lesiones en T2 como en las captaciones de Gadolinio (70,75,95).

3.5 Evaluación de los NAbs

Se han utilizado diferentes técnicas para detectar y cuantificar los NAbs en pacientes con EM, existiendo por ello elevada variabilidad en la definición de lo que constituye una determinación positiva entre los diferentes laboratorios. La técnica recomendada por la OMS (Organización Mundial de la Salud) para determinar los NAbs es un ensayo funcional, la inhibición *in vitro* del efecto citopático (CPE) (96). Éste se basa en la capacidad del IFN- β de inhibir la muerte celular tras una infección viral. Se incuban células, generalmente de la línea celular del carcinoma pulmonar (A-549) junto a un virus lítico, siendo el de la encefalomiocarditis el más recomendado, durante un periodo de 12 a 24h. Posteriormente se añade el suero del paciente diluido a diferentes concentraciones seriadas junto a una cantidad conocida de IFN- β . Cuando en el suero existen anticuerpos, el efecto protector del IFN- β frente al virus no se produce dando lugar a la muerte celular. El efecto se estima cuantificando mediante densitometría óptica, tras añadir un marcador para células vivas. Para estandarizar la cuantificación de los títulos de anticuerpos, se utiliza la fórmula de Kawade (97), expresando la cantidad de anticuerpos como LU (unidades de laboratorio). Este método calcularía la dilución del suero que reduce la actividad del IFN del 10 a 1 U/ml, siendo considerado un nivel de >20 LU/ml el punto de corte para ser definido como positivo. La utilización de diferentes tipos de líneas celulares, virus y periodos de incubación, puede alterar la actividad anti-IFN de cada muestra de suero y por tanto dificulta la comparación de los resultados entre los diferentes laboratorios. Por otra parte, no hay consenso en el título a partir del cual los NAbs se consideran biológicamente significativos. Otro punto a tener en cuenta es que algunos laboratorios consideran solo positivos aquellos pacientes con dos determinaciones positivas separadas por un mínimo de 3 meses mientras que para otros grupos con una sola determinación sería suficiente (80). Otra desventaja de este método sería su falta de especificidad, dado que otros componentes presentes en el suero o en la preparación pueden interferir o simular el efecto del IFN- β , tales como IL-6 o IFN- γ , pudiendo influir en el resultado del ensayo (88).

Otra aproximación para determinar la bioactividad del IFN- β es el grado de inducción *in vivo* de los diferentes genes o de sus productos producido por el interferón. Algunos de ellos han sido testados con este objetivo, entre ellos la neopterin, OAS1, β 2-microglobulina, IL-10, VCAM y MxA. De estos, MxA es de gran interés puesto que se induce en células mononucleares periféricas tras la unión del IFN- β a su receptor específico y se ha observado que esta inducción se ve afectada e incluso abolida en pacientes que han desarrollado NAbs.

4. Myxovirus resistance A (MxA)

4.1 Introducción

MXA es una proteína citoplasmática, con un peso molecular de 75 kiloDaltons aproximado, codificada por el gen *Mx1* localizado en el cromosoma 21q22.3 (98). Tiene una actividad GTPasa intrínseca y se cree que está involucrada en el tráfico de vesículas intracelulares y en la homeostasis de las organelas. Es capaz de inhibir un amplio espectro de virus, principalmente del tipo RNA negativo monocatenario como el de la gripe o el del sarampión, aunque también algunos positivos. El mecanismo por el que es capaz de inhibir estos virus no está del todo definido. Sin embargo, es bien conocido que *MXA* es altamente específica de IFN- β puesto que se ve regulada al alza por los Interferones de tipo I a través de su unión con IFNAR (54,63). Es por esto que su determinación resulta de utilidad para evaluar la biodisponibilidad del IFN- β , siendo capaz de discernir entre respondedor y no respondedor desde el punto de vista biológico.

4.2 Evaluación de MxA

Se han descrito diversos métodos para evaluar la inducción de *MXA*, tanto desde el punto de vista del mRNA (RNA mensajero) como a nivel de proteína.

La cuantificación de la proteína MxA en general se caracteriza por ser más económica y más sencilla de llevar a cabo pero por el contrario tiene una menor sensibilidad. Así mismo, la ausencia de preparaciones comerciales de anticuerpos frente a MxA limita su uso generalizado (99) Entre las técnicas utilizadas, una de las primeras en llevarse a cabo fue la realización de un ELISA con anticuerpos monoclonales frente a *MXA*. Los ensayos de inducción de *MXA* evalúan el efecto de inhibición *in vitro* que tendría el suero del paciente en la expresión de la proteína MxA producida por el IFN- β . Para ello, se cultivan células en presencia del suero del paciente y de IFN- β , lisando posteriormente las células puesto que *MXA* es una proteína citoplasmática (100,101) para cuantificarla mediante el ELISA. De manera similar se ha utilizado el ensayo de inmunoensayo (EIA) (102), la quimioluminiscencia y la citometría de flujo (99) para cuantificar la proteína MxA. Debido a que la vida media de las proteínas es mayor que la del mRNA y a que también se ve influenciada por cambios posttranscripcionales, su concentración puede reflejar diferentes eventos ocurridos

durante las semanas anteriores a la extracción de sangre. Por ello, la determinación del mRNA refleja más el resultado de la unión del IFN a su receptor y por tanto su biodisponibilidad.

La cuantificación del mRNA de la proteína MxA puede realizarse por dos métodos: la PCR (reacción en cadena de la polimerasa) cuantitativa-competitiva (qc-PCR) que fue inicialmente descrita en el año 2001 (103) y la PCR a tiempo real (RT-PCR). La primera consiste en la extracción del RNA de células mononucleares periféricas, proseguida de la síntesis de DNA complementario (cDNA), la realización de una PCR y posteriormente la visualización del producto a través de una electroforesis en gel de agarosa. La cuantificación se realiza por densitometría en relación a un gen de referencia o constitutivo (*housekeeping gene*). El segundo método es similar pero la cuantificación se realiza a través de la medida del incremento de la fluorescencia de la muestra mediante el uso de un termociclador. Los resultados se expresan de forma relativa respecto a un gen constitutivo, lo que evita diferencias debidas a la degradación del RNA o a variabilidad en la eficiencia de la retrotranscripción.

Los ensayos para determinar el mRNA MxA son más rápidos, sencillos y más específicos del efecto del IFN- β que la determinación de la proteína MxA: la determinación del mRNA MxA, gracias a su vida media más corta, refleja de una forma más directa la inducción más reciente producida por el IFN- β . Así mismo, evalúa la respuesta biológica *in vivo* de un paciente concreto al IFN- β . Como inconvenientes se encuentra la variabilidad de la respuesta. Ésta puede verse influida por infecciones virales concomitantes, así como por el tiempo transcurrido entre la administración y la extracción: la máxima expresión de mRNA se detecta a las 12 horas de la inyección (104-106), produciéndose a partir de ese momento un descenso progresivo de los niveles de mRNA y un ascenso en los niveles de la proteína MxA, lo que obliga a la extracción de la muestra de sangre periférica alrededor de 12 horas tras la última administración del fármaco. En cuanto a las técnicas para evaluar el mRNA MxA, la realización de RT-PCR facilita la cuantificación de los resultados y ofrece una mayor especificidad (104,107,108). La utilización de la RT-PCR para cuantificar el mRNA MxA parece resultar de forma global la opción con mayor sensibilidad y adicionalmente ofrece también elevada especificidad comparada con el resto de opciones (109,110).

4.3 *IFN Signature*

La unión del IFN- β a su receptor específico IFNAR da lugar a una cascada de reacciones intracelulares que culminan en el aumento o disminución en la expresión de determinados genes. Como *IFN signature* se ha venido a denominar el perfil de genes que conforman la vía de respuesta a la inducción del interferón tipo I. El gen de la proteína MxA se encuentra entre los que conforman esta vía de respuesta, siendo uno de los regulados al alza tras la administración de IFN- β .

Diversos estudios sugieren que la expresión basal de estos genes es inferior en los pacientes diagnosticados de EM respecto a la población general (63,66,111). Así mismo, se ha detectado que la expresión es aún inferior en los pacientes que se encuentran en situación de reagudización de su enfermedad comparado con aquellos que se encuentran en situación estable (66,111) Esto sugiere un defecto en la vía de señalización del IFN en los pacientes con EM. Tras administrar el tratamiento con IFN- β , la expresión de los genes que constituyen la *IFN signature* se ve regulada al alza hasta niveles que se aproximan a los de controles sanos, aunque sin llegar a ellos, probablemente en relación con una resistencia subyacente a los interferones del tipo I (66,112). Estos pacientes con una expresión reducida de la *IFN signature* que son capaces de corregir la expresión de los genes tras la administración de IFN- β , son en general buenos respondedores al tratamiento, presentando una disminución en la tasa de brotes (73,74). Sin embargo, otros estudios sugieren que los genes que constituyen la *IFN signature* se encuentran sobreexpresados en algunos pacientes con EM (113). Probablemente se trate de un subgrupo de pacientes, alrededor de un 25%, que presenta una elevada *IFN signature* basal, en los que se detecta además una mayor actividad de la enfermedad y una peor respuesta al tratamiento (114). Es posible que, en estos pacientes, la administración del IFN- β sea incapaz de inducir la vía de señalización del Interferón tipo I que ya se encuentra constitutivamente sobreexpresada, dando lugar a un fallo en la respuesta al tratamiento (74,115). Así, nos encontraríamos con dos fenotipos diferenciados: el de los respondedores y el de los no respondedores a IFN- β . Los respondedores tendrían una expresión basal deficitaria de los genes que constituyen la *IFN signature*, aunque serían inducibles tras la administración del IFN- β exógeno. Por otra parte, los no respondedores constituirían un fenotipo con una enfermedad de curso más severo y con incapacidad para inducir la expresión de los genes de la *IFN signature* tras la administración del IFN- β . Estas diferencias interindividuales serían el resultado de variaciones genéticas en la biología del IFN- β tal como una expresión variable de genes reguladores del interferón u otros mecanismos como una diferente actividad de factores inhibidores de la

transcripción. En contraposición a esto, otros estudios proponen que los pacientes con una sobreexpresión de la vía del interferón tipo I tardarían mayor tiempo hasta el siguiente brote y presentarían una menor actividad radiológica, sugiriendo que una actividad elevada de la *IFN signature* podría ser beneficiosa en pacientes no tratados (111,116). No se detectaron diferencias en el subgrupo de pacientes que iniciaron tratamiento que, por otra parte, supuso un porcentaje bajo de los incluidos en el estudio. (111). Los diferentes y, de alguna manera antagónicos, resultados evidencian la necesidad de nuevos estudios que ayuden a determinar la utilidad de los genes de la *IFN signature* para predecir la respuesta al tratamiento con IFN- β .

La *IFN signature* también se ha estudiado en otras enfermedades autoinmunes. En el Lupus eritematoso sistémico se ha observado una actividad significativamente incrementada de los genes que forman la vía del interferón tipo I (114,117,118), llegándose en algunos estudios a correlacionar con la actividad de la enfermedad y con la presencia de autoanticuerpos (119). También se ha observado este incremento en otras enfermedades como en el Síndrome de Sjögren y en la Neuromielitis óptica de Devic (NMO). En el caso de la NMO, diversos estudios muestran la ausencia de respuesta al IFN- β de estos pacientes e incluso su efecto perjudicial, provocando en algunas ocasiones brotes severos de la enfermedad (120-122)

4.4 Utilidad clínica de la expresión de la MxA

El tratamiento con IFN- β modula la expresión de un conjunto de genes con potenciales efectos inmunoreguladores. De estos genes, el de la proteína MxA ha resultado ser unos de los candidatos más específicos de la unión del IFN- β a su receptor. Debido a esto, se ha estudiado a lo largo de las últimas décadas desde diferentes puntos de vista aunque hasta el momento aún no se ha establecido su aplicación en la práctica clínica diaria. Se ha sugerido que su expresión antes de iniciar el tratamiento con IFN- β , como parte de la *IFN signature*, podría ayudar a predecir qué pacientes van a responder mejor al tratamiento (74,115,123) aunque se precisan estudios que confirmen su utilidad para poder ser aplicado en la práctica clínica diaria.

La evaluación de la expresión de MxA se ha orientado principalmente al estudio de la biodisponibilidad del IFN- β : dado que se trata de uno de los genes cuya expresión traduce de forma más específica la unión del IFN a su receptor (54), una expresión disminuida traduciría la ausencia de unión a su receptor. Así, se ha correlacionado la falta de expresión de MxA (ya sea de la proteína

o del mRNA) con la presencia de NAbs en múltiples estudios (99,107,109,110,127-131), la mayoría de ellos realizados a los 12 meses de iniciar el tratamiento por ser el momento en el que con mayor frecuencia se detectan los NAbs (132). Tanto los NAbs como la expresión de MxA se asocian a una mala respuesta al tratamiento con IFN- β (76,90-92,133). Algunos incluso sugieren un mayor poder predictivo del mRNA MxA que de los NAbs (92). Esto probablemente se debe a que la ausencia de inducción del mRNA de MxA en pacientes tratados con IFN- β traduce, no solo la presencia de NAbs, sino también la de otros factores que pueden relacionarse con una disminución de la eficacia del tratamiento como podrían ser la presencia de receptores solubles, receptores de baja afinidad o incluso una baja adherencia al tratamiento. Así pues la expresión de MxA se ha estudiado desde diferentes perspectivas y con diferentes objetivos, aunque sin haberse podido establecer hasta el momento un protocolo óptimo de monitorización en la práctica diaria.

III. HIPÓTESIS

La expresión del gen de la proteína MxA se ha propuesto como biomarcador de respuesta al tratamiento con IFN- β desde dos enfoques: como indicador del estado de la vía de señalización del interferón tipo I y como indicador de biodisponibilidad del IFN- β una vez instaurado el tratamiento.

Para el primero, se ha sugerido la presencia de un defecto de la vía de señalización del IFN- β en pacientes con EM que daría lugar a una expresión basal reducida de algunos genes. Los pacientes con una menor expresión basal tendrían una mayor capacidad potencial de inducción y por tanto, el tratamiento con IFN- β podría corregir el déficit de señalización de esta vía.

En el caso del segundo, la detección a los 12 meses de tratamiento de una reducción de la expresión de MxA se relacionaría con la ausencia de unión del IFN- β a su receptor. Esto supondría una reducción en la biodisponibilidad y por tanto una baja actividad biológica que se traduciría en una ausencia de respuesta al tratamiento.

IV. OBJETIVOS

1. Evaluar la expresión basal de mRNA MxA en sangre periférica de pacientes diagnosticados de EMRR antes de iniciar tratamiento y determinar si su cuantificación tiene valor pronóstico para predecir la respuesta al tratamiento con IFN- β .
2. Determinar si la presencia de inducción del mRNA MxA a los 3 meses de iniciar el tratamiento se correlaciona con la respuesta clínica al tratamiento con IFN- β de forma independiente de las otras variables clínicas, radiológicas o de laboratorio basales.
3. Evaluar si la actividad biológica del IFN- β medida como la expresión de mRNA MxA a los 12 meses de tratamiento se relaciona con la respuesta al tratamiento.

V. PACIENTES, MATERIAL Y MÉTODOS

Para responder a los objetivos planteados en este proyecto, se diseñó un estudio abierto, prospectivo, observacional y no aleatorizado que se llevó a cabo en de la Unidad de Esclerosis Múltiple del Hospital Universitari de Bellvitge.

Se seleccionaron pacientes diagnosticados de EMRR según criterios de McDonald revisados de 2005 (134), que no hubieran recibido tratamiento inmunomodulador previo y que cumplieran los criterios exigidos por el Departament de Salut de la Generalitat de Catalunya para poder iniciar tratamiento (Annex IV de la Circular 1/2002, actualitzada com a Instrucció 1/2007). Según éstos, el tratamiento estaba indicado cuando los pacientes habían presentado un mínimo de dos brotes en los últimos 3 años o cuando se trataba de un primer brote con aparición de nuevas lesiones en una IRM de control realizada entre 3 meses y un año después del episodio. El periodo de selección de pacientes se extendió desde Febrero de 2008 hasta Marzo de 2011.

El seguimiento se realizó según práctica clínica habitual, es decir, se realizaron evaluaciones clínicas y de la escala EDSS (Expanded Disability Status Scale) (135) al iniciar el tratamiento y posteriormente de forma semestral y ante la sospecha de brote. Los datos clínicos, radiológicos y demográficos se introdujeron de forma prospectiva en la base de datos EDMUS (*European Database for Multiple Sclerosis*) (136) también siguiendo la práctica clínica habitual. El seguimiento clínico finalizó en diciembre de 2012. Durante el periodo de estudio no se permitieron cambios de tratamiento por lo que si el paciente abandonaba o cambiaba el tratamiento inicial, su seguimiento era censurado a partir de ese momento.

Se definió como brote el desarrollo de nuevos síntomas o empeoramiento de síntomas previos acompañados de disfunción neurológica persistente durante por lo menos 24h en ausencia de fiebre y precedidos de un periodo de estabilidad o mejoría de por lo menos 30 días (7). La progresión en la escala de EDSS se definió como el incremento de 1 o de 0.5 puntos confirmado por lo menos a los 6 meses para poder considerarse como irreversible (137).

Se obtuvieron muestras de sangre previo inicio del tratamiento, a los tres meses y al año de seguimiento. Las muestras se obtuvieron en ausencia de signos de infección o de tratamiento corticoide para brote. Para cada extracción se obtuvo una muestra de sangre en un tubo de 10ml anticoagulado con EDTA (ácido etilendiaminotetraacético). Para las muestras obtenidas una vez iniciado el tratamiento, se monitorizó el tiempo transcurrido entre la administración del fármaco y el momento de la extracción, con el objetivo de que este periodo se aproximara lo máximo posible

a las 12 horas. Se obtuvieron así mismo muestras de sangre de un pool de controles sanos para la puesta en marcha de la técnica, para su utilización como calibrador y para permitir la normalización de los resultados. El trabajo de laboratorio consistió en la extracción del RNA, la síntesis del cDNA (retrotranscripción del RNA a cDNA) y posteriormente la PCR cuantitativa a tiempo real. El protocolo utilizado se describe de forma detallada en el primer trabajo.

Los datos clínicos, demográficos, radiológicos y de laboratorio obtenidos fueron introducidos en una base de datos y se analizaron utilizando el paquete estadístico *Statistical Package for the Social Sciences*, 20.0 (SPSS Inc., Chicago, USA). Un valor de P inferior a 0.05 fue considerado estadísticamente significativo para las comparaciones. Los métodos estadísticos concretos se describen de forma independiente en cada trabajo.

VI. RESULTADOS

Trabajo número 1

Baseline MxA mRNA Expression Predicts Interferon Beta Response in Multiple Sclerosis Patients

Elisabet Matas^{1*}, Laura Bau¹, María Martínez-Iniesta², Lucía Romero-Pinel¹, M. Alba Mañé^{1,3},
Álvaro Cobo-Calvo¹, Sergio Martínez-Yélamos¹

¹Multiple Sclerosis Unit, Neurology Department, Hospital Universitari de Bellvitge-IDIBELL, L'Hospitalet de Llobregat, Barcelona, Spain. ²Translational Research Laboratory, Institut Català d'Oncologia- IDIBELL, L'Hospitalet de Llobregat, Barcelona, Spain. ³Department of Neurology, Joan XXIII University Hospital, Universitat Rovira I Virgili, Tarragona, Spain.

PLoS One 2014; 9(11): e112758. doi:10.1371/journal.pone.0112758 (IF 2014: 3.23)

Baseline MxA mRNA Expression Predicts Interferon Beta Response in Multiple Sclerosis Patients

Elisabet Matas^{1*}, Laura Bau¹, María Martínez-Iniesta², Lucía Romero-Pinel¹, M. Alba Mañé^{1,3}, Álvaro Cobo-Calvo¹, Sergio Martínez-Yélamos¹

1 Multiple Sclerosis Unit, Neurology Department, Hospital Universitari de Bellvitge-IDIBELL, L'Hospitalet de Llobregat, Barcelona, Spain, **2** Translational Research Laboratory, Institut Català d'Oncologia-IDIBELL, L'Hospitalet de Llobregat, Barcelona, Spain, **3** Department of Neurology, Joan XXIII University Hospital, Universitat Rovira i Virgili, Tarragona, Spain

Abstract

Background: Myxovirus resistance protein A (MxA) is a molecule induced after interferon-beta injection, mostly used to evaluate its bioactivity. There is little available data on clinical utility of baseline MxA mRNA status. The objective of the study is to investigate whether baseline MxA mRNA expression can predict relapse and disease progression in multiple sclerosis patients treated with interferon-beta.

