



FACULTAD DE MEDICINA
UNIVERSIDAD MIGUEL HERNÁNDEZ



TRABAJO FIN DE MASTER

Título del Trabajo de Investigación: Relación existente entre niveles de vitamina D y evolución de la Esclerosis Múltiple.

Investigador principal: Teresa Segura Úbeda.

Tutor: Jose Manuel Soler Torró.

Lugar de trabajo: Murcia. C.P.: 30.009

Teléfono (móvil): ~~697 80 65 73.~~

E-mail: ~~tere.s.u.91@gmail.com~~

Master Universitario de Investigación en Atención Primaria Curso:
2016-2017

1. JUSTIFICACIÓN: ANTECEDENTES Y EL ESTADO DEL TEMA.

La EM es la enfermedad autoinmune crónica desmielinizante del sistema nervioso central (SNC) más frecuente y una de las causas más importantes de discapacidad en adultos jóvenes (1), ya que es una enfermedad progresiva, con frecuencia recurrente y actualmente no existe tratamiento curativo (2).

El inicio de la enfermedad es raro antes de los 10 años (2%) y después de los 60 (10%). En el 70% de los casos, se presenta entre los 20-40 años y afecta con mayor frecuencia a las mujeres que a los varones, en una proporción de 2-3/1. Sin embargo, en edades tardías (mayores de 45 años), la proporción se iguala (3).

La EM se caracteriza por la presencia de lesiones focales en la sustancia blanca, denominadas placas, en las que lo más llamativo es la pérdida de mielina con preservación relativa de los axones. Estas lesiones suelen ser múltiples, de un tamaño inferior a 1,5 cm de diámetro, y característicamente se localizan en el tejido que circunda los ventrículos laterales y el cuarto ventrículo, el tejido periacueductal, el cuerpo calloso, el nervio óptico, el quiasma y los tractos ópticos, la unión yuxtacortical y la sección subpial del tronco-encéfalo. En la médula se localizan en las columnas anteriores y dorsales. Pero pueden aparecer también en la sustancia gris, en particular en la corteza cerebral (3).

Las placas de desmielinización son de dos tipos según la fase de la enfermedad: Lesiones agudas, en la que el fenómeno patológico fundamental es la inflamación; y lesiones crónicas, donde destaca la desmielinización, la degeneración axonal y la gliosis.

La lesión aguda es típicamente perivascular, de bordes mal definidos y caracterizada por un importante infiltrado inflamatorio, compuesto por linfocitos T, linfocitos B y macrófagos, y restos de mielina en distintas fases, con un grado variable de degeneración axonal.

La lesión crónica destaca la escasa actividad inflamatoria, la importante pérdida de vainas de mielina y de oligodendrocitos, y la desmielinización de los axones, muchos de los cuales están degenerados. En fases más avanzadas de la enfermedad existe además una inflamación intersticial del parénquima cerebral, caracterizada esencialmente por pequeños nódulos de microglia activada que irán lesionando todo el SNC de forma lentamente progresiva (3).

El proceso de desmielinización altera la conducción saltatoria típica de las vías de mielina. La desmielinización parcial ocasiona un enlentecimiento en la conducción axonal, responsable del retraso e incluso el bloqueo en la conducción de los potenciales evocados, lo que da lugar, cuando la alteración ocurre en una vía elocuente, a la aparición de los síntomas de la enfermedad (3).

Clásicamente se ha descrito 3 formas de evolución de EM. El 80-90% de los pacientes presentan un curso caracterizado por la aparición de episodios o *brotos* de disfunción neurológica más o menos reversibles, que se repiten en el tiempo y que, a medida que se repiten, van dejando secuelas funcionales (forma en brotes o recurrente-remitente). Tras 10 años, un 50% de esos pacientes pasan a un curso de incremento *progresivo* de la discapacidad no relacionado con los brotes (forma progresiva secundaria). En un 10-15% presentan un curso progresivo desde el inicio (forma progresiva primaria).

Kurtzke desarrolló una escala de disfunción neurológica (EDSS: Expanded Disability Status Scale), que puntúa el deterioro de 0 (normal) a 10 (fallecido), con intervalos de 0,5 puntos. La puntuación se obtiene de la valoración cuantitativa de las alteraciones neurológicas según una escala de sistemas funcionales (función piramidal, cerebelosa, del tronco cerebral, sensitiva, del intestino y vejiga, visual y mental). Se considera discapacidad moderada una puntuación mayor de 3, y a partir de un EDSS de 4 el deterioro viene marcado por la capacidad de deambulación. Esta escala es la utilizada, en clínica y en investigación, para medir la afectación clínica por EM.

Además, la actividad de la enfermedad suele medirse por parámetros clínicos (tasa anualizada de brotes o progresión de la EDSS) y radiológicos (nuevas lesiones captantes de Gadolinio en resonancia magnética (RM), incremento en número o volumen de lesiones en T2 o pérdida de volumen cerebral...) (3).

