

INFORME FINAL PROYECTO DE EXCELENCIA MARÍA
JOSÉ CARRASCO MOTOS PARA LA INVESTIGACIÓN EN
LAS FORMAS PROGRESIVAS DE LA ESCLEROSIS
MÚLTIPLE

EME-REEM JUNIO 2021- JUNIO 2024

TÍTULO: IMPLEMENTACIÓN DE UN NUEVO
TRATAMIENTO PARA PACIENTES CON ESCLEROSIS
MÚLTIPLE PRIMARIAMENTE PROGRESIVA OF A NEW
TREATMENT FOR PATIENTS WITH PRIMARY
PROGRESSIVE MULTIPLE SCLEROSIS NOT CANDIDATES
TO CURRENT APPROVED THERAPIES.

CENTRO DE REALIZACIÓN DEL PROYECTO: Hospital Universitario Ramón y
Cajal.

INVESTIGADOR PRINCIPAL: Luisa María Villar Guimerans, Jefa de Servicio de
Inmunología.

GRUPO DE INVESTIGACIÓN:

Lucienne Costa-Frossard; Susana Sainz de la Maza Cantero; Enric Monreal Laguillo.
Servicio de Neurología.

Ernesto Roldan Santiago; Eulalia Rodríguez Martín Mercedes; Espiño Martínez,; José I
Fernández Velasco; Roberto Pariente Rodríguez; Paloma Lapuente Suanzes, Servicio de
Inmunología.

Miguel A. Rodríguez Sagrado; Ana M. Álvarez Díaz. Servicio Farmacia Hospitalaria

RESUMEN DIVULGATIVO

Este proyecto nos ha permitido abordar las diferencias entre distintos mecanismos inmunológicos que median el avance de la discapacidad en la EM primariamente progresiva y en la EMRR. Hemos visto el papel predominante de los linfocitos B en la EMPP inflamatoria y de la activación de la astrogliá y microglia en la EM PP con baja inflamación. Hemos descrito biomarcadores en suero (Cadena ligera de los neurofilamentos, proteína glial fibrilar ácida y chitinase 3 like 2) que nos pueden ayudar a diferenciar entre ambos tipos de enfermedad y los pueden identificar a los mejores candidatos a las terapias ya existentes y a los fármacos actualmente en fase de investigación (inhibidores de la BTK).

Además, hemos abordado en un modelo murino de inflamación la conveniencia de usar ácidos grasos de cadena corta antiinflamatorios (Propionato) para disminuir la inflamación en pacientes con EMPP poco inflamatorios, que podrían ser respondedores subóptimos a la terapia aprobada en la actualidad. Hemos visto que el propionato tiene propiedades antiinflamatorias en un entorno de inflamación aguda, pero actúa como un mediador de inflamación en un entorno poco inflamatorio. Estos datos desaconsejaron su uso en pacientes y demostraron la utilidad del modelo animal para valorar la actividad antiinflamatoria de los probióticos.

MEMORIA.

1. OBJETIVO 1. IDENTIFICACIÓN DE LAS DIFERENCIAS ENTRE PACIENTES CON EMPP CON ALTA Y BAJA ACTIVIDAD INFLAMATORIA.

En primer lugar, nos propusimos determinar el papel de la inflamación en la respuesta a ocrelizumab en la esclerosis múltiple primaria progresiva (EMPP). Realizamos un estudio prospectivo multicéntrico que incluyó 69 pacientes con EMPP que iniciaron tratamiento con ocrelizumab, clasificados según la presencia basal [Gd+, n=16] o ausencia [Gd-, n=53] de lesiones con realce de gadolinio en la RM cerebral. Diez pacientes Gd+ (62,5%) y 41 Gd- (77,4%) no mostraron evidencia de actividad de la enfermedad (NEDA), definida como ausencia de progresión de la discapacidad o de nuevas lesiones en la RM tras 1 año de tratamiento. Se caracterizaron las poblaciones de células inmunitarias de la sangre por citometría de flujo, las inmunoglobulinas séricas por nefelometría y las cadenas ligeras de neurofilamentos séricos (sNfL) por SIMOA. Los análisis estadísticos se corrigieron con la fórmula de Bonferroni.

Más del 60% de los pacientes alcanzaron NEDA tras un año de tratamiento, independientemente de sus características basales. En los pacientes Gd+, se asoció a una baja tasa de repoblación de células B inflamatorias acompañada de una reducción de los valores de sNfL 6 meses después de la primera dosis de ocrelizumab. En los pacientes del grupo Gd- también se vio una bajada del porcentaje de linfocitos B y los NfL tras el inicio del tratamiento, pero en estos pacientes la presencia de NEDA se asoció con una remodelación tolerogénica de los compartimentos de células T e inmunitarias innatas, y con un claro aumento de los niveles séricos de IgA.

