



Fundació
La Marató de TV3
XVI SIMPOSIUM
Enfermedades minoritarias

Análisis de nuevos antígenos en la neuromielitis óptica (IgG-NMO/AQP4) seronegativa (enfermedad de Devic)

Dr. Albert Saiz

Fundació Clínic per a la Recerca Biomèdica, Hospital Clínic de Barcelona



1. Resumen

La neuromielitis óptica (NMO) es una enfermedad inflamatoria desmielinizante del SNC que se caracteriza por la afectación predominante de los nervios ópticos y de la médula espinal. Es una enfermedad minoritaria (prevalencia estimada 0,4-4 casos/100.000 habitantes), de predominio femenino, y una media de edad de presentación alrededor de los 39 años, aunque también puede debutar en niños y ancianos. Más del 90% de los pacientes presentarán un curso en forma de brotes, y acumularán una alta discapacidad en poco tiempo. El 50% de los pacientes necesitarán de la ayuda de un apoyo para andar o presentarán ceguera visual legal (agudeza visual <1/10) en el plazo de 8,5-10 años después del debut. Inicialmente se consideró una variante de la esclerosis múltiple (EM), pero la implicación de la inmunidad humoral en estudios patológicos, y posteriormente la identificación de un anticuerpo que se unía a un canal acuoso, la aquaporina4 (IgG-NMO/AQP4), que se expresa básicamente en los pies de los astrocitos, permitió diferenciar claramente las dos entidades.

La identificación de los IgG-NMO/AQP4 permitió, por una parte, expandir el espectro clínico a formas limitadas, como mielitis transversa longitudinalmente extensas (MTLE), o neuritis ópticas (NO) recurrentes, y más recientemente a síndrome emético y/o hipo incoercible por afectación del área postrema, y establecer unos nuevos criterios en los que la afectación clínica y/o radiológica más allá del nervio óptico y la médula no excluía el diagnóstico. Los pacientes con anticuerpos IgG-NMO/AQP4 positivos y formas limitadas que no cumplen todos los criterios, reciben el nombre de espectro de NMO. Entre un 20-35% de los pacientes son seronegativos y el porcentaje es mayor cuando se incluyen formas limitadas de la enfermedad (MTLE y NO). El papel patogénico de los IgG-NMO/AQP4 se ha sugerido tanto en estudios *in vitro* como en modelos animales. Pero se desconoce la fisiopatología asociada en los pacientes seronegativos. No se dispone de terapia curativa. El tratamiento va encaminado a minimizar el daño

asociado al brote y a prevenir la aparición de recurrencias. De ahí la importancia de la identificación precoz de los pacientes.

Objetivos:

1. Identificar nuevos anticuerpos que puedan estar implicados en la respuesta patogénica humoral inmune en pacientes seronegativos (IgG-NMO/AQP4).
2. Caracterizar los antígenos identificados en el objetivo anterior.
3. Evaluar el efecto en modelos animales mediante inyección intracerebral de IgG purificada.

2. Resultados

1. Hemos ampliado el arsenal de técnicas de detección de los anticuerpos IgG-NMO/AQP4 y mejorado la sensibilidad, reduciendo los casos de NMO

seronegativos. Se estudiaron 103 pacientes con NMO y 122 controles con enfermedades inflamatorias, a través de una técnica optimizada de inmunohistoquímica (IHQ-o), y se comparó el resultado con un ensayo basado en células *in-house* (CBA-ih) *in vivo* utilizando la isoforma M23 de la AQP4, y con uno comercial (CBA-c) fijado. La sensibilidad de la IHQ-o fue similar a la de CBA-ih y mejor que la del CBA-c, con una especificada de todas ellas del 100%. Nuestros resultados previos, sensibilidad del 65% utilizando una técnica de inmunohistoquímica convencional y CBA con la isoforma M1, mejoraron con las nuevas técnicas, sensibilidad del 77% (referencia 1).

2. Hemos identificado que un 15% de los pacientes IgG-NMO/AQP4 seronegativos presentan anticuerpos contra la glicoproteína de la mielina de los oligodendrocitos (IgG-MOG), y su presencia se asocia a un mejor pronóstico.