La EM presenta una etiología desconocida, en la que probablemente un factor ambiental induce una respuesta inmune anormal en personas genéticamente predispuestas. Induce la aparición de linfocitos T autorreactivos, que tras un período de latencia de años, serán reactivados por un factor sistémico o local mediante un mecanismo de mimetismo molecular respecto a la mielina o por estimulación a través de superantígenos virales o bacterianos. Estos linfocitos T se unen a la pared endotelial mediante la interacción de dos moléculas LFA-1 (Lymphocyte Function- Associated Antigen 1) y VLA-4 (antígeno muy tardío), traspasando la barrera hematoencefálica gracias a la acción de metaloproteinasas. Los linfocitos T activados presentes en el SNC se encontrarán con células presentadoras de antígenos, que expresan en su superficie el antígeno responsable de la EM, el cual es desconocido, en el contexto de una molécula HLA tipo II y de moléculas coestimuladoras.

Una vez constituido el complejo trimolecular (receptor del linfocito T, el antígeno y la molécula HLA tipo II), los linfocitos T autorreactivos, que son de fenotipo colaborador CD4+ (Th1 y Th17), producen citocinas proinflamatorias que inducen la proliferación clonal de linfocitos T y atraen a los macrófagos y a la microglia. Al activarlos se pone en marcha la cascada inflamatoria. Mientras, los linfocitos T colaboradores Th2 liberan citocinas antiinflamatorias que tienden a disminuir el estado proinflamatorio del sistema inmune y a inducir la proliferación de linfocitos B y por ello la elaboración de anticuerpos por estos (generando las típicas bandas oligoclonales). Participan, por tanto, el sistema inmune celular como humoral (3).

Es de gran relevancia conocer que el riesgo de EM es muy bajo en personas que presenten serología negativa para el virus de Epstein-Barr (VEB) y se ha observado que la proporción de pacientes que han padecido mononucleosis infecciosa por VEB o presentan serología positiva aumenta directamente proporcional respecto a la distancia desde Ecuador.

El VEB ha sido visualizado en linfocitos B localizados en el SNC en la mayoría de los pacientes con EM, y el descenso del número de éstos provocado por el tratamiento con Rituximab ha mostrado mejoría clínica en los pacientes (5).

La posibilidad de que la vitamina D pudiera constituir un factor de riesgo para la EM fue descrita hace más de 30 años. Acheson et al. (7) fueron los primeros en estudiar la relación entre una mayor latitud con una mayor prevalencia de EM, por lo que diversos estudios han sugerido que está relacionada con la intensidad y duración de la radiación ultravioleta, la cual podría presentar una acción inmunosupresora independiente de la vitamina D.

Asimismo, hay datos que muestran que la mayoría de pacientes con EM tiene niveles bajos de vitamina D y existe evidencia que indica que la vitamina D tiene un papel relevante en el SNC a través de la respuesta de los linfocitos T colaboradores, pues parece tener un papel inhibiendo el desarrollo de los linfocitos Th1, y por ello la producción de interferón-gamma, mientras que potencia el de los Th2 y los T reguladores, estos últimos productores de IL-10 y TGF- β . Además, se sugiere que el déficit de vitamina D modula la respuesta frente al VEB, considerado uno de los principales factores ambientales implicados como desencadenante de la EM, con un riesgo relativo de desarrollar EM de 2,3 si la infección es clínicamente manifiesta durante la adolescencia. Esta especulación se basa en que a partir de 42° de latitud (considerado como el punto de corte teórico donde la mayoría de radiación ultravioleta B es absorbida por la atmósfera y la producción de vitamina D es menor) la seroprevalencia del VEB es sustancialmente mayor (5).

Destacar que en un ensayo clínico donde se administró 1.000 UI de vitamina D al día a pacientes con EM mostró como resultado un aumento en el nivel de TGF- β , una importante citoquina anti-inflamatoria que se cree que tiene un efecto protector contra la EM (9). Incluso parece que la vitamina D pudiera tener un papel en la reparación de la mielina puesto que se han identificado interacciones entre la proteína receptora de vitamina D y el receptor gamma RXR (Retinoid X Receptor), cuya relación con la reparación de la mielina es conocida. Al añadir vitamina D a células cerebrales donde ambas proteínas estaban presentes, la tasa de producción de oligodendrocitos (las células productoras de mielina) se incrementaba en un 80% (10).

En cuanto a la influencia genética sobre la EM, los estudios indican que es poligénica, y que el riesgo se incrementa por la presencia sobre todo de los alelos DRB1*1501, DQA1*0102 y DQB1*0602, situados en el complejo mayor de histocompatibilidad clase II, regulado por la vitamina D (11). Otros estudios han determinado que variaciones en el gen CYP27B1, el cual codifica la 1- α hidroxilasa que convierte la 25-OH-vitamina D3 en 1,25- OH-vitamina D3 (forma activa de la vitamina D), son predictoras de las concentraciones de 25-hidroxitamina D3 . En uno de ellos se encontró que el alelo 'A' de CYP27B1 estaba asociado con una mayor concentración de 25-hidroxitamina D y un menor riesgo de padecer EM entre los pacientes HLA-DR15 negativos, aunque dicha asociación fue no significativa. Además, polimorfismos en el receptor y en la proteína transportadora de la vitamina D influyen en los niveles y efectos de la vitamina D, por lo que podrían suponer un factor de riesgo para el desarrollo de EM. En un reciente metaanálisis se estudió la asociación de distintos polimorfismos en los receptores de la vitamina D (FokI, TaqI, ApaI y BsmI) y el riesgo de EM (12); la conclusión fue que no parecía existir una asociación entre dichos polimorfismos y la EM. Otros estudios han encontrado un mayor riesgo de EM con la presencia del alelo "G" de DHCR7 (7-dehidrocolesterol reductasa), pues su presencia está relacionada con menores niveles de vitamina D.

