



Universitat de Lleida

Estado redox periférico y biomarcadores pronóstico en la esclerosis múltiple

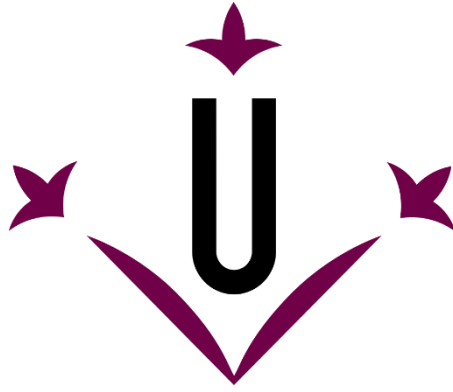
Lara Nogueras Penabad

<http://hdl.handle.net/10803/669973>

ADVERTIMENT. L'accés als continguts d'aquesta tesi doctoral i la seva utilització ha de respectar els drets de la persona autora. Pot ser utilitzada per a consulta o estudi personal, així com en activitats o materials d'investigació i docència en els termes establerts a l'art. 32 del Text Refós de la Llei de Propietat Intel·lectual (RDL 1/1996). Per altres utilitzacions es requereix l'autorització prèvia i expressa de la persona autora. En qualsevol cas, en la utilització dels seus continguts caldrà indicar de forma clara el nom i cognoms de la persona autora i el títol de la tesi doctoral. No s'autoritza la seva reproducció o altres formes d'explotació efectuades amb finalitats de lucre ni la seva comunicació pública des d'un lloc aliè al servei TDX. Tampoc s'autoritza la presentació del seu contingut en una finestra o marc aliè a TDX (framing). Aquesta reserva de drets afecta tant als continguts de la tesi com als seus resums i índexs.

ADVERTENCIA. El acceso a los contenidos de esta tesis doctoral y su utilización debe respetar los derechos de la persona autora. Puede ser utilizada para consulta o estudio personal, así como en actividades o materiales de investigación y docencia en los términos establecidos en el art. 32 del Texto Refundido de la Ley de Propiedad Intelectual (RDL 1/1996). Para otros usos se requiere la autorización previa y expresa de la persona autora. En cualquier caso, en la utilización de sus contenidos se deberá indicar de forma clara el nombre y apellidos de la persona autora y el título de la tesis doctoral. No se autoriza su reproducción u otras formas de explotación efectuadas con fines lucrativos ni su comunicación pública desde un sitio ajeno al servicio TDR. Tampoco se autoriza la presentación de su contenido en una ventana o marco ajeno a TDR (framing). Esta reserva de derechos afecta tanto al contenido de la tesis como a sus resúmenes e índices.

WARNING. Access to the contents of this doctoral thesis and its use must respect the rights of the author. It can be used for reference or private study, as well as research and learning activities or materials in the terms established by the 32nd article of the Spanish Consolidated Copyright Act (RDL 1/1996). Express and previous authorization of the author is required for any other uses. In any case, when using its content, full name of the author and title of the thesis must be clearly indicated. Reproduction or other forms of for profit use or public communication from outside TDX service is not allowed. Presentation of its content in a window or frame external to TDX (framing) is not authorized either. These rights affect both the content of the thesis and its abstracts and indexes.



Universitat de Lleida

TESI DOCTORAL

Estado redox periférico y biomarcadores pronóstico en la
esclerosis múltiple

Lara Nogueras Penabad

Memoria presentada para optar al grado de doctor por la Universitat de Lleida
Programa de doctorado en salud

Directores:
Luis Brieva Ruiz
Hugo Gonzalo Benito
Reinald Pamplona Gras

Tutor:
Manel Portero Otín

2020

Resumen

La esclerosis múltiple (EM) es una enfermedad crónica, neurodegenerativa y desmielinizante del sistema nervioso central (SNC) de supuesta patogenia autoinmune y etiología aún por dilucidar. En este contexto, el estrés oxidativo (EO) ha tomado relevancia por su implicación en la fisiopatología de la enfermedad a nivel del SNC y es causante y/o se relaciona con alteraciones metabólicas que sufren las neuronas de los pacientes con EM. Sin embargo, se desconocen las alteraciones del estado redox periféricas y si los cambios metabólicos ocurren desde el inicio de la enfermedad. Nuestra hipótesis es que el EO juega un papel relevante en alteraciones periféricas en la patología y que las alteraciones metabólicas que ocurren en la enfermedad desde el comienzo pueden establecer el pronóstico de los pacientes. Así pues, se establecieron dos objetivos: i) determinar si existen alteraciones del estado redox en la periferia de pacientes con EM y ii) establecer si cambios en el perfil metabólico en el momento diagnóstico contribuyen a predecir el curso de la enfermedad. Se realizaron dos estudios, el primero con 159 pacientes y 75 controles donde se establecieron las alteraciones mitocondriales de las células mononucleares de sangre periférica (PBMCs) mediante respirometría de alta resolución, citometría de flujo y western blot y el segundo con 65 sujetos No-EM (con enfermedades diferentes a la EM), 19 pacientes agresivos (discapacidad mayor de 6 o cambio a un tratamiento de segunda línea en menos de 5 años) y 41 pacientes leves (discapacidad menor de 3 y sin cambio a tratamiento de segunda línea tras más de 5 años) donde se analizaron diferentes factores pronóstico en suero y líquido cefalorraquídeo mediante cromatografía. En el primer estudio las PBMCs de los pacientes con EM mostraron un mayor consumo de oxígeno en las diferentes situaciones analizadas junto con un menor número de mitocondrias y complejos de la cadena respiratoria además de una mayor producción de superóxido. En el segundo, se obtuvo que el metaboloma, lipidoma y perfil de ácidos grasos del momento diagnóstico podrían predecir el curso de la EM. En conclusión, las alteraciones mitocondriales y del estado redox presentes a nivel periférico podrían tener una importante implicación en la etiopatología de la enfermedad y los cambios metabólicos que suceden desde el comienzo de la patología podrían ser útiles como biomarcadores pronóstico del curso clínico de los pacientes con EM.

Resum

L'esclerosi múltiple (EM) és una malaltia crònica, neurodegenerativa i desmielinitzant del sistema nerviós central (SNC) de suposada patogènia autoimmune i etiologia encara per explicar. En aquest context, l'estrès oxidatiu (EO) ha pres rellevància per la seva implicació en la fisiopatologia de la malaltia en el SNC i és causant i/o es relaciona amb les alteracions metabòliques que es donen a les neurones dels pacients amb EM. No obstant això, es desconeixen les alteracions perifèriques de l'estat redox i si els canvis metabòlics ocorren des de l'inici de la malaltia. La nostra hipòtesi és que l'EO juga un paper rellevant en les alteracions perifèriques de la patologia i que les alteracions metabòliques que ocorren en la malaltia des del començament poden establir el pronòstic del curs dels pacients. Així doncs, es van establir dos objectius: i) determinar si existeixen alteracions de l'estat redox perifèric de pacients amb EM i ii) establir si els canvis en el perfil metabòlic en el moment del diagnòstic contribueixen a predir el curs de la malaltia. Es van realitzar dos estudis, el primer amb 159 pacients i 75 controls on es van establir les alteracions mitocondrials de les cèl·lules mononuclears de sang perifèrica (PBMCs) mitjançant respirometria d'alta resolució, citometria de flux i western blot i el segon amb 65 subjectes No-EM (amb malalties diferents a la EM), 19 pacients agressius (discapacitat major de 6 o canvi a un tractament de segona línia en menys de 5 anys) i 41 pacients lleus (discapacitat menor de 3 i sense canvi a tractament de segona línia després de més de 5 anys) on es van analitzar diferents factors pronòstic en sèrum i líquid cefalorraquidi mitjançant cromatografia. En el primer estudi les PBMCs dels pacients amb EM van mostrar un major consum d'oxigen en les diferents situacions analitzades juntament amb un menor nombre de mitocondris i complexos de la cadena respiratòria a més d'una major producció de superòxid. En el segon estudi, els resultats indicaven que el metaboloma, lipidoma i perfil d'àcids grassos del moment diagnòstic podrien predir el curs de l'EM. En conclusió, les alteracions mitocondrials i de l'estat redox presents a nivell perifèric podrien tenir una important implicació en la etiopatologia de la malaltia i els canvis metabòlics que succeeixen des del començament de la patologia podrien ser útils com a biomarcadors pronòstic del curs clínic dels pacients amb EM.

Abstract

Multiple sclerosis (MS) is a chronic, neurodegenerative and demyelinating disease of the central nervous system (CNS) of suspected autoimmune pathogenesis and etiology yet to be elucidated. In this context, oxidative stress (OS) has become relevant due to its involvement in the pathophysiology of the disease at the CNS, being causative and / or related to metabolic alterations suffered by neurons in patients with MS. However, the peripheral redox state alterations, and whether the metabolic changes occur since the onset of the disease is still unknown. Our hypothesis is that the OS plays a relevant role in the development of the peripheral alterations of the pathology, and that the metabolic alterations occurring from the onset of the disease can determine the patients prognosis. Thus, two objectives were established: i) to determine the peripheral alterations of the redox state of patients with MS, and ii) to establish whether the changes in the metabolic profile at moment of diagnosis contribute to predict the course of the disease. Two studies were conducted, the first including 159 patients and 75 controls, in which mitochondrial alterations of peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) were established using high resolution respirometry, flow cytometry and western blot; and the second including 65 Non-MS subjects (with diseases different from MS), 19 aggressive patients (with a disability greater than 6, or a switch to a second-line treatment in less than 5 years) and 41 mild patients (with a disability less than 3 and, no switch to second-line treatment after more 5 years) where different prognostic factors were analysed in serum and cerebrospinal fluid by chromatography. In the first study, the PBMCs of MS patients showed a higher oxygen consumption in the different analysed conditions along with a lower number of mitochondria and respiratory chain complexes and to a higher superoxide production. In the second, it was found that the metabolomic, lipidomic and fatty acid profile at diagnosis moment could predict the course of MS. To conclude, peripheral mitochondrial and redox state alterations could have an important involvement in the pathophysiology of the disease, and the metabolic changes that occur since the onset of the disease could be used as prognostic biomarkers of the clinical course of patients with MS.

ÍNDICE

Índice de figuras	IX
Índice de tablas	XII
Abreviaciones.....	XIV
Introducción.....	1
1. Introducción	2
1.1. Esclerosis múltiple, ¿qué es?	2
1.1.1 Historia de la enfermedad.....	2
1.2. Epidemiología	4
1.3. Factores de riesgo.....	4
1.3.1 Genéticos.....	4
1.3.2 Ambientales.....	5
1.4. Aspectos clínicos de la enfermedad	6
1.4.1 Diagnóstico	6
1.4.2 Curso de la enfermedad	7
1.5. Fisiopatología de la enfermedad	9
1.5.1 Implicación del sistema inmune.....	10
1.6. Estrés oxidativo y esclerosis múltiple	13
1.6.1 Estrés oxidativo en los sistemas biológicos.....	13
1.6.2 Estrés oxidativo y la fisiopatología de la esclerosis múltiple	14
1.7. La mitocondria en la esclerosis múltiple	17
1.7.1 La mitocondria en las células eucariotas.....	17
1.7.2 Cadena de transporte electrónico.....	17
1.7.3 Estrés oxidativo y mitocondria	18
1.7.4 Alteraciones mitocondriales en la esclerosis múltiple	19
1.8. Herramientas para establecer el pronóstico de la EM	23

1.9.	Metabolómica	24
1.9.1	Flujo de trabajo en la metabolómica no dirigida	26
1.9.2	Metabolómica en la esclerosis múltiple	29
1.10.	Lipidómica	29
1.10.1	Lípidos: funciones y clasificación	30
1.10.2	Perfil lipídico de ácidos grasos	33
1.10.3	Lipidómica y perfil lipídico en la esclerosis múltiple	35
1.11.	Daño oxidativo proteico	36
1.11.1	Oxidación de partículas lipoproteicas: el caso de las lipoproteínas de baja densidad (LDL)	37
	Hipótesis y objetivos	39
	2. Hipótesis y objetivos	40
	Materiales y métodos	42
	3. Materiales y métodos	43
3.1	Sujetos de estudio	43
3.2	Métodos	45
3.2.1	Extracción de sangre	45
3.2.2	Análisis de metabolitos de la vitamina D	46
3.2.3	Determinaciones bioquímicas	49
3.2.4	Respirometría	52
3.2.5	Citometría de flujo	54
3.2.6	Inmunodetección por Western blot	55
3.2.7	Análisis metabolómico	59
3.2.8	Análisis del lipidoma	61
3.2.9	Análisis de ácidos grasos	65
3.2.10	Determinación del daño oxidativo proteico	69

3.3	Análisis estadístico	73
Resultados		75
4.	Resultados	76
4.1	Concentración de metabolitos de la vitamina D en plasma	76
4.2	Capacidad antioxidante en plasma	78
4.3	Lactato en plasma	80
4.4	Estudio del estado redox de las células mononucleares de sangre periférica de los pacientes con esclerosis múltiple	81
4.4.1	Respiración celular de las PBMCs	81
4.4.2	Número de mitocondrias de las PBMCs	83
4.4.3	Concentración de ATP en las PBMCs	84
4.4.4	Potencial de membrana mitocondrial de las PBMCs	85
4.4.5	Producción de superóxido	86
4.4.6	Complejos mitocondriales de la CTE de las PBMCs	88
4.4.7	Enzimas MnSOD y catalasa de las PBMCs	88
4.5	Metaboloma del líquido cefalorraquídeo y suero	91
4.5.1	Metabolitos diferenciales entre grupos en LCR y suero	96
4.6	Lipidoma del líquido cefalorraquídeo y suero	99
4.6.1	Lípidos diferenciales entre grupos en líquido cefalorraquídeo y suero ..	104
4.6.2	Lipidoma del líquido cefalorraquídeo en función del curso clínico	106
4.7	Perfil de ácidos grasos del líquido cefalorraquídeo y suero	109
4.7.1	Índices derivados de la composición de AG en el líquido cefalorraquídeo y en suero	113
4.7.2	Estimación de la actividad de las enzimas desaturasas y elongasas en LCR y suero	115
4.8	Daño oxidativo proteico y anticuerpos contra lipoproteínas de baja densidad oxidadas	119

Discusión.....	122
5. DISCUSIÓN.....	123
5.1 Los pacientes con esclerosis múltiple presentan menor concentración de la vitamina 25D3 en plasma	123
5.2 Los pacientes con esclerosis múltiple presentan menor capacidad antioxidante en plasma que el grupo control	124
5.3 Los pacientes con esclerosis múltiple muestran una mayor concentración de lactato en plasma	125
5.4 Los pacientes con esclerosis múltiple presentan alteraciones en el estado redox de sus células mononucleares de sangre periférica	126
5.4.1 Los pacientes con esclerosis múltiple consumen más oxígeno que el grupo control	126
5.4.2 Las células mononucleares de sangre periférica de los pacientes con esclerosis múltiple tienen un menor número de mitocondrias.....	127
5.4.3 Las células mononucleares de sangre periférica de los pacientes con esclerosis múltiple producen menos ATP	128
5.4.4 Las células mononucleares de sangre periférica de los pacientes no muestran diferencias en el potencial de membrana mitocondrial respecto a los controles.....	128
5.4.5 Los linfocitos T de los pacientes producen más superóxido que los de los controles.....	129
5.4.6 Las mononucleares de sangre periférica de los pacientes tienen menor cantidad de complejos I, III y V de la cadena respiratoria.....	130
5.4.7 Los pacientes muestran una tendencia de concentración superior de enzimas antioxidantes.....	130
5.4.8 Resumen del estado redox de las mononucleares de sangre periférica de los pacientes con EM.....	131
5.5 El perfil metabólico del suero predice mejor el curso de la EM que el perfil del LCR	132

5.6	El perfil lipidómico del líquido cefalorraquídeo podría ser útil como biomarcador pronóstico de la esclerosis múltiple	135
5.7	Los pacientes con esclerosis múltiple presentan un perfil diferencial de ácidos grasos desde el momento diagnóstico.....	136
5.8	Los biomarcadores de daño oxidativo proteico presentan diferencias entre grupos en el momento diagnóstico.....	138
5.9	Los pacientes con esclerosis múltiple presentan mayor concentración de anticuerpos contra lipoproteínas de baja densidad oxidadas en el momento diagnóstico en líquido cefalorraquídeo.....	141
	Conclusiones	143
6.	Conclusiones.....	144
	Bibliografía.....	146
7.	Bibliografía	147
	ANEXOS	166
8.	Anexos.....	167

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Aparición de los tratamientos modificadores de la enfermedad a lo largo del tiempo.	3
Figura 2. Curso clínico Remitente Recurrente.....	8
Figura 3. Escala expandida del estado de discapacidad.....	9
Figura 4. Lesiones en la sustancia blanca en el SNC.....	10
Figura 5. Alteraciones del SI en la periferia.....	11
Figura 6. Actores responsables de la inflamación en los primeros estadios de la enfermedad.....	13
Figura 7. Representación simplificada de las vías energéticas que se activan en función del estado de los LT.....	16
Figura 8. Representación de la CTE.....	18
Figura 9. Lugares de producción de ROS en la CTE.....	19
Figura 10. Mecanismo de daño neuroaxonal e implicación mitocondrial.....	20
Figura 11. Representación de las técnicas “ómicas”.....	25
Figura 12. Flujo de trabajo para la realización de la aproximación no dirigida de la metabolómica.....	28
Figura 13. Representación de la estructura característica de las 8 categorías de lípidos.....	30
Figura 14. Proceso de formación de AG de cadena larga.....	34
Figura 15. Daño oxidativo derivado de productos aldehídicos o peroxidación lipídica.....	37
Figura 16. Separación de las PBMCs.....	46
Figura 17. Metabolismo de la vitamina D.....	47
Figura 18. Concentración de la vitamina 25D3 en sujetos no suplementados.....	77
Figura 19. Diferencias en la concentración de vitamina 25D3 y vitamina 24,25D3.....	78
Figura 20. Análisis de la capacidad antioxidante.....	79
Figura 21. Concentración de AU en plasma.....	79
Figura 22. Correlación entre capacidad antioxidante y concentración de AU en plasma.....	80
Figura 23. Concentración de lactato en plasma.....	81
Figura 24. Representación de un experimento de respiración de las PBMCs.....	82
Figura 25. Resultados del análisis por respirometría de las PBMCs.....	83

Figura 26. Número de mitocondrias analizado por citometría de flujo.....	84
Figura 27. Producción de ATP de las PBMCs.	85
Figura 28. Potencial de membrana mitocondrial en las PBMCs de pacientes y controles	86
Figura 29. Producción de superóxido analizada por citometría de flujo	87
Figura 30. Porcentaje de células analizadas por citometría de flujo	87
Figura 31. Análisis de los complejos mitocondriales por WB.....	88
Figura 32. Análisis de la cantidad de SOD2 por Western Blot.....	89
Figura 33. Análisis de la cantidad de catalasa por Wester Blot.....	90
Figura 34. Distribución del metaboloma del LCR de los pacientes con EM agresiva, pacientes con EM leve y sujetos sin EM.....	92
Figura 35. Distribución del metaboloma en suero de los tres grupos de estudio.	92
Figura 36. Estadística multivariable que muestra la huella del metaboloma del LCR y suero de los grupos de estudio en el momento diagnóstico.	93
Figura 37. Validación cruzada de los valores y score de la importancia de las variables de proyección del modelo del PLS-DA.....	94
Figura 38. PLS-DA del metaboloma del LCR y suero de los pacientes con EM..	95
Figura 39. Potencial poder diagnóstico de la metabolómica en LCR y suero.	95
Figura 40. Distribución de la fosfatidiletanolamina 28:1 en los tres grupos de estudio.	98
Figura 41. Distribución del lipidoma en los tres grupos de estudio en LCR: Pacientes con EM agresiva, Pacientes con EM leve y sujetos sin EM	100
Figura 42. Distribución del lipidoma en los tres grupos de estudio en suero: Pacientes con EM agresiva, Pacientes con EM leve y sujetos sin EM.	101
Figura 43. Estadística multivariable que muestra la huella del lipidoma del LCR y suero de los grupos de estudio en el momento diagnóstico.	102
Figura 44. Validación cruzada de los valores del modelo del PLS-DA.	103
Figura 45. Distribución del lipidoma en los dos grupos de estudio en LCR: Pacientes con EM agresiva, Pacientes con EM leve y sujetos sin EM	107
Figura 46. Estadística multivariable que muestra la huella del perfil lipídico del LCR del grupo agresivo y del grupo leve en el momento diagnóstico.	108

Figura 47. AG diferenciales entre el grupo leve y agresivo en el momento diagnóstico.	112
Figura 48. Índices de AG diferenciales entre los grupos leve y agresivo.	115
Figura 49. Elongasas y desaturasas diferenciales entre el grupo leve y agresivo.....	118
Figura 50. Beta-oxidación peroxisomal	118
Figura 51. Ac contra especies lipídicas oxidadas en LCR.	121

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Actualización de los criterios diagnósticos de 2017	7
Tabla 2. Distribución y características de los grupos del estudio.....	44
Tabla 3. Características de los pacientes del estudio	44
Tabla 4. Reactivos necesarios para la realización de la técnica FRAP	50
Tabla 5. Reactivos necesarios para la técnica ABTS	50
Tabla 6. Preparación de los geles para la técnica Westen Blot.....	57
Tabla 7. Anticuerpos utilizados para el análisis de proteínas por Western Blot.....	58
Tabla 8. Anticuerpos Secundarios utilizados para el análisis proteico por Western Blot	59
Tabla 9. Estándares representativos de clase y estándares internos de extracción añadidos a las muestras	62
Tabla 10. Distribución de las muestras de LCR en los diferentes pools de muestras. ...	66
Tabla 11. FAMEs identificados en un cromatograma por CG-FID.....	67
Tabla 12. Iones (m/z) de los analitos medidos mediante GC/MS	72
Tabla 13. Concentración de metabolitos de la vitamina D analizados en los pacientes y controles	77
Tabla 14. Modelo de regresión lineal para determinar si las diferencias en el FRAP son debidas al AU	80
Tabla 15. Metabolitos identificados en el LCR los grupos de estudio.....	96
Tabla 16. Metabolitos identificados en el suero los sujetos de estudio.	97
Tabla 17. Lípidos identificados entre los 3 grupos de estudio en LCR.	104
Tabla 18. Lípidos identificados en el suero de los tres grupos de estudio.....	105
Tabla 19. Diferencia de concentración de los lípidos identificados entre leves y agresivos.	109
Tabla 20. Composición de AG en LCR.....	110
Tabla 21. Composición de AG en suero.....	111
Tabla 22. Índices calculados mediante la composición de AG en LCR.	113
Tabla 23. Índices calculados mediante la composición de AG en suero.	114
Tabla 24. Actividad estimada de las desaturadas en LCR.....	116
Tabla 25. Actividad estimada de las enzimas desaturadas en suero.....	116
Tabla 26. Actividad estimada de las elongasas en LCR	117

Tabla 27. Actividad estimada de las enzimas elongasas en suero	117
Tabla 28. Marcadores de daño oxidativo en LCR del grupo leve, agresivo y control ..	119
Tabla 29. Marcadores de daño oxidativo en suero del grupo leve, agresivo y control	120
Tabla 30. Marcadores de daño oxidativo en suero del grupo leve y agresivo.....	121

ABREVIACIONES

ABTS: 2,2'-azino-bis(3-ethylbenzthiazoline-6-sulfonic acid)

Ac: anticuerpo

AG: ácido graso

AGI: ácido graso insaturado

AGMI: ácido graso monoinsaturado

AGPI: ácido graso poliinsaturado

AGS: ácido graso saturado

ALE: productos avanzados de lipoxidación

ATP: adenosina 5'-triphosphate

AU: ácido úrico

BHE: barrera hematoencefálica

BSA: albúmina sérica bovina

BOC: bandas oligoclonales

CTE: cadena de transporte electrónico

DG: diglicérido

DHA: ácido docosahexanoico

DMEM: *dulbecco modified Eagles minimal essential médium*

DMSO: dimetil sulfóxido

ADN: ácido desoxiribonucleico

EAE: encefalitis autoinmune experimental

EDSS: escala ampliada del estado de discapacidad

EM: esclerosis múltiple

EO: estrés oxidativo

FCCP: *Carbonyl cyanide 4-(trifluoromethoxy)phenylhydrazone*

FRAP: ferric reducing antioxidant power

GF: glicerofosfolípido

GL: glicerolípido

Ig: inmunoglobulinas

LB: linfocitos B

LDL: lipoproteínas de baja densidad

LE: lípidos de esterol

LP: lípidos de prenol

LT: linfocitos T
LCR: líquido cefalorraquídeo
MG: monoglicérido
MTBE: metil tert butil eterjasj
NADH: Nicotinamida adenina dinucleótido
O2K: oxygraph 2K
PBMCs: células mononucleares de sangre periférica
PBS: *phosphate buffered saline*
PCA: análisis de componentes principales
PLS-DA: análisis discriminante de cuadrados mínimos parciales
PVDF: difluoruro de polivinilo
RL: radical libre
RM: resonancia magnética
RNS: especies reactivas de nitrógeno
ROS: especies reactivas de oxígeno
RR: remitente recurrente
SDS: *sodium dodecyl sulfata*
SI: sistema inmune
SNC: sistema nervioso central
SOD: superóxido dismutasa
TG: triglicérido
UCP: proteínas desacopladoras
UI: unidades internacionales

INTRODUCCIÓN

1. INTRODUCCIÓN

1.1. Esclerosis múltiple, ¿qué es?

La esclerosis múltiple (EM) es una enfermedad crónica, neurodegenerativa y desmielinizante del sistema nervioso central (SNC) de supuesta patogenia autoinmune (Reich, Lucchinetti, & Calabresi, 2018).

1.1.1 *Historia de la enfermedad*

La primera referencia que se hizo a la EM como enfermedad con identidad propia fue en 1838, cuando se consideró una enfermedad neurológica diferente a las demás. Esta primera descripción científica fue realizada por Jean-Martin Charcot en 1868 (Ordenstein, 1868). La definición contempló por primera vez los síntomas clínicos y ciertos aspectos de la fisiopatología de la enfermedad, que fueron imprescindibles para la evolución del conocimiento sobre la misma. Jean-Martin Charcot llamó a la enfermedad “*esclerosis en placas*” debido a las lesiones presentes en los cerebros de los pacientes, que fueron analizados post-mortem (Ordenstein, 1868). Desde la descripción que realizó Charcot, otros médicos utilizaron su conocimiento para diagnosticar la enfermedad, pero la complejidad de la patología ha propiciado que la evolución del conocimiento no se haya detenido desde esta primera descripción. Además, la etiopatogenia de la misma no ha podido ser dilucidada por completo todavía.

Durante la década del 1950 se aceptó la naturaleza inmunológica del proceso fisiopatológico y se comenzaron a aplicar metodologías más rigurosas para los estudios y ensayos clínicos, con el objetivo de poder encontrar un tratamiento para la enfermedad (H. Miller, Newell, & Ridley, 1961).

Uno de los avances tecnológicos más importantes para la EM fue la resonancia magnética (RM) que se introdujo en 1981 por Ian Young y que permitió observar las alteraciones del SNC en el sujeto vivo, así como la evolución de las mismas para conocer la actividad de la enfermedad (Young et al., 1981). Todavía hoy en día es la herramienta más útil en la enfermedad, tanto para el diagnóstico como para el seguimiento (Lublin & Reingold, 1996a; Thompson et al., 2018).

1.1.1.1 Historia de los tratamientos de la esclerosis múltiple

Muchos han sido los esfuerzos realizados para conseguir un tratamiento efectivo pero, no fue hasta el año 1958 cuando por primera vez, Henry Miller y colaboradores demostraron la eficacia de los corticoides como tratamiento de los brotes de la enfermedad (H. Miller et al., 1961). La efectividad de esta terapia sirvió para reforzar la idea de la implicación de la inflamación, en la fisiopatología de la EM. Desde entonces, los corticoides se utilizan para tratar los brotes característicos de la enfermedad, aunque este tratamiento no es específico de la EM y no modifica el curso de la misma, por lo que no se encuentra dentro de los tratamientos modificadores de la enfermedad.

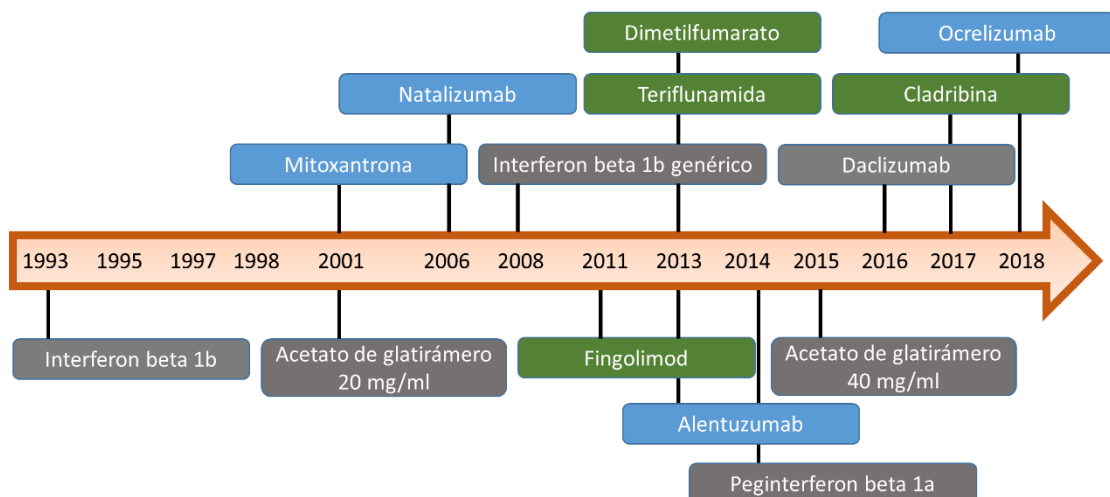


Figura 1. Aparición de los tratamientos modificadores de la enfermedad a lo largo del tiempo. Con el fondo gris se presentan los fármacos inyectables, con fondo verde los fármacos orales y con fondo azul los fármacos de administración intravenosa. Imagen adaptada de De Angelis, John, & Brownlee, 2018.

El descubrimiento del primer tratamiento efectivo para la EM llegó en 1980 y fue el interferón beta 1b (Connolly, 1994). Esta molécula, no era suficientemente estable y el cambio de una cisteína por una serina mejoró su estabilidad permitiendo que posteriormente se pudiera comercializar como terapia para la enfermedad (1993) (Connolly, 1994). Desde entonces han aparecido numerosos tratamientos modificadores de la enfermedad, aunque la cura todavía no se ha encontrado. En la **figura 1** se muestra la cronología de aparición de los tratamientos modificadores de la enfermedad. A partir de 2010 el crecimiento de los tratamientos se produjo de forma

exponencial lo que ofrece un mayor número de opciones para los pacientes pero convierte las estrategias terapéuticas en un algoritmo más complejo para los clínicos.

1.2. Epidemiología

La EM es la causa más común de discapacidad no traumática en los adultos jóvenes (Brundin et al., 2017). Afecta a más de 2 millones de personas en todo el mundo (Reich et al., 2018). En las décadas pasadas, la incidencia y la prevalencia de la enfermedad han aumentado en los países desarrollados. La causa de tal aumento es todavía desconocida (Dobson & Giovannoni, 2019), aunque hay autores que postulan que una mayor esperanza de vida de los pacientes, junto con los cambios en los criterios diagnósticos, además de un aumento real debido a otros factores, podrían ser los responsables de este efecto (Howard, Trevick, & Younger, 2016).

Le EM, en concreto el subtipo clínico remitente recurrente (RR) se desarrolla comúnmente entre los 20-40 años (Louapre, et al., 2017). Esta patología es más común en mujeres, en concreto por cada hombre que desarrolla la enfermedad hay tres mujeres que lo hacen (Kingwell et al., 2013). Al mismo tiempo, el incremento de la incidencia y la prevalencia de la enfermedad, también está siendo más pronunciado en mujeres pasando de una distribución 1:2 (hombres: mujeres) a una 1:3 (hombres: mujeres) (Evans et al., 2013; Kingwell et al., 2013).

1.3. Factores de riesgo

La causa del desarrollo de la EM es todavía desconocida pero se sabe que es necesaria una combinación de una susceptibilidad genética junto con una serie de factores ambientales.

1.3.1 *Genéticos*

A mediados del siglo XIX Ernst Leyden fue el primero en sugerir una posible causa genética de la enfermedad, pero no fue hasta 1930 que Curtius y colaboradores en Alemania, empezaron a estudiar los aspectos genéticos de la enfermedad y pudieron demostrar una implicación de la herencia en ciertos casos (Ebers, Sadovnick, & Risch, 1995). A pesar de estos primeros indicios, el primer estudio colaborativo, que analizó

aproximadamente 30000 pacientes con EM y que permitió conocer mejor la genética característica de la enfermedad, no se inició hasta el 1980 (Sadovnick et al., 1993).

A través de diferentes aproximaciones y mediante estudios en gemelos se han analizado los genes implicados en la enfermedad. Más de 200 variantes genéticas han sido identificadas como responsables del incremento del riesgo de sufrir EM (Reich et al., 2018). El gen que tiene una mayor implicación en la enfermedad es el gen del antígeno leucocitario humano (HLA) tanto el de clase I como el de clase II (Sadovnick et al., 1993; Dyment et al., 2004; Hedstrom et al., 2017). Concretamente es el gen HLA-DRB1 de la clase II el que ha mostrado una mayor implicación en el riesgo de sufrir la enfermedad (De Jager et al., 2009; Katsavos et al., 2019).

1.3.2 *Ambientales*

Los estudios de migración confirman que la exposición ambiental es crítica para el desarrollo de la enfermedad. Los adultos que migran desde países donde el riesgo de desarrollar la enfermedad es bajo continúan teniendo un riesgo bajo en el país de destino, pero los niños nacidos de parejas de migrantes, por el contrario, tienen el riesgo del país donde nacen (Dean, 1967; Dean & Kurtzke, 1971; Dobson & Giovannoni, 2019).

Varios factores de riesgo se han definido en la EM y entre los que han podido demostrar mayor evidencia se encuentran la vitamina D, la luz ultravioleta B, la infección por el virus Epstein Barr (EBV), la obesidad y el tabaco (Dobson & Giovannoni, 2019). En concreto, la infección por EBV, incrementa al doble la probabilidad de desarrollar la enfermedad (Compston & Coles, 2008; Dobson & Giovannoni, 2019).

1.3.2.1 Vitamina D

Dada la importancia de la vitamina D como factor de riesgo en la patología, en esta tesis analizaremos la concentración de la misma en los pacientes con EM. Es por este motivo que, a continuación, nos centraremos en este factor de riesgo.

La vitamina D se encuentra en alimentos como pescados grasos, carne, yema de huevo y aceite de hígado de bacalao, entre otros, y es necesaria su ingesta para que pueda activarse y cumplir funciones tan importantes en el funcionamiento correcto del organismo como la de servir de vehículo para la absorción del calcio, modular el funcionamiento del SI y proteger frente a ciertos tipos de cáncer.

La luz solar es la fuente más eficiente de conversión de la vitamina D inactiva a la forma activa, que es la necesaria para el organismo (Charoenngam, Shirvani, & Holick, 2019; Hossein-nezhad & Holick, 2013). Existe una fuerte correlación entre el gradiente de luz ultravioleta, consecuencia de los cambios en la latitud, y la prevalencia de EM. Esta asociación es debida a la menor síntesis de vitamina D en las zonas de mayor latitud, es decir, a que una menor intensidad lumínica implica una menor síntesis de vitamina D (Bjørnevik et al., 2017; Dobson & Giovannoni, 2019; Hewer et al., 2013). Niveles de vitamina D bajos, una disminución de la ingesta de esta vitamina, poca actividad al aire libre sumada a una predisposición genética, incrementan el riesgo de padecer la enfermedad (Simpson Jr, der Mei, & Taylor, 2018).

Además de relacionarse con la prevalencia, la vitamina D se relaciona con un peor pronóstico de la enfermedad, es decir, con un curso más agresivo de la misma (Sayonara R. Oliveira et al., 2017). Por este motivo, es muy común suplementar a los pacientes con EM que tienen déficit, con esta vitamina (Berezowska, Coe, & Dawes, 2019).

1.4. Aspectos clínicos de la enfermedad

1.4.1 Diagnóstico

El diagnóstico de la EM suele realizarse antes de los 40 años (Friese, Schattling, & Fugger, 2014) y está basado en criterios clínicos y radiológicos. Los criterios diagnósticos de la EM han sido revisados en numerosas ocasiones desde que se establecieron las premisas básicas de la diseminación en tiempo y espacio en 1960 (Schumacher, 1960). En 1983 apareció una nueva actualización de los mismos (Poser et al., 1983) y tras estos, en 2001, los criterios que se han utilizado desde entonces con diferentes actualizaciones, los criterios McDonald (McDonald et al., 2001). A partir de

este momento se han ido adaptando conforme ha mejorado el conocimiento de la patología en los años 2005, 2011 y por última vez en 2017 (Beesley et al., 2018; Thompson et al., 2018). Las actualizaciones han permitido, a través de la experiencia clínica, realizar un diagnóstico de la enfermedad más preciso y más temprano con el objetivo de poder iniciar los tratamientos de manera precoz, ya que es relevante a la hora de prevenir el incremento de la discapacidad de los pacientes.

Actualmente el diagnóstico de la EM se basa en:

1. Síntomas compatibles con la enfermedad
2. Exploraciones paraclínicas características de la EM: presencia de lesiones típicas de la enfermedad medidas por RM y presencia de bandas oligoclonales (BOC) de síntesis intratecal, es decir, en líquido cefalorraquídeo (LCR) y no en suero.
3. Excluir otras enfermedades que puedan simular la EM.

La combinación de estos parámetros se presenta en la **tabla 1** (adaptada de Thompson et al., 2018).

Tabla 1. Actualización de los criterios diagnósticos de 2017

Número de brotes clínicos	Número de lesiones con evidencia clínica objetiva	Datos adicionales necesarios para el diagnóstico
≥ 2	≥ 2	Ninguno (pero recomendable RM)
≥ 2	1 + evidencia de diseminación en espacio	Ninguno (pero recomendable RM)
≥ 2	1	Diseminación en espacio demostrada por un ataque adicional en diferente localización del SNC
1	≥ 2	Demostración de diseminación en tiempo por otro brote o por MRI o BOC positivas en LCR
1	1	Diseminación en espacio demostrada por un ataque adicional en diferente localización del SNC Y Demostración de diseminación en tiempo por otro brote o por MRI o BOC positivas en LCR

1.4.2 Curso clínico de la enfermedad

La EM es una enfermedad crónica y heterogénea en su presentación tanto clínica como radiológica. Además, clásicamente se han descrito diferentes cursos clínicos que son i) primaria progresiva, ii) secundaria progresiva y iii) remitente recurrente. Para

esta tesis nos centraremos en el curso RR que es el curso que afecta aproximadamente al 85% de los pacientes que padecen la enfermedad al inicio de la misma (Saleem, et al., 2019) y que se caracteriza por presentar brotes a los que les sigue una recuperación parcial o total junto con un incremento de la discapacidad a lo largo de los años. En la **figura 2** se muestra un ejemplo del curso clínico RR.

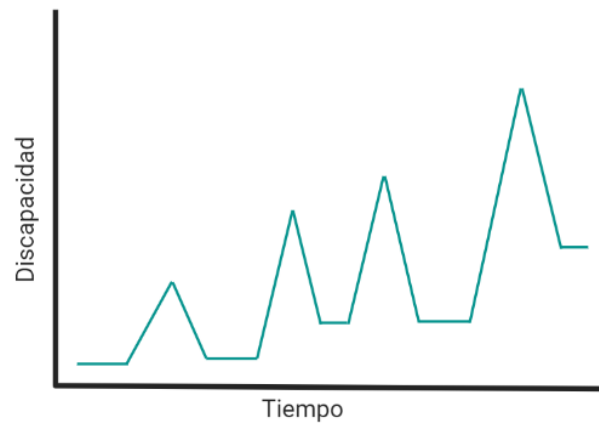


Figura 2. Curso clínico Remitente Recurrente. Tras cada brote se produce una recuperación que puede ser parcial o completa a nivel clínico pero suele dejar una pequeña secuela a nivel de lesión en el SNC. Tras cada brote la recuperación completa es más compleja lo que provoca que la discapacidad aumente al aumentar el número de brotes.

En la revisión de los fenotipos de EM de Lublin (Lublin et al., 2014) se denomina actividad de la enfermedad a la presencia de brotes y/o actividad inflamatoria en RM. Un brote se define como una alteración neurológica compatible con EM que dura más de 24h en ausencia de fiebre o infección (Polman et al., 2011). Los síntomas de un brote son variados y pueden ser desde alteraciones de la visión, debilidad muscular y alteraciones de la marcha entre otros. Los brotes suelen desarrollarse de forma subaguda entre 2-4 semanas y normalmente se resuelven completamente en 6-8 semanas con ayuda de corticoides o de manera espontánea (Ömerhoca, Akkaş, & İçen, 2018). Es necesario, como mínimo, la presencia de un brote para poder realizar un diagnóstico de EM (**tabla 1**).

En los pacientes con la forma RR existen brotes que provocan discapacidad y otros que no. Probablemente queda un daño histológico que inicialmente es compensado total o parcialmente por la plasticidad neuronal y la redundancia biológica. Además, un porcentaje no despreciable (alrededor del 50%) de los pacientes con formas RR se

convierten a formas de EM secundariamente progresivas tras 15-25 años de evolución (Friese et al., 2014; Lublin & Reingold, 1996b; Lublin et al., 2014).

La discapacidad que sufren los pacientes con EM puede medirse con diferentes escalas. La que se utiliza más comúnmente es la escala ampliada del estado de discapacidad (EDSS) (Kurtzke, 1983). Esta escala va de 0 a 10 donde 0 es ausencia de discapacidad y 10 la muerte por EM (van Munster & Uitdehaag, 2017) (**figura 3**).

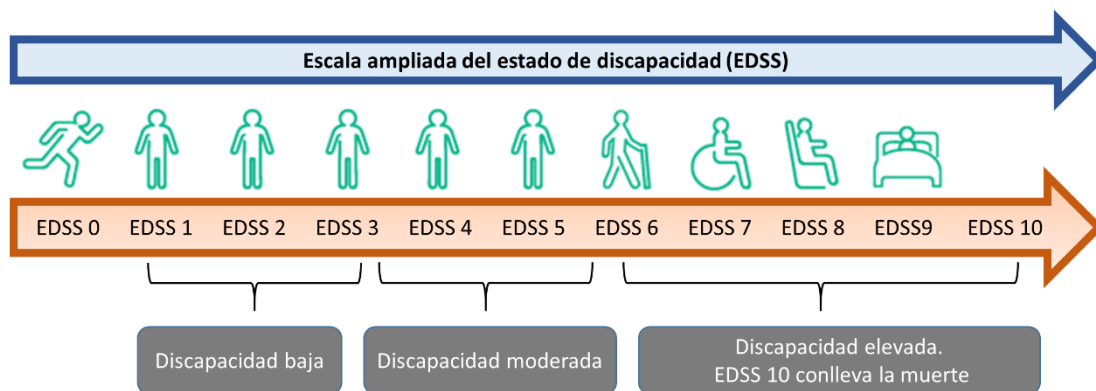


Figura 3. Escala expandida del estado de discapacidad. La puntuación del EDSS es la más utilizada para medir la discapacidad de los pacientes con EM. La puntuación 0 equivale a un examen neurológico normal mientras que la puntuación de 10 sería la muerte.

1.5. Fisiopatología de la enfermedad

La principal característica de la EM son las lesiones en el SNC (placas). Estas placas o lesiones son producidas por la inflamación y desmielinización focal (Reich et al., 2018) proceso que tiene lugar desde las primeras etapas de la enfermedad (McFarland & Martin, 2007).

La inflamación/desmielinización uni o multifocal se manifiesta clínicamente como un brote que remite como consecuencia de los procesos de reparación (Patergnani et al., 2017b). Conforme la enfermedad avanza, la remielinización va disminuyendo hasta ser casi nula (Cotsapas, Mitrovic, & Hafler, 2018; Lassmann, 2011). El fallo de estos procesos junto con la presencia de nuevos eventos de desmielinización se refleja en un aumento de la discapacidad del paciente (Cicarelli et al., 2014; Villoslada et al., 2017). Los mecanismos por los cuales se produce la desmielinización en las lesiones agudas y en las fases crónicas es diferente, tal y como se muestra en la **figura 4**.

Un paso muy importante en la fisiopatología de la enfermedad es la disrupción de la barrera hematoencefálica (BHE) que permite la entrada de linfocitos (sistema inmune (SI)) en el parénquima del SNC y que ocurre desde el inicio de la enfermedad como ha podido demostrarse en el modelo animal de EM, el modelo en ratón de encefalitis autoinmune experimental (EAE) (Maggi et al., 2014).

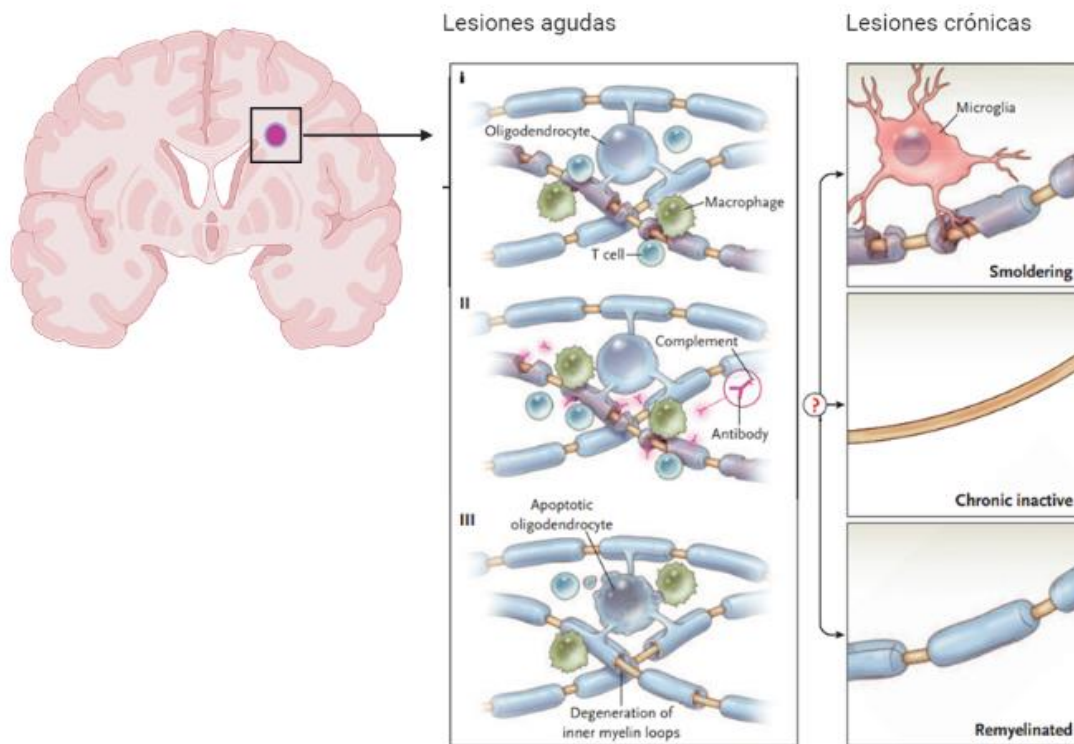


Figura 4. Lesiones en la sustancia blanca en el SNC. En las lesiones agudas la destrucción de mielina puede darse de tres maneras diferentes como se muestra en la parte central de la figura. En el primero, los macrófagos y las células T serían responsables de la destrucción mientras que en el segundo estarían implicados también los anticuerpos. Estos dos patrones son los más comunes en las lesiones pero también hay un tercer patrón en el que la destrucción viene dada por la muerte de los oligodendrocitos. En las lesiones crónicas, como se muestra en la parte de la derecha de la figura, la destrucción de la mielina se produce debido a la microglía. Adaptada de Reich et al., 2018.

1.5.1 Implicación del sistema inmune

El SI cuenta con numerosos actores cuya función principal es la de reaccionar contra antígenos externos para protegernos de diversas enfermedades. La inmunidad se divide en inmunidad innata y adaptativa y en el caso de la EM es la segunda la que juega un rol esencial.

