ESTUDIO DE LOS MECANISMOS FISIOPATOLÓGICOS QUE JUEGAN UN PAPEL IMPORTANTE EN LAS FORMAS PROGRESIVAS DE EM.

PROYECTO COORDINADO QUE OPTA AL PREMIO CONCEDIDO POR LA RED ESPAÑOLA DE ESCLEROSIS MÚLTIPLE PARA LA INVESTIGACIÓN EN EM PRIMARIAMENTE PROGRESIVA.

Investigadora coordinadora del proyecto y del subproyecto 1: LUISA MARÍA VILLAR GUIMERANS. Hospital Universitario Ramón y Cajal. Madrid.

Investigador coordinador del subproyecto 2: MANUEL COMABELLA LÓPEZ. CEMCAT. Hospital Universitario Vall d'Hebron. Barcelona.

Investigador coordinador del subproyecto 3: ROBERTO ÁLVAREZ LAFUENTE. Hospital CLÍNICO Universitario San Carlos. Madrid.

Investigadora coordinadora del subproyecto 4: ESTER QUINTANA CAMPS. Instituto de Investigación Biomédica de Girona (IDIBGI). Gerona.

Investigador coordinador del subproyecto 5: DIEGO CLEMENTE LÓPEZ. Hospital Nacional de Parapéjicos. Toledo.

Investigadora coordinadora del subproyecto 6: CARMEN GUAZA RODRÍGUEZ. Instituto Cajal. CSIC: Madrid.

Investigadora coordinadora del subproyecto 7: CARMEN ESPEJO RUIZ. CEMCAT. Hospital Universitario Vall d'Hebron. Barcelona.

ANTECEDENTES

La esclerosis múltiple (EM) es una enfermedad desmielinizante del sistema nervioso central (SNC) que presenta desmielización, inflamación y daño axonal. La forma clínica más frecuente es la EM remitente-recurrente (EMRR) (85% de casos), con brotes clínicos de disfunción neurológica, atribuidos a nuevas lesiones inflamatorias desmielinizantes en el SNC, seguidos en la mayoría de casos de periodos de recuperación clínica o remisión. La mayoría de estos pacientes desarrollará tras 15-20 años una forma secundaria progresiva (EMSP), caracterizada por un aumento de discapacidad neurológica independiente de la presencia de brotes. En un 10-15% de pacientes, la progresión está presente desde estadios iniciales de la enfermedad (forma primariamente progresiva, EMPP).

Se ha demostrado que la respuesta inmune adaptativa juega un papel muy importante en las fases iniciales de la EMRR (1). Se han encontrado infiltrados de linfocitos T (Sobre todo CD8+) y B junto con macrófagos y microglía en las lesiones. Así, gran parte de la neurodegeneración inicial en la EM se produce por la inflamación originada por dicha respuesta (1). Existen evidencias que sugieren que esta respuesta autoinmune puede deberse a una interacción de factores genéticos y ambientales. La predisposición a padecer EM se asocia a polimorfismos en una serie de genes, la mayoría de los cuales codifican moléculas asociadas a la respuesta inmune (2). La mayor asociación se produce con el HLA-DR15.01. Entre los factores de riesgo ambientales que más se han asociado con la EM están la infección previa por el virus de Epstein Barr, el hábito tabáquico, alta ingesta de sal y niveles bajos de vitamina D. La proliferación de clones autorreactivos podría asociarse a un déficit de células reguladoras. De hecho, parte del efecto terapéutico de los inmunomoduladores parece deberse al aumento que producen sobre las células B, T y NK reguladoras (3).

Tras los primeros años de la enfermedad, la inflamación asociada a la respuesta adaptativa parece ir disminuyendo en parte de los pacientes con EMRR, y a partir de los 40 años, la evolución clínica no parece asociarse en estos pacientes, con la respuesta adaptativa. Los mecanismos asociados con la EM en esta segunda fase de la enfermedad se desconocen, pero una serie de datos sugieren una preponderancia de la respuesta inmune innata confinada en el sistema nervioso central (4,5), sin que se sepa aún los factores que desencadenan estos cambios.

Las formas progresivas de la EM se han dividido en la nueva clasificación de la enfermedad en base a la existencia de actividad (brotes y nuevas lesiones en la resonancia craneal (RNM) y/o

progresión (6). Se ha sugerido que las formas inflamatorias de la EM progresiva podrían compartir, al menos en parte, los mecanismos inflamatorios de la EMRR y ser susceptibles de ser tratados con fármacos eficaces en estas formas de EM (7,8). Los mecanismos implicados en la patogenia de las formas progresivas con bajo componente inflamatorio aún se desconocen, aunque también se ha implicado a la respuesta inmune innata (9).

Distintos datos avalan que los linfocitos B juegan un papel importante en las formas altamente inflamatorias de EM. Un número alto de linfocitos B en LCR se asocia con mayor actividad de la enfermedad en la forma RR (10,11). Además se ha descrito la presencia de folículos linfoides ectópicos en las meninges en un porcentaje alto de pacientes que se asocian a la aparición de lesiones corticales. Se sugiere que los productos sintetizados en esos folículos linfoides (citoquinas y anticuerpos entre otros) causan dicha patología cortical desde la zona subpial hallazgos que se asocian a discapacidad y déficit cognitivo (12,13) ya desde fases muy iniciales de la EM (13). Parte del mecanismo patogénico de los linfocitos B puede estar mediado por anticuerpos. Los anticuerpos se unen a los axones en las lesiones activas y a los oligodendrocitos en la sustancia blanca aparentemente normal e inducen la fijación del complemento lo que demuestra su papel en la patogenia de la enfermedad (14). La síntesis intratecal (SIT) de IgG es característica de la EM, y constituye una herramienta útil para el diagnóstico diferencial (15). La SIT de IgG tiene, además valor pronóstico pues las bandas oligoclonales (BOCG) predicen el desarrollo de EM en pacientes con un síndrome desmielinizante aislado (SNA) (16). Además, la síntesis intratecal de IgM, demostrada por la presencia de BOC de IgM en LCR, y sobre todo las BOC de IgM frente a lípidos, predicen una peor evolución de la EM (11), y se asocian con mayor inflamación, mayor discapacidad y volumen lesional (17). Además la presencia de estos anticuerpos identifica a los pacientes con formas inflamatorias de EMPP potencialmente tratables con los fármacos eficaces en las formas en brotes (8). Estos datos muestran que independientemente del curso clínico, las formas altamente inflamatorias comparten mecanismos comunes en la EM.

La respuesta innata está muy implicada en la patogenia de las formas progresivas de la EM (18) que presentan una amplia desmielinización y neurodegeneración cortical (19) mediada directa o indirectamente por la activación de la microglía en la sustancia blanca aparentemente normal. Esto origina stress oxidativo, disfunción mitocondrial y acúmulo de hierro que da lugar a lesión neuronal y progresión de la discapacidad (9, 20). La microglía representa una población de macrófagos residentes en el SNC que se genera a partir de los monocitos que migran al SNC en etapas tempranas del desarrollo, aunque dicha migración también puede

darse incluso en la edad adulta (21). Al activarse en respuesta a lesiones, inflamación o infecciones, la microglía aumenta la expresión de marcadores de superficie típicamente asociados a macrófagos como F4/80 y Mac-1. El estímulo específico involucrado en su activación (citocinas, agonistas de receptores de tipo Toll) determina el fenotipo funcional que va a presentar la microglía que puede ser proinflamatorio (fenotipo M1) o antiinflamatorio y asociado al remodelado de tejidos y cicatrización (fenotipo M2) (22). Estos fenotipos, que están asociados a programas transcripcionales específicos, representan los extremos de un espectro de posibles fenotipos interconvertibles in vivo. La activación de células de microglía y macrófagos produce citocinas, quimiocinas y metabolitos que regulan directa e indirectamente la neurodegeneración en la EM. La quimiocina CCL-2 producida por microglía activada, por ejemplo, afecta a la integridad de la barrera hematoencefálica y atrae macrófagos periféricos al SNC. A su vez, una vez reclutados al SNC, los macrófagos pueden adquirir también un fenotipo proinflamatorio (M1) que promueve la neurodegeneración. La microglía y los macrófagos M1 producen las citocinas IL-12 e IL-23, las cuales contribuyen a la diferenciación de células Th1 y Th17, respectivamente. Además, las células de la microglía y los macrófagos expresan moléculas MHC de clase I y II junto con moléculas coestimulantes CD40, CD80 y CD86, lo que les permite reactivar células T en el SNC, induciendo la propagación de epítopos y la diferenciación de células patogénicas Th1 y Th17 que puede reclutar neutrófilos y activar a los astrocitos y microglía. La microglía y los macrófagos producen también moléculas con directa actividad neurotóxica. El TNF- α induce apoptosis en neuronas y también actúa en forma autocrina para promover la secreción de glutamato, incrementando la muerte neuronal causada por excitotoxicidad (24). La IL-1β también tiene actividades neurotóxicas e induce la producción de óxido nítrico. El óxido nítrico producido por la microglía y los macrófagos, junto con especies reactivas de oxígeno, interfiere directamente con la actividad mitocondrial de las neuronas. A su vez, los axones desmielinizados tienen mayores necesidades energéticas que deben ser cubiertas incrementando la actividad de las mitocondrias. La combinación de un incremento en la demanda energética con una disminución en la función mitocondrial lleva a la muerte neuronal, por un proceso que ha sido denominado "hipoxia virtual" secundaria a los procesos comentados (23). Debido a lo anterior, en estos casos hay un aumento de peroxidación lipídica y formación de isoprostanos como la 8-Iso-prostaglandina F2a, biomarcador de peroxidación lipídica y stress oxidativo in vivo (24). Recientemente se ha descrito que los astrocitos, activados en la EM (25) pueden sintetizar CCL-2 y lactosilceramida ampliando la respuesta innata al atraer y activar monocitos y microglía favoreciendo la neurodegeneración (26).

