



www.neurobiomarcadores.com

MÓDULO 6

Biomarcadores en investigación básica y la tecnología de 'single molecule array' (SIMOA)

Lección 2

Paradigmas experimentales y biomarcadores emergentes en esclerosis múltiple: qué y cómo hemos avanzado en la obtención de nuevos fármacos

Dr. Carlos Matute

Laboratory of Neurobiology, Achucarro Basque Center for Neuroscience,
Universidad del País Vasco/Euskal Herriko Unibertsitatea (UPV-EHU),
Centro de Investigación Biomédica en Red Enfermedades Neurodegenerativas (CIBERNED), Leioa, Bizkaia

1. Bases moleculares y celulares de la esclerosis múltiple

1.1. Clínica y curso de la esclerosis múltiple

La esclerosis múltiple (EM) es la causa más común de discapacidad neurológica crónica que comienza en la edad adulta temprana o media. Los síntomas de la EM se deben a la desmielinización del sistema nervioso central (SNC) y sus consecuencias en el daño axonal, neuronal y glial. Incluyen debilidad en una o más extremidades, trastornos sensoriales, pérdida de visión monocular (neuritis óptica), visión doble (diplopía), inestabilidad de la marcha y ataxia. A medida que la enfermedad avanza, aparecen disfunción de la vejiga, fatiga y sensibilidad al calor. Los déficits cognitivos son comunes, especialmente en casos avanzados, dándose pérdida de memoria, problemas de atención, procesamiento lento de la información y dificultades para cambiar entre tareas cognitivas. El 60% de los pacientes se deprimen y la tasa de suicidio es 7,5 veces más común que en la población de la misma edad.

El curso de la EM presenta 4 patrones ⁽¹⁾ **(Figura 1)**. Aproximadamente, el 85% de los pacientes experimentan EM remitente-recurrente (EM-RR), caracterizada por el inicio brusco de los síntomas y episodios de empeoramiento (brotes) con recuperación completa o parcial (remisión). Entre estos episodios, los pacientes pueden estar clínicamente estables, experimentar una progresión gradual de la discapacidad o una combinación de ambos. El 50% de los pacientes con EM-RR evolucionan hacia a EM secundaria progresiva (EM-SP) dentro de 10 años desde la aparición de la enfermedad. La fase progresiva secundaria se caracteriza por progresión gradual de la discapacidad con o sin superposición de recaídas. Por el contrario, los pacientes con EM progresiva primaria (EM-PP, aproximadamente el 10% de los pacientes con EM) sufren discapacidad progresiva desde el inicio sin recaídas superpuestas. Por otra parte, los pacientes con EM recurrente progresiva padecen discapacidad desde el inicio de la enfermedad, que más tarde se acompaña de una o más recaídas; este patrón clínico afecta al 5% de los pacientes.

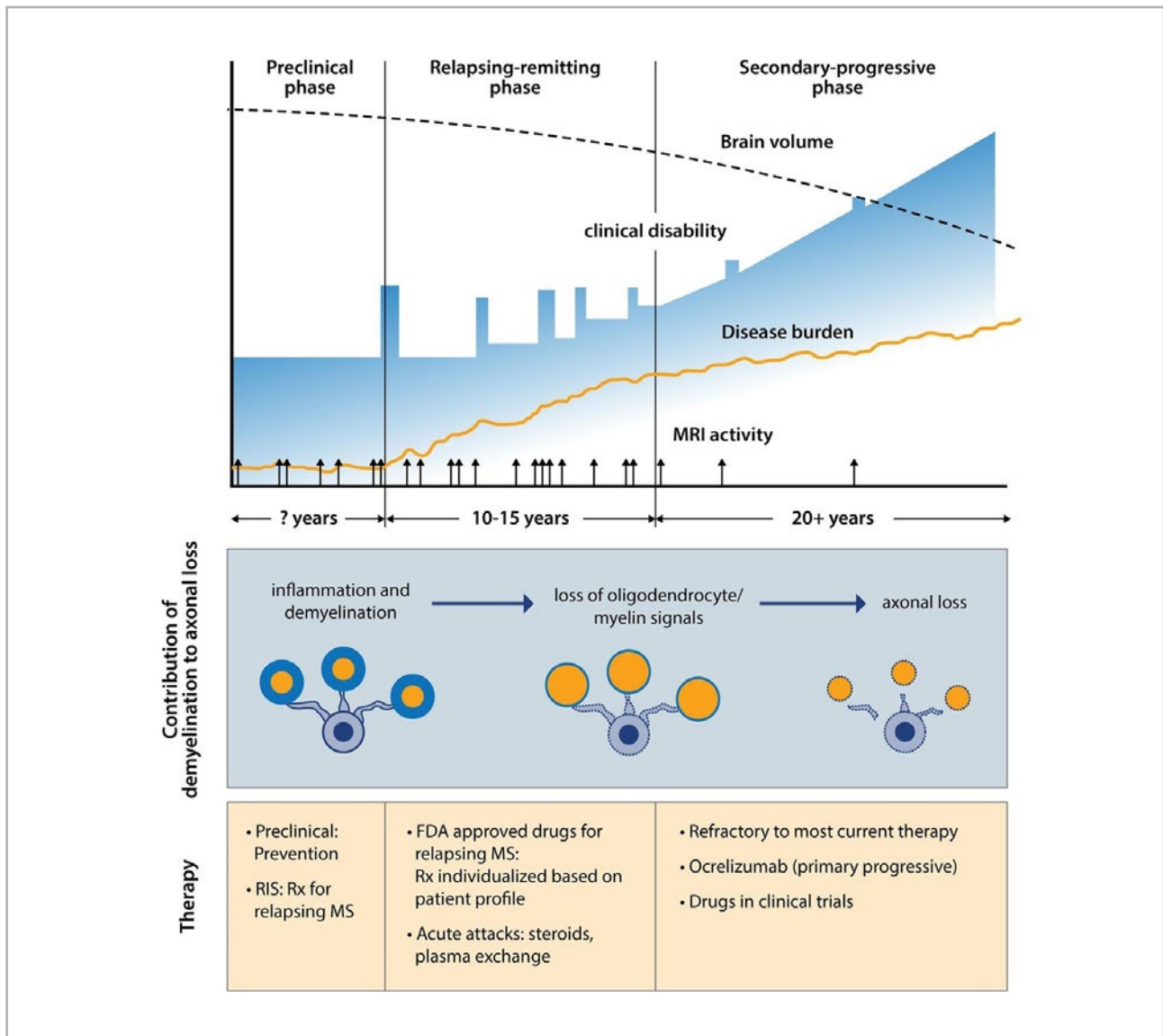


Figura 1. Las etapas de la esclerosis múltiple (EM) ⁽¹⁾. La EM comienza antes de que los síntomas clínicos sean evidentes y puede visualizarse en la resonancia magnética como un síndrome radiológicamente aislado (RIS). Luego suele manifestarse como un síndrome clínicamente aislado (CIS), al que sigue una etapa de recaídas y remisiones, caracterizada por episodios discretos de disfunción neurológica con remisión. La etapa progresiva implica un empeoramiento constante de la discapacidad y, por lo general, evoluciona desde la etapa de recaídas y remisiones, aunque algunos pacientes pueden tener una enfermedad progresiva desde el inicio (EM progresiva primaria). Los hallazgos radiológicos incluyen lesiones visibles con gadolinio y una disminución del volumen cerebral medido por la atrofia. Los tratamientos actuales se dirigen a las formas recurrentes de EM, pero no son eficaces en la EM progresiva.