La EM se considera una enfermedad autoinmune iniciada por los linfocitos T (LT) (Selmi, Mix, & Zettl, 2012). Inicialmente se consideraba a los LT como máximos responsables de la autoinmunidad en la enfermedad, paradigma que cambió hace unos años con la aparición de los anticuerpos (Ac) humanizados anti CD20 como Ocrelizumab y Rituximab que son altamente efectivos en la enfermedad y que tienen como diana terapéutica las células B (Juanatey, Blanco-Garcia, & Tellez, 2018; Serafini et al., 2004; Wekerle, 2017). En la **figura 5** se propone un modelo del inicio de la enfermedad en la periferia con la alteración del SI y la posterior migración al SNC, donde se desarrollan las lesiones (Dendrou, Fugger, & Friese, 2015).

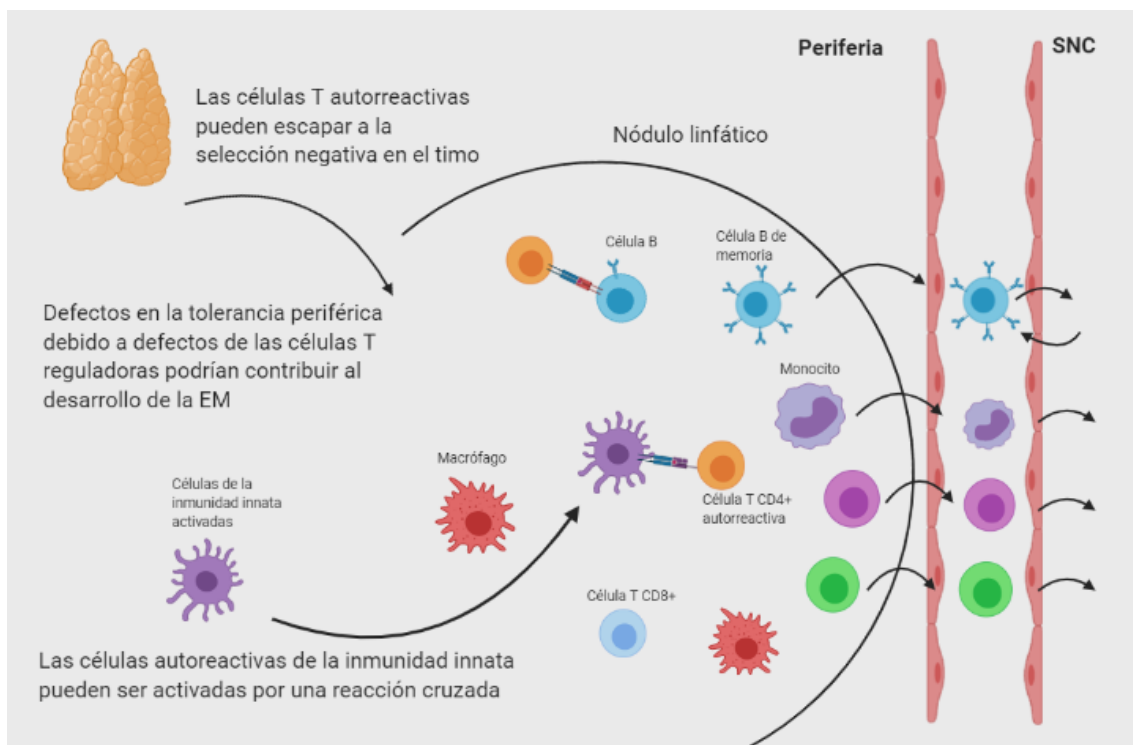


Figura 5. Alteraciones del SI en la periferia. Durante el establecimiento de la tolerancia central en el timo, se producen errores. Además, los LT autorreactivos son activados en la periferia y se convierten en células efectoras que actúan dentro del SNC. Adaptada de: Dendrou et al., 2015.

Es conocido que la patogenia de la EM comprende diferentes aspectos en los que el SI no funciona correctamente. Una de las teorías que explican el desarrollo de la enfermedad sostiene que es debido a una reacción cruzada entre los epítomos del EBV y epítomos presentes en la mielina de las neuronas (Ascherio & Munger, 2010). Esta reacción activa los linfocitos en la periferia que, al atravesar la BHE, reaccionan contra

la mielina originando las lesiones típicas de la enfermedad (Hemmer, Kerschensteiner, & Korn, 2015).

Durante el curso de la enfermedad, existe una producción de citoquinas desmesurada, un desequilibrio de la población de células T, presencia anormal de linfocitos B (LB) e inmunoglobulinas (Ig) en el SNC, activación inapropiada de células natural killer, células dendríticas y macrófagos así como una expresión patológica de moléculas de adhesión y metaloproteasas de matriz (Stadelmann, 2011). Estas características facilitan la disfuncionalidad del SI y el reconocimiento de epítomos propios (autoantígenos) del SNC, concretamente de las vainas de mielina de las neuronas (Glass, et al., 2010).

Años atrás se creía que los linfocitos eran los responsables, en las primeras fases de la enfermedad, de la respuesta inflamatoria que provocaba la desmielinización y que tenía como consecuencia la neurodegeneración futura pero, cada vez son más los autores que postulan que la inflamación y neurodegeneración podrían ser mecanismos independientes (Sospedra & Martin, 2005, 2016).

En el SNC se establece una cascada de inflamación, inicialmente, donde están implicados los LT, los LB, las células natural killer, macrófagos y microglía y que provoca la destrucción de la mielina de los axones y en consecuencia las lesiones típicas de la enfermedad. En la **figura 6** se muestran todos los actores de la enfermedad al inicio de la misma. Conforme avanza la enfermedad, los actores son los mismos aunque se cree que la inflamación deja paso a la neurodegeneración sin necesidad de la formación de nuevas lesiones.

Una de las pruebas utilizadas para el diagnóstico, como se ha explicado anteriormente, es la determinación de BOC de síntesis intratecal. Aproximadamente el 90% de los pacientes presentan síntesis intratecal de BOC IgG (Delmotte & Gonsette, 1977; Gil-Perotin et al., 2019; Schwenkenbecher et al., 2018). Además, la síntesis intratecal de BOC IgM lipidoespecíficas se ha asociado con un peor pronóstico de la enfermedad, probablemente porque son indicadores de una mayor actividad inflamatoria desde el comienzo de la enfermedad (Villar et al., 2015, 2003, 2005).

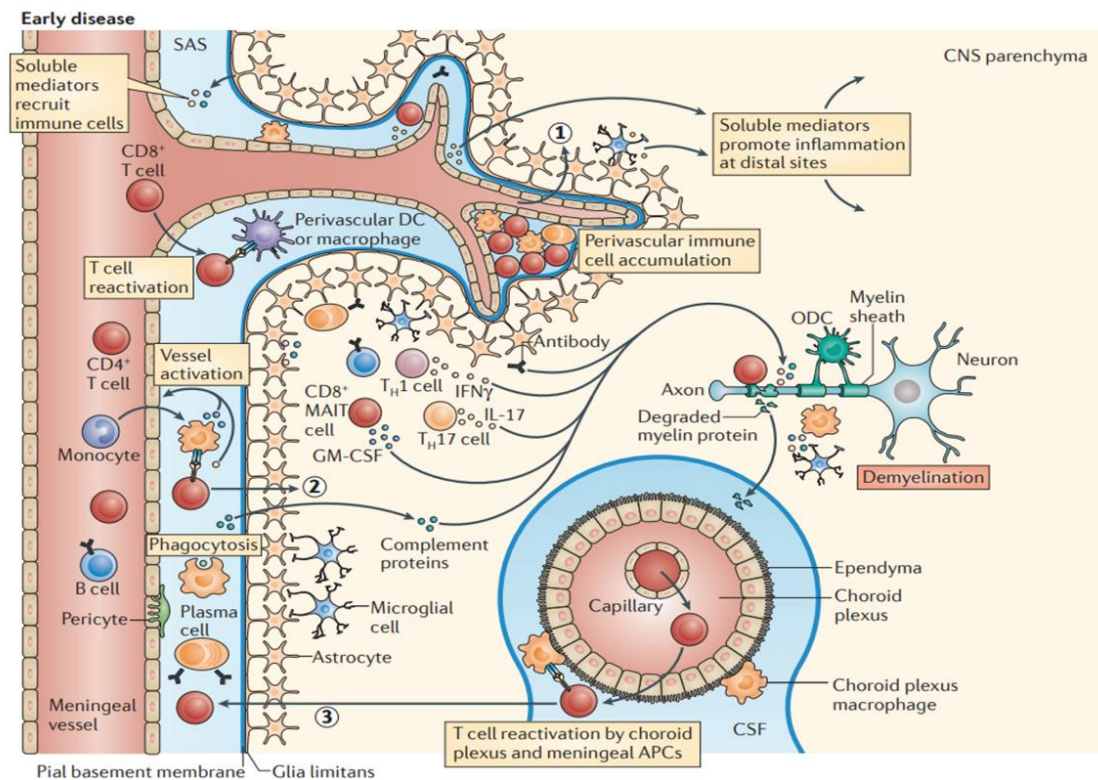


Figura 6. Actores responsables de la inflamación en los primeros estadios de la enfermedad. En las primeras etapas de la enfermedad están implicados los LT, LB, las células natural killer, macrófagos y microglía. Adaptada de Dendro, C.A. (Dendrou, Fugger, & Friese, 2015).

1.6. Estrés oxidativo y esclerosis múltiple

1.6.1 Estrés oxidativo en los sistemas biológicos

El estrés oxidativo (EO) es un proceso deletéreo que puede tener lugar en todos los tipos celulares del organismo y que puede ser debido a un incremento de la producción de radicales libres (RL) o a una disminución de defensas antioxidantes (Karg et al., 1999; Lushchak, 2014). Cuando se pierde el balance entre capacidad antioxidante y producción de RL, estos últimos tienen capacidad de oxidar todas las macromoléculas existentes en nuestro organismo ya sean proteínas, glúcidos, lípidos e incluso ácidos nucleicos.

1.6.1.1 Radicales libres

Los RL son moléculas inestables ya que poseen uno o más electrones desapareados, que aparecen como intermediarios de otras reacciones (Commoner, Townsend, & Pake, 1954). Como consecuencia del metabolismo natural de las células se producen

RL, que pueden ser especies reactivas de oxígeno (ROS) y/o especies reactivas de nitrógeno (RNS).

Los RL son moléculas pequeñas, su vida media es corta y son altamente reactivas, por lo que pueden modificar otras moléculas de las células. Las ROS son producidas a nivel de la cadena de transporte electrónico (CTE) y en particular en los complejos mitocondriales I y III. Un exceso de producción de RL puede producir un desequilibrio en el denominado equilibrio redox que genera, el denominado EO (Turrens, 2003).

1.6.1.2 Defensas antioxidantes

El oxígeno es esencial para la vida, pero es también una de las moléculas potencialmente más dañinas que tenemos en nuestro organismo y es por este motivo, que los organismos aeróbicos han desarrollado las defensas antioxidantes (Ohl, Tenbrock, & Kipp, 2016; Storey, 1996). Como defensas antioxidantes encontramos de dos tipos i) los sistemas enzimáticos como la glutatión peroxidasa, la superóxido dismutasa (SOD) y la catalasa, entre otras; y ii) los sistemas no enzimáticos como el ácido úrico (AU), α -tocoferol, ascorbato carotenoides y glutatión (Halliwell, 1992; Lutskii & Esaulenko, 2007). Los sistemas enzimáticos se encargan de transformar un radical libre en otra molécula disminuyendo así su toxicidad mientras que los sistemas no enzimáticos tienen capacidad antioxidante debido a su estructura molecular como es el caso del AU. Este es un producto del catabolismo de las bases púricas que por su estructura puede comportarse como antioxidante. La función de los antioxidantes es: i) preventiva, neutralizan los RL, impidiendo así su efecto oxidante y ii) curativa, reparan las biomoléculas modificadas por los RL.

Una de las principales vías de respuesta al EO es la vía del factor de transcripción nuclear 2 (Nrf2) (Gan & Johnson, 2013; Ladd et al., 2014). Este factor regula la expresión de enzimas antioxidantes necesarias para mantener la homeostasis celular como la SOD y la catalasa.

1.6.2 *Estrés oxidativo y la fisiopatología de la esclerosis múltiple*

Cuando se produce un desequilibrio en el denominado equilibrio redox, se genera un ambiente oxidativo, provocando el denominado EO (Turrens, 2003). Se ha demostrado

tanto por métodos enzimáticos como no enzimáticos una disminución de las defensas antioxidantes, en los pacientes con EM (Fabbrini et al., 2014; Tasset et al., 2012) lo que puede contribuir a la pérdida del equilibrio redox en los pacientes enfermos de EM.

1.6.2.1 Estrés oxidativo e inflamación

El EO y la inflamación tienen una estrecha relación en la fisiopatología de la EM. En primer lugar, la activación de los linfocitos conlleva un aumento del EO desde las fases más tempranas de la enfermedad (Mao & Reddy, 2010), hecho que es muy relevante en la patogenia de la enfermedad, ya que la inflamación es la característica más estrechamente relacionada con el daño axonal en todas las fases (G. R. Campbell, Worrall, & Mahad, 2014). En segundo lugar, las ROS y RNS producidas por macrófagos y microglía son los iniciadores del daño axonal (Friese et al., 2014; Nikić et al., 2011). La pérdida de mielina tiene numerosas consecuencias para el axón, los axones de las neuronas terminan por dañarse debido a la destrucción de la mielina. Además, se alteran también las células productoras de mielina (los oligodendrocitos), que sufren un cambio metabólico y transfieren lactato a los axones como sustrato metabólico por medio de transportadores específicos (Fünfschilling et al., 2012; Hertz, Gibbs, & Diemel, 2014; Y. Lee et al., 2012). Es decir, la destrucción de mielina, altera los oligodendrocitos que sufren un cambio metabólico con tal de proporcionar una fuente de energía diferente a los axones que están siendo dañados (Fünfschilling et al., 2012; Hertz et al., 2014; Y. Lee et al., 2012).

Los cambios metabólicos y la plasticidad de los oligodendrocitos intentan promover la supervivencia de axones y neuronas. Además, se ha demostrado que el SI es uno de los sistemas que más necesita adaptarse a los cambios, sobre todo en enfermedades autoinmunes con un largo tiempo de evolución. En concreto, se ha descrito que los linfocitos activados tienen una mayor producción de lactato (Yang et al., 2015). Estos linfocitos modifican su metabolismo en función de si están activos, son de memoria o se encuentran inactivos. Los principales cambios se representan en la **figura 7**. Estos cambios son una adaptación de la representación de Yang y colaboradores (Yang et al., 2015).

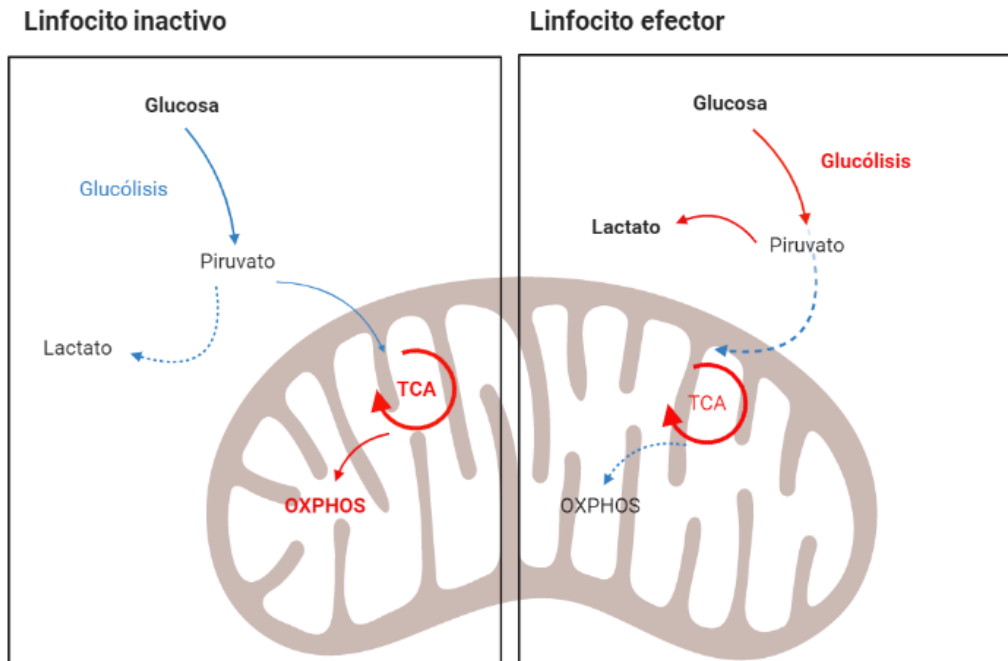


Figura 7. Representación simplificada de las vías energéticas que se activan en función del estado de los LT. En rojo se muestran las vías que se encuentran incrementadas en función del estadio del linfocito. Los linfocitos efectores tienen una mayor producción de lactato mientras que los inactivos utilizan el ciclo de los ácidos tricarboxílicos para conseguir energía y los linfocitos de memoria utilizan esta vía y la beta-oxidación para conseguir energía. Adaptada de Yang et al., 2015.

1.6.2.2 Estrés oxidativo y neurodegeneración

El EO es un proceso deletéreo que puede ocurrir en todas las células del organismo, pero en concreto, el cerebro es el órgano más susceptible al mismo debido a que presenta unas características particulares (Cobley, Fiorello, & Bailey, 2018): i) Elevado consumo de oxígeno: a pesar de que el cerebro solo representa un 2% de la masa del cuerpo las células altamente diferenciadas que lo componen utilizan un 20% de la glucosa y del oxígeno que llega al organismo (Torre, 2004), ii) Impermeabilidad de la BHE a las defensas antioxidantes: algunas de las defensas antioxidantes de nuestro organismo no son sintetizadas en el mismo sino que proceden de alimentos, estas defensas tan apenas pueden llegar al interior del SNC debido a la BHE, iii) Las células postmitóticas, como las neuronas, acumulan daño oxidativo durante toda la vida debido a la baja regeneración celular que presentan, iv) El cerebro tiene una mayor presencia de ácidos grasos altamente susceptibles a la oxidación (ácidos grasos poliinsaturados (AGPI)) en comparación con otros órganos (Cadet, 1988; Pamplona, 2008).

Es por las razones mencionadas que el EO es especialmente relevante en enfermedades neurodegenerativas como el Parkinson, el Alzheimer o la esclerosis lateral amiotrófica (Uttara et al., 2009), donde juega un rol central. En la EM es conocido que una inapropiada activación de macrófagos y microglia generan grandes cantidades de RL lo que teniendo en cuenta las características del cerebro puede tener consecuencias fatales (Colton & Gilbert, 1987; van der Goes et al., 1998). En primer lugar existe un incremento del consumo de oxígeno, que ocurre paralelamente a la activación de la NADPH oxidasa, se incrementa la producción de superóxido, la xantina oxidasa lo convierte en peróxido de hidrógeno y por último la mieloperoxidasa que terminan produciendo ácido hipocloroso que se relaciona con la muerte celular (Lefkowitz & Lefkowitz, 2008). A nivel de oligodendrocitos, el EO inhibe tanto la diferenciación de este tipo celular (G. R. Campbell et al., 2011) como estimula su apoptosis (Jana & Pahan, 2007), fenómenos que repercuten directamente en una inhibición del proceso de remielinización y por tanto, se relacionan directamente con la neurodegeneración.

1.7. La mitocondria en la esclerosis múltiple

1.7.1 La mitocondria en las células eucariotas

Las mitocondrias son orgánulos de doble membrana presentes en las células eucariotas. Son responsables de numerosos procesos celulares como la homeostasis de calcio, la biogénesis de los centros hierro azufre y la apoptosis (Friedman & Nunnari, 2014). Su principal función es la producción de adenosina trifosfato (ATP) a través de la respiración mitocondrial.

1.7.2 Cadena de transporte electrónico

La fosforilación oxidativa mitocondrial es la encargada de sostener la función celular y juega un papel muy importante en el metabolismo energético de la célula. La cadena de transporte electrónico está formada por los complejos I-IV, situados en la membrana mitocondrial interna, que tienen como función crear el gradiente electroquímico que servirá al complejo V para la formación de ATP (Friedman &

Nunnari, 2014). Estos dos procesos forman parte del sistema de fosforilación oxidativa (OXPHOS) (Cogliati, et al., 2018).

Conjuntamente, las enzimas de la CTE convierten la energía de oxidación procedente del dinucleótido de nicotinamida y adenina y del flavín adenín dinucleótido en un gradiente electroquímico de protones a través de la membrana mitocondrial interna que es utilizado por el complejo V o ATPasa para producir ATP como se muestra en la **figura 8**.

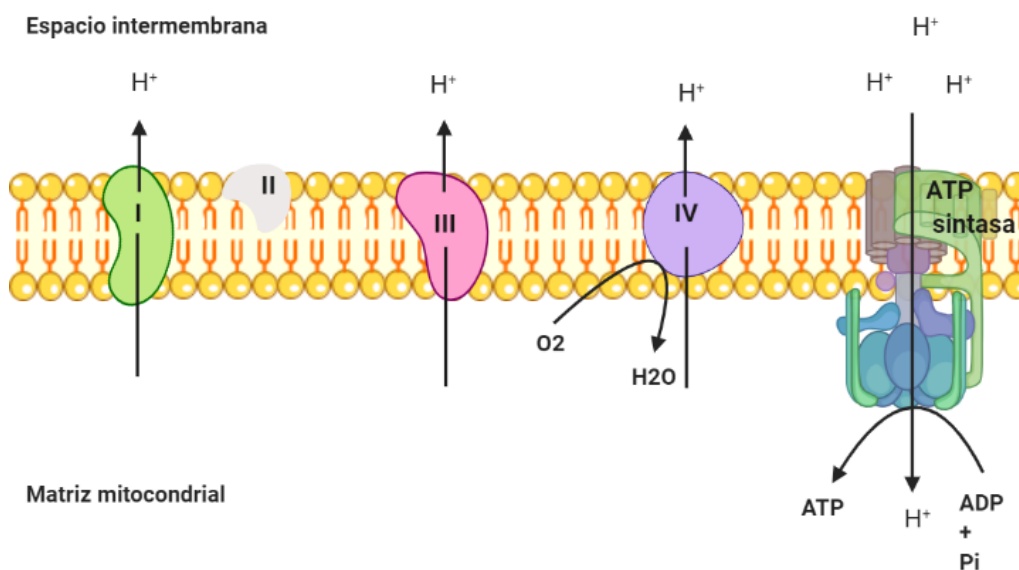


Figura 8. Representación de la CTE. Complejos mitocondriales: CI: NADH deshidrogenasa; CII: succinato deshidrogenasa, CIII: Ubiquinol, Citocromo C oxidoreductasa; CIV: Citocromo C oxidasa, CV: ATP sintasa. Adaptada de Jackson, et al., 2018.

1.7.3 Estrés oxidativo y mitocondria

En el proceso de respiración mitocondrial se producen ROS. El superóxido es la primera ROS que se produce a nivel mitocondrial, tiene una vida media muy corta y es altamente reactiva. Como se muestra en la **figura 9**, el superóxido es producido principalmente por los complejos I y III (Larosa & Remacle, 2018). Esta producción muestra una dependencia importante del gradiente electroquímico de protones y se estima que supone entre el 0.1-2% del oxígeno que se consume (St-Pierre, et al., 2002).

A pesar de que las ROS tienen funciones muy importantes cuando se producen a niveles fisiológicos, un exceso de las mismas tiene consecuencias deletéreas para las células (Turrens, 2003). Por este motivo existen procesos que regulan la producción de superóxido, por ejemplo, los agentes desacoplantes y el ADP estimulan la síntesis de ATP lo que provoca un incremento del ratio de la respiración y una disminución del gradiente de protones. Este proceso tiene como consecuencia final la disminución de la producción de ROS (Cadenas, 2018). Este proceso de regulación de la producción de ROS utiliza mecanismos que implican cambios del estado redox de la coenzima Q. Cuando hay un gradiente electroquímico de protones elevado la respiración se ralentiza lo que aumenta la concentración del radical ubisemiquinona y a su vez favorece la formación de superóxido. Esto demuestra la importancia de la conducción de protones en la producción de EO y se ha hipotetizado que un desacoplamiento moderado atenúa la producción de ROS (Cadenas, 2018).

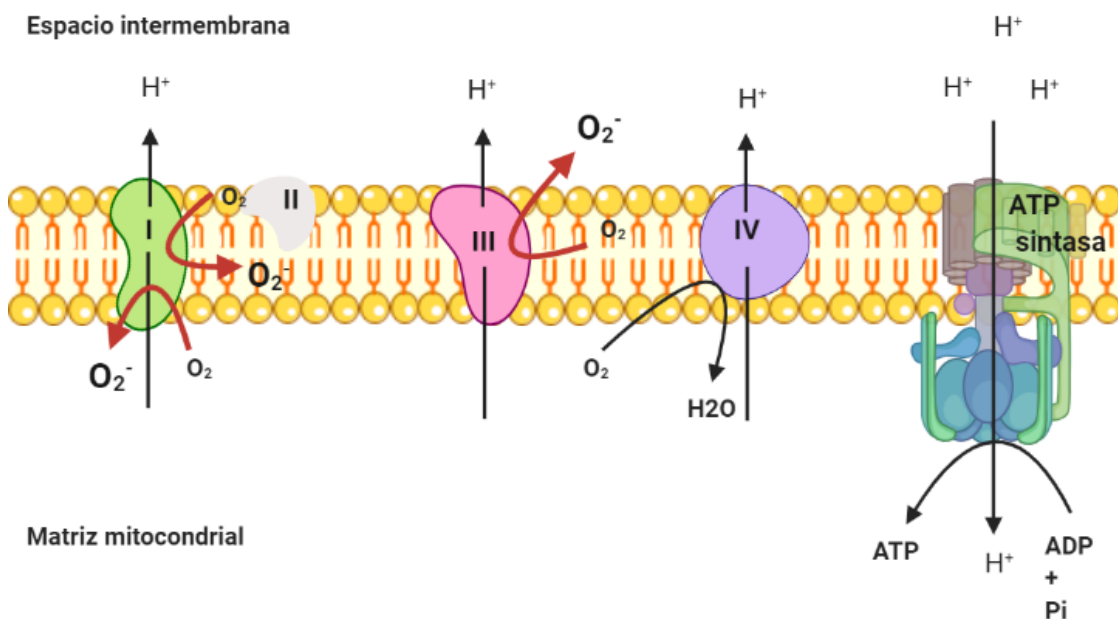


Figura 9. Lugares de producción de ROS en la CTE. El superóxido que se produce en la mitocondria se hace principalmente en los complejos I y III. Adaptada de Larosa & Remacle, 2018.

1.7.4 Alteraciones mitocondriales en la esclerosis múltiple

Una de las hipótesis que tratan de explicar el daño cerebral que sucede en la enfermedad sostiene que el daño mitocondrial es el principal responsable (Trapp & Stys, 2009). El hecho de que el ADN mitocondrial se encuentre desprovisto de histonas

lo hace más susceptible a padecer mutaciones cuando los niveles de ROS son altos, lo que podría comprometer la eficiencia de la fosforilación oxidativa (Wallace, Fan, & Procaccio, 2010). Este hecho podría ser de gran relevancia en la fisiopatología de la EM. En los últimos años se han propuesto diversos modelos de neurodegeneración en la EM y en todos ellos la implicación de la mitocondria es un factor clave. En la **figura 10** podemos ver un ejemplo de los modelos mencionados.

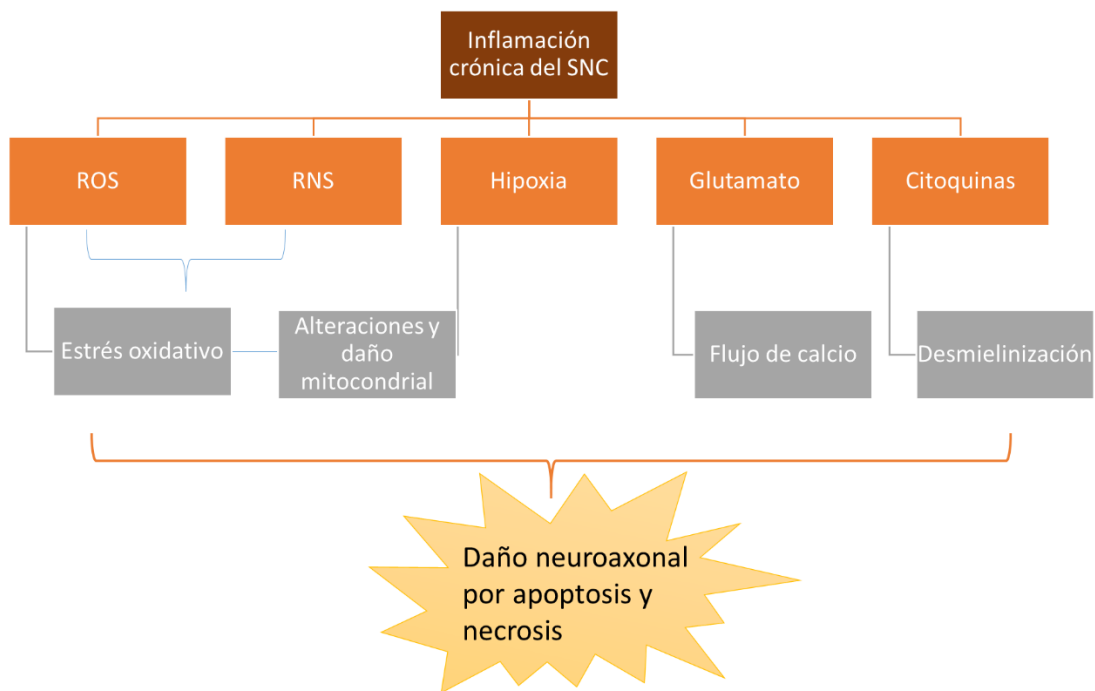


Figura 10. Mecanismo de daño neuroaxonal e implicación mitocondrial. En el modelo propuesto la inflamación crónica es responsable de diversos eventos como una producción excesiva de ROS y RNS. Estas especies causan EO y dañan a la mitocondria. ambos procesos se retroalimentan entre sí y termina por aparecer una deficiencia energética en los axones de las neuronas lo que tiene como consecuencia final el daño neuroaxonal que se acompaña de apoptosis y necrosis en estas células (Frieze et al., 2014).

La inflamación crónica que sucede en la enfermedad, incrementa los niveles de ROS y RNS lo que pone en riesgo la integridad de la mitocondria. En los pacientes con EM se han observado alteraciones en las mitocondrias de las neuronas como cambios en la expresión de genes o deleciones del ADN (Kozin, Kulakova, & Favorova, 2018). Concretamente en estos pacientes, se ha demostrado una reducción del ADN que codifica para las proteínas I y III de la CTE en la corteza motora del cerebro y una reducción de la actividad de estos complejos (Dutta et al., 2006). Además, se han observado alteraciones en el complejo IV en el que se ha visto un incremento en

ciertas regiones del SNC y una disminución en otras (Friese et al., 2014). En estas zonas también se ha reportado una disminución de la producción de ATP que se estima que es consecuencia de las alteraciones mencionadas. Todos estos cambios son críticos a nivel del SNC debido a la cantidad de energía que consume el cerebro que supone, como se ha mencionado en el apartado 1.6.2.2, un 20% de la energía total del organismo (Kozin, Kulakova, & Favorova, 2018). Bajo una situación de disfunción mitocondrial el número de mitocondrias se ve reducido ya que estas aumentan su complejidad en un intento de compensar este déficit energético que se produce (G. R. Campbell et al., 2014) y a esto se le suma la gran cantidad de ROS que se producen en el contexto de la neuroinflamación, proceso que daña todavía más las mitocondrias (Kozin et al., 2018).

Dada la importancia de la mitocondria en los procesos implicados en la enfermedad y las evidencias que existen de las alteraciones en la misma, Mao P and Reddy H se preguntaron, incluso, si la EM es una enfermedad mitocondrial (Mao & Reddy, 2010). Aunque se ha descrito alguna alteración de las mitocondrias del SI de los pacientes con EM (La Rocca et al., 2017) un mayor número de estudios son necesarios para saber si las alteraciones mitocondriales descritas a nivel del SNC también se están produciendo a nivel periférico, es decir, fuera del SNC, y si tienen una implicación en la fisiopatología de la enfermedad (Ohl et al., 2016).

1.7.4.1 Lactato

El lactato es una molécula energética que utiliza nuestro organismo cuando hay alteraciones mitocondriales, cuando el oxígeno es insuficiente o cuando se necesita mayor cantidad de energía que la que aporta el ATP (Pucino, Bombardieri, Pitzalis, & Mauro, 2017).

En el caso de la EM se ha demostrado que los oligodendrocitos transfieren lactato a las neuronas como sustrato metabólico. Además, este metabolito es un marcador de fallo mitocondrial ya que se ha observado que, cuando la CTE no funciona adecuadamente, estos oligodendrocitos producen un exceso de lactato para paliar el fallo energético (G. R. Campbell et al., 2014; Fünfschilling et al., 2012).

En 2014, el lactato en suero se propuso como un potencial biomarcador para la enfermedad (Amorini et al., 2014) pero un mayor número de estudios son necesarios para validarlo como tal. Por otro lado, en los pacientes con EM se ha observado un incremento de lactato a nivel del SNC (Albanese et al., 2016) y también a nivel periférico tanto en pacientes como en el modelo animal de la enfermedad (Ghareghani et al., 2016; Lazzarino et al., 2016).

1.7.4.2 Enzimas antioxidantes

La superóxido dismutasa de manganeso (MnSOD) es la principal enzima antioxidante de la matriz mitocondrial y su función es convertir el superóxido en peróxido de hidrógeno y así proteger a las mitocondrias de un posible daño mitocondrial (Larosa & Remacle, 2018). Por un lado, los ratones que carecen de esta enzima mueren antes de nacer. Por otro lado, se ha observado que el tratamiento con SOD/catalasa en ratones vivos alarga su vida y atenúa diferentes patologías asociadas al EO (Flynn & Melov, 2013).

En la EM se ha reportado un incremento de la MnSOD en el cerebro del modelo animal de la enfermedad, que podría actuar como respuesta al EO que se produce en el SNC en esta patología (Hira, Packialakshmi, & Zhou, 2019). Este incremento también se ha demostrado en suero y LCR de pacientes con la enfermedad (Adamczyk-Sowa et al., 2012).

La catalasa es la segunda enzima implicada en la detoxificación del superóxido y convierte el peróxido de hidrógeno formado por la MnSOD en agua y oxígeno. Un incremento de la actividad de esta enzima se ha observado en la sustancia gris del cerebro de pacientes con EM (Gray et al., 2014). A nivel periférico, diferentes estudios han analizado la actividad de esta enzima y han obtenido resultados dispares: un estudio demostró un incremento de la actividad de esta enzima en eritrocitos de pacientes con EM (Jensen & Clausen, 1984) mientras que otro estudio no encontró ninguna diferencia (Kopff, et al., 1993). Un estudio más reciente observó cambios en el plasma en pacientes con EMRR comparados con controles (Ibitoye et al., 2016; Ljubisavljevic, et al., 2013). Ambas proteínas activan su transcripción por el factor de transcripción Nrf2 que se activa como respuesta al EO.

1.8. Herramientas para establecer el pronóstico de la EM

La EM es una enfermedad crónica neurodegenerativa y desmielinizante del SNC de supuesta patogenia autoinmune. A pesar de los esfuerzos y las mejoras en las técnicas para el diagnóstico de la enfermedad, esta tarea todavía es complicada en algunos casos e impide un tratamiento temprano. Un claro ejemplo de estos esfuerzos es la actualización, la última del año 2017 (Thompson et al., 2018) de los criterios diagnósticos para la enfermedad como se ha detallado en el apartado 1.4.1. Por otro lado, los mecanismos implicados en la fisiopatología de la enfermedad evolucionan de manera muy heterogénea entre los pacientes lo que puede provocar que tanto el pronóstico como la respuesta a los tratamientos se produzca de manera diferente (P. Wang, et al., 2014). Además, el número de tratamientos disponibles para la enfermedad ha aumentado exponencialmente y por tanto la decisión terapéutica que permite elegir el tratamiento más adecuado para cada paciente se vuelve cada vez más compleja (apartado 1.1.1.1). Es por estos motivos que surge la necesidad de encontrar biomarcadores que puedan ayudar en el diagnóstico de la enfermedad así como biomarcadores útiles para establecer el pronóstico de un determinado paciente y que, en consecuencia, permitan a los neurólogos tomar las decisiones de manera más precoz y más fiable.

El LCR es el fluido del organismo que proporciona una mayor información de los procesos patológicos que ocurren en el SNC a pesar de que su obtención se realiza mediante la punción lumbar, que es una técnica invasiva y que por tanto, conlleva riesgos. Es por ello que en la actualidad la búsqueda de biomarcadores se centra en fluidos del organismo que sean más fácilmente accesibles como pueden ser el plasma o el suero (Comabella & Montalban, 2014; Oh et al., 2018). Los biomarcadores pues, se postulan como herramientas muy relevantes en la consecución de la medicina de precisión. La medicina de precisión implica tener las herramientas suficientes para poder realizar el diagnóstico más preciso de la manera más temprana y elegir el mejor tratamiento para cada paciente, es decir, el que vaya a ser más eficaz y tener una menor toxicidad (Bhargava & Calabresi, 2016). Los biomarcadores son esenciales en la búsqueda de la medicina de precisión hacia la que nos encaminamos hoy en día, sobre todo en enfermedades tan heterogéneas en su presentación clínica como puede ser la

EM. En este contexto, las aproximaciones ómicas son, hoy en día, una de las mejores herramientas para dicha búsqueda. Dentro de las mismas, destacaríamos, por su aplicabilidad a la enfermedad, la metabolómica y una rama de la misma, la lipidómica.

1.9. Metabolómica

Es una técnica que apareció a finales del siglo 20 y que integra la genética y el ambiente (Li et al., 2017). La metabolómica es una “ómica” que estudia un conjunto de metabolitos de pequeño tamaño (<1500 Da) en los organismos vivos (Wishart et al., 2008). El objetivo último de esta aproximación es el estudio de las moléculas de bajo peso molecular de un organismo (Schrimpe-Rutledge et al., 2016). Así pues, la metabolómica es el estudio del conjunto de metabolitos, donde un metabolito se define como una molécula pequeña que se transforma durante el metabolismo y que, en consecuencia, proporciona información sobre el estado celular (Patti, Yanes, & Siuzdak, 2012). Consecuentemente, el metaboloma se define como la colección de todos los metabolitos tanto endógenos como exógenos de una célula, tejido u organismo, que son resultado de la actividad enzimática y la exposición a los factores ambientales como puede ser la dieta. El metaboloma pues, es el resultado final del genoma más la interacción de los metabolitos entre sí y proporciona la visión más cercana al fenotipo como se muestra en la **figura 11** (Goodacre et al., 2004).

Por medio de la metabolómica se han descubierto alteraciones en vías de señalización que nos han situado más cerca del conocimiento y entendimiento de la fisiopatología de algunas enfermedades. A pesar de esto, todavía hay moléculas que no han sido identificadas por lo que no se pueden incluir en las bases de datos y en consecuencia la información que puede obtenerse en estos momentos todavía es incompleta.

El conocimiento del metaboloma humano ha ido evolucionando conforme la ciencia lo ha hecho. En 2018 se cuantificó (HMDB) que el número de metabolitos esperados y detectados que es de 25424 metabolitos en suero, 4225 en orina, 440 en LCR, 1234 en saliva, 90 en sudor y 1170 en heces (Wishart et al., 2018). Así pues, el número de metabolitos que se conocen y se han podido caracterizar, en suero, es muy superior al del resto de biofluidos que se han estudiado.

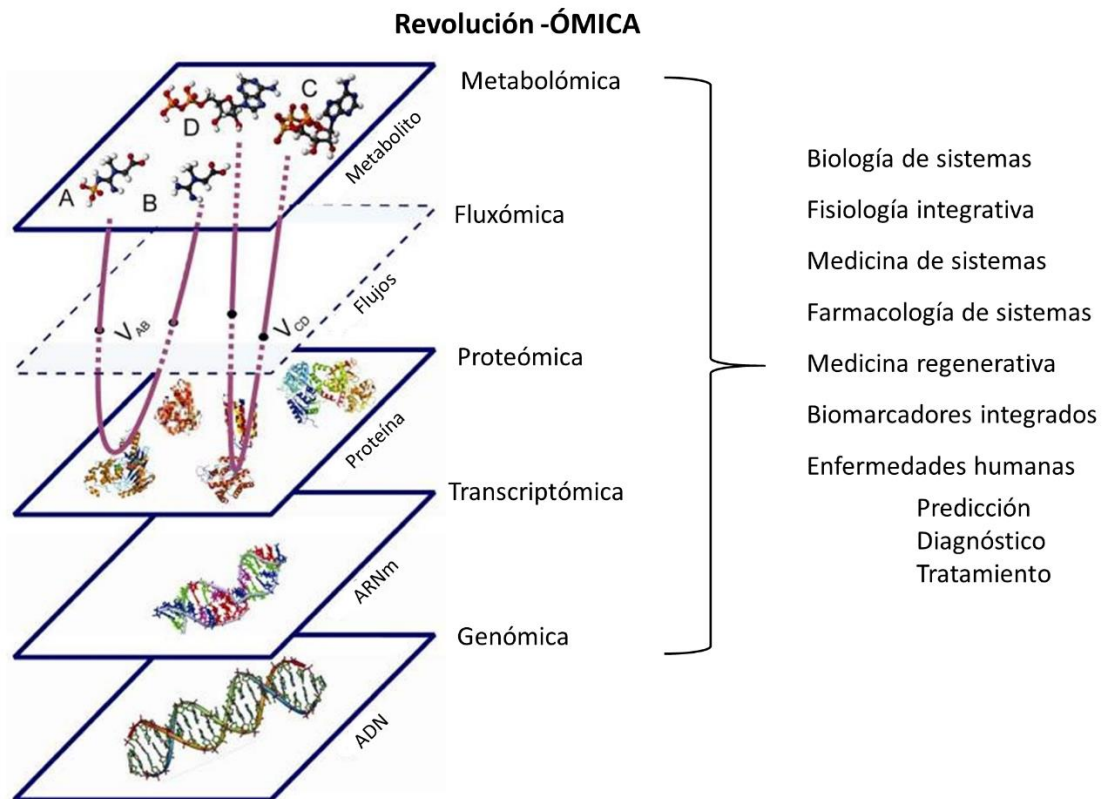


Figura 11. Representación de las técnicas “ómicas”. La información contenida en el genoma y que estudia la genómica pasa al transcriptoma (transcriptómica), y a continuación al proteoma (proteómica) para finalmente verse reflejada en el metaboloma que se estudia mediante la metabolómica. El metaboloma es la -ómica más cercana al fenotipo. Adaptada de Nemutlu et al., 2012.

Dentro del diseño experimental que puede realizarse para el estudio metabolómico se distinguen dos aproximaciones la metabolómica no dirigida y la metabolómica dirigida. La metabolómica dirigida consiste en analizar un conjunto de metabolitos determinados. Normalmente se utiliza para dar respuesta a una pregunta bioquímica o a una hipótesis previamente diseñada. Esta aproximación permite una cuantificación más precisa que la que permite la metabolómica no dirigida (Patti, Yanes, & Siuzdak, 2012). La aproximación no dirigida de la metabolómica permite analizar simultáneamente una gran cantidad de metabolitos sin tener una hipótesis pre-establecida sobre qué vías de señalización o qué metabolitos podrían estar alterados en una determinada patología. Esta aproximación resulta muy útil en la búsqueda de nuevos biomarcadores que puedan caracterizar un determinado estado fisiopatológico. Además es de gran valor para comparar diversas condiciones sin la necesidad de diseñar de manera tan exacta el estudio (Li et al., 2017).

Nuevamente se presenta como limitación el hecho de que un gran número de metabolitos no se encuentran identificados todavía pero las bases de datos cada vez cuentan con un mayor número de moléculas lo que permite la evolución de la técnica y la obtención de una imagen cada vez un poco más completa.

1.9.1 *Flujo de trabajo en la metabolómica no dirigida*

Dado que en esta tesis el diseño experimental escogido ha sido la metabolómica no dirigida nos centraremos en esta aproximación. Aunque muchas veces los experimentos que se realizan mediante la aproximación no dirigida generan nuevas hipótesis y no parten de ellas, el diseño del experimento es importante para obtener resultados lo más fiables posible.

Como se muestra en la **figura 12** en primer lugar se extraen los metabolitos de la muestra biológica en cuestión como se explicará a continuación en el apartado 3.2.7 de materiales y métodos. A continuación, se realizará la separación de los metabolitos y la identificación de los mismos en cuanto a masa y tiempo de retención.

Uno de los procesos más importantes en la metabolómica es el análisis de datos que se puede realizar con diferentes softwares como el XCMS, que es el más utilizado (Patti et al., 2012). La identificación de los metabolitos obtenidos se realiza a través de varias bases de datos disponibles online como Human Metabolome Database y METLIN (<http://www.hmdb.ca/> y <https://metlin.scripps.edu/>).

Tras la identificación de los metabolitos se realiza la comparación entre los grupos de estudio para lo cual pueden utilizarse métodos no supervisados o supervisados. Estos métodos ayudan a encontrar patrones en un conjunto de muestras. Uno de los métodos no supervisados más utilizados es el análisis de componentes principales (PCA) que puede representarse en 2D o 3D y donde se muestran las diferencias entre las muestras que el programa es capaz de identificar por sí mismo (Putri et al., 2013). Otro método multivariable que funciona de manera similar es la *clusterización* jerárquica y que representa cada molécula como un punto dentro de un espacio multidimensional. Las muestras que se asemejan más entre ellas mismas *clusterizan* juntas mientras que las que son más diferentes lo hacen a una mayor distancia. Además de los métodos no supervisados pueden utilizarse métodos supervisados

como puede ser el análisis discriminante de cuadrados mínimos parciales (PLS-DA) en el que el análisis se realiza teniendo en cuenta el grupo experimental al que pertenece cada muestra.

Es por las características mencionadas anteriormente que la metabolómica se ha convertido en una de las principales herramientas en la búsqueda de nuevos biomarcadores para diferentes patologías, sobre todo, para aquellas que tienen un mecanismo más complejo debido a la interacción de varios procesos como es el caso de la EM.

Metabolómica no dirigida

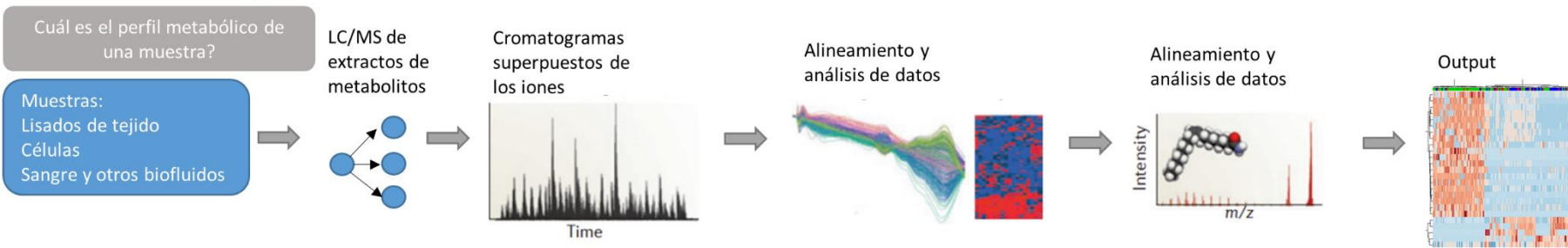


Figura 12. Flujo de trabajo para la realización de la aproximación no dirigida de la metabolómica. Los metabolitos se aíslan de los biofluidos que se utilizaran para el experimento y se analizan por cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas y a continuación se realiza el análisis de los datos mediante plataformas bioinformáticas como XCMS para obtener la primera posible identificación de los metabolitos detectados. Adaptada de Patti et al., 2012.

1.9.2 *Metabolómica en la esclerosis múltiple*

Estudios realizados en el modelo animal de la enfermedad reportaron cambios del metaboloma con el paso del tiempo y en consecuencia con la evolución de la enfermedad (Mangalam et al., 2013; Noga et al., 2012). En este estudio, los investigadores documentaron cambios en metabolitos relacionados con las vías de señalización de síntesis del óxido nítrico, alteraciones del metabolismo energético, de la síntesis de poliaminas y alteraciones en los niveles endógenos de antioxidantes. Otros estudios realizados en el modelo animal han descrito cambios en el metaboloma asociados a la progresión de la enfermedad, en esta ocasión, en el plasma de los ratones (G. Lee et al., 2019). Alteraciones en el metabolismo energético y en el de fosfolípidos en LCR de pacientes con EM también han sido descritos (Reinke et al., 2014). En estudios en plasma de pacientes con diferentes cursos de la enfermedad, el perfil metabolómico también ha mostrado diferencias (Villoslada et al., 2017).