La vitamina D, conocida como calciferol, es un lípido no saponificable del grupo de los esteroides. Se estima que las personas obtienen el 90% de la vitamina D mediante la exposición solar. El 10% restante se obtiene mediante la dieta, a través de alimentos como el pescado, las setas u otros que hayan sido expuestos a la radiación ultravioleta. La piel es el principal órgano productor de vitamina D por la exposición a las radiación solar, en particular a los rayos ultravioleta, los cuales provocan la conversión del 7- dehidrocolesterol en previtamina D3, que, posteriormente se isomeriza en vitamina D3.

Para que la vitamina D3 pueda ejercer su actividad biológica debe hidroxilarse en dos sitios para transformarse en 1,25-dihidroxitamina D3 (calcitriol), actuando como una hormona uniéndose a su receptor celular. La primera hidroxilación ocurre en el hígado, formándose 25-hidroxitamina D3 (colecalciferol), mientras que la segunda ocurre mayoritariamente en el riñón, transformándose en 1,25-dihidroxitamina D3.

Sin embargo, la evidencia reciente muestra que la 1,25-dihidroxitamina D3 también es generada en células del sistema inmune (linfocitos, macrófagos y células dendríticas), nervioso, cardiovascular, piel, intestino, próstata, mama y pulmón, ejerciendo efectos autocrinos o paracrinos al presentar receptores para la vitamina D. Por último, la 25-hidroxitamina D3 refleja adecuadamente el contenido de vitamina D en el organismo y es la forma que se prefiere para determinar las concentraciones de vitamina D en el organismo.

Los principales efectos de la vitamina D están relacionados con la homeostasis del calcio y del fósforo, así como con la regulación de la remodelación ósea. Sin embargo, cada vez hay mayor evidencia de su papel como inmunomodulador, pues existen receptores para la vitamina D en células del sistema inmune, por lo que entre otras acciones, la vitamina D disminuye la respuesta de linfocitos T a autoantígenos, la proliferación de linfocitos activados, células dendríticas y otras células presentadoras de antígenos, la síntesis de IgG por linfocitos B, la generación y activación de células Natural Killer, y la expresión de varias citocinas inflamatorias, como el factor de necrosis tumoral alfa y las interleucinas 1, 6, 7, 8 y 17. Por ello, está implicada en la regulación del sistema inmune y en la reducción de la inflamación, por lo que también se ha asociado a enfermedades autoinmunes como la artritis reumatoide, el lupus eritematoso sistémico o la diabetes mellitus tipo I.

Además, la vitamina D se ha relacionado con patologías tan dispares como enfermedades cardiovasculares o el cáncer, debido a su acción moduladora del sistema inmune a través de la regulación de la transcripción del ADN (13).

La latitud parece ser el principal factor que apoya la relación entre el déficit de vitamina D y el riesgo de EM, sobre todo entre los 40° y 60° de latitud norte y sur, pues la prevalencia de EM aumenta con la distancia respecto al Ecuador, donde la exposición solar es máxima. Por ello en las regiones tropicales hay una prevalencia de EM muy baja. Este gradiente está comenzando a ser menos evidente, pudiendo ser atribuido a los cambios en el estilo de vida o por la mejora del acceso a la Sanidad en países menos desarrollados y por tanto, un mayor número de diagnósticos.

Los cambios en el estilo de vida incluyen la evitación de la exposición solar y el uso de protectores solares como prevención del cáncer cutáneo, el cual se correlaciona inversamente con el riesgo de EM (14); el aumento del turismo a países más cálidos durante el invierno y el menor tiempo en el exterior, tanto en el trabajo y como en el tiempo libre. También se han producido otros cambios como el aumento de la obesidad y el hábito tabáquico, que se asocian a menores niveles de vitamina D, mientras que el enriquecimiento de los alimentos con vitamina D o dietas basadas en un alto contenido en vitamina D, se asocian a mayores niveles de vitamina D. Estos cambios de estilo de vida del mundo occidental ofrecen una explicación plausible para los cambios observados en el patrón epidemiológico de la EM. Otra posible explicación para el cambio en el gradiente de latitud es un cambio en el momento de la exposición a las infecciones en la vida temprana. De acuerdo con la hipótesis higiénica, un aumento de la exposición a las infecciones en la infancia reduce el riesgo de enfermedades autoinmunes debido al desequilibrio Th1/Th2, incluyendo posiblemente EM.