Estudiamos 174 pacientes adultos con NMO y espectro asociado (MTLE, NO), mediante CBA-ih transfectando la células con AQP4 o con MOG. Detectamos IgG-

MOG en el 15% de los pacientes seronegativos. Los IgG-MOG se asociaban más frecuentemente a NO, los IgG-NMO/AQP4 a NMO, y el ser seronegativo doble a MTLE. Al comparar los pacientes en función del anticuerpo (AQP4 vs. MOG), observamos que los pacientes IgG-MOG eran más jóvenes, no presentaban predominio de mujeres (50%), el cuadro clínico con mayor frecuencia era monofásico, y si bien en el debut la enfermedad presentaba la misma gravedad, los pacientes se recuperaban mejor del episodio agudo y el pronóstico final era más favorable (referencia 2).

3. Los pacientes caucásicos con NMO y esclerosis múltiple (EM) presentan una distribución alélica HLA-DRB1 diferente. El alelo DRB1*03 contribuye a ser IgG-NMO/AQP4 positivo, pero los pacientes NMO seronegativos no son diferentes respecto a los seropositivos. Estudiamos una cohorte de 22 pacientes NMO; de ellos, 16 (73%) eran IgG-NMO/AQP4 positivos, y se comparó con 228 pacientes con EM y 225 controles sanos. Los pacientes con NMO presentan una mayor frecuencia del alelo DRB1*10. Al combinar el estudio con uno francés ya publicado, observamos que la NMO se asociaba al alelo DRB1*03, y esto se relacionaba con la presencia de IgG-NMO/AQP4. No hubo diferencias entre pacientes NMO seropositivos o seronegativos (referencia 3).

4. La mayoría de las mielitis transversas longitudinalmente extensas (MTLE) son idiopáticas, presentan un buen pronóstico y son más frecuentes en pacientes con el genotipo HLA-DRB1*13. Estudiamos prospectivamente a 23 pacientes con MTLE aislada de debut. La mayoría eran mujeres, media de edad de 45 años y discapacidad moderada-grave en el nadir. Los IgG-NMO/AQP4 se detectaron en 2 (9%) pacientes, anticuerpos antinucleares en 16 (70%) y genotipo DRB1*13 en 13 (57%). La frecuencia de DRB1*13 fue significativamente mayor a la observada en pacientes con EM o NMO y controles sanos. Al final del seguimiento, 2 pacientes pasaron a NMO, 1 a EM y 20 permanecieron como idiopáticos. La discapacidad en el nadir fue predictora del pronóstico final, asociándose la extensión de la mielitis

a riesgo de recurrencia. La mayoría de MTLE son inflamatorias idiopáticas (referencia 4).

5. Hemos identificado que el 45% de los pacientes con neuritis óptica (NO) unilateral o bilateral, grave o recurrente aislada se presentan con un anticuerpo asociado. Los pacientes con IgG-NMO/AQP4 tienen el peor pronóstico visual, mientras que los que se asocian a Ig-MOG, su pronóstico es bueno y similar al de los seronegativos. Estudiamos a 51 pacientes con NO aislada y 142 controles. Analizamos la presencia de IgG-NMO/AQP4, IgG-MOG y anticuerpos contra la subunidad alfa-1 del receptor de la glicina (IgG-RGly) mediante CBA-ih. Se identificaron anticuerpos en 23 (45%) de los pacientes, incluyendo Ig-MOG en 10, IgG-NMO/AQP4 en 6, e IgG-RGly en 7 (asociado a MOG en 3 y a AQP4 en 1). Al final del seguimiento, un 35% de los pacientes que permanecieron con el diagnóstico de NO idiopática aislada presentaban un anticuerpo (MOG, RGly o ambos), situación que permitía asociarlo a un origen inmunomediado. Confirmamos que la presencia de IgG-NMO/AQP4 es un marcador de mal pronóstico visual, y la de IgG-MOG de buen pronóstico. Los anticuerpos IgG-RGly parecen ser un marcador de autoinmunidad asociada, pues también se detectan en pacientes con EM y otras enfermedades neurológicas (referencia 5).

