

TÍTULO

LACTIC ACID AND METABOLITES FROM GUT MICROBIOTA IN PRIMARY PROGRESSIVE MULTIPLE SCLEROSIS PATIENTS

INVESTIGADOR PRINCIPAL

Roberto Álvarez Lafuente

INVESTIGADORES COLABORADORES

Elena Urcelay García

María Inmaculada Domínguez Mozo

Laura Espino Paisán

Pilar López de Cotarelo

Silvia Pérez Pérez

María Ángel García Martínez

Adela González Jiménez

María Celeste García-Frontini Nieto

OBJETIVOS INICIALMENTE PLANTEADOS EN EL ESTUDIO

El objetivo principal del estudio es analizar la posible correlación entre los niveles de ácidos grasos de cadena corta (SCFA, de sus siglas en inglés) y ácido láctico con la presencia de EMPP a través de la comparación de sus niveles sistémicos en 100 pacientes con EMPP, 100 pacientes con EMRR y 100 controles sanos.

Los objetivos secundarios son analizar la posible correlación entre los niveles de SCFA y ácido láctico con:

1. La evolución de la enfermedad en pacientes con EMPP, a través de los siguientes parámetros clínicos:
 - 1.1. Progresión, según la puntuación de la Escala Ampliada del Estado de Discapacidad (EDSS, de sus siglas en inglés) en el momento del reclutamiento, y
 - 1.2. Severidad, por la Escala de Severidad de la Esclerosis Múltiple (MSSS, de sus siglas en inglés)
2. Género y edad, en pacientes con EMPP y EMRR y controles, y con la duración de la enfermedad, tratamiento y duración del tratamiento en pacientes con EMPP y EMRR.

Material y métodos

Pacientes

El objetivo fue medir en los mismos individuos los niveles de L-lactato y los ácidos grasos de cadena corta: acetato, butirato y propionato. Sin embargo, durante el estudio se observó que los requerimientos para la medida de lactato eran más exigentes que para los ácidos grasos de cadena corta. Estos últimos se mantienen estables y con niveles comparables en suero o plasma y en muestras que incluso han sufrido una descongelación previa. En el caso de la medida de lactato, analizamos las muestras estratificadas por tipo de muestra (suero o plasma) y por tratamiento de la muestra (descongelada previamente o no) y observamos diferencias entre los subgrupos, con niveles no comparables en suero y plasma, y niveles significativamente más bajos en muestras descongeladas previamente. Por ello, seleccionamos para los análisis posteriores las muestras de suero no descongeladas previamente: 30 pacientes PP, 13 pacientes RR, 7 pacientes SP y 11 controles. Se hizo también un subanálisis en muestras de plasma, con el objetivo de comparar los niveles con los obtenidos en suero, pero en este caso el tamaño de muestra fue más pequeño y poco concluyente: 12 pacientes PP, 5 pacientes RR y 3 controles.

Reactivos

Las muestras se midieron con el kit L-Lactate assay (ab65331, Abcam, Cambridge, Reino Unido) siguiendo el protocolo del fabricante. Las lecturas se obtuvieron en un lector de ELISA (Tecan Sunrise). La cuantificación de los ácidos grasos de cadena corta (acetato, propionato y butirato) se realizó mediante cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas; todo el proceso se llevó a cabo en el Centro de Apoyo a la Investigación de Espectrometría de Masas de la Facultad de Ciencias Químicas de la Universidad Complutense de Madrid, Unidad de Apoyo a la Investigación de nuestro Instituto de Investigaciones Sanitarias (IdISSC).

Análisis estadístico

Se recopilaron datos de lactato en suero, niveles de ácidos grasos de cadena corta y variables clínicas (edad al inicio de la enfermedad, duración de la enfermedad, EDSS, nº de brotes). Se eliminaron valores extremos dentro de cada grupo con el test de Grubbs proporcionado por GraphPad Prism (<https://www.graphpad.com/quickcalcs/grubbs1/>) y se evaluó el ajuste de las variables a una distribución normal con el test de Kolmogorov-Smirnov (SPSS v15.0). Aquellas variables que se ajustaban a una distribución normal se estudiaron con los test t de Student y ANOVA. Aquellas que no se ajustaban a una distribución normal se analizaron con los test U de Mann-Whitney y K de Kruskal-Wallis.