1.2. Bases inmunológicas de la esclerosis múltiple

Conceptualmente, la patogénesis de la EM consta de 2 procesos diferentes pero superpuestos y conectados: la fase inflamatoria y la neurodegenerativa ⁽²⁾. Lo más probable es que la enfermedad comience con la pérdida axonal que se va acumulando, de forma que la conversión de recurrente-remitente a progresiva secundaria tenga lugar una vez que dicha pérdida supera la capacidad del SNC para compensar funcionalmente el daño subyacente.

El modelo autoinmune de la patogenia de la EM proporciona un marco conceptual útil pero incompleto para comprender la compleja variedad de factores que conducen a la pérdida de la homeostasis inmunitaria, la mielina y la lesión axonal, y los síntomas neurológicos progresivos ⁽²⁾. Así, la visión neuropatológica tradicional de la EM se representa en la **Figura 2A**, que destaca la lesión del SNC como consecuencia de una respuesta autoinmune. Por otra parte, la hipótesis alternativa propone que la activación de las células autoinmunes se produce de forma secundaria al daño inicial en el SNC y como consecuencia de la liberación prolongada de antígenos neurales (**Figura 2B**).

A nivel mecanístico, al inicio de la respuesta inflamatoria se activan linfocitos con potencial encefalitogénico, que, tras unirse a los receptores en las células endoteliales, atraviesan la barrera hematoencefálica (BHE) provocando la pérdida de la homeostasis del sistema inmune que causa la activación policlonal no específica de células T y B por antígenos bacterianos o virales, con homología estructural entre una proteína propia y una proteína en el patógeno, mediante mimetismo molecular. Una vez activadas, las células T expresan integrinas, que median la unión a las células endoteliales capilares de la BHE. A medida que las células T activadas migran a través de la BHE expresan gelatinasas (metaloproteinasas de matriz – MMP–) responsables de la lisis de la lámina basal subendotelial. Una vez en el SNC, las células T patógenas se reactivan con fragmentos de antígenos de mielina que provocan en última instancia la respuesta autoinmune y el daño desmielinizante.

En paralelo, los linfocitos B acantonados en los espacios de Virchow-Robin y meníngeos producen anticuerpos que atacan la mielina y destruyen los axones mediante sus mecanismos efectores: opsonización, que facilita la fagocitosis por macrófagos; fijación del complemento; o estimulación de citotoxicidad mediada por células dependiente de anticuerpos que se unen a las células asesinas naturales. La contribución de los linfocitos B a la EM explica los efectos terapéuticos que muestra la administración sistémica del anticuerpo monoclonal anti-CD20 humanizado rituximab que elimina los linfocitos B ⁽³⁾.

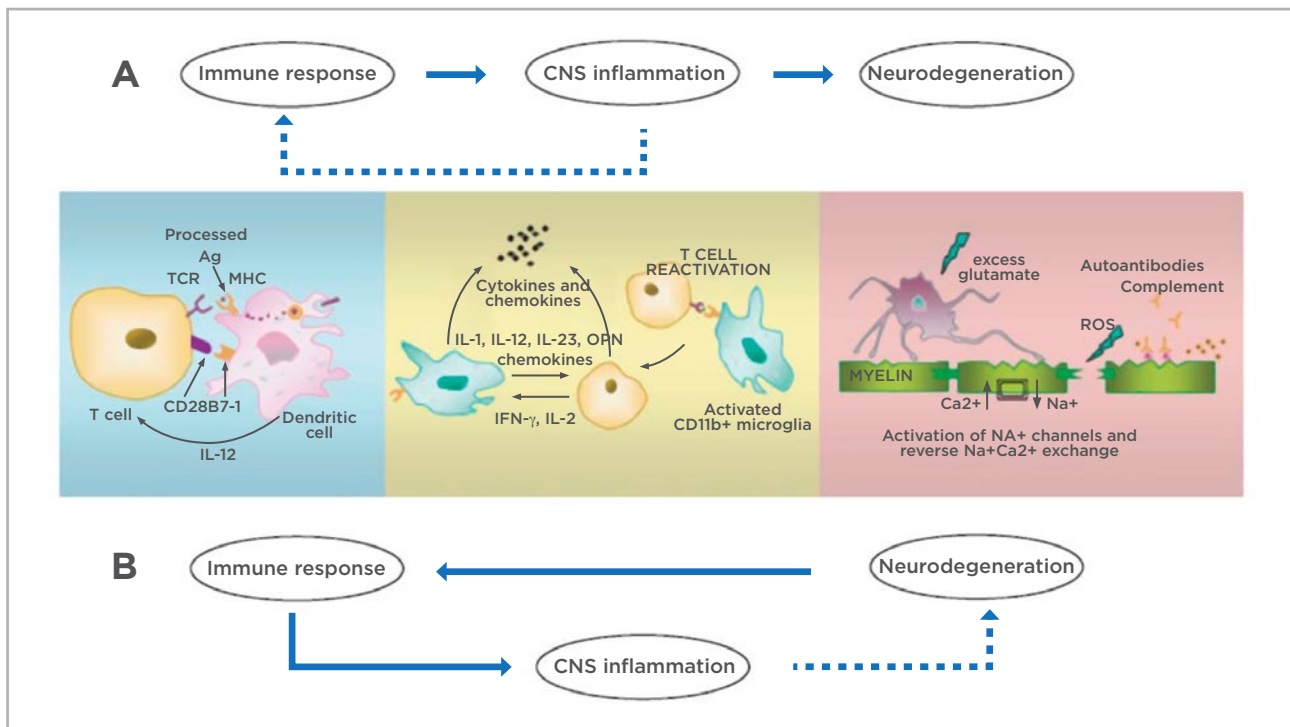


Figura 2. Modelos de la patogénesis de la esclerosis múltiple (EM) ⁽²⁾. La visión neuropatológica tradicional de la EM (A) destaca la lesión del sistema nervioso central (SNC) como consecuencia de una respuesta autoinmune. Una hipótesis alternativa (B) propone que la activación de las células autoinmunes se produce como consecuencia de las agresiones tóxicas a las células del SNC. Las infecciones, por ejemplo, pueden ser asintomáticas, pero causan efectos citopáticos en las células objetivo en el curso de una respuesta antiviral. La liberación prolongada de antígenos neurales puede entonces inducir respuestas inflamatorias.

1.3. El daño neurodegenerativo en la esclerosis múltiple

La pérdida de mielina en la EM ralentiza la propagación de los potenciales de acción y provoca los síntomas neurológicos. Además, los axones carentes de mielina sufren daño estructural desde los inicios de la enfermedad, que se acumula de forma progresiva causando pérdida axonal, atrofia cerebral y discapacidad neurológica irreversible en la EM. Además, aumenta la extensión y la frecuencia de las lesiones focales, se reduce el marcador neuronal N-acetil aspartato y aparece pérdida de plasticidad y conectividad funcional ⁽²⁾. La desmielinización da como resultado una reducción en el soporte de los axones, así como la redistribución de los canales iónicos, potencial desestabilización de la membrana axonal, excitabilidad reducida

y bloqueo de la conducción (**Figura 2**). Los axones inicialmente pueden adaptarse y restaurar la conducción, lo que explicaría las remisiones, pero en última instancia aparecen signos degenerativos distales y retrógrados que finalmente producen su deterioro irreversible. Por lo tanto, la promoción temprana de la remielinización y la preservación de los oligodendrocitos disponibles es un objetivo terapéutico de gran importancia en la EM.