Actualmente, en los países desarrollados las mejoras en las condiciones socioeconómicas y modificaciones de estilo de vida podrían haber reducido esta exposición. Por último, en un metaanálisis se concluyó que el déficit de vitamina D es más común en el sur de Europa, Oriente Medio, India, China y Japón, y con mayor riesgo en niños, ancianos y embarazadas; sin embargo, también es fundamental el color y grosor de la piel, ya que los afroamericanos presentan menores concentraciones de vitamina D, ser mujer, la vestimenta que se use habitualmente y el nivel de urbanización.

Señalar que en algunos países como en Italia, se ha observado un gradiente inverso en cuanto a la prevalencia de EM según la latitud (15). Al ajustar la latitud según la prevalencia de alelos HLA-DRB1, el gradiente inverso se invierte, produciendo un gradiente positivo similar al resto de Europa. Esto sugiere que el gradiente inverso en Italia es debido a la distribución del HLA-DRB1 en el país. Además, en cuanto a Escandinavia, una posible explicación para el gradiente inverso en la región es la alta ingesta de vitamina D en esta región (16).

Destacar que el estudio realizado por Vukusic et al. (17) muestra la existencia de un gradiente geográfico de diferente prevalencia entre las regiones noreste, intermedia y del suroeste de Francia. La marcada oblicuidad de los ejes geográficos de estas tres zonas de regiones sugiere que no se debe simplemente a la latitud de estas regiones, sino que probablemente se deba al clima, es decir, a la exposición solar, ya que incluso la correlación entre la prevalencia de EM y exposición solar parece ser más significativa que la existente entre la prevalencia de EM y la media de la latitud. Además, a igual latitud, el riesgo de EM es menor en las regiones más soleadas.

Por ello se analizaron los niveles de vitamina D en los pacientes y se observó que los pacientes de la región del suroeste presentaban mayores niveles de vitamina D y una menor prevalencia de EM, al contrario que en la región del noreste.

Un dato llamativo es que en el hemisferio norte hay más casos de pacientes con EM nacidos en mayo y menos en los nacidos en noviembre (al contrario que en Australia). Este patrón se podría relacionar con la exposición materna a la radiación ultravioleta durante el primer trimestre de la gestación (18). Las concentraciones de vitamina D durante la gestación son importantes para el desarrollo del SNC; de hecho, en el desarrollo embrionario, los receptores de vitamina D se expresan en el neuroepitelio y, más tarde, en áreas periventriculares. Las madres que durante el embarazo consumen mayor cantidad de vitamina D parecen tener un menor porcentaje de hijos con EM. Por otro lado la infancia y la adolescencia es un período en el que la vitamina D podría desempeñar un papel crucial para el desarrollo de la EM, ya que niveles elevados de vitamina D confiere un menor riesgo de EM. Incluso la vitamina D podría tener funciones neurotróficas.

En conclusión, el motivo de elección de este tema se ha basado en los efectos de la vitamina D sobre la severidad de la EM, ya que parece existir una relación inversa entre niveles de vitamina D y la tasa de brotes de enfermedad (19), que los pacientes presenten menores niveles durante los brotes que durante la fase estable, y también previo a brotes graves que requieran ingreso, que una menor exposición solar se asocie con un mayor riesgo de progresión en pacientes con EM primaria progresiva y que los niveles bajos de vitamina D se correlacionan inversamente con la puntuación en la escala EDSS (20).

Pero hay que tener precaución en la interpretación de la relación de la vitamina D con la severidad de la EM pues pacientes con EM grave podrían tener menor movilidad y por tanto menor exposición solar.

1.1.- BIBLIOGRAFÍA MÁS RELEVANTE.

La información existente respecto a la relación entre el déficit de vitamina D y Esclerosis Múltiple es muy variada. Entre los artículos más destacados, hay uno de ellos que me ha resultado muy útil; Se trata de una revisión donde se critican las evidencias que relacionan la vitamina D con la EM desde un punto de vista epidemiológico, genético, inmunológico y terapéutico.

Se incluye una actualización de los estudios publicados más significativos que han analizado el papel de la vitamina D en la patogénesis y el tratamiento de la EM. Para explorar la asociación entre las concentraciones de vitamina D y el riesgo de EM, se revisa la evidencia disponible hasta el momento, pasando por estudios observacionales y terminando con estudios de intervención (1).

Los otros dos artículos que también me han resultado muy prácticos, hablan de la relación existente entre la distribución geográfica de la esclerosis múltiple, la exposición a la luz solar y el metabolismo de la VD. Es así como se reportó que en las regiones más lejanas al Ecuador la luz solar durante el invierno no es suficiente para que el cuerpo humano produzca una cantidad adecuada de VD, lo que origina un mayor riesgo de padecer esclerosis múltiple (EM), en personas susceptibles (10,12).

2.- OBJETIVOS DE LA INVESTIGACIÓN.

El objetivo principal del estudio fue valorar de forma retrospectiva y observacional si existe correlación entre los niveles plasmáticos de vitamina D y la evolución de la esclerosis múltiple. Para ello, se estudiará si existe correlación entre los niveles de vitamina D y tres parámetros (tasa de brotes al año, progresión de la EDSS y nuevas lesiones en T2 o captantes de Gadolinio en RMN).