Las correlaciones se calcularon mediante el coeficiente de Pearson.

Para los análisis estadísticos y las representaciones gráficas se utilizaron los programas SPSS v15.0 y GraphPad Prism 5.0.

Resultados y relación con la bibliografía previa

1. Comparación de los niveles de lactato en suero entre controles y pacientes RR y PP

El grupo de pacientes RR presenta los niveles más altos de lactato en suero (media= 6.33 nmol/ μ l suero), notablemente más altos que controles (media= 3.1 nmol/ μ l suero) y también más altos que los pacientes PP (media= 4.34 nmol/ μ l suero). Los pacientes PP tienen niveles más bajos de lactato en suero comparados con los pacientes RR, y más altos que en controles, aunque la tendencia se queda al borde de la significación estadística (figura 1).

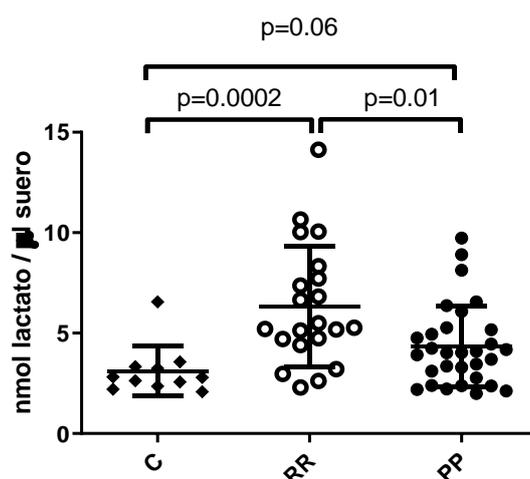


Figura 1. Concentración de lactato en suero en controles (C, n=11), pacientes con esclerosis múltiple remitente recurrente (RR, n=21) y con esclerosis múltiple primaria progresiva (PP, n=30).

Los niveles de lactato en suero en pacientes de EM se han estudiado principalmente en tres estudios en los últimos diez años, y muestran resultados muy prometedores como biomarcador: un estudio multicéntrico con la mayor cohorte de pacientes estudiada hasta la fecha (Amorini A, 2014); un estudio con 60 pacientes de EM y sin grupo control, cuyo objetivo era correlacionar los niveles de lactato con parámetros de imagen (Castellazzi M, 2019) y un estudio reciente con 80 pacientes y 30 controles en el que se analizaban los niveles de lactato y su correlación con variables clínicas y parámetros de imagen (Esmael A, 2021).

Los estudios de Amorini *et al* y Esmael *et al*, que cuentan con cohortes de pacientes y controles, detectaron niveles de lactato en suero entre 2 y 3 veces más altos en pacientes con EM comparados con controles. En nuestro análisis, los grupos de pacientes RR y SP presentan niveles entre 2 y 3 veces más altos que controles, y los pacientes PP niveles aproximadamente 1.5 veces más altos.

Una diferencia de nuestros resultados con respecto a los citados estudios es que, en ambos, los niveles de lactato en suero en pacientes PP son más altos que en pacientes RR, mientras que en nuestro caso los pacientes PP registran niveles más bajos que los pacientes RR. En el estudio de Esmael *et al*, con un tamaño muestral de 50 pacientes, solo disponen de datos de lactato en suero de 2 pacientes con forma clínica PP, de modo que sus resultados no resuelven esta pregunta. En este sentido, nuestra cohorte está mejor seleccionada pues se diseñó con el

objetivo de estudiar principalmente la forma clínica primaria progresiva. Sin embargo, el estudio multicéntrico de Amorini *et al* (2014), que cuenta con una cohorte de pacientes PP bien dimensionada, presenta niveles de lactato en suero en pacientes PP ligeramente más altos que en pacientes RR.

Ante esta diferencia entre nuestros resultados y los del estudio de Amorini *et al* (2014), reanalizamos los datos separando las formas clínicas secundaria progresiva (SP, agrupada en la figura 1 con la forma remitente recurrente) y progresiva recurrente (PR, agrupada en la figura 1 con la forma primaria progresiva). En este análisis desglosado se observa que los pacientes SP tienen niveles significativamente más altos de lactato en suero que los pacientes PP, y también muestran una tendencia a tener niveles más altos que los pacientes RR (figura 2).