Por otra parte, la microglía residente activada en el proceso inflamatorio puede contribuir a la lesión del SNC mediante la liberación de óxido nítrico y radicales de oxígeno, y citocinas proinflamatorias. El óxido nítrico contribuye a la liberación de ácido glutámico que produce excitotoxicidad oligodendroglial y neuronal a través de los receptores glutamatérgicos AMPA y kainato⁽⁴⁾. Asimismo, el proceso neuro- y oligodegenerativo altera la homeostasis del ATP, que a su vez contribuye al proceso excitotóxico mediante la activación de receptores purinérgicos⁽⁵⁾. Finalmente, la pérdida de oligodendrocitos y mielina impide el soporte metabólico al axón necesario para la propagación del potencial de acción. Este déficit energético es causado por el desacople de la señalización axonmielínica iniciada con la liberación de glutámico, activación de los receptores de NMDA en los oligodendrocitos y mielina, e inicio de la captación de glucosa, generación de lactato y transporte al axón⁽⁶⁾ (**Figura 3**). Las consecuencias iniciales de este cortocircuito son el enlentecimiento de la conducción nerviosa y en última instancia el daño estructural de los axones.

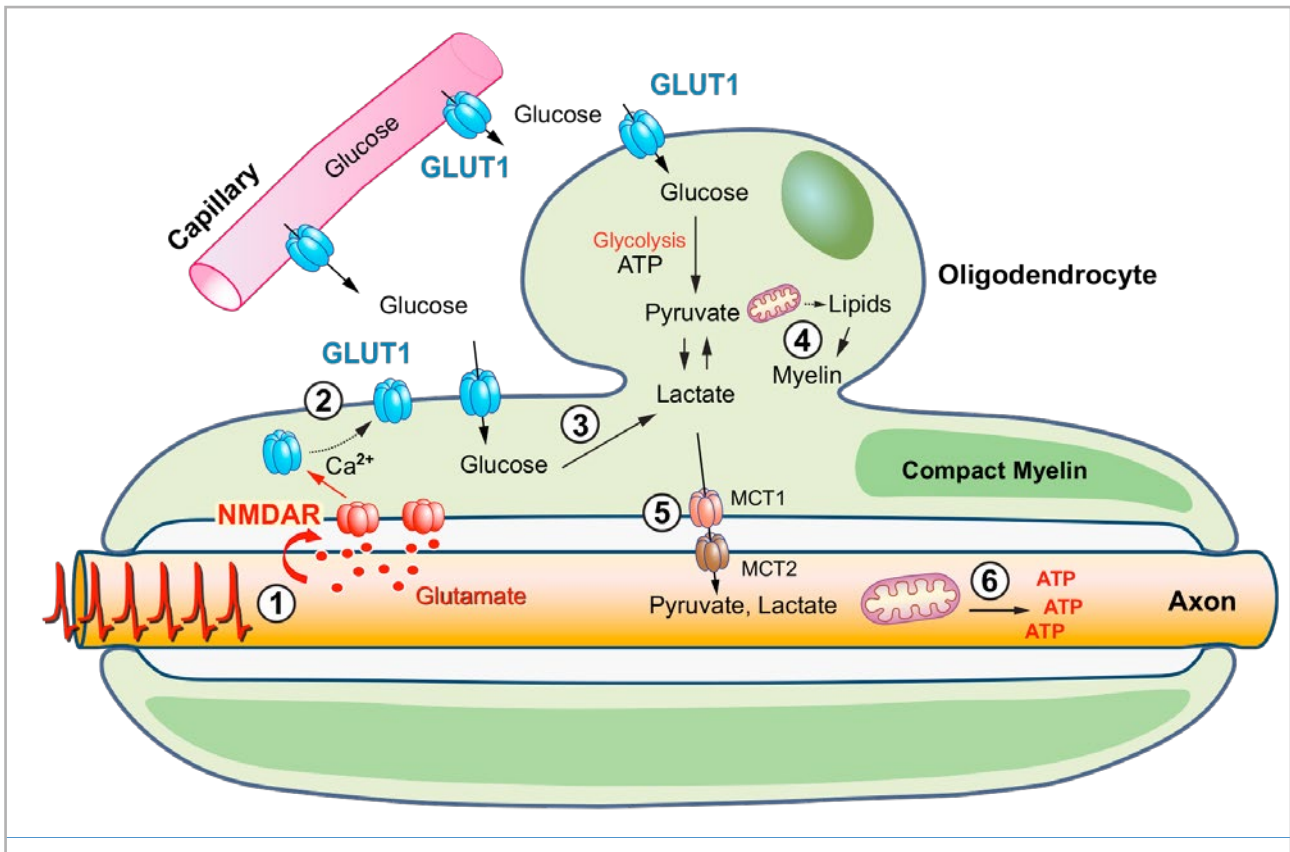


Figura 3. Señalización del receptor NMDA oligodendroglial acoplado a la actividad eléctrica axonal ⁽⁶⁾. Después de la mielinización, los receptores NMDA responden al glutamato axonal liberado ⁽¹⁾ al paso del potencial de acción, ajustando las necesidades de energía, mediante ⁽²⁾ la translocación de transportadores de glucosa adicionales en oligodendrocitos y mielina, y el incremento de la captación de glucosa (regulación feed-forward). Los productos de la glicólisis ⁽³⁾ se utilizan inicialmente para la síntesis de ATP y lípidos ⁽⁴⁾. Posteriormente, los oligodendrocitos maduros liberan lactato (o piruvato) al axón ⁽⁵⁾ para la producción de ATP mitocondrial ⁽⁶⁾.

2. Cómo se investiga la esclerosis múltiple: modelos experimentales

Los distintos aspectos moleculares y celulares, así como las diversas etapas de la EM no se pueden recapitular experimentalmente de forma conjunta en un solo modelo. Por ello, es necesario hacer uso de diferentes paradigmas y aproximaciones experimentales enfocadas a aspectos concretos de la enfermedad. Hay básicamente 3 tipos de modelos animales de EM, todos ellos ampliamente empleados para modelar los diferentes aspectos de la patología: 1) desmielinización inducida por virus; 2) encefalomiелitis experimental autoinmune; y 3) desmielinización provocada por toxinas. En el primero de ellos, la desmielinización se produce mediante la infección de ratones con el virus de la encefalomiелitis murina de Theiler y menos frecuentemente con el virus de la hepatitis del ratón. Esta infección produce inflamación y desmielinización en el cerebro y la médula espinal, que está mediada por células (CD)4+ y CD8+, células T, células B, microglía y macrófagos.

