

## MEMORIA FINAL PROYECTO EME-REEM 2023

**Título del proyecto:** Asociación de los niveles de GFAP y NFL en suero con el daño neuroaxonal y la progresión en la esclerosis múltiple.

**Investigadora principal:** Dra. Sara Llufríu, Hospital Clínic de Barcelona, IDIBAPS.

**Investigadores colaboradores:** Alberto Calvi, Yolanda Blanco Morgado, María Sepúlveda Gázquez, Elisabeth Solana Díaz, Eloy Martínez de las Heras, Elisabeth López Soley, Salut Alba Arbalat, Francesc Vivó Pascual, José María Cabrera Maqueda, Elianet Fonseca, Ferrán Prados Carrasco. Laura Naranjo.

### RESUMEN DE LOS RESULTADOS (lenguaje divulgativo):

La EM ha sido descrita como la enfermedad de las mil caras, ya que los síntomas y su evolución pueden ser muy diversos. Es esencial contar con biomarcadores que nos permitan predecir su evolución. Este proyecto tiene el objetivo de entender mejor como avanza la EM y encontrar biomarcadores predictivos de la evolución a través de la neuroimagen y el estudio de varias proteínas sanguíneas (NFL y GFAP).

Gracias al soporte del proyecto EME-REEM hemos podido estudiar el impacto de la presencia de lesiones crónicas activas identificadas mediante resonancia magnética para predecir el acúmulo progresivo de la discapacidad (PIRA, en sus siglas en inglés). Dicho estudio ha analizado las resonancias magnéticas de 131 pacientes con EM buscando la presencia de lesiones crónicas activas, que aumentan de tamaño de forma progresiva (“slowly expanding lesions”) y caracterizado la gravedad del daño de la mielina y los axones en estas lesiones. Pudimos observar que estas lesiones presentan un daño más severo del tejido, que puede visualizarse a través de técnicas complejas de resonancia magnética como la imagen por difusión, tanto en su zona central como alrededor, mientras que el resto de las lesiones tienen un menor daño que no cambia a lo largo del tiempo. Estas características de las lesiones se relacionan con un mayor riesgo de progresión de la discapacidad. El 22% de los pacientes incluidos en el estudio desarrollaban una progresión de los síntomas a lo largo de los siguientes 10 años y los hallazgos en resonancia se relacionaban con una mayor probabilidad de empeoramiento. Estos resultados permiten conocer la importancia de la presencia de lesiones crónicas activas, y pueden ayudar a identificar aquellos pacientes que presenten un mayor riesgo de mala evolución y por tanto a adecuar la actitud terapéutica y su seguimiento. Actualmente estamos trabajando en combinar la información de la resonancia magnética con los niveles de biomarcadores en sangre (GFAP y NFL) para crear mejores modelos predictivos de la evolución de la EM a través de una colaboración multicéntrica con investigadores de la red europea MAGNIMS.

## **OBJETIVOS PROPUESTOS:**

### **Objetivos:**

Conocer la relación entre los valores de proteína ácida fibrilar glial (GFAP, en sus siglas en inglés) y neurofilamentos de cadena ligera (NFL) en suero con el daño neurodegenerativo de la EM medido a través de la neuroimagen y su asociación con la evolución clínica. Estudiaremos si la relación entre los biomarcadores en suero y la neuroimagen es distinta para la EM secundariamente progresiva (EMSP), de los pacientes con EM remitente-recidivante (EMRR).

Los objetivos específicos de este proyecto son los siguientes:

1.1 Conocer la relación entre los valores de GFAP y NFL en suero con el daño neurodegenerativo medido a través de la neuroimagen cerebral y de tomografía óptica de coherencia.

Para ello, se evaluará la asociación entre los valores en suero de los biomarcadores y su cambio con la presencia y volumen de las lesiones crónicas activas, la pérdida de volumen cerebral y medular, y los valores de la imagen de difusión a lo largo del tiempo. También se asociarán los biomarcadores en suero con el grosor de la capa de fibras de la retina obtenida a través de la tomografía óptica de coherencia.