6. Hemos identificado que los pacientes con encefalitis anti-NMDAR pueden desarrollar de forma concurrente o separada episodios desmielinizantes, y, al revés, pacientes con NMO o con síndromes desmielinizantes y síntomas atípicos pueden tener una encefalitis anti-NMDAR. Se analizó de una cohorte de 691 pacientes con encefalitis anti-NMDAR, los 23 pacientes que presentaron enfermedad desmielinizante. A los pacientes se les analizó IgG-NMO/AQP4 e IgG-MOG mediante CBA-ih. Se identificaron dos grupos: 1) pacientes en los que la encefalitis fue precedida o seguida de episodios de espectro de NMO o tronco o multifocal (12 pacientes, 4 con IgG-NMO/AQP4 y 7 con IgG-MOG) y 2) pacientes que asociaban de forma simultánea hallazgos clínicos y de resonancia de enfermedad desmielinizante (11 pacientes, 5 de ellos IgG-NMO/AQP4 y 2 IgG-

MOG). Aunque la mayoría de los pacientes mejoraron con inmunoterapia, los episodios desmielinizantes, en contraste con los de NMDAR, requirieron terapia más intensa y quedaron con más secuelas (referencia 6).

7. El modelo animal de encefalitis autoinmune experimental mediante transferencia pasiva en ratones C57BL/6 con MOG es útil para evaluar el papel de las células B en enfermedades mediadas por anticuerpos.

Un estudio comparativo, entre el modelo de encefalitis autoinmune experimental activa (aEAE) y el de transferencia pasiva (tpEAE) en ratones C57BL/6, mostró que el desarrollo de EAE era similar, pero los síntomas se iniciaban antes y la discapacidad era mayor en los animales con tpEAE. El análisis de la médula espinal demostró una mayor activación glial y más extensas áreas de desmielinización en la tpEAE que en la aEAE. Aunque los infiltrados inflamatorios, macrófagos y linfocitos T, estaban presentes en médula espinal y cerebro de ambos modelos, los linfocitos B estaban aumentados significativamente en el modelo tpEAE. La colocación de las células B con IgG y su predominante distribución en áreas de desmielinización sugiere que células B secretoras de IgG están implicadas en el proceso neurodegenerativo asociado a la tpEAE (referencia 7).

8. Evaluación del efecto de las IgG de los pacientes seropositivos y seronegativos.

Tras caracterizar el modelo *in vivo* anterior, pusimos en marcha el modelo de LPS en ratones de la cepa C57BL/6. Este modelo desarrolla un proceso inflamatorio sistémico que afecta al SNC y permeabiliza la barrera hematoencefálica. A los animales se les administró intraperitonealmente IgG purificadas de pacientes IgG-NMO/AQP4 positivos (n= 3), pacientes NMO seronegativos (n= 3), con esclerosis múltiple (n= 3) y sujetos sanos (n= 3). Tras 24 h de tratamiento, se extrajeron los cerebros y las medulas espinales, y se procesaron por RT-PCR (evaluación del patrón génico inflamatorio y glial), por Western-blot (expresión de proteínas inflamatorias y gliales) e inmunohistología (análisis de AQP4 y GFAP). También se realizó un modelo con cultivos gliales primarios (40% oligodendrocitos, 35% astrocitos, 10% microglia y 5% progenitores gliales) de células de médula espinal

de ratón, que fueron tratados con las mismas IgG purificadas de pacientes y controles. Los cultivos fueron procesados por inmunohistoquímica: marcadores gliales (GFAP, Iba-1 y CNPase), marcadores proinflamatorios (NOS2 y COX2) y determinación de óxido nítrico; por RT-PCR: evaluación de la expresión de genes gliales (GFAP, Iba-1 y CNPase), proinflamatorios (NOS2, COX2, C/EBP β , IL1 β , IL6, TNF α y IFN γ) y antiinflamatorios (TGF β II, IL4 y C/EBP α) y Western-blot: expresión de las proteínas correspondientes. Los resultados fueron presentados en el congreso de la Federation of European Neuroscience Societies (referencia 8), pero no se han publicado al invalidarse los experimentos por descubrirse con las nuevas técnicas desarrolladas (resultados 1 y 2) que una de las muestras utilizadas tanto en el *pool* de NMO seronegativos como de forma individual era en realidad de un paciente al que hemos detectado IgG-MOG a título alto, y otra era de una paciente con IgG-NMO/AQP4 a título bajo.

3. Relevancia y posibles implicaciones

1. Hemos ampliado el arsenal de técnicas de detección de los anticuerpos IgG-NMO/AQP4, y hemos mejorado la sensibilidad, reduciendo los casos de NMO seronegativos. Todo ello facilita el diagnóstico y poder instaurar una terapia preventiva de forma más precoz.

2. Hemos identificado un nuevo anticuerpo, IgG-MOG, presente en un subgrupo de pacientes IgG-NMO/AQP4 seronegativos. Su identificación es importante, dado que los pacientes presentan características clínicas y pronósticas diferenciadas, y esto tiene implicaciones a la hora de tomar una decisión terapéutica.