SITUACIÓN ACTUAL

A pesar de los datos anteriormente citados, hasta ahora se desconocen los mecanismos inmunológicos que juegan un papel preponderante en las formas con alta y baja actividad inflamatoria de la EMPP. Esto reviste alto interés clínico para identificar a los pacientes con alta probabilidad de ser respondedores a los fármacos que ya están aprobados para esta forma de EM, y para identificar nuevas dianas para ambas formas de EMPP.

El proyecto actual propone la identificación de los factores inmunológicos y ambientales que juegan un papel preponderante en distintos tipos de EMPP. Para ello se estudiarán muestras de sangre, LCR y cortes de tejido obtenidos a partir de necropsias de pacientes. También estudiaremos la utilidad de nuevas dianas terapéuticas, sobre todo relacionadas con la respuesta innata, en distintos modelos experimentales de la enfermedad.

BIBLIOGRAFÍA

1. Frischer JM y col.The relation between inflammation and neurodegeneration in multiple sclerosis brains. Brain 2009; 132:1175-89.

2. The International Multiple Sclerosis Genetics Consortium* & the Wellcome Trust Case Control Consortium 2. Genetic risk and a primary role for cell-mediated immune mechanisms in multiple sclerosis. Nature 2011; 476: 214-219.

3. Martínez-Rodríguez JE, et al. Natural killer cell phenotype and clinical response to interferon-beta therapy in multiple sclerosis. Clin Immunol. 2011; 141:48-56.

4. McFarland HF y Martin R. Multiple sclerosis: a complicated picture of autoimmunity. Nat Immunol 2007; 8: 913-19

5. Lassmann H y col Progressive multiple sclerosis: pathology and pathogenesis. Nat Rev Neurol 2012; 647-656.

6. Lublin FD y col. Defining the clinical course of multiple sclerosis The 2013 revisions. Neurology 2014; 83:278 -286.

7. Hawker K, et al. Rituximab in Patients with Primary Progressive Multiple Sclerosis. Results of a Randomized Double-Blind Placebo-Controlled Multicenter Trial. Ann Neurol 2009; 66: 460 - 471.

8. Villar y cols Immunoglobulin M oligoclonal bands: biomarker of targetable inflammation in primary progressive multiple sclerosis. Ann Neurol. 2014; 76:231-240.

9. Mahad DH y col Pathological mechanisms in progressive multiple sclerosis. Lancet Neurol 2015; 14: 183 -193.

10. Cepok S, Rosche B, Grummel V, et al. Short-lived plasma blasts are the main B cell effector subset during the course of multiple sclerosis. Brain 2005; 128: 1667-76.

11. Villar y col Intrathecal synthesis of oligoclonal IgM against myelin lipids predicts an aggressive disease course in MS. J Clin Invest 2005; 115: 187 -94.

12. Magliozzi R y cols Meningeal B-cell follicles in secondary progressive multiple sclerosis associate with early onset of disease and severe cortical pathology. Brain 2007; 130, 1089-1104.

13. Mainero C y cols. A gradient in cortical pathology in multiple sclerosis by in vivo quantitative 7T imaging. Brain 2015; 138:932-945.

14. Sádaba MC, et al. Axonal and oligodendrocyte-localized IgM and IgG deposits in MS lesions. J Neuroimmunol. 2012; 247: 86-94.

15. Álvarez-Cermeño JC y Villar LM. Multiple sclerosis: Oligoclonal bands-a useful tool to avoid MS misdiagnosis. Nat Rev Neurol. 2013; 9: 303-304.

16. Masjuan J y cols. Clinically isolated syndromes. A new oligoclonal band test accurately predicts conversion to MS. Neurology 2006; 66:576 -8.

17. Boscá I y col Response to interferon in multiple sclerosis is related to lipid-specific oligoclonal IgM bands. Mult Scler 2010; 16: 810-5.

18. Lassmann H y col Progressive multiple sclerosis: pathology and pathogenesis. Nat Rev Neurol 2012; 8: 647-656

19. Kutzeinigg A y cols. Cortical demyelination and diff use white matter injury in multiple sclerosis. Brain 2005; 128: 2705 -12.

20. Fischer MT y col Disease-specific molecular events in cortical multiple sclerosis lesions. Brain 2013; 136:1799 -1815.

21. Mantovani A y col Macrophage plasticity and polarization in tissue repair and remodeling. J Pathol 2013;229: 176-185

22. Takeuchi H y col Tumor necrosis factor-alpha induces neurotoxicity via glutamate release from hemichannels of activated microglia in an autocrine manner. J Biol Chem 2008

23. Trapp BD, Stys PK. Virtual hypoxia and chronic necrosis of demyelinated axons in multiple sclerosis. Lancet Neurol 2009; 8: 280-291.

24. Mir F y col CSF isoprostane levels are a biomarker of oxidative stress in multiple sclerosis. Neurol Neuroimmunol Neuroinflammation 2014; 1:e21; doi: 10.1212/NXI.

25. Cantó E y cols. Chitinase 3-like 1: prognostic biomarker in clinically isolated síndromes. Brain 2015 Feb 13. pii: awv017. [Epub ahead of print]

26. Mayo L y cols. Regulation of astrocyte activation by glycolipids drives chronic CNS inflammation. Nat Med 2014; 20: 1147-56.

PLAN DE ACCIÓN

PACIENTES

Estudio transversal y prospectivo de pacientes diagnosticados de EMPP según criterios de McDonald 2010 estudiados en Hospitales que pertenecen a la Red Española de Esclerosis Múltiple y/o colaboran en el Plan Estratégico de la esclerosis múltiple de la Comunidad de MAdrid (Ramón y Cajal, Gregorio Marañón, La Princesa, Getafe, Clínico San Carlos, Puerta de Hierro, Alcalá de Henares y 12 de Octubre) y concedan su consentimiento informado. Esperamos obtener muestras de al menos 50 pacientes con EMPP. Pretendemos estudiar la relación del curso clínico de los pacientes con una serie de factores inmunológicos, ambientales y epidemiológicos. Se recogerán datos clínicos (Edad, edad de comienzo de la EM, discapacidad medida por las escalas EDSS y MSSS), epidemiológicos (Índice de masa corporal, ingesta de sal, exposición al sol, tabaquismo, lugar de nacimiento y residencia, historia de infecciones en la infancia etc.) y de imagen (Carga lesional en T1, T2, lesiones captantes).

MUESTRAS Las muestras se obtendrán como parte del estudio clínico habitual de los pacientes. Tras obtener consentimiento informado, se usará el material sobrante en este estudio. Se obtendrán muestras de LCR y sangre periférica extraídas en el estudio rutinario para el diagnóstico o seguimiento de los pacientes. Las muestras de LCR y suero se alicuotarán y almacenarán a -80ºC hasta su procesamiento. Las células mononucleares de sangre periférica se obtendrán mediante gradiente de densidad y se procesarán como se indica en cada subproyecto.