Estos datos mostraron que la inflamación basal influye en qué vías inmunológicas predominan en los pacientes con EMPP. Las células B inflamatorias desempeñaron un papel fundamental en el grupo Gd+ y las células T inflamatorias y las células inmunitarias innatas en los pacientes Gd-. La depleción de células B puede modular ambos mecanismos.

OBJETIVO 2. EXPLORAR SI EL AUMENTO DE LOS NIVELES DE PROPIONATO EN SANGRE PUEDE REGULAR A LA BAJA LA RESPUESTA INMUNITARIA INNATA EN UN MODELO ANIMAL DE INFLAMACIÓN.

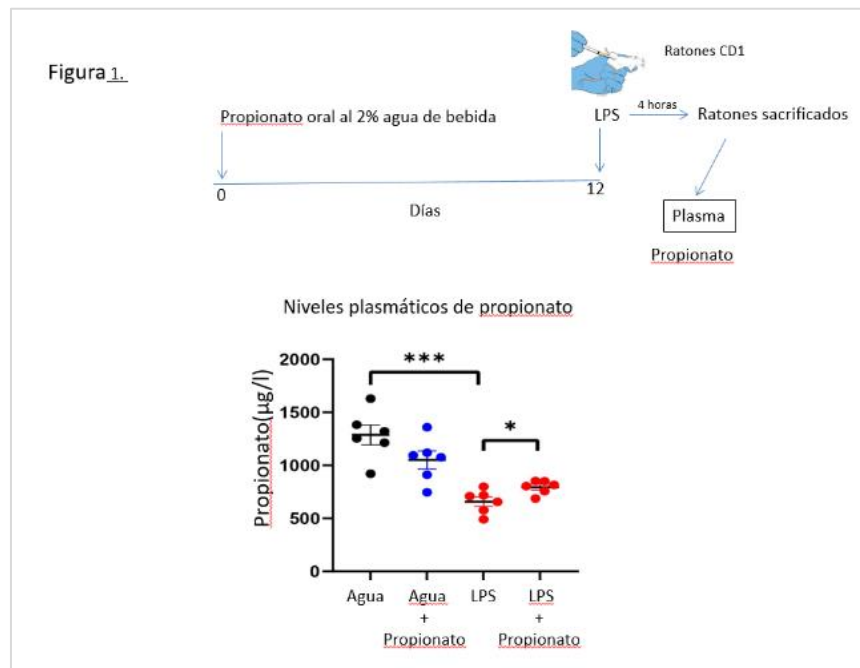
En el objetivo 2 utilizando ratones CD1 nos propusimos investigar si la administración oral de propionato modulaba la respuesta inmune innata en un modelo animal de neuroinflamación con LPS y establecer la dosis de propionato adecuada.

Tarea1: *Establecer la dosis adecuada.* Se administró el propionato en dosis de 2% en el agua de bebida durante 12 días (n=10). Como grupo control se utilizaron ratones que sólo ingirieron agua de bebida (n=10). Transcurrido ese tiempo, la mitad de los ratones (5 que ingirieron propionato y otros 5 que tomaron sólo agua de bebida) se trataron con una inyección intraperitoneal de LPS (*Escherichia coli*, 026:B6; Sigma): 2mg/kg. Los 2 grupos de ratones se sacrificaron 4 horas tras la inyección. Los otros 2 grupos (Controles no inflamatorios) se sacrificaron transcurrido el mismo tiempo.