3. Hemos caracterizado el perfil clínico y evolutivo de los pacientes con mielitis transversa longitudinalmente extensa. El principal factor pronóstico es la gravedad al inicio del cuadro neurológico, y es el principal marcador un genotipo determinado de HLA-DRB1. En los pacientes con neuritis óptica grave o recurrente

aislada, el principal factor pronóstico viene dado por la presencia de IgG-NMO/AQP4. El análisis de anticuerpos permite sugerir el origen inmunomediado hasta en el 35% de los casos considerados idiopáticos.

4. Hay pacientes que pueden presentar de forma concurrente o separada una encefalitis autoinmune, la encefalitis anti-NMDAR y una enfermedad desmielinizante; este conocimiento es importante para poder diagnosticar y tratar de forma precoz y adecuada a los pacientes, ya que el pronóstico es distinto.

5. Hemos descrito que el modelo de encefalitis autoinmune experimental por transferencia pasiva en ratones C57BL/6 con MOG puede ser útil a la hora de evaluar el papel de las células B en enfermedades mediadas por anticuerpos, tal como la NMO.

4. Referencias

Höftberger R, Sabater L, Marignier R, Aboul-Enein F, Bernard-Valnet R, Rauschka H, Ruiz A, Blanco Y, Graus F, Dalmau J, Saiz A.

An optimized immunohistochemistry technique improves NMO-IgG detection: study comparison with cell-based assays.

PLoS One. 2013 Nov 4;8(11):e79083

Höftberger R, Sepulveda M, Armangue T, Blanco Y, Rostásy K, Cobo Calvo A, Olascoaga J, Ramió-Torrentà L, Reindl M, Benito-León J, Casanova B, Arrambide G, Sabater L, Graus F, Dalmau J, Saiz A.

Antibodies to MOG and AQP4 in adults with neuromyelitis optica and suspected limited forms of the disease.

Mult Scler. 2014 Oct 24. pii: 1352458514555785. [Epub ahead of print].

Blanco Y, Ercilla G , Llufríu S, Casanova B, Magrané MJ, Ramió-Torrentà LL, Mendibe M, Ucles A, Casado JL, López de Munain A, Ramo C, Santos S, Bolaños RF, Segura N, Sepúlveda M, Villoslada P, Graus F, Saiz A.

HLA-DRB1 typing in Caucasian patients with neuromyelitis optica.

Rev Neurol 2011; 53: 146-152;

Sepúlveda M, Blanco Y, Rovira A, Rio J, Mendibe M, Llufríu S, Gabilondo I, Villoslada P, Castelló J, Corral J, Ayuso T, Iñiguez C, Santos S, Guijarro C, Ramió-Torrentà L, Sempere AP, Olascoaga J, Graus F, Montalban X, Saiz A.

Analysis of prognostic factors associated with longitudinally extensive transverse myelitis.

Mult Scler. 2013 May;19(6):742-8.

Martinez-Hernandez E, Sepulveda M, Rostásy K, Höftberger R, Graus F, Harvey RJ, Saiz A, Dalmau J.

Antibodies to Aquaporin 4, Myelin-Oligodendrocyte Glycoprotein, and the Glycine Receptor $\alpha 1$ Subunit in Patients With Isolated Optic Neuritis.

JAMA Neurol. 2015 Feb 1;72(2):187-93

Titulaer MJ, Höftberger R, Iizuka T, Leypoldt F, McCracken L, Cellucci T, Benson LA, Shu H, Irioka T, Hirano M, Singh G, Cobo Calvo A, Kaida K, Morales PS, Wirtz PW, Yamamoto T, Reindl M, Rosenfeld MR, Graus F, Saiz A, Dalmau J.

Overlapping demyelinating syndromes and anti-N-methyl-D-aspartate receptor encephalitis.

Ann Neurol. 2014 Mar;75(3):411-28.

Mannara F, Valente T, Saura J, Graus F, Saiz A, Moreno B. *Passive experimental autoimmune encephalomyelitis in C57BL/6 with MOG: evidence of involvement of B cells.*

PLoS One. 2012;7(12):e52361.

Mannara F, Valente T, Sabater L, Saura J, Graus F, Saiz A.

Immunoglobulins from neuromyelitis optica patients induce glial activation.

FENS abstract volume 6, p082.24, 2012