ESTUDIOS INMUNOLÓGICOS EN LCR

Síntesis intratecal de inmunoglobulinas: Se cuantificarán la IgG e IgM en LCR y suero mediante nefelometría en un nefelómetro Immage (Beckmann). Se calcularán los índices de IgG e IgM que dan un valor semicuantitativa de la producción intratecal de inmunoglobulinas. Las cadenas ligeras libres en LCR y suero se medirán por turbidimetría en un turbidímetro Spa-Plus (Binding Site). La presencia de BOC de IgG, BOC de IgM totales, el mejor marcador para detectar la síntesis intratecal de inmunoglobulinas, se estudiará mediante isoelectroenfoque e inmunodetección según los métodos puestos a punto por el grupo del Hospital Ramón y Cajal. Las BOC de IgM lípido específicas se estudiarán mediante isoelectroenfoque e inmunoadsorción sobre membranas tapizadas con lípidos, y western blot Según técnicas descritas por el grupo del Hospital Ramón y Cajal.

ESTUDIOS EN SUERO Y EN SANGRE PERIFÉRICA

SUBPROYECTO 1.

ESTUDIO DE LA RESPUESTA INMUNE INNATA Y ADAPTATIVA EN LA EMPP.

Investigadora principal: Luisa María Villar Guimerans. Jefa de Servicio de Inmunología. Hospital Universitario Ramón y Cajal.

Miembros del equipo investigador

Silvia Medina Heras. Investigadora contratada. Instituto Ramón y Cajal de Investigación Sanitaria.

Amalia Tejeda Velarde. Investigadora contratada. Instituto Ramón y Cajal de Investigación Sanitaria.

José Ignacio Fernández Velasco. Residente de Inmunología. Hospital Universitario Ramón y Cajal.

Eulalia Rodríguez Martín. Adjunto de Inmunología. Hospital Universitario Ramón y Cajal.

Lucienne Costa Frossard. Adjunto de Neurología. Hospital Universitario Ramón y Cajal.

Susana Sainz de la Maza Cantero. Adjunto de Neurología. Hospital Universitario Ramón y Cajal.

Enric Monreal Laguillo. Adjunto de Neurología. Hospital Universitario Ramón y Cajal.

Introducción

Distintos trabajos recientes avalan que el perfil leucocitario en sangre periférica se asocia con la actividad de la EM. Esto se ha demostrado principalmente en estudios de respuesta a fármacos donde se observa que la disminución de la producción de citoquinas proinflamatorias por los linfocitos B y T, así como el aumento de algunas poblaciones reguladoras se asocian con una remisión de alta calidad de la enfermedad (NEDA, de "non evidence of disease activity"). En este trabajo nos proponemos estudiar la relación entre las subpoblaciones leucocitarias en sangre periférica y la actividad de la enfermedad en la EMPP. En caso de disponer de LCR, también se compararán los resultados con la presencia de bandas oligoclonales de IgM y con las subpoblaciones leucocitarias en LCR.

Objetivos

1. Estudiar subpoblaciones leucocitarias en pacientes con EMPP. Correlación con la clínica
2. Estudio de marcadores de inflamación y neurodegeneración en sangre. Correlación con los datos celulares.

Métodos

Marcajes leucocitarios

Las subpoblaciones celulares presentes en sangre periférica se analizarán mediante citometría de flujo en un citómetro FACS Canto II. Diferenciaremos las subpoblaciones mediante la identificación en la superficie celular de los siguientes antígenos: CD19, CD5, CD27, CD38, CD24, (linfocitos B: memoria, plasmablastos, transicionales), CD3, CD8, CD25, CD127, CCR7, CD45RO, CD69, CD103 (linfocitos T: naive, memoria central, memoria efectora, terminalmente diferenciadas, memoria residente, reguladoras), CD14, CD16, CD123, HLA-DR, CD11c (monocitos, dendríticas mieloides, dendríticas plasmacitoides). Las células se marcarán con los anticuerpos monoclonales correspondientes y se incubarán durante 20 minutos a 4ºC. Se utilizará el antígeno pan-leucocitario CD45 y los parámetros de Forward Scatter (FSC) y Side Scatter (SSC) para definir la población de linfocitos en un análisis por citometría de flujo utilizando un citómetro FACSCanto II.

Se estudiará a su vez la producción de citoquinas por las células de sangre. Para ello, se estimularán las células in vitro con PMA e Ionomicina en presencia de brefeldina A y monensina durante 4 horas a 37ºC. De nuevo se realizará el marcaje de los antígenos de superficie; se fijarán y permeabilizarán las células utilizando un kit Cytofix/Cytoperm; se marcarán las células permeabilizadas con los siguientes anticuerpos monoclonales: anti-IFN gamma, anti- GMCSF, anti-TNFα, anti- IL-17, a 4ºC durante 30 min. El análisis se realizará sobre linfocitos B, T CD4+ y CD8+ en un citómetro FACSCanto II.

A su vez, se estudiará la producción de citoquinas por los monocitos de sangre, para lo cual se incubarán durante 4 horas a 37ºC con Brefeldina A y monensina en presencia y ausencia de lipopolisacárido (LPS). Se llevará a cabo el marcaje de los antígenos de superficie, se fijarán y permeabilizarán y se marcarán las células permeabilizadas con los siguientes anticuerpos monoclonales: anti-IL-1β, anti- IL-10, anti-TNFα, anti-IL-12 y anti-IL-6.

Factores solubles: Dependiendo de los resultados del estudio de citometría de flujo se estudiarán las citoquinas implicadas en las vías que encontremos alteradas en los estudios celulares mediante ELISAs de alta sensibilidad (RyD). También estudiaremos los niveles de la cadena ligera de neurofilamentos en suero mediante ELISA de alta sensibilidad. Por último, se determinarán los niveles séricos de vitamina D dos veces en cada uno de ellos. Una entre enero y marzo y otra entre agosto y octubre para ver los niveles mínimos y máximos de esta vitamina en todos ellos.

Todos los datos obtenidos en estos ensayos se almacenarán en una base de datos junto con los datos clínicos y se analizarán buscándose su relación con la edad de los pacientes y el riesgo de progresión o la presencia de formas progresivas inflamatorias o no inflamatorias.

Estudios estadísticos: Las variables serán clasificadas según su normalidad (prueba de Kolmogorov-Smirnov) en paramétricas y no paramétricas, usando los test t de Student y U de

Mann-Whitney para evaluar la relación entre variables continuas y dicotómicas, calculando los índices de correlación de Pearson o Spearman entre variables continuas. Se considerarán significativos los valores de $p<0.05$.

Presupuesto

Anticuerpos monoclonales. Subtotal:	4500 euros
Kits de ELISA. Subtotal:	2000 euros
Reactivos químicos. Subtotal:	500 euros
Material plástico y vidrio. Subtotal:	500 euros
Total:	7500 euros

SUBPROGRAMA 2

Profundización en el estudio del inflamasoma NLRP3 en pacientes con esclerosis múltiple primariamente progresiva

Investigador principal: Manuel Comabella López. Adjunto de Neurología. CEMCAT: Hospital Universitario Vall d'Hebron. Barcelona.

Equipo Investigador:

Nicolas Fissolo. Investigador. CEMCAT.

Sunny Malhotra. Investigador. CEMCAT

Introducción. Justificación del estudio.

Con el objetivo de identificar biomarcadores de actividad de la enfermedad en pacientes con esclerosis múltiple (EM), el Equipo Investigador llevó a cabo recientemente un estudio de secuenciación del ARN en células mononucleares de sangre periférica (CMSP) de una cohorte de pacientes con EM no tratados y controles sanos. El grupo de pacientes con EM estaba formado por (i) pacientes con EM remitente-recurrente (EMRR) en los primeros 5 años de evolución de la enfermedad que cumplían criterios de inicio de tratamiento con fármacos de primera línea; (ii) pacientes con EMRR benigna, definida por la presencia de una puntuación en la escala de discapacidad neurológica (EDSS) inferior a 3.0 tras 15 o más años de evolución de la enfermedad, y por no haber recibido previamente tratamiento específico; pacientes con EM secundariamente progresiva (EMSP), y pacientes con EMPP(iii). El análisis de los resultados mostró que las CMSP de pacientes con EMPP se caracterizaron por una mayor expresión de genes que codifican citoquinas proinflamatorias como IL-1B, IL-6, TNF, y quimiocinas proinflamatorias como CXCL1, CXCL2, CXCL3, y CXCL10. Uno de los genes que mostró mayor

expresión diferencial fue IL-1B. Dada la implicación del inflamasoma en la síntesis de IL-1B, se investigó si las diferencias en la expresión de IL-1B podrían obedecer a una expresión diferencial del inflamasoma, y se observó que las CMSP de pacientes con EMPP presentaron una mayor expresión del inflamasoma NLRP3, el principal inflamasoma implicado en la síntesis de IL-1B, respecto a las otras formas clínicas y los controles sanos. Sin embargo no se observaron diferencias significativas entre grupos en la expresión de genes que codifican otros inflamasomas como NLRP1, AIM2, o NLRC4.