2.1. La encefalomiелitis experimental autoinmune

Las bases moleculares y celulares de la EM se investigan en modelos celulares y animales, si bien estos últimos constituyen la base del rastreo farmacológico. Entre estos modelos animales sobresale por encima de todos el de la encefalomiелitis experimental autoinmune (experimental autoimmune encephalomyelitis -EAE-) ⁽⁷⁾. Hay muchas variantes de este modelo, siendo el de la EAE crónica en ratones C57B6/L el más usado. Consiste en la inmunización mediante la inyección subcutánea de una emulsión de adyuvante de Freund completo (CFA) junto con un fragmento de 20 residuos de la glicoproteína asociada a los oligodendrocitos y la mielina (MOG₃₅₋₅₅) en ratones hembra de 8 a 10 semanas de edad. La respuesta se potencia mediante la administración intraperitoneal de toxina *pertussis*, que abre la barrera hematoencefálica, en el día de inmunización y 2 días después.

Los ratones inmunizados desarrollan parálisis progresiva a partir de los 10-11 días postinmunización que comienza por la cola, progresa por las extremidades posteriores, alcanzando las superiores y ocasionalmente la muerte. Es la denominada fase inflamatoria de la EAE crónica. Una vez alcanzado el pico de los síntomas entorno al día 20 postinmunización, los síntomas remiten ligeramente de manera lenta como

consecuencia de la capacidad reparadora del daño inmunológico, en la denominada fase neurodegenerativa. Ambas fases, neuroinflamatoria y neurodegenerativa, son de interés para el desarrollo de fármacos inmunomoduladores y neuroprotectores, respectivamente. Sin embargo, los desarrollos con éxito terapéutico actúan todos sin excepción en la fase inflamatoria, impactando de forma secundaria sobre el estado clínico en la fase neurodegenerativa.

El modelo de EAE crónica tiene muchas variantes según los antígenos utilizados para inmunizar actúen sobre los linfocitos B y T, como la mielina glicoproteína de oligodendrocitos (MOG), la proteína básica de mielina (MBP), la glicoproteína asociada a mielina (MAG) y la proteína proteolípida (PLP). Estos antígenos peptídicos se emulsionan en el CFA, un potenciador de la inmunogenicidad de los autoantígenos en la inducción de EAE, inyectado posteriormente para inducir la desmielinización y neuroinflamación en ratones.

Una manera ilustrativa de mostrar la gran variedad de modelos de EAE, incluidos los de EAE aguda y los de la EAE activa y adaptativa, es el estudio de la influencia de las hormonas sobre su inicio y curso –véase la revisión en ⁽⁷⁾–. La **Tabla 1** muestra un resumen gráfico de los modelos animales de EAE utilizados para estudiar hormonas del hipotálamo. Asimismo, la **Figura 4** ilustra los efectos de la eliminación de la microglía en el curso de la EAE ⁽⁸⁾.

Tissue	Hormone	Animal and strain of EAE model	Gender	Age	Immunogen for EAE induction	Reference
Hypothalamus	Thyrotropin-releasing hormone (TRH)	LWS rat	M	NA	IrSCH	[39]
	Gonadotropin-releasing hormone (GnRH)	C57BL/6	F	6–8 weeks	MOG35-55	[40]
	Growth hormone-releasing hormone (GHRH)	LWS rat	F	NA	gpBH	[41]
	Corticotropin-releasing hormone (CRH)	LWS rat	F	3–4 months	gpBH	[42,43]
	Somatostatin (SST)	GMM	F	6 weeks	MOG35-55	[44]
		LWS rat	F	NA	gpSCH	[46]
		LWS rat	M	NA	gpMBP	[27]
		GMM	NA	6–8 weeks	MOG35-55	[47]
		DA & OA rats	M	Adult	CFWMH	[48]
		AO rats	M	2–3 months	bbH	[49]
Pineal gland	Melatonin	C57BL/6 mice	F	6–8 weeks	MOG35-55	[50]
		(SJL × PL/J) F1 mice	NA	12 weeks	gpSCH	[51]
		LWS rat	M & F	8–12 weeks	rSCH	[52]
		C57BL/6 mice	F	8 weeks	MOG	[53]
		C57BL/6 mice	F	6–8 weeks	MOG35-55	[54]
		LWS rat	F	5–6 weeks	GPSCHE	[55]
		C57BL/6 mice	F	6–8 weeks	MOG35-55	[56]
		C57BL/6 mice	F	6–8 weeks	MOG35-55	[57]

Abbreviations: gpSCH – guinea pig Spinal Cord Homogenate; gpBH – guinea pig Brain Homogenate; IrSCH – Lewis rat Spinal Cord Homogenate; CFWMH – Calf Brain White Matter Homogenate; bbH – bovine Brain Homogenate; rSCH – rat Spinal Cord Homogenate; DA – Dark Agouti rats; AO – Albino Oxford; GMM – Genetically manipulated mice.

Tabla 1. Resumen de las variantes de modelos de encefalomiелitis experimental autoinmune (EAE).

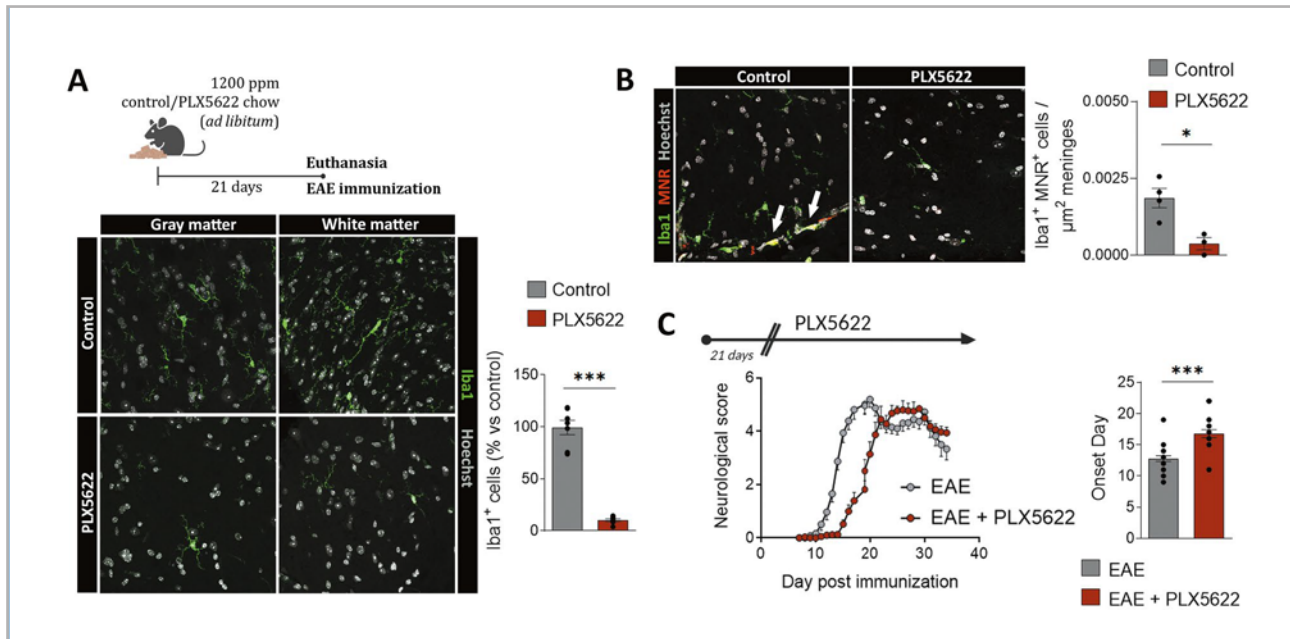


Figura 4. Efectos de la eliminación de la microglía en el inicio y la progresión de los síntomas motores en la encefalomiелitis experimental autoinmune (EAE) ⁽⁸⁾.