Methods: Baseline blood samples were obtained before the first interferon-beta dose was administered to evaluate MxA mRNA expression using real-time polymerase chain reaction (PCR). Demographic and clinical variables were prospectively recorded to define treatment responder and non responder groups.

Results: 104 patients were included in the study. Baseline MxA mRNA expression was significantly lower in the group of patients who met the definition of responders (1.07 vs 1.95, Student *t* test, $p < 0.0001$). A threshold of 1.096 was established using Receiver Operating Characteristic analysis to differentiate between responders and non-responders (sensitivity 73.9%, specificity 69.0%). Survival analysis using this threshold showed that time to next relapse ($p < 0.0001$) and to EDSS progression ($p = 0.01$) were significantly higher in patients with lower MxA titers.

Conclusion: The results suggest that baseline MxA mRNA levels may be useful for predicting whether multiple sclerosis patients will respond or not to interferon-beta treatment.

Citation: Matas E, Bau L, Martínez-Iniesta M, Romero-Pinel L, Mañé MA, et al. (2014) Baseline MxA mRNA Expression Predicts Interferon Beta Response in Multiple Sclerosis Patients. PLoS ONE 9(11): e112758. doi:10.1371/journal.pone.0112758

Editor: David R. Booth, University of Sydney, Australia

Received: July 8, 2014; **Accepted:** October 14, 2014; **Published:** November 14, 2014

Copyright: © 2014 Matas et al. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Data Availability: The authors confirm that all data underlying the findings are fully available without restriction. All relevant data are within the paper.

Funding: This work was supported by the Convenio de Investigación, Dep. de Salut, Generalitat de Catalunya (grant number 352/05). The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

Competing Interests: The authors have read the journal's policy and have the following competing interests: E. Matas received honoraria from speaking engagements from Biogen, Teva and Merck Serono; research support, funding for travel and congress expenses from Biogen Idec, Teva Pharmaceutical Industries LTD, Sanofi-Aventis, Novartis, Bayer Schering Pharma and Merck Serono. L. Bau received research support, funding for travel and congress expenses from Biogen Idec, Teva Pharmaceutical Industries LTD, Sanofi-Aventis, Novartis, Bayer Schering Pharma and Merck Serono. M. Martínez-Iniesta reports no disclosures. L. Romero-Pinel received honoraria from speaking engagements from Biogen, Teva and Merck Serono; research support, funding for travel and congress expenses from Biogen Idec, Teva Pharmaceutical Industries LTD, Sanofi-Aventis, Novartis, Bayer Schering Pharma and Merck Serono. M.A. Mañé received research support, funding for travel and congress expenses from Biogen Idec, Teva Pharmaceutical Industries LTD, Sanofi-Aventis, Novartis, Bayer Schering Pharma and Merck Serono. A. Cobo-Calvo received research support, funding for travel and congress expenses from Biogen Idec, Teva Pharmaceutical Industries LTD, Sanofi-Aventis, Novartis, Bayer Schering Pharma and Merck Serono. S. Martínez-Yélamos received honoraria from speaking engagements, served on a scientific advisory board, collaborates as a consultant and scientific communications and received funding for travel and congress expenses from Biogen Idec, Teva Pharmaceutical Industries LTD, Sanofi-Aventis, Merck Serono, Novartis and Bayer Schering Pharma. This does not alter the authors' adherence to PLOS ONE policies on sharing data and materials.

* Email: ematas@bellvitgehospital.cat

Introduction

Multiple sclerosis (MS) is an immune-mediated demyelinating disease of the central nervous system that mainly affects middle-aged adults and is a common cause of disability. Several therapies are available for the treatment of MS. Interferon beta (IFN- β) was the first approved and is one of the most common immunomodulatory therapies used for this condition. Results from clinical trials have shown a reduction in the MS relapse rate of about 30% with this agent [1–6]. Unfortunately, not all patients respond properly to MS therapies. A percentage of patients do not respond to

treatment, and this fact could only be recognized after months or years of therapy. It would be of value being able to determine whether a patient will respond to each type of treatment so that the most appropriate therapy can be given before the disease relapses or progresses.

Myxovirus resistance protein A (MxA) is a molecule induced after injection of IFN- β , and its quantification could be considered a biomarker of IFN- β bioactivity [7]. There is little available data on MxA mRNA baseline status or its potential usefulness for indicating IFN- β treatment response. The objective of this study is to investigate whether MxA mRNA baseline expression has a role

in predicting the occurrence of relapses or disease progression in MS patients treated with IFN- β .

Methods

Study Design

A prospective, observational, open-label, non-randomized study was performed in the Multiple Sclerosis Unit of Hospital Universitari de Bellvitge. Our MS clinic is the reference center for demyelinating diseases in the health district of *Gerència Territorial Barcelona Metropolitana Sud* in Catalonia, a region in the northeast of Spain.

Ethics Statement

The study was approved by the Ethics Committee of Hospital Universitari de Bellvitge, and written informed consent to participate was obtained from each patient and control.

Patients

Patient enrollment began in February 2008 and was completed in March 2011. Patients meeting the following inclusion criteria were prospectively selected: treatment-naïve, relapsing-remitting MS patients fulfilling the 2005 revised McDonald criteria [8] and achieving criteria to start IFN- β treatment. After selection, patients initiated treatment with one of three IFN- β products: IFN- β 1a 30 μ g by intramuscular administration once weekly (Avonex), IFN- β 1a 44 μ g subcutaneously three times weekly (Rebif44), or IFN- β 1b 8 million IU subcutaneously every other day (Betaferon/Extavia). Patients were not randomized to treatment. Therapy for each case was selected according to guidelines for MS and the standard medical practice in our center. Prospective follow-up was completed in May 2012. Treatment changes were not allowed during the study. For the development of survival curves, follow-up was finished when a relapse or increase in the EDSS score occurred. Patients that finished the follow-up before any of these events occurred or stopped the treatment, were censored for that analysis.

A cohort of non-MS controls was selected to perform gene standard curves (MxA and GAPDH) and to normalize MS patient samples.

Clinical assessment including the Expanded Disability Status Scale (EDSS) [9] was performed every 6 months following the start of treatment and at the time of relapse. Clinical, demographic and radiological data were recorded prospectively using the European Database for Multiple Sclerosis (EDMUS) [10]. Relapses were established based on the development of a new symptom or worsening of an old symptom attributable to MS, accompanied by consistent neurological dysfunction lasting at least 24 hours in the absence of fever and preceded by stability or improvement for at least 30 days [11]. EDSS progression was defined as an increase of at least 1 point on the EDSS score. The EDSS score had to be confirmed at least 6 months later to be defined as irreversible [12].

Treatment responders (R) and non-responders (NR) were defined as follows: Responders were patients presenting no relapses or EDSS progression during follow-up. Non-responders were those presenting relapses and/or EDSS progression. Two groups were defined in the non-responders group: Relapse-NR were patients presenting relapses but no increase on the EDSS score and EDSS-NR comprised of patients presenting EDSS progression or relapses and additionally EDSS progression at follow-up.

Samples

Blood samples were obtained before the first IFN- β dose and after 12 months of treatment, in the absence of signs of infection or corticosteroid treatment for relapse. Ten milliliters of peripheral blood from MS patients and controls was collected in an EDTA tube. Mononuclear cells were separated on a Ficoll-Hypaque density gradient. RNA extraction was performed with Ultraspec-II RNA isolation system (Biotecx Laboratories, Texas, USA) following the manufacturer's instructions.

Complementary DNA was prepared by reverse transcription using M-MLV Reverse Transcriptase (Invitrogen Life Technologies, Carlsbad, USA) according to the manufacturer's recommendations. Real-time PCR was performed on a Light Cycler 480 system (Roche, Mannheim, Germany) using the Lightcycler 480 sybr green master kit (Roche, Mannheim, Germany). Results were normalized to the expression level of the glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) housekeeping gene to avoid differences due to possible RNA degradation or variable reverse transcription efficiency. Primers for MxA and GAPDH were designed following the description provided by other authors [13]. Standard curves were performed for each primer using control samples diluted to different concentrations. A sample from these curves was used as a standard and run in each experiment. Results obtained were normalized to a calibrator. A pool of healthy control samples was used as a calibrator and run during each PCR assay. MxA and GAPDH PCR quantities were determined using these standard curves and were normalized to GAPDH and to a calibrator. Results were expressed as MxA mRNA expression levels relative to GAPDH expression levels.

Statistical analysis

Differences in baseline clinical characteristics were analyzed using the Student *t* test, chi-square test, or Mann-Whitney *U* test, as appropriate. Baseline MxA mRNA expression in the R and NR groups was compared using the Student *t* test. The optimal cut off value for MxA expression was determined using receiver operating characteristics (ROC) analysis. Kaplan Meier survival curves were carried out to study time to the next relapse and to progression of disability. Results obtained from baseline samples were used to establish the cut-off to determine the presence of MxA mRNA induction at month 12. The threshold was defined as mean + 3SD. [14-16] Kaplan Meier survival curves were performed to study differences in time to the next relapse and in time to progression of disability between MxA induced and non induced patients.

All statistical analyses were performed with the Statistical Package for the Social Sciences, 20.0 (SPSS Inc., Chicago, USA). A *P* value of <0.05 was considered statistically significant for the comparisons.

Results

Patients

A total of 104 relapsing-remitting MS patients were included in the study. The inclusion period was completed in March 2011 and follow-up in May 2012. The patients' baseline clinical and radiological characteristics are shown in Table 1. No statistical differences regarding these characteristics were found.

Responders and non-responders

At the end of follow-up, 58 (55.8%) patients met the definition of responders and 46 (44.2%) patients were classified as non-responders. The 46 patients in the NR group were Relapse-NR and 16 (15.3%) EDSS-NR. None of the patients developed a secondary progressive MS during the study, thus the 16 patients in

Table 1. Clinical and demographic baseline characteristics.

	High-MxA (MXA >1.096)	Low-MxA (MXA <1.096)	<i>p</i>	TOTAL
Patients	52	52	-	104
Sex, n(%) female	39 (75.0%)	36 (69.2%)	0.51 ^a	75 (72.1%)
Age at onset, years, mean (SD)	32.31 (8.26)	33.77 (8.41)	0.37 ^b	33.04 (8.33)
Relapses pretreatment, mean (SD)	2.37 (1.44)	2.50 (1.61)	0.65 ^b	2.43 (1.52)
Duration MS pretreatment, years, median (IQR)	1.53 (0.82-3.19)	1.40 (0.75-3.52)	0.59 ^c	1.53 (0.78-3.19)
Initial EDSS score, median (IQR)	1.5 (1.0-2.0)	1.5 (1.0-2.0)	0.99 ^c	1.5 (1.0-2.0)
Duration of follow-up, years, median (IQR)	1.98 (1.52-2.58)	1.74 (1.04-2.90)	0.55 ^c	1.94 (1.09-2.64)
Baseline MRI				
-Gadolinium enhancement	16/42 (38.1%)	17/42 (40.5%)	0.82 ^a	33/84 (39.3%)
-Infratentorial lesions	37/49 (75.5%)	35/49 (71.4%)	0.65 ^a	72/98 (73.4%)
Interferon, n (%)				
-Rebif44	26 (50.0%)	27 (51.9%)		53 (51.0%)
-Betaferon/Extavia	22 (42.3%)	20 (47.6%)	0.89 ^a	42 (40.4%)
-Avonex	4 (7.7%)	5 (9.6%)		9 (8.9%)

^aChi-square test.

^bStudent *t*-test.

^cMann-Whitney *U* test.

Abbreviations: EDSS: Expanded Disability Scale; IQR: interquartile range; SD: standard deviation.

doi:10.1371/journal.pone.0112758.t001

the EDSS-NR group with confirmed EDSS progression also had relapses.

Baseline MxA expression

The mean baseline MxA mRNA expression level was significantly higher in the NR group (1.95, SD 1.32) than in the R group (1.07, SD 0.86) (Student *t* test, *p*<0.0001). ROC analysis was performed to establish a cut-off value for MxA mRNA expression that could differentiate between R and NR. A cut-off of 1.096 yielded the best sensitivity (73.9%) and specificity (69.0%) values (area under the curve = 0.732). The positive predictive value was 76.9% and the negative predictive value, 65.4%.

Patients were then classified as high-MxA or low-MxA according to whether MxA mRNA levels were above or below 1.096. The baseline characteristics of the high-MxA and low-MxA groups were analyzed, and no statistical differences were found. (Table 1) Mean relapse rate during the study was 1.23 (SD 1.28) in the high-MxA group and 0.46 (SD 0.99) in the low-MxA group, (Student *t* test, *p*=0.001). There were no differences in the duration of study follow-up between the two groups (years, median 1.98, IQR 1.52-2.58 vs 1.74, IQR 1.04-2.90, respectively) (Mann-Whitney *U* test, *p*=0.554).

Fourteen patients abandoned or changed treatment before a relapse or EDSS progression occurred: 9 interrupted treatment for pregnancy intention, 3 switched treatment because of adverse events (2 intense flu-like symptoms, 1 persistent lymphopenia), 1 had problems with the injector handling, and 1 abandoned therapeutic intervention. Median follow-up in the study for these patients was 1.29 years (IQR 0.78-1.91). There were no differences between the groups regarding the number of patients who did not complete follow-up (6 high-MxA and 8 low-MxA, chi-square test *p*=0.33).

Survival analysis

Survival analysis for relapses (Fig. 1) and EDSS progression (Fig. 2) was performed using the 1.096 threshold. In the low MxA

group, the time to the next relapse and to increase one point on the EDSS scale confirmed at 6 months was significantly longer compared with the high MxA group (25% of patients experienced the next relapse (percentile 75) in 2.14 years in the low-MxA group vs 0.40 years in the high-MxA group, log-rank *p*<0.0001)(25% of patients experienced EDSS progression (percentile 75) in undefined time in low-MxA group vs 2.09 years in the high-MxA group, log-rank *p*=0.01).

Survival curve for the time to the next relapse using the threshold of 1.096

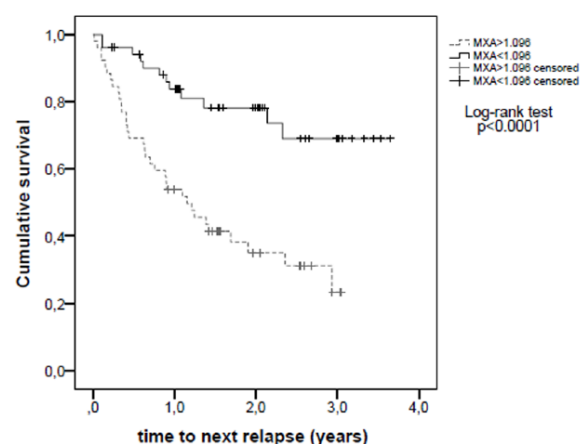


Figure 1. Survival curve for the time to the next relapse using the 1.096 threshold. Patients belonging to the low-MxA group (MXA <1.096) showed a significantly longer time to the next relapse (*p*<0.0001).

doi:10.1371/journal.pone.0112758.g001

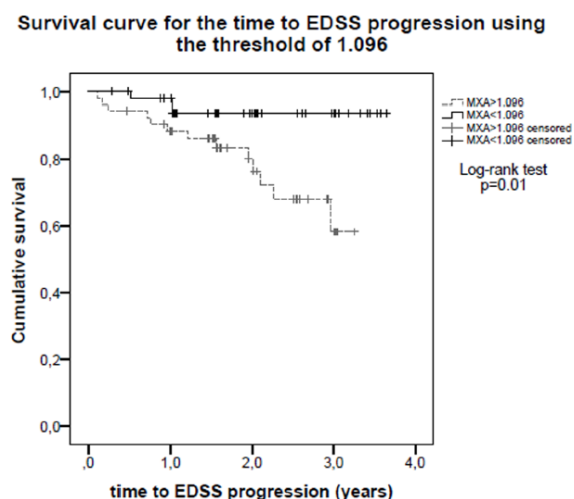


Figure 2. Survival curve for the time to EDSS progression using the 1.096 threshold. Patients belonging to the low-MxA group ($MxA < 1.096$) showed a significantly longer time to increase by one point on the EDSS scale ($p = 0.01$). doi:10.1371/journal.pone.0112758.g002

MxA induction

Evaluation of MxA mRNA expression after 12 months of treatment was performed in 96 patients. Eighteen patients showed absence of MxA induction (defined as levels below baseline MxA mRNA mean $(1.46) + 3SD (1.17)$ [14–16]) and in the remaining 78 patients MxA induction was demonstrated. No statistical differences were detected between high-MxA and low-MxA groups at baseline in the proportion of patients with or without MxA induction after one year of treatment (8 patients without MxA induction (16.7%) and 40 with MxA induction (83.3%) after one year of treatment in the high-MxA group at baseline vs 10 patients without induction (20.8%) and 38 with induction (79.2%) in the low-MxA group at baseline, *Chi square* test $p = 0.60$).

Survival analyses were performed to study differences in time to the next relapse and to progression of disability between MxA induced and non-induced patients at month 12. No statistical differences were found between both groups (median time to next relapse, MxA induced 2.93 years vs MxA non-induced 2.32 years, log rank $p = 0.72$; median time to EDSS progression, MxA induced undefined time vs MxA non-induced undefined time, log rank $p = 0.21$).

Discussion

Approximately 30% to 50% of MS patients do not respond to IFN- β treatment [12,17]. Two main types of mechanisms in the failure to respond to IFN- β treatment have been described [18]. The first one is in part a consequence of differing baseline characteristics, leading to interindividual differences in the response to this drug. The baseline characteristics of IFN-induced gene expression that conform to the so-called IFN signature [18–20], are factors that could explain these differences. High endogenous expression of these genes has been demonstrated in a subgroup of patients, referred to as IFN-^{high}. Several authors have studied the implications of the IFN signature in the IFN response. The results suggest that when the type I IFN pathway is fully activated at baseline (IFN-^{high}), there is a lack of pharmacological effect due to a loss of the ability for further stimulation by

IFN- β administration [19,21,22]. The IFN signature, and therefore the MxA as one of the genes constituting the IFN signature [19,20], could have a potential role as a biomarker of the IFN- β response.

A second mechanism in the failure to respond to IFN- β therapy is probably due to immunogenic factors leading to a decrease in the bioavailability of IFN- β . Development of NAbs is one of the main types but also others as the presence of different IFN receptor isoforms could contribute to this decrease [23]. Independently of the mechanism involved, a reduction of the expression of induced interferon responsive genes is detected including the MxA expression.

The present study evaluates if baseline MxA could have a role in predicting the IFN- β response. The results suggest that baseline MxA mRNA status can predict whether patients will respond or not to IFN- β before starting treatment. Previously published results suggest that patients with a less activated endogenous type I IFN pathway would have greater ability to up-regulate genes levels after the start of IFN, which would lead to a favorable response [19,20]. We hypothesize that patients with low baseline MxA status, as one of the genes involved in the IFN signature, would up-regulate MxA levels when IFN is started and therefore would have a favorable response. On the other hand, high MxA titers at baseline would indicate an innate activation of genes related to IFN response and a less inducible pathway, which would result in failure to respond to IFN- β treatment.

Baseline MxA expression has been evaluated in several studies. Some authors have suggested that spontaneous MxA mRNA levels in MS patients may be useful to identify patients with active disease forms [24] and those experiencing a relapse [25]. They found that higher baseline MxA mRNA levels are related to a longer time to a new relapse. Essential differences were found between these studies and the present. The objective of our study was to evaluate if baseline MxA expression has a role in predicting the response to IFN- β treatment while in Van der Voort study [26] the main objective was to evaluate if MxA is related to clinical disease activity in early MS untreated patients. Since the objectives are different, the populations included were also different: in our study, a homogeneous cohort of treatment naïve relapsing-remitting MS patients with at least one relapse in the previous year and achieving criteria to start treatment was selected to evaluate clinical response after beginning IFN- β treatment. In van der Voort study, patients presenting with a clinically isolated syndrome suggestive of MS or recently diagnosed with relapsing-remitting MS were recruited. In the subgroup of 50 patients that started treatment with IFN- β , no differences in baseline MxA mRNA levels were found between responders and non-responders, probably due to the small sample of patients as themselves suggest. It could be possible that untreated MS patients with low baseline MxA levels would have more chance to experience a relapse earlier and, at the same time, would have greater ability to induce MxA and therefore to show a better response to the treatment with IFN- β . Similarly, another study did not find differences between endogenous type I IFN signature and disease course in MS treated patients even though the patients on the high IFN signature group showed weaker biologic response within the first treatment month [22].