A pesar de que se han realizado diversos estudios en esta materia, los resultados son poco consistentes debido a las diferentes características de los pacientes, las diferentes metodologías utilizadas y a que la mayoría de los resultados, hasta donde llega nuestro conocimiento, se han obtenido del modelo animal de la enfermedad. El LCR es el mejor biofluido para estudiar la enfermedad por la proximidad pero la obtención del mismo es un proceso invasivo. Es por este motivo que estudios en plasma o suero son de gran relevancia en patologías como la EM. Además con el objetivo de poder reconocer si el suero de un determinado paciente es representativo del LCR los estudios en paralelo cobran una gran relevancia.

1.10. Lipidómica

La lipidómica puede definirse como una rama de la metabolómica que se encarga del estudio de los lípidos. Así pues, es una disciplina científica que se encarga del estudio del lipidoma (Shevchenko & Simons, 2010; Yan et al., 2016). El lipidoma es el conjunto de lípidos y los lípidos se pueden definir de diferentes maneras dado el grado de variabilidad dentro de esta clase de moléculas. Una de las definiciones más aceptadas es que los lípidos son ácidos grasos y sus derivados, y sustancias relacionadas de forma biosintética o funcional con estas moléculas (Fahy et al., 2005).

1.10.1 Lípidos: funciones y clasificación

Un lípido es una molécula orgánica hidrófoba que cumple importantes funciones de reserva energética, estructural, hormona y transportadora. Dada la importancia de los lípidos en el funcionamiento celular normal, alteraciones de los mismos o de su metabolismo, están presentes en diversas patologías. Los lípidos tienen una gran diversidad estructural que viene determinada por factores como la longitud media de cadena de sus AG, modificaciones bioquímicas como oxidaciones, reducciones sustituciones, así como la adición de azúcares u otros grupos funcionales de diferente origen (Sud et al., 2007). En concreto en las células eucariotas, la longitud media de cadena se ha mantenido durante la evolución alrededor de los 18 átomos de carbono y la distribución entre ácidos grasos saturados (AGS) y ácidos grasos insaturados (AGI) sigue el ratio 40:60 respectivamente (Pamplona, 2008).

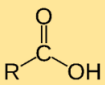
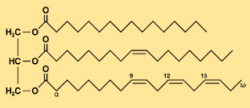
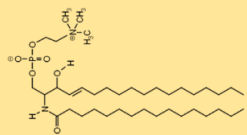
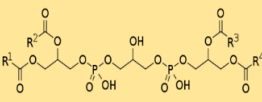
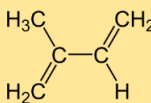
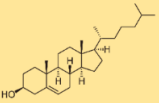
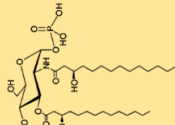
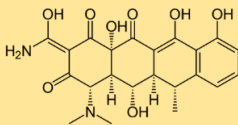
<p>Ácidos grasos</p>  <p>Ácidos grasos y conjugados Eicosanoides Alcoholes Ésteres</p>	<p>Glicerolípidos</p>  <p>Monoacilglicéridos Diacilglicéridos Triacilglicéridos</p>
<p>Esfingolípidos</p>  <p>Bases de esfingolípidos Cerámidas Fosfoesfingolípidos Glicosfingolípidos</p>	<p>Glicerofosfolípidos</p>  <p>Glicerofosfatos Glicerofosfolinas Glicerofosfoetanolaminas Glicerofosfogliceroles Cardiolipinas Glicerofosfoinositoles Glicerofosfoferinas</p>
<p>Lípidos de prenil</p>  <p>Isoprenoides Ubiquinonas Vitamina E Vitamina K Vitamina A</p>	<p>Lípidos de esteroil</p>  <p>Colesterol y derivados Fitoesteroles y derivados Estrógenos y derivados Esteroides y derivados Ácidos biliares y derivados Conjugados</p>
<p>Sacarolípidos</p>  <p>Lipopolisacárido Lípido A Lípido X</p>	<p>Poliquétidos</p>  <p>Esitromicinas Tetraciclinas Avermectinas Epotilonas antitumorales</p>

Figura 13. Representación de la estructura característica de las 8 categorías de lípidos. Adaptada de Stephenson, Hoeflerlin, & Chalfant, 2017.

De acuerdo con las características estructurales, los lípidos se han dividido en ocho categorías: ácidos grasos (AG), lípidos de esteroil (LE), lípidos de prenil (LP), glicerofosfolípidos (GF), esfingolípidos (EL), poliquétidos, sacarolípidos y glicerolípidos

(GL) siendo estos últimos de los que se ha podido identificar un mayor número de estructuras en la base de datos más importante de lípidos: LIPID MAPS Structure Database (LMSD, <http://www.lipidmaps.org>) (Fahy et al., 2009; Liebisch et al., 2013). En la **figura 13** se muestran las características estructurales de cada familia y las diferentes especies dentro de cada familia.

1.10.1.1 Lípidos de esteroil

Los esteroides (colesterol y derivados) son un gran grupo de sustancias tanto naturales como sintéticas que, como se muestra en la **figura 13**, tienen la característica de tener 4 anillos de carbono. Su transporte es el metabolismo de las lipoproteínas (Yan et al., 2016).

Esta categoría de lípidos representa los componentes principales de la mayoría de membranas de mamíferos, plantas y hongos y el colesterol es el miembro más abundante, de esta categoría, en mamíferos (Stephenson et al., 2017). El colesterol juega un papel muy importante en la fluidez de las membranas interactuando con los complejos lipídicos de las mismas (Vance & Vance, 1996).

1.10.1.2 Lípidos de prenil (LP)

Los LP se sintetizan a partir de 5 precursores de carbón, dimetilalil difosfatos y/o isopentenil difosfatos. Los LP forman una de las categorías menos estudiadas hasta el momento (Stephenson et al., 2017). Dentro de esta categoría encontramos los retinoides y la vitamina A, muy relevante para la visión, y otras vitaminas como la vitamina E (Yan et al., 2016).

Los lípidos pertenecientes a esta familia funcionan también como antioxidantes y además controlan expresión de genes a través de los retinoides (Noy, 2015). La deficiencia de algunas de estas vitaminas tiene graves consecuencias para la salud (Stephenson et al., 2017).

1.10.1.3 Glicerofosfolípidos (GF)

Los GF son las principales moléculas en las membranas celulares y pueden desarrollar sus funciones fisiológicas gracias a su estructura química y su diversidad. Además están

implicados en el metabolismo y la señalización celular (Yan et al., 2016). Los glicerofosfolípidos se dividen a su vez en 7 categorías que son: fosfatidiletanolamina, fosfatidilglicerol, fosfatidilcolina, ácido fosfatídico, fosfatidilserina, fosfatidilinositol y cardiolipina. En consecuencia, cuenta con una gran variabilidad estructural entre los lípidos que la forman lo que provoca que tenga numerosas propiedades físicas y químicas que tienen una gran influencia en las propiedades de las membranas dado que influyen en su permeabilidad, fluidez, curvatura, presencia de *lipid rafts* y regulación de interacciones lípido-proteína (Stephenson et al., 2017; Vance & Vance, 1996; Yan et al., 2016).

Las principales funciones que se les atribuyen a estos lípidos son i) componentes estructurales de la membranas ii) segundos mensajeros en procesos de señalización iii) precursores en la biosíntesis de otras especies lipídicas (Vance & Vance, 1996).

1.10.1.4 Glicerolípidos (GL)

Están formados por un glicerol que es generalmente esterificado con, de una a tres cadenas de AG. Cuando las cadenas de AG están situadas en las posiciones hidroxil del glicerol se obtienen los monoglicéridos (MG), diglicéridos (DG) y triglicéridos (TG).

La función principal de los GL es la de almacenar energía, específicamente, los MG son principalmente moléculas de señalización, DG son importantes en la formación de los GL y cumplen funciones en las membranas tanto en la curvatura de las mismas, como en la fusión, comunicación célula-célula y en el reclutamiento de proteínas (Almena & Mérida, 2011; Ueda et al., 2014). Los TG por su parte son los principales componentes de las grasas animales y su función principal en el metabolismo es ser una fuente de energía y la de transportar grasas (Yan et al., 2016).

1.10.1.5 Esfingolípidos (EL)

Son una categoría de lípidos compleja que comparten una base de esfingolípido (o base de larga cadena) compuesta por una parte hidrofóbica y un grupo hidrofílico (Gurr & James, 1980).

Esta familia también puede dividirse en 7 familias diferentes que son: ceramida, ceramida 1-fosfato, esfingomielina, hexoilceramida, gangliósido, sulfatida. La ceramida es la molécula central en la vía de síntesis de los esfingolípidos.

Algunos esfingolípidos como la ceramida-1 fosfato tienen un rol importante en la regulación del SI lo que puede ser de gran relevancia en enfermedades como la EM. De hecho uno de los fármacos que se utilizan para esta enfermedad es Fingolimod que es un modulador del receptor de esta molécula y que impide que las células de SI lleguen al SNC.

1.10.1.6 Ácidos grasos (AG)

Los AG se componen de largas cadenas de hidrocarburos cubiertas por grupos hidroxilo. Las diferencias dentro de esta familia lipídica vienen dadas por el número de insaturaciones (dobles enlaces) y la longitud de las cadenas (Pizarro et al., 2013).

Los AG son los principales componentes de los lípidos complejos, tienen importantes funciones biológicas y son fundamentales para entender la estructura y la función de los lípidos de los que forman parte. La cadena de hidrocarburo puede ser saturada, es decir sin dobles enlaces, o bien puede contener dobles enlaces y por tanto insaturaciones. La categoría de AG contiene también otros grupos como los alcoholes, aldehídos, hidrocarburos, aminas y ésteres (Patti et al., 2012; Yan et al., 2016).

1.10.2 *Perfil lipídico de ácidos grasos*

Es el estudio de un conjunto de AGI y AGS tanto esenciales como no esenciales que difiere del estudio de la lipidómica en la metodología y obtención de los datos. La aproximación utilizada para el estudio del perfil lipídico es dirigida.

Como componentes estructurales de las membranas y como fuente de energía, los AG son esenciales para la vida y, además, juegan un papel muy relevante en el mantenimiento de la función neurológica normal (Naudí et al., 2015). Características como la longitud de la cadena y el número de insaturaciones son esenciales para que los lípidos puedan cumplir sus funciones (Guillou et al., 2010).

En las células eucariotas, tanto los AG sintetizados en el citosol por la enzima ácido graso sintetasa, como los AG derivados de la dieta pueden sufrir desaturaciones y

elongaciones para dar lugar a AG de cadena larga (de 16 a 18 carbonos) y de cadena muy larga (más de 20 carbonos). Además, debido a la acción de enzimas específicas que se sitúan en el retículo endoplasmático también pueden sufrir diferentes insaturaciones.

Algunos de los AG presentes en nuestro organismo son esenciales como el ácido linolénico (18:3n-3) y el ácido linoleico (18:2n-6). Estos permiten la síntesis de los AGPI de cadena larga de las series n-6 y n-3. Los AGS de cadena larga y los ácidos grasos monoinsaturados (AGMI) de las series n-10, n-7 y n-9 pueden sintetizarse a partir de ácido palmítico (C16:0) (Naudí et al., 2011). En este proceso de síntesis las enzimas desaturasas insertan dobles enlaces en posiciones específicas de la cadena del AG y por otro lado las elongasas añaden átomos de carbono. Este proceso y las enzimas implicadas se encuentran representadas en la **figura 14**.

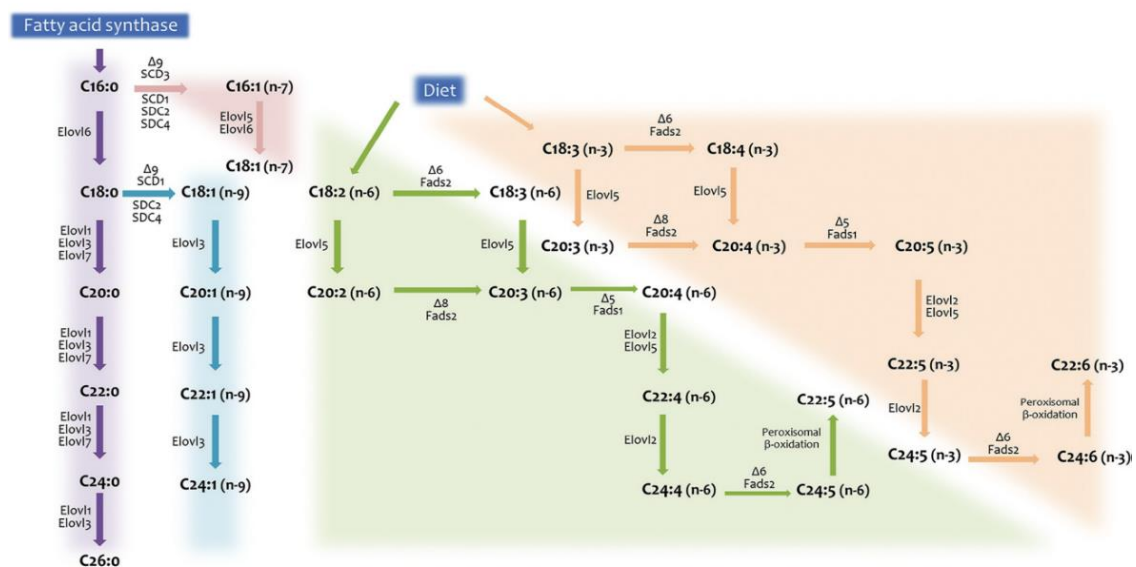


Figura 14. Proceso de formación de AG de cadena larga. Elov1: elongasa. FAD: desaturasa de ácidos grasos. Naudí et al., 2011.

Los ácidos grasos omega 3 y omega 6 que cumplen unas funciones importantes a nivel del SNC se distinguen por la localización del primer doble enlace desde el extremo metil de la cadena (Guillou et al., 2010). El cerebro es uno de los órganos que contienen una mayor cantidad de AG de cadena larga e insaturados, especialmente el ácido docosahexanoico (DHA) (Naudí et al., 2013). Se ha demostrado que los AG

insaturados, sobre todo los poliinsaturados, son más susceptibles a la oxidación por los RL (Arranz et al., 2013; Pamplona, 2008).

1.10.3 *Lipidómica y perfil lipídico en la esclerosis múltiple*

La EM es una enfermedad neurodegenerativa del SNC donde, debido a un ataque del SI, se destruye la mielina de los axones de las neuronas (Oh et al., 2018). La mielina está compuesta en un 80% por lípidos; contiene unas 700 especies lipídicas diferentes, específicamente esfingolípidos y glicerofosfolípidos (Cermenati et al., 2015; O'Brien & Sampson, 1965) cuyo rol en la enfermedad ya ha sido estudiado previamente (Schmitt, Castelvetri, & Simons, 2015). Esta composición de la mielina otorga al estudio de los lípidos una gran importancia en la patología.

Dentro de los tejidos celulares el cerebro es uno de los que mayor cantidad de lípidos presenta (Adibhatla & Hatcher, 2007; Naudí et al., 2015). Los lípidos participan en varias vías de señalización lo que les convierte en posibles dianas terapéuticas en enfermedades como la EM. De hecho, estudios recientes han sugerido que estas moléculas son de gran importancia en la autoinmunidad y se han descrito alteraciones en el metabolismo de los lípidos en pacientes con EM (Pieragostino et al., 2015; Wheeler et al., 2008).

La esfingosina es la molécula central de los esfingolípidos que son las moléculas más abundantes de la vaina de mielina. Además, el Fingolimod, que es un modulador del receptor de la esfingosina 1 fosfato, se utiliza como tratamiento modulador de la EM. También se ha demostrado que la carnitina, que está involucrada en el metabolismo de los AG y sus derivados, se encuentra en concentraciones diversas en los diferentes fluidos del organismo y tiene una implicación en enfermedades que se caracterizan por alteraciones de la respuesta inmune (Famularo et al., 2004; Lebrun et al., 2006).

Algunos estudios han descrito diferencias en el lipidoma de los pacientes con EM o del modelo animal de la enfermedad respecto a un grupo control (Del Boccio et al., 2011; G. Lee et al., 2019; Trépanier et al., 2018) pero los resultados han sido poco extrapolables debido a la utilización de tipos de muestras distintos y tamaños muestrales pequeños. Nuestro grupo de investigación, recientemente publicó un

estudio donde muestra que el perfil lipídico y la lipidómica podrían ser útiles para contribuir al diagnóstico de la enfermedad (Nogueras et al., 2019).

1.11. Daño oxidativo proteico

Un incremento de EO generalmente describe una condición en la que las defensas antioxidantes son insuficientes para inactivar completamente las ROS o RNS, bien sea por un exceso de producción de las mismas, por un déficit de defensas antioxidantes o por ambos motivos (Dalle-Donne et al., 2006). En un ambiente de EO, los RL pueden alterar cualquier tipo de macromolécula como los lípidos, proteínas y el ADN (Dalle-Donne et al., 2006).

Las ROS se producen principalmente dentro de las mitocondrias y modifican componentes de las membranas celulares. Cuando los componentes modificados son lípidos tiene lugar un proceso denominado peroxidación lipídica (Pamplona, 2008). La peroxidación lipídica genera hidroperóxidos y endoperóxidos que se fragmentan y dan lugar a la formación de las especies reactivas de carbonil entre las cuales se encuentran el 4-hydroxy-trans-2-nonenal (HNE) y el malondialdehído (MDA) (Aldini et al., 2007). Estos productos tienen una vida media más larga que las ROS y además son más estables lo que les permite llegar más lejos y modificar un mayor número de macromoléculas. Cuando tienen lugar estas modificaciones se forman los productos avanzados de lipoxidación (ALEs) (Pamplona, 2008). Dentro de estos productos ALEs se encuentran los compuestos mostrados en la **figura 15**.

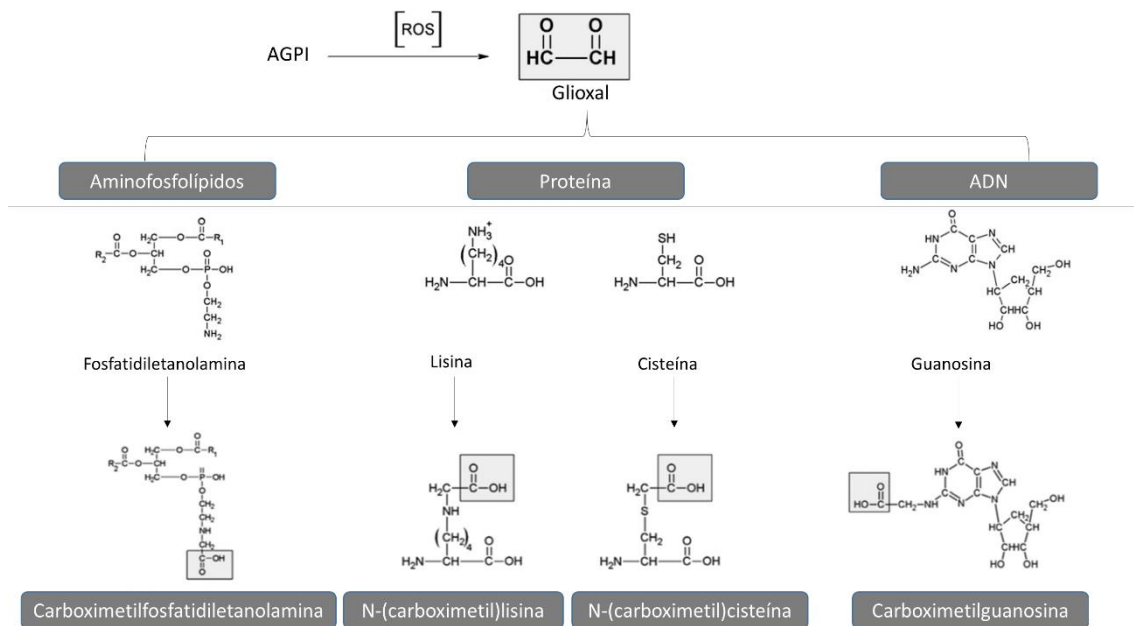


Figura 15. Daño oxidativo derivado de productos aldehídicos o peroxidación lipídica. En la figura se muestran ejemplos de ALEs formados por la acción de los compuestos carbonílicos. Adaptada de Pamplona, 2008.

En función del origen, estos productos se clasifican como derivados de la modificación de proteínas como el semialdehído glutámico (SAG) y el semialdehído amino-adipídico (SAAA), los que proceden de glicoxidación como el N-carboxietil-lisina (CEL), los que derivan de glico y lipoxidación como la S-carboximetil-cisteína (CMC) y la N-carboximetil-lisina (CML) y los que derivan directamente del estrés mitocondrial con la S-(2-succinil)-L-cisteína (2-SC).

1.11.1 Oxidación de partículas lipoproteicas: el caso de las lipoproteínas de baja densidad (LDL)

El EO es un proceso que ha sido directamente relacionado con la fisiopatología de la EM. Diversos estudios, con diferentes métodos utilizados para los análisis realizados, han demostrado un incremento del HNE (Gonzalo et al., 2012; Pennisi et al., 2011; Sadowska-Bartosz et al., 2014).

También se han descrito alteraciones en pacientes con un síndrome clínico aislado en plasma y LCR cuando se analizaron productos ALEs y contenido de tioles respecto a un grupo control (Ljubisavljevic, et al., 2013). Se han reportado además, diferencias en pacientes que se encuentran bajo diferentes tratamientos y si el análisis se hizo

cuando se encontraban en brote o no (Sadowska-Bartosz et al., 2014). Se han realizado también, análisis de estos productos de oxidación en la sustancia gris y blanca del cerebro, análisis que también ha demostrado alteraciones en los pacientes con EM (Bizzozero et al., 2005).

Estos resultados han sido obtenidos utilizando diversas metodologías y, en ocasiones, fueron resultados dispares por lo que un mayor número de análisis además de estudiar diferentes especies derivadas de la oxidación serían necesarios para establecer tanto la utilidad de estas moléculas como su valor como biomarcador pronóstico de la enfermedad (Ibitoye et al., 2016).

Las lipoproteínas de baja densidad (LDL) oxidadas consisten en lípidos, incluyendo colesterol y oxiesteroles, fosfolípidos, AG oxidados, aldehídos y peróxidos lipídicos (Esterbauer et al., 1987). Los oxiesteroles son derivados oxigenados del colesterol o sus precursores; además son buenos biomarcadores del EO y tienen funciones importantes en la regulación del SI (Björkhem, 2013). Los oxiesteroles están presentes en las lipoproteínas y en las membranas biológicas, a pesar de su poca abundancia tienen funciones importantes. Las LDL oxidadas tienen funciones citotóxicas y proinflamatorias (H. Li et al., 2016) y además el colesterol oxidado ha demostrado ser neurotóxico a nivel del SNC (Chang & Liu, 1998).

Un exceso de oxidación de LDL provoca la aparición de Ac contra estas especies como se demostró primeramente en la aterosclerosis (Wu & Lefvert, 1995). En la fisiopatología de la EM la implicación del EO ha sido demostrada a diferentes niveles. El EO está estrechamente relacionado con la aparición de lípidos oxidados y en consecuencia de Ac contra estas especies lipídicas oxidadas como han reportado algunos investigadores (Quintana et al., 2008).

Por otro lado anticuerpos inmunoglobulinas M (IgM) cuando son de producción intratecal se han relacionado con un peor pronóstico de la enfermedad (Villar et al., 2005) y no solo eso, sino que la aparición de IgM lipidoespecíficas de síntesis intratecal han demostrado mejorar el pronóstico respecto a las anteriores, es decir, predecir el curso de la enfermedad con mayor eficacia (Villar et al., 2015).

HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

2. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

El SI es uno de los principales actores en la fisiopatología de la EM donde la inflamación a nivel del SNC sucede desde el inicio del proceso patogénico. Por otro lado, se ha demostrado la implicación del EO y de alteraciones metabólicas en la enfermedad. Teniendo en cuenta estos antecedentes la hipótesis de nuestro trabajo es que existen alteraciones del estado redox a nivel periférico y en concreto en las PBMCs y que además los cambios metabólicos se reflejan desde el inicio de la enfermedad y tienen utilidad como biomarcadores pronóstico.

En base a ello se propusieron dos objetivos generales:

A) Establecer las alteraciones del estado redox periférico y de la función mitocondrial en las PBMCs de pacientes con EM. Para conseguir este objetivo general se definieron los siguientes objetivos específicos:

1. Analizar la concentración de diferentes metabolitos de la vitamina D para validar que nuestra cohorte presenta las mismas alteraciones respecto al grupo control del estudio.
2. Estudiar la capacidad antioxidante de los pacientes con EM respecto del grupo control mediante dos metodologías diferentes.
3. Analizar la concentración de lactato y de AU de los pacientes.
4. Medir el consumo de oxígeno de las PBMCs en estado basal, tras la inhibición de la ATP sintasa, tras la adición de un agente desacoplante y tras la adición de un inhibidor del complejo III para comparar la respuesta ante estos estímulos de los pacientes con EM respecto del grupo control.
5. Cuantificar el número de mitocondrias de las PBMCs de los dos grupos de estudio.
6. Medir de manera directa e indirecta la concentración de ATP de las PBMCs.
7. Cuantificar el potencial de membrana mitocondrial de las PBMCs de los dos grupos de estudio.
8. Analizar la producción de superóxido por parte de las PBMCs y específicamente de los LT y LT de los pacientes y controles del estudio.
9. Realizar una semicuantificación de los complejos de la CTE.
10. Analizar de manera semicuantitativa las enzimas antioxidantes SOD2 y catalasa.

B) Definir la capacidad pronóstica de los cambios metabólicos en los pacientes con EM en el momento diagnóstico. Para ello se establecieron los siguientes objetivos específicos:

1. Buscar mediante una aproximación no dirigida de la metabolómica un perfil diferencial para establecer el pronóstico de los pacientes con EM (leve y agresivo) y diferenciarlos del grupo No-EM en LCR y suero.
2. Determinar la capacidad pronóstica de la lipidómica en LCR y suero de los pacientes con EM (leve y agresivo) y del grupo No-EM.
3. Buscar biomarcadores pronóstico en el perfil de AG de las muestras de LCR y suero.
4. Establecer la capacidad pronóstica del daño oxidativo proteico tanto en LCR como en suero en los grupos de pacientes leve y agresivo y en el grupo No-EM.
5. Analizar la concentración de Ac contra LDL oxidadas para establecer su utilidad como biomarcadores pronóstico de la enfermedad.

MATERIALES Y MÉTODOS

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 Sujetos de estudio

A) Estudio 1

Para el primer estudio de la presente tesis se realizó un estudio multicéntrico y transversal con un total de 75 controles sanos y 159 pacientes con EM. Se trata de un estudio observacional, analítico de casos y controles. El estudio fue aprobado en primer lugar por el comité ético del Hospital Universitario Arnau de Vilanova de Lleida y en segundo lugar por los comités éticos de los diferentes hospitales que participaron en el mismo: Hospital de la Santa Creu y Sant Pau de Barcelona, Hospital del Broggi de Sant Joan d'Espí, Hospital Verge de la cinta de Tortosa, Hospital de Mataró, Hospital de Figueres, Hospital Josep Trueta de Girona, Hospital Del Mar de Barcelona, Hospital Germans Trias i Pujol de Barcelona, Hospital de la Tecla de Tarragona y Hospital Universitari de Tarragona Joan XXIII.

Los criterios de inclusión para el estudio fueron pacientes diagnosticados de EM, según los criterios McDonald 2010, desde hace más de 5 años y con un EDSS menor de 3. Fueron incluidos tanto pacientes con tratamiento modificador de la enfermedad como pacientes sin tratamiento. Las variables género y edad se tendrán en cuenta a la hora de seleccionar los controles. La identificación de las cohortes óptimas de estudio se realizará a tenor de los siguientes criterios de selección:

- **Controles:** sujetos sanos (sin EM u otras enfermedades neurológicas y/o psiquiátricas que puedan comprometer las funciones cognitivas) que quieran colaborar en el estudio sin beneficio económico.
- **Pacientes:** sujetos diagnosticados de EMRR desde hace más de 5 años cuya discapacidad se encuentre entre 0 y 3 en el momento del análisis. Pueden estar bajo tratamiento o no.

Los criterios de exclusión para el estudio fueron que los pacientes sufrieran otra enfermedad neurodegenerativa, que padezcan alguna otra enfermedad que no les permita comprender la naturaleza del estudio y que no firmen el consentimiento informado.

Tabla 2. Distribución y características de los grupos del estudio

	Controles	Pacientes	p-valor	
N	75	159		
Mujeres (%)	67.1%	70.3%	0.623	
Edad	44.1 ± 13.39	46.83 ± 9.16	0.117	
EDSS		1.138 [0-3]	100%	na

Como se muestra en la **tabla 2** el porcentaje de mujeres de cada grupo fue aproximadamente del 70% siguiendo la distribución de la enfermedad en la población general (Mujeres 3: Hombres 1) (Kingwell et al., 2013).

B) Estudio 2

Para el segundo estudio se realizó un estudio transversal y retrospectivo con un total de 125 sujetos. Se trata también, de un estudio observacional, analítico de casos y controles. El grupo control estaba formado por 65 que no padecen EM (grupo no-EM) y el grupo de EM a su vez, estaba formado por 60 sujetos. De los 60 sujetos del grupo con EM, 19 se clasificaron dentro del grupo que sufre un curso agresivo de la enfermedad. Los criterios de inclusión para estos sujetos fueron que en menos de 10 años de enfermedad hubieran alcanzado un EDSS de 6 o bien hubieran requerido un cambio de tratamiento de una primera a una segunda línea. De los 60 sujetos del grupo con EM, 41 sufren lo que consideramos un curso leve de la enfermedad. Los criterios de inclusión para este grupo fueron: pacientes de EM con menos de 3 puntos en la escala de EDSS tras, como mínimo, 5 años de enfermedad. Dentro del grupo no-EM que fue utilizado como grupo control se encuentran sujetos con diferentes características: 29 con enfermedades neurológicas no inflamatorias, 9 con enfermedades inflamatorias diferentes a la EM y 16 con enfermedades no neurológicas. Los criterios de exclusión para los tres grupos fueron: no tener punción lumbar del momento diagnóstico para los pacientes con EM o no tener punción lumbar del grupo No-EM. Todos los sujetos diagnosticados de EM son menos de 5 años de evolución no se incluyeron en el análisis. El estudio fue aprobado por el comité ético del Hospital Universitario Arnau de Vilanova de Lleida y las características de los sujetos analizados se muestran en la **tabla 3**.

Tabla 3. Características de los pacientes del estudio

	Leve (n=36)	Agresivo (n=17)	No-EM (n=54)	p-valor
Mujeres (%)	77.78%	58.82%	61.1%	0,197

Edad	43.5 ± 7.37	39.05 ± 8.88	45.58 ± 12.39	0.083
Edad de debut	35.21 ± 8.71	32.82 ± 10.52	na	0,423
EDSS basal	0.00 [0.00;1.25]	1.75 [1.00;2.75]	na	0,019
Cambio a tratamiento de segunda línea:				<0.001
No	36 (100.00%)	3 (17.65%)	na	
Si	0 (0.00%)	14 (82.35%)	na	
Último EDSS	0.00 [0.00;0.00]	2.75 [1.00;6.12]	na	<0.001

3.2 Métodos

3.2.1 Extracción de sangre

La extracción de sangre se realizó por venopunción 24h antes de su procesamiento. Se extrajeron 2 tubos de EDTA (BD (Becton Dickinson) Vacutainer K2 EDTA 7,2 mg ref: 367861) de 10 ml cada uno y se conservaron a temperatura ambiente (TA) y en oscuridad hasta su análisis.

Con el objetivo de no introducir sesgos en el procesamiento de las muestras todas fueron analizadas a las 24h de su extracción para así tratar de la misma manera las muestras de nuestro centro como la de los centros colaboradores.

3.2.1.1 Separación del plasma

Se centrifugó, en primer lugar, la sangre completa a 1300 rpm durante 10 min y se separaron como mínimo 4 ml de plasma que se volvieron a centrifugar en las mismas condiciones para descartar el mayor número de plaquetas posible. El plasma se conservó a -20°C hasta su posterior análisis.

3.2.1.2 Extracción de las PBMCs por gradiente de Ficoll

Tras realizar la separación del plasma se diluyó la sangre con *phosphate buffered saline* (PBS) (Gibco ref: 10010-015) 1:1. Se añadió a continuación *Ficoll* (Lymphocyte separatum médium 1,077 g/l Lonza ref: 17-829E) y sobre éste la sangre diluida anteriormente en una relación 1:2 (*Ficoll*: Sangre). A continuación se centrifugaron las muestras durante 30 min 500 g sin freno y con poca aceleración para conseguir la separación de las PBMCs como se muestra en la **figura 16**. Tras conseguir la separación de las fases, se extrajo la fase de las PBMCs, se lavaron con PBS y se incubaron durante

10 min con un *buffer* de lisis de eritrocitos (Red Blood Cell Buffer Lysis Sigma ref: 11814389001). Tras la incubación se centrifugaron las células 5min a 1200 rpm y una vez descartados los eritrocitos se lavaron las PBMCs dos ocasiones con PBS durante 10 min a 1300 rpm.

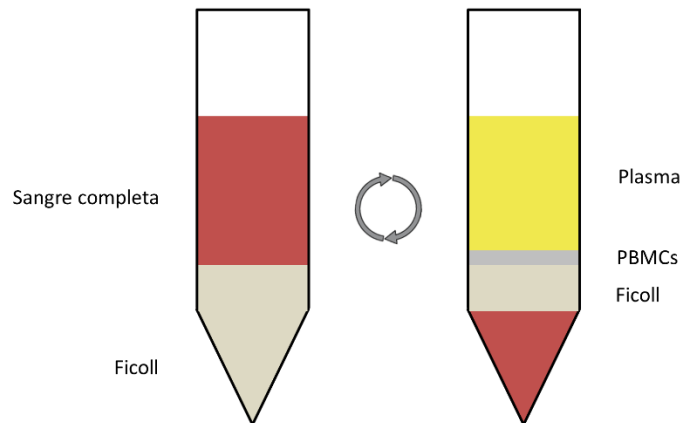


Figura 16. Separación de las PBMCs. La separación se produce tras 30 min de centrifugación a 500g sin freno y con 2 de aceleración. Entre el plasma y el Ficoll se obtienen las PBMCs.

Por último, se resuspendieron las células en 1ml de DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium Gibco ref: 13345364) y se procedió al contaje de las mismas en la cámara de Neubauer. Para identificar las células viable, se realizó una tinción con Trypan Blue (Sigma, ref: T8154) en dilución 1:5.

La fórmula aplicada para el contaje de células fue la siguiente:

$$N. de cel en 16 cuadros \times dilución con Trypan Blue \times volumen final \times 10.000$$

Tras realizar el contaje de las PBMCs se procedió a congelar 5 millones (en las muestras que fue posible por número de células) y se distribuyó un número diferente de células en función de la técnica a realizar como se especifica en los apartados siguientes.

3.2.2 Análisis de metabolitos de la vitamina D

Seis metabolitos diferentes de la vitamina D: vitamina D3; vitamina 25D3; vitamina 24,25D3; vitamina 1,25D3; Vitamina D2 y Vitamina 25D2 fueron analizados en el plasma de los sujetos del estudio. Es bien conocido el déficit de la forma activa de la vitamina D que presentan los pacientes con EM pero, hasta donde llega nuestro conocimiento, a día

de hoy no hay ningún estudio publicado que analice seis metabolitos diferentes de esta vitamina en estos pacientes. Tanto algunos pacientes de nuestra cohorte como voluntarios del grupo control se encuentran tomando dosis de 25.000 unidades internacionales (UI) de vitamina D al mes, dato que se tuvo en cuenta a la hora de analizar los resultados.

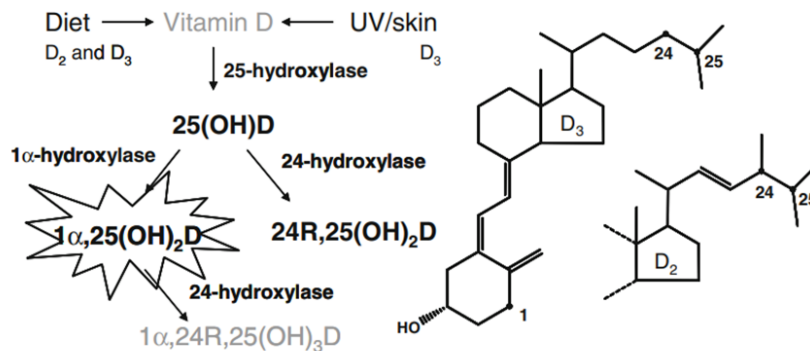


Figura 17. Metabolismo de la vitamina D. En negrita se muestran los compuestos analizados en este estudio (Aronov et al., 2008).

El perfil lipídico de los metabolitos mayoritarios de la vitamina D se realizó mediante cromatografía líquida de ultra alta resolución acoplada a espectrometría de masas (HPLC-MS) y se analizaron los metabolitos que se muestran en negrita en la **figura 17**. El análisis se realizó siguiendo el protocolo establecido por Pavel Aronov en 2008 (Aronov et al., 2008)

3.2.2.1 Compuestos químicos

Hexano, metil tert-butil éter (MTBE), diclorometano, acetonitrilo, etil acetato, metanol, ácido fórmico y K₂HPO₄ se obtuvieron de Termo Fisher Scientific. 4-phenyl-1,2,4-triazoline-3,5-dione (PTAD) y los estándares deuterados de los metabolitos de la vitamina D se obtuvieron de Sigma y de BIOMOL.

3.2.2.2 Stocks y soluciones de calibración

Los estándares de los metabolitos de la vitamina D se diluyeron y conservaron a -80 °C, 10 µg de 1α,25-dihidroxitamina D₃ (Sigma) se disolvieron en 1000 µl de acetonitrilo; 1 mg de 1α,25-dihidroxitamina D₂ (Sigma) se disolvió en 500 µl de acetonitrilo; 1 mg de

25-hidroxivitamina D₂ (Sigma) se disolvió en 1000 µl de acetonitrilo; 50 µg de 24R,25-dihidroxivitamina D₃ (BIOMOL) en 50 µL de etanol se diluyó en 950 µl de acetonitrilo; por último 1 mg de calcitriol (Sequoia Research Products, Pangbourne, UK) se disolvieron en 2000 µl de acetonitrilo.

Los estándares internos deuterados 26,26,26,27,27,27-hexadeuterium-1 α ,25-dihidroxivitaminaamina D₃ (Medical Isotopes) and 26,26,26,27,27,27-hexadeuterium-25-hidroxivitaminaamina D₃ (Synthetica) se disolvieron en acetonitrilo para preparar las soluciones stock. Finalmente, se prepararon rectas patrón de todos los estándares internos.

3.2.2.3 Preparación de las muestras

Brevemente, se añadieron 20 µl de estándares internos (12.5 ng/mL d₆ 1 α ,25-dihydroxyvitaminaamin D₃ and 500 ng/mL d₆ 25-hidroxivitamina D₃) a 500 µl de plasma de cada muestra. Se añadieron 500 µl de acetonitrilo para permitir la precipitación de las proteínas; se *vortearon* las muestras durante 1 min y a continuación se centrifugaron durante 10 min a 10.000g.

3.2.2.4 Extracción líquido-líquido

Se recuperó el sobrenadante tras la precipitación de proteínas y se transfirió a tubos de 2 ml que contenían 400 µl 0.4 M de K₂HPO₄, se *vortearon* las muestras y a continuación se añadieron 500 µl de MTBE. Tras mezclar bien las muestras se centrifugaron 5 min a 10.000 g y la fase superior (fase orgánica) se evaporó a continuación un flujo de nitrógeno en un evaporador (N-evap Modelo 113 Organomation Association, Berlin, MA, EUA). Tras la evaporación se añadió 0,75 mg/ml de PTAD en acetonitrilo y se mezcló durante 1 min. Esta mezcla permitió que se produjera la derivatización de las muestras (toda la noche a 4°C).

3.2.2.5 Condiciones cromatográficas

10 µl de cada muestra fueron inyectados en la columna del módulo de separación ACQUITY UPLC (Waters). La columna UPLC BEH C18 2.1 x 100 mm 1.7 µm (Waters) se mantuvo a 40 °C. La fase acuosa A estuvo formada por 10 % v/v de acetonitrilo en agua

conteniendo un 0.1% de ácido fórmico como modificador. Metanol al 100% formó la fase orgánica B. El programa de gradiente utilizado fue el siguiente: 0-1 min 60% de B; 7 min 72% de B. Tras la separación, la columna se lavó con la fase B (100%) durante 2 min a 0.4 ml/min de flujo. El voltaje utilizado fue de 3.00 kV y el flujo de nitrógeno fue continuo (25 L/h).

3.2.2.6 Análisis de los resultados

Seis metabolitos diferentes de la vitamina D fueron analizados en el estudio: D3; D2; 25D3; 25D2; 1,25D3; 24,25D3. Todos los metabolitos se procesaron de la misma muestra de plasma y se utilizó el límite de detección y el límite de cuantificación para medir la concentración de los mismos.

3.2.3 *Determinaciones bioquímicas*

3.2.3.1 FRAP (ferric reducing antioxidant power)

Con este método se determinó la capacidad de reducción férrica que tiene una muestra. En este caso, se trata de muestras de plasma que habían sido congeladas en el momento de la extracción de las PBMCs, a -20 °C.

A pH bajo y en presencia de un reductor o antioxidante, el complejo 2, 4, 6-tri (2-piridil)-s-triazina (TPTZ, Sigma, ref: 93285) con hierro III (forma férrica) se reduce a la forma ferrosa (hierro II) desarrollando un intenso color azul con absorbancia máxima a 595 nm. Para la realización del FRAP se utilizaron los reactivos que se muestran en la **tabla 4**.

La medición se realizó en placas de 96 pocillos y se utilizaron concentraciones crecientes entre 100 µM y 1000 µM de TROLOX (6-hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchroman-2-carboxylic acid, Sigma, ref: 23881-3) para realizar la recta patrón que permitió calcular la capacidad antioxidante de cada muestra. El TROLOX es un análogo de la vitamina E que, por tanto, tiene capacidad antioxidante y se utiliza como antioxidante de referencia en técnicas como esta.

En cada pocillo se añadieron 3 µl tanto de TROLOX como de las muestras a los cuales se les añadieron 27 µl de PBS y 200 µl de reactivo FRAP. La placa se mezcló e incubó

durante 30 min a 37°C y se procedió a la lectura por medio del espectrofotómetro (Multiskan Ascent 354, Thermo Labsystem).

Tabla 4. Reactivos necesarios para la realización de la técnica FRAP

Tampón acetato 0.3 M pH3.6	C2H3NaO2 (acetato sódico) 3.1 g	C2H4O2 (ácido acético) 16 ml	Agua miliQ Enrasar hasta 1l
Solución TPTZ	HCl 40mM	TPTZ 0.0312 g	
Solución FeCl3 6H2O 20 mM	FeCl3 0.054 g	Agua miliQ 10 ml	
Reactivo FRAP	25 ml de Tampón acetato	2,5 ml de Solución TPTZ	2,5 ml de Solución FeCl3 6H2O 20 mM

3.2.3.2 ABTS (2,2'-azino-bis (3-ethylbenzthiazoline-6-sulfonic acid))

El radical catión 2,2'-azino-bis (3-ethylbenzthiazoline-6-sulfonic acid) (ABTS, Sigma ref: 10102946001) preformado por oxidación de ABTS con persulfato potásico es reducido por la presencia de antioxidantes. Para la realización del ABTS se prepararon los reactivos como se indica en la **tabla 5**.

Tabla 5. Reactivos necesarios para la técnica ABTS

Tampón fosfato salino 5mM pH7.4	KH2PO4 (potassium phosphate monobasic) 0.136 g	Na2HPO4 (sodium phosphate dibasic) 0.568 g	NaCl (cloruro sódico) 8.48 g
Persulfato potásico	66 mg	Agua MiliQ 100 ml	
ABTS oxidado (Nota: 12h en oscuridad y agitación previo a su uso)	ABTS 38.4 mg	Solución de persulfato potásico 10 ml	

Para realizar el experimento se diluyó el volumen necesario de ABTS oxidado en PBS para que la absorbancia del mismo sea aproximadamente de 1 cuando se realiza la lectura a 405 nm.

La recta patrón se realizó nuevamente con TROLOX y todas las mediciones se realizaron frente a un blanco compuesto por 1 µl de PBS al que se añadió 200 µl de Reactivo ABTS. Se realizaron 7 mediciones para todas las muestras, la primera a T0, y las 6 siguientes un minuto después (minuto 1, 2, 3, 4, 5 y 6). Para calcular la capacidad antioxidante se

calculó el porcentaje de inhibición de cada muestra respecto al % del TROLOX y se calculó el área bajo la curva.

3.2.3.3 Ácido úrico

Se analizó la concentración de ácido úrico (AU) en el plasma (previamente congelado a -20 °C) de los sujetos del estudio mediante el kit comercial *Uric Acid Kit* (Spinreact 1001010). El principio del método se basa en la oxidación del AU por la uricasa. De esta reacción se generan allantoine y peróxido de hidrógeno que en presencia de 2-4 dichlorophenol sulfonato y de 4-aminophenazona forma un compuesto rojo que detectamos por espectofotometría y que se general de manera proporcional a la concentración de ácido úrico.

Las muestras se analizaron siguiendo las recomendaciones del fabricante, en placas de 96 pocillos y todas las mediciones se realizaron por triplicado.

Brevemente, se preparó una recta patrón con concentraciones del estándar entre 1 mg/dl y 6 mg/dl que permitió analizar la concentración de las muestras. La absorbancia se analizó a 505 nm.

3.2.3.4 Lactato

La determinación de la concentración de lactato se realizó mediante el kit comercial *Lactate Kit* (Spinreact ref: 1001330, Girona, España) siguiendo las indicaciones del fabricante pero adaptando los volúmenes para realizar la medición en una placa de 96 pocillos.

El lactato presente en el plasma es oxidado por la lactato oxidasa a piruvato y peróxido de hidrógeno el cual, en presencia de peroxidasa, 4-aminofenazona y 4-clorofenol forma un producto rojo cuantificable por espectofotometría que puede ser cuantificado por relación directa con su absorbancia analizada a 505 nm. Se realizó una recta patrón con concentraciones entre 0 y 10 mg/dl y se restó de todas las mediciones el blanco (compuesto solo por el reactivo de trabajo). Tras añadir las muestras, recta patrón y el reactivo de trabajo se incubó la placa a TA durante 10 minutos y se procedió a su análisis tras la agitación de la placa.

3.2.3.5 ATP

El análisis de la concentración de ATP se realizó mediante el kit de Invitaminarogen™ *ATP Determination Kit, 200-1,000 assays* (Thermo Fisher Scientific). El proceso para descongelar las células fue el mismo que se ha especificado en el apartado 4.2.8.2. A continuación, se centrifugaron durante 10 min a 1300 rpm, el pelet se resuspendió en 1ml de DMEM y se contó el número de células presentes en cada muestra. Para medir la concentración de ATP se utilizaron 300.000 PBMCs por pocillo y la medición se realizó por triplicado de la siguiente manera: en primer lugar, se construyó una recta patrón (entre 1nM y 1 µM) a partir de una concentración de ATP conocida. Se prepararon los reactivos conforme lo indicado en el protocolo y se añadieron 10 µl tanto de recta patrón como de las muestras y 90 µl de la solución de ATP preparada conforme a lo indicado por la casa comercial. La placa se incubó durante 15 minutos a TA y en oscuridad y se procedió a la lectura de la luminiscencia a 560 nm mediante el Luminómetro Infinite M200 (TECAN, Männedorf, Suiza).

3.2.4 *Respirometría*

La respiración de las PBMCs de los sujetos de nuestro estudio se realizó mediante respirometría de alta resolución con el *Oxygraph-2K (O2K)* (Oroboros, Innsbruck, Austria) al día siguiente de la extracción de las muestras.

3.2.4.1 Preparación del instrumento y calibración del O2K con medio saturado

Para nuestros experimentos el instrumento O2K se utilizó a 37°C. El volumen añadido en cada cámara fue de 2ml y la velocidad de los agitadores de difluoruro de polivinilo (PVDF) de 400 rpm. El consumo de oxígeno se midió en intervalos de 2 s.