3.- MATERIALES Y METODOS.

Diseño

Estudio de casos y controles.

Emplazamiento

El estudio se va a realizar en el Hospital Morales Meseguer de Murcia en la consulta monográfica de esclerosis múltiple.

Pacientes

La muestra de casos son pacientes con esclerosis múltiple recurrente – remitente según los criterios Mc donald's 2010 que hayan tenido mala evolución en los dos últimos años. Se define como mala evolución: haber tenido en los últimos dos años al menos un brote de EM, empeoramiento en el EDSS o una nueva lesión en T2 (lesión captante de GAD).

La muestra de controles son pacientes con esclerosis múltiple recurrente-remittente según los criterios Mc donald's 2010 que haya tenido buena evolución en los dos últimos años. Se define como buena evolución: No haber tenido ningún brote en los últimos dos años, no haber presentado empeoramiento en el EDSS y no presentar nuevas lesiones en T2 (lesión captante de GAD).

Mediciones

Posteriormente, de forma retrospectiva, se recogieron los niveles de vitamina D obtenidos en los últimos dos años, ya que según la literatura médica los niveles de vitamina D influyen en la evolución de la EM, por ese motivo se solicitan analíticas de control con dichos parámetros en estos pacientes. Todas las determinaciones se realizaron en el laboratorio del hospital con las mismas especificaciones técnicas.

Variables

-EDSS (Expanded Disability Status Scale): variable cualitativa nominal. Kurtzke desarrolló una escala de disfunción neurológica que puntúa el deterioro de 0 (normal) a 10 (fallecido), con intervalos de 0,5 puntos. La puntuación se obtiene de la valoración cuantitativa de las alteraciones neurológicas según una escala de sistemas funcionales (función piramidal, cerebelosa, del tronco cerebral, sensitiva, del intestino y vejiga, visual y mental). Se considera discapacidad moderada una puntuación mayor de 3, y a partir de un EDSS de 4 el deterioro viene marcado por la capacidad de deambulación. Esta escala es la utilizada, en clínica y en investigación, para medir la afectación clínica por EM.

-Tab (Tasa Anual de Brotes): Variable cuantitativa discreta. Número de alteraciones neurológicas típicas de una inflamación aguda desmielinizante del SNC en un periodo de un año, informada por el paciente u observada por el médico, de al menos 24 horas de duración, en ausencia de fiebre o infección. El brote de EM debe ser corroborado por los resultados del examen neurológico, potenciales evocados visuales en aquellos que refieren alteración visual o RMN consistente al área de desmielinización en el SNC que refería el paciente.

-Lesiones en RMN cerebral: Variable cuantitativa discreta. Se realizará una comparación entre la última RMN y la realizada dos años antes. Así se comprobará si se ve aumento en la secuencia de T2 y T1 más GAD.

-Vitamina D: Variable cuantitativa discreta. Valores de referencia y orientación clínica (Schmidt-Gayk, 1998; Limbach et al 1996/7):

*Rango normal (verano): 20-120 ng/ml.

*Deficiencia moderada (invierno): 10-30 ng/ml.

*Deficiencia intermedia: 4-10 ng/ml.

*Deficiencia severa: < 4 ng/ml.

VARIABLE	TIPO DE VARIABLE	RANGO DE VALORES	UNIDADES
EDSS	Cuantitativa nominal	(Anexo I)	grado
Tab	Cuantitativa discreta	(No tiene rango)	n / año
Lesiones RMN cerebral	Cuantitativa discreta	(No tiene rango)	n
Vitamina D	Cuantitativa discreta	*Rango normal (verano): 20-120 ng/ml. *Deficiencia moderada (invierno): 10-30 ng/ml. *Deficiencia intermedia: 4-10 ng/ml. *Deficiencia severa: <4 ng/ml.	ng/ml

Cálculo de tamaño muestral

Vamos a comparar los niveles de vitamina D entre dos grupos, los casos y controles, y como es una variable cuantitativa, compararemos dos medias. Hay que tener en cuenta que la prevalencia de Esclerosis Múltiple en la Región de Murcia es de 70 casos por cada 100.000 habitantes, por lo tanto, en el área de salud VI habría aproximadamente 200 pacientes con EM.

Lo que queremos calcular es el tamaño de muestra necesario para detectar diferencias de 5 mg/ml ($d=5$) entre los 2 grupos, con una varianza de 69 ($s^2=69$), una confianza del 95% (por tanto error alfa del 5% y entonces $Z_{\alpha}=1,96$) y una potencia del 90% (por tanto error beta del 10% y entonces $Z_{\beta}=1,282$). Si sustituimos dichas cifras en la formula que se indica abajo obtenemos un tamaño de 58 pacientes en cada grupo. Si aumentamos un 10% por posibles pérdidas serán 64 en cada grupo.

$$n = \frac{2(Z_{\alpha} + Z_{\beta})^2 * S^2}{d^2}$$

Análisis estadístico

En cuanto al análisis estadístico, los datos se resumirán mediante estadísticos descriptivos: Las variables cuantitativas se describirán con medidas de tendencia central (media) y dispersión (mediana, rango y desviación estándar), y las variables cualitativas con frecuencias absolutas (N) y relativas (%).