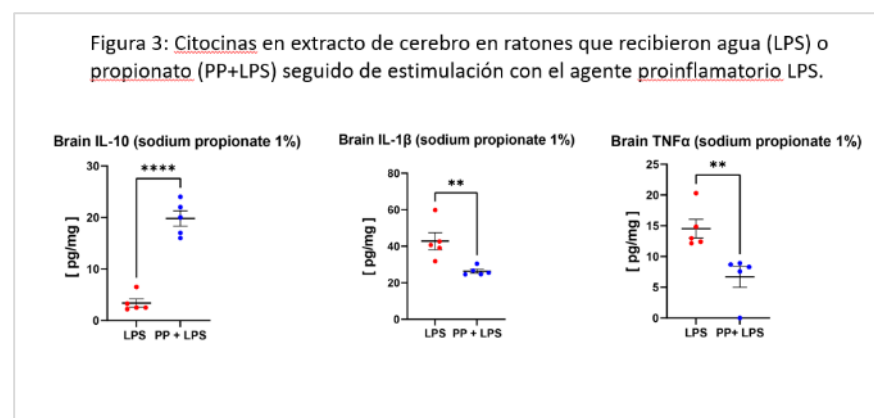
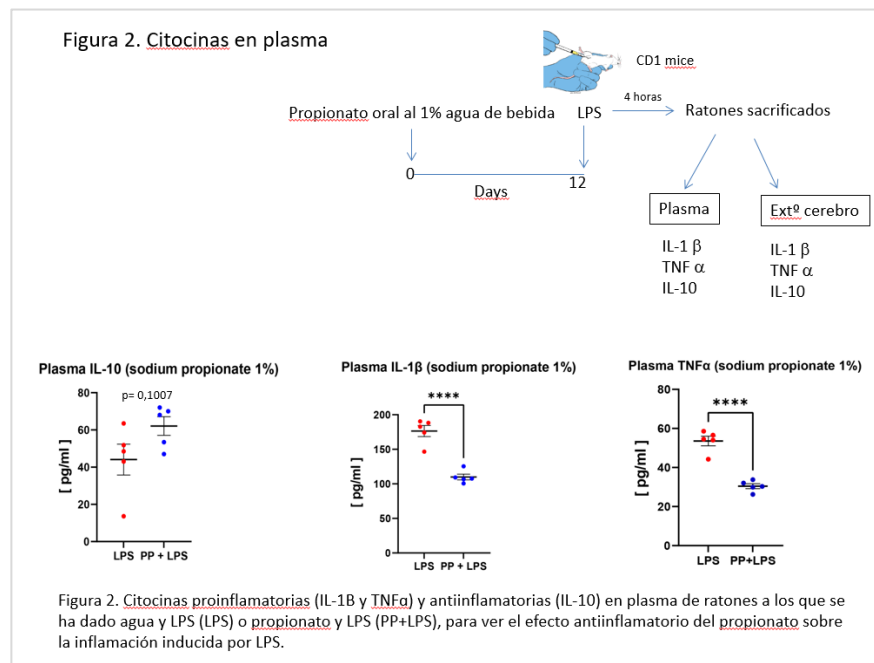
La administración oral de propionato no modificó significativamente el nivel de propionato en el plasma, respecto a los valores de los ratones que toman agua de bebida sin aditivos. Incluso aparece una tendencia a la baja en los ratones que toman propionato (Figura 1). Sin embargo, encontramos unos resultados que nos parecieron de alto interés. El LPS disminuyó significativamente el contenido de propionato en el plasma ($p < 0.001$) y la administración oral de propionato revertió parcialmente, pero de manera significativa ($p < 0.05$), el descenso de propionato inducido por LPS.

Por el contrario, al cuantificar las citoquinas inflamatorias en plasma mediante ELISA (RD Systems) observamos que la administración de propionato “per se” aumentaba los niveles de TNF- α en plasma.

En la literatura hay resultados diversos y algunos artículos señalan que el propionato puede ser inflamatorio. Pensamos que la dosis administrada en el esquema que habíamos propuesto al principio (2%) era demasiado alta y abordamos la segunda tarea bajando la dosis de propionato.



Tarea 2. Explorar el papel de la suplementación con propionato sódico sobre la respuesta inmune innata. Se repitió el mismo experimento detallado en la tarea 1, reduciendo la dosis de propionato a la mitad. Para ello administramos el propionato sódico al 1% en el agua de bebida durante 12 días. Los ratones CD1 ingirieron de 5 a 6 ml al día de una solución de propionato 0,104M, que corresponde a una dosis de 50mg de propionato sódico/ratón en la ingesta de 5 ml. Los ratones que bebieron agua sin propionato ingerían de 6 a 8 ml. Los ratones se trataron con inyección intraperitoneal de LPS o no según se detalla en la tarea 1. Tras el sacrificio de los ratones se midieron mediante ELISA citocinas solubles en plasma y en extractos de hipotálamo de los ratones sacrificados. En este caso no se midieron los niveles de propionato ya que apenas se había visto aumento con la dosis doble de propionato. Los resultados se muestran en las figuras 2 y 3. Cuando se administra junto al LPS el propionato reduce significativamente los valores de IL-1 beta y TNF alfa tanto en plasma como en el extracto de hipotálamo. Además, induce un aumento de los niveles de IL-10 en extractos de cerebro.