En primer lugar, se lavaron cuidadosamente las cámaras para evitar contaminaciones: primero, con etanol al 100% y a continuación con etanol al 70%. Para finalizar se lavaron 3 veces más con agua antes de añadir DMEM para equilibrar el aparato. Tras la adición del DMEM se cerraron las cámaras para eliminar el exceso de medio y de oxígeno y posteriormente se abrieron hasta dejar solamente una única burbuja para permitir el flujo de oxígeno hacia el interior y estabilizar la medición.

El oxígeno disuelto en el medio difunde a través de una membrana de teflón y se reduce al entrar en contacto con un electrodo de platino polarizado a 0.8V; proceso que genera una corriente eléctrica que es detectada por el equipo.

3.2.4.2 Protocolo de respiración para las PBMCs

Todas las mediciones se realizaron con un total de 2,5 millones de células por ml ya que fue la cantidad con la que mejores resultados se obtuvieron en la puesta a punto. Se utilizó el protocolo de control de la fosforilación que proporciona información sobre la calidad de la respiración mitocondrial de células intactas tras la adición de diferentes sustancias permeables a la membrana mitocondrial.

La respiración celular se midió bajo diferentes estímulos: en primer lugar la respiración basal de las células que se midió con las cámaras cerradas para que el consumo de oxígeno proceda de las células que estamos analizando. La respiración basal o de rutina se monitorizó durante al menos 10 min. A continuación se añadió un inhibidor del complejo 5 de la cadena de transporte electrónico; oligomicina 2µg/ml (*Oligomycin from Streptomyces diastatochromogenes*, Sigma, ref: O4876) para analizar el escape de electrones (Fuga); la capacidad respiratoria teórica máxima (Máxima) con la adición seriada del FCCP (Carbonyl cyanide 4-(trifluoromethoxy) phenylhydrazone, Sigma, ref: C2920) 0.5 µM por inyección y por último antimicina (Antimycin A from *Streptomyces sp.*, Sigma, ref: A8674) a una concentración final de 2.5 µM. La antimicina es un inhibidor del complejo III que nos permitió hacer una estimación del consumo residual de oxígeno (No mitocondrial).

3.2.4.3 Análisis de los datos, corrección por el background y ratios

Todos los estados respiratorios (Basal, Fuga y Máxima) fueron corregidos por los valores de la respiración no mitocondrial y previamente todas las mediciones fueron corregidas por el consumo de oxígeno en ausencia de células en equilibrio con el medio ya que no siempre es igual a 0.

3.2.5 Citometría de flujo

Esta técnica se realizó en el citómetro analizador digital FACS-Canto II (BD (Becton Dickinson) BD Switzerland Sàrl) con 3 láseres con la configuración 4-2-2 que permite analizar hasta 8 colores diferentes, del servicio de citometría del Institut de Recerca Biomèdica de Lleida. Un total de 300.000 PBMCs por paciente se utilizaron para realizar la citometría de flujo que se realizó el mismo día de la extracción de las PBMCs.

3.2.5.1 Superóxido y poblaciones linfocitarias

Mediante el *forward scatter* y el *side scatter* se seleccionaron los linfocitos de cada muestra. Un total de 30.000 eventos fueron seleccionados a través del marcador común para leucocitos CD45+ (CFTMBlue Anti-human CD45, Immunostep ref: 45CFB1). Además se añadió el marcador CD3 (APC Anti-human, Immunostep ref: 3A1) con el objetivo de marcar los LT y CD19 (FITC, Immunostep 19F1) con el objetivo de marcar los LB. Por último se añadió un marcador de la producción de superóxido; el MitoSox (Molecular Probes Ref: M36008).

El protocolo utilizado fue el siguiente: se añadieron los marcadores a las células resuspendidas en PBS en una relación de 1:20 para el CD45, 1:5 para el CD3 y 1:5 para el CD19. Se incubaron las células durante 15 minutos en oscuridad y posteriormente se centrifugaron durante 5 min 4400 rpm. A continuación se añadieron 2 ml PBS al 5% de bovine serum albumin (BSA) y se volvieron a centrifugar las células en las condiciones anteriores. Tras esta centrifugación se decantó el PBS quedando un volumen final de 50 µl donde se añadieron 50 µl de MitoSox (concentración 5µM) obteniendo un concentración final de 2,5 µM como recomienda el fabricante. Tras 10 min de incubación en oscuridad se procedió a realizar los mismos pasos que tras la tinción con el resto de Ac y se procedió a la lectura de las muestras en el citómetro.

Para el análisis de resultados se midió en primer lugar la existencia de diferencias en la producción de superóxido en la población de leucocitos (CD45+) y a continuación en los linfocitos B y en los linfocitos T.

3.2.5.2 Número de mitocondrias y potencial de membrana mitocondrial

El conteo del número de mitocondrias (*MitoSpy™ Green FM* ref: 424805) y el análisis de su potencial de membrana (*MitoProbe™ DiIC₁(5) Assay Kit - For Flow Cytometry - 100 Assays* Ref:34151) se hizo por citometría de flujo de PBMCs congeladas en el momento de la extracción. Un total de 3000 eventos fueron analizados para cada sonda.

En primer lugar, se descongelaron las muestras que estaban conservadas en nitrógeno líquido en un proceso rápido (2 min 37°C) y seguidamente se diluyeron en 3 ml de PBS para intentar evitar la toxicidad del dimetil sulfoxido (DMSO, Sigma, ref: 276855). Se centrifugaron durante 10 min a 1300 rpm, el pellet se resuspendió en 1ml de DMEM y se contó el número de células como se ha detallado anteriormente.

Se resuspendió de nuevo el pellet en 1 ml de DMEM y se añadió la sonda MitoSpy Green a una concentración final de 50 µM que se incubó durante 20 min a 37°C. Tras este periodo se realizaron los lavados en las mismas condiciones que previamente y por último se resuspendieron las PBMCs en 100 µl de PBS para la lectura en el citómetro. El mismo proceso se utilizó para la adición de la sonda MitoProbe™ DiIC₁(5) que se incluyó a una concentración final de 50 nM.

3.2.6 *Inmunodetección por Western blot*

La inmunodetección de las proteínas de las PBMCs se consiguió tras la aplicación de los protocolos que se detallan a continuación.

3.2.6.1 Procesamiento previo de la muestra

Cuando se finalizó el proceso de extracción de las PBMCs se conservaron células en el tampón de lisis celular RIPA (TRIS-HCl: 50Mm (USB, ref: 75825), pH 7,4; Tween 20: 1% (v/v) (Sigma, ref: P1379); Desoxicolato sódico: 0,25% (p/v); NaCl 150 mM; EDTA 1mM, PMSF 1 mM, inhibidor de proteasas 1µg/ml (Sigma, ref: P8340); Ortovanadato sódico 1mM y fluoruro de sodio 1mM.

3.2.6.2 Sonicación y cuantificación de proteínas

Las muestras se homogenizaron por sonicación (Soniprep 150 Braun Biotech, Barcelona, España) durante 15 segundos a una amplitud entre 8-10 micrómetros.

Una vez sonicadas se procedió a la cuantificación proteica de las muestras mediante el método Bradford (Bradford Sigma ref: B6916) que se basa en la unión que experimentan los residuos básicos y aromáticos de los aminoácidos con el azul de Coomassie. La concentración proteica de las muestras se analizó por interpolación de los datos obtenidos a partir de una recta patrón realizada con concentraciones conocidas de BSA (Thermo Fisher Scientific, ref: 23209) (rango de 0 a 2 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$).

Se añadió la misma cantidad de reactivo Bradford (40 μl) (Coomassie protein assay reagent, Thermo Fisher Scientific, ref: 1856209) a las muestras y a la recta patrón de BSA y estas se incubaron durante 5 minutos a TA. La absorbancia de cada muestra se analizó por espectrofotometría a una longitud de onda de 595 nm en una placa de 96 pocillos.

3.2.6.3 Preparación de la muestra

Se normalizaron las muestras a una concentración final de 20 μg a las que se añadió el tampón de carga formado por HCl 62.5 mM pH 7,8; SDS: 2% (*sodium dodecyl sulfate*); glicerol: 10% y azul de bromofenol: 0,02%.

A continuación, con el objetivo de desnaturalizar las proteínas se introdujeron las muestras en un baño seco (Thermobloc Selecta, Biotech, Madrid, España) a 95°C durante 3 min.

3.2.6.4 Separación de proteínas por electroforesis

Para la separación de proteínas por peso molecular se utilizaron geles de acrilamida en presencia del detergente dodecilsulfato sódico (SDS). Este detergente aniónico actúa solubilizando y desnaturalizando la mayor parte de las proteínas de la muestra y permite que la separación de las mismas tenga lugar por peso molecular. Cuando se aplica un campo eléctrico las proteínas migran una mayor o menor distancia en función de su peso molecular.

El soporte físico utilizado para la separación de las proteínas fue un gel de acrilamida-bisacrilamida (Sigma, ref: A3574) que consta de dos partes: el gel apilador que permite que las proteínas comiencen a migrar desde el mismo punto y el gel separador que es

dentro del cual se produce la separación proteica en función del peso molecular. En esta tesis se han utilizado geles del 15% y el 12% dependiendo del peso molecular de las proteínas que se querían separar. Además, y como se especifica en la **tabla 6**, la acrilamida fue forzada a polimerizar por la presencia de los catalizadores persulfato amónico (Sigma, ref: A3678) al 10% y *N,N,N',N'-tetramethylethylenediamine* (TEMED, Sigma, ref: T9281) al 0,03%.

Tabla 6. Preparación de los geles para la técnica Westen Blot

Compuesto	12%		15%	
	Separador	Apilador	Separador	Apilador
Acrilamida/Bis 30% (ml)	4	1	5	1
Tris 1,5 M pH8.9 (ml)	2.5	-	2.5	-
Tris 0,5 M pH6.5 (ml)	-	1.5	-	1.5
Agua MiliQ (ml)	3.30	3.4	2.3	3.4
SDS 10% (μl)	100	60	100	60
PA 10% (μl)	80	40	80	40
TEMED (μl)	7.5	7.5	7.5	7.5

Una vez polimerizados, los geles se situaron en cubetas de electroforesis tipo Mini-Protean II (BioRad ref. 165-2940, Barcelona, España); se cubrieron con tampón de electroforesis: Tris 25 mM; Glicerol 192 mM, SDS 0,1% (p/v) y se aplicó una corriente de 15 mA por gel durante aproximadamente 2 horas.

3.2.6.5 Electrotransferencia

Las proteínas se transfirieron a membranas de PVDF (ref. IPVH00010 Immobilon-P de Millipore, Bedford, MA, EEUU). Las membranas fueron previamente activadas con metanol al 100% durante 3 minutos y equilibradas en tampón de transferencia (Tris 25 mM; glicerol 192 mM y metanol 20% (v/v)) durante 5 minutos. Para realizar la transferencia se colocó el gel en contacto directo con la membrana mediante un sistema de *sandwicheras* de plástico perforado que se sitúan en cubetas de transferencia (BioRad, Mini Trans-Blot Transfer Cell, Barcelona, España) diseñadas para conseguir un campo eléctrico uniforme en toda la superficie y perpendicular al sistema membrana-

gel, en dirección a la membrana. Para la electrotransferencia se aplicó un voltaje de 100 V durante 1h o 1,5 h dependiendo del % de acrilamida y el grosor del gel. Este proceso desprende calor por lo que se introdujo hielo dentro de la cubeta que se puso en agitación para refrigerar el sistema.

3.2.6.6 Bloqueo de la membrana

Una vez terminada la transferencia se procedió al bloqueo de la membrana en agitación suave con el objetivo de bloquear las posiciones de la membrana donde no se han unido las proteínas de la muestra que se analiza y evitar falsos positivos. El bloqueo se realizó con I-Block, Tween-20 0,1 %, cloruro de sodio 68 mM, hidrogenofosfato de sodio 58 mM y dihidrogenofosfato de sodio 17 mM o BSA-TBS-T 0,1 % (BSA 5%-TRIS 2 M, cloruro de sodio 2,5 M, Tween-20 0,1 %) en función de las proteínas que se analizaban. El bloqueo se realizó durante 1h en agitación suave a TA y tras el mismo se realizaron 3 lavados de 5 minutos de duración con TBST-T 0,05 % (TRIS 2 M, cloruro de sodio 2,5 M, Tween-20 0,05 %) con la finalidad de retirar el exceso de solución de bloqueo.

3.2.6.7 Inmunodetección

Las membranas se incubaron con el Ac primario durante toda la noche a 4°C y en agitación suave. Los diferentes Ac utilizados y la concentración de cada uno se especifican en la **tabla 7**. Tras la incubación se realizaron de nuevo 3 lavados de las membranas de la misma duración y condiciones que tras el bloqueo.

Tabla 7. Anticuerpos utilizados para el análisis de proteínas por Western Blot

Proteína (antígeno)	P.M. (kDa)	Descripción	Referencia	Dilución	Especie
OXPPOS	Varios	Complejos de la CTE	ab110413 abcam	1:500	Mouse
SOD2	25 kDa	Proteína SOD2	sc-271803 Santa Cruz Biotechnology	1:1000	Mouse
Catalasa	64 kDa	Proteína Catalasa	sc-271803 Santa Cruz Biotechnology	1:1000	Mouse
Porina	31 kDa	Anti-VDAC1 (Mitochondrial Loading Control)	ab15895 abcam	1:1000	Rabbit

A continuación se procedió a la incubación con el anticuerpo secundario correspondiente (**tabla 8**) y el exceso del mismo se eliminó realizando de nuevo 3 lavados en las mismas condiciones que se han especificado anteriormente.

Tabla 8. Anticuerpos Secundarios utilizados para el análisis proteico por Western Blot

Anticuerpo Secundario	Descripción	Referencia	Dilución
Anti-mouse	ECL Anti-Mouse IgG, Horseradish Peroxidase-Linked Species-Specific Whole Antibody (from sheep)	NA931 GE-Healthcare	1:50000
Anti-rabbit	Anti-rabbit IgG, H&L, Horseradish Peroxidase-Linked species (from goat)	31460 Pierce	1:100000

3.2.6.8 Revelado y análisis de datos

Para el revelado se incubó la membrana durante 5 minutos a TA con un sustrato quimioluminiscente (Milipore Corporation, luminol™ Western Chemiluminiscent HRP. Billerica MA, EEUU). La cantidad de luminiscencia emitida se detectó con el equipo ChemiDoc™ MP imagen System (BioRad, Munich, Alemania) y se analizó con el programa Image Lab software v4.0.1 (BioRad, Hércules, CA, EEUU).

La cantidad de luminiscencia emitida es proporcional a la cantidad de proteína y la medida de la intensidad se relativizó o bien mediante un anticuerpo utilizado como marcador de carga o bien mediante la técnica de tinción de membranas con Azul de Commassie.

3.2.7 *Análisis metabolómico*

La metabolómica se describe como el conjunto completo de metabolitos, es decir, el conjunto de moléculas intermediarias de bajo peso molecular. Estas moléculas cambian en función del estado fisiológico y por ende, en función del estado fisiopatológico. Debido al poco conocimiento que existía en el tema en el momento de la realización del análisis, decidimos utilizar una aproximación no dirigida de la técnica con el propósito de hacer una primera aproximación a los cambios en los metabolitos de los pacientes con EM respecto al grupo no-EM.

3.2.7.1 Preparación de la muestra

Los metabolitos se analizaron tanto del suero como del LCR almacenados a -80°C desde su extracción. 16 μl tanto de suero como de LCR fueron utilizados. Brevemente, se añadieron 20 volúmenes de metanol frío que contiene $1\mu\text{g}/\text{ml}$ de fenilalanina marcada isotópicamente con un ^{13}C , como estándar interno y $1\mu\text{M}$ de BHT (como antioxidante). Tras vortear las muestras durante 1 min se incubaron durante 1h a -20°C . A continuación se centrifugaron durante 5 min a 1300 rpm y se descartó el pellet donde habían precipitado las proteínas. El sobrenadante se secó en el Speed Vac (SPD121P Savant, Barcelona, España) durante 45 min a 45°C y se resuspendieron las muestras en una mezcla 1:1 de metanol y ácido acético (0,4%). Finalmente se filtraron mediante eppendorfs UltraFree con $0.22\mu\text{m}$ de poro (UFC3LTK00, Millipore, Bredford, MA, EUA) para su análisis.

3.2.7.2 Sistema cromatográfico

El análisis se realizó por cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas con una fuente de ionización de electrospray (ESI; electrospray ionization) y un analizador de masas híbrido cuadrupolo-tiempo de vuelo (LC-ESI-QTOF-MS/MS).

Se utilizó la cromatografía líquida de ultra alta resolución UPLC modelo 1290 (Agilent Technologies, Barcelona, España) acoplado a un ESIQ-TOF MS/MS modelo 6520 (Agilent Technologies, Barcelona, España).

3.2.7.3 Condiciones cromatográficas

Se inyectaron 2 μl del extracto metanólico que se obtuvo acorde a lo descrito en el apartado 5.2.1.1 en una columna C18 de fase reversa (Zorbax SB-Aq $1,8\mu\text{m} \times 2,1 \times 50$ mm; Agilent Technologies, Barcelona, España) a una temperatura de 60°C y equipada con una precolumna (Zorbax SB-C8 Rapid Resolution Cartridge $3,5\mu\text{m} \times 2,1 \times 30$ mm; Agilent Technologies, Barcelona, España). La velocidad del flujo fue constante (0.6 ml/min) con un gradiente inicial del 2% de fase móvil B. En el minuto 13 se llegó al 98% de la fase B que se mantuvo en estas condiciones durante 6 min. Por último, el sistema se equilibró al 2% de fase B durante 5 min. Como fase móvil A se utilizó agua al 0.2% de ácido acético y metanol al 0,2 % de ácido acético como fase móvil B.

Para la recogida de datos se utilizó el modo positivo operando en el modo TOF de rastreo desde 200 hasta 3000 m/z. 3500 V fue el voltaje del capilar y 1 la velocidad de escaneo. El N₂ se utilizó como gas nebulizador independiente con un flujo de 5 L/min y una temperatura de 350°C. Paralelamente, la fuente ESI utilizó un nebulizador independiente con un flujo de 10L/min, el cual introduce continuamente masa de compuestos de referencia: 121.050873, 922.009798 (en modo ión positivo) para calibrar continuamente las masas.

3.2.7.4 Análisis de los datos

Se utilizó el MassHunter Data Acquisition (Agilent Technologies, Barcelona, España) para el análisis de los datos y el procesador MassHunter Qualitative Analysis (Agilent Technologies, Barcelona, España) para la extracción de las características moleculares de las muestras.

El procesador MassHunter Profiler Professional (Agilent Technologies, Barcelona, España) permitió la comparación y el análisis estadístico entre los grupos. Solo las moléculas con una abundancia absoluta mínima de 200 *counts* fueron seleccionadas. Posteriormente, las características moleculares presentes en las muestras se alinearon utilizando una ventana de tiempo de retención de $0,1\% \pm 0,15$ min y una ventana de masas de $5,0$ ppm $\pm 2,0$ mDA. Por último y con el objetivo de disminuir el ruido de fondo, solo se seleccionaron las moléculas que se encontraban al menos en el 50% de las muestras de un mismo grupo. Se aplicó tanto estadística multivariante no supervisada (Hierarchical clustering y PCA) como análisis supervisados (PLS-DA). Todos los análisis se realizaron gracias a la plataforma online Metaboanalyst (Chong et al., 2018).

3.2.8 *Análisis del lipidoma*

La lipidómica permite analizar el conjunto de lípidos presente en un determinado tejido y/o fluido. Se realizó un análisis lipidómico tanto del suero como del LCR de los sujetos del estudio.

3.2.8.1 Preparación de los estándares lipídicos

Tanto para la estandarización interna como para la externa se utilizaron estándares lipídicos que consisten en lípidos marcados isotópicamente (**tabla 9**). La estandarización externa permitió asignar la familia lipídica a cada compuesto y la interna reducir las posibles variaciones que pueda haber tanto intra como inter ensayos. Las soluciones stock se prepararon disolviendo los estándares lipídicos en MTBE a una concentración de 1 mg/ml y las soluciones de trabajo se diluyeron hasta 2,5 µg/ml.

Tabla 9. Estándares representativos de clase y estándares internos de extracción añadidos a las muestras

Compuesto	Referencia
1,3(d5)-dihexadecanoyl-glycerol	110537, Avanti Polar Lipids
1,3(d5)-dihexadecanoyl-2-octadecanoyl-glycerol	110543, Avanti Polar Lipids
1-hexadecanoyl(d31)-2-(9Z-octadecenoyl)-sn-glycero-3-phosphate	110920, Avanti Polar Lipids
1-hexadecanoyl(d31)-2-(9Z-octadecenoyl)-sn-glycero-3-phosphocholine	110918, Avanti Polar Lipids
1-hexadecanoyl(d31)-2-(9Z-octadecenoyl)-sn-glycero-3-phosphoethanolamine	110921, Avanti Polar Lipids
1-hexadecanoyl-2-(9Z-octadecenoyl)-sn-glycero-3-phospho-(1'-racglycerol-1',1',2',3',3'-d5)	110899, Avanti Polar Lipids
1-hexadecanoyl(d31)-2-(9Z-octadecenoyl)-sn-glycero-3-phosphomyoinositol	110923, Avanti Polar Lipids
1-hexadecanoyl(d31)-2-(9Z-octadecenoyl)-sn-glycero-3-[phospho-Lserine]	110922, Avanti Polar Lipids
26:0-d4 Lyso PC	860389, Avanti Polar Lipids
18:1 Chol (D7) ester	111015, Avanti Polar Lipids
cholest-5-en-3β-ol (d7)	LM-4100, Avanti Polar Lipids
D-erythro-sphingosine-d7	860657, Avanti Polar Lipids
D-erythro-sphingosine-d7-1-phosphate	860659, Avanti Polar Lipids
N-palmitoyl-d31-D-erythro-sphingosine	868516, Avanti Polar Lipids
N-palmitoyl-d31-D-erythro-sphingosylphosphorylcholine	868584, Avanti Polar Lipids
Octadecanoic acid-2,2-d2	19905-58-9, Sigma Aldrich

3.2.8.2 Extracción lipídica

El análisis lipidómico se basó en un método previamente validado y publicado por Pizarro en 2013 (Pizarro et al., 2013). Las muestras se conservaron a -80 °C hasta su análisis y para la extracción de las mismas se utilizó MTBE (solvente orgánico).

Para el análisis se utilizaron 10 µl de plasma y 10 µl de LCR. A estas cantidades se les añadió 5 µl de agua miliQ y 20 µl de metanol frío. Las muestras se vortearon durante 2 minutos para conseguir la precipitación de las proteínas. A continuación, se añadieron 250 µl de MTBE conteniendo los estándares lipídicos internos. Las muestras se sumergieron en un baño (ATU, Ultrasonidos, Valencia, España) con una potencia de 40 kHz y 100 W respectivamente, a 10 °C durante 30 min. Por último, se añadieron 25 µl de agua miliQ y se centrifugaron las muestras a 1400 g a 10 °C durante 10 min para separar la fase orgánica. La parte superior, que contenía los extractos lipídicos, se conservó para realizar la espectrometría de masas. Además, una mezcla de todos los extractos lipídicos se preparó y se utilizó como control de calidad.

3.2.8.3 Sistema cromatográfico

El análisis se realizó por cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas con una fuente de ionización de electrospray (ESI; *electrospray ionization*) y un analizador de masas híbrido cuadrupolo-tiempo de vuelo (LC-ESI-QTOF-MS/MS).

Se utilizó la cromatografía líquida de ultra alta resolución UPLC modelo 1290 (Agilent Technologies, Barcelona, España) acoplado a un ESIQ-TOF MS/MS modelo 6520 (Agilent Technologies, Barcelona, España).

3.2.8.4 Condiciones cromatográficas

Los extractos lipídicos se analizaron siguiendo el método previamente publicado por Castro-Perez en 2010 (Castro-Perez et al., 2010). El compartimento del UHPLC de las muestras se refrigeró a 4 °C para cada muestra y 10 µl del extracto lipídico se introdujeron en la columna a 55 °C de temperatura (1,8 µm 100 x 2,1 mm id columna Waters Acquity HSS T3 (Waters, Mildord, MA)).

El flujo fue 400 $\mu\text{l}/\text{min}$ con el solvente A compuesto por 10 mM de acetato de amonio en acetonitrilo-agua (40:60, v/v) y el solvente B compuesto por 10 mM de acetato de amonio en acetonitrilo-isopropanol (10:90, v/v). El gradiente empezó al 40% de la fase móvil B y alcanzó el 100% en 10 min quedando retenido durante 2 minutos. Finalmente el sistema volvió al 60% de la fase móvil B y se equilibró durante 3 minutos.

El voltaje del capilar fue 3500 V con un ratio de escaneo de 1 escaneo/seg. El N_2 se utilizó como gas nebulizador independiente con un flujo de 5 L/min y una temperatura de 350°C. Paralelamente, la fuente ESI utilizó un nebulizador independiente con un flujo de 10L/min, el cual introduce continuamente masa de compuestos de referencia: 121.050873, 922.009798 (en modo ión positivo) para calibrar continuamente las masas.

3.2.8.5 Análisis de los datos

Para obtener los datos se utilizó el software MassHunter Data Analysis (Agilent Technologies, Barcelona, España). Para la obtención de las características de las moléculas se utilizó el algoritmo Molecular Feature Extractor (MFE) (Agilent Technologies, Barcelona, España) (Jové et al. 2013b) contenido en el Software MassHunter Qualitative Analysis (Agilent Technologies, Barcelona, España).

Brevemente, el algoritmo utiliza la exactitud de las medidas de masa para grupos de iones relacionados (basado en el estado de la carga que los envuelve, la distribución isotópica y/o la presencia de diferentes aductos y dímeros/trímeros) asignando múltiples especies (iones) a un compuesto único utilizado como referencia.

Finalmente, el MassHunter Mass Profiler Professional Software (Agilent Technologies, Barcelona, España) se utilizó para realizar un análisis lipidómico no dirigido de las características extraídas. Solamente se analizaron las características con una abundancia mínima de 200 counts y que estuvieron presentes al menos en 50% de muestras de cada grupo (para evitar el background).

Las características moleculares en las muestras fueron alineadas utilizando una ventana de tiempo de retención de $0,1 \% \pm 0,25$ minutos y $20,0 \text{ ppm} \pm 2,0 \text{ mDa}$. Se aplicó tanto estadística multivariante no supervisada (Hierarchical clustering y PCA) como análisis supervisados (PLS-DA) utilizando Metaboanalyst (Chong et al., 2018).

Los lípidos se definieron por tiempo de retención y masa exacta y se buscaron en la base de datos Lipids MAPS. Para terminar, las identidades se confirmaron por MS/MS usando el espectro de MS/MS del software LipidBlast y LipidMatch una herramienta basada en el programa R que permite la identificación de lípidos.

3.2.9 *Análisis de ácidos grasos*

Mediante la cromatografía de gases acoplada a un detector de ionización con llama (GC-FID) se detectaron, identificaron y cuantificaron hasta 26 ésteres metílicos de los AG diferentes. Estos 26 ésteres metílicos son representativos del LCR y del plasma. Ambos tipos de muestras analizados de cada sujeto del estudio (muestras conservadas a -80 °C desde su extracción).

3.2.9.1 Preparación de la muestra

A partir de la fracción lipídica extraída con cloroformo: metanol (2:1, v/v) se analizó el contenido de AG (Folch et al., 1957). 7 µl de plasma y 600 µl de LCR fueron las cantidades determinadas para el análisis de los AG de la siguiente manera. 500 µl de tampón de homogenización en presencia de BHT al 0,01% se añadió a la muestra con el objetivo de evitar la oxidación artefactual de los lípidos durante el procesamiento de la muestra. Se realizaron dos extracciones de cloroformo (contiene la parte lipídica) y a continuación se evaporaron las muestras bajo un flujo de nitrógeno en un evaporador (N-evap Modelo 113 Organomation Association, Berlin, MA, EUA). A continuación se procedió a la transesterificación de los AG mediante la incubación de los mismos en 2 ml de metanol-ácido clorhídrico al 5% a 75 °C durante 90 minutos en un baño seco (Termobloc Selecta, Barcelona, España). La preparación de metanol-ácido clorhídrico se realizó bajo la campana ya que la adición del 6,5% de cloruro de acetil sobre el metanol provoca una reacción exotérmica peligrosa que además genera ácido clorhídrico anhidro. Los ésteres metílicos de los AG resultantes (FAMES; *Fatty acid methyl esters*) se extrajeron de la siguiente manera: en primer lugar se añadió 1 ml de solución saturada de cloruro de sodio y a continuación 2 ml de n-pentano; se mezclaron con ayuda del vortex y por último se centrifugaron a 4400 rpm a 4°C durante 15 min. La fase del pentano se separó y evaporó bajo el flujo de nitrógeno. Por último, el residuo resultante (formado por FAMES) se resuspendió en 80 µl de disulfuro de carbono. Tras esto las

muestras se analizaron por cromatografía de gases con detección de ionización en llama (GC-FID).

Para el análisis de las muestras de LCR se hicieron pools debido al volumen de muestra necesario. Estos pools se especifican en la **tabla 10**.

Tabla 10. Distribución de las muestras de LCR en los diferentes pools de muestras.

Codificación	EM (leve, agresivo) vs. No-EM	Sexo	Edad (años)	Número muestras/pool
A	EM Agresivo	Mujer	<40	8
B	EM Agresivo	Mujer	>40	4
C	EM Agresivo	Hombre	All	7
N	EM Leve	Mujer	>40	6
Ñ	EM Leve	Mujer	>40	6
O	EM Leve	Mujer	>40	6
P	EM Leve	Mujer	<40	4
Q	EM Leve	Mujer	<40	4
R	EM Leve	Hombre	> 40	3
S	EM Leve	Hombre	<40	3
D	No-EM	Mujer	<40	7
E	No-EM	Mujer	>40	8
F	No-EM	Hombre	All	5
G	No-EM	Mujer	>40	5
H	No-EM	Mujer	>40	5
I	No-EM	Mujer	<40	6
J	No-EM	Hombre	>40	7
K	No-EM	Hombre	<40	5
L	No-EM	Mujer	All	4
M	No-EM	Hombre	All	5

3.2.9.2 Sistema cromatográfico

El cromatógrafo utilizado fue un cromatógrafo de gases modelo 7890A de Agilent Technologies (Barcelona, España) con un detector de ionización con llama (FID: del inglés, Flame Ionization Detector) y equipado con una columna capilar DB-WAX (30 m x 0,25 mm x 0,20 µm) y con un inyector automático modelo 7683B Series de Agilent Technologies (Barcelona, España).

3.2.9.3 Condiciones cromatográficas

El método que se seleccionó para la separación de los diferentes ésteres metílicos fue el de gradiente de temperatura. El puerto de inyección se mantuvo a 220 °C y el detector a 250°C. El programa de temperatura utilizado fue el siguiente: durante los 5 primeros minutos 145 °C; se incrementó 2 °C/min hasta los 245 °C, temperatura que se mantuvo durante 10 min. El equipo se mantuvo a 250 °C durante 10 min tras la carrera. El helio (99,9%), se utilizó como gas portador y la velocidad de flujo fue constante a 1,2 ml/min. En cada carrera cromatográfica se inyectaron 2 µl de muestra.

3.2.9.4 Cuantificación de los analitos

Se compararon los tiempos de retención de los diferentes ésteres metílicos para poder identificarlos además de los datos de los patrones de fragmentación de los estándares correspondientes. El estudio de los patrones se realizó previamente por GS/MS en nuestro laboratorio. Se utilizaron estándares de Larodan Fine Chemicals (Malmö, Sweden), que permitieron la identificación de los picos obtenidos en el cromatograma (Tabla 11). Los resultados, expresados de manera semicuantitativa, se han calculado mediante el % que supone el área de cada ácido graso en relación al total de la muestra. Finalmente, los resultados se expresan como moles en %.

Tabla 11. FAMES identificados en un cromatograma por CG-FID

Nombre químico	Nombre común	Nombre lipídico
Ácido tetradecanoico	Ácido mirístico	14:0
Ácido hexadecanoico	Ácido palmitico	16:0
Ácido (z)-9-hexadecenoic	Ácido palmitoleico	16:1n-7
Ácido octadecanoico	Ácido esteárico	18:0
Ácido (z)-9-octadecenoico	Ácido oleico-elaídico	18:1n-9 cis/trans
Ácido 9,12-octadecadienoico	Ácido linoleico	18:2n-6
Ácido 6,9,12-octadecatrienoico	Ácido α-linolénico	18:3n-3
Ácido 9,12,15-octadecatrienoic	Ácido γ-linolénico	18:3n-6
Ácido 6,9,12,15-octadecatetraenoico	Ácido estearidónico	18:4n-3
Ácido eicosanoico	Ácido araquídico	20:0
Ácido (z)-11-eicosenoico	Ácido gondoico	20:1n-9
Ácido 11,14-eicosadienoico	Ácido eicosadienoico	20:2n-6

Ácido 8,11,14-eicosatrienoico	Ácido eicosatrienoico	20:3n-6
Ácido 5,8,11,14-eicosatetraenoico	Ácido araquidónico	20:4n-6
Ácido 5,8,11,14,17-eicosapentaenoico	Ácido eicosapentaenoico	20:5n-3
Ácido docosanoico	Ácido behénico	22:0
Ácido (z)-13-docosenoico	Ácido erúcico	22:1n-9
Ácido 7,10,13,16-docosatetraenoico	Ácido adrénico	22:4n-6
Ácido 4,7,10,13,16-docosapentaenoico	Ácido osbond	22:5n-6
Ácido 7,10,13,16,19-docosapentaenoico	Ácido clupanodónico	22:5n-3
Ácido 4,7,10,13,16,19-docosahexaenoico	Ácido cervónico	22:6n-3
Ácido tetracosanoico	Ácido lignocérico	24:0
Ácido (z)-15-tetracosenoico	Ácido nervónico	24:1
Ácido 6,9,12,15,18-tetracosapentaenoico	Ácido tetracosapentaenoico	24:5n-3
Ácido 6,9,12,15,18,21-tetracosahexaenoico	Ácido nisínico	f24:6n-3

3.2.9.5 Índices calculados

A partir de la composición en ácidos grasos se han calculado los siguientes índices:

- Longitud media de la cadena (**LMC**)

$$\text{LMC} = [(\Sigma \% \text{mol total C14} \times 14) + (\Sigma \% \text{mol total C16} \times 16) + (\Sigma \% \text{mol total C18} \times 18) + (\Sigma \% \text{mol total C20} \times 20) + (\Sigma \% \text{mol total C22} \times 22) + (\Sigma \% \text{mol total C24} \times 24)]/100$$
- Ácidos grasos saturados (**AGS**)

$$\text{AGS} = \Sigma \% \text{mol ácidos grasos saturados}$$
- Ácidos grasos insaturados (**AGI**)

$$\text{AGI} = \Sigma \% \text{mol ácidos insaturados}$$
- Ácidos grasos monoinsaturados (**AGMI**)

$$\text{AGMI} = \Sigma \% \text{mol ácidos monoinsaturados}$$
- Ácidos grasos poliinsaturados (**AGPI**)

$$\text{AGPI} = \Sigma \% \text{mol ácidos poliinsaturados}$$
- Ácidos grasos poliinsaturados de la serie n-6 (**AGPI n-6**)

$$\text{AGPI n-6} = \Sigma \% \text{mol ácidos poliinsaturados de la serie n-6}$$
- Ácidos grasos poliinsaturados de la serie n-3 (**AGPI n-3**)

$$\text{AGPI n-3} = \Sigma \% \text{mol ácidos poliinsaturados de la serie n-3}$$
- Índice de dobles enlaces (**IDE**):

$$\text{IDE} = [(\sum \% \text{mol ácidos monoenoicos} \times 1) + (\sum \% \text{mol ácidos dienoicos} \times 2) + (\sum \% \text{mol ácidos trienoicos} \times 3) + (\sum \% \text{mol ácidos tetraenoicos} \times 4) + (\sum \% \text{mol ácidos pentaenoicos} \times 5) + (\sum \% \text{mol ácidos hexaenoicos} \times 6)]$$

Las susceptibilidades relativas de los diferentes ácidos grasos fueron determinadas empíricamente en 1954 por Holman en función del consumo de oxígeno. El ácido docosahexanoico (22:6 n-3) es extremadamente susceptible a la peroxidación lipídica debido a los 6 dobles enlaces que posee en su estructura. Este ácido graso es ocho veces más propenso a la peroxidación que el ácido linoleico (18:2 n-6) ya que este solamente posee dos dobles enlaces en su estructura. Así mismo, el ácido docosahexaenoico es 320 veces más susceptible a la peroxidación que el AGMI el ácido oleico (18:1 n-9).

El índice de peroxidabilidad (IP) se calcula a partir de la susceptibilidad de los diferentes AGs a la peroxidación lipídica y es diferente al índice de dobles enlaces (IDE), en el que se mide el número de dobles enlaces por cada 100 moléculas de ácido graso, es decir, mide la densidad de los dobles enlaces (Hulbert, 2007).

- Índice de peroxidabilidad lipídica (IP):

$$\text{IP} = [(\sum \% \text{mol ácidos monoenoicos} \times 0,025) + (\sum \% \text{mol ácidos dienoicos} \times 1) + (\sum \% \text{mol ácidos trienoicos} \times 2) + (\sum \% \text{mol ácidos tetraenoicos} \times 4) + (\sum \% \text{mol ácidos pentaenoicos} \times 6) + (\sum \% \text{mol ácidos hexaenoicos} \times 8)]$$

Las actividades desaturasa y elongasa se estiman mediante ratios de los productos respecto su sustrato (Guillou et al., 2010).

$\Delta 9(n-7) = 16:1 \text{ n-9}/16:0$; $\Delta 9(n-9) = 18:1 \text{ n-9}/18:0$; $\Delta 8(n-6) = 20:3 \text{ n-6}/20:2 \text{ n-6}$; $\Delta 5(n-6) = 20:4 \text{ n-6}/20:3 \text{ n-6}$; $\Delta 6(n-3) = 24:6 \text{ n-3}/24:5 \text{ n-3}$; $\Delta 6(n-3) = 18:4 \text{ n-3}/18:3 \text{ n-3}$; **Elovl3(n-9) = 20:1 n-9/18:1 n-9**; **Elovl6 = 18:0/16:0**; **Elovl1-3-7a = 20:0/18:0**; **Elovl1-3-7b = 22:0/20:0**; **Elovl1-3-7c = 24:0/22:0**; **Elovl 5(n-6) = 20:2 n-6/18:2 n-6**; **Elovl2-5 (n-6) = 22:4 n-6/20:4 n-6**; **Elovl2-5(n-3) = 22:5n-3/20:5n-3**, y **Elovl2(n-3) = 24:5 n-3/22:5 n-3**. Finalmente, la vía n-6 y la n-3 así como la vía de la β -oxidación peroxisomal se han estimado mediante los ratios 22:5 n-6/18:2 n-6; 22:6 n-3/18:3 n-3 y 22:6 n-3/24:6 n-3, respectivamente.

3.2.10 Determinación del daño oxidativo proteico

Se detectaron marcadores de daño oxidativo proteico mediante cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (GS/MS). Los marcadores detectados son

representativos de las tres modificaciones oxidativas principales en proteínas, los cuatro primeros son marcadores de EO mientras que el quinto es un marcador de estrés mitocondrial.

1. Derivadas de la modificación directa de proteínas: semialdehído glutámico (GSA) y semialdehído aminoacético (SAAA)
2. Derivadas de glicoxidación: N^ε-carboxietil-lisina (CEL)
3. Derivadas de lipoxidación: N^ε-malondialdehído-lisina (MDAL)
4. Derivadas de glico- y lipoxidación: N^ε- carboximetil-lisina (CML) i S-(carboximetil)-cisteína (CMC)
5. Derivadas de oxidación a fumarato, oxidación mitocondrial: S-(2-succinil)-L-cisteína (2-SC)

A continuación se detallan los procedimientos utilizados que se siguieron para su identificación.

3.2.10.1 Preparación de la muestra

El daño oxidativo proteico se analizó a partir de la fracción metanol: tampón de homogenización, obtenida previamente de las extracciones cloroformo: metanol (2:1, v/v) (Folch et al., 1957), previamente descritas en el apartado 4.3.1. Las proteínas se precipitaron añadiendo ácido tricloroacético al 10% (concentración final) y se centrifugó a 4400 rpm a 4 °C durante 15 min. Para continuar, las proteínas se redujeron incubándolas toda la noche con una solución reductora (1 ml de borhidruro sódico 500 mM disuelto en un tampón de ácido bórico 0,2 M a pH 9,2). Una gota de hexanol se añadió a la solución reductora para que actuara como antiespumante. Al día siguiente, las proteínas reducidas se precipitaron añadiendo 1 ml de ácido tricloroacético al 10% de concentración final y se centrifugaron de nuevo. Este paso se repitió más de una vez en caso de que apareciera una formación de cristales.

Estándares internos fueron añadidos a las muestras reducidas. Estos estándares internos deuterados marcados isotópicamente fueron: [2H₈]Lisina (12 nmols), [2H₅]AHAV (72 pmols), [2H₄]AHAC (17,5 pmols), [2H₄]CEL (144,1 pmols), [2H₈]MDA-Lisina (20,6 pmols), [2H₂]CML (162,2 pmols), [13H₂]CMC (112,4 pmols) y 2-[2H₂]SC (71,06 pmols). Tras esto se

añadió 1 ml de ácido clorhídrico 6 N y se incubaron a 155 °C durante 30 min en un baño seco (Termobloc Selecta, Barcelona, España), hidrolizando así los enlaces peptídicos. Tras la hidrolización se evaporaron las muestras al vacío (SPD121P Speed Vac Savant, Barcelona, España). A partir del hidrolizado de proteínas se obtuvieron los derivados N₂O-trifluoroacetil de los ésteres metílicos (TFAME; *trifluoroacetyl methyl ester*) de la siguiente manera: en primer lugar se incubó el hidrolizado con 1 ml de la solución metanol-ácido clorhídrico al 5% a 65 °C durante 30 minutos y a continuación se evaporó bajo un flujo de nitrógeno (Nevap Modelo 113 Organomation Association, Berlin, MA, EUA) para obtener los ésteres metílicos. La solución de metanol-ácido clorhídrico se preparó mediante la adición del 6,5% de cloruro de acetil sobre el metanol (para 20 ml de solución: 1,3 ml de cloruro de acetil y 18,7 ml de metanol), con el objetivo de producir ácido clorhídrico anhidro. En segundo lugar se incubaron los ésteres metílicos con 1 ml de ácido trifluoroacético anhidro durante 1h y se evaporó bajo flujo de nitrógeno (Nevap Modelo 113 Organomation Association, Berlin, MA, EUA) y así se obtuvieron los derivados N₂O-trifluoroacetil metil ésteres de los diferentes aminoácidos del hidrolizado. Finalmente, las muestras se resuspendieron en 80 µl de diclorometano como vehículo para su análisis por cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (GC/MS).

3.2.10.2 Sistema cromatográfico

Se mantuvo el puerto de inyección a 275 °C. El programa de temperatura que se utilizó fue el siguiente: 5 min a 110 °C, aumento de 2 °C/min hasta los 150 °C, aumento de 5 °C/min hasta los 240 °C y un último incremento de 25 °C/min hasta los 300 °C, temperatura a la que se mantuvo durante 5 min. 2 µl de muestra se inyectaron en cada carrera cromatográfica.

3.2.10.3 Cuantificación de los analitos

Para realizar la cuantificación se utilizaron curvas patrón realizadas a partir de una mezcla de estándares internos deuterados y no deuterados: [2H₈]Lisina; AHAV; [2H₅]AHAV; AHAC; [2H₄]AHAC; CEL; [2H₄]CEL; MDA-Lisina; [2H₈]MDA-Lisina; CML; [2H₂]CML; CMC; [13H₂]CMC; 2-SC y 2-[2H₂]SC. Estos estándares internos se adquirieron en PolyPeptide Group (Estrasburgo, Francia), a excepción de los estándares de Lisina,

[²H₈]Lisina, CMC, AHAV, [²H₅]AHAV, AHAC y [²H₄]AHAC que se compraron en Sigma (Madrid, España).

Los iones específicos seleccionados previamente (SIM; *Selected ion monitoring*) se monitorizaron para realizar el análisis. Así pues, por SIM-GS/MS se detectaron los analitos cuyas características químicas se presentan en la tabla 12. Las concentraciones finales de SAG, SAAA, CML, CEL, MDAL, CMC o SC se expresaron en μmoles/ mol de lisina.

Tabla 12. Iones (m/z) de los analitos medidos mediante GC/MS

Estándar	Nomenclatura química del compuesto	Ión (m/z)
Lisina	Lisina	180
[² H ₈]Lisina	d8-3,3,4,4,5,5,6,6-L-lisina	187
AHAV*	Ácido 5-hidroxi-2-aminovalérico	280
[² H ₅]AHAV*	Ácido 5-hidroxi-2-amino-d5-2,3,3,4,4-valérico	285
AHAC*	Ácido 6-hidroxi-2-aminocaproico	294
[² H ₄]AHAC*	Ácido 6-hidroxi-2-amino-d4-4,4,5,5-caproico	298
CEL	NE- carboxietil-lisina	379
[² H ₄]CEL	NE- carboxietil-d4-4,4,5,5--D,L-lisina	383
MDA-Lisina	NE- malondialdehido-lisina	474
[² H ₈]MDA-Lisina	NE- malondialdehido-lisina-d8-3,3,4,4,5,5,6,6-L-lisina	482
CML	NE- carboximetil- lisina	392
[² H ₂]CML	NE- carboximetil-d4-4,4,5,5-D,L-lisina	394
CMC	S-caboximetil-cisteina	271
[¹³ C ₂]CMC	S- ¹³ C ₂ -caboximetil-L-cisteina	273
2-SC	S-(2-succinil)-L-cisteina	284
2-[² H ₂]SC	S-(2 succinil)-L-2H ₂ -cisteina	286

*Los productos de oxidación son las moléculas semialdehido glutámico (SAG) y el semialdehido amino-adipídico (SAAA), pero los analitos que se detectan en el cromatógrafo son sus derivados después de la reducción, AHAV y AHAC, respectivamente.

3.2.10.4 Control de calidad interno

Con el objetivo de garantizar el correcto procesamiento de las muestras además de agilizar el proceso de cuantificación de los analitos se necesitó un control de calidad interno. Por ello se realizó el análisis a partir de una muestra que se denominó *GOLD*,

con la que se realizaron estudios previos para conocer los valores de los marcadores oxidativos. Este *GOLD* se preparó y procesó con el conjunto de muestras que se analizaron para ser utilizada como control interno. A partir de los valores de los marcadores oxidativos en las muestras *GOLD*, obtenidos en cada tanda de muestras, juntamente con los valores de las rectas patrones estándares, se obtuvo la cuantificación final de los marcadores oxidativos de cada muestra.

3.2.10.5 Anticuerpos contra lipoproteínas de baja densidad oxidadas

La presencia de Ac contra especies lipídicas oxidadas nos indica la presencia de especies lipídicas oxidadas tanto en suero como en LCR. Este análisis se realizó mediante el kit comercial *OLAB IgG anti-oxidised low density lipoprotein* (BI-20032, Biomedica, Viena, Austria) con algunas adaptaciones.

Brevemente y como indican las instrucciones del fabricante se hizo una pre-dilución de las muestras 1:5 que posteriormente volvieron a diluirse para la realización del ensayo 1:11. En primer lugar se añadió el buffer del ensayo (ya preparado en el kit) en los pocillos no recubiertos por anticuerpo. A continuación se añadió la muestra y estándar a estos pocillos y se mezcló bien. Este proceso se completó en menos de 15 min y a continuación se incubó la placa durante 1,5h a 37 °C. A continuación se aspiró y se lavó 4 veces cada pocillo con buffer de lavado (proporcionado por el kit).

Tras aspirar se añadieron 100 µl de conjugado a cada pocillo (a excepción del blanco) y se incubaron las muestras durante 30 min a TA.

Se procedió al lavado de los pocillos en las mismas condiciones que la vez anterior, se añadió el sustrato y se incubó la placa en oscuridad durante 15 minutos a TA. Finalmente se añadió a cada pocillo la solución de parada y se procedió a la lectura de la absorbancia a 450 nm en el espectofotómetro (Multiskan Ascent 354, Thermo Labsystem).

3.3 Análisis estadístico

Con el objetivo de extraer la máxima información posible de cada análisis y por tanto, para conseguir los objetivos propuestos se han realizado diferentes pruebas estadísticas que se especifican a continuación.