Primero se comprobará si las variables tienen una distribución normal mediante la prueba de Normalidad Kolmogorov –Smirnov. Posteriormente, se comparará las variables cuantitativas mediante tests paramétricos (t-Student) en el caso de que presenten una distribución normal, y tests no paramétricos (Mann-Whitney o Wilcoxon) cuando presenten una distribución no normal. Se utilizará la prueba de la Chi-cuadrado (o exacta de Fisher cuando no se cumplen las condiciones de aplicación) para las variables cualitativas, utilizando un nivel de significación <0.05 .

4.- CALENDARIO PREVISTO PARA EL ESTUDIO.

FASES DEL ESTUDIO:

- 1.- Fase preliminar: diciembre 2017
- 2.- Identificación del problema: diciembre 2017
- 3.- Revisión bibliográfica: enero 2018
- 4.- Análisis de pertenencias: febrero 2018
- 5.- Planificación: marzo 2018
- 6.- Introducción: marzo 2018
- 7.-Objetivos: abril 2018
- 8.- Diseño metodológico: mayo 2018
- 9.- Ejecución: junio 2018
- 10.- Recogida y procesado de datos: julio 2018-octubre 2018
- 11.- Análisis de datos: noviembre 2018- enero 2019
- 12.- Interpretación: marzo 2019

	FP	IP	RB	AP	P+I	O	DM	E	RyPD	AD	In
Diciembre 2017	█	█									
Enero 2018			█								
Febrero 2018				█							
Marzo 2018					█						
Abril 2018						█					
Mayo 2018							█				
Junio 2018								█			
Julio 2018									█		
Agosto 2018									█		
Septiembre 2018									█		
Octubre 2018									█		
Noviembre 2018										█	
Diciembre 2018										█	
Enero 2019										█	
Febrero 2019											█
Marzo 2019											█

Cronograma: FP: fase preliminar. IP: identificación del problema. RB: revisión de la bibliográfica. AP: análisis de pertenencia. P: planificación. I: introducción. O: objetivos. DM: diseño metodológico. E: ejecución. RyPD: recogida y procesamiento de los datos. AD: Análisis de los datos. In: interpretación

5.- LIMITACIONES Y POSIBLES SESGOS

Es un estudio retrospectivo observacional que se realizará utilizando los datos informáticos presentes en Selene del Área VI, sin necesidad de valorar personalmente al paciente, por lo tanto, la principal causa de sesgos, aunque de mínima importancia y difícil eliminación, sería la falta de alguno de los datos en el historial de los pacientes.

Teniendo en cuenta que la prevalencia de la Esclerosis Múltiple en la Región de Murcia es de 70 casos por cada 100.000 habitantes, no debería ser un problema alcanzar la muestra necesaria.

6.- PROBLEMAS ÉTICOS

Antes de comenzar el estudio se solicitará la aprobación del Comité Ético de Investigación de la región de Murcia. Los datos personales de los pacientes serán recopilados respetando la Ley Orgánica 15/1999 de 13 de diciembre de Protección de Datos de Carácter Personal, Publicado en BOE núm. 298 de 14 de Diciembre de 1999. Los participantes en esta investigación se les aportará la información oportuna, y en el caso de que estén de acuerdo con lo expuesto, firmaran el consentimiento informado.

7.- ORGANIZACIÓN DEL ESTUDIO

El investigador principal del estudio es la Dra. Teresa Segura, MIR-Medicina Familiar y Comunitaria en el Hospital Morales Meseguer de Murcia ,que realizará la recogida de datos, análisis e interpretación de los resultados.

8.- PRESUPUESTO

La investigadora realizará el estudio de forma voluntaria, por lo tanto, eso no supondrá ningún gasto económico.

Se solicitará una beca para recaudar los fondos necesarios. En caso de que no sea concedida, los investigadores se encargarán del gasto en fotocopias para consentimientos informados, gastos para la asistencia y presentación a congresos, y la publicación de resultados en revistas científicas, si fuera necesario.

- Gasto de fotocopias de consentimientos informados: 20 euros
- Presentación del estudio en el Congreso Nacional de Medicina de Familia (semfyc) o de Neurología (SEN)
- Inscripción -> 600 euros.
- Transporte ->200 euros.
- Dietas ->150 euros.
- Alojamiento ->400 euros.
- Publicación de resultados en revista open access ->1500 euros
- TOTAL: 2870

8.- BIBLIOGRAFÍA.