1.2 Evaluar si los valores de biomarcadores en suero y si la asociación entre los biomarcadores y el daño neurodegenerativo en neuroimagen difiere entre los pacientes con EMSP de los pacientes con EMRR, y también entre los pacientes con EMRR con discapacidad moderada (alto riesgo de progresión) y pacientes con EMRR con discapacidad baja.

1.3 Estudiar la capacidad de los biomarcadores en suero y de imagen de forma conjunta para predecir la evolución de la discapacidad en el tiempo. Desarrollar y aplicar umbrales de los biomarcadores que se relacionen con la evolución de la enfermedad.

### **Métodos:**

El grupo de investigación ha reclutado a los participantes en el estudio y recogido la información clínica necesaria a través de bases de datos de estudios observacionales del grupo considerando como aspecto principal la progresión de la discapacidad. Hemos podido estudiar a un grupo de 131 pacientes, con un seguimiento medio de 10 años desde la primera adquisición de RM.

Hemos cuantificado la presencia de lesiones crónicas activas o “slowly expanding lesions-SELS” gracias a la colaboración del Dr. Ferrán Prados, ingeniero de la University of Central London, y los ingenieros del grupo, a través del análisis del cambio de volumen lesional a lo largo del tiempo (en 3 resonancias magnéticas por participante). Utilizando el criterio aceptado para la definición de las SELs cuantificamos el número de lesiones con una expansión clara o “definite SELs”, una expansión que no alcanza el criterio definitorio o

“probable SELs” y las lesiones sin expansión o “non-SELs”. En cada grupo de lesiones calculamos los valores de anisotropía fraccional (FA, en sus siglas en inglés) y otros índices con la imagen de difusión en la imagen de DTI, que informan sobre el daño tanto desmielinizante como axonal del tejido cerebral en 3 tiempos a lo largo del estudio tanto en la zona central como en el borde-core de la lesión. También analizamos los valores de atrofia global cerebral (NBV), el porcentaje de pérdida de volumen cerebral anual entre la primera y tercera resonancia magnética

Cuantificamos la evolución de la discapacidad a través de diversas medidas, como el EDSS (Escala de Kurtzke) y el Multiple Sclerosis Functional Composite (MSFC). El MSFC está formado por unos componentes que evalúan la agilidad manual (9HPT), la velocidad de la marcha (T25FW) y la atención y velocidad de procesamiento de la información (PASAT y SMDT).

En la actualidad estamos cuantificando los valores de NFL y GFAP mediante la tecnología Simoa en muestras de suero que se obtuvieron en la primera adquisición de resonancia magnética y en la última visita realizada durante los años 2023-2024. Utilizaremos modelos estadísticos combinando la información del daño neurodegenerativo como la presencia y severidad de las SELs, la atrofia cerebral y retiniana con los valores de dichos biomarcadores y la información clínica (número de brotes, discapacidad inicial, edad, tratamiento modificador de la enfermedad) para evaluar la predicción del incremento de la discapacidad. Dichos modelos se explorarán en aquellos pacientes que presentan PIRA y en pacientes que presentan una forma remitente recurrente de la enfermedad sin progresión de la discapacidad. Para incrementar el poder predictivo hemos solicitado la colaboración de otros centros de investigación que pertenecen a la red europea MAGNIMS (Magnetic Resonance in Multiple Sclerosis) y estamos recopilando la información de resonancia magnética, los niveles de biomarcadores y la información clínica de otros 5 centros (Dr. Barkhof en Amsterdam, Dra. Rocca en Milán, Dra. Ciccarelli en Londres, Dr. Enzinger en Graz y Dr. Groppa en Mainz).

### **Resultados de los análisis que se han realizado hasta el momento, centrados en la resonancia magnética:**

De los pacientes incluidos en el estudio, 29 habían presentado una progresión de la discapacidad independiente de los brotes (PIRA, en sus siglas en inglés) mientras que 102 no habían presentado dicha progresión al final del seguimiento (media de 10 años).