2.2. Las lesiones desmielinizantes mediante intoxicación

Los modelos de desmielinización basados en toxinas se usan para estudiar los mecanismos de desmielinización primaria y posterior progresiva remielinización autónoma y/o favorecida por fármacos. La desmielinización se puede iniciar mediante la inyección de tóxicos como la lisolectina, lipopolisacárido o etidio bromuro en áreas de sustancia blanca para crear una lesión focal en el lugar de la inyección, o bien mediante la ingesta de cuprizona, que produce desmielinización regional. En ambos casos, el modelo de lesión es principalmente inside-outside, a saber, la lesión inicial no tiene componente inmunológico obvio, si bien puede generar una respuesta neuroinflamatoria inicial con repercusiones sistémicas.

El modelo de la cuprizona, un quelante del cobre, se basa en la administración de esta sustancia durante 6 semanas, lo que induce la desmielinización de estructuras cerebrales específicas. A pesar del amplio uso de la cuprizona, aún se desconoce el mecanismo por el cual induce la desmielinización. A pesar de ello, hay 2 modos de acción distintos pero superpuestos para la desmielinización inducida por cuprizona: 1) daño que se origina dentro del oligodendrocito, causado por disfunción mitocondrial o reducción de la síntesis de proteína de mielina (daño



celular intrínseco); y 2) daño al oligodendrocito ejercido por moléculas inflamatorias, células residentes en el cerebro, como oligodendrocitos, astrocitos y microglía, o células inmunitarias periféricas: neutrófilos o células T (daño celular extrínseco)⁽⁹⁾. Los detalles de este modelo experimental se pueden ver en una publicación reciente de nuestro laboratorio⁽¹⁰⁾.

La lisofosfatidilcolina, comúnmente denominada lisolecitina, se ha utilizado en modelos de mamíferos, incluidos ratones, ratas, conejos, gatos y monos macacos, y más recientemente el pez cebra, para inducir lesiones desmielinizantes en la médula espinal y el cuerpo calloso. Las inyecciones de lisolecitina al 1% son suficientes para inducir la desmielinización en el SNC de estos animales; posteriormente, se evidencia la repoblación de progenitores de oligodendrocitos, su diferenciación y posterior remielinización. La cronología de los eventos celulares, un ejemplo de remielinización espontánea y otro en el que está favorecida por la aplicación intraperitoneal de baclofeno, un agonista de los receptores GABA-B, están descritos en un artículo reciente de nuestro laboratorio⁽¹¹⁾.

3. Biomarcadores establecidos y emergentes en la esclerosis múltiple

3.1. Marcadores diagnósticos

La herramienta de diagnóstico más fiable para la EM es la resonancia magnética, mientras que en general carecemos de biomarcadores de las enfermedades neurológicas; todo ello a pesar de que se están logrando avances significativos para paliar este déficit ⁽¹²⁾.

Los biomarcadores se pueden obtener de 2 fuentes diferentes: del líquido cefalorraquídeo (LCR) y de la sangre. Los biomarcadores del LCR pueden darnos una visión más precisa del estado inflamatorio del SNC en comparación con los biomarcadores sanguíneos; sin embargo, la obtención del LCR es un procedimiento mucho más complicado y doloroso. Entre los biomarcadores del LCR, los más relevantes son la cadena ligera de los neurofilamentos (NfL) y los marcadores de inmunoglobulinas, como las bandas oligoclonales.

Los biomarcadores se dividen en diferentes grupos según el estadio de avance de la enfermedad o el daño tisular acumulado. Algunos biomarcadores serán más prominentes cuando haya daño axonal, mientras que otros ponen de manifiesto el componente inflamatorio de la enfermedad o la disfunción glial **(Figura 5)** ⁽¹³⁾.

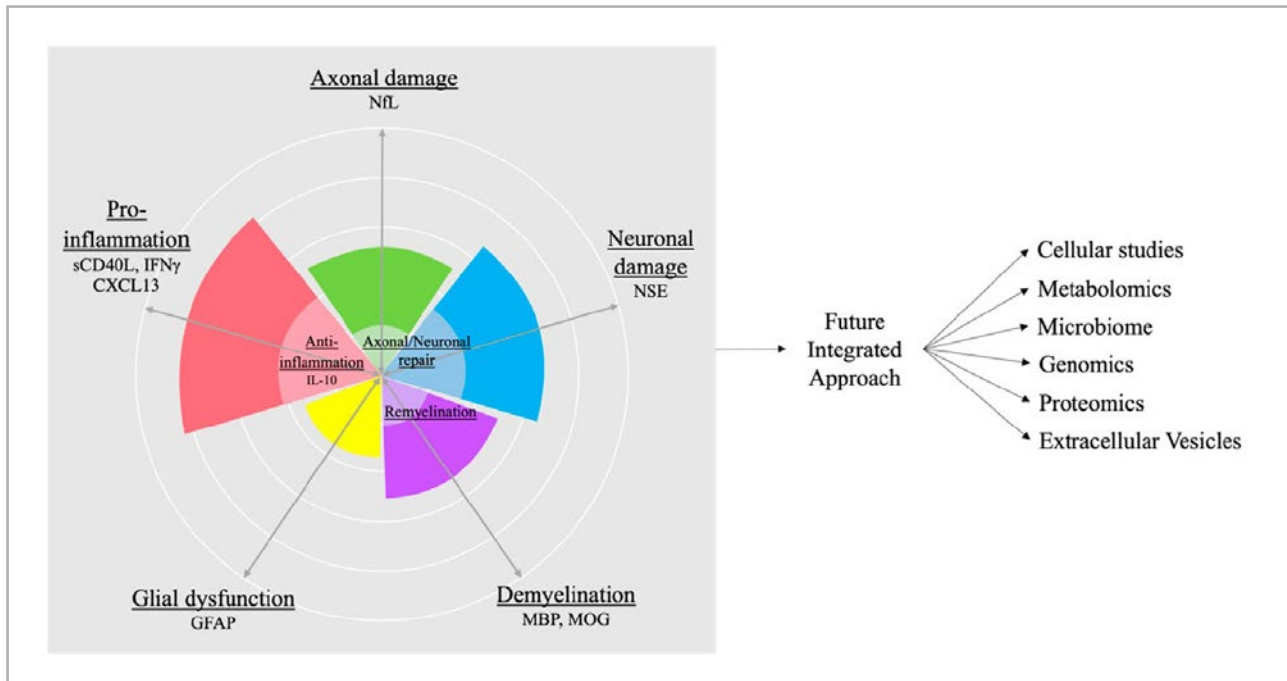


Figura 5. Biomarcadores actuales y futuros ⁽¹³⁾. Actualmente, hay biomarcadores candidatos que representan varios procesos como desmielinización, disfunción glial, daño axonal y neuronal, así como proinflamación. Estos pueden ser contrarrestados por la reparación axonal y neuronal, la remielinización y la antiinflamación. Un enfoque de biomarcador compuesto ayudará a cuantificar el estado de la enfermedad de cada paciente. El futuro enfoque integrado con la bioinformática y el aprendizaje automático, combinando estudios celulares, metabolómica, microbioma, genómica, proteómica y vesículas extracelulares, conducirá a una mejor comprensión del estado de la enfermedad de cada paciente individual. La disponibilidad de mejores biomarcadores de diagnóstico y pronóstico conducirá a mejores objetivos terapéuticos y terapias personalizadas en el futuro. CXCL: ligando de quimiocina con motivo C-X-C; IFN: interferón; sCD40L: CD40L soluble.