1. Ebers G. Prognostic factors for multiple sclerosis: The importance of natural history studies. *J Neurol.* 2005; 252 Suppl 3:iii15–20.
2. Benito-León J, Mitchell AJ, Rivera-Navarro J, Morales- González JM. Impaired health- related quality of life predicts progression of disability in multiple sclerosis. *Eur J Neurol* 2013; 20: 79-86.
3. Ó. Fernández Fernández, A. Saiz. Enfermedades desmielinizantes del sistema nervioso central. En: C. Rozman, director. Farreras Rozman Medicina Interna 17a Edición. Barcelona: Elsevier España; 2012. 1353-1361.
4. Gale CR, Martyn CN. Migrant studies in multiple sclerosis. *Prog Neurobiol* 1995; 47: 425– 48.
5. Disanto G, Pakpoor J, Morahan JM, Hall C, Meier UC, Giovannoni G, et al. Epstein–Barr virus, latitude and multiple sclerosis. *Mult Scler* 2013; 19: 362-5.
6. Hauser SL, Waubant E, Arnold DL, Vollmer T, Antel J, Fox RJ, et al. B-cell depletion with rituximab in relapsing-remitting multiple sclerosis. *N Engl J Med* 2008; 358: 676–88.
7. Acheson ED, Bachrach CA, Wright FM. Some comments on the relationship of the distribution of multiple sclerosis to latitude, solar radiation, and other variables. *Acta Psychiatr Scand* 1960; 35: 132-47.
8. Becklund BR, Severson KS, Vang SV, Deluca HF. UV radiation suppresses experimental autoimmune encephalomyelitis independent of vitamin D production. *Proc Natl Acad Sci USA* 2010; 107: 6418–6423.

9. Mahon BD, Gordon SA, Cruz J, Cosman F, Cantorna MT. Cytokine profile in patients with multiple sclerosis following vitamin D supplementation. *J Neuroimmunol* 2003; 134:128-132.
10. De la Fuente AG, Errea O, van Wijngaarden P, Gonzalez GA, Kerninon C, Jarjour AA, et al. Vitamin D receptor-retinoid X receptor heterodimer signaling regulates oligodendrocyte progenitor cell differentiation. *J Cell Biol* 2015; 211: 975-85.
11. Ramagopalan SV, Maugeri NJ, Handunnetthi L, Lincoln MR, Orton SM, Dymont DA, et al. Expression of the multiple sclerosis-associated MHC class II Allele HLA-DRB1*1501 is regulated by vitamin D. *PLoS Genet* 2009; 5: e1000369.
12. Huang J, Xie ZF. Polymorphisms in the vitamin D receptor gene and multiple sclerosis risk: a meta-analysis of casecontrol studies. *J Neurol Sci* 2012; 313: 79-85.
13. Hart PH, Gorman S, Finlay-Jones JJ. Modulation of the immune system by UV radiation: more than just the effects of vitamin D? *Nat Rev Immunol* 2011; 11:584–96.
14. Alonso A, Hernan MA. Temporal trends in the incidence of multiple sclerosis: a systematic review. *Neurology* 2008; 71: 129-35.
15. Simpson S Jr, Blizzard L, Otahal P, Van der Mei I, Taylor B. Latitude is significantly associated with the prevalence of multiple sclerosis: a meta-analysis. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 2011; 82: 1132-41.
16. Kampman MT, Brustad M. Vitamin D. A candidate for the environmental effect in multiple sclerosis-observations from Norway. *Neuroepidemiology* 2008; 30: 140-6.

17. Vukusic S, Van Bokstael V, Gosselin S, Confavreux C. Regional variations of multiple sclerosis prevalence in French farmers. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 2007; 78: 707–9.
18. Staples J, Ponsonby AL, Lim L. Low maternal exposure to ultraviolet radiation in pregnancy, month of birth, and risk of multiple sclerosis in offspring: longitudinal analysis. *BMJ* 2010; 340: c1640.
19. Soilu-Hänninen M, Airas L, Mononen I, Heikkilä A, Viljanen M, Hänninen A. 25- hydroxyvitamin D levels in serum at the onset of multiple sclerosis. *Mult Scler* 2005; 11: 266- 71.
20. Neau JP, Artaud-Uriot MS, Lhomme V, Bounaud JY, Lebras F, Boissonnot L, et al. Vitamin D and multiple sclerosis. A prospective survey of patients of poitou-charentes area. *Rev Neurol (Paris)* 2011; 167: 317-323.

ANEXO 1: Escala EDSS de Kurtzke

SISTEMA FUNCIONAL VISUAL
0. Normal
1. Papiledema/pequeño escotoma/agudeza visual (AV) corregida en el peor ojo $<20/20$ (1.0) y $>20/30$ (0.67)
2. Peor ojo con agudeza visual de $20/30$ a $20/59$ (0.67-0.34)
3. Peor ojo con escotoma grande/alteración campimétrica moderada/AV corregida $20/60$ a $20/99$ (0.33-0.21)
4. Peor ojo con marcada disminución de campos y/o agudeza visual (corregido) de $20/100$ del $20/200$ (0,2-0,1); grado 3 más agudeza máxima de ojo mejor de $20/60$ (0.33) o menos.
5. Peor ojo con AV de $<20/200$ (0,1) // Grado 4 + la AV del mejor ojo $20/60$ (0.33) o menos.
6. Grado 5 + AV del ojo mejor de $20/60$ (0.33) o menos
SISTEMA FUNCIONAL TRONCO-ENCEFALO
0. Normal
1. Sólo signos
2. Nistagmo moderado o alteración de MOE y/o otra alteración leve (2)
3. Nistagmo severo y/o empeoramiento grave de la motilidad ocular o discapacidad moderada de otros nervios craneales.
4. Disartria marcada u otra discapacidad grave/marcada
5. Incapaz de tragar o habla