Estos datos demuestran el papel inmunomodulador del propionato en casos de inflamación aguda. Sin embargo, el hecho de que en situación basal el propionato aumentara los niveles de TNF alfa, nos hizo descartar su uso como agente tolerogénico en pacientes con EMPP poco inflamatoria. A pesar de ello, creemos que estos datos tienen un indudable interés científico ya que muestran que el efecto tolerogénico de algunos productos de la microbiota en inflamación aguda puede tornarse en proinflamatorio en condiciones de baja inflamación. Así mismo, estos resultados muestran la utilidad de los estudios de estos compuestos en modelo animal, para identificar posibles efectos paradójicos de estas moléculas.

Una vez descartado el estudio en pacientes, implementamos un nuevo objetivo para nuestro estudio, consistente en investigar el papel de distintos biomarcadores hemáticos para identificar a los pacientes con riesgo de progresión no asociada a inflamación, un problema importante en las formas progresivas de la enfermedad.

OBJETIVO 3. IDENTIFICACIÓN DE BIOMARCADORES ASOCIADOS CON LA PROGRESIÓN NO ASOCIADA A LA INFLAMACIÓN EN LA EM.

El riesgo de empeoramiento en la esclerosis múltiple puede asociarse a la inflamación aguda o no. Identificar a los pacientes en riesgo de una u otra progresión es muy importante. Puede indicar la respuesta a los distintos tratamientos e identificar la fase de la enfermedad en que se encuentra el paciente. Nuestro objetivo ha sido estudiar el papel de la combinación de los niveles séricos de cadena ligera de neurofilamentos (sNfL) y la proteína glial fibrilar ácida (sGFAP) para predecir el empeoramiento de la discapacidad en la esclerosis múltiple (EM). Para ello establecimos los valores normales de estas variables en una cohorte de 116 individuos sanos y la influencia de la edad, sexo e índice de masa corporal en las mismas. Como valores normales de sNfL se estableció un z-score de 1.5 en cualquier rango de edad. Como valores normales de GFAP se consideraron valores inferiores a 140 mg/dl para individuos más jóvenes de 55 años y de 280 pg/ml para aquellos con una edad superior.

Una vez establecidos los rangos de normalidad se inició un estudio multicéntrico en trece hospitales europeos. Se incluyeron pacientes con EM en los que se recogieron muestras de suero en los 12 meses siguientes al inicio de la enfermedad y antes de iniciar los tratamientos modificadores de la enfermedad (TME). Se utilizaron modelos de regresión multivariable para estimar el riesgo de empeoramiento asociado a la inflamación aguda (RAW) o independiente de ella (PIRA), y el riesgo de llegar a una puntuación de 3 en la Escala Expandida del Estado de Discapacidad (EDSS). De los 725 pacientes incluidos, la mediana de edad fue de 34,2 años siendo 509 pacientes (70,2%) mujeres. La mediana de la duración del seguimiento fue de 6,43 años.

Los valores elevados de sNfL se asociaron con un riesgo elevado de RAW (HR= 1,45; $p < 0,001$), PIRA (HR= 1,43; $p = 0,003$) y de alcanzar una EDSS de 3 (HR= 1,55; $p < 0,001$). Además, los niveles más altos de sGFAP se relacionaron con un mayor riesgo de alcanzar una puntuación EDSS de 3 (HR=1,36; $P = 0,02$) y, en pacientes con valores bajos de sNfL, con PIRA (HR=1,86; $P=0,04$). Examinamos además el efecto combinado de los niveles de sNfL y sGFAP. Los pacientes con valores bajos de sNfL y sGFAP (NLGL) mostraron un riesgo bajo de todos los resultados y sirvieron como referencia. Los pacientes no tratados con niveles elevados de sNfL mostraron un mayor riesgo de RAW, PIRA y de alcanzar una EDSS de 3. Los TME inyectables u orales redujeron el riesgo de RAW en estos pacientes, pero no lograron mitigar el riesgo de PIRA y de alcanzar una EDSS de 3. Por el contrario, los TME de alta eficacia contrarrestaron el mayor riesgo de estos resultados, excepto el riesgo de PIRA en

pacientes con niveles elevados de sNfL y sGFAP. Los pacientes con valores bajos de sNfL y altos de sGFAP (NLGH) mostraron un mayor riesgo de PIRA y de alcanzar una EDSS de 3, que se mantuvo sin cambios con los TME de alta eficacia o con otros TME. Como conclusión de nuestro trabajo establecimos que la evaluación de los niveles de sNfL y sGFAP al inicio de la enfermedad en la EM puede identificar fenotipos distintos asociados a diversas vías inmunológicas de adquisición de la discapacidad y respuesta terapéutica.