Los resultados preliminares expuestos anteriormente indican una mayor expresión de IL-1B en CMSP de pacientes con EMPP. Con el objetivo de identificar la población celular responsable de la huella de IL-1B, el Equipo Investigador llevó a cabo un inmunofenotipado en CMSP de pacientes con formas EMPP, pacientes con formas de inicio con brotes (EMRR y EMSP), y controles sanos. Mediante tinción intracelular para IL-1B, IL-6, y TNF, y posterior análisis por citometría de flujo se midió la expresión de citocinas en células dendríticas, células B, células T, células NK y monocitos. La expresión de IL-1B se encontró aumentada de forma significativa en monocitos de pacientes con EMPP respecto a las otras formas clínicas y controles sanos. Sin embargo, no se observaron diferencias entre grupos en la expresión de IL-1B por parte de células dendríticas, células T, B, o NK. Tampoco se observaron diferencias en la expresión de IL-6 y TNF entre grupos en ninguna de las poblaciones celulares estudiadas, monocitos incluidos. Estos resultados apuntan a una huella de IL-1B selectiva en monocitos de pacientes con EMPP.

Finalmente, los niveles de IL-1B obtenidos en el grupo de pacientes con EMPP se clasificaron en "altos" y "bajos" en función de: (i) la mediana de valores de IL-1B; y (ii) del percentil 25 de valores más altos de IL-1B. En ambos grupos de pacientes con EMPP se calculó el tiempo en alcanzar un EDSS de 6,0. Los pacientes con EMPP y valores de IL-1B por encima de la mediana presentaron un tiempo de evolución de su discapacidad más rápido que los pacientes con valores por debajo de la mediana. Se obtuvieron resultados similares tras analizar el tiempo en alcanzar un EDSS de 6,0 en función del percentil 25 de valores más altos de IL-1B. Estos resultados apuntan a un posible papel del inflamasoma NLRP3 como diana terapéutica en los pacientes con EMPP, cuyo bloqueo farmacológico podría influir en la evolución de la discapacidad en pacientes con EMPP y niveles altos de IL-1B.

Objetivos

1. Validación del carácter pronóstico de la IL-1B sobre la progresión de la discapacidad en pacientes con EMPP.
2. Caracterización fenotípica de los pacientes con EMPP y niveles "altos" y "bajos" de IL-1B.

Métodos

Objetivo 1.

De forma prospectiva, se obtendrán CMSP y suero de una cohorte de pacientes con EMPP. Se estima un tamaño muestral de 50 pacientes con EMPP y la participación de los diferentes grupos de la REEM. A partir de las CMSP y del suero se determinarán los niveles de IL-1B mediante PCR a tiempo real y ELISA respectivamente. Los niveles de IL-1B se clasificarán en "altos" y "bajos" en función de la mediana y el percentil 25 de valores más altos de IL-1B. Las puntuaciones en la escala de gravedad de la enfermedad (MSSS) desde el inicio de la enfermedad hasta el momento de la extracción en pacientes con niveles "altos" y "bajos" de IL-1B se compararán mediante una prueba estadística de comparación de medias (prueba U de Mann-Whitney o prueba t de Student, dependiendo de la normalidad de las variables). El tiempo en alcanzar un EDSS de 3,0, 4,0 y 6,0 en ambos grupos de pacientes se comparará mediante un análisis de supervivencia de Kaplan-Meier y un test de log-rank.

Objetivo 2.

En un subgrupo de 30 pacientes incluidos como parte del Objetivo 1, 15 pacientes con niveles "altos" y 15 pacientes con niveles "bajos" de IL-1B, se determinará:

- Número de lesiones en T2 y número de lesiones captantes de contraste en la resonancia magnética (RM).
- Niveles de IL-1B en líquido cefalorraquídeo (LCR) mediante ELISA.
- Porcentaje de monocitos y expresión de IL-1B en monocitos de LCR mediante citometría de flujo.
- Bandas oligoclonales de IgG, IgM, e índice IgG en LCR.

Dichas determinaciones sólo se llevarán a cabo en aquellos pacientes a los que se les practique una RM y punción lumbar con fines diagnósticos y en proximidad a la extracción de sangre para determinar los niveles de IL-1B.

El Objetivo 2 también se realizará con la participación de los diferentes grupos de la REEM

Presupuesto

- Extracción de CMSP y adquisición de reactivos de PCR a tiempo real para determinar los niveles de IL-1B en CMSP. Subtotal: 2500 euros.
- Adquisición de ELISAs para determinar los niveles de IL-1B en LCR y suero. Subtotal: 1500 euros.
- Reactivos de citometría de flujo para determinar el porcentaje de monocitos en LCR y la expresión de IL-1B en dicha población. Subtotal: 2000 euros.

Total: 6000 euros

SUBPROYECTO 3

Relación entre la serología frente a herpesvirus y la actividad de la enfermedad en pacientes con EMPP.

Investigador principal: Roberto Álvarez Lafuente. Investigador: IdISSC. Hospital Clínico San Carlos. Madrid.

Equipo investigador

MI Domínguez Mozo: Investigador. IdISSC.

Silvia Pérez Pérez. Investigador. IdISSC.

María Ángel García Martínez. Técnico de Laboratorio. IdISSC.

Introducción

Uno de los herpesvirus más estudiado en relación con la esclerosis múltiple (EM) es el virus del Epstein-Barr (EBV). Está ampliamente descrita la mayor seroprevalencia de EBV en los pacientes con EM frente a los sujetos sanos. Además se ha comprobado también que el riesgo de padecer EM no solo es menor en sujetos sin anticuerpos frente a EBV que en pacientes seropositivos, sino que también se incrementa en sujetos que contraen el EBV en la edad adulta y por lo tanto desarrollan la mononucleosis infecciosa frente a aquellos que se contagian en la infancia y no desarrollan la infección clínica. Otro herpesvirus que ha acaparado una gran atención en los últimos años por su posible implicación en la etiopatogenia de la EM es el Herpesvirus humano 6 (HHV-6). Se trata de un virus con una alta seroprevalencia, presente en casi todos los sujetos a partir de los dos años de edad, con tropismo por células del sistema nervioso central y del sistema inmunitario, y, que tras la primoinfección puede quedar latente, con reactivaciones periódicas a lo largo de la vida. Se ha señalado un posible aumento de la muerte de oligodendrocitos, y una disminución de la proliferación celular mediada por este virus. También se ha sugerido un posible efecto desmielinizante por reacción cruzada contra la mielina por mimetismo molecular. Por último, en relación con el Citomegalovirus (CMV), otro herpesvirus, aunque existe cierta controversia, acerca de su posible implicación en la etiopatogenia de la EM; así, hay estudios que apuntan a un posible efecto protector sobre la EM, basándose en unas prevalencias más bajas de este virus al comienzo de la enfermedad en relación con controles sanos con la misma edad, así como a una cierta actitud inmunoevasiva a través de las células Natural-Killer. Además, se ha observado que existe una correlación inversamente proporcional entre los títulos de HHV-6 y EBV (que disminuirían con la edad) y CMV (cuya prevalencia y títulos se incrementan con la

edad); esta evolución de los títulos de anticuerpos, si bien es observada también en controles sanos, parece suceder a edades más tardías en estos últimos, lo que podría estar en relación con los procesos de inmunosenescencia precoz descritos en los pacientes de EM, así como en el establecimiento de formas progresivas en la enfermedad.

Objetivo

Estudiar la posible correlación entre los títulos de anticuerpos IgG e IgM frente a EBV, HHV-6 y CMV con los procesos de inmunosenescencia precoz en pacientes con esclerosis múltiple primaria progresiva.

Metodología

Muestras

De cada uno de los sujetos incluidos en el estudio se utilizarán 2 alícuotas de 200 microlitros de suero para el análisis serológico de los siguientes herpesvirus: EBV, HHV-6 y CMV. Todas las determinaciones serán analizadas en el Laboratorio de Investigación de Esclerosis Múltiple, del Hospital Clínico San Carlos.

Serología viral por ELISA.

Para la detección de los niveles de IgG e IgM frente a los virus de la familia Herpesviridae en muestras de suero, se emplearán kits comerciales (Vidia – HHV-6, Zeus –CMV- y Trinity –EBV-) siguiendo las instrucciones del fabricante. Los resultados serán leídos en un robot de ELISA DS2 (Dynex).