These studies provide evidence of the role of baseline characteristics as determinants of the treatment response. The data presented in this study support that role and indicate that MxA may be a useful biomarker of IFN- β response in naïve relapsing-remitting MS patients. Patients with MxA levels under the threshold take longer to relapse and to increase by one point on the EDSS scale, likely because a less activated IFN pathway

have greater ability to be stimulated when IFN- β treatment is started. Nonetheless, these findings should be validated in other MS cohorts. Our population only included treatment-naïve relapsing-remitting MS cases. The predictive performance of MxA should be tested in other forms of MS, such as the secondary progressive type, and in clinically isolated syndromes, and it would be interesting to see if there are differences between treatment-naïve and previously treated patients. Another issue to resolve in MxA mRNA measurement is the considerable variability between laboratories; hence, standardization of the technique is needed.

MxA after one year of treatment was studied in order to evaluate the bioavailability of IFN- β . One of the main causes of IFN bioavailability reduction is the development of NABs that generally appear after 6-18 months of treatment [14,15,27]. In our study, only 18 patients failed in MxA induction after 12 months. Absence of MxA induction at month 12 was not related with baseline MxA levels. This suggests that, in our population, baseline MxA expression couldn't predict which patients were going to develop NABs (evaluated through the absence of MxA induction at month 12). Therefore, the appearance of NABs would be better related to the immunogenicity of the preparation, dosing frequency and route of administration [28] than to the baseline MxA levels. The survival analyses to study time to next relapse and to progression of disability didn't show differences between the induced and non-induced patients. Presence of NABs may explain treatment failure after one year of treatment. Other biological mechanisms, such as the presence of soluble IFN receptors, could explain early treatment failure when NABs are absent.

References

1. The IFNB Multiple Sclerosis Study Group (1993) Interferon beta-1b is effective in relapsing-remitting multiple sclerosis. I. Clinical results of a multicenter, randomized, double-blind, placebo controlled trial. *Neurology* 43: 655-661.
2. Paty DW, Li DK (1993) Interferon beta-1b is effective in relapsing-remitting multiple sclerosis. II. MRI analysis results of a multicenter, randomized, double-blind placebo controlled trial. UBC MS/MRI Study Group and the IFNB Multiple Sclerosis Group. *Neurology* 43: 662-667.
3. Jacobs LD, Cookfair DL, Rudick RA, Herndon RM, Richert JR, et al. (1996) Intramuscular interferon beta-1a for disease progression in relapsing multiple sclerosis. *Ann Neurol* 39: 285-294.
4. Rudick RA, Goodkin DE, Jacobs LD, Cookfair DL, Herndon RM, et al. (1997) Impact of interferon beta-1a on neurologic disability in relapsing multiple sclerosis. The Multiple Sclerosis Collaborative Research Group (MSCRG). *Neurology* 49: 358-363.
5. PRISMS (Prevention of Relapses and Disability by Interferon beta-1a Subcutaneously in Multiple Sclerosis) Study Group (1998) Randomised double-blind placebo-controlled study of interferon beta-1a in relapsing/remitting multiple sclerosis. *Lancet* 352: 1498-1504.
6. PRISMS (Prevention of Relapses and Disability by Interferon- β -1a Subcutaneously in Multiple Sclerosis) Study Group, the University of British Columbia MS/MRI Analysis Group (2001) PRISMS-4: long-term efficacy of interferon- β -1a in relapsing MS. *Neurology* 56: 1628-1636.
7. Malucchi S, Gili F, Caldano M, Marnetto F, Valentino P, et al. (2008) Predictive markers for response to interferon therapy in patients with multiple sclerosis. *Neurology* 70: 1119-1127.
8. Polman CH, Reingold SC, Edan G, Filippi M, Hartung HP, et al. (2005) Diagnostic criteria for multiple sclerosis: 2005 revisions to the "McDonald Criteria". *Ann Neurol* 58: 840-846.
9. Kurtzke JF (1983) Rating neurological impairment in multiple sclerosis: an expanded disability status scale (EDSS) *Neurology* 33: 1444-52.
10. Confavreux C, Compston DA, Hommes OR, McDonald WI, Thompson AJ (1992) EDMUS, a European database for multiple sclerosis. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 55: 671-676.
11. Schumacher GA, Beebe G, Kibler RF, Kurland LT, Kurtzke JF, et al. (1965) Problems of experimental trials of therapy in multiple sclerosis: Report by the panel on the evaluation of experimental trials of therapy in multiple sclerosis. *Ann N Y Acad Sci* 122: 552-558.
12. Río J, Nos C, Tintoré M, Borrás C, Galán I, et al. (2002) Assessment of different treatment failure criteria in a cohort of relapsing-remitting multiple sclerosis patients treated with interferon beta: implications for clinical trials. *Ann Neurol* 52: 400-406.
13. Bertolotto A, Gili F, Sala A, Audano L, Castello A, et al. (2001) Evaluation of bioavailability of three types of IFN β in multiple sclerosis patients by a new quantitative-competitive-PCR method for MxA quantification. *J Immunol Methods* 256: 141-152.
14. Hesse S, Sellebjerg F, Sorensen PS (2009) Absence of MxA induction by interferon β in patients with MS reflects complete loss of bioactivity. *Neurology* 73: 372-377.
15. Malucchi S, Gili F, Caldano M, Sala A, Capobianco M, et al. (2011) One-year evaluation of factors affecting the biological activity of interferon beta in multiple sclerosis patients. *J Neurol* 258: 895-903.
16. Sominada A, Hillert J, Fogdell-Hahn A (2008) In vivo bioactivity of interferon-beta in multiple sclerosis patients with neutralizing antibodies is titre-dependent. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 79: 57-62.
17. Rudick RA, Lee JC, Simon J, Ransohoff RM, Fisher E (2004) Defining interferon beta response status in multiple sclerosis patients. *Ann Neurol* 56: 548-555.
18. Verweij CL, Vosslander S (2013) Relevance of the type I interferon signature in multiple sclerosis towards a personalized medicine approach for interferon-beta therapy. *Discov Med* 15: 51-60.
19. Comabella M, Lünemann JD, Río J, Sánchez A, López C, et al. (2009) A type I interferon signature in monocytes is associated with poor response to interferon-B in multiple sclerosis. *Brain* 132: 3353-3365.
20. van Baarsen L, Vosslander S, Tijssen M, Baggen JM, van der Voort LF, et al. (2008) Pharmacogenomics of interferon-B therapy in multiple sclerosis: baseline IFN signature determines pharmacological differences between patients. *PLoS One* 3(4): e1927. Available: <http://www.plosone.org/article/info%3Adoi%2F10.1371%2Fjournal.pone.0001927> Accessed April 02, 2008.
21. Axtell RC, de Jong BA, Boniface K, van der Voort LF, Bhat R, et al. (2010) T helper type I and 17 cells determine efficacy of interferon-beta in multiple sclerosis and experimental encephalomyelitis. *Nat Med* 16: 406-412.
22. Hundeshagen A, Hecker M, Paap BK, Angerstein C, Kandulski O, et al. (2012) Elevated type I interferon-like activity in a subset of multiple sclerosis patients: molecular basis and clinical relevance. *J Neuroinflammation* 9: 140. Available: <http://www.jneuroinflammation.com/content/9/1/140> Accessed 22 June 2012.
23. Sottini A, Capra R, Serana, Chiarini M, Caimi L, et al. (2009) Interferon-Beta therapy monitoring in multiple sclerosis patients. *Elder Metab Immune Disord Drug Targets* 9: 14-28.
24. Feng X, Petraglia AL, Chen M, Byskosh PV, Boos MD, et al. (2002) Low expression of interferon-stimulated genes in active multiple sclerosis is linked to subnormal phosphorylation of STAT1. *J Neuroimmunol* 129: 205-215.
25. Hesse D, Krakauer M, Lund H, Ryder LP, Alsing I, et al. (2007) Spontaneous MxA mRNA expression is associated with low MRI disease activity in multiple sclerosis. *Mult Scler* 13: S37-S38, p143.

Baseline MxA mRNA in Multiple Sclerosis Patients

26. Van der Voort LF, Vennegeoor A, Visser A, Knol DL, Uitdehaag BM, et al. (2010) Spontaneous MxA mRNA level predicts relapses in patients with recently diagnosed MS. *Neurology* 75: 1228–1233.
27. Serana F, Imberti L, Amato MP, Comi G, Gasperini C, et al. (2014) MxA mRNA quantification and disability progression in interferon beta-treated multiple sclerosis patients. *PLoS One* 9(4): e94794. Available: <http://www.plosone.org/article/info%3Adoi%2F10.1371%2Fjournal.pone.0094794>. Accessed 2014 Apr 14.
28. Sominanda A, Rot U, Suoniemi M, Deisenhammer F, Hillert J, et al. (2007) Interferon beta preparations for the treatment of multiple sclerosis patients differ in neutralizing antibody seroprevalence and immunogenicity. *Mult Scler* 13: 208–214.

Trabajo número 2

Absence of MxA induction is related to a poor clinical response to interferon beta treatment in multiple sclerosis patients.

Matas E¹, Bau L¹, Martínez-Iniesta M², Romero-Pinel L¹, Mañé-Martínez MA^{1,3}, Martínez-Yélamos S¹.

¹Multiple Sclerosis Unit, Department of Neurology, Hospital Universitari de Bellvitge-IDIBELL, Edifici Tècnic-Quirúrgic, mòdul E. Gran via s/n, 08907, L'Hospitalet de Llobregat, Spain. ²Translational Research Laboratory, Institut Català d'Oncologia-IDIBELL, L'Hospitalet de Llobregat, Spain.

³Department of Neurology, Hospital Universitari de Tarragona Joan XXIII, Universitat Rovira i Virgili, Tarragona, Spain.

Journal of Neurology 2016; 263(4): 722-729. (IF 2015: 3.408)



ORIGINAL COMMUNICATION

Absence of MxA induction is related to a poor clinical response to interferon beta treatment in multiple sclerosis patients

Elisabet Matas¹ · Laura Bau¹ · María Martínez-Iniesta² · Lucía Romero-Pinel¹ · Maria Alba Mañé-Martínez^{1,3} · Sergio Martínez-Yélamos¹Received: 14 December 2015 / Revised: 25 January 2016 / Accepted: 27 January 2016 / Published online: 12 February 2016
© Springer-Verlag Berlin Heidelberg 2016

Abstract The aim of this study is to investigate whether induction of myxovirus resistance protein A (MxA) mRNA after 3 months of interferon- β administration is related to the treatment response in multiple sclerosis (MS) patients. In this prospective study, MS patients were enrolled before starting treatment. Demographic, clinical and radiological variables were recorded. Blood samples were obtained before, and at 3 and 12 months after interferon- β treatment. Real-time PCR was used to analyze MxA mRNA expression. Patients were classified as MxA-low or -high depending on MxA levels at baseline, and as MxA-induced or -non-induced according to whether an increase in MxA expression was detected at month 3. Time to the next relapse was investigated using Cox proportional hazards regression analysis. One hundred and four patients were selected and followed for a median of 2.2 years (IQR 1.6–3.5). On Cox regression analysis, a higher EDSS score before treatment (HR 1.57; 95 % CI 1.02–2.40; $p = 0.039$), MxA-high status at baseline (HR 2.71; 95 % CI 1.26–5.81; $p = 0.010$), and MxA-non-induced at month 3 (HR 2.49; 95 % CI 1.08–5.68; $p = 0.031$), were predictors of poor response to interferon- β in naïve MS patients. Patients showing a lower capacity for MxA

induction following 3 months of interferon- β treatment are more likely to be non-responders to this therapy.

Keywords Multiple sclerosis · MxA · Interferon- β · Biomarker · Treatment response · Immunomodulatory therapy

Introduction

Immunomodulatory treatment with interferon-beta (IFN- β) is the most commonly used therapy for relapsing-remitting multiple sclerosis (MS) [1–4]. Unfortunately, around 40 % of MS patients do not respond appropriately to IFN- β [5, 6], and their ability to respond can only be determined after a period of treatment, usually 1 or 2 years. It would be of value to have biomarkers that can identify patients who are likely to have a poor response before or shortly after starting IFN- β in order to consider other treatments and lower the socio-economic cost and disability accumulation associated with relapses.

After IFN- β binds to its specific receptor, transcription of different IFN-responsive genes is initiated. Among these, the myxovirus resistance protein A (MxA) gene is a proven indicator of IFN bioavailability [7, 8]. An absence of MxA gene expression in the course of treatment has been related to the appearance of neutralizing antibodies, the development of different receptor isoforms, and other mechanisms of IFN resistance [9–11]. Previously reported results by our group have shown that baseline MxA level can predict treatment response [12] and suggest that MxA may be a useful biomarker for this purpose.

The objective of this study is to investigate whether induction of MxA mRNA expression after 3 months of

✉ Elisabet Matas
ematas@bellvitgehospital.cat

¹ Multiple Sclerosis Unit, Department of Neurology, Hospital Universitari de Bellvitge-IDIBELL, Edifici Tècnic-Quirúrgic, mòdul E. Gran via s/n, 08907 L'Hospitalet de Llobregat, Spain

² Translational Research Laboratory, Institut Català d'Oncologia-IDIBELL, L'Hospitalet de Llobregat, Spain

³ Department of Neurology, Hospital Universitari de Tarragona Joan XXIII, Universitat Rovira i Virgili, Tarragona, Spain

treatment is related to IFN- β response in MS patients, independently of the baseline MxA expression.

Methods

Study design

A prospective, observational, open-label, non-randomized study was performed in the Multiple Sclerosis Unit of Hospital Universitari de Bellvitge (Barcelona). Our MS clinic is the reference center for demyelinating diseases in the health district of *Gerència Territorial Barcelona Metropolitana Sud* in Catalonia, a region in the northeast of Spain.

Ethics statement

This study was approved by the Ethics Committee of Hospital Universitari de Bellvitge, and written informed consent to participate was obtained from each patient and control.

Patients

Patients were selected from a previously described prospective cohort [12]. Briefly, treatment-naïve, relapsing-remitting MS patients fulfilling the 2005 revised McDonald criteria [13] were enrolled between February 2008 and March 2011. Treatment was selected according to MS guidelines and the standard medical practice in our center. Prospective follow-up was completed in December 2012. A cohort of non-MS controls was selected to perform gene standard curves (MxA and GAPDH) and to normalize the MS patient samples.

Clinical assessment, including the Expanded Disability Status Scale (EDSS) [14], was performed every 6 months following the start of treatment and at the time of relapse. Clinical and demographic data were recorded prospectively using the European Database for Multiple Sclerosis (EDMUS) [15].

Relapses were established based on the development of a new symptom or worsening of a previously recorded symptom attributable to MS, accompanied by consistent neurological dysfunction lasting at least 24 h in the absence of fever and preceded by a stable period or improvement for at least 30 days [16].

Patients were classified as responders if there were no relapses over the follow-up or non-responders if a relapse occurred.

Variables

The baseline clinical variables included sex, age at onset, age when treatment was started, annualized relapse rate before treatment, duration of MS before treatment, and EDSS score at the beginning of treatment. The radiologic variables were obtained by magnetic resonance imaging (MRI) study performed during the year previous to the start of IFN- β treatment. The presence of gadolinium-enhancing lesions and infratentorial lesions was recorded. Detection of IgG oligoclonal bands (OCB) in cerebrospinal fluid obtained by lumbar puncture at the diagnosis of MS was also included as a variable in the study.

Samples

Blood samples were taken at baseline, month 3, and at completion of a 12-month period of IFN- β treatment, in the absence of signs of infection and corticosteroid treatment for relapse [17, 18]. Baseline samples were taken before starting treatment. For the samples at months 3 and 12, patients were instructed to visit our center 12 h after administration of the last IFN- β dose [19].

Ten milliliters of peripheral blood was collected in an EDTA tube from MS patients and controls. Mononuclear cells were separated on a Ficoll-Hypaque density gradient. RNA extraction was performed with the Ultraspec-II RNA isolation system (Biotecx Laboratories, Texas, USA), following the manufacturer's instructions.

Complementary DNA was prepared by reverse transcription using M-MLV Reverse Transcriptase (Invitrogen Life Technologies, Carlsbad, USA) according to the manufacturer's recommendations. Real-time PCR was performed on a Light Cycler 480 system (Roche, Mannheim, Germany) using the Lightcycler 480 sybr green master kit (Roche, Mannheim, Germany). Results were normalized to the expression level of the glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) housekeeping gene to avoid differences due to possible RNA degradation or variable reverse transcription efficiency. Primers for MxA and GAPDH were designed following the descriptions provided by other authors [20].

Standard curves were performed for each primer using control samples diluted to different concentrations. A sample from these curves was used as a standard and run in each experiment. The results obtained were normalized to a calibrator. A pool of healthy control samples was used as a calibrator and run during each PCR assay. MxA and GAPDH PCR quantities were determined using these standard curves and were normalized to GAPDH and to a

calibrator. Results were expressed as MxA mRNA expression levels relative to GAPDH expression levels.

Statistical analysis

Receiver operating curve analysis was performed to establish a cut-off value for baseline MxA mRNA expression that would differentiate between responders and non-responders. Two groups were defined: MxA-high when baseline MxA mRNA levels were above the cut-off value and MxA-low when they were below [12].

The cut-off value to detect MxA induction at month 3 was established as the ratio: mean MxA month 3/mean MxA baseline. Based on this threshold, two patient groups were defined: MxA-induced and MxA-non-induced.

The optimal cut-off to determine MxA mRNA induction at month 12 was defined according to previously published criteria [9, 21, 22] as the mean plus 3 standard deviations (SD) of the baseline value. Patients in whom MxA was induced at month 12 were referred to as MxA-positive.

Cox proportional hazards regression analysis was performed using time to the next relapse as the outcome variable. Covariates included demographic, clinical, radiologic, and laboratory variables. Results were expressed as the hazard ratio (HR) with 95 % confidence interval (CI).

The Chi-square test was used to detect association between the presence of MxA induction at month 12 with the baseline MxA status or with the presence of MxA induction at month 3.

All statistical analyses were performed with the Statistical Package for the Social Sciences, 20.0 (SPSS Inc., Chicago, USA). A *p* value of <0.05 was considered statistically significant in the comparisons.

Results

Patients

A total of 104 relapsing-remitting MS patients were included in the study. At the end of follow-up (median 2.2 years, IQR 1.6–3.5), 47 (45.2 %) patients met the criteria of responders and 57 (54.8 %) of non-responders. None of the patients developed secondary progressive MS during the study. The baseline demographic, clinical and radiologic variables were evaluated (Table 1).

Baseline MxA expression

Mean baseline MxA mRNA in the 104 treatment-naïve patients, expressed as the normalization ratio, was 1.46 (SD

Table 1 Baseline clinical, radiologic, and demographic characteristics

Patients	104
Sex, female, <i>n</i> (%)	75 (72.1 %)
Age at onset, years, mean (SD)	33.04 (8.33)
OCB positive, <i>n</i> (%)	83/100 (83 %)
Relapses pretreatment, mean (SD)	2.43 (1.52)
Duration MS pretreatment, years, median (IQR)	1.53 (0.78–3.19)
Initial EDSS score, median (IQR)	1.5 (1.0–2.0)
Duration of follow-up, years, median (IQR)	2.2 (1.6–3.5)
Baseline MRI	
Infratentorial lesions	72/98 (73.4 %)
Gadolinium enhancement	33/84 (39.3 %)
Interferon, <i>n</i> (%)	
Rebif44	53 (51.0 %)
Betaferon/Extavia	42 (40.4 %)
Avonex	9 (8.9 %)

OCB oligoclonal bands, EDSS expanded disability status scale, MRI magnetic resonance imaging

1.17). ROC analysis to establish a cut-off value for MxA mRNA expression that could differentiate between responders and non-responders found that a value of 1.096 yielded the best sensitivity (73.9 %) and specificity (69.0 %) for this purpose (area under the curve = 0.732). Patients were then classified as MxA-high or MxA-low according to whether MxA mRNA levels were above or below 1.096 [12]. The mean baseline MxA mRNA value was 0.69 (SD 0.24) in the MxA-low group and 2.23 (SD 1.22) in MxA-high patients.