Para el análisis estadístico y la realización de gráficos se han utilizado los programas SPSS (*IBM SPSS Statistics 24*), el programa GraphPad Prism (versión 6) para el capítulo 1 de los resultados y la plataforma gratuita online MetaboAnalyst (<https://www.metaboanalyst.ca/docs/About.xhtml>) para el estudio 2.

En primer lugar se ha comprobado la normalidad de las variables analizadas mediante el test Kolmogorov-Smirnov o Shapiro Wilk en función del tamaño de la muestra para cada test. A continuación, si la variable seguía una distribución normal se aplicó la prueba T para muestras independientes y si no lo hacía el test no paramétrico H de Kruskal-Wallis.

Para los modelos de regresión lineal se utilizó exclusivamente el programa SPSS y para realizar las correlaciones el programa GraphPad Prism.

Es necesario tener en cuenta que en todos los análisis realizados el nivel mínimo de significación estadística ha sido 0.05. El grado de significación obtenido se ha representado en todas las gráficas como: * cuando $p < 0.05$, ** cuando $p < 0.01$ o *** cuando $p < 0.001$.

RESULTADOS

4. RESULTADOS

A) Estudio 1

Para el **estudio 1** se ha utilizado un total de un total de 75 controles sanos y 159 pacientes con EM. El % de mujeres que se seleccionaron para el estudio es un % representativo de la realidad de la enfermedad y por tanto en el grupo control cerca del 70% de los sujetos son también mujeres. Además tampoco existen diferencias en la edad entre los pacientes y los controles. Tanto la edad como el género son variables importantes para la enfermedad con lo que es importante que no presenten diferencias entre los grupos para no introducir sesgos en la muestra. Por último, todos los pacientes del estudio presentan un EDSS ≤ 3 , es decir, un EDSS no muy alto en el que la discapacidad todavía no tiene grandes implicaciones en la vida de estos pacientes. Los resultados de este estudio se presentan en los apartados 4.1 a 4.4.

4.1 Concentración de metabolitos de la vitamina D en plasma

El déficit de vitamina D se ha asociado con un mayor riesgo de sufrir EM. Además, está ampliamente demostrado que los pacientes con EM muestran déficits de esta vitamina en un porcentaje mayor que el resto de la población (Sintzel, Rametta, & Reder, 2018). Basándonos en esta característica ampliamente contrastada y reconocida por la comunidad científica, el primer objetivo fue corroborar que la cohorte de pacientes del estudio presenta también alteraciones de esta vitamina respecto al grupo control. Por primera vez, hasta donde llega nuestro conocimiento, se analizaron 6 metabolitos diferentes de esta vitamina. Los estudios realizados hasta el momento solamente analizan la vitamina 25D3, que es la forma de la vitamina permite analizar los depósitos de la misma en nuestro organismo. En este estudio se incluyó el análisis de 5 metabolitos más que son las formas D2 y D3 que proceden de la dieta, la forma 24,25D3 y 1,25D3 que son productos del metabolismo de la vitamina 25D3 y la vitamina 25D2 que procede del metabolismo de la vitamina D2.

Como se muestra en la **tabla 13**, del análisis de los 6 metabolitos diferentes solo se encontraron diferencias entre pacientes y controles en el caso de la vitamina 25D3 lo

que indica que existen diferencias en los depósitos de esta vitamina pero en las formas procedentes de la dieta ni en el metabolismo de las mismas.

Tabla 13. Concentración de metabolitos de la vitamina D analizados en los pacientes y controles

Metabolito	Control	EM	p
Vitamina D3 (ng/ml)	0.233 ± 0.033	0.225 ± 0.033	0.864
Vitamina 25D3 (ng/ml)	17.260 ± 0.777	15.143 ± 0.629	0.036
Vitamina 24,25D3 (ng/ml)	1.685 ± 0.141	1.438 ± 0.107	0.166
Vitamina 1,25D3 (ng/ml)	0.145 ± 0.012	0.127 ± 0.009	0.244
Vitamina D2 (ng/ml)	0.041 ± 0.003	0.104 ± 0.061	0.382
Vitamina 25D2 (ng/ml)	0.272 ± 0.015	0.284 ± 0.036	0.759

Algunos de los pacientes y de los sujetos del grupo control se encuentran suplementados con vitamina D dado que un déficit de la misma se ha asociado con diferentes enfermedades; entre ellas la EM. Cuando se realizó el mismo análisis, como se muestra en la **figura 18**, sin tener en cuenta a estos sujetos, se obtuvieron resultados similares a los mostrados en la tabla 13, es decir, solo aparecieron diferencias significativas en la vitamina 25D3 ($p=0.02$).

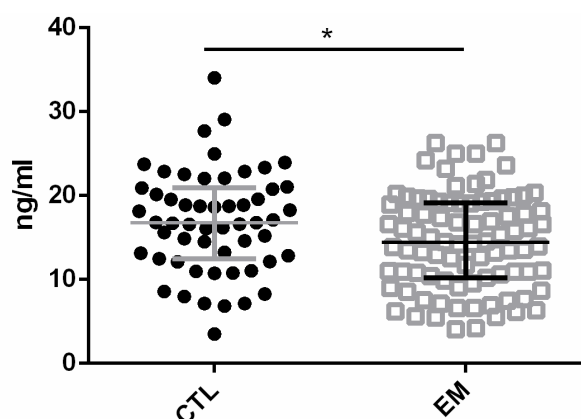


Figura 18. Concentración de la vitamina 25D3 en sujetos no suplementados. Pacientes con EM (n=88) y grupo control (n=55). Los valores se han representado individualmente y se muestra la mediana ± el rango intercuartil. T-test para muestras independientes: $p=0.02$. CTL: control. EM: esclerosis múltiple

Cuando se comparó dentro de los pacientes aquellos que se encuentran suplementados respecto a los que no toman suplemento se observó que dos metabolitos presentan diferencias estadísticamente significativas: vitamina 25D3 y vitamina 24,25D3 (**figura 19**). Estas diferencias no se mantuvieron al realizar el mismo análisis en el grupo control,

es decir, no se encontraron diferencias estadísticamente significativas en ninguno de estos dos metabolitos pero sí en la forma 1,25D3 entre los controles que toman suplemento de la vitamina respecto a los que no lo hacen (para una información más detallada consultar **anexo 1**).

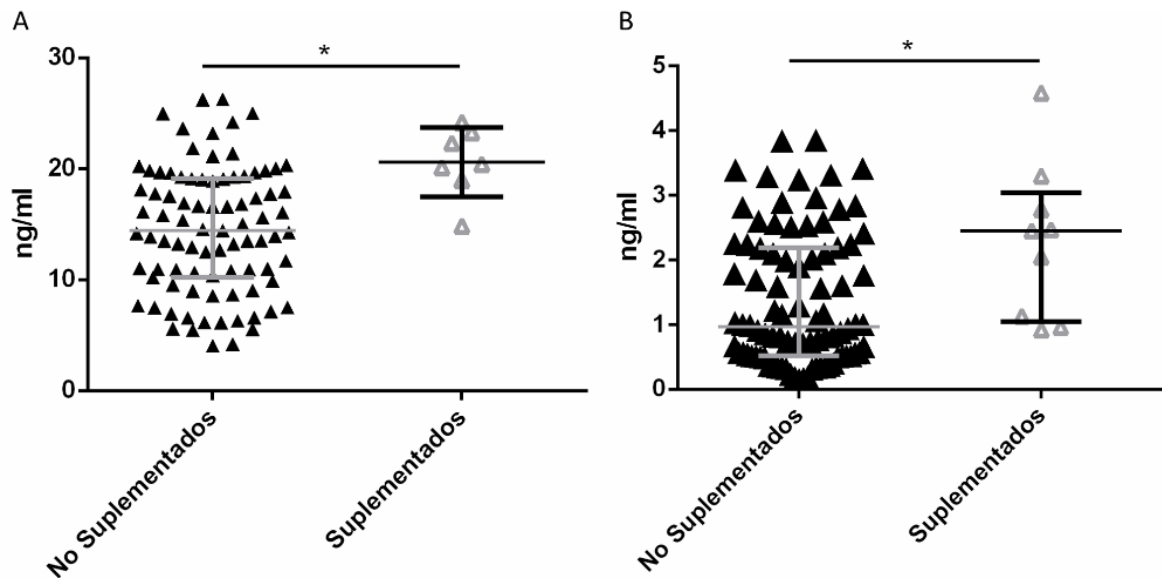


Figura 19. Diferencias en la concentración de vitamina 25D3 y vitamina 24,25D3. A) Diferencias en la vitamina 25D3 entre pacientes no suplementados (n= 88) y pacientes suplementados (n=7). Test Mann Whitney ($p= 0.028$). **B)** Diferencias en la concentración de la Vitamina 24,25D3 entre pacientes no suplementados (n=88) y pacientes suplementados (n=9). Test Mann Whitney ($p= 0.0144$). Los valores se han representado individualmente y se muestra la mediana \pm el rango intercuartil.

En base a estos resultados se puede inferir que los pacientes incluidos en este estudio cumplen criterios moleculares, en cuanto a la concentración de vitamina D, típicos de los pacientes con EM.

4.2 Capacidad antioxidante en plasma

Las alteraciones del estado redox de los sujetos con EM ha sido objeto de estudio en numerosas ocasiones. En este estudio se analizó la capacidad antioxidante por dos métodos validados que están basados en principios diferentes como se ha explicado en el apartado 3.2.3 de los materiales y métodos. La **figura 20** muestra que los pacientes con EM tienen una menor capacidad antioxidante analizada tanto por el método FRAP como por el método ABTS.

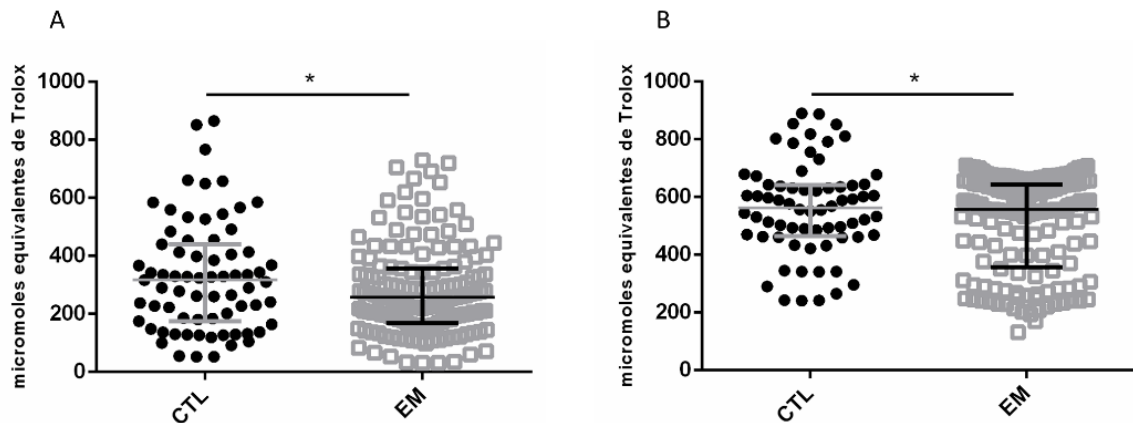


Figura 20. Análisis de la capacidad antioxidante. **A)** Capacidad antioxidante analizada por FRAP de los pacientes con EM (n= 149) y controles (n=71). T-test para muestras independientes ($p= 0.048$). **B)** Capacidad antioxidante analizada por ABTS de los pacientes con EM (n= 151) y controles (n= 69). T-test para muestras independientes ($p= 0.022$). Los resultados se expresan de forma individual además de la mediana más el rango intercuartil. CTL: control, EM: esclerosis múltiple

El AU puede comportarse como un antioxidante debido a su estructura molecular. Debido a su concentración en el plasma puede introducir sesgos en el análisis de la capacidad antioxidante de los sujetos del estudio (Benzie & Strain, 1996). Es por este motivo que se decidió analizar la concentración de esta molécula. Como se muestra en la **figura 21**, los pacientes con EM tienen una menor concentración de AU en el plasma.

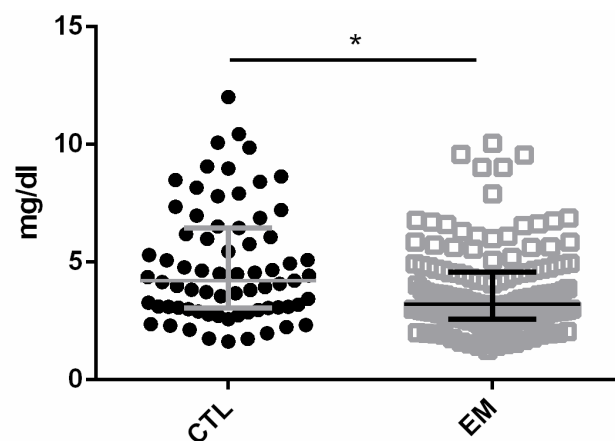


Figura 21. Concentración de AU en plasma. Controles (n= 75) y pacientes con EM (n= 151). T-test para muestras independientes ($p < 0.0001$). Los resultados se presentan individualizados y además se representa la mediana más el rango intercuartil. CTL: control. EM: esclerosis múltiple

Debido a las diferencias encontradas se decidió comprobar si existe una correlación entre la concentración del AU y los diferentes métodos que se utilizaron para analizar la capacidad antioxidante del plasma de los sujetos del estudio. Como se muestra en la **figura 22** no existe correlación entre el ABTS y el AU pero sí entre el FRAP y el AU.

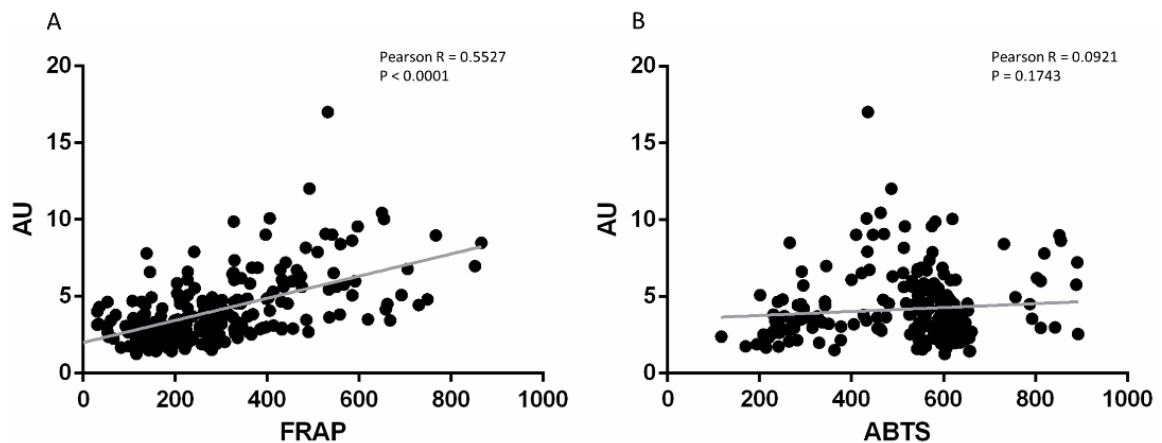


Figura 22. Correlación entre capacidad antioxidante y concentración de AU en plasma. **A)** correlación entre FRAP y AU ($p < 0.0001$) $R^2 = 0.305$. **B)** correlación entre ABTS y AU ($p = 0.174$) $R^2 = 0.008$

Además, se realizó un modelo de regresión lineal, como se muestra en la **tabla 14**, en cual se obtuvo que el AU explica a la perfección la capacidad antioxidante analizada por el método FRAP. Cuando se tiene en cuenta la cantidad de AU de cada sujeto para analizar las diferencias que existen en la capacidad antioxidante por el método FRAP, las diferencias obtenidas previamente se pierden.

Tabla 14. Modelo de regresión lineal para determinar si las diferencias en el FRAP son debidas al AU. Como muestra el modelo la adición del AU es significativa para el análisis de las diferencias entre pacientes y controles y al añadir esta variable al modelo la significación se pierde entre los grupos.

Modelo	Beta	Error estándar	Significación
Constante	130.4	44.0	0.003
EM vs. CTL	-3.9	20.9	0.854
Ácido Úrico	41.7	4.4	<0.001

4.3 Lactato en plasma

Defectos en la capacidad antioxidante pueden ser de gran relevancia en el estado redox de un sujeto. Una disminución de esta capacidad podría provocar un mayor daño por parte de los RL. Estos RL se producen principalmente en la mitocondria con lo que podrían dañarla. El daño mitocondrial se ha asociado con un incremento de lactato por lo que se decidió analizar la concentración del mismo en el plasma de los pacientes con EM. El análisis de la concentración de lactato en plasma reveló que los pacientes con EM tienen una mayor concentración del mismo como se muestra en la **figura 23**.

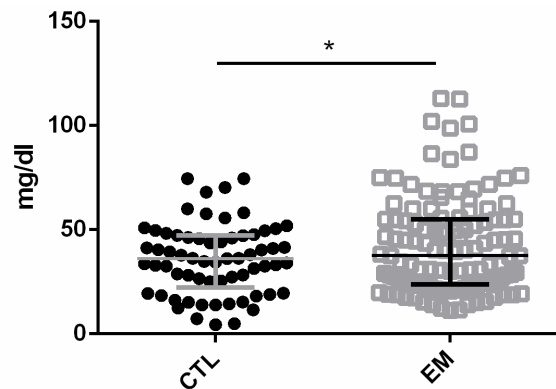


Figura 23. Concentración de lactato en plasma. Controles n= 65, pacientes = 115. T-test para muestras independientes ($p= 0.047$). Los resultados se presentan de manera individualizada y se añade la mediana más el rango intercuartil. CTL= Control EM= esclerosis múltiple

4.4 Estudio del estado redox de las células mononucleares de sangre periférica de los pacientes con esclerosis múltiple

4.4.1 Respiración celular de las PBMCs

Defectos en la capacidad antioxidante están estrechamente relacionados con un aumento del EO. Por otro lado, el lactato puede verse incrementado en el plasma por defectos mitocondriales de células sanguíneas. Las PBMCs, son las células sanguíneas más implicadas en la fisiopatología de la enfermedad. Por este motivo, una vez analizado el estado redox del plasma se analizó el estado redox de las PBMCs.

La respirometría de alta resolución permite medir el consumo de oxígeno de células intactas como las PBMCs. En consecuencia, se utilizó esta técnica para analizar la función mitocondrial de las PBMCs. En la **figura 24** se muestra una representación del protocolo utilizado para el análisis de las PBMCs. En primer lugar, se analizó la respiración basal con el objetivo de estimar la demanda de oxígeno de la célula. A continuación se añadió la oligomicina, un inhibidor del complejo V o ATP sintasa que provoca una disminución del consumo de oxígeno de las células. Este estado se conoce como fuga, es decir, define el consumo de oxígeno desacoplado de la fosforilación oxidativa. Así pues, la adición de la oligomicina da dos informaciones: por un lado el consumo de oxígeno que se destina a producción de ATP (teórico) y por otro lado el consumo de oxígeno debido a la fuga de protones. Tras la oligomicina se añadió el FCCP, un agente desacoplante; el FCCP que permite definir la respiración teórica máxima. La diferencia entre la respiración basal y la respiración teórica máxima es lo que se conoce como capacidad de reserva que indica la

habilidad que una célula tiene de responder ante condiciones de estrés y/o de incremento de la demanda energética. Finalmente la antimicina, un inhibidor del complejo III de la CTE, provoca que el consumo de oxígeno caiga hasta registrar los niveles de lo que se conoce como ROX (consumo de oxígeno residual) que se refiere al consumo de oxígeno que no proviene de la respiración mitocondrial y que por tanto puede indicar procesos de oxidación y otros procesos donde se consume oxígeno. Este valor se utiliza para relativizar todos los demás.

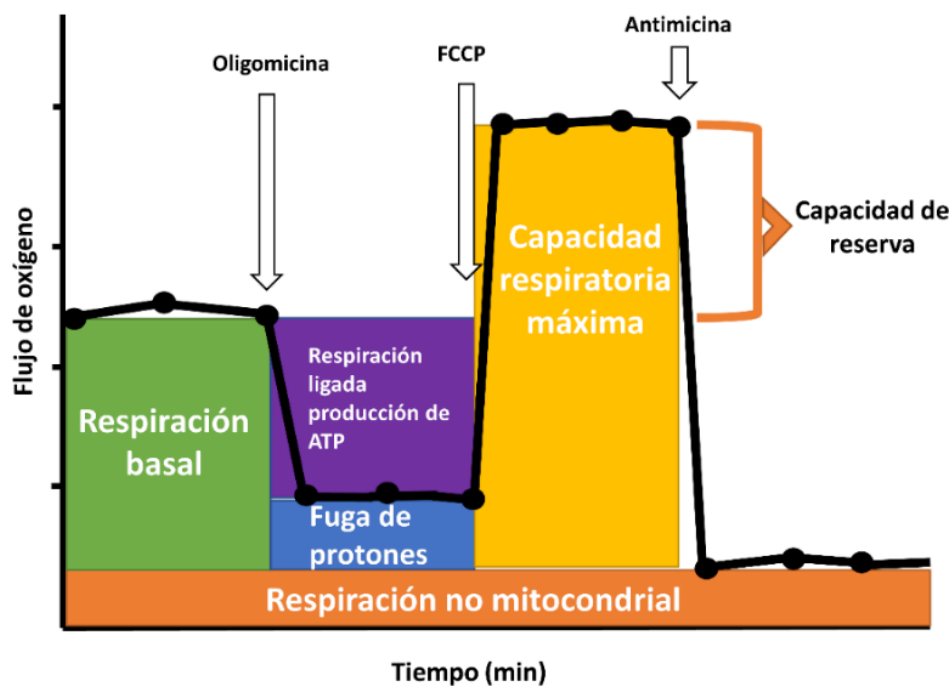


Figura 24. Representación de un experimento de respiración de las PBMCs

El análisis de las PBMCs de los pacientes comparadas con el análisis de las PBMCs de los controles se refleja en la **figura 25**. En concreto, como se muestra en la **figura 25 A**, en todas las mediciones realizadas mediante la respirometría los pacientes con EM muestran un mayor consumo de oxígeno, es decir, el consumo de oxígeno por parte de los pacientes con EM es superior durante la respiración basal, tras la adición de oligomicina, cuando se analiza la capacidad teórica máxima y tras la adición de antimicina que sirve para analizar la respiración no mitocondrial. En la **figura 25 B** se muestra que todas las diferencias que aparecen en la figura 25 A son estadísticamente significativas. Así pues, de este análisis se puede concluir que los requerimientos de

oxígeno son superiores en las PBMCs de los pacientes con EM independientemente del estado en el que se analice.

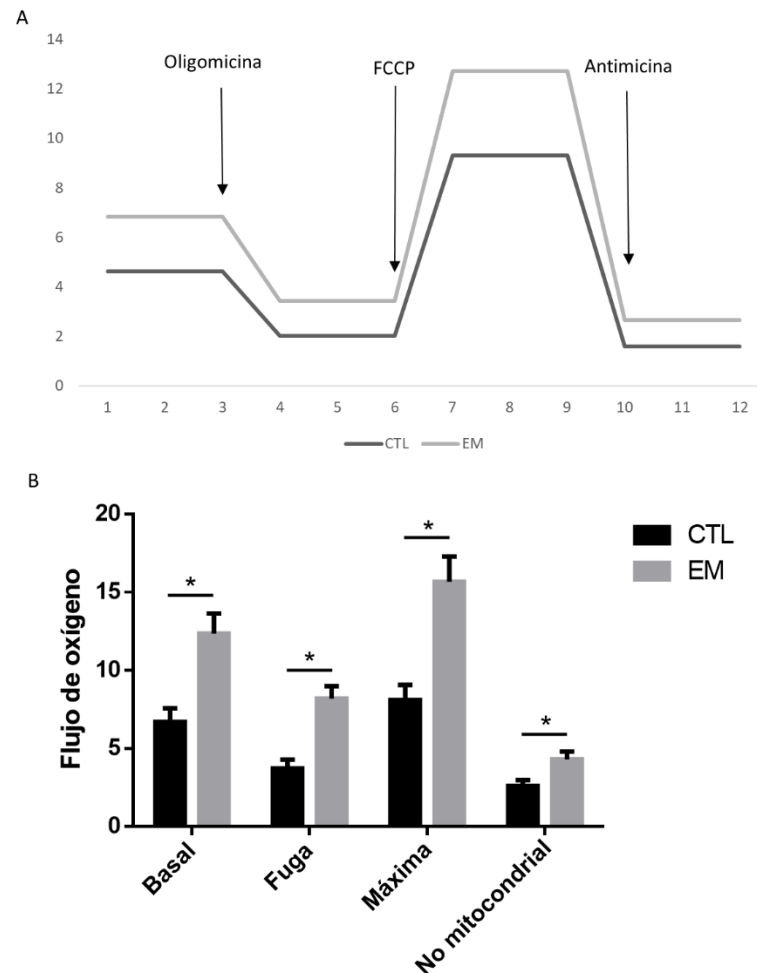


Figura 25. Resultados del análisis por respirometría de las PBMCs. A) Media del consumo de oxígeno de las PBMCs por grupos en las diferentes condiciones. En gris se representa el consumo de los pacientes y en negro el de los CTL. **B)** Diferencias obtenidas entre pacientes y controles en las mismas condiciones que en la figura A. Controles n= 26-31. Pacientes = 59-66. T-test para muestras independientes (Basal: p= 0.005, Fuga: p= 0.001, Máxima: p= 0.002, No mitocondrial: p= 0.027). Los datos se representan como media \pm SEM. CTL: Control, EM: esclerosis múltiple.

4.4.2 Número de mitocondrias de las PBMCs

Con el objetivo de evitar al máximo los posibles sesgos entre las muestras analizadas, la respirometría se realizó con un mismo número de células entre pacientes y controles; un total de 5 millones de células. Por este motivo, se hipotetizó que cambios en el consumo basal del oxígeno entre los dos grupos de estudio podrían ser debidos a cambios en el número de mitocondrias.

El análisis del número de mitocondrias se realizó mediante citometría de flujo. Como se refleja en la **figura 26** y contrariamente a lo que se esperaba teniendo en cuenta los resultados previos, los pacientes con EM presentan un menor número de mitocondrias que el grupo control.

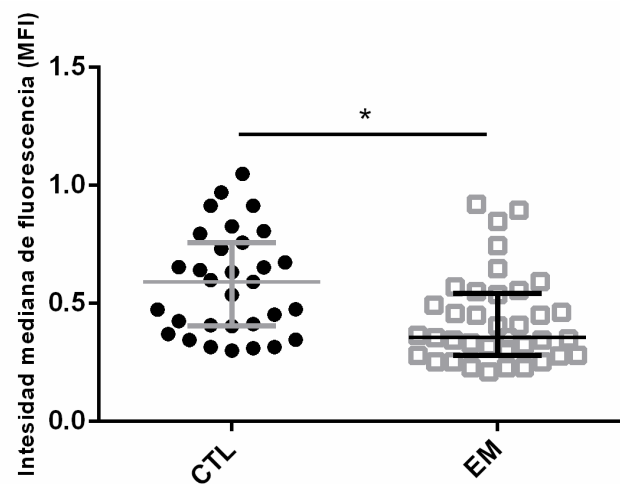


Figura 26. Número de mitocondrias analizado por citometría de flujo. Controles n= 32. Pacientes n= 37. T-test para muestras independientes (p=0,009). Los resultados se expresan de manera individualizada y se representa también la mediana y el rango intercuartil. CTL: Control EM: Esclerosis Múltiple

4.4.3 Concentración de ATP en las PBMCs

La eficiencia del acoplamiento de la CTE se define por la proporción de oxígeno consumido que es destinado a la síntesis de ATP. Así pues, un incremento de la respiración o consumo de oxígeno basal puede traducirse también en una mayor producción de ATP por lo que se decidió analizar la concentración del mismo en las PBMCs.

La respirometría permitió calcular la cantidad de oxígeno destinada a la producción de ATP de los dos grupos del estudio. Este es un cálculo que procede de la resta de la respiración basal o de rutina (R) menos el consumo de oxígeno tras la inhibición del complejo V (L). Como se muestra en la **figura 27 A** los pacientes destinan una mayor cantidad de oxígeno a la producción de ATP; en cambio, como se muestra en la **figura 27 B**, la habilidad teórica para la síntesis de ATP es menor en los pacientes con EM. Esta capacidad se calcula a través del índice de respirometría que divide la capacidad respiratoria máxima (teórica) entre el estado de fuga o *Leak* (E/L). Además, cuando

analizamos la concentración de ATP de estas células vemos que los pacientes muestran una menor concentración de ATP como se muestra en la **figura 27 C**.

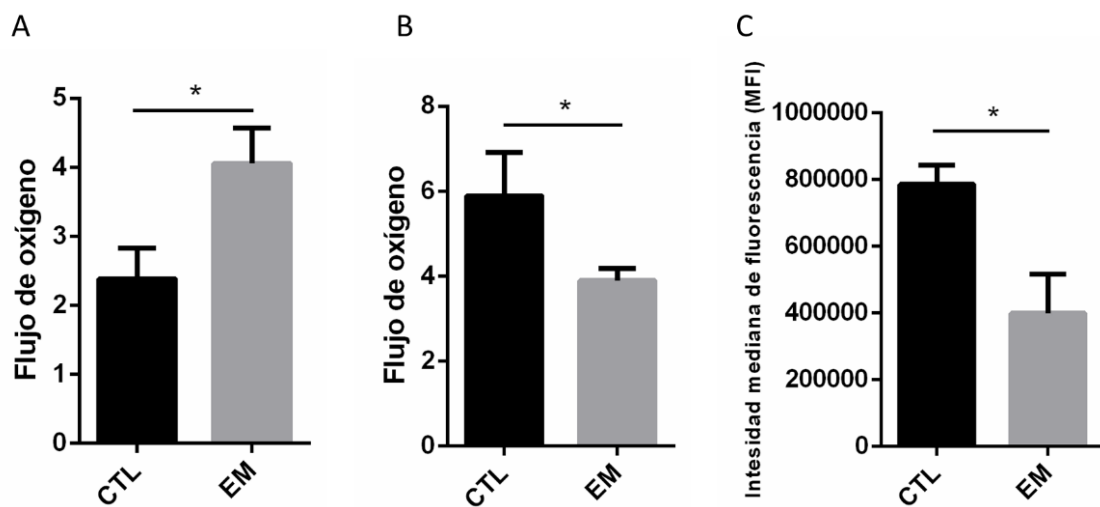


Figura 27. Producción de ATP de las PBMCs. A) Consumo de oxígeno asociado a la producción de ATP (R-L). Controles n= 26-31 Pacientes = 56-66. T-test para muestras independientes ($p= 0.015$) B) Habilidad teórica de la mitocondrial para la síntesis de ATP y la oxidación de los sustratos respiratorios (E/L). T-test para muestras independientes ($p = 0.025$). Controles n= 26-31 Pacientes = 56-66 C) concentración de ATP en las PBMCs. Controles n= 4. Pacientes n= 4. T-test para muestras independientes ($p = 0.02$). Los resultados se presentan como media \pm SEM. CTL: Control. EM: Esclerosis Múltiple

El consumo de oxígeno en ausencia de producción de ATP es debido principalmente a la fuga de protones. Así pues, como se ha mostrado previamente, a pesar de que los pacientes consumen más oxígeno de forma rutinaria éste no se dedica de manera tan eficiente a la producción de ATP.

4.4.4 Potencial de membrana mitocondrial de las PBMCs

Un mayor consumo de oxígeno que no se traduce en una mayor producción de ATP puede ser consecuencia de alteraciones en el potencial de membrana mitocondrial. Sin embargo, en este estudio no se puede afirmar que una menor producción de ATP sea consecuencia de alteraciones en el potencial de membrana mitocondrial ya que las diferencias no son estadísticamente significativas (**figura 28**).

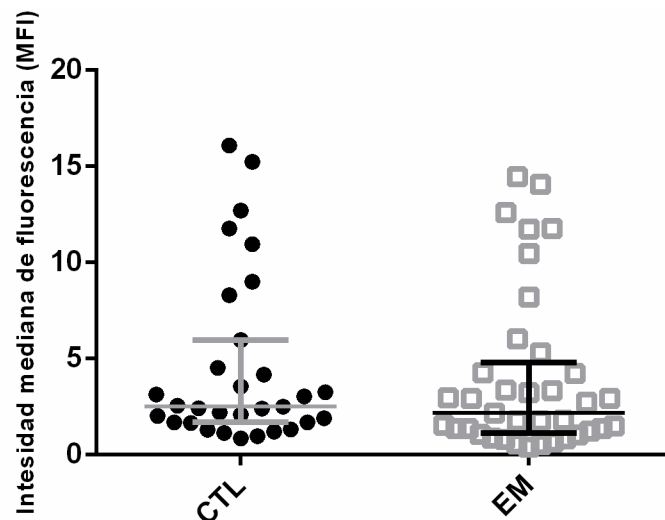


Figura 28. Potencial de membrana mitocondrial en las PBMCs de pacientes y controles. Controles n= 32. Pacientes n= 36. T-test para muestras independientes ($p=0.08$). Los resultados se presentan de manera individual más la mediana y el rango intercuartil. CTL: Control. EM: Esclerosis Múltiple

4.4.5 Producción de superóxido

Se estima que entre un 0.1-2% del consumo de oxígeno mitocondrial se transforma en superóxido, el primer RL que se forma en la mitocondria y el más reactivo. Por este motivo, un mayor consumo de oxígeno está directamente relacionado con una mayor producción de superóxido. La mitocondria es un lugar importante de producción de ROS; en concreto existen 7 lugares de producción de superóxido y/o de peróxido de hidrógeno (Larosa & Remacle, 2018) relacionados con sustratos del metabolismo y transporte de electrones por lo que decidimos analizar la producción de esta molécula altamente reactiva por parte de las PBMCs.

Se analizaron las diferencias entre las células CD45+ y también entre los LB (CD45+, CD19+) y los LT (CD45+, CD3+). Se decidió diferenciar los LT de los LB debido a que se ha demostrado que la producción de ROS a niveles no muy elevados provoca activación de los LT (Devadas et al., 2002). Además, estos linfocitos son parcialmente dependientes de una producción de superóxido para su activación (Yang et al., 2015). Cuando se analizaron por separado, las células CD45+, los LB y LT, como se muestra en la **figura 29**, se comprobó que existe una mayor producción de superóxido por parte de las células CD45+ y, en concreto, por los LT de los pacientes con EM.

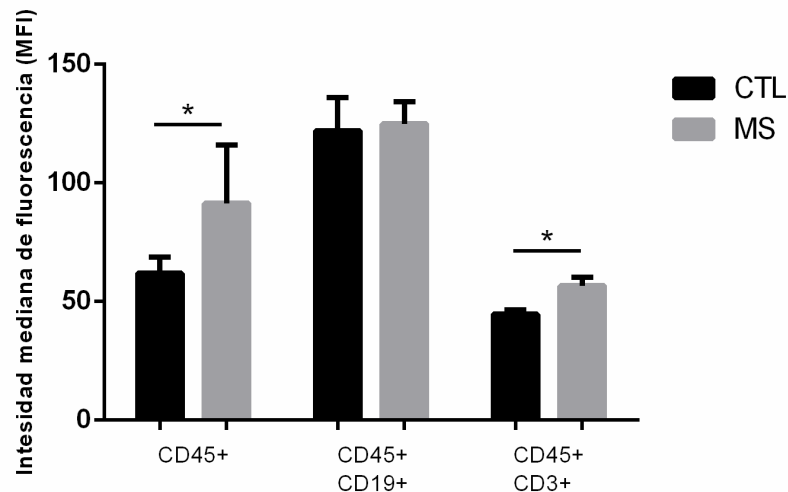


Figura 29. Producción de superóxido analizada por citometría de flujo. Controles n= 41. Pacientes n= 105. T-test para muestras independientes (CD45+ p= 0.009; CD45+ CD19+ p= 0.86; CD45+ CD3+ p= 0.035). Los resultados se presentan como media \pm SEM. CTL: Controles. EM: Esclerosis múltiple

Por último, se analizó si diferencias en la producción de superóxido podían ser debidas a diferencias en el número de células entre los pacientes y controles pero, como se muestra en la **figura 30**, ni las PBMCs (CD45+) ni los LB (CD45+ CD19+) ni los LT (CD45+ CD3+) presentan diferencias en el % de células respecto al total de las analizadas.

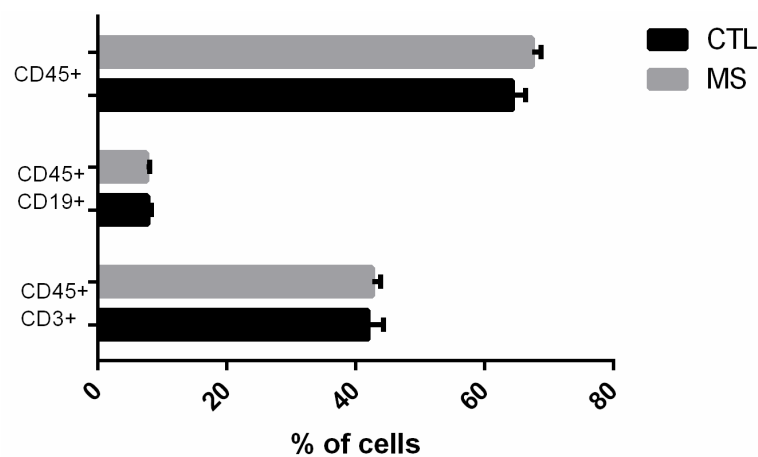


Figura 30. Porcentaje de células analizadas por citometría de flujo. Controles n= 41. Pacientes n= 105. Los resultados se presentan como media \pm SEM. No se encontraron diferencias significativas en ninguna de las poblaciones.

Por otro lado, una mayor producción de superóxido está estrechamente relacionada con una sobreactivación de la CTE, hecho que se ha demostrado que está ocurriendo en los pacientes con EM ya que tienen un mayor consumo de oxígeno. Además, defectos mitocondriales también causan una mayor producción de ROS y en concreto el complejo

I y III de la CTE son responsables de una gran parte de la producción de superóxido que tiene lugar en las mitocondrias. Por este motivo se decidió analizar la cantidad de complejos mitocondrias de la CTE.

4.4.6 Complejos mitocondriales de la CTE de las PBMCs

Los complejos mitocondriales de la CTE tienen una función esencial en la producción de ATP en las células. Por este motivo se decidió realizar el análisis de los 5 complejos mediante western blot. Como se muestra en la **figura 31 A** los pacientes con EM muestran una reducción estadísticamente significativa de los complejos I, III y del complejo V o ATPasa de la CTE. Tanto para el complejo I como para el III, los principales responsables de la producción de superóxido en las mitocondrias, la reducción en el grupo de pacientes es casi del 50% respecto al grupo control. En el caso del complejo V, la reducción es aproximadamente del 30%. En la **figura 31 B** se muestra una imagen representativa de los resultados obtenidos para la realización del análisis de los complejos.

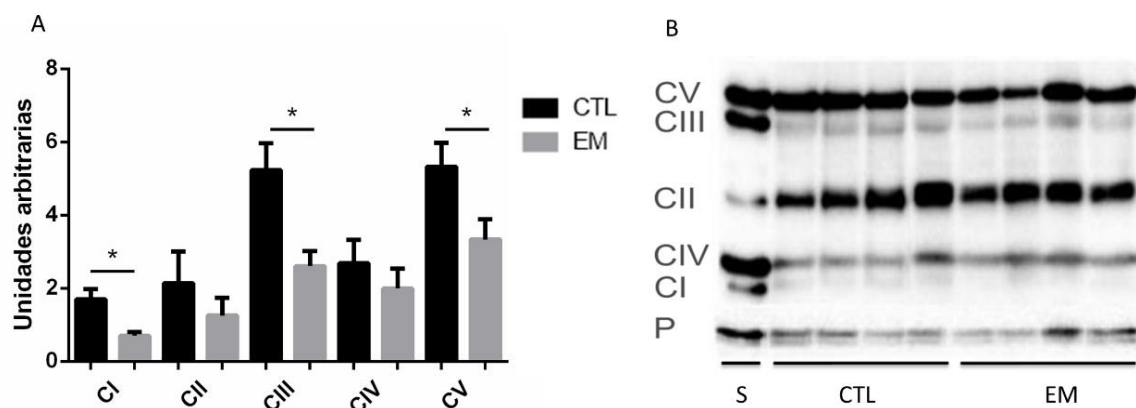


Figura 31. Análisis de los complejos mitocondriales por WB. A) diferencias en los complejos mitocondrias analizados por western blot. Los valores se han representado como media \pm SEM. T-test para muestras independientes (CI $p= 0.002$; CII $p= 0.1$; CIII $p= 0.03$, CIV $p= 0.06$; CV $p= 0.047$). **B)** Imagen representativa del Western Blot de los complejos mitocondriales y la banda de porina utilizada para relativizar todas las muestras. El estándar utilizado (S) es un extracto mitocondrial de lisado de corazón humano.

4.4.7 Enzimas MnSOD y catalasa de las PBMCs

Tras realizar el análisis del estado redox y los cambios tanto funcionales como a nivel proteico de las mitocondrias de las PBMCs se decidió analizar por western blot dos enzimas antioxidantes. Estas enzimas responden a estímulos como el EO de la vía Nrf2.

El factor de transcripción Nrf2 se activa y transloca al núcleo principalmente por incremento de los RL en el citoplasma. Una vez en el núcleo estimula la transcripción de enzimas antioxidantes como la SOD2 y la catalasa. La enzima SOD2 es mitocondrial y es la encargada de convertir el superóxido en peróxido de hidrógeno. A continuación, la catalasa es la enzima encargada de detoxificar este peróxido de hidrógeno. Dado que los pacientes con EM presentan una mayor producción de superóxido por parte de los LT se propuso analizar la cantidad de estas proteínas en las PBMCs.

La mitocondria tiene su propia SOD (MnSOD) lo que confirma la importancia biológica de la producción de superóxido. La MnSOD se encarga de la conversión del superóxido en peróxido de hidrógeno con lo que una célula que produce mayor cantidad de superóxido puede necesitar una mayor cantidad de MnSOD para intentar evitar los efectos deletéreos que tiene el exceso de este RL en las células.

Como muestra la **figura 32** no existen diferencias estadísticamente significativas entre los pacientes con EM y los controles aunque algunos pacientes presentan valores elevados de esta enzima en sus PBMCs.

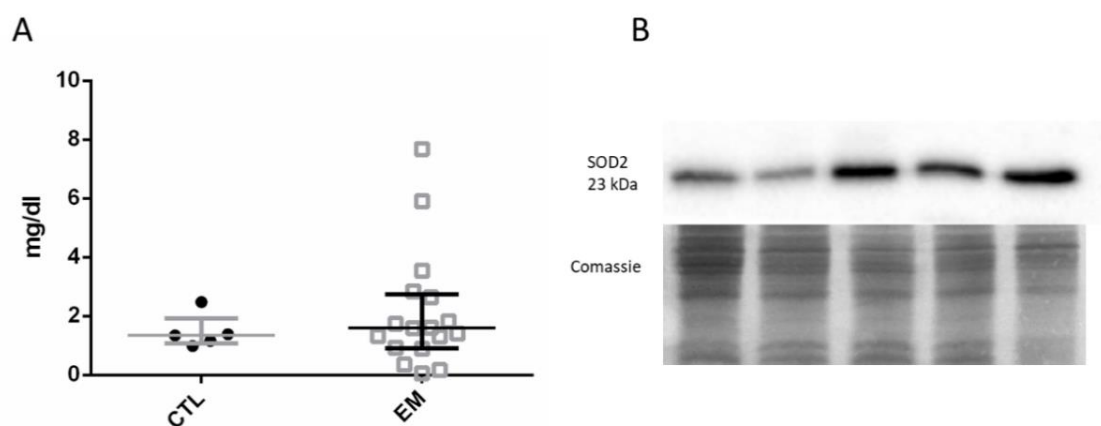


Figura 32. Análisis de la cantidad de SOD2 por Western Blot. **A)** Diferencias en la cantidad de SOD2 entre controles (n=5) y pacientes (n=15). T-test para muestras independientes ($p = 0.25$). Los valores se han representado como media \pm SEM. **B)** Imagen representativa de los resultados del WB donde se muestra el resultado del análisis de la proteína SOD2 y el control de carga realizado mediante comassie. CTL: control. EM: esclerosis múltiple.

En el proceso de detoxificación del superóxido interviene en primer lugar la SOD2 y a continuación la catalasa por lo que se analizaron también las diferencias entre pacientes y controles referentes a esta enzima cuya expresión también aumenta gracias a Nrf2. Se analizó la concentración de la catalasa por western blot y como se muestra en la **figura**

33, existe una tendencia de que los pacientes presenten mayor cantidad de esta enzima pero, las diferencias no son estadísticamente significativas quizás debido a un tamaño muestral reducido (5 controles y 19 pacientes) y a la gran dispersión que aparece en los pacientes con EM.

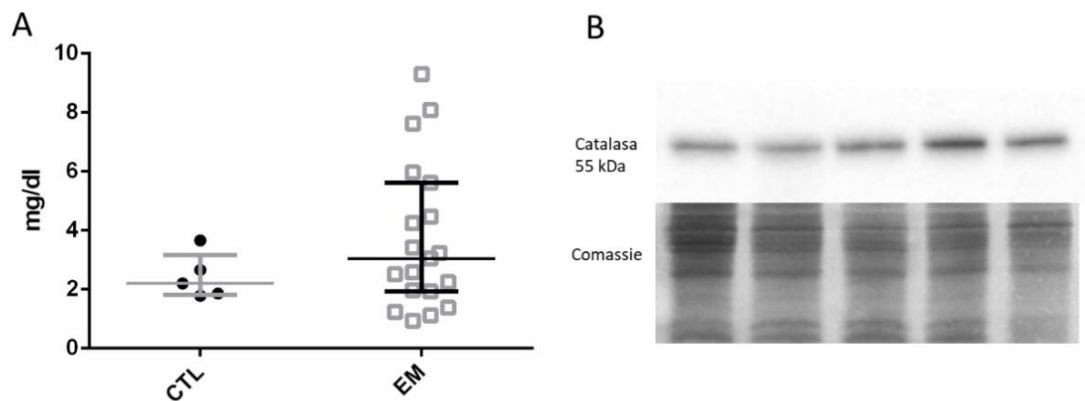


Figura 33. Análisis de la cantidad de catalasa por Wester Blot. A) Diferencias en la cantidad de catalasa entre controles (n=5) y pacientes (n=19). T-test para muestras independientes ($p = 0.24$). Los valores se han representado como media \pm SEM. **B)** Imagen representativa de los resultados del WB donde se muestra el resultado del análisis de la proteína catalasa y el control de carga realizado mediante comassie. CTL: control. EM: esclerosis múltiple

B) Estudio 2

Para el estudio 2, cuyos resultados se presentan del apartado 4.5 al apartado 4.9, se ha realizado retrospectivo con un total de 54 sujetos sin EM, 36 con un curso leve de la enfermedad y 17 con un curso agresivo de la misma. En el caso de este estudio el % de mujeres del grupo leve sigue la distribución normal de la población con EM. En el caso del grupo agresivo el % de hombres es mayor, hecho que ocurre de manera general en los cursos más agresivos de la enfermedad. Por último, en el grupo de sujetos sin EM el 60% son mujeres. A pesar de que se observan estos cambios las diferencias no son estadísticamente significativas. En cuanto a la edad, se observan también pequeños cambios pero las diferencias tampoco son estadísticamente significativas. Los cambios en el EDSS y en el tratamiento se utilizaron como criterios de inclusión para los pacientes cuyo curso se definió como leve y para aquellos cuyo curso se definió como agresivo, por lo que estas variables sí presentaron diferencias estadísticamente significativas.

4.5 Metaboloma del líquido cefalorraquídeo y suero

Con el objetivo de estudiar si el metaboloma puede predecir el curso de la EM en el momento diagnóstico y diferenciar a los enfermos de EM de otros sujetos con sospecha de la enfermedad o con otras enfermedades neurodegenerativas, se realizó el estudio del metaboloma mediante un análisis no dirigido. Por otro lado, para conocer si el metaboloma del suero es representativo del metaboloma del LCR se estudió el conjunto de metabolitos en ambos fluidos. Se escogió la aproximación no dirigida con el objetivo de encontrar nuevos biomarcadores potenciales de la enfermedad.

El análisis de la distribución de los metabolitos en el LCR y en el suero se realizó utilizando una aproximación no dirigida mediante LC-QTOF. Primero se analizó el perfil en el LCR y a continuación se comparó con el perfil de los mismos sujetos en el suero. En el análisis del metaboloma del LCR, tras seleccionar las moléculas que aparecían como mínimo en un 50% de las muestras de cada grupo, se incluyó un total de 774 metabolitos. En el caso del suero, 1208 moléculas fueron analizadas tras concluir el mismo proceso de selección.