Presupuesto

- Kits de ELISA para la detección de anticuerpos IgG de EBNA-1 (EBV). Subtotal: 1.000 €
- Kits de ELISA para la detección de anticuerpos IgG de EBNA-2 (EBV). Subtotal: 1.000 €
- Kits de ELISA para la detección de anticuerpos IgG de VCA (EBV). Subtotal: 1.000 €
- Kits de ELISA para la detección de anticuerpos IgM de EBV.Subtotal: 1.000 €
- Kits de ELISA para la detección de anticuerpos IgG de HHV-6. Subtotal: 750 €
- Kits de ELISA para la detección de anticuerpos IgM de HHV-6. Subtotal: 750 €
- Kits de ELISA para la detección de anticuerpos IgG de CMV. Subtotal: 1.000 €
- Kits de ELISA para la detección de anticuerpos IgM de CMV. Subtotal: 1.000 €

TOTAL: 7.500 €.

SUBPROYECTO 4:

Estudio de la asociación de microRNA (miRNAs) circulantes con la actividad de la EMPP.

Investigadora principal: Ester Quintana Camps. Instituto de Investigación Biomédica de Girona (IDIBGI).

Equipo Investigador

Lluis Ramió Torrentà. Jefe de Servicio de Neurología. Hospital Universitario Dr. Josep Trueta. Instituto de Investigación Biomédica de Girona (IDIBGI)

René Robles Cedeño. Hospital Universitario Dr. Josep Trueta. Instituto de Investigación Biomédica de Girona (IDIBGI)

María Muñoz San Martín. Instituto de Investigación Biomédica de Girona (IDIBGI).

.....

Introducción:

Los (miRNA) son pequeños RNA no codificantes que, en su forma madura, son de cadena simple, tienen alrededor de 22 nucleótidos y están muy conservados evolutivamente. Se descubrieron a principios de los 90, pero ha sido en los últimos años cuando su estudio se ha aplicado para identificar marcadores y/o explicar procesos que se desarrollan en el organismo (1). Se considera que los miRNAs controlan a nivel post-transcripcional la expresión de más del 30% de los genes en mamíferos (2), modulando la disponibilidad de RNAs mensajeros y la síntesis de proteínas. Están implicados en muchos procesos celulares tales como el crecimiento, la proliferación, la diferenciación y la apoptosis celular (3), también tienen un papel importante en el desarrollo y mantenimiento del sistema nervioso central en la edad adulta (4). Dado que la expresión de miRNAs está estrechamente relacionada con el comportamiento celular, los cambios en los perfiles de expresión miRNAs están siendo ampliamente estudiados y vinculados a enfermedades humanas tales como el cáncer, la osteoporosis, la enfermedad cardíaca y enfermedades neurodegenerativas (5-7).

Cada microRNA puede tener un gran número de genes diana, y por lo tanto podría ser capaz de regular un proceso celular en diferentes puntos o participar en más de uno. Por todo ello los microRNA son buenos candidatos para su estudio en enfermedades complejas.

Los miRNA tienen un gran interés en EM ya que se encuentran altamente expresados tanto en sistema inmune, mediador de la respuesta inflamatoria, como en SNC, órgano diana de dicha respuesta inflamatoria. Desde 2009, cuando Otaegui y col (8) describieron las alteraciones de miRNA presentes en células mononucleadas de sangre periférica de pacientes con EM, muchos son los estudios que han explorado los miRNA como potenciales biomarcadores para EM. Nuestro grupo ha trabajado en el perfil de miRNAs en LCR de pacientes con EMRR identificando miRNAs desregulados en pacientes con BOCM lípido específicas. Actualmente estamos trabajando en el perfil de miRNAs en LCR de pacientes con EMPP. Este trabajo permitirá definir un perfil de miRNAs diferencial en plasma para EMPP, y detectar las diferencias entre los pacientes con curso más inflamatorio de los menos inflamatorios. Los

miRNAs identificados, uno concreto o un grupo de ellos, podrán proponerse como biomarcadores de inflamación en pacientes EMPP.

Igualmente, en el caso que los miRNAs identificados presenten como dianas proteínas que coincidan en una misma vía metabólica, nos indicaría los procesos que se alteran en cada uno de los fenotipos observados.

Bibliografía:

1. Bartel DP. MicroRNAs: genomic, biogénesis, mechanism, and function. Cell 2004;116:281-97.

2. Lewis BP, Burge CB, Bartel DP. Conserved seed pairing, often flanked by adenosines, indicates that thousands of human genes are microRNA targets. Cell 2005;120:15-20.

3. Schickel R, Boyerinas B, Park SM, Peter ME. MicroRNAs: key players in the immune system, differentiation, tumorigenesis and cell death. Oncogene 2008;27:5959-74

4. Kosik, KS. The neuronal microRNA system. Nat Rev Neurosci 2006;7: 911-22

5. Hernando E. microRNAs and cancer: role in tumorigenesis, patient classification and therapy. Clin Transl Oncol 2007;9:155-56.

6. Perera RJ, Ray A. MicroRNAs in the search for understanding human diseases. Bio Drugs 2007;21: 97-104

7. Hebert SS and De Strooper B. Alterations of the microRNA network cause neurodegenerative disease. Trends Neurosci 2009;32:199-206.

8. Otaegui D, Baranzini S, Armañanzas R, et al. Differential microRNA expresión in PBMC from multiple sclerosis patients. PLoS One 2009;4:e6309.

Objetivos:

Identificar el perfil de miRNAs presente en pacientes con EMPP con curso altamente inflamatorio de la enfermedad y en aquellos con un perfil inflamatorio bajo.

Materiales y métodos:

Pacientes y muestras:

Estudiaremos 50 pacientes con EMPP. A partir de la extracción de sangre periférica se obtiene suero para la determinación de miRNAs circulantes.

Extracción de miRNAs:

La extracción de RNA se realizará con el Kit de aislamiento mirVana® PARIS (AppliedBiosystems), siguiendo las instrucciones del fabricante, a partir de 600 µl de suero. Los miRNAs circulantes deben ser retrotranscritos y preamplificados antes del análisis mediante PCR a tiempo real. Para ello, utilizaremos el kit de síntesis de cDNA TaqMan™ Advanced miRNA (Applied Biosystems).

Array de miRNA con Open Array:

Para identificar los miRNAs con expresión diferencial entre los dos grupos de estudio cuantificaremos los miRNAs detectables en muestras de suero mediante Open Array. Este análisis se realizará a 8 pacientes de cada grupo.

Validación de los resultados de los TLDAs:

Los resultados del Open Array se validaran en la cohorte completa de pacientes mediante PCR a tiempo real y ensayos de hidrólisis TaqMan® individuales de los miRNA que hayan mostrado expresión diferencial en el análisis de identificación.

Acción biológica de los miRNAs:

Una vez identificados los miRNAs relevantes, realizaremos una estimación in silico y mediante búsqueda bibliográfica de la explicación biológica de las alteraciones observadas. Utilizaremos los recursos informáticos disponibles online: miRsearch2.0, Dianalabs, miRDB, IPA y Pubmed.

Presupuesto:

-Extracción miRNAs (mirVana Paris®). Subtotal: 1000€

-Retrotranscripción y preamplificación (TaqMan™ Advanced miRNA cDNA synthesis). Subtotal: 1.000€

-Open Array. Subtotal: 3500€

-Validación por qPCR en la cohorte total. Subtotal: 2000€

Total presupuesto: 7500€

SUBPROYECTO 5.

Estudio de las células mieloides supresoras monocíticas en la esclerosis múltiple primariamente progresiva.

Investigador principal: Diego Clemente López. Investigador. Lab. Neuroinmuno-Reparación. Hospital Nacional de Parapléjicos. Toledo.

Equipo investigador

Dra. Mª. Cristina Ortega Muñoz (Investigadora postdoctoral; objetivo 1)

Dra. Carmen Mª Fernández Martos (Investigadora Postdoctoral; objetivo 2)

Isabel Machín Díaz (Lab. Manager; objetivo 1)

Rafael Lebrón Galán (T.E.L; objetivo 2)

Dra. Inmaculada Pérez Molina (F.E.A. Neurología; objetivo 2)

Introducción

Las células mieloides supresoras (MDSCs, del inglés myeloid-derivedsuppressorcells) son un grupo heterogéneo de células mieloides inmaduras con una potente capacidad de supresión del linfocito T activado. Actualmente, tanto en ratón como en humano, las MDSCs se clasifican en dos grupos basándose en el nivel de expresión de marcadores distinguiéndose MDSCs polimorfonucleares (PMN-MDSCs) y las MDSCs monocíticas (M-MDSCs) (Youn et al.,2008, Bronte et al., 2016). El efecto inmunosupresor de las MDSCs se lleva a cabo por diferentes métodos siendo los más estudiados la producción de especies reactivas de óxigeno, la inducción de células T reguladoras (Treg) y la alteración del metabolismo de la L-Arg vía activación de iNOS, Arginasa-I (Arg-I) o ambas (Melero-Jerez et al., 2016). En este último caso, la activación de ambas enzimas y su competición por este aminoácido conlleva la anergia del linfocito T activado y su posterior apoptosis (Gabrilovich et al., 2012).