3.2. Biomarcadores de daño axonal y neuronal

Se ha encontrado que los niveles de NfL están elevados en diferentes formas de la EM, especialmente en la progresión entre EM-RR y EM-SP **(Tabla 2)** ⁽¹³⁾. En comparación con los grupos de control, se detectaron niveles más altos de este biomarcador durante la recaída activa y la recaída aguda en pacientes con EM. Además, después del tratamiento modificador de la enfermedad, dichos niveles tienden a bajar, lo que corrobora la eficacia de estos tratamientos. Los altos niveles de NfL se han relacionado con lesiones de resonancia magnética más prominentes;

sin embargo, esto no se puede generalizar a todos los pacientes. Parece que, a veces, los niveles altos de NfL no se correlacionan con las lesiones activas de resonancia magnética y que esto podría deberse a otros factores. Por lo tanto, siempre se deben realizar resonancias magnéticas para asegurarse de que ambos factores se correlacionen. Este biomarcador también se ha mostrado beneficioso en cuanto a su capacidad pronóstica. En un estudio militar, concluyeron que los niveles de NfL aumentaron 6 años antes de la aparición de los síntomas de la EM. Es importante considerar que este es un biomarcador valioso en cuanto a grupo y que no debe usarse para evaluar si un individuo tiene EM, ya que también se encuentran valores más altos de este biomarcador en otras infecciones y muchas enfermedades neurodegenerativas.

Potential Biomarker	Study Population (n)	Sample	Results	Possible Utility
NfL	RRMS (65), SPMS (10), PPMS (20)	CSF	Correlated with RRMS progression to SPMS [42]	Predictive, prognostic, treatment response
	RRMS (41), SPMS (25), controls (50)	CSF	Increased during active and acute relapse in MS patients compared to healthy controls [43]	
	RRMS (62), SPMS (3), PPMS (16), CIS (48), RIS (13), controls (87)	CSF, serum	Strong associated between CSF and serum levels; serum levels lower with disease-modifying treatment; serum levels positively correlated with age and higher in older patients during relapse and associated with higher risk of relapse and EDSS worsening [45]	
	RRMS (435), SPMS (54), PPMS (25), CIS (93)	Serum	Lower levels associated with active treatment, with larger decreases in NfL levels with high-potency treatments. Associated with T2 lesion volume over time; no association between higher levels at disease onset and higher long-term EDSS scores nor any association with relapse activity overtime; large overlap between the baseline level in MS patients and controls who may have migraine or conversion disorder [47]	
	RRMS (15)	Serum	Associated with clinical or MRI disease activity [48]	
	SET cohort: RRMS (163) GeneMSA cohort: RRMS (179)	Serum	Lower levels associated with lower probability of recent imaging disease activity; higher levels associated with higher number of active MRI lesions [49]	
	RRMS (35), PPMS (17), CIS (15)	Serum	Higher baseline levels associated with higher hazard ratio of developing EDSS 4 after 15+ years [51]	
	MS (60)	Serum	Levels were increased six years prior to onset of MS [52]	
	MS (955)	Serum	Levels were elevated only after EBV seroconversion [53]	

Las referencias bibliográficas citadas numéricamente entre paréntesis se pueden obtener en la referencia ⁽¹³⁾

Tabla 2. Resumen documentando el uso de la cadena ligera de los neurofilamentos (NfL) como marcador en la esclerosis múltiple.

Por otra parte, la proteína tau y la proteína precursora de amiloide también se pueden encontrar en niveles elevados después del daño axonal o durante la desmielinización o la desmielinización en la glía reactiva; sin embargo, se usan con más frecuencia para el diagnóstico diferencial.

En cuanto al daño neuronal, hay consenso en que la proteína 14-3-3 se asocia con una mayor discapacidad de la enfermedad, así como con una afectación más extensa de la médula espinal⁽¹³⁾. Aunque puede tener un buen valor pronóstico, los niveles de esta proteína suelen ser indetectables en la gran mayoría de la población. Por otro lado, se ha encontrado que la enolasa específica de neuronas tiene niveles elevados en el LCR y el suero en pacientes que sufren traumatismo cerebral, lesión cerebral hipóxica y hemorragia cerebral. Cuando se trata de EM, generalmente no hay diferencia entre los pacientes con EM y los controles, aunque los niveles tienden a ser más bajos en síndrome clínicamente aislado (*clinical isolated syndrome* -CIS-) en comparación con los controles.

3.3. Biomarcadores gliales y de la mielina

La proteína ácida fibrilar glial (GFAP) se expresa en astrocitos maduros y sus niveles se encuentran más altos en el LCR de pacientes con EM-SP en comparación con pacientes con EM-RR, lo que significa que GFAP podría ser un biomarcador útil que arrojará algo de luz sobre la progresión de la enfermedad.

Por otra parte, los niveles plasmáticos de proteína S100 β son más altos en pacientes con un fenotipo más progresivo de la enfermedad (EM-SP y EM-PP). Sin embargo, la gran mayoría de los estudios no han podido encontrar diferencias estadísticamente relevantes en el LCR y la proteína S100 β sérica entre el CIS y los controles sanos, así como con otros subtipos de EM⁽¹³⁾.

El óxido nítrico inhibe la actividad del citocromo c oxidasa y, por lo tanto, daña las mitocondrias. Dado que existe literatura relacionada con la disrupción bioenergética en la EM, este biomarcador puede usarse para asociarlo a la enfermedad, ya que los estudios han encontrado niveles elevados de este marcador en pacientes con EM en comparación con los controles. Los biomarcadores de disfunción glial se detallan en la **Tabla 3**.