La **Tabla 1** informa de los resultados demográficos, clínicos y de neuroimagen de los participantes.

Los pacientes que presentan PIRA tienen una mayor duración de la enfermedad, mayor edad y discapacidad basal así como un menor volumen cerebral. A nivel basal el número de lesiones SELs y el daño global del tejido parece ser similar.

**Table 1.** Demographic and clinical measures in the PIRA and non-PIRA group

	<b>Whole cohort (n=131)</b>	<b>PIRA (n=29)</b>	<b>Non-PIRA (n=102)</b>	<b>P- value*</b>
Female, n (%)	94 (72 %)	24 (83%)	70 (69%)	0.136
Disease duration, median (IQR) years	6.7 (2.6, 12.4)	11.4 (6.2, 15.7)	5.6 (2.5, 12.5)	<b>0.016</b>
Age, median (IQR) years	40.7 (33.8, 49.1)	47.2 (43.5, 52.6)	38.6 (33.2, 46.1)	<b>0.001</b>
<b>Clinical</b>				
EDSS baseline, median (IQR)	1.5 (1.0, 2.0)	2.5 (1.5, 4.5)	1.5 (1.0, 2.0)	<b>&lt;0.001</b>
EDSS change, median (IQR)	0 (1.0, 2.0)	1.5 (0.5, 4.5)	0.0 (-1.0, 3.0)	<b>&lt;0.001</b>
MSFC z-score baseline, mean (SD)	0.2 (0.5)	0.1 (0.5)	0.3 (0.5)	<b>&lt;0.001</b>
9HPT z-score baseline, mean (SD)	0.3 (0.7)	0.2 (1.0)	0.4 (0.6)	0.531
T25FW z-score baseline, mean (SD)	0.5 (0.2)	0.4 (0.3)	0.5 (0.2)	<b>&lt;0.001</b>
PASAT z-score baseline, mean (SD)	-0.2 (1.2)	-0.3 (1.4)	-0.2 (1.2)	0.730
SDMT z-score baseline, mean (SD)	0.3 (1.1)	0.1 (1.1)	0.4 (1.0)	0.347
<b>MRI volumetric</b>				
NBV, mean (SD), ml	1465.8 (79.4)	1437.2 (89.0)	1474.0 (74.9)	<b>0.049</b>
NLV, mean (SD), ml	9.6 (12.1)	12.7 (13.8)	8.8 (11.5)	0.057
PBVC (annualised), median (IQR) (%)	-0.37 (-0.63, -0.16)	-0.61 (-0.53, -0.14)	-0.35 (-0.53, 0.91)	<b>0.001</b>
Lesion count (global), median (IQR)	31 (18, 46)	34 (27, 50)	30 (17, 42)	0.060
Lesion count by type, median (IQR)				
Non-SELS	18 (10, 31)	23 (17, 35)	18 (9, 30)	0.051
Possible SELs	8 (4, 15)	11 (5, 16)	8 (4, 14)	0.209
Definite SELs	2 (0.5, 4.5)	2 (1, 4)	2 (0, 5)	0.396
Volumes by type, mean (SD), ml				
Non-SELS	4.5 (7.2)	5.8 (8.2)	4.1 (6.9)	0.125
Possible SELs	1.2 (1.8)	1.5 (1.4)	1.1 (1.9)	<b>0.047</b>
Definite SELs	1.3 (2.9)	2.0 (4.0)	1.1 (2.4)	0.219
<b>MRI diffusivity</b>				
FA in NAWM, mean (SD)	0.59 (0.14)	0.57 (0.15)	0.60 (0.13)	0.089
FA in Lesion Core, mean (SD)	0.38 (0.05)	0.37 (0.04)	0.38 (0.05)	0.323
FA in Lesion Edge, mean (SD)	0.43 (0.05)	0.43 (0.05)	0.43 (0.05)	0.688

\*PIRA and no PIRA groups were tested and the corresponding p-value is reported using the Wilcoxon signed rank test for the continuous variables and the X-squared test for the categorical variables.