Las MDSCs, especialmente las M-MDSCs, han cobrado gran importancia en la regulación de la respuesta autoinmune en el modelo animal de esclerosis múltiple (EM), encefalomielitis autoinmune experimental (EAE) (Zhu et al., 2007; Zhu et al., 2011; Alabanza et al., 2013). Con respecto a su papel en la EM, hay evidencia de la presencia de MDSCs en la sangre de pacientes con EM-RR (Ionannou et al., 2012; Cantoni et al., 2017), pero no hay datos sobre la presencia de MDSCs en sangre periférica de pacientes en formas progresivas. Además, no existe dato alguno sobre la presencia de MDSCs en el SNC de pacientes con EM.

Nuestro grupo describió por primera vez la presencia y fenotipado de M-MDSCs, así como su relación morfo-funcional con la apoptosis de los linfocitos T dentro del sistema nervioso central (SNC) de ratones con EAE, observándose que su presencia y abundancia era paralela al curso clínico del modelo (Moliné-Velázquez et al., 2011). Además, observamos que la maduración farmacológica de las M-MDSCs conllevaba un empeoramiento de los síntomas del modelo animal, lo que indicaba que el grado de actividad de las M-MDSCs está directamente relacionado con el mantenimiento de su estado indiferenciado (Moliné-Velázquez et al., 2014). Por último, nuestros datos avalan que la mayor abundancia de MDSCs a nivel periférico se asocia a un curso clínico menos agresivo y a un mayor grado de recuperación en los ratones con EAE, así como a una menor afectación histopatológica. Además, apuntan hacia un papel de las M-MDSCs como potenciadoras de la mielinización. La ausencia de fenómenos de recuperación espontánea de los episodios inflamatorios en el caso de las formas progresivas, podría significar una ausencia o menor presencia de las M-MDSCs como agentes reguladores de la respuesta inmune adaptativa, o un cambio en los parámetros fenotípicos de las mismas. La existencia de pacientes de EM-PP con una mayor o menor actividad inflamatoria así como con curso clínico más o menos agresivo, podría también verse reflejado en el contenido en M-MDSCs a nivel periférico o dentro del SNC, respectivamente.

Bibliografía

1. Alabanza et al., J Immunol. 2013; 191:3764-3777.

2. Bronte et al., 2016. NatCommun 7:12150.

3. Cantoni et al 2017 Acta Neuropathol. 133:61-77.

4. Gabrilovich et al., 2012. Nat. Rev. Immunol. 12:253-268.

5. Ioannou et al., 2012. J. Immunol. 188:1136-1146.

6. Melero-Jerez et al., 2016 BBA-Mol. BasisDis. 1862:368-80

7. Moliné-Velázquez et al., 2011. BrainPathol 21:678-691.

8. Moliné-Velázquez et al., 2014. Neurobiol. Dis. 67:149-164.

9. Youn et al., J Immunol. 2008; 181:5791-5802.

10. Zhu et al., 2007. J. Immunol 179:5228-5237.

11. Zhu et al., 2011. J. Immunol. 187:2418-2432.

Objetivos

1- Análisis de la presencia, abundancia y estado de actividad de las MDSCs en muestras post mortem de SNC de pacientes de EM-PP con cursos clínicos más o menos agresivos así como en sujetos control.

2.- Estudio transversal de correlación entre la abundancia y estado de actividad de las M-MDSCs presentes en la población de células mononucleares de sangre periférica de pacientes EM-PP y el grado de actividad inflamatoria de los mismos.

Materiales y métodos

Objetivo 1: Analizaremos bloques de tejido de sujetos control y de pacientes de EM-PP con lesiones activas, crónico-activas y crónico-inactivas, así como sustancia blanca aparentemente normal. En todos los casos se trata de mujeres sin antecedentes de enfermedades neuropsiquiátricas o gliomas. Actualmente disponemos del siguiente número de pacientes y controles:

a) 6 pacientes de EM-PP (edad: 39-58; duración de enfermedad < 15 años)

b) 6 pacientes de EM-PP (edad: 56-88; duración de enfermedad > 30 años)

c) 6 pacientes control (rango de edad: 69-84).

En todas las muestras, se analizará el grado de desmielinización e inflamación de cada lesión mediante la técnica histoquímica de la eriocromocianina (EC; mielina) junto con el marcador HLA-DR. El análisis de la distribución de MDSCs en el tejido se analizará mediante la inmunohistoquímica de CD11b, junto con la presencia de CD33 (marcador mieloide inmaduro), CD14 (como marcador de monocitos) y de CD15 (como marcador de granulocitos); las M-MDSCs no deben mostrar inmunorreactividad para HLA-DR o CD206 (macrófagos M2). Para

estudiar su fenotipo funcional se utilizarán Arg-I e iNOS, y se describirá su distribución en relación con la presencia de linfocitos T apoptóticos mediante el marcaje con CD3 y TUNEL.

Objetivo 2: Analizaremos el contenido en M-MDSCs en PBMCs totales obtenidas de pacientes con EM-PP por parte de los miembros del consorcio. Las M-MDSCs se clasificarán como CD11b+CD33+HLA-DR-/lowCD14+CD15- (Cantoni et al., 2017). Compararemos el nivel de M-MDSCs con el de sujetos control de edades y % de sexos similares y con pacientes de EM-RR en inicio de curso clínico que no hayan recibido corticoides en los últimos 6 meses. Estableceremos correlaciones entre la abundancia de M-MDSCs y diferentes parámetros: edad, sexo, edad a la que debutó la EM, EDSS cuando se diagnosticó, EDSS en el muestreado, tiempo de enfermedad, agresividad (MSSS), presencia de IgMs, alteraciones de RMN.

Para el análisis de los diferentes datos se utilizará SigmaStat. Los diferentes estudios de correlación se llevarán a cabo con el test de Spearman. Las diferencias entre varios grupos se analizarán con la ANOVA (o su versión no paramétrica en Rangos) de una sola vía y las posibles diferencias entre grupos se verán con el test de Tukey o de Dunn. Para analizar relación entre MDSC, edad y sexo, se realizarán ANOVA de doble vía seguida de un test de multicomparación paramétrico de Tukey o Dunn. La significación mínima estadística se establecerá en $P<0.05$, siendo *<0.05;**<0.01;***<0.001.

PRESUPUESTO

- Anticuerpos y reactivos para citometría de flujo. Subtotal: 4.000 €
- Anticuerpos y reactivos para histología. Subtotal: 2.000 €
- Reactivos químicos generales: Subtotal: 500 €- TOTAL 6.500 €

ESTUDIOS EN MODELO ANIMAL

SUBPROYECTO 6

Heterogeneidad en la respuesta inmune en un modelo experimental de EM progresiva: Identificación de nuevas dianas terapéuticas.

Investigadora principal: Carmen Guaza Rodríguez. Grupo de Neuroinmunología Instituto Cajal, CSIC.

Equipo investigador

Leyre Mestre Nieto. Investigadora, Instituto Cajal

Miriam Mecha Rodríguez. Investigadora, Instituto Cajal.

Ana Feliú Martínez. Investigadora, Instituto Cajal

Laura Ramos del Álamo, técnico soporte Investigación, Instituto Cajal

Introducción

El envejecimiento supone un factor de riesgo relacionado con un aumento en la susceptibilidad a desarrollar enfermedades, con alteraciones más severas y con la posibilidad de cronificación de las mismas por una falta de respuesta del organismo adecuada que dificulta la recuperación debido a fallos en los sistemas de control de la homeostasis. Se dan dos hechos interrelacionados: por un lado la aparición de enfermedades asociadas a la edad y por otro simultáneo, la presencia de condiciones fisiológicas cambiantes con la edad que propician el debut de dichas enfermedades o afectan la severidad o patología de otras enfermedades no asociadas en principio al envejecimiento. En cuanto al sistema inmune el envejecimiento se asocia a una progresiva disminución de la integridad y eficiencia inmunológica que se ha venido a denominar inmunosenescencia y que implica una remodelación de la respuesta inmune innata y adquirida (Rawji KS, et al., 2016). Estos cambios asociados a la edad pueden alterar la incidencia, severidad y susceptibilidad de las enfermedades autoinmunes.