En la **figura 34 panel A** se muestra el *Heat map* de la distribución de los metabolitos en el LCR de todas las moléculas utilizadas para el estudio. Para la realización del *Heat map* se utilizó un algoritmo de agrupamiento jerárquico con Pearson como medida de distancia. El mismo tipo de análisis no supervisado se volvió a realizar, pero en esta ocasión, únicamente con los 25 lípidos más diferenciales entre los 3 grupos. Este análisis se realizó mediante análisis de la varianza de un factor (ANOVA) y el resultado se muestra en la **figura 34 panel B**. Tal y como se refleja en esta figura, 8 de estos 25 metabolitos pudieron ser identificados y corresponden en su totalidad a lípidos o a moléculas derivadas de lípidos. El resto de moléculas no han podido ser identificadas y por eso se muestran con su masa exacta y tiempo de retención. En estas figuras se muestra que la separación entre los grupos no es perfecta aunque cuando se seleccionan los 25 lípidos con los p-valores más bajos parece observarse una cierta tendencia a la separación entre los tres grupos a pesar de que no es perfecta.

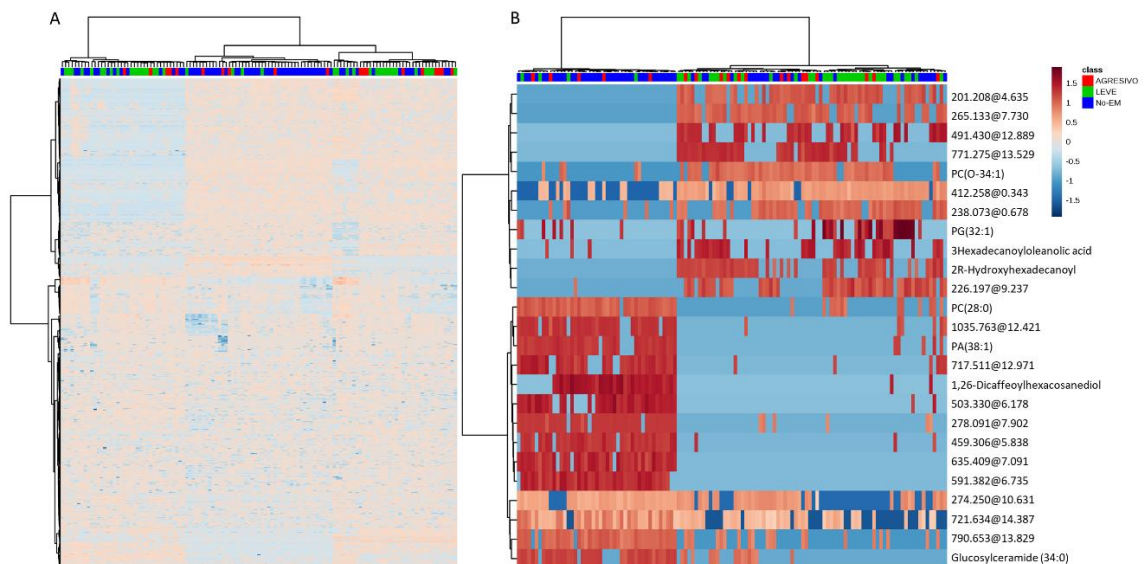


Figura 34. Distribución del metaboloma del LCR de los pacientes con EM agresiva, pacientes con EM leve y sujetos sin EM. **A)** Heat map de todas las moléculas analizadas. **B)** Heat map utilizando las 25 moléculas más significativas obtenidas por ANOVA de un factor. Cada línea del gráfico muestra un lípido, estos están ordenados por masa y tiempo de retención y su abundancia sale coloreada desde el azul hasta el naranja. La escala de -6 (azul) hasta 6 (rojo) representa la abundancia en unidades arbitrarias. El análisis se realizó en ESI positivo.

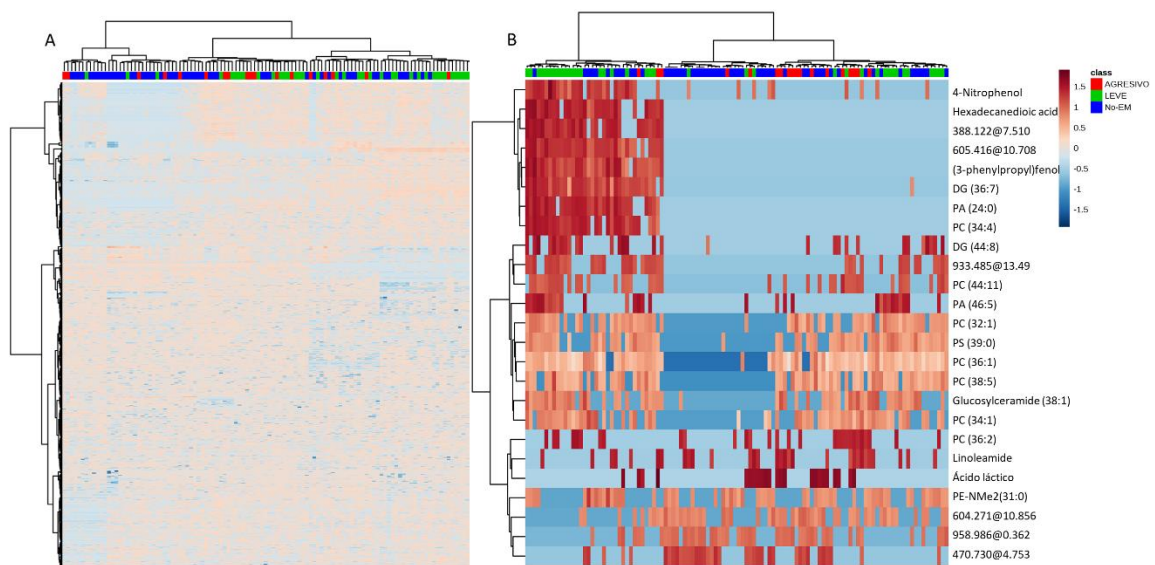


Figura 35. Distribución del metaboloma en suero de los tres grupos de estudio. **A)** Heat map de las 1208 moléculas analizadas. **B)** Heat map utilizando las 25 moléculas más significativas obtenidas por ANOVA de un factor. Cada línea del gráfico muestra un lípido, estos están ordenados por masa y tiempo de retención y su abundancia sale coloreada desde el azul hasta el naranja. La escala de -6 (azul) hasta 6 (rojo) representa la abundancia en unidades arbitrarias. El análisis se realizó en ESI positivo.

La misma aproximación analítica se llevó a cabo en el suero de los sujetos del estudio con el objetivo de ver si existe una correlación entre ambos fluidos. En este caso se encontró un total de 1208 moléculas. Como se muestra en la **figura 35** en el caso del

suero se obtuvieron resultados similares a los del LCR, es decir, la separación no es perfecta pero mejora cuando se utilizan las 25 moléculas con mayores diferencias entre los grupos. En este caso, se pudieron identificar 19 de las 25 moléculas que esta aproximación analítica seleccionó. De estos 19 metabolitos 16 pertenecen a la familia de los lípidos o derivados. Además, el ácido láctico aparece como uno de los 25 metabolitos más importantes para definir los tres grupos.

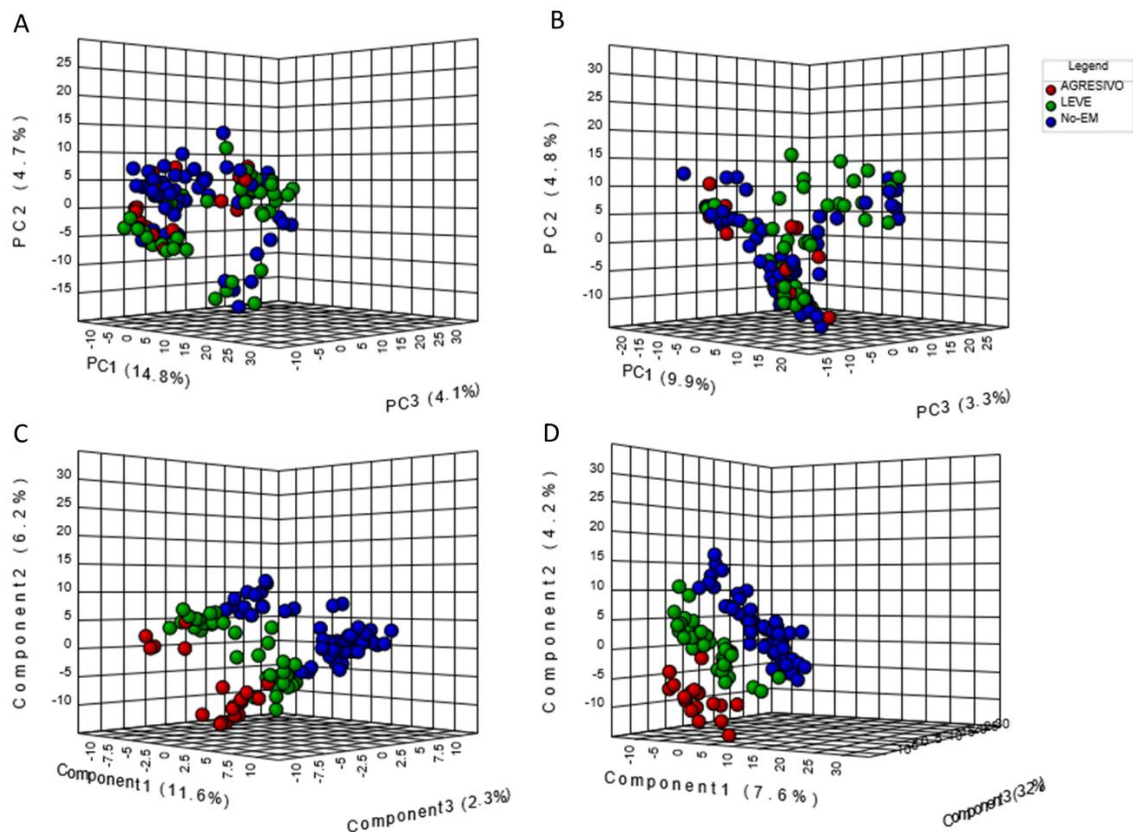


Figura 36. Estadística multivariable que muestra la huella del metaboloma del LCR y suero de los grupos de estudio en el momento diagnóstico. **A)** Análisis no supervisado por PCA en LCR **B)** Análisis supervisado por PLS-DA en LCR **C)** Análisis no supervisado por PCA en suero. **D)** Análisis supervisado por PLS-DA en suero.

Tras realizar el *Heat map* se decidió analizar estas diferencias entre grupos mediante otra aproximación no supervisada; el análisis de componentes principales (PCA) cuyos resultados son similares al *Heat map*. En el **panel A y B de la figura 36** se observa el PCA de las muestras de LCR y el PCA de las muestras de suero respectivamente. Como se muestra en la figura, no hay separación entre los tres grupos mediante este análisis. Sin embargo, cuando se realizó un método supervisado; PLS-DA, como se muestra en el **panel C y D de la figura 36** sí se consigue la separación entre los 3 grupos del estudio

tanto en el LCR (C) como en el suero (D). A pesar de que la separación entre los grupos se produce en ambos fluidos parece que en el suero los tres grupos pueden diferenciarse mejor.

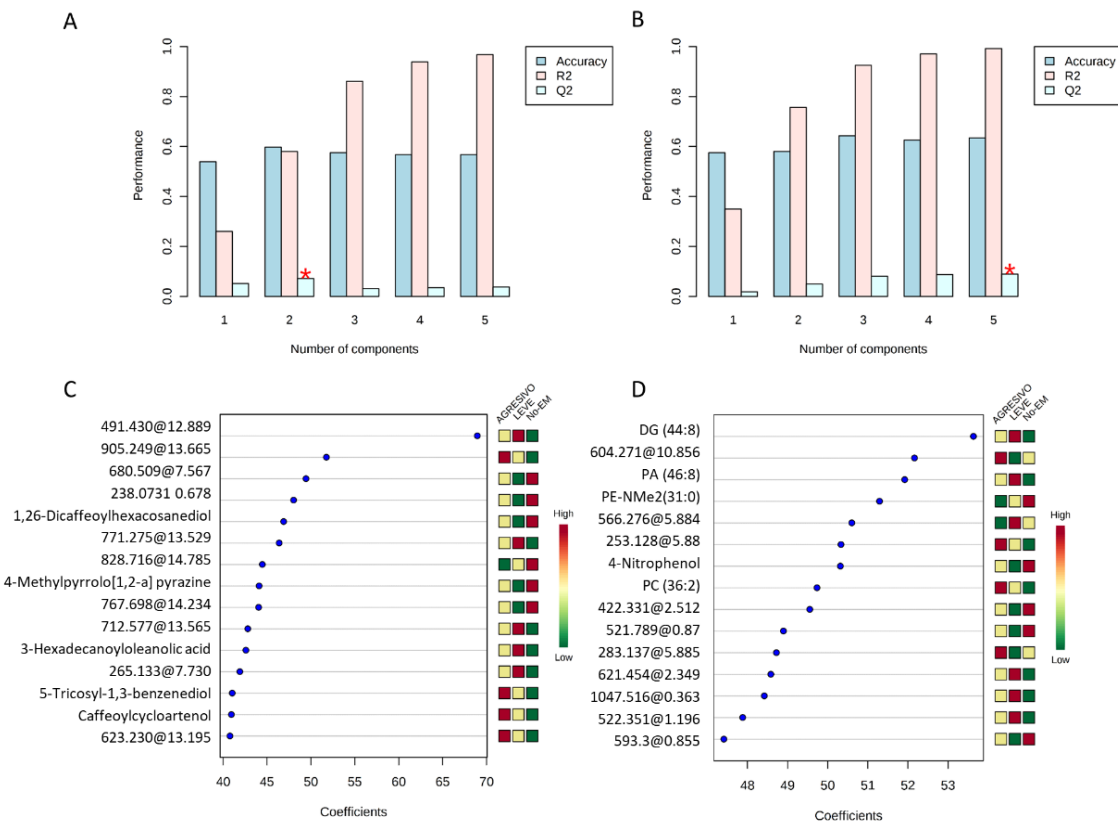


Figura 37. Validación cruzada de los valores y score de la importancia de las variables de proyección del modelo del PLS-DA. A) Validación cruzada del modelo en LCR. **B)** Validación cruzada del modelo en suero. **C)** Score de la importancia de las variables en proyección en LCR. **D)** Score de la importancia de las variables en proyección en suero.

Mediante el análisis dirigido, también se realizó una validación cruzada del modelo. Gracias a la misma, se puede observar que tanto en LCR como en suero los modelos presentan un 60% de posibilidades de diferenciar los tres grupos (accuracy = 0.6). Además el valor máximo de R2 se obtiene con 5 componentes en ambos casos y los valores de Q2 presentan valores positivos en los dos modelos. Estos resultados se presentan en la **figura 37 A y B**.

Por último y con el objetivo de conocer que metabolitos son los más relevantes en la creación del modelo se aplicó un score de importancia de las mismas. Estas moléculas se representan en la **figura 37 C y D** y como puede observarse 5 de estas 15 moléculas se pudieron identificar tanto en el LCR como en el suero. En LCR 2 de las 5 moléculas

identificadas son lípidos mientras que en suero 4 de las 5 pertenecen a esta clase de moléculas.

Dado que uno de los objetivos era poder determinar si el metaboloma es útil como factor pronóstico en la EM se decidió realizar un análisis similar al anterior teniendo en cuenta solo los grupos leve y agresivo tanto en LCR como en suero. Como se muestra en la figura 38 la separación entre ambos grupos en función del metaboloma es mejor cuando tenemos en cuenta el metaboloma del suero y no el del LCR.

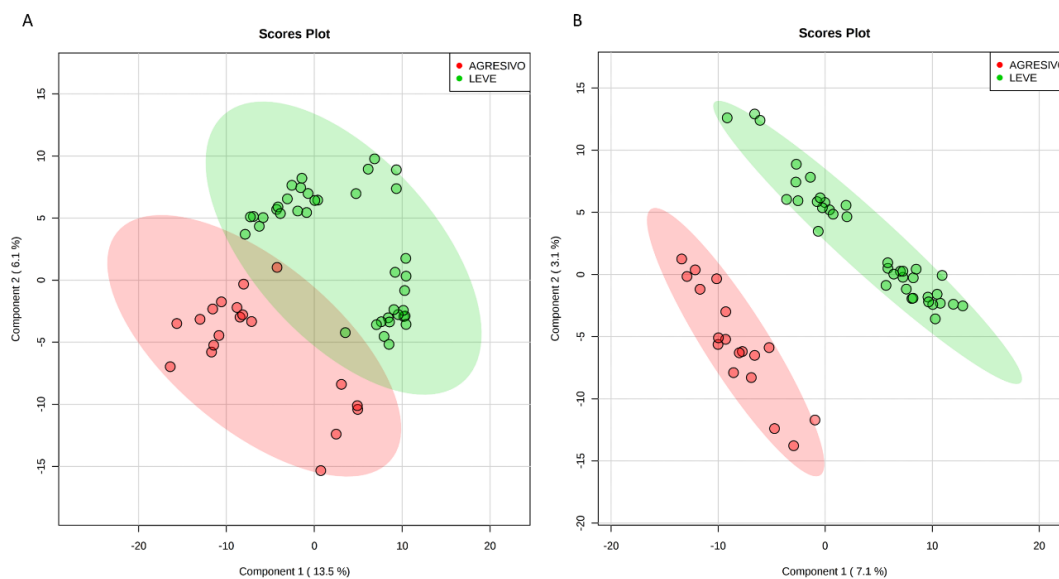


Figura 38. PLS-DA del metaboloma del LCR y suero de los pacientes con EM. A) Se muestra la separación basada en los metabolitos del LCR. **B)** Se muestra la separación basada en los metabolitos del suero.

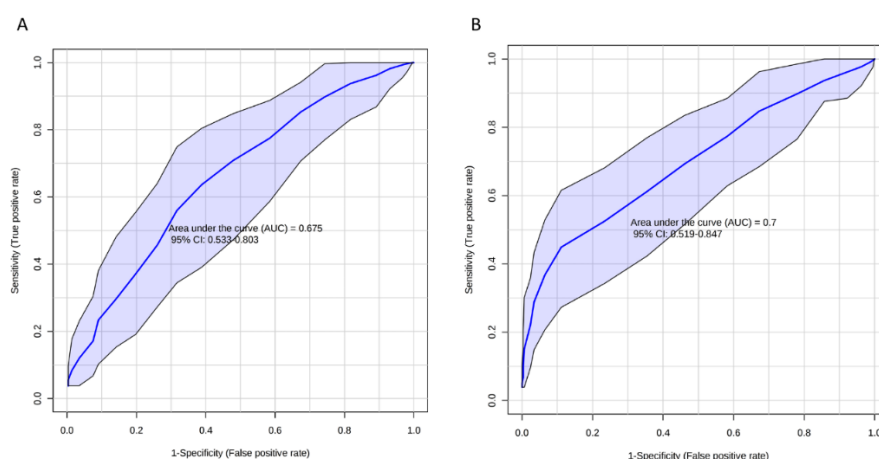


Figura 39. Potencial poder diagnóstico de la metabolómica en LCR y suero. A) Este panel muestra la curva ROC basada en las 100 moléculas más diferenciales entre los grupos en LCR. **B)** Este panel muestra la curva ROC basada en las 100 moléculas más diferenciales entre los grupos en suero

Otro de los objetivos planteados fue si el metaboloma en suero o en LCR podría ser una herramienta útil para el diagnóstico de la EM. Como se muestra en la **figura 39** ambos fluidos podrían utilizarse con este objetivo aunque el LCR muestra un área bajo la curva (**figura 39 panel A**) algo superior.

4.5.1 Metabolitos diferenciales entre grupos en LCR y suero

Como se ha mencionado en el apartado anterior, se detectaron 744 metabolitos en LCR y 1208 en suero. En el caso de los metabolitos del LCR 92 de los 744 mostraron diferencias significativas entre los grupos y 34 pudieron ser identificados (los metabolitos no identificados se muestran en el **anexo 2**). La identificación se hizo en función de la masa para los metabolitos en general y en función de la masa y el tiempo de retención en el caso de los lípidos. Los metabolitos identificados en el LCR se presentan en la **tabla 15**. Los metabolitos identificados pertenecen a diferentes grupos de moléculas; aminoácidos, péptidos y análogos, fenilpropanoides y poliquetidas, fenoles y derivados, nucleósidos, nucleótidos y análogos, flavonoides y lípidos y derivados. De las 34 moléculas que se pudieron identificar casi un 70% son lípidos (23 moléculas).

Tabla 15. Metabolitos identificados en el LCR los grupos de estudio.

Familia	Compuesto	m/z	Tiempo retención	p-valor
Aminoácidos, péptidos y análogos	Thiomorpholine 3-carboxylate	186,989	0,366	1.98E-03
	Gamma-glutamylthreonine	249,108	6,439	4.52E-03
	N-palmitoyl tyrosine	442,296	12,217	5.73E-04
	Guanosine pentaphosphate adenosine	933,001	0,363	5.47E-03
	β -hydroxypyruvic acid	350,996	0,365	2.71E-03
Fenilpropanoides y poliquetidas	1-[3-(3,7-dimethylocta-2,6-dien-1-yl)-2,4,6-trihydroxyphenyl]-3-phenylpropan-1-one	395,221	7,310	3.44E-03
	1,26-Dicaffeoylhexacosanediol	723,469	12,745	2.09E-07
Fenoles y derivados	5-tricosyl-1,3-benzenediol	471,356	11,537	8.80E-04
Nucleósidos, nucleótidos y derivados	Inosine triphosphate	530,976	0,366	1.07E-03
Flavonoides	Quercetin 3'-sulfate	404,987	0,337	4.54E-03
	Gossypetin 8-glucuronide 3-sulfate	597,005	0,364	3.42E-03
Lípidos y derivados	Tiglylcarnitine	266,133	7,770	9.70E-04
	O-phosphorylethanolamine	268,992	0,366	3.84E-03
	(+)-Isostearic acid	285,270	11,896	4.27E-04
	Dodecanoylcarnitine	382,241	7,318	2.56E-03
	Ganoderiol c	519,404	12,448	1.75E-03
	Butanoic acid	536,159	12,690	3.07E-03

N-(2r-hydroxyhexadecanoyl)-2s-amino-9-methyl-4e,8e-octadecadiene-1,3r-diol	548,494	13,281	2.30E-05
Caffeoylcycloartenol	571,421	12,430	2.78E-03
Momordicilin	579,418	12,123	4.43E-03
Phylloquinone	901,720	14,342	1.31E-03
3-Hexadecanoyloleanolic acid	733,558	13,497	1.62E-04
Glucosylceramide (34:1)	682,563	13,589	1.69E-04
PA (38:1)	731,552	13,015	4.31E-04
PE (28:1)	634,444	10,799	1.73E-03
PE-NMe2 (44:6)	876,654	12,062	3.43E-04
DG (42:6)	719,543	13,425	3.33E-04
DG (36:3)	641,508	13,259	2.71E-03
DG (20:8)	673,497	13,019	2.44E-03
PS (32:0)	718,510	12,847	4.47E-03
PC (28:0)	700,484	12,675	3.14E-05
PC (34:1)	728,596	13,435	2.73E-04
PC (46:6)	918,698	12,302	8.80E-04
PG (32:1)	721,508	13,285	1.01E-05

m/z, ratio masa carga (mass-to-charge ratio); DG, diglicéridos; PE-NMe, , fosfatidiletanolamina-N-metiletanolamina; PE, fosfatidiletanolamina; PC, fosfatidilcolina; PS, fosfatidilserina; PA, ácido fosfatídico; PG, fosfoglicérido

En el suero se encontraron un total de 1208 metabolitos de los cuales 39 presentaron diferencias estadísticamente significativas. De estos un total de 26 pudieron identificarse en función de la masa o en función de la masa y el tiempo de retención en el caso de los lípidos. Los metabolitos identificados en suero se presentan en la **tabla 16** (los metabolitos no identificados se presentan en el **anexo 3**). En el suero, los metabolitos identificados pertenecen a diferentes grupos de moléculas: fenoles; aminoácidos, péptidos y análogos; y lípidos. En esta ocasión casi un 77% de las moléculas que pudieron identificarse son lípidos.

Tabla 16. Metabolitos identificados en el suero los sujetos de estudio.

Familia	Compuesto	m/z	Tiempo retención	p-valor
Fenoles	4-Nitrophenol	163.011	0.532	4.96E-05
	4-(3-hydroxy-3-phenylpropyl)phenol	247.149	6.184	5.71E-04
Aminoácidos, péptidos y análogos	Kinetensin 1-7	934.485	13.490	6.17E-04
	Phosphoguanidinoacetate	181.019	0.674	7.49E-04
	N6,N6,N6-trimethyl-l-lysine	172.149	5.886	1.31E-03
Hidroxi ácidos y derivados	Ácido láctico	91.031	0.511	3.67E-04
Lípidos y derivados	Linoleamide	303.245	10.468	4.05E-05
	Hexadecanedioic acid	611.370	10.707	1.77E-04
	PA (24:0)	520.342	10.008	4.09E-05
	PA (33:3)	675.472	11.091	1.48E-03
	PA (36:5)	817.618	13.480	6.10E-05
	PC (32:4)	776.507	11.476	7.86E-04

PC (32:1)	701.550	13.089	2.64E-04
PC (32:2)	697.536	13.988	1.60E-03
PC (24:11)	918.539	13.776	5.90E-04
PC (38:5)	830.561	13.562	1.01E-03
PC (34:1)	782.559	13.703	9.00E-04
PC (36:2)	808.575	13.581	1.30E-03
PC (36:1)	788.610	13.906	5.92E-04
DG (44:8)	704.571	13.120	2.54E-05
DG (26:0)	813.665	13.875	1.49E-03
PGP (38:5)	872.507	13.473	1.23E-03
PE-NMe (31:0)	724.562	7.339	4.01E-05
PE (28:1)	634.445	11.090	6.04E-04
PS (39:0)	816.602	13.695	6.23E-04
Glucosylceramide (38:1)	794.592	13.594	1.37E-03

m/z, ratio masa carga (mass-to-charge ratio); DG, diglicéridos; PE-NMe, , fosfatidiletanolamina-N-metiletanolamina; PE, fosfatidiletanolamina; PC, fosfatidilcolina; PS, fosfatidilserina; PA, ácido fosfatídico; PG, fosfoglicérido

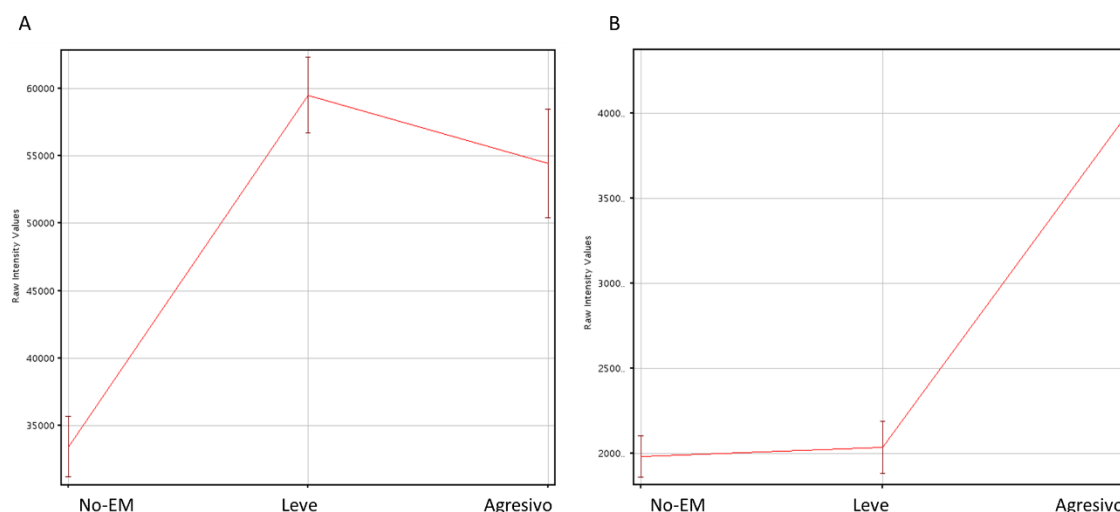


Figura 40. Distribución de la fosfatidiletanolamina 28:1 en los tres grupos de estudio. A) Distribución del metabolito en LCR **B)** Distribución del metabolito en suero.

Solo dos de los metabolitos analizados mostraron diferencias significativas entre los grupos tanto en suero como en LCR. Uno de ellos no fue identificado (masa: 180,0195; tiempo de retención: 0,67283124) y el otro es la **fosfatidiletanolamina 28:1**; un lípido de la familia de los glicerolípidos. Este lípido muestra un patrón diferente en LCR y en suero como se muestra en la **figura 40**, en el caso del LCR el grupo leve presenta los niveles más bajos mientras que en el suero es este mismo grupo el que presenta los niveles más altos.

Los resultados obtenidos del estudio de metabolómica muestran que en el momento diagnóstico el suero y el LCR presentan diferencias importantes. A pesar de ello la fosfatidiletanolamina se postularía como un posible biomarcador de pronóstico de la enfermedad teniendo en cuenta las diferencias que presenta entre ambos fluidos.

4.6 Lipidoma del líquido cefalorraquídeo y suero

Tras realizar el análisis del metaboloma de los sujetos del estudio y comprobar que diversos lípidos presentan diferencias entre los grupos y que uno de ellos aparece en concentraciones diferentes en el suero y en el LCR, se decidió estudiar el lipidoma de estos sujetos.

Para conseguir los objetivos mencionados anteriormente, se evaluó el perfil lipídico de pacientes con EM con un curso leve de la enfermedad comparándolos con pacientes con EM con un curso agresivo de la enfermedad y a su vez con un grupo de sujetos denominados No-EM, o grupo control, que presentan: patologías neurológicas inflamatorias diferentes de la EM, patologías neurológicas no inflamatorias o patologías no neurológicas, como se ha descrito previamente. El lipidoma se analizó tanto en LCR como en suero de estos sujetos; ambas muestras extraídas en el momento diagnóstico. La técnica escogida para realizar este análisis fue un análisis lipídico no dirigido.

En primer lugar se decidió estudiar la distribución de los diferentes lípidos tanto en el LCR como en el suero lo que se realizó por LC-QTOF acoplado a un MS/MS. Gracias a este método se detectaron, en LCR, 9532 especies lipídicas. Solo las especies que aparecieron al menos en el 50% de las muestras de cada grupo fueron seleccionadas. Como resultado, un total de 1094 moléculas fueron incluidas en el estudio del LCR.

En la **figura 41 panel A** se muestra el Heat map de la distribución de los lípidos en el LCR de todas las moléculas utilizadas para el estudio. El mismo tipo de análisis no supervisado se volvió a realizar pero, en esta ocasión, únicamente con los 25 lípidos más diferenciales entre los 3 grupos y se muestra en la **figura 41 panel B**. Como ocurría en el caso del metaboloma la separación entre los grupos no es perfecta aunque cuando se seleccionan los 25 lípidos con los p-valores más bajos parece observarse una cierta tendencia para realizar la separación de los grupos. Siete de los 25 lípidos con p-valores

más bajos pudieron ser identificados. De estos, cuatro pertenecen a la familia de los GL, uno a la familia de las GP, uno a los LE y uno a la familia de los AG.

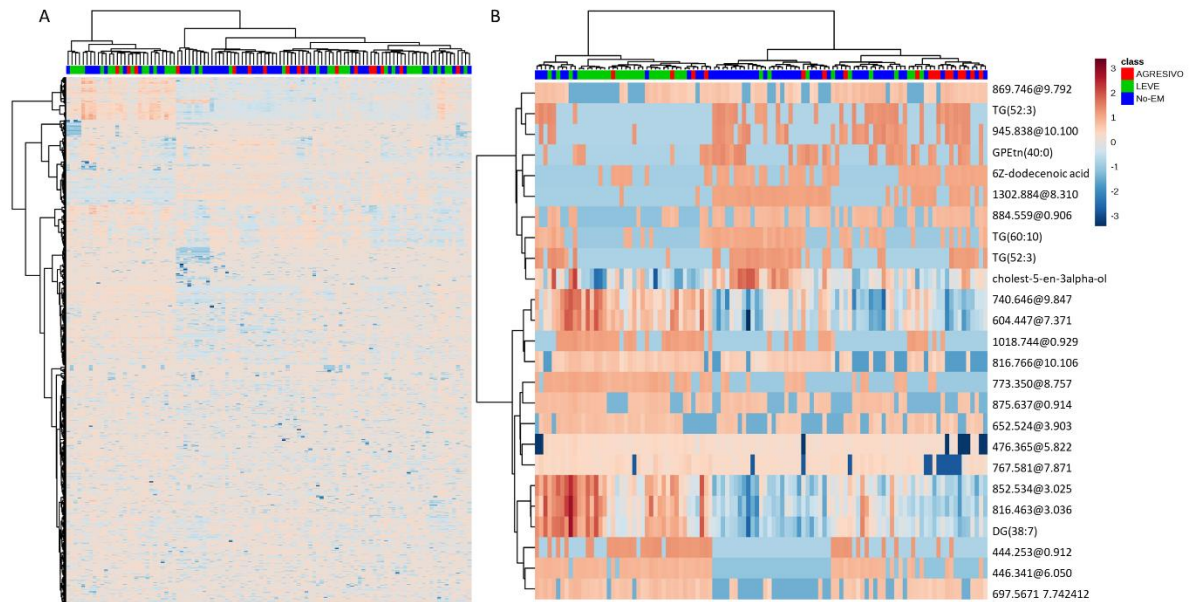


Figura 41. Distribución del lipidoma en los tres grupos de estudio en LCR: **Pacientes con EM agresiva, Pacientes con EM leve y sujetos sin EM.** **A)** Heat map de las 1094 moléculas analizadas. **B)** Heat map utilizando las 25 moléculas más significativas obtenidas por ANOVA de un factor. Cada línea del gráfico muestra un lípido, estos están ordenados por masa y tiempo de retención y su abundancia sale coloreada desde el azul hasta el naranja. La escala de -6 (azul) hasta 6 (rojo) representa la abundancia en unidades arbitrarias. El análisis se realizó en ESI positivo.

Con el objetivo de analizar si los resultados obtenidos entre el suero y el LCR en el momento diagnóstico son comparables, se llevó a cabo el mismo procedimiento de diferenciación entre los grupos, en suero. Los resultados obtenidos se muestran en la **figura 42**. Estos resultados, como ocurre en el LCR muestran que la aproximación no supervisada obtenida con el Heat map no permite diferenciar a la perfección a los tres grupos. En el caso del suero, un total de 770 lípidos fueron detectados, tras la selección de aquellos que aparecen como mínimo en el 50% de las muestras. Como sucede en el caso del LCR, la separación parece mejorar cuando se seleccionan los 25 lípidos con un p-valor más bajo pero a pesar de ello la separación no es perfecta. En el suero se pudieron identificar 15 de los 25 lípidos. Nuevamente la mayoría pertenecen a la familia de los GL pero también se identificaron lípidos pertenecientes a los AG, LE, EL y GP. De los lípidos identificados aproximadamente el 50% pertenecen a la familia de los GL.

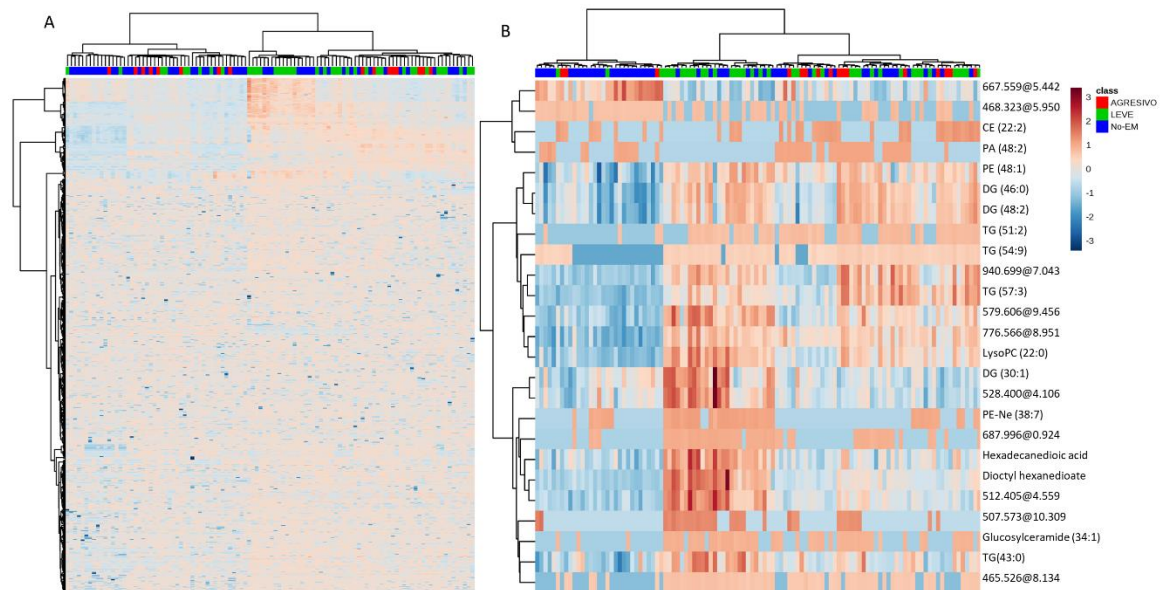


Figura 42. Distribución del lipidoma en los tres grupos de estudio en suero: **Pacientes con EM agresiva, Pacientes con EM leve y sujetos sin EM.** **A)** *Heat map* de las 770 moléculas analizadas. **B)** *Heat map* utilizando las 25 moléculas más significativas obtenidas por ANOVA de un factor. Cada línea del gráfico muestra un lípido, estos están ordenados por masa y tiempo de retención y su abundancia sale coloreada desde el azul hasta el naranja. La escala de -6 (azul) hasta 6 (rojo) representa la abundancia en unidades arbitrarias. El análisis se realizó en ESI positivo.

Tras realizar el *Heat map* se decidió analizar estas diferencias entre grupos mediante otra aproximación no supervisada; el PCA, cuyos resultados son similares al *Heat map*. En la **figura 43 panel A y panel B** se puede observar que no hay separación entre los tres grupos mediante este análisis ni en LCR ni en suero, respectivamente. Sin embargo, cuando se realizó un método supervisado; PLS-DA, como se muestra en la **figura 43 panel C y panel D**, sí se consigue la separación entre los 3 grupos del estudio. En el caso de la lipidómica, en base a estos resultados, se podría decir que los cambios en el momento diagnóstico se observan mejor en el LCR que en el suero aunque la separación de los tres grupos se produce, en ambos fluidos.

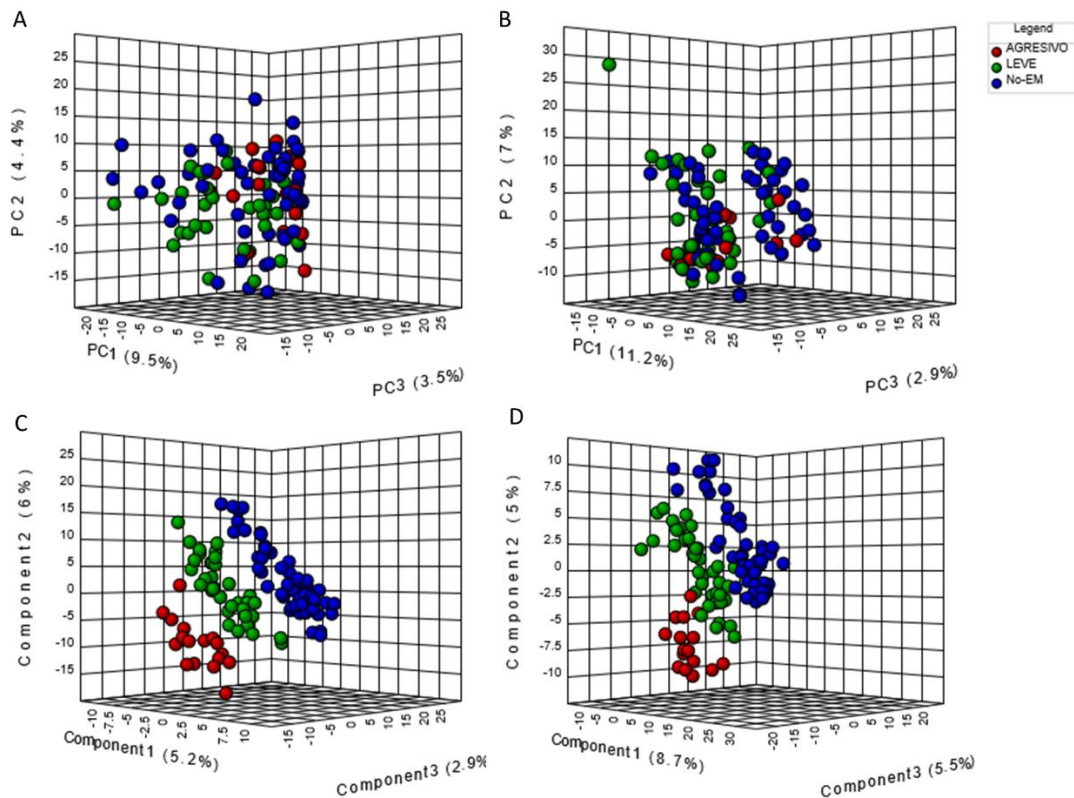


Figura 43. Estadística multivariable que muestra la huella del lipidoma del LCR y suero de los grupos de estudio en el momento diagnóstico. **A)** Análisis no supervisado por PCA en LCR **B)** Análisis no supervisado por PCA en suero. **C)** Análisis supervisado por PLS-DA en LCR **D)** Análisis supervisado por PLS-DA en suero.

Tras realizar el PLS-DA y observar que permite la separación de los grupos se procedió a realizar una validación cruzada del modelo en ambos fluidos. Este análisis indica que, en LCR, en un 60% de los casos se pueden diferenciar los 3 grupos de estudio (accuracy = 0.6); el valor máximo para R2 se obtuvo con 4 componentes y por último; Q2 muestra valores positivos en 4 de los 5 modelos lo que indica que, a excepción del modelo con una única variable, el resto son efectivos para mejorar el poder de predicción. Los resultados se muestran en la **figura 44 A** para el LCR. La misma validación se realizó para el suero lo que vuelve a mostrar que el LCR es algo mejor que el suero para predecir el curso de la EM en el momento diagnóstico y los resultados se muestran en la **figura 44 B**. En el caso del suero un poco menos del 60% de las veces se pueden diferenciar los grupos mediante este análisis; la R2 máxima se obtiene con 3 componentes y la Q2 es positiva en todos los caso lo que indica que este modelo en suero podría ser también útil para la diferenciación entre los grupos.

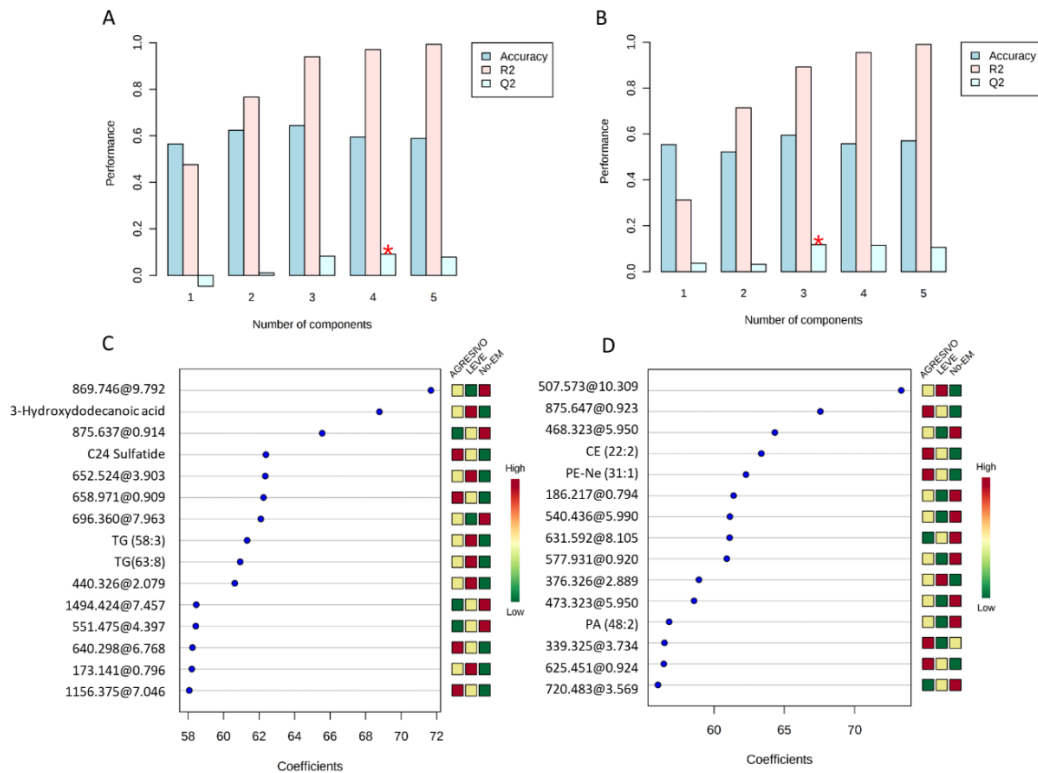


Figura 44. Validación cruzada de los valores del modelo del PLS-DA. Score de la importancia de las variables de proyección (VIP) y especies lipídicas identificadas. A) Se muestran los resultados de la validación cruzada en LCR. **B)** Se muestran los resultados de la validación cruzada en el suero. **C)** Resultados del score de la importancia de las variables de proyección en LCR. **D)** Resultados del score de la importancia de las variables de proyección en suero.

Por último, con el objetivo de conocer qué moléculas tienen una mayor relevancia en la separación entre los grupos se aplicó un score de importancia de las mismas (VIP: *variable importance in projection*). En la **figura 44 C** se presentan los resultados en LCR y en la **figura 44 D** se presentan los resultados en suero. En el caso del LCR, las 15 moléculas más relevantes para definir el modelo supervisado (PLS-DA) aparecen a partir del coeficiente 58 mientras que en el suero lo hacen un poco antes. De estas moléculas se pudieron identificar 4 en LCR y 3 en suero. En el caso del LCR encontramos dos TG que pertenecen a la familia de los GL, ambos incrementados en el grupo leve, un EL y un AG. En suero encontramos dos AG, ambos incrementados en el grupo agresivo, y un GP. El cálculo del score de la importancia de las variables muestra que entre los grupos no hay ningún lípido que aparezca en ambos fluidos. Únicamente aparecen lípidos de la familia de los AG diferenciales en ambos fluidos pero la distribución dentro de los grupos es diferente.

4.6.1 Lípidos diferenciales entre grupos en líquido cefalorraquídeo y suero

Tras analizar la huella lipídica de los tres grupos tanto en LCR como en suero se trató de identificar los lípidos significativamente diferentes entre grupos. Un total de 147 lípidos mostraron diferencias estadísticamente significativas entre los grupos. Como se muestra en la **tabla 17** un total de 40 lípidos fueron identificados en LCR (los lípidos no identificados se muestran en el **anexo 4**). Estos pertenecen a las familias de los AG, GL, GP, EL y LE.

Tabla 17. Lípidos identificados entre los 3 grupos de estudio en LCR.