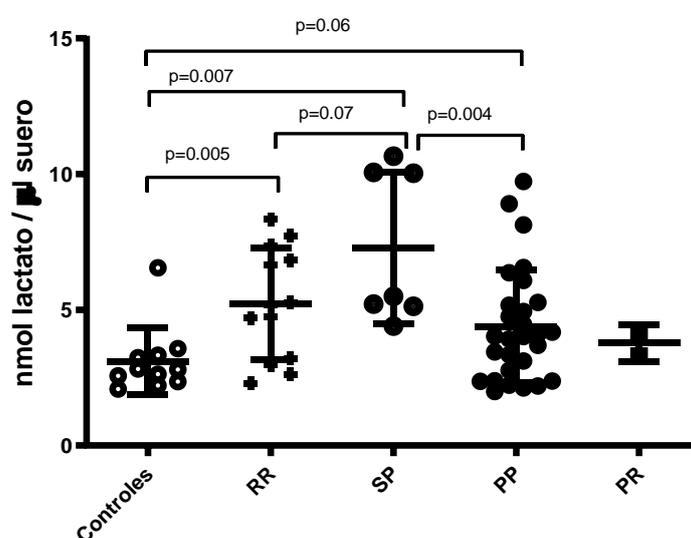


Figura 2. Concentración de lactato en suero separando las formas clínicas secundaria progresiva y progresiva recurrente. Controles (C, n=11), pacientes con esclerosis múltiple remitente recurrente (RR, n=13), con esclerosis múltiple secundaria progresiva (SP, n=7), con esclerosis múltiple primaria progresiva (PP, n=28) y pacientes con esclerosis múltiple progresiva recurrente (PR, n=2).

Cabe destacar que al analizar por separado los pacientes SP y los RR no existe diferencia estadísticamente significativa en los niveles de lactato entre los pacientes RR y PP, mientras que se observa una diferencia estadísticamente significativa o una tendencia a la significación entre los pacientes con forma SP y el resto. Esto es interesante puesto que en el estudio de Amorini *et al* los pacientes EM con forma SP también mostraban los niveles más altos de lactato en suero, por encima de los pacientes RR y PP. Sin embargo, dado que nuestro estudio estaba enfocado a evaluar los pacientes PP en relación con controles y pacientes RR, el grupo de pacientes SP es reducido y convendría aumentarlo para corroborar las diferencias que se ven en este análisis. Atendiendo a este interesante resultado, y dada la tendencia a la significación observada entre los pacientes PP y los controles sanos, nuestro grupo se ha propuesto reclutar nuevos pacientes para ampliar el tamaño muestral de cara a la publicación de los resultados.

2. Correlaciones entre los niveles de lactato y variables clínicas

En la cohorte de pacientes se dispone de los siguientes datos clínicos: EDSS en el momento de recogida de la muestra, nº de brotes desde el inicio de la enfermedad hasta la recogida de la muestra, edad de comienzo de la enfermedad y duración de la misma hasta el momento de la toma de muestra. Se observa una correlación positiva entre los niveles de lactato y la duración de la enfermedad en el grupo de pacientes PP ($R^2= 0.414$, $p= 0.032$). Es decir, los niveles de lactato en suero son más altos en aquellos pacientes PP que llevan más tiempo con la enfermedad. En el resto de variables no se observan correlaciones significativas.

Los estudios previos detectaron una correlación entre los niveles de lactato en suero y un mayor EDSS (Amorini et al, 2014; Esmael et al, 2021), pero en nuestro estudio no observamos diferencias estadísticamente significativas (correlación en el grupo RR: $R^2= 0.136$, $p= 0.56$; correlación en el grupo PP: $R^2= -0.071$, $p= 0.73$). Aunque esto pudiera deberse a un menor tamaño muestral, otros estudios observaron diferencias con cohortes pequeñas. Deberían plantearse nuevas validaciones de esta correlación para intentar esclarecer si el nivel de lactato en suero puede ser un buen marcador pronóstico o si su eficacia pueda estar influida por otras variables como la historia terapéutica del paciente (tratamientos, respuesta a los mismos), el tiempo de avance de la enfermedad (con el que sí observamos correlación en el grupo PP), la técnica utilizada para determinar el lactato en suero (los tres estudios referidos en la bibliografía utilizan técnicas distintas), etc.