SISTEMA FUNCIONAL PIRAMIDAL

0. Normal
1. Signos anormales sin discapacidad.
2. Discapacidad mínima: fatigabilidad o limitación en actividades extenuantes (rendimiento motor de grado 1) y / o BMRC de 4 en uno o dos grupos musculares.
3. Paraparesia leve a moderada o hemiparesia: BMRC 4 en más de 2 grupos musculares; y / o de grado 3 en uno o dos grupos musculares ; y / o hemiparesia severa: BMRC grado 2 o menos en un grupo muscular
4. Marcados paraparesia o hemiparesia: BMRC de 2 en dos extremidades o monoplejía con BMRC grado 0 o 1 en una extremidad; y / o tetraparesia moderada: BMRC grado 3 en tres o más miembros.
5. Paraplejía: BMRC grado 0 ó 1 en todos los grupos musculares de los miembros inferiores; y / o marcada tetraparesia: BMRC grado 2 o menos en tres o más miembros; y / o hemiplejía;
6. Tetraplejía: BMRC grado 0 ó 1 en todos los grupos musculares de extremidades superiores e inferiores

FUNCIONES CEREBELOSAS

0. Normales
 1. Signos anormales sin discapacidad
 2. Ataxia leve y / o ataxia moderada en test de Romberg) y / o tándem imposible
 3. Ataxia moderada de extremidades y / o ataxia de la marcha moderada o grave / ataxia troncal
 4. Ataxia severa de la marcha / ataxia troncal y ataxia severa en tres o cuatro extremidades.
 5. Incapaz de realizar movimientos coordinados debido a la ataxia.
- X = debilidad piramidal (BMRC grado 3 o peor en fuerza de las extremidades) o déficits sensoriales que interfieren con las pruebas cerebelosas

FUNCIONES SENSORIALES

0 . Normales

1. Sólo signos en una o dos extremidades
2. Disminución leve de la sensibilidad táctil o algésica o propioceptiva o disminución moderada de la vibratoria en uno o dos miembros; o “sólo signos” en más de dos extremidades
3. Disminución moderada del tacto o el dolor o la propiocepción o marcada reducción de la sensibilidad vibratoria en una o dos extremidades; y / o una disminución leve en el tacto o el dolor o disminución moderada en todas las pruebas propioceptiva en más de dos extremidades
- 4 . Disminución “marcada” del tacto o dolor en 1-2 miembros; y / o disminución moderada del tacto o el dolor y / o marcada reducción de la propiocepción en más de dos extremidades
5. Pérdida de la sensibilidad en uno o dos miembros; y / o disminución moderada del tacto o el dolor y / o marcada reducción de la propiocepción la mayor parte del cuerpo por bajo la cabeza
- 6 . Pérdida de sensibilidad caudal a la cabeza

FUNCIONES INTESTINALES Y GENITOURINARIAS

0. Normales

1. Vacilación urinaria leve, urgencia y / o estreñimiento
2. Moderado retención urinaria y / o moderada urgencia urinaria / incontinencia
y / o disfunción intestinal moderada.
3. Incontinencia urinaria frecuente o intermitente auto-cateterización; necesita enemas o medidas manuales para evacuar las heces
4. Necesidad de cateterismo casi constante
5. Pérdida de la función de los esfínteres; catéter externo o mora
6. Pérdida de la función intestinal y vesical.

FUNCIONES CEREBRALES

0. Normales
1. Sólo signos de deterioro cognitivo; fatiga leve
2. Leve deterioro cognitivo; fatiga moderada o grave
3. Moderado deterioro cognitivo
4. Deterioro cognitivo importante
5. Demencia

DEAMBULACIÓN-MARCHA

0. Deambulación sin restricciones
1. Completamente ambulante
2. Camina más de 300 metros pero menos de 500 sin ayuda o apoyo (EDSS 4.5-5)
3. Camina más de 200 metros pero menos de 300 sin ayuda o apoyo (EDSS 5)
4. Camina más de 100 metros pero menos de 200 sin ayuda o apoyo (EDSS 5.5)
5. Camina menos de 100 m sin asistencia (EDSS 6.0)
6. Camina con apoyo unilateral más de 50 metros (EDSS 6.0)
7. Camina con apoyo bilateral más de 120 metros (EDSS 6)
8. Camina con apoyo unilateral menos de 50 metros (EDSS 6.5)
9. Camina con apoyo bilateral más de 5 metros pero menos de 120 (EDSS 6.5)
10. Uso de la silla de ruedas sin ayuda; incapaz de caminar 5 metros incluso con ayuda; no necesita ayuda para las transferencias . En silla unas 12 h al día. (EDSS 7.0)
11. Uso de la silla de ruedas con ayuda, incapaz de dar más de unos pasos; restringido a la silla de ruedas; puede necesitar ayuda en las transferencias. (EDSS 7.5)

12. Fundamentalmente, vida cama-sillón; encamado la mayor parte del día. (EDSS 8.0)