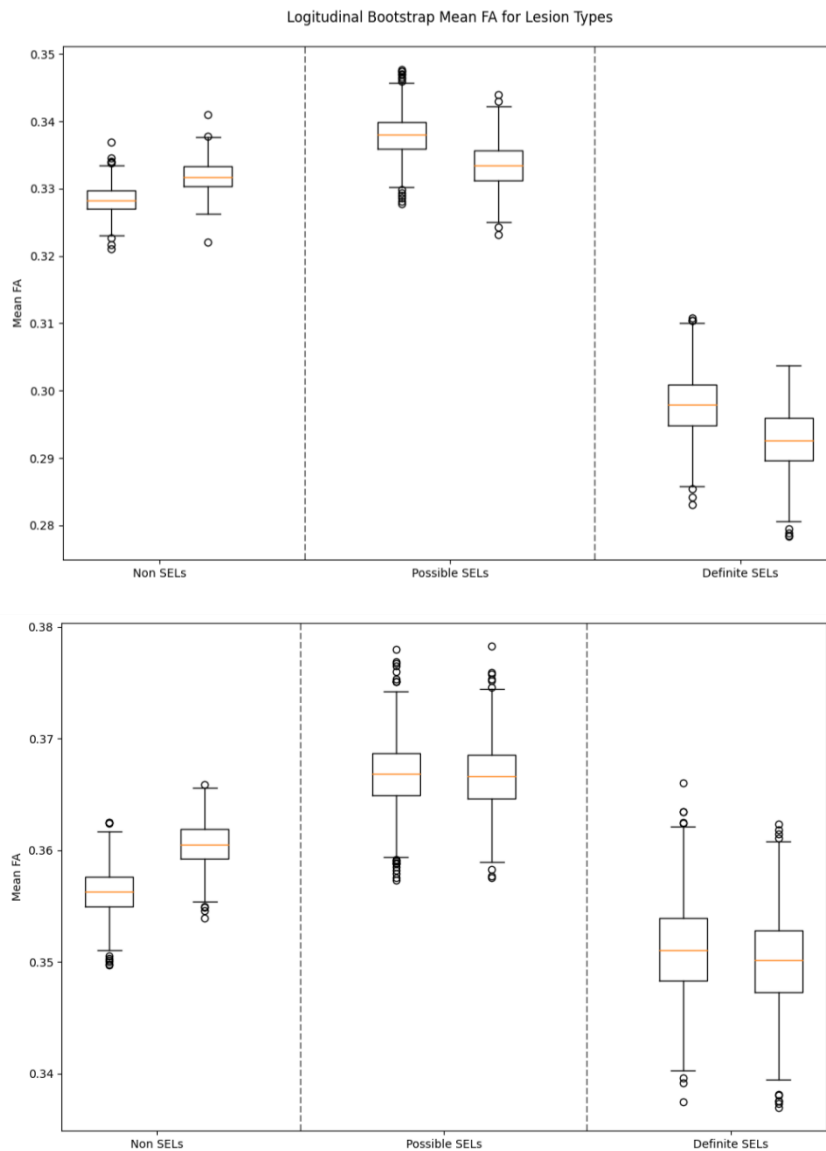
Variables correspond to the baseline time point except for those indicated as change. Abbreviations:

FA = fractional anisotropy, SEL = slowly expanding lesion, NAWM = normal-appearing white matter,

PBVC = percentage brain volume change, EDSS = Expanded Disability Status Scale

Al analizar las características del tejido subyacente a través del DTI en las lesiones vimos que las definite-SELS tenían un daño más severo que el resto de las lesiones, tanto en la zona central como en el borde. En el análisis longitudinal estas lesiones tenían unas características específicas en que el borde seguía presentando un empeoramiento del daño del tejido mientras que en el resto de las lesiones no existían cambios o incluso los valores de DTI mejoraban (**Figura 1**).