Familia	Compuesto	m/z	Tiempo de retención	p-value
AG	6Z-dodecenoic acid	397,325	4,852	< 0,001
	3-Hydroxydodecanoic acid	216,187	0,825	0,012
	Heptadecanedioic acid	939,639	0,903	0,045
	l-2-hydroxy-decanoic acid	582,428	3,867	0,015
	PENMe (32:0)	670,550	3,658	0,019
	PENMe (28:0)	621,530	5,8594	0,020
GL	DG (32:1)	571,444	4,743	0,002
	DG (32:2)	565,472	4,200	0,002
	TG (59:2)	977,8285	9,264	0,007
	TG (52:2)	840,765	9,965	0,027
	TG (51:0)	848,819	7,922	0,039
	TG (52:3)	895,7236	9,148	0,001
	TG (58:3)	961,808	8,904	< 0,001
	TG (64:10)	1028,844	10,118	0,001
	TG (59:2)	977,828	9,264	0,007
	TG (57:6)	921,774	9,030	0,009
	TG (57:4)	947,794	9,467	0,010
	TG (63:8)	983,823	10,413	0,012
	TG (55:5)	917,742	8,589	0,015
	TG (58:1)	965,82	10,053	0,015
	TG (56:4)	893,783	9,696	0,015
	TG (56:6)	911,720	9,042	0,017
	DG (38:6)	641,514	8,549	0,018
	TG (62:8)	986,8657	10,101	0,023
	TG (57:7)	919,765	8,855	0,025
	TG (60:10)	937,7439	9,085	0,031
	TG (59:6)	948,8528	10,263	0,032
	TG (61:10)	969,772	8,892	0,038
	TG (60:4)	987,804	9,840	0,043

GP	PE (40:0)	824,573	5,926	0,001
	PC (37:1)	786,620	3,335	0,015
EL	CerP (42:2)	745,6147	9,418	0,002
	Ceramide (44:2)	675,671	10,680	0,021
	C20 Sulfatide	818,587	6,036	0,005
	GlcCer (42:0)	852,657	7,877	0,011
LE	18:2 Cholesteryl ester	666,614	10,5103	0,043
	cholest-5-en-3alpha-ol	369,345	9,197	0,002
	5beta-Dihydrotestosterone	562,438	10,708	0,003
	22:0 Cholesteryl ester	765,642	9,240	0,047
	3-Hydroxydodecanoic acid	216,187	0,825	0,012

m/z, ratio masa carga; AG, ácidos grasos; GL, glicerolípidos; GP, glicerosfolípidos; EL, esfingolípidos; LE, lípidos de esteroles; TG, triglicéridos; DG, diglicéridos; PE-NMe, fosfatidiletanolamina-N-metiletanolaminas; PE, fosfatidiletanolaminas; PC, fosfatidilcolinas; PS, fosfatidilserinas; GlcCer, glucosilceramidas; CerP, ceramidas fosfato.

De los lípidos identificados uno de ellos pudo ser confirmado por MS, el éster de colesterol 18:2, lo que permite que se postule como un biomarcador pronóstico de la enfermedad a falta de una validación del mismo en una cohorte más amplia de sujetos y mediante una aproximación dirigida.

En el caso del suero un total de 41 lípidos de los 155 que presentaron diferencias estadísticamente significativas pudieron ser identificados y se muestran en la **tabla 18** (los no identificados se muestra en el **anexo 5**). Dentro de los lípidos identificados se encuentran lípidos de la familia de los AG, GL, GP y LE.

Tabla 18. Lípidos identificados en el suero de los tres grupos de estudio

Familia	Compuesto	m/z	Tiempo de retención	p-value
AG	Diocetyl hexanedioate	371.308	4.549	0.002
	6-Hydroxy-8-heptacosanone	433.393	4.777	0.009
	Mosin C	612.497	3.807	0.019
	PA (44:11)	817.459	2.921	0.003
	PA (48:2)	795.524	0.918	0.002
	Panaxynol linoleate	524.445	4.106	0.007
	Pentacosanoic acid	421.345	0.983	0.016
	Trilobalicin	633.426	3.805	0.033
GL	DG (22:0)	429.361	4.566	0.009
	DG (30:1)	521.445	4.290	0.002
	DG (28:2)	531.396	5.938	0.016
	DG (32:1)	549.475	5.160	0.042
	DG (32:2)	617.451	4.106	0.004

	DG (36:8)	573.423	3.085	0.005
	DG (37:6)	608.497	3.947	0.017
	DG (34:2)	631.465	3.022	0.009
	DG (36:3)	641.512	7.454	0.025
	DG (38:7)	656.523	3.682	0.015
	DG (46:0)	747.713	7.411	0.016
	TG (43:0)	757.643	9.128	<0.001
	DG (48:2)	806.772	7.407	0.004
	TG (49:0)	789.761	7.952	0.010
	TG (51:2)	848.819	7.951	0.016
	TG (52:3)	865.753	9.469	0.015
	TG (57:4)	907.801	9.651	0.001
	TG (54:1)	913.790	9.976	0.031
	TG (49:10)	941.770	9.233	0.002
	TG (57:3)	949.812	9.243	0.008
	TG (54:9)	955.747	8.528	<0.001
	TG (52:13)	977.770	7.345	0.012
GP	1-hexadecyl-2-dodecanoyl-glycero-3-phosphate	543.412	3.588	0.005
	PE (48:1)	567.693	7.329	0.023
	PE-Nme (31:1)	672.508	0.925	0.022
	PE (40:1)	786.621	3.341	0.034
	PE (48:1)	936.742	7.049	0.018
	PE (48:2)	950.720	6.152	0.016
	PE-NMe2 (48:2)	978.752	5.915	0.012
	PS (48:1)	997.691	4.655	0.005
LE	16:1 Cholesteryl ester	645.570	9.954	0.045
	GlcCer (32:1)	682.570	5.082	0.004
	22:4 Cholesteryl ester	683.616	8.962	<0.001

m/z, ratio masa carga; AG, ácidos grasos; GL, glicerolípidos; GP, glicerofosfolípidos; SP, esfingolípidos; LE, lípidos de esteroles; TG, triglicéridos; DG, diglicéridos; PE-NMe, fosfatidiletanolamina-N-metiletanolaminas; PE, fosfatidiletanolaminas; PC, fosfatidilcolinas; PS, fosfatidilserinas; GlcCer, glucosilceramidas; CerP, ceramidas fosfato; AG: agresivo; No-EM: no esclerosis múltiple

Dado que uno de los principales objetivos era establecer la capacidad pronóstica del lipidoma en la enfermedad, tras ver diferencias entre los tres grupos y se decidió analizar únicamente los grupos de pacientes con EM, es decir, los grupos que se denominaron leve y agresivo. Como fluido para realizar este análisis se escogió el LCR por la proximidad al SNC y debido a que el suero no muestra resultados comparables a los de este fluido. El mismo número de lípidos que en el caso anterior fueron analizados.

En primer lugar se realizó el *Heat map* del lipidoma del LCR de estos pacientes y como se puede observar en la **figura 45**, aunque sí hay cierta tendencia la separación entre los dos grupos, no es perfecta. Esta separación mejora cuando se seleccionaron las 25 moléculas con p-valores más bajos aunque sigue sin ser una separación perfecta.

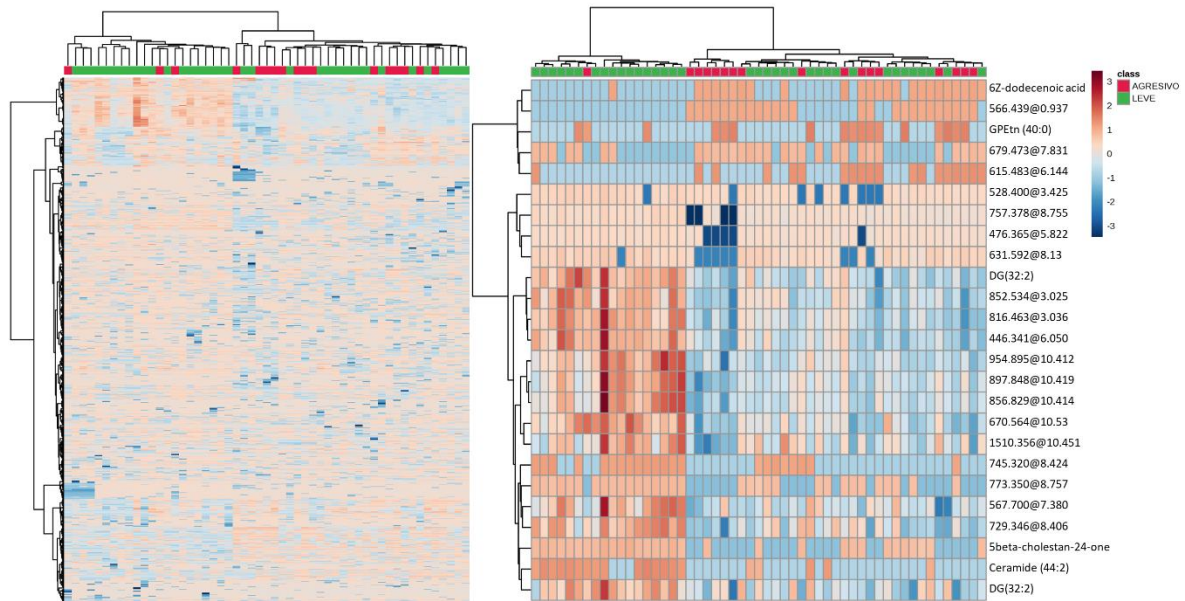


Figura 45. Distribución del lipidoma en los dos grupos de estudio en LCR: **Pacientes con EM agresiva, Pacientes con EM leve y sujetos sin EM.** **A)** *Heat map* de las 1094 moléculas analizadas. **B)** *Heat map* utilizando las 25 moléculas más significativas obtenidas por ANOVA de un factor. Cada línea del gráfico muestra un lípido, estos están ordenados por masa y tiempo de retención y su abundancia sale coloreada desde el azul hasta el naranja. La escala de -6 (azul) hasta 6 (rojo) representa la abundancia en unidades arbitrarias. El análisis se realizó en ESI positivo.

A continuación se realizó el PCA de estas muestras, donde, como ocurría anteriormente se obtienen resultados similares al *Heat map* ya que ambos son análisis no dirigidos. Estos resultados se muestran en la **figura 46 A**. El PLS-DA muestra una separación perfecta entre ambas poblaciones como se muestra en la **figura 46 B**. Este modelo con solo los dos grupos de pacientes consigue discriminar en un 80% de los casos el grupo (accuracy 0.8), además la R2 es de uno en el caso de los 5 componentes y la Q2 con valores positivos refleja que el modelo mejora la predicción lo que se muestra en la **figura 46 C**. Por último el score de la importancia de las variables en proyección muestra las 15 moléculas con una mayor influencia en el modelo (p-valores más pequeños) con un coeficiente mayor del 70% como se refleja en la **figura 46 D**. De las 15 moléculas más relevantes para el modelo 4 han sido identificadas. Cada una de ellas pertenece a una familia lipídica diferente, es decir, se encontró un lípido de la familia de los AG, otro de la familia de los EL, otro de la familia de los LE y por último uno de la familia de los GP. Tres de estos cuatro lípidos aparecen incrementados en el grupo agresivo respecto al grupo leve.

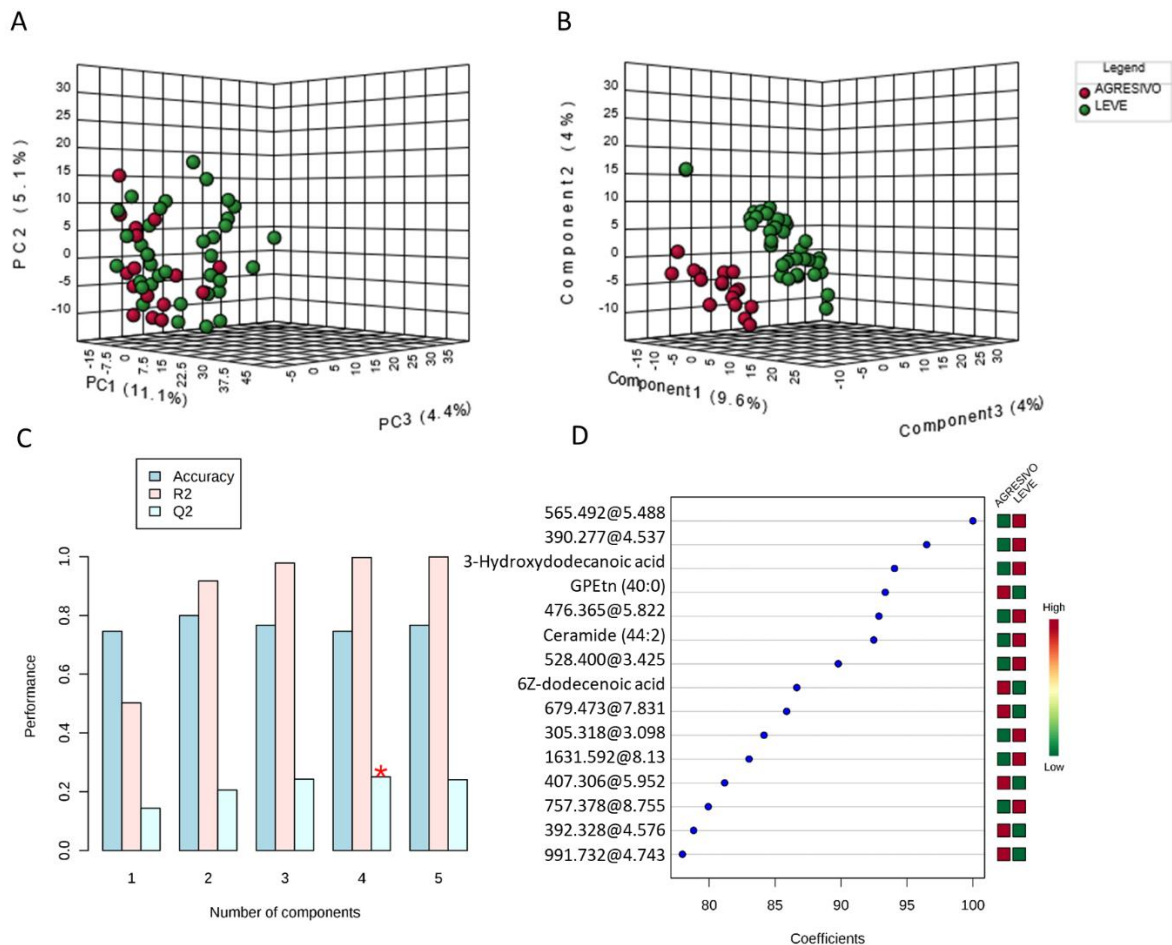


Figura 46. Estadística multivariable que muestra la huella del perfil lipídico del LCR del grupo agresivo y del grupo leve en el momento diagnóstico. **A)** Análisis no supervisado por PCA **B)** Análisis supervisado por PLS-DA. **C)** Validación cruzada de los valores del modelo del PLS-DA. **D)** Score de la importancia de las variables de proyección (VIP) y especies lipídicas identificadas.

Como se muestra en la **tabla 19**, 15 de los lípidos diferenciales entre los 3 grupos analizados anteriormente son diferenciales entre el grupo leve y el agresivo. De estos lípidos, en el caso de la familia de los AG, se encuentran dos lípidos significativamente más elevados en el grupo agresivo y uno en el grupo leve. En el caso de los GL todos aparecen aumentados en el grupo leve respecto al grupo agresivo. Solo se ha identificado un lípido de la familia de los GP que aparece aumentado en el grupo agresivo al igual que ocurre con uno de los EL identificados pero no con el otro que presenta una mayor concentración en el momento diagnóstico en el grupo leve. Por último y al igual que ocurre en los GL los LE aparecen en mayores concentraciones en el grupo leve en el momento diagnóstico.

Tabla 19. Diferencia de concentración de los lípidos identificados entre leves y agresivos.

Familia	Compuesto	Agresivo vs. leve
AG	6Z-dodecenoic acid	+
	3-Hydroxydodecanoic acid	-
	Heptadecanedioic acid	+
GL	DG (32:1)	-
	DG (32:2)	-
	TG (59:2)	-
	TG (52:2)	-
	TG (51:0)	-
	TG (64:10)	-
	TG (59:2)	-
GP	PE (40:0)	+
SP	CerP (42:2)	+
	Ceramide (44:2)	-
LE	18:2 Cholesteryl ester	-
	3-Hydroxydodecanoic acid	-

AG, ácido graso; GL, glicerolípidos; LE, lípidos de esteroles; SP, esfingolípidos; GP, glicerofosfolípidos; SP, esfingolípidos; TG, triglicéridos; DG, diglicéridos; PE, fosfatidiletanolamina; CerP, Ceramida-fosfato

El éster de colesterol 18:2, que aparece incrementado en el grupo leve en el momento diagnóstico, es un lípido que está implicado en procesos biológicos como el transporte y metabolismo lipídico. Además está implicado en procesos de peroxidación lipídica. La identidad de este lípido de esteroles ha sido confirmada por MS/MS lo que le postula como un posible biomarcador pronóstico para diferenciar los pacientes agresivos de los leves desde el inicio de la enfermedad.

4.7 Perfil de ácidos grasos del líquido cefalorraquídeo y suero

Debido a los resultados obtenidos del perfil lipídico se decidió realizar un análisis dirigido de los AG de los tres grupos de estudio tanto en LCR como en suero. El análisis de la composición de ácidos grasos del LCR y del suero tanto de los pacientes como del grupo sin EM permite determinar si existen diferencias en la susceptibilidad al estrés oxidativo en los tres grupos. A continuación se presentan los resultados obtenidos en los tres grupos primero en LCR y después en suero del momento diagnóstico de la enfermedad.

En la **tabla 20** se muestran las diferencias en los tres grupos respecto a la concentración de los 25 AG analizados en LCR. Como se muestra en esta tabla se encontraron diferencias entre grupos en AG concretos. Catorce de los 25 AG analizados presentan diferencias entre dos grupos o más. Lo que se observa en casi todos los AG analizados es que el grupo leve es mucho más parecido al grupo sin EM en la composición de sus AG mientras que el grupo agresivo presenta valores diferentes. En cuanto a los AGS 14:0, 16:0, 20:0, 22:0 y 24:0 el grupo agresivo presenta menor cantidad de los mismos en ocasiones en comparación con el grupo leve y en ocasiones en comparación con el grupo No-EM. En general el grupo agresivo muestra mayor cantidad de AGMI como el 20:1n9 o 22:1n9 y menor cantidad de AG de la serie omega 3 como el 18:3n6. En especial el AG 22:1n9 que se encuentra incrementado en el grupo agresivo. De hecho, los sujetos del grupo agresivo muestran más del doble de concentración de este AG que el grupo leve o el grupo No-EM. Además la identidad de este AG se confirmó por MS/MS con lo que podría ser un buen biomarcador pronóstico para la enfermedad.

Tabla 20. Composición de AG en LCR

	<i>No-EM</i> (%mol)	<i>Leve</i> (%mol)	<i>Agresivo</i> (%mol)	<i>No-EM vs.</i> <i>Leve (p)</i>	<i>Leve vs.</i> <i>Agresivo (p)</i>	<i>No-EM vs.</i> <i>Agresivo (p)</i>
14:0	1,183 ± 0,036	1,666 ± 0,089	0,954 ± 0,294	0,001	0,001	0,166
16:0	27,224 ± 0,41	27,485 ± 0,43	19,39 ± 6,553	0,898	0,010	0,009
16:1n-7	0,909 ± 0,036	0,974 ± 0,044	0,675 ± 0,232	0,464	0,025	0,059
18:1n-9 <i>cis</i>	18,708 ± 0,58	16,613 ± 0,31	14,49 ± 5,164	0,226	0,358	0,070
18:1n-9 <i>trans</i>	2,689 ± 0,075	2,556 ± 0,049	1,953 ± 0,655	0,539	0,060	0,019
18:2n-6	7,593 ± 0,971	6,228 ± 0,457	5,632 ± 2,199	0,317	0,752	0,283
18:3n-6	1,163 ± 0,051	1,509 ± 0,156	0,794 ± 0,277	0,042	0,005	0,097
18:3n-3	0,203 ± 0,029	0,318 ± 0,047	0,116 ± 0,039	0,037	0,011	0,214
18:4n-3	0,913 ± 0,066	0,947 ± 0,112	0,687 ± 0,185	0,794	0,164	0,202
20:0	0,859 ± 0,043	1,033 ± 0,041	0,834 ± 0,013	0,009	0,029	0,758
20:1n-9	1,148 ± 0,053	1,326 ± 0,063	2,542 ± 1,284	0,651	0,037	0,015
20:2n-6	0,418 ± 0,014	0,465 ± 0,029	0,337 ± 0,038	0,141	0,008	0,065
20:3n-6	1,020 ± 0,047	1,046 ± 0,135	0,741 ± 0,258	0,857	0,138	0,154
20:4n-6	3,854 ± 0,240	3,439 ± 0,120	3,045 ± 1,102	0,351	0,524	0,180
20:5n-3	0,168 ± 0,026	0,260 ± 0,061	0,103 ± 0,038	0,129	0,068	0,409
22:0	1,589 ± 0,068	1,004 ± 0,159	1,318 ± 0,068	0,020	0,001	0,038
22:1n-9	13,162 ± 0,79	14,525 ± 2,14	34,72 ± 19,54	0,818	0,024	0,013

22:4n-6	0,193 ± 0,029	0,791 ± 0,048	0,119 ± 0,012	0,806	0,404	0,294
22:5n-6	0,152 ± 0,041	0,153 ± 0,027	0,066 ± 0,011	0,984	0,248	0,232
22:5n-3	0,323 ± 0,034	0,375 ± 0,048	0,130 ± 0,062	0,373	0,007	0,023
24:0	1,749 ± 0,074	1,681 ± 0,031	1,256 ± 0,388	0,640	0,050	0,020
22:6n-3	0,300 ± 0,044	0,376 ± 0,036	0,265 ± 0,039	0,215	0,197	0,664
24:1 n-9	0,731 ± 0,069	0,824 ± 0,053	0,781 ± 0,030	0,314	0,734	0,684
24:5n-3	0,140 ± 0,014	0,150 ± 0,033	0,099 ± 0,032	0,739	0,273	0,363
24:6n-3	0,453 ± 0,029	0,482 ± 0,051	0,283 ± 0,087	0,633	0,026	0,043

Como se muestra en la **tabla 21** el perfil de ácidos grasos en el suero es diferente al del LCR en el momento diagnóstico. En el suero se analizaron 27 AG y las principales diferencias se encuentran entre el grupo control y el grupo leve (7 AG presentan diferencias estadísticamente significativas) mientras que no se encontró ninguna diferencia entre el grupo de enfermos (leve y agresivo) y solo en un AG entre el grupo control y el agresivo. Las diferencias descritas en el LCR no siguen una tendencia tan marcada en suero donde se puede encontrar AGS con niveles bajos en el grupo leve como el 16:0 a la par que AGS con niveles elevados en este mismo grupo como el AGS 20:0.

Tabla 21. Composición de AG en suero

	<i>No-EM</i> (%mol)	<i>Leve</i> (%mol)	<i>Agresivo</i> (%mol)	<i>No-EM vs. Leve</i> (p)	<i>Leve vs. Agresivo</i> (p)	<i>No-EM vs. Agresivo</i> (p)
14:0	0,685 ± 0,036	0,66 ± 0,031	0,665 ± 0,070	0,650	0,942	0,780
14:1	0,067 ± 0,004	0,10 ± 0,013	0,084 ± 0,006	0,004	0,300	0,239
16:0	19,294 ± 0,40	17,471 ± 0,45	18,166 ± 0,617	0,004	0,403	0,152
16:1n-7	1,353 ± 0,070	1,057 ± 0,091	1,141 ± 0,098	0,009	0,576	0,136
18:0	6,667 ± 0,118	6,490 ± 0,129	6,718 ± 0,253	0,348	0,371	0,831
18:1n-9 cis	27,586 ± 0,82	29,854 ± 0,84	28,835 ± 1,670	0,077	0,554	0,443
18:1n-9 trans	1,835 ± 0,135	1,729 ± 0,198	1,518 ± 0,067	0,623	0,468	0,250
18:2n-6	24,798 ± 0,44	25,189 ± 0,62	24,193 ± 1,011	0,614	0,344	0,543
18:3n-6	0,422 ± 0,021	0,368 ± 0,019	0,432 ± 0,056	0,117	0,173	0,833
18:3n-3	0,187 ± 0,010	0,193 ± 0,015	0,194 ± 0,029	0,766	0,976	0,791
18:4n-3	0,130 ± 0,005	0,150 ± 0,007	0,148 ± 0,009	0,018	0,832	0,099
20:0	0,182 ± 0,005	0,211 ± 0,010	0,202 ± 0,013	0,009	0,575	0,139
20:1n-9	0,447 ± 0,028	0,507 ± 0,052	0,560 ± 0,078	0,296	0,501	0,127

20:2n-6	0,256 ± 0,009	0,227 ± 0,010	0,231 ± 0,012	0,036	0,823	0,158
20:3n-6	1,229 ± 0,047	1,024 ± 0,053	1,035 ± 0,058	0,004	0,907	0,034
20:4n-6	4,822 ± 0,149	4,530 ± 0,201	4,945 ± 0,324	0,253	0,229	0,705
20:5n-3	0,282 ± 0,042	0,267 ± 0,031	0,220 ± 0,038	0,792	0,522	0,377
22:0	0,359 ± 0,011	0,448 ± 0,062	0,365 ± 0,016	0,075	0,214	0,934
22:1n-9	5,165 ± 0,432	6,238 ± 0,943	6,942 ± 1,314	0,276	0,596	0,158
22:4n-6	0,162 ± 0,005	0,138 ± 0,007	0,158 ± 0,009	0,008	0,090	0,755
22:5n-6	0,154 ± 0,021	0,141 ± 0,019	0,114 ± 0,006	0,639	0,483	0,268
22:5n-3	0,170 ± 0,009	0,152 ± 0,006	0,155 ± 0,010	0,146	0,848	0,347
24:0	0,152 ± 0,008	0,139 ± 0,007	0,150 ± 0,013	0,270	0,485	0,900
22:6n-3	0,937 ± 0,034	0,940 ± 0,046	0,875 ± 0,063	0,960	0,400	0,394
24:1 n-9	0,298 ± 0,012	0,286 ± 0,011	0,298 ± 0,014	0,466	0,591	0,998
24:5n-3	0,074 ± 0,010	0,073 ± 0,013	0,070 ± 0,015	0,978	0,902	0,879
24:6n-3	2,275 ± 0,722	1,406 ± 0,320	1,569 ± 0,455	0,315	0,889	0,522

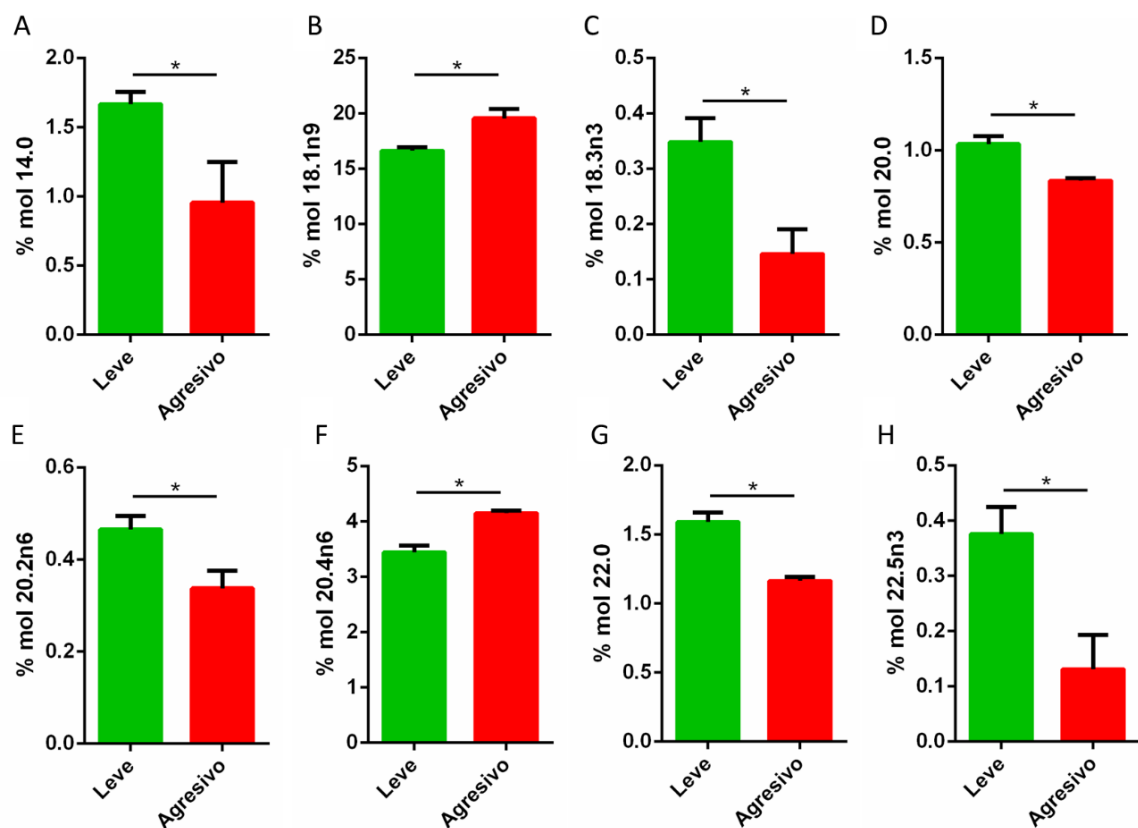


Figura 47. AG diferenciales entre el grupo leve y agresivo en el momento diagnóstico. A) Diferencias en el AGS 14:0. **B)** Diferencias en el AGMI 18:1n9. **C)** Diferencias en el AGPI 18:3n3. **D)** Diferencias en el AGS 20:0. **E)** Diferencias en el AGPI 20:2n6. **F)** Diferencias en el AGPI 20:4n6. **G)** Diferencias en el AGS 22:0. **H)** AGPI 22:5n6. T-test para muestras independientes. Las muestras se analizaron por pull y los resultados se presentan como media ± SEM.

Dado que en el LCR fue donde se encontró un mayor número de lípidos diferenciales entre los grupos leve y agresivo se decidió analizar en este fluido las diferencias que existían entre ambos grupos sin tener en cuenta el grupo sin EM. Se encontraron 8 AG diferenciales que permitirían definir el curso de la EM en el momento diagnóstico. Los lípidos que son significativamente diferentes entre los grupos se presentan en la **figura 47**.

4.7.1 Índices derivados de la composición de AG en el líquido cefalorraquídeo y en suero

A partir de la composición de AG mostrada en la tabla 20 se calculó una serie de índices que indican cambios de forma global. Estos índices se calcularon tanto en el suero como el en LCR de los tres grupos de estudio. Como muestra la **tabla 22**, en LCR, existen diferencias en todos los índices estudiados a excepción de los AGPI y AGPI n6 y el índice de dobles enlaces. Como ocurría con los AG analizados de manera individual, el grupo de pacientes con un curso agresivo de la enfermedad presenta niveles más bajos de AGS y más altos de AGI y de AGMI. Además presenta una longitud media de cadena superior tanto al grupo leve como al grupo No-EM pero, sorprendentemente, un menor índice de peroxidabilidad lipídica.

Tabla 22. Índices calculados mediante la composición de AG en LCR.

	<i>No-EM</i> (%mol)	<i>Leve</i> (%mol)	<i>Agresivo</i> (%mol)	<i>No-EM vs. Leve</i> (p)	<i>Leve vs. Agresivo</i> (p)	<i>No-EM vs. Agresivo</i> (p)
AGS	48,373 ± 3,054	47,243 ± 0,611	32,506 ± 10,532	0,811	0,037	0,021
AGI	51,626 ± 9,658	52,756 ± 1,618	67,493 ± 18,241	0,811	0,037	0,021
AGMI	37,351 ± 2,198	36,821 ± 1,858	55,068 ± 25,682	0,907	0,009	0,008
AGPI	16,900 ± 3,140	15,935 ± 1,474	12,424 ± 7,443	0,587	0,168	0,071
AGPI n-3	2,503 ± 0,555	2,911 ± 0,3612	1,687 ± 0,723	0,130	0,003	0,029
AGPI n-6	10,67 ± 6,658	13,14 ± 1,574	14,50 ± 3,375	0,440	0,317	0,113
IDE	88,70 ± 5,677	86,86 ± 3,848	92,67 ± 3,786	0,456	0,104	0,235
IP	44,40 ± 4,402	44,14 ± 3,579	33,00 ± 16,462	0,940	0,030	0,021
LMC	17,611 ± 0,961	17,646 ± 0,962	18,734 ± 1,733	0,908	0,018	0,011

AGS: Ácidos Grasos Saturados; AGI: Ácidos Grasos Insaturados; AGMI: Ácidos grasos monoinsaturados; AGPI: Ácidos grasos poliinsaturados; IDE: índice de dobles enlaces; IP: índice de peroxidabilidad lipídica; LMC: longitud media de cadena. Los resultados se expresan como la media del % de moles ± SEM

En el suero, como se muestra en la **tabla 23**, se encontraron diferencias en los AGS, AGI y en los AGMI. En este caso, y como ocurría con los AG analizados de manera individual, las principales diferencias aparecen entre el grupo leve y el No-EM. Además, las diferencias obtenidas en ambos fluidos no son comparables ya que, por ejemplo, el LCR el grupo agresivo presenta una menor cantidad de AGS que los otros grupos mientras que en suero es el grupo leve el que presenta valores más bajos de este tipo de AG.

Tabla 23. Índices calculados mediante la composición de AG en suero.

	No-EM (%mol)	Leve (%mol)	Agresivo (%mol)	No-EM vs. leve (p)	Leve vs. agresivo (p)	No-EM vs. agresivo (p)
AGS	27,341 ± 0,498	25,421 ± 0,553	26,269 ± 0,824	0,013	0,409	0,270
AGI	72,658 ± 0,498	74,578 ± 0,553	73,730 ± 0,824	0,013	0,409	0,270
GMI	36,755 ± 0,821	39,774 ± 1,091	39,381 ± 1,626	0,029	0,831	0,134
AGPI	35,903 ± 0,718	34,804 ± 0,736	34,348 ± 1,001	0,293	0,747	0,244
AGPI n-3	4,057 ± 0,724	3,185 ± 0,341	3,234 ± 0,476	0,318	0,967	0,460
AGPI n-6	31,846 ± 0,452	31,618 ± 0,722	31,114 ± 1,052	0,785	0,655	0,493
IDE	135,525 ± 3,674	131,899 ± 1,893	131,707 ± 2,408	0,416	0,975	0,502
IP	79,900 ± 5,695	71,445 ± 3,001	72,670 ± 3,793	0,223	0,896	0,414
LMC	17,392 ± 1,294	17,632 ± 0,710	17,614 ± 0,847	0,131	0,933	0,273

AGS: Ácidos Grasos Saturados; AGI: Ácidos Grasos Insaturados; AGMI: Ácidos grasos monoinsaturados; AGPI: Ácidos grasos poliinsaturados; IDE: índice de dobles enlaces; IP: índice de peroxidabilidad lipídica; LMC: longitud media de cadena. Los resultados se expresan como la media del % de moles ± SEM

el suero por lo que se decidió comparar el grupo leve y agresivo de forma individual. Los resultados de los índices que presentaron diferencias significativas se muestran en la **figura 48**. Al estudiar estos grupos por separado aparecen diferencias estadísticamente significativas entre el grupo leve y agresivo en el índice antiinflamatorio. Este índice muestra valores superiores en el grupo leve lo que podría ser de gran relevancia al comienzo de la enfermedad al tratarse de una enfermedad inflamatoria.

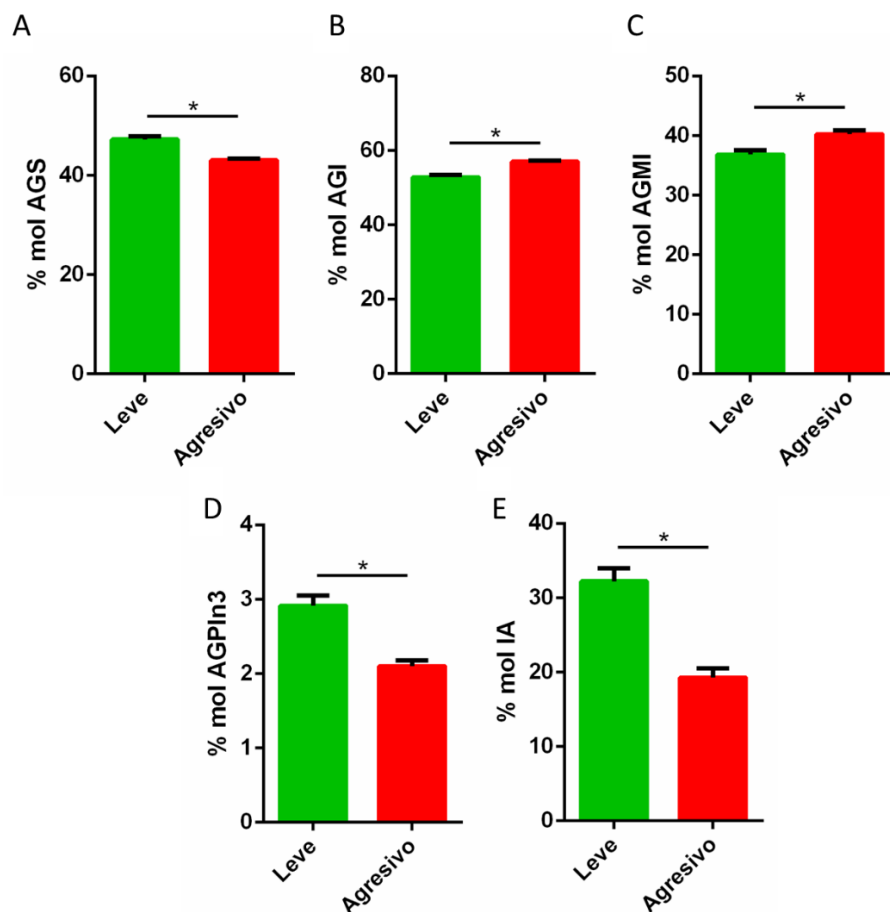


Figura 48. Índices de AG diferenciales entre los grupos leve y agresivo. **A)** Diferencias entre AGS. **B)** Diferencias en los AGI. **C)** Diferencias en los AGMI **D)** Diferencias en los AGPIIn3. **E)** Diferencias en el índice antiinflamatorio. T-test para muestras independiente. Los resultados se expresan como media \pm SEM. Las muestras se han analizado por pull (leve: 7; agresivo: 3).

4.7.2 Estimación de la actividad de las enzimas desaturasas y elongasas en LCR y suero

Una vez estimada la composición de AG del LCR se estimó la actividad de las desaturasas (**tabla 24**) de los tres grupos de estudio. Los resultados obtenidos muestran diferencias estadísticamente significativas entre el grupo leve y el control y entre el leve y el agresivo en el caso de la desaturasa delta 9. La actividad de estas enzimas se estimó en base a los resultados obtenidos de la concentración de los AG, es decir, en base al precursor y al producto de la misma. Para verificar los resultados sería necesario un análisis concreto de las enzimas de las que se ha estimado la actividad.

Tabla 24. Actividad estimada de las desaturadas en LCR

		No-EM (%mol)	Leve (%mol)	Agresivo (%mol)	No-EM vs. Leve (p)	Leve vs. Agresivo (p)	No-EM vs. Agresivo (p)
$\Delta 9$ (n-7)	16:1/16:0	0,033 ± 0,001	0,035 ± 0,002	0,034 ± 0,001	0,445	0,790	0,766
$\Delta 9$ (n-9)	18:1/18:0	1,421 ± 0,085	1,207 ± 0,028	1,566 ± 0,039	0,048	0,020	0,293
$\Delta 5$ (n-6)	20:4/20:3	3,778 ± 0,172	3,887 ± 0,847	4,017 ± 0,132	0,876	0,894	0,798
$\Delta 6$ (n-3)	24:6/24:5	3,487 ± 0,392	4,464 ± 1,286	2,869 ± 0,104	0,383	0,311	0,677
$\Delta 6$ (n-3)	18:4/18:3	5,345 ± 0,886	3,746 ± 0,896	6,158 ± 0,801	0,216	0,184	0,631

Como se muestra en la **tabla 25** las diferencias que se encontraron en el suero a nivel de desaturadas es diferente a las diferencias que se encontraron en el LCR. En el caso del suero se han encontrado diferencias entre el grupo leve y el control en la desaturasa delta 9 (n-7) y en la desaturasa delta 5 (n-6) entre el grupo control y el agresivo.

Tabla 25. Actividad estimada de las enzimas desaturadas en suero

		No-EM (%mol)	Leve (%mol)	Agresivo (%mol)	No-EM vs. Leve (p)	Leve vs. Agresivo (p)	No-EM vs. Agresivo (p)
$\Delta 9$ (n-7)	16:1/16:0	0,069 ± 0,002	0,058 ± 0,003	0,062 ± 0,004	0,020	0,496	0,261
$\Delta 9$ (n-9)	18:1/18:0	4,231 ± 0,159	4,682 ± 0,170	4,461 ± 0,342	0,076	0,516	0,476
$\Delta 5$ (n-6)	20:4/20:3	4,168 ± 0,168	4,727 ± 0,274	5,029 ± 0,453	0,087	0,490	0,039
$\Delta 6$ (n-3)	24:6/24:5	33,367 ± 9,64	25,94 ± 3,368	25,045 ± 5,49	0,512	0,953	0,564
$\Delta 6$ (n-3)	18:4/18:3	0,849 ± 0,101	0,884 ± 0,059	0,868 ± 0,072	0,782	0,927	0,905

Se estimó también la actividad de las elongasas como se muestra en la **tabla 26**. En el LCR se encontraron diferencias significativas en 4 de las 9 elongasas de las que se estimó su actividad. El grupo leve con el agresivo y el No-EM con el agresivo son los que presentan mayores diferencias en la actividad de estas enzimas. Dado que la actividad estimada es resultado de los AG analizados de manera individual se encuentra una misma tendencia en cuanto a las diferencias entre los tres grupos de estudio.

Tabla 26. Actividad estimada de las elongasas en LCR

	<i>No-EM</i> (%mol)	<i>Leve</i> (%mol)	<i>Agresivo</i> (%mol)	<i>No-EM vs.</i> <i>Leve (p)</i>	<i>Leve vs.</i> <i>Agresivo</i> (<i>p</i>)	<i>No-EM vs.</i> <i>Agresivo</i> (<i>p</i>)
<i>Elovl 3 (n-9)</i>	0,062 ± 0,003	0,080 ± 0,004	0,456 ± 0,391	0,878	0,032	0,020
<i>Elovl 6</i>	0,492 ± 0,017	0,501 ± 0,011	0,459 ± 0,012	0,675	0,178	0,265
<i>Elovl 1-3-7</i>	0,064 ± 0,002	0,075 ± 0,004	0,146 ± 0,077	0,643	0,043	0,017
<i>Elovl 1-3-7</i>	1,537 ± 0,034	1,558 ± 0,099	1,202 ± 0,188	0,840	0,024	0,026
<i>Elovl 1-3-7</i>	1,360 ± 0,093	1,069 ± 0,049	1,181 ± 0,246	0,043	0,557	0,328
<i>Elovl 5 (n-6)</i>	0,062 ± 0,007	0,076 ± 0,006	0,103 ± 0,055	0,453	0,326	0,121
<i>Elovl 2-5 (n-6)</i>	2,259 ± 0,354	2,062 ± 0,544	1,569 ± 0,682	0,753	0,575	0,413
<i>Elovl2-5 (n-3)</i>	0,054 ± 0,010	0,054 ± 0,016	0,059 ± 0,027	0,986	0,852	0,856
<i>Elovl2 (n-3)</i>	2,472 ± 0,300	3,397 ± 0,895	1,479 ± 0,533	0,257	0,100	0,359

En el caso del suero 3 elongasas presentaron diferencias entre el grupo leve y el grupo No-EM. Las diferencias se muestran en la **tabla 27**.

Tabla 27. Actividad estimada de las enzimas elongasas en suero

	<i>No-EM</i> (%mol)	<i>Leve</i> (%mol)	<i>Agresivo</i> (%mol)	<i>No-EM</i> <i>vs. Leve</i> (<i>p</i>)	<i>Leve vs.</i> <i>Agresivo</i> (<i>p</i>)	<i>No-EM vs.</i> <i>Agresivo</i> (<i>p</i>)
<i>Elovl 3 (n-9)</i>	0,017 ± 0,001	0,018 ± 0,002	0,022 ± 0,005	0,916	0,313	0,251
<i>Elovl 6</i>	0,350 ± 0,007	0,376 ± 0,007	0,373 ± 0,013	0,019	0,820	0,107
<i>Elovl 1-3-7</i>	0,027 ± 0,001	0,033 ± 0,002	0,031 ± 0,002	0,016	0,441	0,278
<i>Elovl 1-3-7</i>	2,054 ± 0,079	2,248 ± 0,313	1,879 ± 0,107	0,447	0,286	0,592
<i>Elovl 1-3-7</i>	0,459 ± 0,034	0,429 ± 0,063	0,422 ± 0,039	0,634	0,936	0,648
<i>Elovl 5 (n-6)</i>	0,010 ± 0,001	0,009 ± 0,001	0,009 ± 0,001	0,032	0,354	0,478
<i>Elovl 2-5 (n-6)</i>	0,817 ± 0,047	0,764 ± 0,059	0,938 ± 0,101	0,501	0,102	0,226
<i>Elovl2-5 (n-3)</i>	0,035 ± 0,001	0,031 ± 0,001	0,033 ± 0,002	0,194	0,602	0,639
<i>Elovl2 (n-3)</i>	3,854 ± 0,427	3,487 ± 0,381	2,991 ± 0,325	0,522	0,521	0,239

Dado que nuevamente es en el LCR donde más enzimas muestran diferencias estadísticamente significativas entre los grupos se decidió realizar el análisis de las

elongasas y desaturasas para establecer su poder pronóstico. Los resultados de las enzimas que mostraron diferencias significativas se muestran en la **figura 49**.

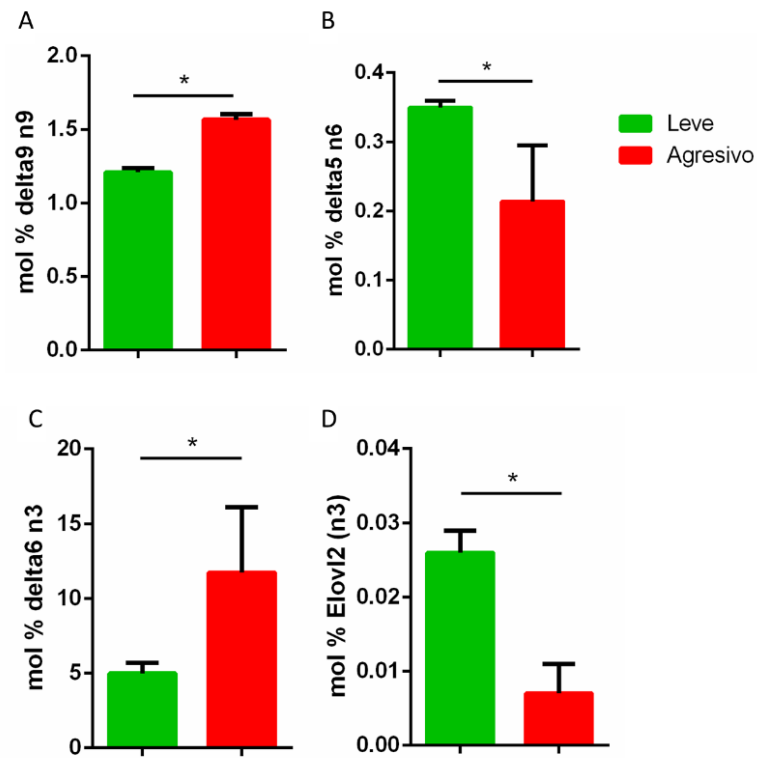


Figura 49. Elongasas y desaturasas diferenciales entre el grupo leve y agresivo. A) Resultados de la enzima $\Delta 9$ (n-9). P = 0,001. **B)** Resultados de la enzima $\Delta 5$ (n-6). P = 0,029. **C)** Resultados de la enzima $\Delta 6$ (n-3). P = 0,046. **D)** Resultados de la enzima elongasa 2 (n3). P= 0.006. T-test para muestras independientes. Los resultados se expresan como media \pm SEM.

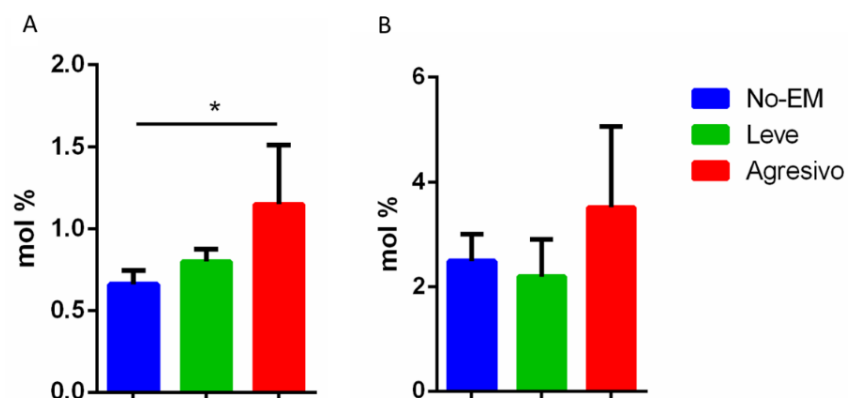


Figura 50. Beta-oxidación peroxisomal. A) Resultados de la beta-oxidación peroxisomal en LCR. **B)** resultados de la beta oxidación peroxisomal en suero. T-test para muestras independientes, p = 0.031. Se analizaron las muestras de LCR por pull y las muestras de suero de manera individual. Los resultados se expresan como media \pm SEM.