Month 3

At month 3, we were able to evaluate blood samples from 101 patients. Data from three patients were not available: in two because the sample was not taken and in 1 because the sample was of poor quality. Median time from the beginning of treatment to sample collection was 2.86 months (IQR 2.56–3.19), and median time from administration of the last IFN- β injection to sampling was 12.60 h (IQR 10.51–15.45). The degree of induction of MxA mRNA expression after starting IFN- β treatment was defined as the ratio between the month 3 mean and the baseline mean. Mean MxA mRNA level was 15.17 (SD 9.46) at month 3 and 1.46 (SD 1.17) at baseline. A cut-off of 10 (month 3 mean/baseline mean: 15.17/1.46 = 10.4) was established to classify patients as MxA-induced (level above 10) or MxA-non-induced (level below or equal 10). Mean MxA mRNA expression at month 3 was 15.55 (SD 9.13) in patients classified as MxA-low at baseline and 14.80 (SD 9.86) in those classified as MxA-high at baseline (Student *t* test, *p* = 0.69).

Month 12

At month 12, blood samples were evaluated from 94 of the 104 patients. Seven did not complete the 12-month treatment period for the following reasons: pregnancy intention in two patients, problems handling the injector in one, adverse events in three (two intense flu-like symptoms, one thyroid disorder), and treatment failure in one. In addition, samples were rejected in three patients who completed treatment, two because IFN-β dose had been changed and one because of poor sample quality. Median time from the beginning of treatment to sample collection was 11.99 months IQR (11.14–12.68), and median time from administration of the last IFN-β injection to sampling was 11.33 h IQR (9.62–14.25).

The threshold to establish increased MxA gene expression at month 12 was calculated as the mean plus 3SD of the baseline MxA mRNA expression [9, 21, 22], which yielded a value of 4.97. Hence, a MxA mRNA level greater

than 5 was considered to define the presence of increased MxA expression, referred to hereafter as *MxA-positive*.

Cox proportional hazards regression analysis

The following clinical variables were included in the regression analyses: sex, age at onset, age when treatment was started, annualized pre-treatment relapse rate, time from onset to treatment and EDSS score at the beginning of treatment.

The radiologic variables analyzed (gadolinium-enhancing lesions and infratentorial lesions) were obtained from the most recent MRI study performed before starting treatment. Ninety-one MRI were evaluated. Median time from MRI study to treatment initiation was 0.24 years (IQR 0.09–0.68).

The laboratory variables included cerebrospinal fluid IgG oligoclonal band (OCB) detection (positive or negative), baseline MxA status (MxA-high or -low), and

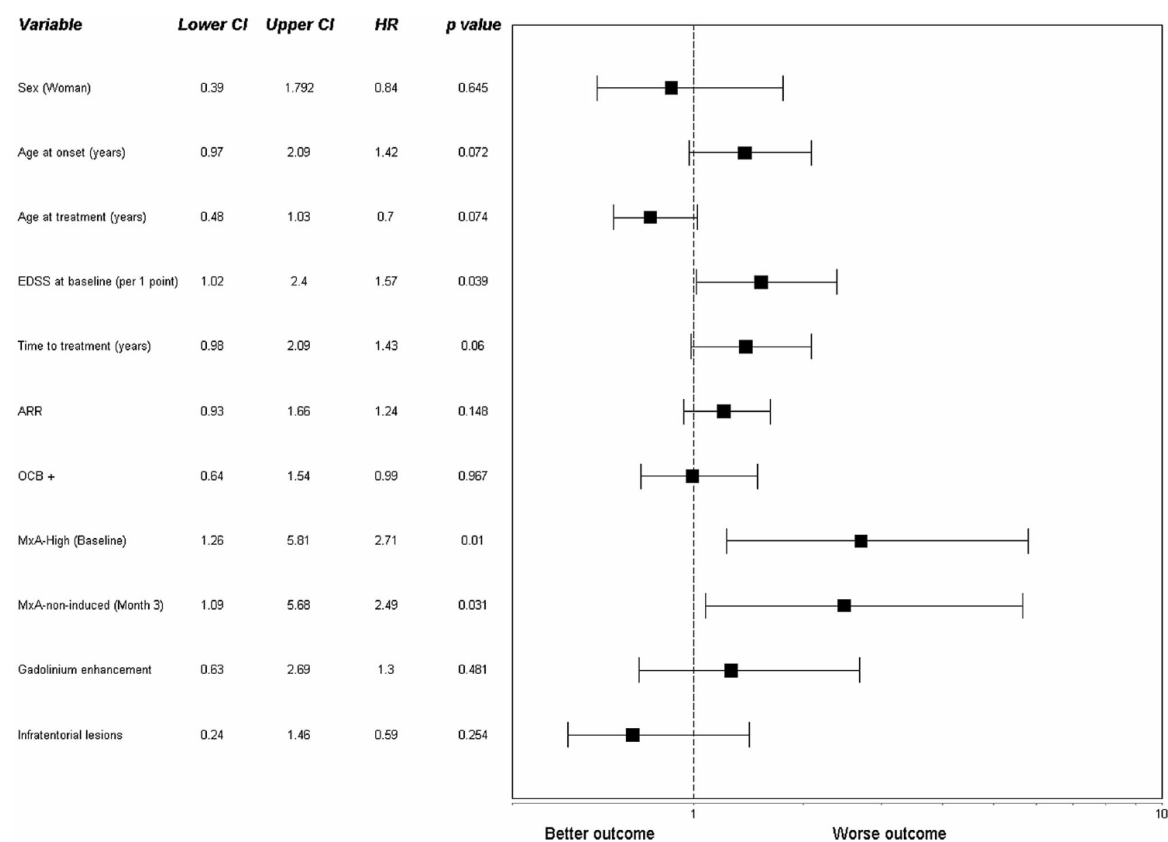


Fig. 1 Cox Proportional hazard analysis using time to the next relapse as the outcome variable. The figure shows hazard ratio estimates and confidence intervals for the effect of IFN-β treatment within the different variables. Higher EDSS at baseline, MxA-high at

baseline, and MxA-non-induced at month 3 were independent predictors of non-response to IFN treatment in naïve MS patients. EDSS expanded disability status scale, ARR annualized relapse rate, OCB oligoclonal bands

induction detected at month 3 (MxA-induced or MxA-non-induced).

Cox proportional hazard regression analysis was performed using the time to the next relapse as the outcome variable. A higher EDSS score before starting treatment (HR 1.57; 95 % CI 1.02–2.40; $p = 0.039$), MxA-high status at baseline (HR 2.71; 95 % CI 1.26–5.81; $p = 0.010$), and MxA-non-induced at month 3 (HR 2.49; 95 % CI 1.08–5.68; $p = 0.031$) were independent predictors of non-response to IFN- β in treatment-naïve MS patients (Fig. 1).

Combined analysis of the three predictive variables yielded a survival curve model. EDSS score was transformed into a dichotomous variable (<2 and ≥ 2). Patients categorized as MxA-low at baseline and MxA-induced at month 3 were grouped together, and the remaining possibilities (MxA-high or MxA-non-induced) formed the other group. Cox proportional hazard analysis showed that time to the next relapse was longer in patients whose baseline EDSS was <2 than in those with scores of ≥ 2 . In both groups, patients with MxA-low status at baseline and MxA-induced at month 3 showed a longer time to the next relapse ($p = 0.034$) (HR 2.04, 95 % CI 1.39–3.00, $p < 0.001$) (Fig. 2).

MxA at month 12 related to baseline and month-3 MxA

Relationships were sought between MxA expression at month 12 and MxA expression at baseline and at month 3. No statistically significant differences in the percentage of

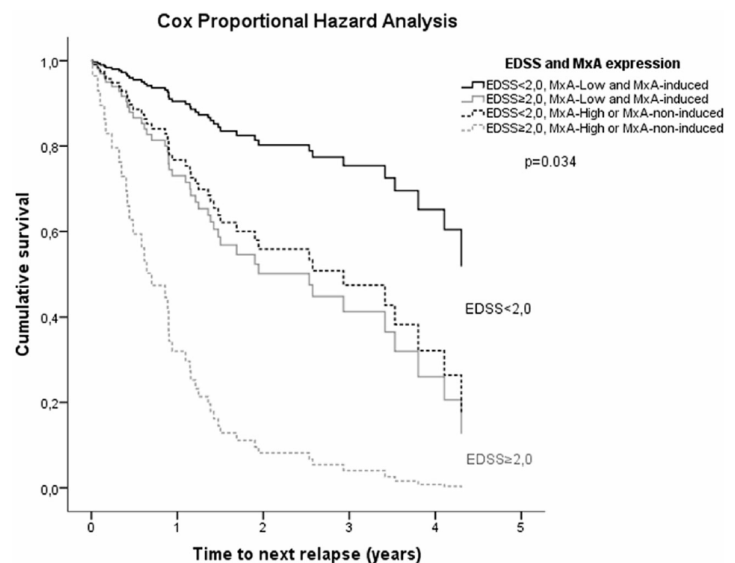
MxA-positive and -negative patients at month 12 were found according to their baseline status (37 patients rated as MxA-low out of 77 MxA-positive patients at month 12 vs. 9 patients rated as MxA-low of 17 MxA-negative at month 12, Chi-square test, $p = 0.71$) or according to their month-3 status (41 MxA-induced at month 3 out of 75 MxA-positive at month 12 vs. 7 MxA-induced at month 3 of 16 MxA-negative at month 12, Chi-square test, $p = 0.43$).

Discussion

Interferon beta is one of the most commonly used therapies for relapsing-remitting MS [1–4] but, unfortunately, a large percentage of MS patients do not respond appropriately to this treatment [5, 6]. Newer therapies are now available for this population; hence, tools are being sought to help decide which treatment would be the best for each individual case.

Several clinical, radiologic, and laboratory biomarkers have been investigated to predict IFN- β response, but none have proven absolutely reliable. Among the baseline clinical characteristics, older age at onset, longer MS duration, and lower disability at the start of IFN- β seem to be related to better treatment response [23, 24]. Our analysis showed that for each 1-point increase in EDSS score, the hazard of non-response to IFN- β increased by a factor of 1.57 (95 % CI 1.02–2.40). These results are in line with other studies suggesting that a lower EDSS score at the start of the drug predicts a more favorable response [23, 25]. Nevertheless,

Fig. 2 Cox proportional hazard analysis for the predictive value of EDSS, baseline MxA and month-3 MxA. Time to next relapse was longer in patients with EDSS scores <2 than in those with scores ≥ 2 . In both these groups, time to relapse was longer in patients classified as MxA-low at baseline and MxA-induced at month 3 compared with MxA-high or MxA-non-induced patients. Patients with EDSS >2 and MxA-high or MxA-non-induced status relapsed earlier than the remaining groups



although an analysis of clinical characteristics may help, it does not seem to suffice for selecting drugs other than IFN as the initial treatment for MS patients.

The baseline characteristics of the IFN-stimulated genes that conform the IFN signature may have implications in the response to IFN- β [26, 27], and several authors have investigated this possibility. The results suggest that when the type I IFN pathway is fully activated at baseline, IFN- β administration will have little or no pharmacological effect because the ability for further stimulation is lost [26, 28, 29]. The MxA gene is one of the most extensively studied of those constituting the IFN signature. Previous work by our group has shown that baseline MxA results can predict the clinical response to IFN- β [12]. In the present study, the same cohort of patients was evaluated in a prospective manner. Results of the previously evaluated baseline samples and of those obtained after 3 and 12 months of IFN- β treatment were evaluated. On Cox regression analysis, patients with high baseline MxA values were found to have a higher probability of non-response to IFN- β , as defined by a shorter time to the next relapse (HR 2.71; 95 % CI 1.26–5.81; $p = 0.01$). Our results are in line with the findings of a previous study, in which the pretreatment type I IFN pathway was found to be activated in non-responders [26].

Another variable predictive of a shorter period to the next relapse investigated in our study was MxA induction following 3 months of IFN- β treatment. Patients in whom MxA was not induced had an approximately 2.5-fold increased risk of experiencing a relapse relative to those showing MxA induction. Higher MxA induction with IFN- β treatment has been related to a lower risk of EDSS progression [30] and a better IFN response [31]. Analysis of changes in gene expression during the first 3 months of IFN- β treatment have shown strong, significant induction in treatment responders compared to non-responders (in the case of MxA, values of 3 in non-responders and 20 in responders) [26].

Due to the immunogenicity of the drug preparations, a percentage of patients develop neutralizing antibodies (NAbs), which can interfere with the function of IFN- β treatment. Other factors, such as the development of IFN receptor isoforms may also have an influence on the treatment response. Several studies have demonstrated that the presence of NAbs is related with a reduction in the clinical and radiologic response to IFN- β [4, 7, 32–34]. Development of NAbs mainly occurs after 12 months of treatment [7, 34]. Hence, determination of these antibodies at the start of drug therapy has limited value. The study of NAbs is based on direct detection or on measurement of MxA expression as an indicator of IFN bioavailability and the biological effect, with equivalent results [9, 22]. In the present study, MxA expression was evaluated at month 12

to determine the IFN bioavailability at that time point. No association was found between patients classified as MxA-low or -high at baseline and patients MxA-positive or -negative at month 12 (Chi-square test, $p = 0.71$) or between patients categorized as MxA-induced or -non-induced at month 3 and patients considered MxA-positive or -negative at month 12 (Chi-square test, $p = 0.43$). These results suggest that neither baseline nor month-3 status are associated with the bioavailability of IFN- β at month 12, probably because, apart from the capability of IFN- β induction in each patient, MxA expression is also influenced by the development of NAbs or other immunogenic factors [7]. It is likely that the appearance of NAbs is more closely related to other factors, such as the immunogenicity of the preparation, the dosing frequency, or the administration route [35]. NAbs are known to appear at 6–12 months after the start of treatment [18], but their impact on clinical efficacy can only be determined after 18 months [33, 34]. In the present study, we aimed to evaluate factors that could predict treatment response at the beginning of treatment, and therefore, the month 12 findings were not included in the regression analysis.

The population included in this study comprised only treatment-naïve relapsing-remitting MS cases. Therefore, the predictive variables identified can only be applied to this group and would require evaluation in other forms of MS, such as the secondary progressive type, and in previously treated patients. Furthermore, the considerable variability between laboratories in MxA mRNA measurement should be resolved by standardization of the technique.

This study investigated induction of MxA, one of the IFN-stimulated genes, together with clinical and radiologic variables, to determine the performance of these factors in predicting the clinical response to IFN- β therapy. Our results indicate that MxA induction after 3 months of treatment may be a useful predictor of IFN- β response, and suggest that the subgroup of MS patients whose baseline profile is consistent with greater disability, high baseline MxA, and low MxA induction have a higher probability of non-responding to IFN- β treatment than their counterparts.

Acknowledgments The authors thank Dr. Txomin Arbizu for his support in the development of the study, Ana M. González, Nuria Iranzo, Isabel León, M. Teresa Anguix, Silvia Macho and Mireya Bures for their nursing assistance, Gemma Aiza and Nadia García for their laboratory support, Susana Pobra for her administrative support and all patients for their invaluable participation.

Compliance with ethical standards

Conflicts of interest E. Matas, L. Bau, L. Romero-Pinel, M.A. Mañé-Martínez and S. Martínez-Yélamos received research support, funding for travel and congress expenses and honoraria from speaking engagements from Biogen Idec, Teva Pharmaceutical Industries LTD.

Sanofi-Aventis, Novartis, Bayer HealthCare Pharmaceuticals and Merck Serono. M. Martínez-Iniesta reports no disclosures.

Ethical standard This study was approved by the Ethics Committee of Hospital Universitari de Bellvitge, and written informed consent to participate was obtained from each patient and control.

Funding This work was partially supported by the Convenio de Investigación, Dep. de Salut. Generalitat de Catalunya (352/05).

References

1. The IFNB Multiple Sclerosis Study Group (1993) Interferon beta-1b is effective in relapsing-remitting multiple sclerosis. I. Clinical results of a multicenter, randomized, double-blind, placebo controlled trial. *Neurology* 43:655–661
2. Jacobs LD, Cookfair DL, Rudick RA et al (1996) Intramuscular interferon beta-1a for disease progression in relapsing multiple sclerosis. *Ann Neurol* 39:285–294
3. PRIMS (Prevention of Relapses and Disability by Interferon beta-1a Subcutaneously in Multiple Sclerosis) Study Group (1998) Randomised double-blind placebo-controlled study of interferon beta-1a in relapsing/remitting multiple sclerosis. *Lancet* 352:1498–1504
4. PRISMS (Prevention of Relapses and Disability by Interferon-β-1a Subcutaneously in Multiple Sclerosis) Study Group and the University of British Columbia MS/MRI Analysis Group (2001) PRISMS-4: long-term efficacy of interferon-β-1a in relapsing MS. *Neurology* 56:1628–1636
5. Río J, Nos C, Tintoré M et al (2002) Assessment of different treatment failure criteria in a cohort of relapsing-remitting multiple sclerosis patients treated with interferon beta: implications for clinical trials. *Ann Neurol* 52:400–406
6. Rudick RA, Lee JC, Simon J et al (2004) Defining interferon beta response status in multiple sclerosis patients. *Ann Neurol* 56:548–555
7. Malucchi S, Gili F, Caldano M et al (2008) Predictive markers for response to interferon therapy in patients with multiple sclerosis. *Neurology* 70:1119–1127
8. Gilli F, Marnetto F, Caldano M et al (2006) Biological markers of interferon-beta therapy: comparison among interferon-stimulated genes MxA, TRAIL and XAF-1. *Mult Scler* 12:47–57
9. Hesse D, Sellebjerg F, Sorensen PS (2009) Absence of MxA induction by interferon beta in patients with MS reflects complete loss of bioactivity. *Neurology* 73:372–377
10. Sottini A, Capra R, Serana F et al (2009) Interferon-Beta therapy monitoring in multiple sclerosis patients. *Eur J Neurol* 16:14–28
11. Deisenhammer F, Reindl M, Harvey J et al (1999) Bioavailability of interferon beta 1b in MS patients with and without neutralizing antibodies. *Neurology* 52:1239–1243
12. Matas E, Bau L, Martínez-Iniesta M et al (2014) Baseline MxA mRNA expression predicts interferon beta response in multiple sclerosis patients. *PLoS One* 9(11):e112758. doi:10.1371/journal.pone.0112758
13. Polman CH, Reingold SC, Edan G et al (2005) Diagnostic criteria for multiple sclerosis: 2005 revisions to the “McDonald Criteria”. *Ann Neurol* 58:840–846
14. Kurtzke JF (1983) Rating neurological impairment in multiple sclerosis: an expanded disability status scale (EDSS). *Neurology* 33:1444–1452
15. Confavreux C, Compston DA, Hommes OR et al (1992) EDMUS, a European database for multiple sclerosis. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 55:671–676
16. Schumacher GA, Beebe G, Kibler RF et al (1965) Problems of experimental trials of therapy in multiple sclerosis: report by the panel on the evaluation of experimental trials of therapy in multiple sclerosis. *Ann N Y Acad Sci* 122:552–558
17. Bertolotto A, Malucchi S, Sala A et al (2002) Differential effects of three interferon betas on neutralising antibodies in patients with multiple sclerosis: a follow up study in an independent laboratory. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 73:148–153
18. Antonelli G, Bagnato F, Pozzilli C et al (1998) Development of neutralizing antibodies in patients with relapsing-remitting multiple sclerosis treated with IFN-beta 1a. *J Interferon Cytokine Res* 18:345–350
19. Gilli F, Marnetto F, Caldano M et al (2005) Biological responsiveness to first injections of interferon-beta in patients with multiple sclerosis. *J Neuroimmunol* 158:195–203
20. Bertolotto A, Gilli F, Sala A et al (2001) Evaluation of bioavailability of three types of IFNβ in multiple sclerosis patients by a new quantitative-competitive-PCR method for MxA quantification. *J Immunol Methods* 256:141–152
21. Malucchi S, Gilli F, Caldano M et al (2011) One-year evaluation of factors affecting the biological activity of interferon beta in multiple sclerosis patients. *J Neurol* 258:895–903
22. Sominada A, Hillert J (2008) Fogdell-Hahn. In vivo bioactivity of interferon-beta in multiple sclerosis patients with neutralizing antibodies is titre-dependent. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 79:57–62
23. Romeoa M, Martinelli-Boneschib F, Rodeghera M et al (2013) Clinical and MRI predictors of response to interferon-beta and glatiramer acetate in relapsing-remitting multiple sclerosis patients. *Eur J Neurol* 20:1060–1067
24. Mezei Z, Bereczki D, Racz L et al (2012) Can a physician predict the clinical response to first-line immunomodulatory treatment in relapsing-remitting multiple sclerosis? *Neuropsychiatr Dis Treat* 8:465–473
25. Sá MJ, de Sá J, Sousa L (2014) Relapsing-remitting multiple sclerosis: patterns of response to disease-modifying therapies and associated factors: a national survey. *Neurol Ther* 3(2):89–99. doi:10.1007/s40120-014-0019-4 (eCollection 2014)
26. Comabella M, Lünemann JD, Rio J et al (2009) A type I interferon signature in monocytes is associated with poor response to interferon-B in multiple sclerosis. *Brain* 132:3353–3365
27. van Baarsen L, Vosslander S, Tijssen M et al (2008) Pharmacogenomics of interferon-B therapy in multiple sclerosis: baseline IFN signature determines pharmacological differences between patients. *PLoS One* 3(4):e1927. doi:10.1371/journal.pone.0001927
28. Axtell RC, de Jong BA, Boniface K et al (2010) T helper type I and 17 cells determine efficacy of interferon-beta in multiple sclerosis and experimental encephalomyelitis. *Nat Med* 16:406–412
29. Hundeshagen A, Hecker M, Paap BK et al (2012) Elevated type I interferon-like activity in a subset of multiple sclerosis patients: molecular basis and clinical relevance. *J Neuroinflamm* 9:140. doi:10.1186/1742-2094-9-140
30. Serana F, Imberti L, Amato MP et al (2014) MxA mRNA quantification and disability progression in interferon beta-treated multiple sclerosis patients. *PLoS One* 9(4):e94794. doi:10.1371/journal.pone.0094794
31. Garcia-Montojo M, De Las Heras V, Bartolome M et al (2007) Interferon beta treatment: bioavailability and antiviral activity in multiple sclerosis patients. *J Neurovirol* 13:504–512
32. The IFNB Multiple Sclerosis study group and the (1996) University of British Columbia MS/MRI analysis group. Neutralizing antibodies during treatment of multiple sclerosis with interferon beta-1b: experience during the first three years. *Neurology* 47:889–894