La edad cronológica es un hecho importante en la EM tanto juvenil (niños y adolescentes) como de adultos con un rango de edad definido entre los 20 y los 30 años para la aparición inicial de la enfermedad y un límite de tiempo después de la 5ª década. La edad puede determinar el curso de la enfermedad con presentación tardía que presenta un curso clínico progresivo con transformación más rápida a la fase secundaria progresiva. Además la conversión y el inicio de la EM progresiva podrían estar influenciados por la edad más que por factores relacionados con la propia enfermedad.

Modelos animales

La edad también influye en la susceptibilidad y en la sintomatología durante el curso de los modelos experimentales de enfermedades autoinmunes. En el caso particular de la EM, sabemos que el modelo de EAE es específico de especie y cepa, pero también altamente dependiente de la edad a la que se inocula el antígeno así como de la edad de evaluación de los parámetros inmunológicos (Bolton and Smith 2017). ¿Existe un periodo crítico de respuesta a la inducción de la enfermedad? En el modelo de rata Lewis se ha descrito un aumento de la incidencia de déficits neurológicos agudos y recaídas así como de cronicidad de los síntomas y un mayor número de lesiones en animales más viejos. Sin embargo en la rata Fisher existe una clara disminución de la susceptibilidad a la EAE con el aumento de la edad (Djikić J et al,2014). En ratones SJL/J se ha descrito una reducción notable en la incidencia de la EAE con el aumento de la edad.

Los cambios funcionales en el sistema inmune pueden generar un estado progresivo de inmunosenescencia que puede contribuir a las diferencias relacionadas con la edad en la EAE y en otros modelos experimentales de EM de diferente etiología y que reproducen las características de la EM progresiva como es el modelo de la encefalomielitis murina por infección con el virus de Theiler (del inglés: *"Theiler's murine induced demyelinating disease"*, TMEV-IDD) en el que no se han explorado aún los cambios asociados a la edad sobre la eficacia y función del sistema inmune, los parámetros inmunes que podrían remodelar el transcurso de la enfermedad.

Objetivos

1.- Investigar en el modelo de TMEV-IDD los cambios asociados a la edad en las respuestas inmune innata y adquirida en el SNC y en la periferia, y como afectan estos cambios en la evolución y severidad de la enfermedad, así como en el grado de desmielinización/remielinización, en médula espinal y en corteza motora. Se investigará además el nivel de daño axonal, astrogliosis, estado de activación de la microglía, marcadores inflamatorios y la dinámica de expresión de progenitores de oligodendrocitos (OPCs) y de oligodendrocitos maduros en las áreas de interés.

Métodos

Se plantean dos aproximaciones en el modelo de Theiler.

La primera consistirá en la inoculación intracerebral de TMEV (cepa Daniel) en la ventana de tiempo de infección clásica utilizando ratones hembras SJL/J de 6 a 8 semanas de edad (Lledó y cols, 1999; Mecha y col., 2013), esperando un tiempo de latencia para el desarrollo de la enfermedad e inicio de la patología de 80 días post-infección (dpi) que es cuando comienzan habitualmente los déficits motores en los ratones infectados. En este mismo esquema se dejará un grupo de ratones infectados hasta los 6-8 meses (pi). En todos los casos se llevarán ratones controles apareados por edad que reciben la inoculación de vehículo sin TMEV (ratones sham).

La segunda aproximación consistirá en inocular el TMEV en ratones SJL/J hembras adultas viejas, de 6-9 meses de edad y valorar los parámetros señalados anteriormente durante la fase aguda del modelo (7dpi) así como en la fase crónica (80 dpi).

La función motora como índice de severidad se evaluará mediante la caja de actividad (actividad horizontal, vertical y estereotipias), el test del rotarod, y el test de la huella. La valoración de la respuestas inmune central y periférica se realizará por FACS, utilizando cerebro y médula espinal, bazo y ganglios linfáticos. Se utilizará para el resto de los parámetros, análisis de inmunohistoquímica e inmunofluorescencia, además de PCR cuantitativa en el caso de identificación de marcadores inflamatorios especialmente en microglía valorando el grado

de activación celular y el fenotipo inflamatorio o reparador (Mecha et al., 2016) siguiendo protocolos ya descritos en nuestro grupo (Feliú y col.,2017).

Bibliografía

Bolton C, Smith PA, (2017) The influence and impact of ageing and immunosenescence (ISC) on adaptive immunity during multiple sclerosis (MS) and the animal counterpart experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE). Ageing Res Rev. 41:64-81

Djikić J, Nacka-Aleksić M, Pilipović I, Stojić-Vukanić Z, Bufan B, Kosec D, Dimitrijević M. (2014) Leposavić G. Age-associated changes in rat immune system: lessons learned from experimental autoimmune encephalomyelitis. Exp Gerontol. 58:179-97.

Feliú A, Bonilla Del Río I, Carrillo-Salinas FJ, Hernández-Torres G, Mestre L, Puente N, Ortega-Gutiérrez S, López-Rodríguez ML, Grandes P, Mecha M, Guaza C. (2017). 2-Arachidonoylglycerol Reduces Proteoglycans and Enhances Remyelination in a Progressive Model of Demyelination. J Neurosci. 37(35):8385-8398

Lledó, A., Borrell, J. Guaza, C. (1999).Dexamethasone regulation of interleukin-1-receptors in the hippocampus of Theiler's virus-infected mice: effects of virus-mediated demyelination. Eur J Pharmacol 372,75-83

Mecha, M., Carrillo-Salinas, F.J., Mestre, L., Feliú, A., Guaza, C. (2013). Viral models of multiple sclerosis: neurodegeneration and demyelination in mice infected with Theiler´s virus. Prog Neurobiol 101-102, 46-64

Mecha M, Carrillo-Salinas FJ, Feliú A, Mestre L, Guaza C. (2016) Microglia activation states and cannabinoid system: Therapeutic implications. Pharmacol Ther 166:40-55

Rawji KS, Mishra MK, Michaels NJ, Rivest S, Stys PK, Yong VW (2016) Immunosenescence of microglia and macrophages: impact on the ageing central nervous system. Brain 139 :653-61

Presupuesto.

No se solicita asignación económica para este subproyecto.

SUBPROYECTO 7.

PAPEL DEL TRATAMIENTO FRENTES A DIANAS DE LA RESPUESTA INNATA EN MODELO PROGRESIVO DE LA ENFERMEDAD. INFLUENCIA DE LA EDAD.

Invesigador principal: Carmen Espejo. Investigadora. CEMCAT. Hospital Universitario Vall d'Hebron. Barcelona.

Equipo investigador

Herena Eixarch. Investigadora. CEMCAT.

Carme Costa. Investigadora. CEMCAT.

Introducción y objetivos

Distintos datos avalan que la edad induce cambios en los mecanismos inmunológicos que juegan un papel en la esclerosis múltiple, pasando la respuesta innata a jugar un papel preponderante en la fisiopatología de la enfermedad. Datos preliminares de nuestro grupo en el modelo progresivo de EM inducido en ratones C57BL6/J inmunizados con MOG avalan esta hipótesis. La interleuquina 1 juega un papel importante en la respuesta inmune innata. El objetivo de este trabajo es el estudio del efecto del tratamiento con anticuerpos monoclonales frente a IL1Ra en ratones viejos con este modelo de EAE respecto a ratones jóvenes para evaluar nuevas dianas terapéuticas en la enfermedad-

Material y métodos

- Animales: Ratones hembra C57BL6/J (Envigo) de 2 meses de edad (aproximadamente 20 años edad humana) y de 9 meses de edad (aproximadamente 45 años edad humana).
- Reactivos: MOG35-55 (Unidad síntesis de péptidos, Unidad PompeuFabra, Barcelona), Adyuvante incompleto de Freund (Sigma-Aldrich), antígeno purificado de Micobacterium turberculosis H37RA (Difco); toxina pertussis (Sigma-Aldrich).
- Anestesia: Inyección intraperitoneal de 37 mg/kg de ketamina (Ketalar, Parke& Davis) y 5.5 mg/kg de xylazine (Rompun, Bayer).
- Inmunización: Los animales se inmunizarán subcutáneamente con un emulsificado que contendrá el antígeno (100 µg de MOG35-55) y el adyuvante de completo Freund. Además, se les inyectará 250 ng de toxina pertussis por vía intravenosa en el momento de la inmunización y a las 48h.
- Seguimiento clínico: Desde la inmunización hasta la eutanasia, los ratones se pesarán y se valorarán diariamente mediante una escala clínica de seis puntos que valora una parálisis ascendente (Espejo et al., Neuroscience 2001): 0 = no debilidad; 0.5 = debilidad distal de la cola; 1 = parálisis completa de la cola; 2 = paraparesia moderada; 3 = paraplejia o paraparesia severa con importante ataxia; 4 = tetraparesia; 5 = tetraplejia, estado moribundo, 6 = exitus.