**Figure 1.** Lesion level FA distribution within core & edge



**Figure 1** shows the distribution of bootstrap-computed mean FA values for all lesion categories (i.e. non-SELS, possible SEL and definite SELs), comparing baseline and final follow-up measurements. For each lesion category, a pair of boxplots is presented: the left boxplot represents the baseline data, and the right boxplot shows the final follow-up, both derived using bootstrap methods. This layout facilitates a direct comparison of bootstrap mean FA values within each lesion category over time and across different lesion types.

Evaluamos la asociación entre los cambios en los valores de DTI de las SELs a lo largo del tiempo con la discapacidad y observamos una asociación estadísticamente significativa del daño microestructural de estas lesiones con la discapacidad (ver **Tabla 2**).

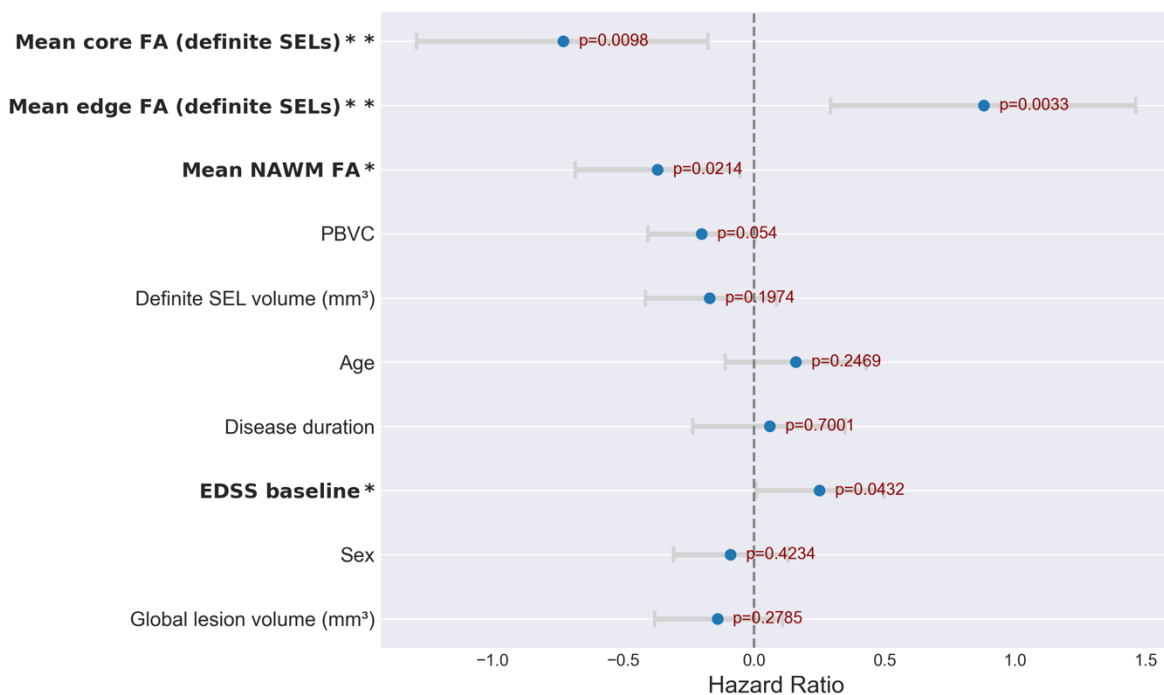
**Table 2.** Mixed-effects models assessing the clinical outcomes predicted by longitudinal FA change (core and edge) within definite SELs

Clinical outcome	FA change over time <sup>a</sup>	
	Beta coeff., 95% CI, P values	
	Core – definite SELs	Edge – definite SELs
EDSS	-0.01 (-0.04 – 0.01), p=0.177	-0.01 (-0.03 – 0.01), p=0.585
MSFC z-score	0.03 (0.01 – 0.05), <b>p=0.003</b>	0.03 (0.01 – 0.07), <b>p=0.008</b>
9HPT z-score	0.08 (0.02 – 0.14), <b>p=0.009</b>	0.08 (0.02 – 0.14), <b>p=0.011</b>
T25FW z-score	0.02 (0.01– 0.04), <b>p=0.005</b>	0.03 (0.01 – 0.04), <b>p&lt;0.001</b>
PASAT z-score	0.04 (0.01 – 0.07), <b>p=0.003</b>	0.05 (0.02 – 0.08), <b>p&lt;0.001</b>
SDMT z-score	0.04 (-0.01 – 0.07), p=0.057	0.04 (0.01 – 0.08), <b>p=0.043</b>