Potential Biomarker	Study Population (n)	Sample	Results	Possible Utility
GFAP	MS (503), controls (252)	CSF	Patients with SPMS had higher levels than those with RRMS [78]	
	RRMS (20), SPMS (21), PPMS (10), controls (51)	CSF	Associated with greater disabilities and relapse [79]	
S100b	RRMS (41), SPMS (25), controls (50)	CSF	No difference between MS patients and controls [43]	Prognostic
	CIS (21), controls (20)	CSF, serum	No difference between CIS patients and controls; no correlation with EDSS score [62]	
	RRMS (25), SPMS (23), PPMS (16)	Plasma	No difference between various clinical subtypes of MS [75]	
	RRMS (20), SPMS (21), PPMS (10), controls (51)	CSF	Highest levels in order of PPMS, SPMS, then RRMS, with all higher than controls [79]	
	RRMS (9 with acute exacerbations, 3 stable), chronic progressive (8 with acute exacerbations, 3 stable)	Plasma	Acute exacerbations results in higher levels [80]	
AQP4	MS (144), NMO (37)	Serum	Only detectable in 4 out of 144 MS patients but detectable in 21 out of 37 NMO patients [83]	Diagnostic
	RRMS (27), SPMS (6), PPMS (5), controls (14), NMO (24)	Serum	Undetectable in all MS patients and controls, but detectable in 14 out of 24 patients with NMO [84]	
NO	RRMS (8), SPMS (8), PPMS (1), controls (8)	CSF, serum	Increased in MS patients compared to controls [85]	Associated marker
	MS exacerbation (24), MS remission (17), MS progression (20), tension headache (8), controls (11)	CSF	Increased in MS patients compared to controls [86]	

GFAP = glial fibrillary acidic protein; AQP4 = anti-aquaporin 4; NO = nitric oxide; NMO = neuromyelitis optica. Las referencias bibliográficas citadas numéricamente entre paréntesis se pueden obtener en la referencia ⁽¹³⁾

Tabla 3. Biomarcadores de disfunción glial en la esclerosis múltiple.

Por otra parte, entre los biomarcadores de mielina/desmielinización se encuentran la MBP y la MOG. La MBP aumenta en el LCR de pacientes con EM, especialmente durante las exacerbaciones agudas, a diferencia de los controles y los fenotipos más progresivos. Finalmente, la MOG se utiliza con fines de diagnóstico, ya que se han encontrado diferencias en los tipos de células mieloides del LCR en sujetos con neuroinflamación, incluida la EM y su trastorno asociado conocido como trastorno anti-MOG ⁽¹³⁾.

3.4. Buscando nuevos biomarcadores

La medición de los cambios en los mediadores inmunitarios y las citocinas en el LCR pueden reflejar el tipo y la progresión de la enfermedad. La quimiocina CXCL13 parece estar elevada en el LCR de pacientes con EM-RR en comparación con el control, así como en la conversión de CIS a EM. Esto significaría que CXCL13 podría estar potencialmente asociada con la progresión y la duración de la enfermedad.

El precursor de quitinasa-3-like-1 aumenta en los niveles de LCR de muchos pacientes con enfermedades inflamatorias del SNC, así como en lesiones cerebrales



en pacientes con EM. Los niveles séricos y en LCR de esta molécula aumentan según el estadio de la enfermedad, mostrando niveles más bajos en LCR en los fenotipos progresivos frente al fenotipo EM-RR.

Las proteínas de choque térmico (HSP) 70 y 90 se correlacionan con un mayor riesgo de desarrollar EM. Los pacientes con EM muestran niveles más altos de proteínas de choque térmico en suero en comparación con los pacientes sanos. Estos niveles son, sin embargo, más bajos que en otras enfermedades neurológicas inflamatorias. Por lo tanto, este biomarcador podría utilizarse con fines diagnósticos.

Las cadenas ligeras libres kappa (anticuerpos del suero plasmático) se pueden utilizar como biomarcadores para predecir la enfermedad y su progresión. Estos anticuerpos aumentan en pacientes con EM y se correlacionan con una discapacidad futura. Los pacientes con CIS con niveles más altos de cadena ligera libre kappa (KFLC) en el LCR tuvieron una conversión más temprana a EM.

El ácido úrico es otro marcador asociado cuyos niveles están disminuidos en pacientes con EM en comparación con otras enfermedades neurológicas. Un estudio argumenta que el aumento de los niveles de urato no conduce a un mayor riesgo de desarrollar EM y, por lo tanto, este marcador no debe usarse con fines de diagnóstico.

Alternativamente, las micromoléculas de ARN se pueden identificar en el suero y el LCR de los pacientes mediante una PCR. Están desregulados en el sistema inmunitario y el SNC de los pacientes con EM y esta regulación al alta o a la baja puede conducir a una alteración en la expresión génica en células mononucleares de sangre periférica y lesiones de sustancia blanca en el cerebro de pacientes con EM. miR-19a, miR-21, miR-22, miR-142-3p, miR-146a, miR-146b, miR-155, miR-210, miR-233 y miR-326 están regulados al alza. miR-15a, miR-19a, miR-22, miR-210 y miR-223 también están regulados al alza en las células T reguladoras (Treg) y en el plasma y las células sanguíneas de los pacientes con EM⁽¹⁴⁾.

Por otra parte, los exosomas (EV) se pueden usar para comunicarse entre células y viajar grandes distancias en el cuerpo. Esta capacidad los hace ideales para monitorizar la progresión y la actividad de la enfermedad de la EM⁽¹⁴⁾. Se encuentra que los EV aumentan en el LCR y el plasma de los pacientes con EM y tienen composiciones moleculares diferentes en comparación con los EV de individuos sanos. Un estudio encontró que los pacientes con EM-RR tenían miARN

significativamente alterados en comparación con los controles, específicamente un aumento en el miARN let-7i en los exosomas. Se ha descrito un mayor número de exosomas totales del LCR para pacientes con EM. En general, las vesículas extracelulares se pueden utilizar con fines de pronóstico, ya que se encuentran niveles más altos de estas vesículas en pacientes con EM en comparación con los controles sanos y, la mayoría de las veces, este fenómeno se correlaciona con la actividad y la gravedad de la enfermedad.

De todos estos biomarcadores, los NfL es el más usado con fines diagnósticos y pronósticos. Sin embargo, dado que todavía no se pueden usar para diagnosticar pacientes individuales, los científicos están combinando la presencia de este biomarcador con otros biomarcadores, como los que se encuentran a lo largo de este artículo, para refinar el diagnóstico de la enfermedad. Los nuevos avances tecnológicos, como la transcriptómica, la proteómica y la metabolómica, están descubriendo nuevos biomarcadores y dianas terapéuticas.

Conclusiones

La EM es una enfermedad muy heterogénea en cuanto al curso clínico, al diagnóstico y a la respuesta al tratamiento. Hay una necesidad urgente de buscar biomarcadores de fluidos corporales simples y confiables que ayuden al diagnóstico y la predicción del pronóstico clínico y del tratamiento. Los biomarcadores tradicionales de la EM todavía tienen un valor clínico limitado, con excepción de las bandas oligoclonales. Por tanto, hay un interés creciente en nuevas moléculas con valor diagnóstico y/o pronóstico.

El marcador estrella (*gold standard*) de la EM son los niveles de NfL, cuya fiabilidad está limitada para evaluar la recaída o la progresión de la enfermedad ⁽¹⁵⁾. Sin embargo, no es un marcador específico de la EM, pues sus valores aumentan en los traumatismos craneoencefálicos leves, con las infecciones y en otras enfermedades neurológicas o comorbilidades. Además, no es obvio cómo valorar el impacto de otras variables de confusión, como la edad, el índice de masa corporal y el volumen de sangre. Por otra parte, la inflamación y las lesiones activas de los pacientes cursan con un pico repentino en sus niveles de NfL. Por lo tanto, los aumentos en los niveles de NfL pueden ser más indicativos de neuroinflamación que de neurodegeneración en la EM.