33. Malucchi S, Sala A, Gilli F et al (2004) Neutralizing antibodies reduce the efficacy of β IFN during treatment of multiple sclerosis. *Neurology* 62:2031–2037
34. Sorensen PS, Ross C, Clemmesen KM et al (2003) Clinical importance of neutralising antibodies against interferon-beta in patients with relapsing-remitting multiple sclerosis. *Lancet* 362:1184–1191
35. Sominanda A, Rot U, Suoniemi M et al (2007) Interferon beta preparations for the treatment of multiple sclerosis patients differ in neutralizing antibody seroprevalence and immunogenicity. *Mult Scler* 13:208–214

Trabajo número 3

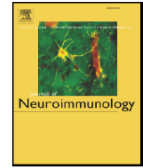
MxA mRNA expression as a biomarker of interferon beta response in multiple sclerosis patients

Elisabet Matas¹, Laura Bau¹, María Martínez-Iniesta², Lucía Romero-Pinel¹, M. Alba Mañé-Martínez^{1,3}, Álvaro Cobo-Calvo⁴, Sergio Martínez-Yélamos¹

¹Multiple Sclerosis Unit, Department of Neurology, Hospital Universitari de Bellvitge-IDIBELL, Edifici Tècnic-Quirúrgic, Planta 1, mòdul E, Feixa Llarga s/n, L'Hospitalet de Llobregat 08907, Spain.

²Translational Research Laboratory, Institut Català d'Oncologia-IDIBELL, Gran via s/n, L'Hospitalet de Llobregat 08907, Spain. ³Department of Neurology, Joan XXIII University Hospital, Universitat Rovira i Virgili, Dr. Mallafrè Guasch, 4, Tarragona 43005, Spain. ⁴Department of Neurology, Hospital del Mar Medical Research Institute, Dr. Aiguader, 88, Barcelona 08003, Spain

Journal of Neuroimmunology 2016; 291: 73–77 (IF 2015: 2.536)



Short Communication

MxA mRNA expression as a biomarker of interferon beta response in multiple sclerosis patients



Elisabet Matas^{a,*}, Laura Bau^a, María Martínez-Iniesta^b, Lucía Romero-Pinel^a, M. Alba Mañé-Martínez^{a,c}, Álvaro Cobo-Calvo^d, Sergio Martínez-Yélamos^a

^a Multiple Sclerosis Unit, Department of Neurology, Hospital Universitari de Bellvitge-IDIBELL, Edifici Tècnic-Quirúrgic, Planta 1, mòdul E, Feixa Llarga s/n, L'Hospitalet de Llobregat 08907, Spain

^b Translational Research Laboratory, Institut Català d'Oncologia-IDIBELL, Gran via s/n, L'Hospitalet de Llobregat 08907, Spain

^c Department of Neurology, Joan XXIII University Hospital, Universitat Rovira i Virgili, Dr. Mallafre Guasch, 4, Tarragona 43005, Spain

^d Department of Neurology, Hospital del Mar Medical Research Institute, Dr. Aiguader, 88, Barcelona 08003, Spain

ARTICLE INFO

Article history:

Received 27 October 2015

Received in revised form 22 December 2015

Accepted 28 December 2015

Available online xxxx

Keywords:

Multiple sclerosis

MxA

Interferon-beta

Biomarker

Treatment response

ABSTRACT

Myxovirus resistance protein A (MxA) is a molecule induced after interferon- β injection. The aim of this study was to investigate whether MxA determination one year after starting interferon- β can predict treatment response in multiple sclerosis patients. MxA mRNA expression was evaluated in blood samples obtained at baseline and at month 12. Clinical variables were prospectively recorded. A threshold of 5 was defined to establish MxA induction. On survival analysis, time to the next relapse and to EDSS progression were significantly longer in patients showing MxA induction, suggesting that MxA induction after one year may be useful to identify interferon- β responders.

© 2015 Published by Elsevier B.V.

1. Introduction

Interferon beta (IFN- β) is one of the most commonly used therapies for multiple sclerosis (MS) (The IFNB Multiple Sclerosis Study Group, 1993; Jacobs et al., 1996; PRIMS study group, 1998), but unfortunately, a percentage of patients do not respond adequately to the treatment (Rio et al., 2002; Rudick et al., 2004). Its mechanism of action depends on interferon binding to a specific receptor, leading to different reactions that result in the expression of certain genes. The myxovirus resistance protein A (MxA) is one of these interferon-stimulated genes (Sottini et al., 2009). Various methods have been described to study the biological activity of IFN- β , such as detection of neutralizing antibodies (NABs) in serum and quantification of MxA (Bertolotto et al., 2003). MxA induction can be measured by protein (Valittu et al., 2008) or mRNA

determination, and its quantification is considered a biomarker of IFN- β bioactivity (Malucchi et al., 2008). MxA mRNA measurement by real-time polymerase chain reaction (PCR) seems to be the more sensitive option and additionally shows high specificity (McKay et al., 2006; Capra et al., 2007). In addition, it seems that a single MxA mRNA measurement has predictive value for clinical responsiveness to IFN- β therapy in terms of the risk of new relapses (Malucchi et al., 2008).

The aim of this study is to evaluate MxA mRNA status 1 year after the start of IFN- β treatment and to determine if this single determination can predict clinical treatment response in MS patients, defined as relapses and disease progression.

2. Methods

2.1. Study design

A prospective, observational, open-label, non-randomized study was performed in the Multiple Sclerosis Unit of Hospital Universitari de Bellvitge. Our MS clinic is the reference center for demyelinating diseases in the health district of *Gerència Territorial Barcelona Metropolitana Sud* in Catalonia, a region in the northeast of Spain.

The study was approved by the Ethics Committee of Hospital Universitari de Bellvitge, and written informed consent to participate was obtained from each patient and control.

Abbreviations: MS, multiple sclerosis; IFN- β , interferon beta; NABs, neutralizing antibodies; MxA, myxovirus resistance A; PCR, polymerase chain reaction; GAPDH, glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase; EDSS, Expanded Disability Status Scale; EDMUS, European Database for Multiple Sclerosis; IQR, interquartile range; SD, standard deviation.

* Corresponding author at: Multiple Sclerosis Unit, Neurology Department, Hospital Universitari de Bellvitge, Edifici Tècnic-Quirúrgic, Planta 1, mòdul E, Feixa Llarga s/n, L'Hospitalet de Llobregat, 08907, Barcelona, Spain.

E-mail addresses: ematas@bellvitgehospital.cat (E. Matas), lbau@bellvitgehospital.cat (L. Bau), mmi@iconcologia.net (M. Martínez-Iniesta), luciaromero@bellvitgehospital.cat (L. Romero-Pinel), amane.hj23.ics@gen.cat (M.A. Mañé-Martínez), acobo@imim.es (Á. Cobo-Calvo), smartinez@bellvitgehospital.cat (S. Martínez-Yélamos).

2.2. Patients

Patients from a previously described prospective cohort (Matas et al., 2014) were eligible for the current study. Briefly, treatment-naïve relapsing–remitting MS patients were enrolled before starting treatment with IFN-β and a blood sample was obtained after 12 months of treatment. Patients that had completed a 6 month period of IFN-β after the month 12 sample was obtained were included in the present study. Prospective follow-up was completed in December 2012. Clinical, radiological and demographic data including the Expanded Disability Status Scale (EDSS) (Kurtzke, 1983) was recorded prospectively using the European Database for Multiple Sclerosis (EDMUS) (Confavreux et al., 1992). Responders were defined as patients presenting no relapses or EDSS progression during follow-up and non-responders were those presenting relapses and/or EDSS progression. Disability progression was evaluated considering two milestones: the time to increase 1 point and the time to increase 0.5 point on the EDSS scale. In both cases, the EDSS score had to be confirmed at least 6 months later to be considered irreversible (Río et al., 2002). Patients with disability progression at the end of the study were followed up for an extra 6 month period to confirm EDSS increase.

2.3. Samples

Blood samples were obtained at baseline and at completion of 12 months of IFN-β treatment, in the absence of signs of infection or corticosteroid treatment for relapse (Antonelli et al., 1998; Bertolotto et al., 2002). Patients were instructed to visit our center 12 h after the last IFN-β dose had been administered for blood sample collection (Pachner et al., 2003; Gilli et al., 2005; Hoffmann et al., 2007). Laboratory work to evaluate MxA expression was performed as previously described (Matas et al., 2014). The optimal cut-off to establish MxA mRNA induction at month 12 was calculated as the mean plus 3 SD of the values obtained in MS patients at baseline (Sominada et al., 2008; Hesse et al., 2009; Malucchi et al., 2011).

2.4. Statistical analysis

Differences in clinical characteristics were analyzed using the Student *t* test, chi-square test, or Mann–Whitney *U* test, as appropriate.

Kaplan Meier survival curves were carried out to study the time to the next relapse and to progression of disability.

All statistical analyses were performed with the Statistical Package for the Social Sciences, 20.0 (SPSS Inc., Chicago, USA). A *p* value of <0.05 was considered statistically significant for the comparisons.

3. Results

3.1. Patients

Ninety-seven patients from a cohort of 104 completed 12 months of IFN-β treatment, and a blood sample was drawn at that time. Eighty-three of them were ultimately included in the study population (Fig. 1).

At the end of follow-up, 51 (61.4%) patients met the definition of responders and 32 (38.6%) were classified as non-responders. All 32 patients in the non-responder group presented a relapse and 14 of them also an increase in the EDSS scale (5 patients presented 1-point EDSS increase). None of the patients developed secondary progressive MS during the study.

3.2. MxA expression

Blood samples from the 83 patients were taken at a median of 12.0 months (IQR 11.5–12.4) after starting treatment and 11.2 h (IQR 10.5–12.5) after the last interferon injection.

The threshold defining increased MxA gene expression was calculated as the mean plus 3 SD of the baseline MxA mRNA expression value in the 104 treatment-naïve patients (mean 1.46, SD 1.17) (Matas et al., 2014). Hence, a MxA mRNA level over 5 (mean + 3 SD = 4.97) was considered to establish increased MxA expression, hereafter referred as MxA-positive.

Sixty-eight (82%) patients were classified as MxA-positive (MxA > 5) and the remaining 15 (18%) as MxA-negative (MxA ≤ 5). The clinical and demographic characteristics of the two groups were analyzed, and no statistical differences were found (Table 1).

Ten of the 38 (26.3%) patients treated with IFN-β-1b and 5 (5 subcutaneous and 0 intramuscular) of the 45 (11.1%) treated with IFN-β-1a were MxA-negative (chi-square, *p* = 0.07).

Patients excluded from the study because of less than 6 months of treatment after month 12 sampling were evaluated. No differences

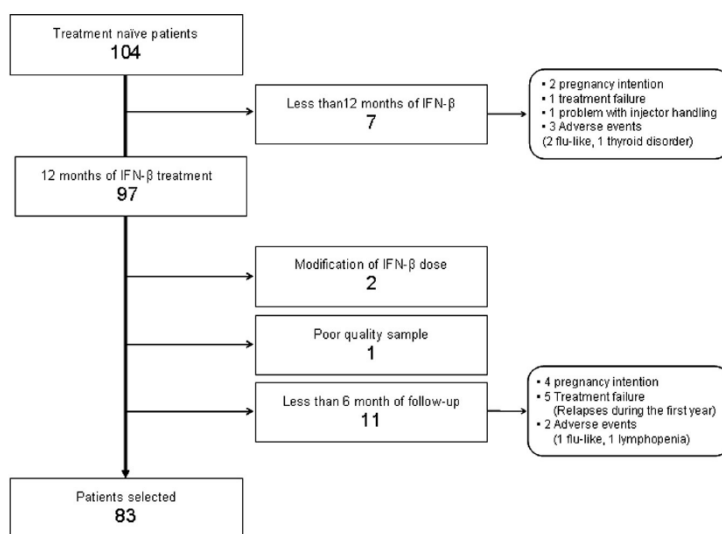


Fig. 1. Flow chart of patients included in the study.

Table 1
Clinical and demographic baseline characteristics.

	MxA-positive (MxA > 5)	MxA-negative (MxA ≤ 5)	p	Total
Patients	68	15	–	83
Sex, n(%) female ¹	49 (72.0%)	9 (60.0%)	0.35	58 (69.9%)
Age at onset, mean (SD), ² years	32.85 (8.59)	34.73 (5.65)	0.43	33.19 (8.26)
Pretreatment relapses, median (IQR), ³	2.0 (1.0–3.0)	2.0 (1.0–3.0)	0.76	2.0 (1.0–3.0)
Duration MS pretreatment, median (IQR), ³ years	1.54 (0.78–3.04)	1.23 (0.63–3.71)	0.84	1.42 (0.78–3.08)
Initial EDSS, median (IQR), ³	1.5 (1.0–2.0)	1.5 (0.0–1.5)	0.33	1.5 (1.0–2.0)
Duration of follow-up, median (IQR), ³ years	1.51 (0.89–2.58)	1.70 (1.04–3.46)	0.28	1.62 (0.92–2.63)
Baseline MRI, n(%) ¹				
Gadolinium enhancement	24/56 (42.9%)	2/13 (38.5%)	0.77	29/69 (42%)
Infratentorial lesions	47/64 (73.4%)	11/13 (84.6%)	0.39	58/77 (75.3%)
Interferon, n (%) ¹				
Rebif44	34 (50.0%)	5 (33.3%)		39 (47.0%)
Betaferon/Extavia	28 (41.2%)	10 (66.7%)	0.15	38 (45.8%)
Avonex	6 (8.8%)	0 (0%)		6 (7.2%)

¹ Chi-square test.
² Student t test.
³ Mann–Whitney U test.

were found in the percentages of MxA-positive and MxA-negative cases when compared with the patients included in the study (18.2% of MxA-negative in patients with less than 6 months of follow-up vs. 18% in study patients; chi-square, $p = 0.99$).

3.3. Survival analysis

Survival analysis was performed for relapses and EDSS progression, considering the month 12 sampling as the beginning of the follow-up. The median time to the next relapse after month 12 sampling was significantly longer in the MxA-positive group, than in MxA-negative patients (MxA-positive 2.8 years vs. MxA-negative 1.3 years; log-rank, $p = 0.02$) (Fig. 2a). Survival analysis for EDSS progression showed that the median time to increase one point was *undefined* in both groups, although there was a non-significant trend to a lengthier time in MxA-positive patients (log-rank $p = 0.22$). On analysis of the median time to increase 0.5 point on the EDSS scale, the time was *undefined* in the MxA-positive group versus 2.1 years in MxA-negative patients (log-rank $p = 0.001$) (Fig. 2b).

4. Discussion

Development of biomarkers to predict treatment response has become one of the main objectives over the last years, in order to decide the most appropriate treatment for each individual patient.

Focusing on IFN-β treatment, different factors could influence the response, as the production of NABs against IFN-β, or the development of IFN receptor isoforms (Sottini et al., 2009) that could lead to a decrease in IFN-β bioavailability and, therefore, in the interferon responsive gene expression. In the present research, MxA mRNA determination was selected because of the simplicity of the assay and the somewhat stronger sensitivity for predicting relapses than NABs determination. Nevertheless, it would have been useful having NABs data to enhance the conclusions obtained in the study.

In the present research, 18% of the patients showed no increase in MxA expression, a proportion consistent with the 11% to 27% obtained in other studies (Zanotti et al., 2010). None of the baseline clinical characteristics were able to predict which patients would be MxA-positive or -negative.

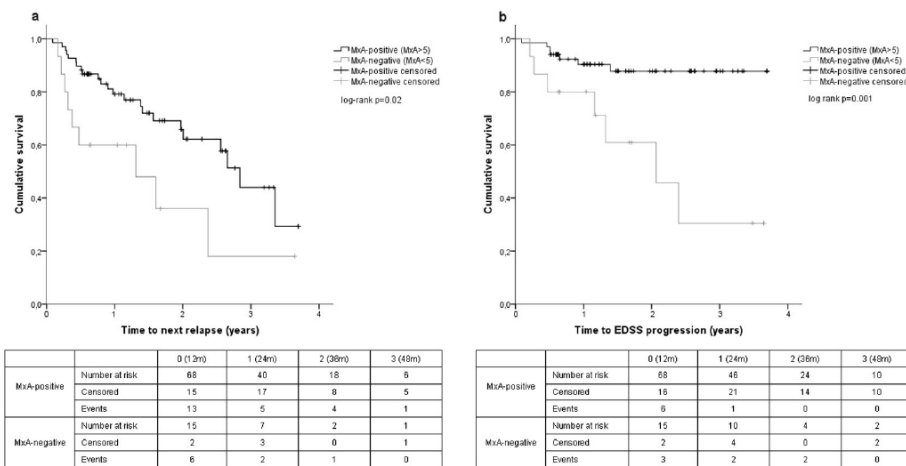


Fig. 2. Survival curves for time to the next relapse and to increase 0.5 point on the EDSS scale since month 12 sample was obtained in MxA-positive and -negative patients: Solid black lines represent MxA-positive patients while gray lines represent MxA-negative patients. The table below the graph shows the number of events, censored observations and patients still at risk of the event during the year indicated. a: Survival curve for time to the next relapse: MxA-positive patients (MxA > 5) showed a significantly longer time to the next relapse (median 2.8 vs. 1.3 years) (log-rank $p = 0.02$). b: Survival curve for time to increase 0.5 point on the EDSS scale: MxA-positive patients (MxA > 5) showed a significantly longer time to increase by 0.5 point on the EDSS scale (median *undefined* vs. 2.1 years) (log-rank $p = 0.001$).

A larger number of patients treated with IFN- β -1b were MxA-negative than those receiving IFN- β -1a but the difference did not reach statistical significance (chi square, $p = 0.07$). These findings concur with those of previous studies, in which IFN- β -1a seemed to be less immunogenic than IFN- β -1b, particularly when administered by intramuscular injection (Bertolotto et al., 2002; Gneiss et al., 2006). Nevertheless, MxA was induced to a similar extent by all IFN- β preparations and the predictive capacity of MxA values in EDSS progression was independent of the type of IFN used (Serana et al., 2014).