3. Niveles de lactato en suero y plasma

Cuando se analizan suero y plasma de distintos pacientes, no se observa que los niveles de lactato en suero y en plasma correlacionen bien. Por ello se ha decidido analizar las muestras de suero, al disponer de más individuos en cada categoría y porque el análisis de este metabolito en suero tiene un mayor respaldo en la literatura consultada.

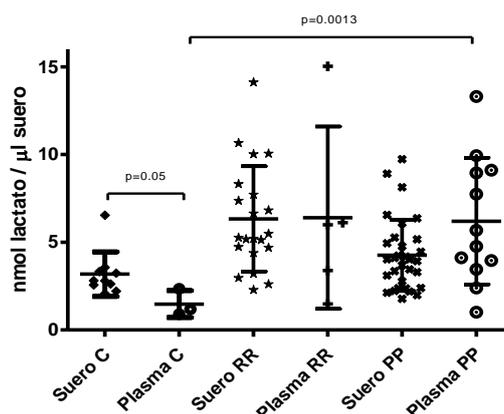
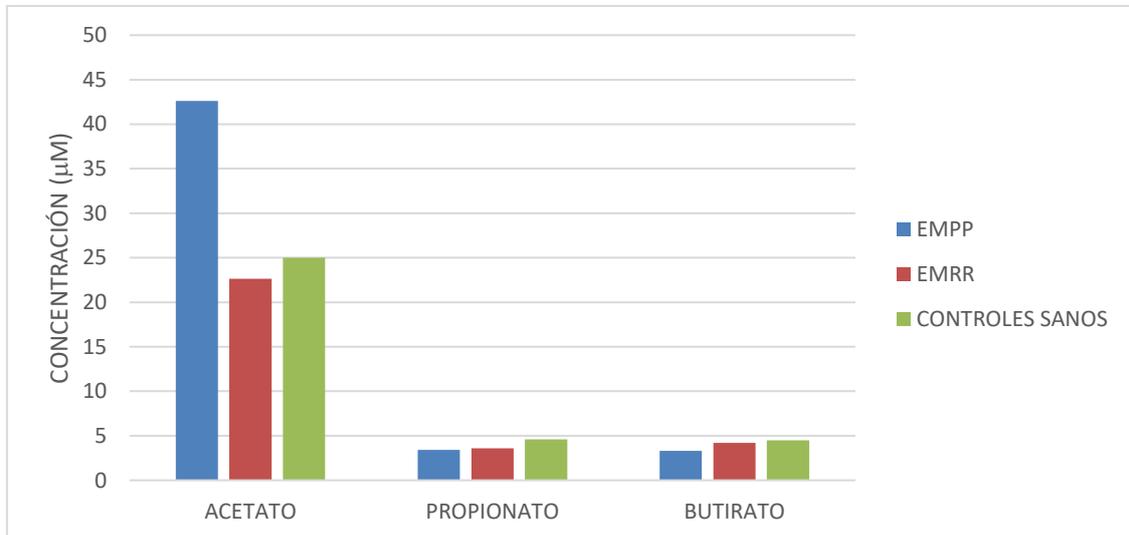


Figura 3. Concentración de lactato en muestras de suero y plasma de distintos pacientes. Controles en los que se ha medido suero (Suero C, $n=11$) y plasma (Plasma C, $n=3$); pacientes con esclerosis múltiple remitente recurrente en los que se ha medido suero (Suero RR, $n=21$) y plasma (Plasma RR, $n=5$); pacientes con esclerosis múltiple primariamente progresiva en los que se ha medido suero (Suero PP, $n=30$) y plasma (Plasma PP, $n=12$).