Extendimos este estudio a la EMPP en colaboración con el grupo dirigido por el Dr. Manuel Comabella en el CEMCAT. Estudiamos el papel de sNfL y sGFAP junto con la chitinase 3 like 1 (CHI3L1). Observamos que los tres biomarcadores se asociaban con el deterioro de la discapacidad medido por la escala EDSS, siendo la CHI3L1 la variable menos asociada con la inflamación. Estos datos confirman el papel de la respuesta innata en el empeoramiento de la discapacidad en pacientes con EMPP, especialmente en los de curso poco inflamatorio.

ARTÍCULOS PUBLICADOS A RAIZ DE ESTE PROYECTO.

Este proyecto ha dado lugar a presentaciones en congresos nacionales e internacionales y especialmente a los artículos en revistas nacionales e internacionales que se reseñan a continuación.

1. Fissolo N, Benkert P, Sastre-Garriga J, Mongay-Ochoa N, Vilaseca-Jolonch A, Llufríu S, Blanco Y, Hegen H, Berek K, Perez-Miralles F, Rejdak K, Villar LM, Monreal E, Alvarez-Lafuente R, Soylyu OK, Abdelhak A, Bachhuber F, Tumaní H, Martínez-Yélamos S, Sánchez-López AJ, García-Merino A, Gutiérrez L, Castillo-Trivino T, Lycke J, Rosenstein I, Furlan R, Filippi M, Téllez N, Ramió-Torrentà L, Lünemann JD, Wiendl H, Eichau S, Khalil M, Kuhle J, Montalban X, Comabella M. Serum biomarker levels predict disability progression in patients with primary progressive multiple sclerosis. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. 2024; 95: 410-418. PMID: 37940409.
2. Monreal E, Fernández-Velasco JI, Álvarez-Lafuente R, Sainz de la Maza S, García-Sánchez MI, Llufríu S, Casanova B, Comabella M, Martínez-Yélamos S, Galimberti D, Ramió-Torrentà L, Martínez-Ginés ML, Aladro Y, Ayuso L, Martínez-Rodríguez JE, Brieva L, Villarrubia N, Eichau S, Zamora J, Rodero-Romero A, Espiño M, Blanco Y, Saiz A, Montalbán X, Tintoré M, Domínguez-Mozo MI, Cuello JP, Romero-Pinel L, Ghezzi L, Pilo de la Fuente B, Pérez-Miralles F, Quiroga-Varela A, Rubio L, Rodríguez-Jorge F, Chico-García JL, Sainz-Amo R, Masjuan J, Costa-Frossard L, Villar LM. Serum biomarkers at disease onset for personalized therapy in multiple sclerosis. *Brain*. 2024. PMID: 39101570.
3. Rodero-Romero A, Monreal E, Sainz-Amo R, García Domínguez JM, Villarrubia N, Veiga-González JL, Fernández-Velasco JI, Goicochea-Briceño H, Rodríguez-Jorge F, Sainz de la Maza S, Chico-García JL, Muriel A, Masjuan J, Costa-Frossard L, Villar LM. Establishing Normal Serum Values of Neurofilament Light Chains and Glial Fibrillary Acidic Protein Considering the Effects of Age and Other Demographic factors in healthy adults. *Int J Mol Sci*. 2024 Jul 17;25(14):7808. PMID: 39063050.
4. Calabrese M, Preziosa P, Scalfari A, Colato E, Marastoni D, Absinta M, Battaglini M, De Stefano N, Di Filippo M, Hametner S, Howell OW, Inglese M, Lassmann H, Martin

R, Nicholas R, Reynolds R, Rocca MA, Tamanti A, Vercellino M, Villar LM, Filippi M, Magliozzi R. Determinants and Biomarkers of Progression Independent of Relapses in Multiple Sclerosis. *Ann Neurol.* 2024; 96: 1-20. PMID: 38568026.

5. Fernández-Velasco JI, Monreal E, Kuhle J, Meca-Lallana V, Meca-Lallana J, Izquierdo G, Oreja-Guevara C, Gascón-Giménez F, Sainz de la Maza S, Walo-Delgado PE, Lapuente-Suanzes P, Maceski A, Rodríguez-Martín E, Roldán E, Villarrubia N, Saiz A, Blanco Y, Diaz-Pérez C, Valero-López G, Diaz-Diaz J, Aladro Y, Brieva L, Íñiguez C, González-Suárez I, Rodríguez de Antonio LA, García-Domínguez JM, Sabin J, Llufríu S, Masjuan J, Costa-Frossard L, Villar LM. Baseline Inflammatory Status Reveals Dichotomic Immune Mechanisms Involved In Primary-Progressive Multiple Sclerosis Pathology. *Front Immunol.* 2022;13: 842354. PMID: 35386690.