Relapse occurred after a lengthier time interval in MxA-positive patients than in MxA-negative ones. Survival curves for an EDSS increase of 1 point showed only a non-significant trend to a longer time in the MxA-positive group (log rank $p = 0.22$), likely because of the small number of patients that progressed 1 point. However, on survival analysis for an increase of 0.5 point, the EDSS increase occurred after a lengthier time in MxA-positive patients than in MxA-negative ones (log-rank $p = 0.001$). These results are in line with those reported in some studies evaluating clinical endpoints related to presence of NAb or absence of MxA expression (Sorensen et al., 2003; Malucchi et al., 2004, 2008).

This study is based on clinical practice. Follow-up MRI scans were performed according to clinical requirements and therefore in different scheduled time points.

Our population only included treatment-naïve relapsing–remitting MS cases; thus, the findings obtained in our study should be validated in other MS cohorts, as well as for each IFN preparation in an independent manner.

In conclusion, detection of MxA induction at 1 year could be a useful parameter to identify patients who will respond to IFN- β treatment.

Conflict of interest statement

I have read the journal's policy and the authors of this manuscript have the following competing interests:

E. Matas received honoraria from speaking engagements from Biogen, Teva and Merck Serono, research support, funding for travel and congress expenses from Biogen Idec, Teva Pharmaceutical Industries LTD, Sanofi-Aventis, Novartis, Bayer Schering Pharma and Merck Serono.

L. Bau received research support, funding for travel and congress expenses from Biogen Idec, Teva Pharmaceutical Industries LTD, Sanofi-Aventis, Novartis, Bayer Schering Pharma and Merck Serono.

M. Martínez-Iniesta reports no disclosures.

L. Romero-Pinel received honoraria from speaking engagements from Biogen, Teva and Merck Serono, research support, funding for travel and congress expenses from Biogen Idec, Teva Pharmaceutical Industries LTD, Sanofi-Aventis, Novartis, Bayer Schering Pharma and Merck Serono.

MA. Mañé-Martínez received research support, funding for travel and congress expenses from Biogen Idec, Teva Pharmaceutical Industries LTD, Sanofi-Aventis, Novartis, Bayer Schering Pharma and Merck Serono.

A. Cobo-Calvo, received research support, funding for travel and congress expenses from Biogen Idec, Teva Pharmaceutical Industries LTD, Sanofi-Aventis, Novartis, Bayer Schering Pharma and Merck Serono.

S. Martínez-Yélamos received honoraria from speaking engagements, served on a scientific advisory board, collaborates as a consultant and scientific communications and received funding for travel and congress expenses from Biogen Idec, Teva Pharmaceutical Industries LTD, Sanofi-Aventis, Merck Serono, Novartis and Bayer Schering Pharma.

Acknowledgment

The authors thank Dr. Txomin Arbizu for his support in the development of the study, Ana M. González, Nuria Iranzo, Isabel León, M. Teresa Anguix, Silvia Macho and Mireya Bures for their nursing assistance,

Gemma Aiza and Nadia García for their laboratory support, Susana Pobra for her administrative support and all patients for their invaluable participation.

This work was partially supported by the Convenio de Investigación. Dep. de Salut. Generalitat de Catalunya (352/05).

References

- Antonelli, G., Bagnato, F., Pozzilli, C., Simeoni, E., Bastianelli, S., Currenti, M., De Pisa, F., Fieschi, C., Gasperini, C., Salvetti, M., Dianzani, F., 1998. Development of neutralizing antibodies in patients with relapsing–remitting multiple sclerosis treated with IFN- β 1a. *J. Interf. Cytokine Res.* 18, 345–350.
- Bertolotto, A., Malucchi, S., Sala, A., Orefice, G., Carriero, P.B., Capobianco, M., Milano, E., Melis, F., Giordana, M.T., 2002. Differential effects of three interferon betas on neutralizing antibodies in patients with multiple sclerosis: a follow up study in an independent laboratory. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry* 73, 148–153.
- Bertolotto, A., Gilli, F., Sala, A., Capobianco, M., Malucchi, S., Milano, E., Melis, F., Marnetto, F., Lindberg, R.L., Bottero, R., Di Sapio, A., Giordana, M.T., 2003. Persistent neutralizing antibodies abolish the interferon β bioavailability in MS patients. *Neurology* 60, 634–639.
- Capra, R., Sottini, A., Cordioli, C., Serana, F., Chiarini, M., Caimi, L., Padovani, A., Bergamaschi, R., Imberti, L., 2007. IFN β bioavailability in multiple sclerosis patients: MxA versus antibody-detecting assays. *J. Neuroimmunol.* 189, 102–110.
- Confavreux, C., Compston, D.A., Hommes, O.R., McDonald, W.I., Thompson, A.J., 1992. EDMUS, a European database for multiple sclerosis. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry* 55, 671–676.
- Gilli, F., Marnetto, F., Caldano, M., Sala, A., Malucchi, S., Di Sapio, A., Capobianco, M., Bertolotto, A., 2005. Biological responsiveness to first injections of interferon-beta in patients with multiple sclerosis. *J. Neuroimmunol.* 158, 195–203.
- Gneiss, C., Tripp, P., Reichartseider, F., Egg, R., Ehling, R., Lutterotti, A., Khalil, M., Kuenz, B., Mayringer, I., Reindl, M., Berger, T., Deisenhammer, F., 2006. Differing immunogenic potentials of interferon beta preparations in multiple sclerosis patients. *Mult. Scler.* 12, 731–737.
- Hesse, S., Sellebjerg, F., Sorensen, P.S., 2009. Absence of MxA induction by interferon β in patients with MS reflects complete loss of bioactivity. *Neurology* 73, 372–377.
- Hoffmann, L.A., Krumbholz, M., Faber, H., Kuempfel, T., Starck, M., Pöhlmann, W., Meinl, E., Hohlfeld, R., 2007. Multiple sclerosis: relating MxA transcription to anti-interferon-beta-neutralizing antibodies. *Neurology* 68, 958–959.
- Jacobs, L.D., Cookfair, D.L., Rudick, R.A., Herndon, R.M., Richert, J.R., Salazar, A.M., Fischer, J.S., Goodkin, D.E., Granger, C.V., Simon, J.H., Alam, J.J., Bartoszak, D.M., Bourdette, D.N., Braiman, J., Brownscheidle, C.M., Coats, M.E., Cohan, S.L., Dougherty, D.S., Kinkel, R.P., Mass, M.K., Munschauer 3rd, F.E., Priore, R.L., Pullicino, P.M., Scherokman, B.J., Whitham, R.H., 1996. Intramuscular interferon beta-1a for disease progression in relapsing multiple sclerosis. *Ann. Neurol.* 39, 285–294.
- Kurtzke, J.F., 1983. Rating neurological impairment in multiple sclerosis: an expanded disability status scale (EDSS). *Neurology* 33, 1444–1452.
- Malucchi, S., Sala, A., Gilli, F., Bottero, R., Di Sapio, A., Capobianco, M., Bertolotto, A., 2004. Neutralizing antibodies reduce the efficacy of beta-IFN during treatment of multiple sclerosis. *Neurology* 62, 2031–2037.
- Malucchi, S., Gilli, F., Caldano, M., Marnetto, F., Valentino, P., Granieri, L., Sala, A., Capobianco, M., Bertolotto, A., 2008. Predictive markers for response to interferon therapy in patients with multiple sclerosis. *Neurology* 70, 1119–1127.
- Malucchi, S., Gilli, F., Caldano, M., Sala, A., Capobianco, M., di Sapio, A., Granieri, L., Bertolotto, A., 2011. One-year evaluation of factors affecting the biological activity of interferon beta in multiple sclerosis patients. *J. Neurol.* 258, 895–903.
- Matas, E., Bau, L., Martínez-Iniesta, M., Romero-Pinel, L., Mañé, M.A., Cobo-Calvo, Á., Martínez-Yélamos, S., 2014. Baseline MxA mRNA expression predicts interferon beta response in multiple sclerosis patients. *PLoS One* 9 (11), e112758. <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0112758>.
- McKay, F.J., Schibeci, S., Heard, R., Stewart, G., Booth, D., 2006. Analysis of neutralizing antibodies to therapeutic interferon-beta in multiple sclerosis patients: a comparison of three methods in a large Australasian cohort. *J. Neuroimmunol. Methods* 310, 20–29.
- Pachner, A., Narayan, K., Price, N., Hurd, M., Dail, D., 2003. MxA gene expression analysis as an interferon-beta bioactivity measurement in patients with multiple sclerosis and the identification of antibody-mediated decreased bioactivity. *Mol. Diagn.* 7, 17–25.
- PRIMS (Prevention of Relapses and Disability by Interferon beta-1a Subcutaneously in Multiple Sclerosis) Study Group, 1998n. Randomised double-blind placebo-controlled study of interferon beta-1a in relapsing/remitting multiple sclerosis. *Lancet* 352, 1498–1504.
- Río, J., Nos, C., Tintoré, M., Borrás, C., Galán, I., Comabella, M., Montalban, X., 2002. Assessment of different treatment failure criteria in a cohort of relapsing–remitting multiple sclerosis patients treated with interferon beta: implications for clinical trials. *Ann. Neurol.* 52, 400–406.
- Rudick, R.A., Lee, J.C., Simon, J., Ransohoff, R.M., Fisher, E., 2004. Defining interferon beta response status in multiple sclerosis patients. *Ann. Neurol.* 56, 548–555.
- Serana, F., Imberti, L., Amato, M.P., Comi, G., Gasperini, C., Ghezzi, A., Martinelli, V., Provinciali, L., Rottoli, M.R., Sotgiu, S., Stecchi, S., Vecchio, M., Zaffaroni, M., Cordioli, C., Capra, R., 2014. MxA mRNA quantification and disability progression in interferon beta-treated multiple sclerosis patients. *PLoS One* 9 (4), e94794. <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0094794>.
- Sominada, A., Hillert, J., Fogdell-Hahn, A., 2008. In vivo bioactivity of interferon-beta in multiple sclerosis patients with neutralizing antibodies is titre-dependent. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry* 79, 57–62.

- Sorensen, P.S., Ross, C., Klemmesen, K.M., Bendtzen, K., Frederiksen, J.L., Jensen, K., Kristensen, O., Petersen, T., Rasmussen, S., Ravnborg, M., Stenager, E., Koch-Henriksen, N., Danish Multiple Sclerosis Study Group, 2003. Clinical importance of neutralizing antibodies against interferon beta with relapsing–remitting multiple sclerosis. *Lancet* 362, 1184–1191.
- Sottini, A., Capra, R., Serana, F., Chiarini, M., Caimi, L., Imberti, L., 2009. Interferon-beta therapy monitoring in multiple sclerosis patients. *Endocr. Metab. Immune Disord. Drug Targets* 9, 14–28.
- The IFNB Multiple Sclerosis Study Group, 1993. Interferon beta-1b is effective in relapsing–remitting multiple sclerosis. I. Clinical results of a multicenter, randomized, double-blind, placebo controlled trial. *Neurology* 43, 655–661.
- Valittu, A.M., Erälä, J.P., Ilonen, J., Salmi, A.A., Waris, M., 2008. MxA protein assay for optimal monitoring of IFN- β bioactivity in the treatment of MS patients. *Acta Neurol. Scand.* 118, 12–17.
- Zanotti, C., Ghidini, C., Lamorgese, C., Caimi, L., Capra, R., Imberti, L., 2010. Transfer of myxovirus-protein-A mRNA assay for interferon- β bioactivity measurement in multiple sclerosis patients to routine laboratory practice. A 4-year experience. *Clin. Chem. Lab. Med.* 48, 1235–1238.

VII. DISCUSIÓN

1. Resumen de los resultados y discusión conjunta

La EM es una enfermedad desmielinizante del sistema nervioso central, con un comportamiento heterogéneo que oscila entre formas benignas y formas altamente agresivas. En los últimos años, la aparición de nuevos tratamientos ha permitido la ampliación del arsenal terapéutico, aunque desafortunadamente no todos los pacientes responden de forma adecuada a los diferentes fármacos. Disponer de biomarcadores de respuesta al tratamiento que faciliten la selección del más óptimo para cada paciente se ha convertido en uno de los objetivos principales de las investigaciones actuales. Con este fin se han planteado los diferentes estudios que constituyen este trabajo, centrándose en el tratamiento con IFN- β .

Se describen dos mecanismos principales en el fracaso de respuesta al IFN- β , uno relacionado con las características intrínsecas de cada paciente y otro derivado de la inmunogenicidad de la preparación. El primero de ellos depende de particularidades que darían lugar a diferencias interindividuales en la respuesta al tratamiento. Estas diferencias radican principalmente en la vía de respuesta del interferón tipo I, conocida también como *IFN signature*. En pacientes con EM, se observa un defecto en esta vía de señalización. Encontramos una expresión reducida de dichos genes comparada con la de población general (63,66), siendo incluso inferior en periodos de exacerbación. Sin embargo, en un porcentaje de pacientes esta vía se encuentra sobreexpresada, aunque sin llegar a alcanzar los valores de los controles sanos (112,113). Esta vía de respuesta al interferón se evalúa en los dos primeros trabajos a través de la expresión de MxA.

Para evaluar *MXA* se ha seleccionado como metodología la realización de una PCR a tiempo real que permite cuantificar la expresión del mRNA MxA. Esta técnica ofrece como ventajas que es más rápida y menos susceptible a problemas de variabilidad comparada con la evaluación de la proteína aunque supone un mayor coste (130). La vida media del mRNA es más corta que la de la proteína por lo que con su determinación se refleja de forma más precisa la interacción del IFN- β con su receptor, evitando posibles factores de confusión (105,110) pero obligando a obtener la muestra a las 12 horas de la administración del IFN- β , puesto que a partir de ese momento se produce un descenso rápido del mRNA (99,104). Además, es más sensible que la determinación de los NAb a través del efecto citopático, con una mayor capacidad predictiva de la respuesta al tratamiento y no se precisa de la utilización de virus en su metodología, siendo su expresión muy específica de los interferones del tipo I (92,109,125).

En el primer trabajo, encontramos que el tiempo hasta el siguiente brote y hasta la progresión de la discapacidad es mayor en pacientes con expresión basal reducida de mRNA MxA, teniendo además la expresión basal de mRNA MxA, capacidad para predecir una buena respuesta al tratamiento (valor predictivo positivo del 76.9%).

En el segundo trabajo, se realiza un análisis de variables clínicas, radiológicas y de laboratorio y se concluye que, aquellos pacientes que, además de presentar una expresión basal incrementada de mRNA MxA, también presentan una mayor discapacidad basal y una menor inducción de MxA a los tres meses de iniciar el tratamiento, tienen mayor probabilidad de no responder adecuadamente al IFN- β evaluado como el tiempo hasta el siguiente brote.

Son pocos los trabajos que han evaluado de forma explícita la expresión de *MXA* basal y su utilidad pronóstica, habiéndose centrado la mayoría de ellos en estudiar en su conjunto diversos genes de la vía de inducción del interferón, generalmente a través de *microarrays* (74,123,138,139). En dos estudios centrados en la expresión de mRNA MxA en pacientes no tratados, encuentran que ésta es útil para identificar formas de EM más activas y para predecir brotes, concluyendo que los pacientes con una expresión basal incrementada de mRNA MxA tardarían más tiempo hasta el siguiente brote (111,116). En el subgrupo de pacientes que posteriormente inician tratamiento con IFN- β (40 pacientes), no encuentra relación entre la expresión basal de MxA y la respuesta al tratamiento, probablemente debido al tamaño reducido de la muestra (111). Sin embargo, otros estudios sugieren que el subgrupo de pacientes con una sobreexpresión basal de la vía de respuesta del interferón tipo I tendrían además de una mayor actividad basal de la enfermedad, una menor capacidad de inducción al iniciar el tratamiento con IFN- β y por tanto responderían peor al tratamiento, lo que vendría a ser un tipo de resistencia al interferón (73,74,114).

Nuestros hallazgos se encuentran en línea con los resultados de estos últimos estudios: en el primer trabajo, encontramos que los pacientes con una expresión basal de mRNA MxA por encima del punto de corte tienen mayor probabilidad de ser no respondedores, presentando un menor tiempo hasta el siguiente brote y hasta la progresión de la discapacidad. Tras iniciar el tratamiento con IFN- β , se produce una inducción en la vía del interferón tipo I que sería potencialmente mayor en aquellos casos en los que basalmente se encuentra reducida y, por el contrario, menor cuando ésta se encuentra sobreexpresada. Los pacientes con menor capacidad de inducción serían los que responderían peor al tratamiento. En consonancia con esto, en el segundo trabajo encontramos que a los tres meses de tratamiento, los pacientes con menor inducción del mRNA MxA tendrían

mayor probabilidad de ser no respondedores al tratamiento. En otros estudios se han observado resultados en la misma línea que sugieren que una mayor inducción de MxA tras iniciar tratamiento con IFN- β se relaciona con un menor riesgo de progresión de la discapacidad y una mayor probabilidad de respuesta al tratamiento y, por el contrario, aquellos con una menor inducción de los genes de la *IFN signature* tienen mayor riesgo de presentar un brote (74,140,141).

En cuanto a las características basales de los pacientes, aquellos pacientes con mayor discapacidad basal tienen mayor probabilidad de ser no respondedores. No se han detectado otras características que puedan ayudar a predecir qué pacientes van a responder mejor al IFN- β . Otros estudios han sugerido que la discapacidad basal se correlaciona con la respuesta al tratamiento (142-144) aunque también barajan otras características como mayor edad al inicio de la enfermedad y mayor duración de la EM que en nuestro estudio no se han demostrado significativas. En cualquier caso, las características tanto clínicas como radiológicas basales, no parecen ser suficientes para predecir que pacientes van a responder de forma más adecuada al tratamiento.

El segundo mecanismo implicado en el fracaso al tratamiento con IFN- β , se relaciona con mecanismos inmunogénicos que darían lugar a una disminución de la biodisponibilidad del IFN- β . Hablamos principalmente de la aparición de NAbs que bloquearían la unión del IFN- β a su receptor (54). En cualquier caso, el resultado sería un fracaso en la unión del IFN- β con su receptor específico y por tanto una disminución en la expresión de los genes derivados de esta interacción, entre ellos el de la *MXA*. Para estudiar este segundo mecanismo y determinar su influencia en la respuesta al tratamiento se llevó a cabo el tercer trabajo. En éste, se determina la expresión de mRNA MxA al año de iniciar tratamiento, momento en el que los factores inmunogénicos adquieren mayor trascendencia, y se evalúa la evolución clínica posterior. Los pacientes con expresión más elevada de mRNA MxA tardan más tiempo hasta el siguiente brote y hasta la progresión de la discapacidad. Por el contrario, aquellos con una expresión reducida presentaban antes tanto brotes como progresión de la discapacidad.

El desarrollo de anticuerpos en pacientes tratados con IFN- β se ha considerado una de las principales causas conocidas de pérdida de eficacia al tratamiento. Actúan uniéndose al IFN- β en diversas regiones y siendo conocidos como NAbs aquellos que impiden la unión del fármaco a su receptor específico. Entre un 2 y un 42% de pacientes tratados con IFN- β desarrollan NAbs a lo largo del seguimiento, pudiendo estos desaparecer o ser persistentes a lo largo del tiempo (54,79). Los resultados iniciales de los estudios pivote de los tres tipos de interferón no mostraron relación

entre el desarrollo de NAbS y la eficacia del fármaco (22-24). Sin embargo, en análisis posteriores que incrementaban el seguimiento de los pacientes se demostró que la presencia de NAbS se correlacionaba con una disminución de la eficacia terapéutica tanto desde el punto de vista clínico como radiológico (67,70,75,89). Diversos estudios han demostrado posteriormente que la presencia de NAbS se relaciona con una reducción de la efectividad del IFN- β presentando dichos pacientes menor tiempo hasta el siguiente brote y un mayor número de brotes (76,90,91). La mayoría de estos estudios no pudieron demostrar el efecto de los NAbS sobre la progresión de la discapacidad, ya sea porque el seguimiento no fue lo suficientemente largo, porque la intensidad del efecto buscada era excesivamente grande (incremento mayor o igual a un punto en la escala EDSS) o porque el fracaso del tratamiento desde el punto de vista radiológico o de los brotes propició un cambio de tratamiento antes de que este incremento ocurriera. De la misma forma se ha estudiado la expresión de MxA en sus diferentes formas (tanto como proteína como mRNA) para evaluar si una disminución de su expresión se correlaciona con la respuesta al tratamiento. Encontramos una ausencia de inducción de la expresión de mRNA MxA en alrededor de un 11 a un 27% de los pacientes en función del estudio (128). Varios son los estudios que han evaluado de forma conjunta la presencia de NAbS y la expresión de MxA concluyendo que el mRNA de MxA resulta más sensible y con mayor capacidad predictiva que los propios NAbS (92,110). No es de extrañar que esto sea así dado que la evaluación de MxA identificaría no solo a los pacientes con NAbS sino también a aquellos con otras causas de pérdida de eficacia como el desarrollo de receptores de baja afinidad o una mala adherencia al tratamiento. Nuestros resultados se encuentran alineados con los obtenidos en estos estudios donde los pacientes con ausencia de inducción de mRNA MxA presentan un menor tiempo hasta el siguiente brote y por tanto una peor respuesta al tratamiento. Por otra parte, la mayoría de estudios no han sido capaces de demostrar su efecto en la progresión de la discapacidad, posiblemente debido a seguimientos demasiado cortos u otras causas similares a las comentadas en el caso de los NAbS. En nuestro estudio, hemos podido observar un menor tiempo hasta incrementar la discapacidad en los pacientes con ausencia de inducción del mRNA MxA, aunque este efecto es pequeño puesto que se ha evaluado el incremento de 0.5 puntos en la escala EDSS. Un mayor seguimiento hubiera permitido quizás obtener resultados similares para un efecto mayor (incremento de un punto del EDSS). En la actualidad se acepta la repercusión moderadamente negativa del desarrollo de NAbS en la respuesta al tratamiento con IFN- β , aunque han sido necesarios muchos años y los resultados de múltiples estudios para llegar a esta conclusión.