<sup>a</sup>Mixed-effects model using as the outcome the clinical variable and as a predictor the change over time in the diffusivity variable (interaction term with time), including as fixed effects the demographic variables (age, sex, disease duration), lesion volume and using as random effects the lesion and the subject-level identifiers, and the scanner protocol. All the models were applied to the subset of definite SELs.

Finalmente, en un modelo multivariante Cox analizamos los factores asociados a alcanzar el PIRA más pronto, y entre ellos destacaba el daño central y del borde de las lesiones SELs, la discapacidad basal y el daño microestructural del cerebro (sustancia blanca de apariencia normal) (**Figura 2**).

**Figure 2.** Time-to-event analysis to assess evolution to PIRA in relation to MRI diffusivity and volumetric measures.



**Figure 2** shows Cox's multivariate model showing the hazard ratios for time to reach PIRA using as predictors the MRI diffusivity and volumetric measures assessed at the first MRI follow-up (median interval time from baseline was 1 year), including mean FA within definite SELs in the core and the edge, mean NAWM FA, PBVC, total lesion volume.

**Conclusiones:**

Por tanto, el análisis actual ha permitido evidenciar un daño neurodegenerativo más severo en las lesiones que se expanden lentamente, o lesiones crónicas activas en los pacientes con EM. Las características del daño de dichas lesiones se relacionan con un mayor acúmulo de discapacidad a lo largo del tiempo y un mayor riesgo de alcanzar más pronto una progresión de la discapacidad. Estos resultados subrayan la importancia de detectar este tipo de lesiones. Además, es posible que la combinación de esta información con biomarcadores serológicos de daño neuroaxonal como NFL y GFAP pueda permitir obtener mejores modelos predictivos. Por ello, estamos analizando la información sobre biomarcadores en esta cohorte y pretendemos combinarla con la información de otras cohortes en centros europeos en un análisis multicéntrico lo cual podrá permitir aumentar la potencia del estudio y ayudar a que los resultados sean más generalizables.

## **ACCIONES DIVULGATIVAS:**

Los resultados iniciales han sido presentados en forma de comunicación oral en la LXXV Reunión Anual de la Sociedad Española de Neurología que tuvo lugar del 31 de octubre al 4 de noviembre de 2023 en Valencia. Título: Evolución de las medidas de difusión de las lesiones de expansión lenta (SEL) en la esclerosis múltiple. Autores: Calvi - , Alberto 1 ; Martinez- Heras , Eloy 1 ; Lopez- Soley , Elisabet 1 ; Elisabeth , Solana 1 ; Francesc , Vivó 1 ; Alba-Arbalat , Salut 1 ; Sepulveda , Maria 1 ; Cabrera- Maqueda , José Maria 1 ; Fonseca , Elianet 2 ; Kanber , Baris 3 ; Prados Carrasco, Ferran 4 ; Saiz , Albert 1 ; Blanco , Yolanda 1 ; Llufríu Duran, Sara 1 ; Centros: Hospital Clínic i Provincial de Barcelona 1 ; Sant Joan de Déu- Numancia 2 ; University College London (UCL) 3 ; Universitat Oberta de Catalunya 4.

También han sido presentados en el “Taller de neuroimagen” que organiza semestralmente nuestra unidad de EM. Se trata de un curso de resonancia magnética para neurólogos y radiólogos con interés en la EM. Los resultados se han presentado en la edición del 31 de mayo de 2024 por el Dr. Alberto Calvi.

Hemos preparado un artículo científico con los resultados presentados en esta memoria, titulado “Diffusivity signature of the slowly expanding lesions predicts progression independent of relapse activity in multiple sclerosis”, que ha sido enviado a la revista Multiple Sclerosis Journal para su revisión.