Algo parecido ocurre con los otros biomarcadores señalados para el daño axonal y neuronal, la disfunción glial y la desmielinización. Por lo tanto, será necesaria una combinación de diversos biomarcadores de distinta índole, así como tratamiento bioinformático, para desarrollar paneles de estos, que sirvan como herramientas útiles para predecir la recaída y la progresión de la EM.

Las tecnologías ómicas (proteómica, metabolómica, sc-RNA seq, véanse ejemplos en la **Tabla 4**) pueden contribuir en los próximos años al descubrimiento de nuevos biomarcadores y dianas terapéuticas para la progresión de la EM. En particular, los microARN y las vesículas extracelulares tienen gran potencial como biomarcadores. Los primeros representan un mecanismo importante en el control de la expresión génica en la patofisiología de la EM, mientras que los segundos ofrecen perspectivas novedosas en la transferencia de cargo diverso a larga distancia, incluido el contenido de la mielina.

Potential Biomarker	Study Population (n)	Sample	Results	Possible Utility
Metabolomics	RRMS (24), controls (30)	Plasma	Decreased levels of PC(34:3), PC(36:6), PE(40:10) and PC(38:1) phospholipids [155]	Prognostic
	RRMS (106), PMS (176), controls (127), pediatric MS (31), pediatric controls (31)	Plasma	Decreased secondary bile acids [156]	
	MS (637), controls (317)	Plasma	Alteration in aromatic amino acid metabolites [157]	
	Retrospective longitudinal cohort: MS (238), controls (74) Prospective cohort: MS (61), controls (41)	Plasma	Identified metabolic signature consist of hormones, lipids, and amino acids associated with MS and with a severe disease course [158]	
	RRMS in relapse (38), last relapse (LR) between 1 to 6 months (28), LR between 6-24 months (34); LR more than 24 months ago (101)	Plasma	Identified four metabolites including lysine, asparagine, isoleucine, and leucine, which showed a consistent trend with time away from relapse [159]	

miRNAs = micro-RNAs, EVs = extracellular vesicles; DMF = dimethyl fumarate; NFkB = nuclear factor kappa beta; Th = T helper; Tem = effector memory T cells; Tregs = regulatory T cells; Bregs = regulatory B cells; Tn = naïve T cells; Tcm = central memory T cells; Ig = immunoglobulin; ASM = acid sphingomyelinase; TLR = toll-like receptor; KLKB1 = kallikrein B1; ApoE4 = apolipoprotein-E4; PC = phosphatidylcholine; PE = phosphatidylethanolamine; SCFAs = short-chain fatty acids.

Las referencias bibliográficas citadas numéricamente entre paréntesis se pueden obtener en la referencia ⁽¹³⁾

Tabla 4. Futuros posibles empleando metabolómica en la esclerosis múltiple.

Bibliografía

1. Baecher-Allan C, Kaskow BJ, Weiner HL. Multiple Sclerosis: Mechanisms and Immunotherapy. *Neuron*. 2018 Feb 21;97(4):742-68. [\[Pubmed\]](#)
2. Hauser SL, Oksenberg JR. The neurobiology of multiple sclerosis: genes, inflammation, and neurodegeneration. *Neuron*. 2006 Oct 5;52(1):61-76. [\[Pubmed\]](#)
3. Salzer J, Svenningsson R, Alping P, Novakova L, Björck A, Fink K, et al. Rituximab in multiple sclerosis: a retrospective observational study on safety and efficacy. *Neurology*. 2016 Nov 15;87(20):2074-81. [\[Pubmed\]](#)
4. Matute C, Alberdi E, Domercq M, Sánchez-Gómez MV, Pérez-Samartín A, Rodríguez-Antigüedad A, Pérez-Cerdá F. Excitotoxic damage to white matter. *J Anat*. 2007 Jun;210(6):693-702. [\[Pubmed\]](#)
5. Matute C, Torre I, Pérez-Cerdá F, Pérez-Samartín A, Alberdi E, Etxebarria E, et al. P2X(7) receptor blockade prevents ATP excitotoxicity in oligodendrocytes and ameliorates experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Neurosci*. 2007 Aug 29;27(35):9525-33. [\[Pubmed\]](#)
6. Saab AS, Tzvetavona ID, Trevisiol A, Baltan S, Dibaj P, Kusch K, et al. Oligodendroglial NMDA Receptors Regulate Glucose Import and Axonal Energy Metabolism. *Neuron*. 2016 Jul 6;91(1):119-32. [\[Pubmed\]](#)
7. Ghareghani M, Ghanbari A, Eid A, Shaito A, Mohamed W, Mondello S, Zibara K. Hormones in experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE) animal models. *Transl Neurosci*. 2021 May 6;12(1):164-89. [\[Pubmed\]](#)
8. Montilla A, Zabala A, Er-Lukowiak M, Rissiek B, Magnus T, Rodríguez-Iglesias N, ET AL. Microglia and meningeal macrophages depletion delays the onset of experimental autoimmune encephalomyelitis. *Cell Death Dis*. 2023 Jan 12;14(1):16. [\[Pubmed\]](#)
9. Zirngibl M, Assinck P, Sizov A, Caprariello AV, Plemel JR. Oligodendrocyte death and myelin loss in the cuprizone model: an updated overview of the intrinsic and extrinsic causes of cuprizone demyelination. *Mol Neurodegener*. 2022 May 7;17(1):34. [\[Pubmed\]](#)
10. Bernal-Chico A, Manterola A, Cipriani R, Katona I, Matute C, Mato S. P2x7 receptors control demyelination and inflammation in the cuprizone model. *Brain Behav Immun Health*. 2020 Mar 28;4:100062. Erratum in: *Brain Behav Immun Health*. 2021 Dec 23;19:100408. [\[Pubmed\]](#)
11. Serrano-Regal MP, Bayón-Cordero L, Chara Ventura JC, Ochoa-Bueno BI, Tepavcevic V, Matute C, Sánchez-Gómez MV. GABAB receptor agonist baclofen promotes central nervous system remyelination. *Glia*. 2022 Dec;70(12):2426-40. [\[Pubmed\]](#)
12. Biernacki T, Kokas Z, Sandi D, Füvesi J, Fricska-Nagy Z, Faragó P, et al. Emerging Biomarkers of Multiple Sclerosis in the Blood and the CSF: A Focus on Neurofilaments and Therapeutic Considerations. *Int J Mol Sci*. 2022 Mar 21;23(6):3383. [\[Pubmed\]](#)



13. Yang J, Hamade M, Wu Q, Wang Q, Axtell R, Giri S, Mao-Draayer Y. Current and Future Biomarkers in Multiple Sclerosis. *Int J Mol Sci.* 2022 May 24;23(11):5877. [\[Pubmed\]](#)
14. Selmaj KW, Mycko MP, Furlan R, Rejdak K. Fluid phase biomarkers in multiple sclerosis. *Curr Opin Neurol.* 2022 Jun 1;35(3):286-92. [\[Pubmed\]](#)
15. Benkert P, Meier S, Schaedelin S, Manouchehrinia A, Yaldizli Ö, Maceski A, et al.; NfL Reference Database in the Swiss Multiple Sclerosis Cohort Study Group. Serum neurofilament light chain for individual prognostication of disease activity in people with multiple sclerosis: a retrospective modelling and validation study. *Lancet Neurol.* 2022 Mar;21(3):246-57. [\[Pubmed\]](#)