2. Relevancia

Los hallazgos de nuestro estudio se engloban en lo que se ha venido a llamar la medicina personalizada, es decir, seleccionar el tratamiento más indicado para cada paciente de cara a conseguir una respuesta terapéutica óptima evitando los efectos adversos derivados del uso de fármacos que no sean idóneos para cada uno de ellos. Así se plantea la búsqueda de biomarcadores de respuesta al tratamiento, como podría ser la expresión basal de MxA y la presencia de inducción a los 3 meses de tratamiento, que serían útiles de cara a decidir si un paciente va a ser respondedor a IFN- β . En caso contrario, existen en el momento actual otras opciones terapéuticas de las que el paciente se podría beneficiar en lugar de estar sometido a un tratamiento con el que podría presentar brotes y progresión de la discapacidad. Por el contrario, en caso de que los biomarcadores muestren que será un buen respondedor, el uso del IFN- β sería una buena opción terapéutica dada la amplia experiencia de la que se dispone en el momento actual.

3. Limitaciones

Estos estudios tienen una serie de limitaciones basadas principalmente en la población seleccionada para el estudio y en las variables utilizadas para el análisis.

En primer lugar, estos estudios se han realizado en pacientes con diagnóstico de EMRR según McDonald 2005 que no hubieran recibido tratamiento inmunomodulador previo, por tanto, no se pueden extrapolar a otras poblaciones diferentes, como pacientes con CIS o con EMSP, o pacientes que hayan recibido otros tratamientos. Por otra parte, no se trata de un estudio aleatorizado en lo que respecta a la selección del paciente y la elección del tipo de interferón. Nuestro estudio está basado en práctica clínica habitual para interferir lo mínimo en el seguimiento habitual.

No se ha realizado la determinación de NAbS a través del efecto citopático por lo que no ha sido posible correlacionar los resultados de expresión de mRNA de MxA en el mes 12 con los NAbS.

Un mayor seguimiento de los pacientes en el tercer estudio hubiera permitido tener unos resultados más precisos en cuanto a la progresión de la discapacidad, permitiendo ofrecer resultados para el incremento de un punto en la escala EDSS. Estos pacientes continúan

actualmente en seguimiento por lo que es posible que en el futuro podamos disponer de nuevos datos.

Se han utilizado únicamente variables de resultado clínicas. La utilización de variables radiológicas nos hubiera permitido disponer de más información.

Como limitaciones derivadas de la técnica utilizada nos encontramos la necesidad de procesar las muestras inmediatamente tras la extracción para poder conservar el RNA. Esto podría ser corregido en el futuro utilizando tubos específicos (PAXgene tubes) que permiten conservar la muestra hasta tres días, pudiendo realizar la extracción del RNA dentro de este periodo. También la falta de estandarización del trabajo de laboratorio dificulta la comparación de nuestros resultados con los obtenidos en otros centros.

4. Perspectivas de futuro

Tras completar estos estudios, nos planteamos la estrategia a seguir en la búsqueda de biomarcadores de respuesta al tratamiento. En primer lugar, será necesario validar los resultados obtenidos en otra cohorte de pacientes y además, incluir en un segundo término pacientes con características basales diferentes como podría ser una cohorte de CIS o de pacientes diagnosticados de EMSP.

Por otra parte, aumentando la precisión de los resultados y evaluando su uso combinado con otros biomarcadores permitiría incrementar el valor predictivo positivo y negativo, facilitando su posterior aplicación en la práctica clínica diaria.

VIII. CONCLUSIONES

- 1.** La detección de una expresión basal de mRNA MxA baja puede ser un biomarcador útil para identificar pacientes diagnosticados de EMRR con elevada probabilidad de respuesta clínica al tratamiento con IFN- β .
- 2.** La presencia de una mayor inducción del mRNA MxA a los tres meses de haber iniciado el tratamiento se asocia a una mayor probabilidad de responder clínicamente al IFN- β .
- 3.** La detección de una expresión reducida de mRNA MxA al año de iniciar el tratamiento con IFN- β se relaciona con una pérdida de respuesta clínica al tratamiento con IFN- β .

IX. BIBLIOGRAFÍA

1. Compston A, McDonald IR, Noseworthy J, Lassmann H, Miller DH, Smith KJ, Wekerle H, Confavreux C. *McAlpine's Multiple Sclerosis*. 4th ed. Philadelphia: Elsevier Inc; 2006.
2. Kingwell E, Marriott JJ, Jetté N, Pringsheim T, Makhani N, Morrow SA, et al. Incidence and prevalence of multiple sclerosis in Europe: a systematic review. *BMC Neurol*. 2013; 13: 128. doi: 10.1186/1471-2377-13-128. Available: <http://bmcneurol.biomedcentral.com/articles/10.1186/1471-2377-13-128>
3. Bártulos Iglesias M, Marzo Sola ME, Estrella Ruiz LA, Bravo Anguiano Y. Epidemiological study of multiple sclerosis in La Rioja. *Neurologia*. 2015; 30(9): 552-60.
4. 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; 338(5): 278-85.
5. Mahad DH, Trapp BD, Lassman H. Progressive multiple sclerosis 1. Pathological mechanisms in progressive multiple sclerosis. *Lancet Neurol* 2015; 14(2): 183-93.
6. Frohman, EM, Racke MK and Raine CS. Multiple Sclerosis-The Plaque and Its Pathogenesis. *N Engl J Med* 2006; 354: 942-55.
7. Schumacher GA, Beebe G, Kibler RF, Kurtland LT, Kurtzke JF, McDowell F, et al. Problems of experimental trials of therapy in multiple sclerosis: Report by the panel on the evaluation of experimental trials of therapy in multiple sclerosis. *Ann N Y Acad Sci* 1965; 122: 552-58.
8. Lublin FD, Reingold SC. Defining the clinical course of multiple sclerosis: results of an international survey. National Multiple Sclerosis Society (USA) Advisory Committee on Clinical Trials of New Agents in Multiple Sclerosis. *Neurology*. 1996; 46(4): 907-11.
9. Lublin FD, Reingold SC, Cohen JA, Cutter GR, Sørensen PS, Thompson AJ, et al. Defining the clinical course of multiple sclerosis: the 2013 revisions. *Neurology*. 2014; 83(3): 278-86.

10. 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;69(2):292-302.
11. Compston A, Coles A. Multiple sclerosis. *Lancet*. 2008; 372(9648): 1502-17.
12. Patzold U, Pocklington PR. Course of multiple sclerosis. First results of a prospective study carried out of 102 MS patients from 1976-1980. *Acta Neurol Scand*. 1982; 65(4): 248-66.
13. Myhr KM, Riise T, Vedeler C, Nortvedt MW, Grønning R, Midgard R, et al. Disability and prognosis in multiple sclerosis: demographic and clinical variables important for the ability to walk and awarding of disability pension. *Mult Scler*. 2001; 7(1): 59-65.
14. Tremlett H, Zhao Y, Joseph J, Devonshire V; UBCMS Clinic Neurologists. Relapses in multiple sclerosis are age- and time-dependent. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. 2008; 79(12): 1368-74.
15. Inusah S, Sormani MP, Cofield SS, Aban IB, Musani SK, Srinivasasainagendra V, et al. Assessing changes in relapse rates in multiple sclerosis. *Mult Scler*. 2010; 16(12): 1414-21
16. Tremlett H, Zhao Y, Rieckmann P, Hutchinson M. New perspectives in the natural history of multiple sclerosis. *Neurology*. 2010; 74(24): 2004-15.
17. Mowry EM. Natural history of multiple sclerosis: early prognostic factors. *Neurol Clin*. 2011; 29(2): 279-92.
18. Renoux C. Natural history of multiple sclerosis: long-term prognostic factors. *Neurol Clin*. 2011; 29(2): 293-308.
19. 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.
20. Ebers GC. Treatment of multiple sclerosis. *Lancet*. 1994; 343(8892): 275-9

21. Fox EJ. Management of worsening multiple sclerosis with mitoxantrone: a review. *Clin Ther.* 2006; 28(4): 461-74
22. The IFNB Multiple Sclerosis Study Group. Interferon beta-1b is effective in relapsing-remitting multiple sclerosis. I. Clinical results of a multicenter, randomized, double-blind, placebo controlled trial. *Neurology.* 1993; 43: 655-61.
23. Jacobs LD, Cookfair DL, Rudick RA, Herndon RM, Richert JR, Salazar AM, et al. Intramuscular interferon beta-1a for disease progression in relapsing multiple sclerosis. The Multiple Sclerosis Collaborative Research Group (MSCRG). *Ann Neurol.* 1996; 39(3): 285–94.
24. PRISMS (Prevention of Relapses and Disability by Interferon beta-1a Subcutaneously in Multiple Sclerosis) Study Group. Randomised double-blind placebo-controlled study of interferon beta-1a in relapsing/remitting multiple sclerosis. *Lancet.* 1998; 352: 1498-504.
25. Johnson KP, Brooks BR, Cohen JA, Ford CC, Goldstein J, Lisak RP, et al. Copolymer 1 reduces relapse rate and improves disability in relapsing-remitting multiple sclerosis: results of a phase III multicenter, double-blind placebo-controlled trial. The Copolymer 1 Multiple Sclerosis Study Group. *Neurology.* 1995; 45(7): 1268-76.
26. Rudick RA, Stuart H, Calabresi PA, Confavreux C, Galetta SL, Radue EW, et al, for the SENTINEL Investigators. Natalizumab plus Interferon Beta-1a for Relapsing Multiple Sclerosis. *N Engl J Med.* 2006; 354: 911-23.
27. Polman CH, O'Connor PW, Havrdova E, Hutchinson M, Kappos L, Miller DH, et al; AFFIRM Investigators. A randomized, placebo-controlled trial of natalizumab for relapsing multiple sclerosis. *N Engl J Med.* 2006; 354(9): 899-910.
28. Cohen JA, Barkhof F, Comi G, Hartung HP, Khatri BO, Montalban X, et al, for the TRANSFORMS Study Group. Oral Fingolimod or Intramuscular Interferon for Relapsing Multiple Sclerosis. *N Engl J Med.* 2010; 362: 402-15.

29. Kappos L, Radue EW, O'Connor P, Polman C, Hohlfeld R, Calabresi P, et al, for the FREEDOMS Study Group. A Placebo-Controlled Trial of Oral Fingolimod in Relapsing Multiple Sclerosis *N Engl J Med*. 2010; 362: 387-401.
30. O'Connor P, Wolinsky JS, Confavreux C, Comi G, Kappos L, Olsson TP, et al. Randomized trial of oral teriflunomide for relapsing multiple sclerosis. *N Engl J Med*. 2011; 365(14): 1293–303.
31. Confavreux C, O'Connor P, Comi G, Freedman MS, Miller AE, Olsson TP, et al. Oral teriflunomide for patients with relapsing multiple sclerosis (TOWER): a randomised, double-blind, placebo-controlled, phase 3 trial. *Lancet Neurol*. 2014; 13(3): 247–56.
32. Gold R, Kappos L, Arnold DL, Bar-Or A, Giovannoni G, Selmaj K, et al. Placebo-controlled phase 3 study of oral BG-12 for relapsing multiple sclerosis. *N Engl J Med*. 2012; 367(12): 1098–107.
33. Fox RJ, Miller DH, Phillips JT, Hutchinson M, Havrdova E, Kita M, et al. Placebo-controlled phase 3 study of oral BG-12 or glatiramer in multiple sclerosis. *N Engl J Med*. 2012; 367(12): 1087–97.
34. Cohen JA, Coles AJ, Arnold DL, Confavreux C, Fox EJ, Hartung HP, et al; CARE-MS I investigators. Alemtuzumab versus interferon beta 1a as first-line treatment for patients with relapsing-remitting multiple sclerosis: a randomised controlled phase 3 trial. *Lancet*. 2012; 380(9856): 1819-28.
35. Coles AJ, Twyman CL, Arnold DL, Cohen JA, Confavreux C, Fox EJ, et al; CARE-MS II investigators. Alemtuzumab for patients with relapsing multiple sclerosis after disease-modifying therapy: a randomised controlled phase 3 trial. *Lancet*. 2012; 380(9856): 1829-39.
36. Calabresi PA, Kieseier BC, Arnold DL, Balcer LJ, Boyko A, Pelletier J, et al; ADVANCE Study Investigators. Pegylated interferon β -1a for relapsing-remitting multiple sclerosis (ADVANCE): a randomised, phase 3, double-blind study. *Lancet Neurol*. 2014; 13(7): 657-65.
37. Biomarker Definitions Working Group. Biomarkers and surrogate endpoints: preferred definitions and conceptual framework. *Clin Pharmacol Ther*. 2001; 69(3): 89-95.

38. Teunissen CE, Malekzadeh A, Leurs C, Bridel C and Killestein J. Body fluid biomarkers for multiple sclerosis -- the long road to clinical application. *Nat Rev Neurol*. 2015; 11: 585-96.
39. Housley WJ, Pitt D, Hafler DA. Biomarkers in multiple sclerosis. *Clinical Immunology*. 2015; 161: 51-8.
40. 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; 13: 227-31.
41. Kuhle J, Disanto G, Dobson R, Adiutori R, Bianchi L, Topping J. et al. Conversion from clinically isolated syndrome to multiple sclerosis: a large multicentre study. *Mult Scler*. 2015; 21: 1013-24.
42. Villar LM, Masjuan J, González-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*. 2002; 59: 555-59.
43. 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; 53: 222-26.
44. Disanto G, Adiutori R, Dobson R, Martinelli V, Dalla Costa G, Runia T, et al; International Clinically Isolated Syndrome Study Group. Serum neurofilament light chain levels are increased in patients with a clinically isolated syndrome. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. 2016; 87(2): 126-29.
45. J. Salzer, A. Svenningsson, P. Sundstrom, Neurofilament light as a prognostic marker in multiple sclerosis. *Mult Scler*. 2010; 16: 287-92.
46. Martínez MA, Olsson B, Bau L, Matas E, Cobo Calvo Á, Andreasson U, et al. Glial and neuronal markers in cerebrospinal fluid predict progression in multiple sclerosis. *Mult Scler*. 2015; 21(5): 550-61.

47. Petzold A, Eikelenboom MJ, Gveric D, Keir G, Chapman M, Lazeron RH, et al. Markers for different glial cell responses in multiple sclerosis: clinical and pathological correlations. *Brain* 2002; 125: 1462-73.
48. 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: 1082-93.
49. Durelli L, Bongioanni MR, Cavallo R, Ferrero B, Ferri R, Ferrio MF et al. Chronic systemic high-dose recombinant interferon alfa-2a reduces exacerbation rate, MRI signs of disease activity, and lymphocyte interferon gamma production in relapsing–remitting multiple sclerosis. *Neurology*. 1994; 44: 406-13.
50. Myhr KM, Riise T, Green Lilleas FE, , Beiske TG, Celius EG, Edland A et al. Interferon-alpha2a reduces MRI disease activity in relapsing–remitting multiple sclerosis. Norwegian Study Group on Interferon-alpha in Multiple Sclerosis. *Neurology*. 1999; 52: 1049-56.
51. Panitch HS, Hirsch RI, Schindler J, Johnson KP. Treatment of multiple sclerosis with gamma-interferon: exacerbation associated with activation of the immune system. *Neurology*. 1987; 37: 1097-102.
52. Kieseier BC. The mechanism of action of interferon- β in relapsing multiple sclerosis. *CNS Drugs*. 2011; 25(6): 491-502.
53. Zhang J, Hutton G, Zang Y. A comparison of the mechanisms of action of interferon beta and glatiramer acetate in the treatment of multiple sclerosis. *Clin Ther*. 2002; 24(12): 1998-2021.
54. Sottini A, Capra R, Serana, Chiarini M, Caimi L and Imberti L. Interferon-Beta therapy monitoring in multiple sclerosis patients. *Edcr Metab Immune Disord Drug Targets*. 2009; 9: 14-28.
55. Arnason BG, Dayal A, Qu ZX, Jensen MA, Genç K, Reder AT. Mechanisms of action of interferon-beta in multiple sclerosis. *Springer Semin Immunopathol*. 1996; 18(1): 125-48.

56. Shapiro S, Galboiz Y, Lahat N, Kinarty A, Miller A. The 'immunological-synapse' at its APC side in relapsing and secondary-progressive multiple sclerosis: modulation by interferon-beta. *J Neuroimmunol.* 2003; 144: 116-24.
57. Rudick RA, Ransohoff RM, Lee JC, Pepler R, Yu M, Mathisen PM, et al. In vivo effects of interferon beta-1a on immunosuppressive cytokines in multiple sclerosis. *Neurology.* 1998; 50: 1294-300.
58. Calabresi PA, Pelfrey CM, Tranquill LR, Maloni H, McFarland HF. VLA-4 expression on peripheral blood lymphocytes is downregulated after treatment of multiple sclerosis with interferon beta. *Neurology.* 1997; 49(4): 1111-6.
59. Calabresi PA, Tranquill LR, Dambrosia JM, Stone LA, Maloni H, Bash CN, et al. Increases in soluble VCAM-1 correlate with a decrease in MRI lesions in multiple sclerosis treated with interferon beta-1b. *Ann Neurol.* 1997; 41(5): 669-74.
60. Muraro PA, Liberati L, Bonanni L, Pantalone A, Caporale CM, Iarlori C, et al. Decreased integrin gene expression in patients with MS responding to interferon-beta treatment. *J Neuroimmunol.* 2004; 150: 123-31.
61. Saraste M, Irjala H, Airas L. Expansion of CD56bright natural killer cells in the peripheral blood of multiple sclerosis patients treated with interferon-beta. *Neurol Sci.* 2007; 28: 121-6.
62. Biernacki K, Antel JP, Blain M, Narayanan S, Arnold DL, Prat A. Interferon beta promotes nerve growth factor secretion early in the course of multiple sclerosis. *Arch Neurol.* 2005; 62: 563-8.
63. Vosslander S, Van Baarsen LG, Verweij CL. Pharmacogenomics of IFN-B in multiple sclerosis: towards a personalized medicine approach. *Pharmacogenomics.* 2009; 10(1): 97-108.
64. Burdick LM, Somani N and Somani AK. Type I IFNs and their role in the development of autoimmune diseases. *Expert Opin Drug Saf.* 2009; 8(4): 459-72.