Además, al final del experimento, para evaluar los cambios de la función motora ocasionados por el tratamiento se utilizará el paradigma de los rodillos giratorios ("Rota-Rod") (Moreno et al., RevNeurol 2012). Se realizará el siguiente test: aceleración de 4-40 revoluciones por minuto (rpm) durante 5 minutos y su registrará el tiempo que el animal es capaz de resistir en el rodillo y la velocidad alcanzada. Previo al test se realizará un proceso de adaptación y

aprendizaje que consistirá en 3 test con tres repeticiones de 20 segundos a velocidad constante (10, 20, 30 rpm).

- Tratamiento: Tras la aparición de los signos clínicos los animales serán tratados diariamente con IL1Ra (Anakinra – Kineret). Se les administrará intraperitonealmente 100 mg/Kg de IL1Ra. Los ratones control serán tratados de igual forma pero con solución salina.

- Medidas correctoras y criterios de punto final para garantizar el bienestar animal: Se pondrán pellets de comida húmedos en el lecho cuando los animales empiecen a desarrollar los signos clínicos para facilitarles el acceso al alimento así como la hidratación. Se administrará de forma subcutánea 0,5 ml de suero glucosado 10% en caso de pérdida de peso superior al 15%. Si la pérdida de peso excede el 30% o un animal alcanza la puntuación clínica de 5 el animal será eutanasiado y puntuará 6 en la escala clínica desde la eutanasia hasta la finalización del experimento.

- Evaluación histopatológica: Para estudiar la inflamación se realizará una tinción con hematoxilina-eosina y hará una valoración semicuantitativa siguiendo el siguiente criterio: 0= Ausencia de infiltrados; 1= Infiltrado celular localizado únicamente en meninges; 2= Baja presencia de infiltrados superficiales en el parénquima; 3= Presencia moderada de infiltrados, < 25% de infiltración de la sustancia blanca; 4= Presencia elevada de infiltrados, < 50% de infiltración de la sustancia blanca; 5= Presencia severa de infiltrados, >50% de infiltración de la sustancia blanca.

La desmielinización se estudiará mediante tinción de Klüver-Barrera y se realizará una valoración semicuantitativa según el siguiente criterio: 0= Ausencia de áreas de desmielinización; 1= Baja presencia de desmielinización localizada únicamente alrededor de los infiltrados y representando <25% de la sustancia blanca; 2= Desmielinización moderada, representando <50% de la sustancia blanca; 3= Elevada presencia de desmielinización difusa y extensa, representando >50% de la sustancia blanca.

Mediante inmunohistoquímica se cuantificará cuantitativamente (número de células positivas/área) el daño axonal (marcador SMI-32), la reactividad de la microglía (marcador lectina de tomate) y astrocitaria (marcador GFAP) así como el número de células T infiltrantes (marcador CD3).

- Análisis de los resultados: El número de ratones por grupo experimental para el seguimiento clínico y los estudios histopatológicos nunca será inferior a 6 ratones para garantizar la potencia estadística en el análisis de los resultados. Como en este modelo obtenemos una incidencia de la enfermedad mayor al 90% en el grupo no tratado (o tratados con el vehículo) y la mortalidad puede ser de un 15% haremos grupos de 8 ratones inmunizados con el péptido

inmunogénico más dos ratones controles negativos inmunizados sin antígeno. Cada grupo de tratamiento se comparará con su grupo vehículo.

Para las variables cualitativas se realizarán tablas de contingencia y se aplicará la prueba exacta de Fisher. Para las variables cuantitativas se estudiará la normalidad y en función de ella se aplicarán la prueba t-Student o U-Mann Whitney. Se considerarán las diferencias significativas cuando el valor p sea inferior a 0,05.

- Cuestiones éticas: Todos los procedimientos realizados en animales de experimentación serán aprobados por el Comité Ético de Experimentación Animal de nuestro centro según la normativa Europea (Directiva 2010/63/UE), Española (Real Decreto 53/2013) y Autonómica (Decreto 214/1997) vigentes.

Presupuesto

Animales de experimentación.....3500 euros

Anticuerpos monoclonales.....1500 euros

Reactivos para inmunofluorescencia y kits del ELISA .....2500 euros

Total.....6500 euros

CRONOGRAMA

1º-5º mes	• Comienzo de la recogida de muestras • Inicio de los procesos experimentales en sangre periférica. • Recogida de datos clínicos de los pacientes • Comienzan los estudios en modelo animal • Comienzan los estudios en tejido de necropsias
6º mes	• Análisis de los datos de cada grupo que trabaja en sangre periférica, junto con los datos clínicos. Reajuste de protocolos, si procede • Continuación de la recogida de muestras, datos clínicos y marcajes leucocitarios. • Análisis de los primeros datos en modelo experimental. Reajuste de protocolos si procede. • Análisis de los resultados de necropsias. Ampliación del estudio según los resultados obtenidos.
7º-10º mes	• Estudios de factores solubles y marcadores de daño axonal, comparación con otros datos experimentales en sangre • Continuación de la recogida de muestras, datos clínicos y marcajes

	leucocitarios. • Continuación de los estudios en modelo animal y finalización de los estudios en necropsias.
11º-12º mes	• Finalización de todos los estudios. • Análisis estadístico de resultados. • Análisis de correlaciones entre los resultados de los distintos grupos.
13º-18º MES	• Preparación de manuscritos y envío para su publicación. Envío de comunicaciones a congresos.

VIABILIDAD DEL PROYECTO

Nuestro consorcio está formado por neurólogos con una larga trayectoria en la evaluación clínica de los pacientes y por investigadores con una amplia experiencia en el estudio de los mecanismos básicos de la enfermedad.

Los centros participantes cuentan con todos los medios necesarios para la realización del estudio.

Esperamos que todo esto redunde en la obtención de los resultados que esperamos, esto es, la identificación de mecanismos que juegan un papel en las formas progresivas de la enfermedad y, por tanto, encontrar nuevos biomarcadores y dianas terapéuticas para esa forma de la enfermedad.

RESULTADOS ESPERADOS

Creemos que nuestro proyecto es factible. Se basa en datos científicos recientes y se sustenta en nuestros datos preliminares. En caso de ser exitoso y alcanzar los objetivos propuestos tendría, las siguientes implicaciones científicas y sociales:

1.- Aumentar el conocimiento de los mecanismos de progresión en la EM e identificar nuevas dianas terapéuticas para el tratamiento de estos pacientes.

2.- Encontrar biomarcadores que identifiquen los distintos tipos de progresión en la EM.

3.- Identificar a los pacientes con formas progresivas que podrían responder a las terapias actuales.

Esto contribuiría a retrasar el acúmulo de discapacidad y a mejorar la calidad de vida de los pacientes; podría ser susceptible de producir resultados patentables y dará lugar a publicaciones que se publicarán en revistas de impacto medio y alto.

CAPACIDAD DEL PROYECTO DE FOMENTAR SINERGIAS E IMPULSAR EL TALENTO EN EL SNS.

Nuestros grupos forman parte de la Red Española de Esclerosis múltiple. Este proyecto se desarrollará en ese ámbito y potenciará la colaboración entre grupos básicos y clínicos de la red en un tema de alto interés clínico en el campo de la esclerosis múltiple en la actualidad.

PRESUPUESTO TOTAL

SUBPROYECTO 1. SUBTOTAL.....7500 EUROS
SUBPROYECTO 2. SUBTOTAL.....6000 EUROS
SUBPROYECTO 3. SUBTOTAL.....7500 EUROS
SUBPROYECTO 4. SUBTOTAL.....7500 EUROS
SUBPROYECTO 5. SUBTOTAL.....6500 EUROS
SUBPROYECTO 6. SUBTOTAL.....NO SOLICITA
SUBPROYECTO 7. SUBTOTAL.....6500 EUROS
GASTOS ENVÍO DE MUESTRAS.....1000 EUROS
SUBTOTAL.....42500 EUROS
COSTES INDIRECTOS.....7500 EUROS
TOTAL.....50000 EUROS

El total del premio se ingresará en la Fundación para la Investigación Biomédica del Hospital Ramón y Cajal de Madrid (FIBIO-HRC). Los grupos de investigación cargarán las facturas a la cuenta que se asigne al proyecto en dicha Fundación.