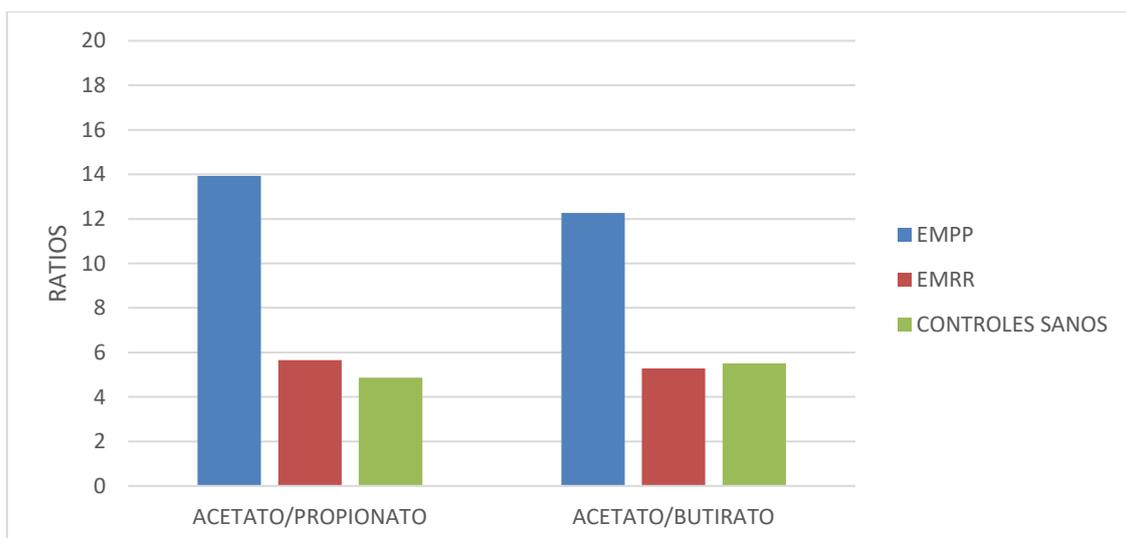
4. Niveles de ácidos grasos de cadena corta en pacientes RR, PP y controles

Cuando se analizaron los niveles de acetato, propionato y butirato en estas tres poblaciones, encontramos los siguientes resultados:



Observamos que los niveles de acetato estaban significativamente elevados entre los pacientes EMPP en comparación con los pacientes EMRR ($p < 0,0001$) y los controles sanos ($p < 0,0001$). Además, los niveles de propionato y de butirato estaban significativamente más bajos en los pacientes EMPP que en los controles sanos ($p < 0,0002$ y $p = 0,038$, respectivamente).

Puesto que se ha descrito que el acetato tiene un perfil más proinflamatorio, mientras que el propionato y el butirato tendrían características antiinflamatorias (Pérez-Pérez S, et al.; Cuello JP, et al.; Dominguez-Mozo MI, et al.), analizamos los ratios acetato/propionato y acetato/butirato. Los resultados obtenidos fueron los siguientes:



El ratio acetato/propionato y acetato/butirato estaba significativamente más elevado entre los pacientes de EMPP que en los pacientes EMRR y los controles sanos ($p < 0,0001$ en ambos casos).

5. Correlaciones entre los niveles de ácidos grasos de cadena corta y las variables clínicas

Cuando analizamos las posibles correlaciones entre los niveles de los ácidos grasos de cadena corta y las variables clínicas en los pacientes de EMPP y EMRR, observamos que:

- No existía una correlación estadísticamente significativa de los niveles de ácidos grasos de cadena corta ni de los ratios con el sexo, con la edad de los pacientes EMPP, la duración de la enfermedad o el grado de discapacidad.
- En cuanto a los pacientes de EMRR, no se observaron tampoco diferencias estadísticamente significativas ni en cuanto a los niveles de los ácidos grasos de cadena corta ni de los ratios de los mismos con el sexo, la edad o la duración de la enfermedad. Lo que sí se observaron fueron unos niveles significativamente más elevados de acetato y del ratio acetato/propionato entre los pacientes EMRR con EDSS más elevado (EDSS>4.0) en comparación con los pacientes EMRR con EDSS más bajos (EDSS<2.0). Tal y como se ha descrito previamente en la bibliografía (Pérez-Pérez S, et al; Dominguez-Mozo MI, et al.)