65. Platanias LC. Mechanisms of type-I- and type-II-interferon-mediated signalling. *Nat Rev Immunol.* 2005; 5(5): 375-86.
66. Feng X, Petraglia AL, Chen M, Byskosh PV, Boos MD, Reder AT. Low expression of interferon-stimulated genes in active multiple sclerosis is linked to subnormal phosphorylation of STAT1. *J Neuroimmunol.* 2002; 129(1-2): 205-15.
67. The IFNB Multiple Sclerosis Study Group and The University of British Columbia MS/MRI Analysis Group. Interferon beta-1b in the treatment of multiple sclerosis: final outcome of the randomized controlled trial. *Neurology.* 1995; 45(7): 1277-85.
68. Paty DW, Li DK. Interferon beta-1b is effective in relapsing-remitting multiple sclerosis. II. MRI analysis results of a multicenter, randomized, doubleblind placebo controlled trial. UBC MS/MRI Study Group and the IFNB Multiple Sclerosis Group. *Neurology.* 1993; 43: 662-67.
69. Rudick RA, Goodkin DE, Jacobs LD, Cookfair DL, Herndon RM, Richert JR, et al. Impact of interferon beta-1a on neurologic disability in relapsing multiple sclerosis. The Multiple Sclerosis Collaborative Research Group (MSCRG). *Neurology.* 1997; 49: 358-63.
70. PRISMS (Prevention of Relapses and Disability by Interferon-b-1a Subcutaneously in Multiple Sclerosis) Study Group, the University of British Columbia MS/MRI Analysis Group PRISMS-4: long-term efficacy of interferon-b-1a in relapsing MS. *Neurology.* 2001; 56: 1628-36.
71. Kieseier BC, Arnold DL, Balcer LJ, Boyko AA, Pelletier J, Liu S, et al. Peginterferon beta-1a in multiple sclerosis: 2-year results from ADVANCE. *Mult Scler.* 2015; 21(8): 1025-35.
72. Rudick RA, Lee JC, Simon J, Ransohoff RM, Fisher E. Defining interferon beta response status in multiple sclerosis patients. *Ann Neurol.* 2004; 56: 548-55.

73. Verweij CL, Vosslander S. Relevance of the type I interferon signature in multiple sclerosis towards a personalized medicine approach for interferon-beta therapy. *Discov Med*. 2013; 15(80): 51-60.
74. Comabella M, Lünemann JD, Rio J, Sánchez A, López C, Julià E et al. A type I interferon signature in monocytes is associated with poor response to interferon- β in multiple sclerosis. *Brain*. 2009; 132 (Pt 12): 3353-65.
75. The IFNB Multiple Sclerosis Study Group and the University of British Columbia MS/MRI Analysis Group. Neutralizing antibodies during treatment of multiple sclerosis with interferon beta-1b: experience during the first three years. *Neurology*. 1996; 47(4): 889-94.
76. Boz C, Oger J, Gibbs E, Grossberg SE and the Neurologists of the UBC MS Clinic. Reduced effectiveness of long-term interferon- β treatment on relapses in neutralizing antibody-positive multiple sclerosis patients: a Canadian multiple sclerosis clinic-based study. *Mult Scler*. 2007; 13: 1127-37.
77. Sorensen PS, Deisenhammer F, Duda P, Hohlfeld R, Myhr KM, Palace J, Polman C, Pozzilli C, Ross C. Use of anti - interferon beta antibody measurements in multiple sclerosis. In: Gilhus NE, Barnes MR, Brainin M. *European Handbook of Neurological Management*. Vol 1. 2nd ed. Chichester: Wiley-Blackwell; 2011.
78. Hemmer B, Stüve O, Kieseier B, Schellekens H, Hartung HP. Immune response to immunotherapy: the role of neutralising antibodies to interferon beta in the treatment of multiple sclerosis. *Lancet Neurol*. 2005; 4: 403-12.
79. Hesse D. and Sorensen PS. Using measurements of neutralizing antibodies: the challenge of IFN-beta therapy. *Eur J Neurol*. 2007; 14(8): 850-9.
80. Goodin DS, Frohman EM, Hurwitz B, O'Connor PW, Oger JJ, Reder AT, et al. Neutralizing antibodies to interferon beta: Assessment of their clinical and radiographic impact: An evidence

report Report of the Therapeutics and Technology Assessment Subcommittee of the American Academy of Neurology. *Neurology*. 2007; 68: 977-84.

81. Bertolotto A, Granieri L, Marnetto F, Valentino P, Sala A, Capobianco M, et al Biological monitoring of IFN- β therapy in Multiple Sclerosis. *Cytokine Growth Factor Rev*. 2015; 26(2): 241-8.

82. Gneiss C, Reindl M, Lutterotti A, Ehling R, Egg R, Khalil M, et al. Interferon-beta: the neutralizing antibody (NAb) titre predicts reversion to NAb negativity. *Mult Scler*. 2004; 10(5): 507-10.

83. Bertolotto A, Deisenhammer F, Gallo P, Sørensen PS. Immunogenicity of interferon beta: differences among products. *J Neurol*. 2004; 251 [Suppl 2]: II/15–II/24.

84. Ross C, Clemmesen KM, Svenson M, Sørensen PS, Koch-Henriksen N, Skovgaard GL, et al, Danish Multiple Sclerosis Study Group. Immunogenicity of interferon-b in multiple sclerosis patients influence of preparation, dosage, dose frequency, and route of administration. *Ann Neurol*. 2000; 48: 706-12.

85. Sominada A, Rot U, Suoniemi M, Deisenhammer F, Hillert J and Fogdell-Hahn A. Interferon beta preparations for the treatment of multiple sclerosis patients differ in neutralizing antibody seroprevalence and immunogenicity. *Mult Scler*. 2007; 13: 208-14.

86. Perini P, Calabrese M, Biasi G and Gallo P. The clinical impact of interferon beta antibodies in relapsing-remitting MS. *J Neurol*. 2004; 251: 305-9.

87. Sorensen PS, Koch-Henriksen N, Ross C, Clemmesen KM, Bendtzen K; and the Danish Multiple Sclerosis Study Group. Appearance and disappearance of neutralizing antibodies during interferon-beta therapy. *Neurology*. 2005; 65: 33-9.

88. Hartung HP, Polman C, Bertolotto A, Deisenhammer F, Giovannoni G, Havrdova E, et al. Neutralising antibodies to interferon beta in multiple sclerosis: expert panel report. *J Neurol*. 2007; 254(7): 827-37

89. Rudick RA, Simonian NA, Alam JA, Campion M, Scaramucci JO, Jones W, et al. Incidence and significance of neutralizing antibodies to interferon beta-1a in multiple sclerosis. Multiple Sclerosis Collaborative Research Group (MSCRG) Neurology. 1998; 50(5): 1266-72.
90. Sorensen PS, Ross C, Clemmesen KM, Bendtzen K, Frederiksen JL, Jensen K et al, and the Danish Multiple Sclerosis Study Group. Clinical importance of neutralising antibodies against interferon beta in patients with relapsing-remitting multiple sclerosis. Lancet. 2003; 362: 1184-91.
91. Malucchi S, Sala A, Gilli F, Bottero R, Di Sapio A, Capobianco M, et al. Neutralizing antibodies reduce the efficacy of beta1FN during treatment of multiple sclerosis. Neurology. 2004; 62(11): 2031-7.
92. Malucchi S, Gilli F, Caldano M, Marnetto F, Valentino P, Granieri L, et al. Predictive markers for response to interferon therapy in patients with multiple sclerosis. Neurology. 2008; 70: 1119-27.
93. Tomassini V, Paolillo A, Russo P, Giugni E, Prosperini L, Gasperini C, et al. Predictors of long-term clinical response to interferon-beta therapy in relapsing multiple sclerosis. J Neurol. 2006; 253: 287-93.
94. Paolicelli D, D'Onghia M, Pellegrini F, Direnzo V, Iaffaldano P, Lavolpe V, et al. The impact of neutralizing antibodies on the risk of disease worsening in interferon b-treated relapsing multiple sclerosis: a 5 year post-marketing study. J Neurol. 2013; 260: 1562–1568.
95. Kappos L, Clanet M, Sandberg-Wollheim M, Radue EW, Hartung HP, Hohlfeld R, et al. European interferon beta-1a IM dose-comparison study investigators. Neutralizing antibodies and efficacy of interferon beta-1a: a 4-year controlled study. Neurology. 2005; 65(1): 40–7.
96. WHO Expert Committee on Biological Standardization. Thirty-fifth report. World Health Organ Tech Rep Ser. 1985; 725: 1-140.
97. Kawade Y. Quantitation of neutralization of interferon by antibody. Methods Enzymol. 1986; 119: 558-73.

98. Horisberger MA. Interferons, Mx genes, and resistance to influenza virus. *Am J Respir Crit Care Med* 1995; 152(4 Pt 2): S67-S71.
99. Pachner AR, Bertolotto A, and Deisenhammer F. Measurement of MxA mRNA or protein as a biomarker of IFN bioactivity. Detection of antibody-mediated decreased bioactivity (ADB). *Neurology*. 2003; 61(Suppl 5): S24-S26.
100. Deisenhammer F, Reindl M, Harvey J, Gasse T, Dilitz E, Berger T. Bioavailability of interferon beta 1b in MS patients with and without neutralizing antibodies. *Neurology*. 1999; 52: 1239-43.
101. Kracke A, VonWussow P, Al-Masri AN, Dalley G, Windhagen A, Heidereich F. Mx protein in blood leukocyte for monitoring interferon beta 1b therapy in patients with MS. *Neurology*. 2000; 54(1): 193-9.
102. Vallittu A-M, Erällinna J-P, Ilonen J, Salmi AA, Waris M. MxA protein assay for optimal monitoring of IFN- β bioactivity in the treatment of MS patients. *Acta Neurol Scand*. 2008; 118: 12-7.
103. Bertolotto A, Gilli F, Sala A, Audano L, Castello A, Magliola U, et al. Evaluation of bioavailability of three types of IFN β in multiple sclerosis patients by a new quantitative-competitive-PCR method for MxA quantification. *J Immunol Methods*. 2001; 256: 141-52.
104. Pachner A, Narayan K, Price N, Hurd M, Dail D. MxA gene expression analysis as an interferon-beta bioactivity measurement in patients with multiple sclerosis and the identification of antibody-mediated decreased bioactivity. *Mol Diagn*. 2003; 7: 17-25.
105. Gilli F, Marnetto F, Caldano M, Sala A, Malucchi S, Di Sapio A, et al. Biological responsiveness to first injections of interferon-beta in patients with multiple sclerosis. *J. Neuroimmunol*. 2005; 158: 195–203.

106. Hoffmann LA, Krumbholz M, Faber H, Kuempfel T, Starck M, Pöllmann W, et al. Multiple sclerosis: relating MxA transcription to anti-interferon-beta-neutralizing antibodies. *Neurology*. 2007; 68: 958-9.
107. Bertolotto A, Gilli F, Sala A, Capobianco M, Malucchi S, Milano E et al. Persistent neutralizing antibodies abolish the interferon B bioavailability in MS patients. *Neurology* 2003; 60(4): 634-639.
108. Gilli F, Marnetto F, Stefanuto G, Rinaldi V, Farinazzo F, Malucchi S, et al. Comparison of three PCR assays for the evaluation of interferon-beta biological activity in patients with multiple sclerosis. *Mol Diagn*. 2004; 8(3): 185-94.
109. McKay F, Schibeci S, Heard R, Stewart G, Booth D. Analysis of neutralizing antibodies to therapeutic interferon-beta in multiple sclerosis patients: A comparison of three methods in a large Australasian cohort. *J Immunol Methods*. 2006; 310(1-2): 20-9.
110. Capra R, Sottini A, Cordioli C, Serana F, Chiarini M, Caimi L, et al. IFN β bioavailability in multiple sclerosis patients: MxA versus antibody-detecting assays. *J Neuroimmunol*. 2007; 189: 102-10.
111. Van der Voort LF, Vennegoor A, Visser A, Knol DL, Uitdehaag BM, Barkhof F et al. Spontaneous MxA mRNA level predicts relapses in patients with recently diagnosed MS. *Neurology* 2010; 75(14): 1228-33.
112. Hundeshagen A, Hecker M, Paap BK, Angerstein C, Kandulski O, Fatum C, et al. Elevated type I interferon-like activity in a subset of multiple sclerosis patients: molecular basis and clinical relevance. *J Neuroinflammation*. 2012; 9: 140. doi: 10.1186/1742-2094-9-140.
Available: <http://www.jneuroinflammation.com/content/9/1/140> Accessed 22 June 2012.
113. van Baarsen LG, van der Pouw Kraan TC, Kragt JJ, Baggen JM, Rustenburg F, Hooper T, et al. A subtype of multiple sclerosis defined by an activated immune defense program. *Genes Immun*. 2006; 7(6): 522-31.

114. Reder AT and Feng X. Aberrant Type I Interferon Regulation in Autoimmunity: Opposite Directions in MS and SLE, Shaped by Evolution and Body Ecology. *Front Immunol* 2013; 4: 281. doi: 10.3389/fimmu.2013.00281.
115. van Baarsen LG, Vosslamber S, Tijssen M, Baggen JMC, van der Voort LF, Killestein J, et al. Pharmacogenomics of Interferon- β Therapy in Multiple Sclerosis: Baseline IFN Signature Determines Pharmacological Differences between Patients. *PLoS ONE* 2008; 3(4): e1927. doi: 10.1371/journal.pone.0001927.
116. Hesse D, Krakauer M, Lund H, Ryder LP, Alsing I, Svejgaard A, et al. Spontaneous MxA mRNA expression is associated with low MRI disease activity in multiple sclerosis. *Mult Scler.* 2007; 13: S37-S38, p143.
117. Feng X, Reder NP, Yanamandala M, Hill A, Franek BS, Niewold TB , et al. Type I interferon signature is high in lupus and neuromyelitis optica but low in multiple sclerosis. *J Neurol Sci.* 2012; 313: 48-53.
118. López de Padilla CM, Niewold TB. The type I interferons: Basic concepts and clinical relevance in immune-mediated inflammatory diseases. *Gene.* 2016; 576: 14-21. doi: 10.1016/j.gene.2015.09.058.
119. Feng X, Wu H, Grossman JM, Hanvivadhanakul P, FitzGerald JD, Park GS, et al. Association of increased interferon-inducible gene expression with disease activity and lupus nephritis in patients with systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum.* 2006; 54: 2951–62.
120. Tanaka M, Tanaka K, Komori M. Interferon- β (1b) treatment in neuromyelitis optica. *Eur Neurol.* 2009; 62: 167–70.
121. Uzawa A, Mori M, Hayakawa S, Masuda S, Kuwabara S. Different responses to interferon beta-1b treatment in patients with neuromyelitis optica and multiple sclerosis. *Eur J Neurol.* 2010; 17: 672-6.

122. Palace J, Leite MI, Nairne A, Vincent A. Interferon Beta treatment in neuromyelitis optica: increase in relapses and aquaporin 4 antibody titers. *Arch Neurol*. 2010; 67: 1016-7.
123. Sellebjerg F, Datta P, Larsen J, Rieneck K, Alsing I, Oturai A, et al. Gene expression analysis of interferon-beta treatment in multiple sclerosis. *Mult Scler*. 2008; 14:615-21.
124. Pachner AR, Dail D, Pak E, Narayan K. The importance of measuring IFNbeta bioactivity: monitoring in MS patients and the effect of anti-IFNbeta antibodies. *J Neuroimmunol*. 2005; 166(1-2): 180-8.
125. Deisenhammer F, Schellekens H, Bertolotto A. Measurement of neutralizing antibodies to interferon beta in patients with multiple sclerosis. *J Neurol*. 2004; 251 (Suppl 2):II31-9.
126. Sominanda A, Hillert J, Fogdell-Hahn A. In vivo bioactivity of interferon-beta in multiple sclerosis patients with neutralising antibodies is titre-dependent. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. 2008; 79(1): 57-62.
127. Hesse D, Sellebjerg F, Sorensen PS. Absence of MxA induction by interferon beta in patients with MS reflects complete loss of bioactivity. *Neurology*. 2009; 73(5): 372-7.
128. Zanotti C, Ghidini C, Lamorgese C, Caimi L, Capra R, Imberti L. Transfer of myxovirus-protein-A mRNA assay for interferon-b bioactivity measurement in multiple sclerosis patients to routine laboratory practice. A 4-year experience. *Clin Chem Lab Med*. 2010; 48: 1235-8.
129. Vallittu AM, Erälinna JP, Ilonen J, Salmi AA, Waris M. MxA protein assay for optimal monitoring of IFN-beta bioactivity in the treatment of MS patients. *Acta Neurol Scand*. 2008; 118(1): 12-7.
130. Bertolotto A, Sala A, Caldano M, Capobianco M, Malucchi S, Marnetto F, et al. Development and validation of a real time PCR-based bioassay for quantification of neutralizing antibodies against human interferon-beta. *J Immunol Methods*. 2007; 321(1-2): 19-31.

131. Gilli F, Marnetto F, Caldano M, Sala A, Malucchi S, Capobianco M, et al. Biological markers of interferon-beta therapy: comparison among interferon-stimulated genes MxA, TRAIL and XAF-1. *Mult Scler.* 2006; 12(1): 47-57.
132. Bertolotto A, Granieri L, Marnetto F, Valentino P, Sala A, Capobianco M, et al. Biological monitoring of IFN-b therapy in Multiple Sclerosis. *Cytokine Growth Factor Rev.* 2015; 26(2): 241-8
133. van der Voort LF, Visser A, Knol DL, Oudejans CB, Polman CH, Killestein J. Lack of interferon-beta bioactivity is associated with the occurrence of relapses in multiple sclerosis. *Eur J Neurol.* 2009; 16: 1049-52.
134. Polman CH, Reingold SC, Edan G, Filippi M, Hartung HP, Kappos L, et al. Diagnostic criteria for multiple sclerosis: 2005 revisions to the "McDonald Criteria". *Ann Neurol.* 2005; 58: 840-6.
135. Kurtzke JF. Rating neurological impairment in multiple sclerosis: an expanded disability status scale (EDSS) *Neurology.* 1983; 33: 1444-52.
136. Confavreux C, Compston DA, Hommes OR, McDonald WI, Thompson AJ. EDMUS, a European database for multiple sclerosis. *J Neurol Neurosurg Psychiatry.* 1992; 55: 671-6.
137. Río J, Nos C, Tintoré M, Borrás C, Galán I, Comabella M, et al. Assessment of different treatment failure criteria in a cohort of relapsing-remitting multiple sclerosis patients treated with interferon beta: implications for clinical trials. *Ann Neurol.* 2002; 52: 400-6.
138. Stürzebecher S, Wandinger WP, Rosenwald A, Sathyamoorthy M, Tzou A, Mattar P, et al. Expression profiling identifies responder and non-responder phenotypes to interferon-b in multiple sclerosis. *Brain.* 2003; 126: 1419-29.
139. Rudick RA, Rani MR, Xu Y, Lee JC, Na J, Shrock J, et al. Excessive biologic response to IFN β is associated with poor treatment response in patients with multiple sclerosis. *PLoS One.* 2011; 6(5): e19262. doi: 10.1371/journal.pone.0019262. Epub 2011 May 13.
Available: <http://journals.plos.org/plosone/article/asset?id=10.1371%2Fjournal.pone.0019262.PDF>

140. Serana F, Imberti L, Amato MP, Comi G, Gasperini C, Ghezzi A, et al. MxA mRNA quantification and disability progression in interferon beta-treated multiple sclerosis patients. *PLoS One* 2014; 9: e94794. doi: 10.1371/journal.pone.0094794. eCollection 2014.

Available: <http://journals.plos.org/plosone/article/asset?id=10.1371%2Fjournal.pone.0094794.PDF>

141. Garcia-Montojo M, De Las Heras V, Bartolome M, Arroyo R, Alvarez-Lafuente R. Interferon beta treatment: bioavailability and antiviral activity in multiple sclerosis patients. *J Neurovirol.* 2007; 13: 504-512.

142. Romeo M, Martinelli-Boneschi F, Rodegher M, Esposito F, Martinelli V, Comi G; San Raffaele Multiple Sclerosis Clinical Group. Clinical and MRI predictors of response to interferon-beta and glatiramer acetate in relapsing-remitting multiple sclerosis patients. *Eur J Neurol.* 2011; 20: 1060-7.

143. Mezei Z, Bereczki D, Racz L, Csiba L, Csepány T. Can a physician predict the clinical response to first-line immunomodulatory treatment in relapsing–remitting multiple sclerosis? *Neuropsychiatr Dis Treat.* 2012; 8: 465-73.

144. Sá MJ, de Sá J, Sousa L. Relapsing-remitting multiple sclerosis: patterns of response to disease-modifying therapies and associated factors: a national survey. *Neurol Ther.* 2014; 3: 89-99. doi: 10.1007/s40120-014-0019-4. eCollection2014.

Available: <http://link.springer.com/article/10.1007%2Fs40120-014-0019-4>