6. Análisis conjunto de los niveles de lactato y ácidos grasos de cadena corta

Se calcularon los coeficientes de correlación entre los niveles de lactato de cada individuo y los niveles de acetato, butirato, propionato, y las ratios acetato/propionato y acetato/butirato, estratificando la población de dos formas:

- en controles, y pacientes RR y PP
- en controles y pacientes de EM en general

No se observan correlaciones estadísticamente significativas dentro de los grupos de pacientes de EM (RR y PP).

Conclusiones

Por tanto, podemos concluir que los niveles de lactato parecen estar más elevados en los pacientes con EMPP que en los controles sanos, si bien sería deseable aumentar el número de pacientes reclutados para confirmar esta tendencia encontrada. Dentro de los pacientes EMRR, los pacientes que se encuentran en una fase SP, es decir, en una fase ya progresiva de la enfermedad, tenían niveles de lactato significativamente más elevados. Todo ello, por tanto apunta a una posible asociación entre progresión en la EM y niveles elevados de lactato.

En cuanto a los ácidos grasos de cadena corta, los niveles de acetato, así como de los ratios acetato/propionato y acetato/butirato, están significativamente elevados en los pacientes EMPP en comparación con los pacientes EMRR y controles sanos. Estos resultados parecen indicar que la microbiota intestinal, a través de algunos de sus metabolitos, como los ácidos grasos de cadena corta, podrían también estar contribuyendo a los mecanismos implicados en la progresión de la EM.

Referencias bibliográficas

Amorini AM, Nociti V, Petzold A, Gasperini C, Quartuccio E, Lazzarino G, Di Pietro V, Belli A, Signoretti S, Vagnozzi R, Lazzarino G, Tavazzi B. (2014). Serum lactate as a novel potential biomarker in multiple sclerosis. *Biochim Biophys Acta*. 1842 (7):1137-43.

Castellazzi M, Patergnani S, Donadio M, Giorgi C, Bonora M, Fainardi E, Casetta I, Granieri E, Pugliatti M, Pinton P. (2019). Correlation between auto/mitophagc processes and magnetic resonance imaging activity in multiple sclerosis patients. *J Neuroinflammation*, 27;16(1):131

Esmael A, Talaat M, Egila H, Eltoukhy K. (2021) Mitochondrial dysfunction and serum lactate as a biomarker for the progression and disability in MS and its correlation with the radiological findings. *Neurol Res*. 43(7):582-590.

Pérez-Pérez S, Domínguez-Mozo MI, Alonso-Gómez A, Medina S, Villarrubia N, Fernández-Velasco JI, García-Martínez MÁ, García-Calvo E, Estévez H, Costa-Frossard L, Alvarez-Cermeño JC, Luque-García JL, Arroyo R, Villar LM, Alvarez-Lafuente R. Acetate correlates with disability and immune response in multiple sclerosis. *PeerJ* 2020;8:e10220.

Cuello JP, Martínez Ginés ML, García Domínguez JM, Tejeda-Velarde A, Lozano Ros A, Higuera Y, Meldaña Rivera A, Goicochea Briceño H, Garcia-Tizon S, de León-Luis J, Medina Heras S, Fernández Velasco JI, Pérez-Pérez S, García-Martínez MÁ, Pardo-Rodríguez B, Domínguez-Mozo MI, García-Calvo E, Estévez H, Luque-García JL, Villar LM, Alvarez-Lafuente R. Short-chain fatty acids during pregnancy in multiple sclerosis: A prospective cohort study. *Eur J Neurol* 2022;29(3):895-900.

Dominguez-Mozo MI, Perez-Perez S, Villarrubia N, Costa-Frossard L, Fernandez-Velasco JI, Ortega-Madueño I, Garcia-Martinez MA, Garcia-Calvo E, Estevez H, Luque Garcia JL, Torrejon MJ, Arroyo R, Villar LM, Alvarez-Lafuente R. Herpesvirus Antibodies, Vitamin D and Short-Chain Fatty Acids: Their Correlation with Cell Subsets in Multiple Sclerosis Patients and Healthy Controls. *Cells* 2021;10(1):119.