Finalmente se analizó la beta-oxidación peroxisomal (22:6/24:6) entre los tres grupos. Como se muestra en la **figura 50** existen diferencias significativas entre el grupo control

y agresivo en el LCR pero no en el plasma aunque la tendencia se mantiene entre los dos fluidos. Cuando se analizó solo en los grupos leve y agresivo no se observaron diferencias entre los grupos.

Los resultados del perfil de AG muestran diferencias entre LCR y suero que indican que el LCR, es un mejor predictor del curso clínico que no el suero.

4.8 Daño oxidativo proteico y anticuerpos contra lipoproteínas de baja densidad oxidadas

Tras realizar el análisis del perfil de AG en el momento diagnóstico de los pacientes con EM y del grupo considerado control se realizó un análisis de diferentes biomarcadores de daño oxidativo proteico con el objetivo de conocer si existen alteraciones desde el inicio de la enfermedad.

Tabla 28. Marcadores de daño oxidativo en LCR del grupo leve, agresivo y control

	<i>No-EM</i> ($\mu\text{mol/mol}$ lisina)	<i>Leve</i> ($\mu\text{mol/mol}$ lisina)	<i>Agresivo</i> ($\mu\text{mol/mol}$ lisina)	<i>No-EM vs.</i> <i>Leve (p)</i>	<i>Leve vs.</i> <i>agresivo (p)</i>	<i>No-EM vs.</i> <i>agresivo (p)</i>
<i>AHAV/GSA</i>	6575,635 \pm 412,644	5119,553 \pm 295,470	6388,524 \pm 413,64	0,017	0,236	0,805
<i>CEL</i>	202,255 \pm 24,467	196,168 \pm 28,143	141,848 \pm 15,011	0,862	0,278	0,213
<i>CML</i>	1821,829 \pm 130,882	1896,168 \pm 208,976	1656,436 \pm 222,128	0,749	0,458	0,596
<i>MDAL</i>	210,445 \pm 25,169	199,410 \pm 51,262	53,207 \pm 30,989	0,642	0,039	0,029
<i>CMC</i>	291,066 \pm 36,657	294,886 \pm 31,770	298,038 \pm 119,793	0,949	0,970	0,931
<i>SC</i>	23,584 \pm 2,630	24,454 \pm 1,616	21,918 \pm 4,177	0,749	0,655	0,825

Los valores se expresan como media \pm SEM de los 18 pools de LCR. **AHAV**: ácido 5-hidroxi-2-aminovalénico; **GSA**: semialdehído glutámico; **MDAL**: malondialdehído lisina; **CEL**: carboxietil lisina; **CMC**: carboximetil cisteína; **CML**: carboximetil lisina; **SC**: succinil cisteína

Como se muestra en la **tabla 28** en el momento diagnóstico se encontraron diferencias en el LCR en dos marcadores de daño oxidativo. Se encontraron diferencias entre el grupo sin EM y el leve en el caso de GSA, que presenta niveles inferiores en el grupo

leve. Además, existen diferencias entre el grupo leve y agresivo y entre el grupo sin EM y el agresivo en el biomarcador de daño oxidativo el MDAL donde el grupo agresivo presenta niveles inferiores a los otros dos grupos de estudio.

Tabla 29. Marcadores de daño oxidativo en suero del grupo leve, agresivo y control

	<i>No-EM</i> ($\mu\text{mol/mol}$ lisina)	<i>Leve</i> ($\mu\text{mol/mol}$ lisina)	<i>Agresivo</i> ($\mu\text{mol/mol}$ lisina)	<i>No-EM vs.</i> <i>Leve (p)</i>	<i>Leve vs.</i> <i>agresivo (p)</i>	<i>No-EM vs.</i> <i>agresivo (p)</i>
<i>AHAV/GSA</i>	8206,544 \pm 406,346	9649,738 \pm 481,643	8177,097 \pm 484,33	0,047	0,077	0,725
<i>CEL</i>	150,429 \pm 11,503	202,503 \pm 17,124	168,805 \pm 30,251	0,014	0,247	0,506
<i>CML</i>	2647,396 \pm 219,160	3826,40 \pm 348,046	2644,683 \pm 413,465	0,003	0,029	0,996
<i>MDAL</i>	3479,287 \pm 1164,61	11083,55 \pm 2636,25	613,525 \pm 274,997	0,003	0,004	0,408
<i>CMC</i>	437,381 \pm 112,578	826,746 \pm 151,751	278,149 \pm 62,951	0,027	0,031	0,509
<i>2-SC</i>	39,673 \pm 6,923	92,381 \pm 17,041	39,218 \pm 7,446	0,001	0,018	0,197

Los valores se expresan como media \pm SEM de las 110 muestras de suero analizadas. **AHAV**: ácido 5-hidroxi-2-aminovalénico; **GSA**: semialdehído glutámico; **MDAL**: malondialdehído lisina; **CEL**: carboxietil lisina; **CMC**: carboximetil cisteína; **CML**: carboximetil lisina; **SC**: succinil cisteína

Cuando se realizó el análisis de este daño oxidativo proteico procedente de diferentes fuentes de oxidación, en el suero, se pudo ver que existen también diferencias entre el grupo leve y el utilizado como control en el marcador de GSA que procede de la carbonilación de glutámico y se determina a través del AHAV que es un metabolito derivado del mismo. Nuevamente, la distribución que sigue este marcador en los 3 grupos no es la misma en suero y en LCR. En suero los niveles más elevados los presenta el grupo leve mientras que en LCR era el grupo sin EM. También se encontraron diferencias significativas entre el grupo leve y el control en el resto de marcadores de oxidación que se analizaron. Las principales diferencias se encontraron entre el grupo No-EM y el leve pero también se encontraron diferencias entre el grupo leve y agresivo en algunos de los marcadores. Los resultados se presentan en la **tabla 29**.

Respecto a este marcador el suero muestra mayores diferencias que el LCR y por tanto podría ser mejor fluido para estudiar el pronóstico. Cuando se analizaron los cambios

entre el grupo leve y agresivo se obtuvieron diferencias en todos los marcadores de oxidación a excepción del CEL. Los resultados se muestran en la **tabla 30**.

Tabla 30. Marcadores de daño oxidativo en suero del grupo leve y agresivo

	Leve ($\mu\text{mol/mol}$ lisina)	Agresivo ($\mu\text{mol/mol}$ lisina)	Leve vs. agresivo (p)
AHAV/GSA	9649.731 \pm 481.642	8177.095 \pm 484.300	0,037
CEL	202.503 \pm 17.124	168.809 \pm 30.251	0,305
CML	3826.402 \pm 348.005	2644.681 \pm 413.443	0,035
MDAL	11083.558 \pm 2636.209	613.522 \pm 274.998	0,020
CMC	826.748 \pm 151.751	278.140 \pm 62.959	0,032
2-SC	92.381 \pm 17.041	39.219 \pm 7.447	0,006

Finalmente se decidió analizar los Ac contra especies lipídicas oxidadas ya que los cambios encontrados en el perfil de AG sugerían posibles diferencias en términos de oxidación. Se realizó este análisis de los tres grupos de estudio tanto en LCR como en suero. Como se muestra en la **figura 51 A** en el LCR se encontraron diferencias significativas entre los controles y el grupo de pacientes leve así como entre los controles y el grupo de pacientes agresivo. El grupo leve muestra la mayor concentración de Ac contra especies lipídicas oxidadas, seguido por el grupo agresivo aunque sin que las diferencias sean significativas entre los grupos. El grupo control es el que menor concentración muestra de estas especies. En el suero, no se encontraron diferencias entre los grupos como se muestra en la **figura 51 B**. Cuando se realizó el análisis de forma aislada del grupo leve y agresivo estos grupos no mostraron diferencias significativas entre ellos ($p = 0,401$).

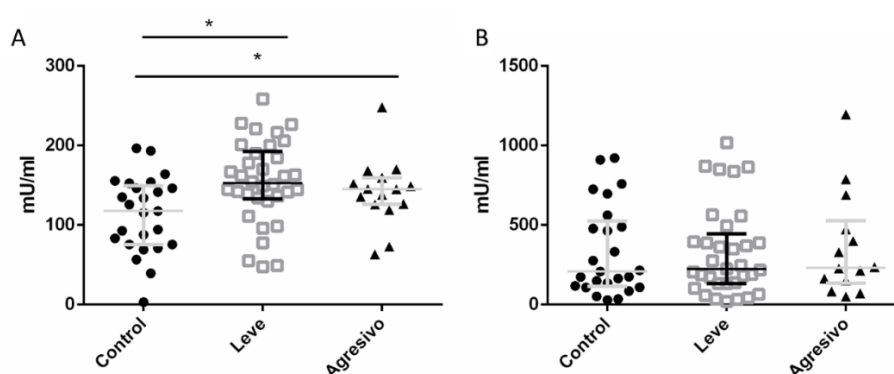


Figura 51. Ac contra especies lipídicas oxidadas en LCR. Los resultados muestran la distribución de cada muestra: controles $n = 25$, Leve $n = 30$, Agresivo $n = 14$. Los resultados se han obtenido mediante ANOVA de un factor y DMS como estudio Pos-Hoc. Control vs. Leve $p = 0.001$, Control vs. Agresivo $p = 0.046$.

DISCUSIÓN

5. DISCUSIÓN

5.1 Los pacientes con esclerosis múltiple presentan menor concentración de la vitamina 25D3 en plasma

La deficiencia de vitamina D ha demostrado ser uno de los factores de riesgo más importantes a la hora de desarrollar EM (Sayonara R. Oliveira et al., 2017; Pierrot-Deseilligny & Souberbielle, 2017). En el presente estudio, los resultados confirman una disminución de la concentración de la vitamina 25D3 en los pacientes con EM respecto del grupo control. Diversos estudios han demostrado estos hallazgos previamente (Hewer et al., 2013; Pierrot-Deseilligny & Souberbielle, 2017) lo que permitió confirmar que la cohorte de pacientes seleccionados se comporta de manera similar a otras cohortes de pacientes en relación a la vitamina D. En el análisis que se realizó, 6 metabolitos diferentes de esta vitamina fueron estudiados. Sin embargo, solo se obtuvieron diferencias significativas en la vitamina 25D3. Esta isoforma es producida a través de oxidaciones en el citocromo p450 a partir de su precursor dietario (Sintzel et al., 2018). Uno de los motivos por los que no se han podido encontrar diferencias en los otros metabolitos de esta enzima podría ser debido a su inestabilidad y a la variabilidad de los resultados obtenidos lo que justifica que la mayor parte de análisis se realicen midiendo la vitamina 25D3. Hoy en día, en la práctica clínica habitual, todos los pacientes con EM que tienen déficit de vitamina 25D3 toman suplementos de la misma, entre otros motivos, por las propiedades inmunomoduladoras que tiene (Fyfe, 2016).

Como era de esperar y han demostrado otros estudios previamente, sí se encontraron diferencias en la concentración de la vitamina 25D3 en los pacientes suplementados respecto a los que no lo están (Berezowska et al., 2019; Jagannath et al., 2018). Las diferencias que se encontraron entre el grupo control y los pacientes suplementados *versus* los no suplementados son diferentes. Para encontrar una explicación al efecto de la suplementación serían necesarios estudios del metabolismo de la vitamina D en estos sujetos.

Por último, se ha demostrado que los pacientes suplementados con vitamina D no solo presentan mayor cantidad de la vitamina D3 sino también de la vitamina 24,25D3. Esta

forma de la vitamina aparece tras la desactivación de la forma activa aunque también se le conocen funciones propias (Aronov et al., 2008). Una posible explicación a este resultado sería un incremento de la actividad de las enzimas del metabolismo de la vitamina D que tiene lugar al suplementar a los pacientes con la misma.

Estos resultados confirman nuevamente las alteraciones de la vitamina D que son comunes en los pacientes con EM. Además, en el estudio se incluyeron otros metabolitos de la vitamina lo que podría llevar a la comprensión de las alteraciones en el metabolismo que pueden existir en estos pacientes.

5.2 Los pacientes con esclerosis múltiple presentan menor capacidad antioxidante en plasma que el grupo control

Se ha demostrado, mediante dos técnicas diferentes, que los pacientes con EM presentan una menor capacidad antioxidante en el plasma comparados con el grupo control. Otros estudios han demostrado estos mismos resultados mediante otros métodos como el *total antioxidant capacity* (TAC) (Armon-Omer et al., 2019; Karlík et al., 2015) con lo que la evidencia de que existe una alteración de la capacidad antioxidante en los pacientes con EM es cada vez más robusta.

El AU, debido a su estructura, actúa como un antioxidante natural que se ha demostrado que presenta valores por debajo de la media en los enfermos de EM (Wang et al., 2016); por otro lado se ha propuesto como biomarcador de actividad de la enfermedad debido a que presenta diferentes concentraciones en función del curso clínico de la enfermedad (Simental-Mendía, & Guerrero-Romero, 2017). Los resultados del presente estudio, en concordancia con los mencionados, muestran una menor concentración de esta molécula en los pacientes con EM. Además, se ha demostrado una correlación positiva y significativa entre los niveles del AU y la capacidad antioxidante medida por FRAP, de hecho, en el modelo presentado, se demuestra que la capacidad antioxidante analizada por el método FRAP está altamente condicionada por la concentración del AU. La significación entre el grupo control y los pacientes se pierde al tener en cuenta la concentración de AU que presenta cada sujeto. Estos resultados se justifican por el principio del método FRAP ya que este analiza la capacidad de una muestra de reducir el hierro férrico a hierro ferroso y se ve afectado

por la concentración de AU, lo que justifica la correlación significativa positiva que encontramos en nuestros sujetos y además los resultados obtenidos con el modelo de regresión lineal (Benzie & Strain, 1996).

Por otra parte, se ha demostrado que la capacidad antioxidante analizada por el método ABTS no está condicionada por la concentración del AU. Este hecho puede ser debido a que este método analiza la reducción del ABTS que ocurre en presencia de antioxidantes donadores de hidrógeno (Miller et al., 1993; Re et al., 1999) y no en presencia de AU, por lo que este metabolito no interfiere en estas mediciones.

El EO está implicado en la fisiopatología de la EM, como se ha descrito en la introducción. Los resultados del estudio llevado a cabo confirman que el plasma de los pacientes tiene un déficit de capacidad antioxidante. Por otro lado, a nivel del SNC, se ha descrito un déficit de esta capacidad junto con un aumento de la producción de ROS (Barcelos, Troxell, & Graves, 2019) lo que parece indicar que el EO no solamente tiene una implicación relevante a nivel del SNC sino también a nivel periférico. Ambos procesos tienen como consecuencia un aumento del EO que a su vez provoca alteraciones a nivel mitocondrial (Patergnani et al., 2017). En la EM se han detectado alteraciones mitocondriales a nivel del SNC conjuntamente con un incremento en la producción de lactato (Albanese et al., 2016) y además este incremento ha sido detectado también en suero de pacientes (Amorini et al., 2014).

5.3 Los pacientes con esclerosis múltiple muestran una mayor concentración de lactato en plasma

Los resultados de nuestro estudio muestran un incremento de la concentración de lactato en el plasma de los pacientes con EM. Los estudios realizados por Mahler et al. (Mähler et al., 2012) no encontraron diferencias significativas en la concentración de lactato en el plasma de los pacientes, pero un estudio más reciente con un total de 1238 sujetos muestra un incremento en la concentración de lactato en suero y propone además esta molécula como un potencial biomarcador para la enfermedad (Amorini et al., 2014).

Alteraciones a nivel mitocondrial tienen como consecuencia un aumento de la producción de lactato, hecho que a su vez causa más alteraciones en la propia

mitocondria. Además, los niveles de lactato aumentan en función del grado de inflamación (Pucino et al., 2017) y se ha hipotetizado que tanto el cambio metabólico de las placas del SNC como el metabolismo de las células del SI pueden incrementar la producción de lactato y éste podría cruzar la BHE extendiéndose sistémicamente (Amorini et al., 2014).

Un incremento en la producción de lactato se ha relacionado con un incremento del EDSS, hecho que no hemos observado en nuestros pacientes (**Anexo 6**) probablemente debido a que nuestra cohorte tiene una puntuación menor o igual de 3 en esta escala.

Dada la posible relación entre el incremento de lactato, el SI y los defectos mitocondriales se hace necesario estudiar el estado redox de las PBMCs de los pacientes con EM para establecer la existencia de modificaciones que ayudaran a mejorar el conocimiento la fisiopatología de la enfermedad.

5.4 Los pacientes con esclerosis múltiple presentan alteraciones en el estado redox de sus células mononucleares de sangre periférica

5.4.1 Los pacientes con esclerosis múltiple consumen más oxígeno que el grupo control

Las células modulan la CTE con el objetivo de producir la energía necesaria para su funcionamiento normal. Mediante respirometría de alta resolución se ha determinado el consumo de oxígeno de las PBMCs de los pacientes y los controles observando que los primeros consumen una mayor cantidad de oxígeno en los diferentes estados analizados.

En discrepancia con estos resultados se encuentra el estudio de De Riccardis (De Riccardis et al., 2015) que muestra un menor consumo de oxígeno en LT CD4+ de pacientes con EM comparado con un grupo control. Estos experimentos, además de contemplar solo la población de LT CD4+ y no del conjunto de las PBMCs, se han obtenido con otro equipo y en diferentes condiciones ya que en nuestro caso se trabajó con células intactas y en el estudio de De Riccardis se permeabilizaron los LT

CD4+ para realizar el análisis. Estas discrepancias en la metodología y el hecho de analizar diferentes tipos celulares en uno y otro experimento podrían explicar el hecho de que los resultados de los estudios no vayan en la misma línea.

Los resultados de este estudio muestran un mayor consumo de oxígeno, también, tras la inhibición de la ATP sintasa mediante la oligomicina. En este estado se analiza el consumo de oxígeno en reposo que compensa la fuga de protones y la circulación a través de la membrana mitocondrial externa (Michalak et al., 2017). Un mayor consumo de oxígeno en este estado implica una teórica destinación de oxígeno mayor, a la producción de ATP (Kener et al., 2018). Estudios realizados a nivel del SNC concuerdan con estos hallazgos ya que estos también han reportado un aumento del consumo de oxígeno tras la adición de la oligomicina (Errea et al., 2015).

Un mayor consumo de oxígeno tras la adición del FCCP indica una capacidad máxima teórica de las PBMCs de los pacientes con EM y un incremento del consumo tras la adición de antimicina indica que una mayor cantidad de oxígeno se consume a través de procesos que no son la respiración celular, uno de los cuales puede ser la producción de ROS.

En otras enfermedades neurodegenerativas como el Alzheimer se ha encontrado un incremento de la actividad de algunos complejos de la CTE en PBMCs, lo que permite hipotetizar sobre hipermetabolismo de estas células (Feldhaus et al., 2011). Los resultados presentados van en concordancia con esta hipótesis.

5.4.2 Las células mononucleares de sangre periférica de los pacientes con esclerosis múltiple tienen un menor número de mitocondrias

Diversos estudios han analizado alteraciones mitocondriales a nivel del SNC (G. R. Campbell & Mahad, 2012; Errea et al., 2015; Patergnani et al., 2017). Sin embargo, el número de estudios a nivel periférico es mucho menor (Silaidos et al., 2018). Con este trabajo es la primera vez que se describe que las PBMCs de los pacientes con EM tienen un menor número de mitocondrias. Un menor número de mitocondrias podría implicar una mayor dificultad para producir la energía celular necesaria a la par que un incremento de la producción de RL debido a la necesidad celular de producir la misma energía con un menor número de mitocondrias. A nivel del SNC se ha observado un

aumento de fusión de las mitocondrias a la par que un aumento de la complejidad de las mismas en respuesta a EO (Errea et al., 2015). Si estos mismos hechos estuvieran ocurriendo a nivel del SI podrían explicar la disminución que encontramos en el número de mitocondrias en los pacientes respecto al grupo control pero más experimentos son necesarios con el objetivo de establecer una causa o consecuencia de estas diferencias.

5.4.3 Las células mononucleares de sangre periférica de los pacientes con esclerosis múltiple producen menos ATP

A pesar de que teóricamente los pacientes con EM consumen una mayor cantidad de oxígeno relacionado con la producción de ATP que los controles, este hecho no se produce en la cohorte analizada. La habilidad teórica, calculada mediante respirometría, muestra que los pacientes del estudio tienen una menor habilidad para producir ATP, hecho que se confirmó cuando se analizó la cantidad de ATP que tienen las PBMCs. La concentración de ATP en las PBMCs de los pacientes es significativamente menor que en los controles. Una menor cantidad de ATP tiene consecuencias importantes para cualquier tipo celular. En diferentes enfermedades neurodegenerativas como el Alzheimer, la ELA y el Parkinson se han reportado alteraciones en la producción de ATP en diferentes tipos celulares aunque casi siempre a nivel del SNC (Camandola & Mattson, 2017; Haider, 2015; Uttara et al., 2009). Concretamente en la EM se ha demostrado una menor producción de ATP en las mitocondrias de la sustancia blanca del cerebro (G. Campbell, Licht-Mayer, & Mahad, 2019).

5.4.4 Las células mononucleares de sangre periférica de los pacientes no muestran diferencias en el potencial de membrana mitocondrial respecto a los controles

El análisis del potencial de membrana mitocondrial de las PBMCs (ajustado por el número de mitocondrias) no refleja diferencias entre el grupo control y los pacientes con EM. Un estudio realizado con acetato de glatirámico (tratamiento modificador de la enfermedad) muestra que el potencial de membrana mitocondrial se encuentra

incrementado en el momento de comenzar el tratamiento y va disminuyendo hasta igualarse a los niveles del grupo control tras 1 año de tratamiento (De Riccardis et al., 2016). Esto demuestra que el potencial de membrana mitocondrial es una variable que cambia a lo largo de la enfermedad con lo que estudios a diferentes tiempos serían necesarios para validar los datos. El estudio de esta tesis es un estudio transversal que muestra que no existen diferencias en este parámetro entre los dos grupos.

5.4.5 Los linfocitos T de los pacientes producen más superóxido que los de los controles

Los resultados que se obtuvieron muestran que las PBMCs de los pacientes producen una mayor cantidad de superóxido que los controles. Estos resultados suponen una validación de los publicados recientemente por nuestro grupo de investigación en un menor número de sujetos (Gonzalo et al., 2019). Hasta donde llega nuestro conocimiento, no se había demostrado previamente un incremento de la producción de superóxido por parte de las PBMCs de los pacientes con EM.

Estos resultados van en la misma línea que otros reportados a nivel del SNC. En concreto, se ha demostrado un incremento de la producción de superóxido en oligodendrocitos a los que se les ha inducido un daño mitocondrial (Sghaier et al., 2019). También se ha demostrado que en el plasma de los pacientes con EM existe un incremento del EO analizado mediante tert-butil hidroperóxido y óxido nítrico (Sayonara Rangel Oliveira et al., 2012). El análisis de otros biomarcadores de EO en plasma ha reportado los mismos resultados: un incremento del EO en los pacientes con EM respecto a un grupo control (Tasset et al., 2012).

Cuando se analizó por separado la producción de superóxido por los LT y LB se observó que son los LT los responsables de estas diferencias generales que se encontraron ya que presentan niveles significativamente más altos en los pacientes que en los controles.

Se ha demostrado que los LT dependen parcialmente de la concentración de superóxido para su activación (Terrazzano et al., 2014). La EM es una enfermedad autoinmune lo que puede explicar que estas células del SI se encuentren activas y que a su vez tengan una mayor producción de superóxido que puede ser debido a un

incremento de la actividad o a defectos mitocondriales de estas células. Teniendo en cuenta la importancia de las células T en la enfermedad los tratamientos que van dirigidos a disminuir el tráfico de estas células hacia el SNC reducen no solo la inflamación sino el EO en el SNC que es una de las causas de la neurodegeneración (J. Y. Lee, Taghian, & Petratos, 2014).

5.4.6 Las mononucleares de sangre periférica de los pacientes tienen menor cantidad de complejos I, III y V de la cadena respiratoria

Los resultados del presente estudio muestran una menor cantidad de los complejos I, III y V de la CTE. En el estudio de De Riccardis (De Riccardis et al., 2015) se encontraron diferencias en la cantidad de complejo I de la CTE aunque no en el complejo III. En este estudio no se analizó el complejo V y sí se encontraron diferencias en el complejo IV. Análisis post-mortem del cortex de enfermos con EM revelaron una reducción en la expresión de 26 subunidades de los complejos I, III y IV de la CTE (Witte et al., 2014) aunque no se encontraron diferencias en la cantidad del complejo V. Los resultados mencionados en comparación con los del estudio representan poblaciones celulares diferentes por lo que no se puede extraer una conclusión general respecto a esta alteración en la enfermedad.

5.4.7 Los pacientes muestran una tendencia de concentración superior de enzimas antioxidantes

No se ha detectado un incremento de las enzimas SOD2 y catalasa aunque sí parece que exista una tendencia a aumentar en los pacientes con EM. Otros estudios han observado resultados en la línea de esta tendencia superior en concreto en oligodendrocitos expuestos a un EO. Estas células muestran un incremento de las enzimas glutatión peroxidasa, catalasa y SOD (Sghaier et al., 2019). Por otro lado, estudios realizados solo con LT CD4+ obtienen, nuevamente, resultados opuestos a los nuestros (De Riccardis et al., 2016). A pesar de que no se han encontrado diferencias significativas, se hipotetiza que podrían existir debido al incremento de la cantidad de superóxido que se ha descrito pero más estudios son necesarios para confirmar si esta tendencia es real o no.

5.4.8 Resumen del estado redox de las mononucleares de sangre periférica de los pacientes con EM

Las células de los pacientes del estudio realizado consumen una mayor cantidad de oxígeno, lo que está directamente relacionado con una mayor producción de superóxido hecho que se ha podido demostrar a nivel general en las PBMCs y en los LT en concreto. Por otro lado, estas células presentan un menor número de mitocondrias y además una menor cantidad de los complejos I, III y V de la CTE lo que implicaría que estas mitocondrias de los pacientes están trabajando a mucha mayor capacidad que las mitocondrias de los controles lo que puede provocar también un incremento de la producción de RL como el superóxido.

Hay una relación muy estrecha entre producción de ROS y fuga de protones (Parker, et al., 2009). En este estudio se ha descrito que los pacientes producen más superóxido y además tienen un mayor consumo de oxígeno durante la fuga de protones, es decir, tras la inhibición del complejo V de la CTE con oligomicina.

Por otro lado, un mayor consumo de oxígeno debería traducirse en una mayor producción de ATP, hecho que no se produce en las PBMCs de los pacientes con EM. Las PBMCs de estos pacientes consumen significativamente más oxígeno que las de los controles pero muestran una concentración significativamente menor de ATP lo que implica una eficiencia muy baja por parte de estas células a la hora de producir energía y por tanto podría implicar también un fallo energético de las mismas.

Con los resultados que se han obtenido es posible hipotetizar que la activación de las mitocondrias en primera instancia produce un incremento de la producción de ATP que va acompañado de un incremento de la producción de ROS. Estos ROS dañan la propia mitocondria lo que probablemente produzca una disminución de la producción de ATP cuando el EO se alarga en el tiempo.

Se ha encontrado un menor número de mitocondrias en estas células a pesar de que consumen mayor cantidad de oxígeno. A nivel del SNC otros estudios han demostrado un incremento del tamaño y complejidad de las mitocondrias tras provocar un aumento del EO lo que puede sugerir un esfuerzo por parte de las mismas para incrementar la producción de energía tras un daño agudo. Resultados de este mismo

estudio, a nivel del SNC, permiten sugerir que las mitocondrias responden aumentando las necesidades metabólicas de los axones al incrementar el EO (Errea et al., 2015). Esta respuesta, es decir, una adaptación por parte de las mitocondrias de los pacientes a nivel del SNC, podría estar ocurriendo también a nivel del SI.

No se han encontrado diferencias en el potencial de membrana mitocondrial entre las células de los pacientes y de los controles al tener en cuenta el número de mitocondrias de las mismas. Una posible explicación para los resultados obtenidos es un incremento de la cantidad de las proteínas desacopladoras (UCP) de estas células que estén provocando que la fuga de protones se produzca de manera irregular y que esto afecte a la producción de ATP. Algunos estudios han demostrado que la UCP1 contribuye a la fuga de protones basal (Parker et al., 2009) lo que lleva a hipotetizar que quizás los pacientes presentan mayor cantidad de estas proteínas desacopladoras. El superóxido es capaz de activar las UCPs. Y las UCPs por su parte inducen una fuga de protones para controlar la producción de superóxido en las mitocondrias (Parker et al., 2009).

Por último, se ha encontrado una tendencia mayor en las enzimas antioxidantes SOD2 y catalasa pero los cambios no son estadísticamente significativos lo que puede explicarse debido a un tamaño muestra pequeño junto con una elevada dispersión de las muestras analizadas. Otros estudios han demostrado un incremento de la actividad de estas enzimas con el objetivo de disminuir el EO (Islam, 2017).

Como se ha demostrado en esta tesis las PBMCs de los pacientes con EM presentan defectos a nivel mitocondrial que sostienen su potencial para poder monitorizar la enfermedad así como los diferentes tratamientos modificadores de la enfermedad.

5.5 El perfil metabólico del suero predice mejor el curso de la EM que el perfil del LCR

En los últimos años, el estudio de los cambios en el metaboloma humano como consecuencia de diferentes alteraciones ha demostrado ser una herramienta con un gran potencial. Los cambios metabólicos en el SNC pueden estudiarse a través de la metabolómica lo que le da a esta herramienta una gran relevancia en enfermedades neurodegenerativas como la EM. En la EM, el estudio del metaboloma en LCR nos

permite tener una visión general del estado del mismo en el SNC. Por otro lado, el estudio del metaboloma del suero permite conocer si los cambios registrados en el SNC son similares a los cambios registrados en el LCR.

Diferentes biomarcadores han sido estudiados en la EM con el objetivo de predecir el curso de la enfermedad, de facilitar el diagnóstico, de controlar la respuesta de los pacientes a los tratamientos... pero pocos han llegado a la práctica clínica diaria. El estudio del metaboloma de manera no dirigida abre la posibilidad de analizar un gran número de potenciales biomarcadores que podrían ser utilizados para la enfermedad en un futuro.

El LCR es el biofluido más adecuado para el estudio de enfermedades del SNC pero la manera de conseguirlo es invasiva por lo que la búsqueda de biomarcadores en otros biofluidos ha sido un tema central de las investigaciones en la EM. Los resultados del presente estudio muestran que el metaboloma podría ser útil tanto para contribuir en el diagnóstico como para establecer el pronóstico de la enfermedad desde el momento diagnóstico, lo que abre un gran número de estudios potenciales a través del metaboloma.

El conjunto de metabolitos de un organismo se encuentra en constante cambio, además, las condiciones patológicas tampoco son estáticas por lo que el metaboloma de una persona con EM debería ser diferente al inicio de la enfermedad que tras 10 años de evolución. Este hecho ya fue demostrado en 2012 en ratas inmunizadas para sufrir EM. Estos animales presentaban un metaboloma diferente en LCR a los 10 días y a los 14 de la inmunización lo que indica que estos cambios podrían estar sucediendo a lo largo de la enfermedad (Noga et al., 2012). Los resultados del estudio aquí presentados muestran diferencias en el momento diagnóstico en función del curso de la enfermedad y con los pacientes que no tienen EM a pesar de que existe una gran variabilidad entre los grupos, motivo por el cual no se diferencian los grupos en el PCA. Los resultados del estudio en ratas son más robustos que los obtenidos, en general, con muestras humanas, ya que pequeños cambios del metabolismo afectan a este metaboloma y no se conoce cuando empieza realmente la enfermedad en los humanos.

Estudios metabolómicos realizados en suero y en lágrimas de pacientes han demostrado ser útiles para realizar el diagnóstico de la enfermedad (Cicalini et al., 2019) al igual que muestran los resultados obtenidos en este estudio. Además, un estudio piloto previo de nuestro grupo de investigación también demostró que el metaboloma podría ser útil para el diagnóstico de la enfermedad (Gonzalo et al., 2012) con un número menor de pacientes. Estos resultados han sido validados en una muestra mayor en esta tesis.

Los biomarcadores estudiados en la EM han intentado establecerse tanto en LCR como en suero debido a que el LCR es el fluido que mejor puede mostrar los cambios a nivel del SNC pero el suero/plasma es mucho más accesible, su extracción conlleva menos riesgos y es más sencillo realizar estudios de seguimiento (Bhargava & Calabresi, 2016). Es por ello que se decidió estudiar el LCR y el suero de los mismos sujetos obtenido en el momento diagnóstico. Sorprendentemente, en el momento diagnóstico se encontraron mayores diferencias en el metaboloma en suero que en LCR. Hasta donde llega nuestro conocimiento, ningún estudio ha comparado suero y LCR en el momento diagnóstico en la EM por lo que estudios con cohortes mayores e independientes serían necesarios para validar estos resultados.

En otras enfermedades neurodegenerativas como el Parkinson, el Alzheimer o la Esclerosis Lateral Amiotrófica sí se han realizado estudios en paralelo en LCR y en plasma (no en suero) y los resultados obtenidos en ambos fluidos también son diferentes aunque algunos de ellos encuentran un mayor número de metabolitos comunes a ambos (Stoessel et al., 2018; Wuolikainen et al., 2016).

Uno de los metabolitos que aparecen diferenciales en el momento diagnóstico en el suero es el ácido láctico, metabolito que se ha relacionado estrechamente con la enfermedad y que se postuló como un posible predictor del curso de la misma (Amorini et al., 2014).

El único lípido identificado en ambos fluidos es el PE (28:1) que muestra un patrón de expresión diferente en LCR y en suero lo que podría indicarnos que en el momento diagnóstico todavía las condiciones que ocurren en el SNC no han llegado a extenderse de la misma manera a nivel sistémico, quizás porque la BHE no se encuentra tan comprometida. Una reducción de la cantidad de este lípido podría ser consecuencia de

defectos en la síntesis de fosfatidilcolina. La fosfatidilcolina es el fosfolípido más abundante en las membranas de las células eucariotas. Un estudio dirigido sería necesario para confirmar estos hallazgos y poder establecer el potencial del PE (28:1) como biomarcador para el diagnóstico y pronóstico de la enfermedad.

5.6 El perfil lipídico del líquido cefalorraquídeo podría ser útil como biomarcador pronóstico de la esclerosis múltiple

La lipidómica permite realizar el estudio completo del lipidoma tanto en LCR como en el suero de estos sujetos. Los lípidos son moléculas de gran relevancia en la EM debido, principalmente, a la composición de la mielina, pero también a las importantes funciones que tienen tanto a nivel estructural como de señalización.

Desde hace unos años, se han demostrado defectos en el metabolismo de los lípidos en enfermedades neurodegenerativas como la EM (Adibhatla & Hatcher, 2007). Son diversas y numerosas las alteraciones que se han encontrado en el lipidoma de los pacientes con EM: en la sustancia blanca se han reportado defectos del metabolismo de los esfingolípidos (Wheeler et al., 2008), se ha reportado también alteraciones en los niveles de ceramidas en LCR de pacientes con EM (Vidaurre et al., 2014), y se ha sugerido la implicación de los mismos en los procesos autoinmunes (Quintana et al., 2008). Además IgM lípido-específicas se han asociado con un peor pronóstico de la enfermedad (Villar et al., 2014) y se utilizan en la práctica clínica diaria con el objetivo de poder elegir el mejor tratamiento para un determinado paciente.

Todos estos hallazgos demuestran la importancia del metabolismo lipídico en la EM y van en concordancia con los resultados obtenidos en nuestro análisis en los que ya en el momento diagnóstico el lipidoma del grupo sin EM, del grupo que tendrá un curso leve de la enfermedad y del grupo que tendrá un curso agresivo de la misma, es diferencial.

Recientemente, nuestro grupo de investigación ha publicado un estudio donde proponemos la utilidad del perfil lipídico como herramienta diagnóstica para la enfermedad (Nogueras et al., 2019) por lo que en esta discusión nos centraremos en la utilidad del lipidoma como biomarcador pronóstico para la enfermedad.

Dos de los DG identificados presentan diferencias entre el grupo agresivo y el grupo leve tanto en LCR como en suero (DG 32:2, DG 32:1) por lo que, si se validaran estos marcadores, podrían ser útiles para establecer el pronóstico de la enfermedad. Por otro lado, un estudio reciente realizado en el modelo animal de EAE también ha encontrado cambios en el TG 52:3 a lo largo del tiempo (G. Lee et al., 2019). Los resultados de nuestro estudio muestran cambios en este glicerolípido desde el momento diagnóstico tanto en suero como en LCR.

Un estudio reciente ha constatado cambios tanto en el lipidoma como en el metaboloma de las lágrimas de los pacientes con EM clínicamente definida lo que indica la relevancia de estas dos aproximaciones tanto en el momento diagnóstico para establecer el pronóstico de la enfermedad como para el seguimiento de la misma (Cicalini et al., 2019).

El éster de colesterol 18:2, es un éster de colesterol que está implicado en procesos biológicos como el transporte lipídico y metabolismo lipídico y además en procesos de peroxidación lipídica. La identidad de este lípido de esterol ha sido confirmada por MS/MS por lo que es el lípido más prometedor en cuanto a su capacidad como biomarcador pronóstico. Este éster de colesterol aparece incrementado en el LCR de los pacientes con un curso leve de la enfermedad en el momento diagnóstico. Un nuevo análisis dirigido para la identificación y cuantificación de este lípido en una cohorte mayor sería necesario para validar estos resultados y analizar su utilidad en la práctica clínica diaria.

5.7 Los pacientes con esclerosis múltiple presentan un perfil diferencial de ácidos grasos desde el momento diagnóstico

El perfil de AG da una idea de la composición que tienen los AG de las especies lipídicas analizados mediante lipidómica. Los resultados del estudio presentado muestran un aumento del porcentaje de AGS en el grupo leve y un aumento en el porcentaje de AGI, concretamente de AGMI, en el grupo agresivo. Este aumento podría deberse a un aumento de la actividad de desaturasas y elongasas, aunque la actividad de las mismas es una actividad estimada y serían necesarios estudios específicos para verificarlo.

Como se ha comentado anteriormente, la susceptibilidad de un AG frente a la oxidación depende de las insaturaciones del mismo (Tasset et al., 2012) y aumenta de manera exponencial conforme aumenta el número de dobles enlaces (Pamplona, Barja, & Portero-Otín, 2002). Consecuentemente, el hecho de tener mayor porcentaje de AGMI en el momento diagnóstico se relaciona directamente con un curso más agresivo de la enfermedad, mientras que tener mayor porcentaje de AGS es un marcador de buen pronóstico para la misma.

A pesar de ello, no encontramos diferencias entre los grupos cuando estudiamos el porcentaje de AGPI que son los AG más susceptibles a la oxidación. Esto podría parecer a simple vista una contradicción, sin embargo, cuando nos fijamos en los AGPI significativamente diferentes, observamos niveles superiores en el grupo leve de AG omega tres y seis (alfa linolénico (18:3n-3), gamma linolénico (18:3n-6), eicosadienoico (20:2n6), nisínico (24:6n3) y clupanodoico (22:5n3)). Los AG omega tres juegan un papel muy importante en el desarrollo del cerebro y la neuroplasticidad (Liu et al., 2014). En concreto se ha sugerido que el DHA procedente de la dieta, mejora el desarrollo neuronal, restaura y potencia las funciones cognitivas y protege contra la producción de beta-amiloide, importante en la enfermedad de alzhéimer (Pamplona, 2008). Por otra parte también se le han atribuido propiedades antiinflamatorias a los AG omega tres incluyendo la producción de prostaglandinas, tromboxanos y leucotrienos (van Meeteren et al., 2005) y se ha observado que la proliferación de células T en inflamación crónica y aguda puede ser reducida mediante una suplementación tanto de AG omega tres como seis (Wergeland, Torkildsen, Bø, & Myhr, 2012).

En la EM, estudios realizados tanto in vitro como in vivo han demostrado que AG procedentes de la dieta como el ácido icosapentaenoico (EPA), DHA, LA y ácido gamma-linolénico podrían estar implicados o modular diferentes vías y eventos que tienen lugar en la fisiopatología de la enfermedad (van Meeteren et al., 2005). Por otro lado, se ha demostrado recientemente en un ensayo clínico que la suplementación con AG omega 3 más vitamina D mejoran el EDSS de los pacientes con EM además de parámetros relacionados con la inflamación, el EO y el perfil metabólico de los pacientes (Kouchaki et al., 2018). Por último el ácido docosapentaenoico que aparece

incrementado en el grupo leve de nuestro estudio, se le atribuyen propiedades en el metabolismo lipídico, la reducción de la inflamación e incluso, en ratas envejecidas, la suplementación con este AG ha demostrado mejorar la función cerebral (Kaur, Guo, & Sinclair, 2016).

Tanto en modelos experimentales como en humanos se ha demostrado que dietas ricas en DHA y EPA pueden aumentar la proporción de estos AGPI en las membranas de las células inflamatorias y disminuir los niveles de ácido araquidónico libre que es un biomarcador relacionado con estrés oxidativo (Glass, Saijo, Winner, Marchetto, & Gage, 2010). Otros estudios en ratones han demostrado que la suplementación con DHA y EPA acelera el proceso de producción de mielina al aumentar la expresión de proteínas de la misma (Dyall & Michael-Titus, 2008) mientras que otros estudios han reportado también un aumento de la resistencia de las neuronas frente a diferentes tipos de ataques, entre ellos frente al estrés oxidativo. Concretamente, se ha visto que el aumento de omega tres protege a los progenitores de las células neuronales frente al estrés oxidativo por peróxido de hidrógeno (Torkildsen et al., 2012).

Así pues, se hace evidente la importancia de los AG omega tres y seis en el cerebro debido a las funciones que cumplen y concretamente en la EM ya que hemos podido demostrar que un mayor porcentaje de algunos de ellos en el momento diagnóstico, podría suponer un curso de la enfermedad más leve.

En el caso del suero los índices de AGS, AGI y AGMI se distribuyen de diferente manera entre los grupos. Serían necesarios más estudios con el objetivo de establecer si el suero puede ser representativo de la EM y por tanto útil para el diagnóstico y/o pronóstico de la enfermedad.

5.8 Los biomarcadores de daño oxidativo proteico presentan diferencias entre grupos en el momento diagnóstico

El EO, estrechamente relacionado con la producción de RL y/o defectos en la capacidad antioxidante, se ha asociado con el daño y fallo energético de la mitocondria. Estas alteraciones podrían jugar un papel clave en la desmielinización además de en otros procesos de la enfermedad (Pantzaris et al., 2013).

Las ROS producidas en mayor cantidad por este fallo mitocondrial, causan daño oxidativo a ácidos nucleicos, proteínas, carbohidratos y lípidos. La peroxidación de lípidos da lugar a aldehídos insaturados incluyendo malondialdehído, 4-hidroxinonal y acroleína. Estos aldehídos se unen de manera covalente a proteínas al reaccionar con aminas y tioles y alteran sus funciones (Del Boccio et al., 2011). La carbonilación de proteínas en muestras de pacientes y de modelos experimentales de la enfermedad ha sido demostrada (Youdim, Martin, & Joseph, 2000). El efecto del EO se debe a un aumento de RL que atacan a las proteínas y que pueden llegar a afectar a un gran número de moléculas lo que aumenta el daño oxidativo. Estas modificaciones han sido demostradas en pacientes y modelos experimentales con la enfermedad pero se desconoce su valor pronóstico (Yousefi, et al., 2014). Por este motivo, se quiso analizar el daño oxidativo que acumulaban las muestras biológicas en el momento diagnóstico, ya que en su perfil lipídico muestran diferencias en parámetros que pueden condicionar el estado oxidativo de los mismos.

A pesar de los indicios que apuntaban a un posible daño oxidativo proteico mayor en el LCR que en suero, los resultados obtenidos muestran que, en el momento diagnóstico, un mayor número de cambios son detectables en el suero. En LCR se encontró un incremento del GSA en el grupo leve y una disminución del MDAL en el grupo agresivo. El GSA es un marcador procedente de oxidación de proteínas mientras que el MDAL procede de lipooxidación. El hecho de que la procedencia del daño oxidativo sea diferente para ambos marcadores podría explicar la tendencia diferente que se refleja entre los grupos.

Resultados previos de nuestro laboratorio muestran un aumento del EO en los pacientes con EM, debido principalmente al fenómeno de peroxidación lipídica que resulta en un incremento de la concentración circulante de anticuerpos contra aductos derivados de la oxidación lipídica al interaccionar con proteínas (Gonzalo et al., 2012). Además, no se encontraron diferencias al medir la carbonilación de las proteínas pero sí vieron un aumento de MDAL y CML (Gonzalo et al., 2012). Sus análisis fueron realizados por Western Blot y no por cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas lo que podría ser la causa de las diferencias que hemos encontrado en nuestros análisis. Los análisis realizados en el estudio mencionado se

realizaron de manera individual mientras que para este estudio el análisis se ha realizado por pool debido a las limitaciones metodológicas comentadas en el apartado de materiales y métodos. El hecho de realizar el análisis mediante pools de muestras podría provocar que algunas diferencias quedaran camufladas.

En el suero, los resultados del presente estudio muestran que los pacientes con un curso leve de la enfermedad presentan una mayor cantidad de marcadores de oxidación en el momento diagnóstico. Existen estudios que demuestran un aumento de productos de oxidación proteica avanzada en pacientes con EMRR y en pacientes con un síndrome clínico aislado en suero (Ferreira et al., 2017). Se ha descrito también una correlación entre estos productos y el EDSS de los pacientes, es decir, a mayor cantidad de productos de oxidación proteica avanzada mayor grado de discapacidad del paciente (Sadowska-Bartosz et al., 2013). Otros estudios muestran péptidos diferenciales entre los diferentes cursos de la enfermedad al realizar un análisis por espectrometría de masas y MALDI-TOF (Ljubisavljevic, et al., 2013) aunque el momento del análisis es también diferente al momento diagnóstico.

Otros estudios han constatado un aumento del daño oxidativo proteico en suero de pacientes no tratados respecto de pacientes bajo tratamientos inmunomoduladores (Teunissen et al., 2011) así como en pacientes estudiados postmortem (Sadowska-Bartosz et al., 2014). De nuevo, la limitación cuando comparamos estos resultados con los nuestros es el hecho de que el estudio no se ha realizado en el mismo momento de la enfermedad. Quizás el hecho de que sean parámetros influyentes en la enfermedad no implica que tengan una capacidad pronóstica aunque estudios más detallados al respecto serían necesarios para determinarlo.

Resumiendo, el hecho de que se obtenga un mayor número de diferencias en suero que en LCR podría ser debido al hecho de que la activación del SI es periférica. En el momento diagnóstico, cuando se realizó la punción lumbar y la extracción de sangre, el paciente ya había sufrido un brote. Este brote implica una previa activación del SI de manera periférica, es decir, antes de atravesar la BHE el SI se activa en la periferia y esta activación implica la generación de EO. Es posible que al realizar este análisis muy al comienzo de la enfermedad provoque que el daño oxidativo en el LCR todavía no sea constatable pero sí en el suero donde el EO “lleva instaurado” más tiempo.

5.9 Los pacientes con esclerosis múltiple presentan mayor concentración de anticuerpos contra lipoproteínas de baja densidad oxidadas en el momento diagnóstico en líquido cefalorraquídeo

La oxidación de las LDL se ha asociado históricamente con la enfermedad cardiovascular dada la implicación que tienen estas especies lipídicas oxidadas en la formación de la placa y la aterosclerosis (Steinberg & Witztum, 2010; Trpkovic et al., 2015). Sin embargo, se ha demostrado también, que en presencia de EO, el alto contenido de colesterol que se encuentra presente en el cerebro lo hace vulnerable a la oxidación lo que favorece la generación de oxiesteroles (productos de oxidación del colesterol) en el SNC (Zarrouk et al., 2018). La mayoría de los oxiesteroles se generan debido a la autooxidación del colesterol y se ha demostrado que provocan una ampliación del EO y del daño mitocondrial lo que contribuye a la muerte celular (Iuliano, 2011). En enfermedades como la EM se ha visto un incremento de estas especies oxidadas en los pacientes respecto a los controles tanto en CSF como en plasma (Leoni, Lütjohann, & Masterman, 2005) aunque no tan elevadas como se creía previamente (Diestel et al., 2003). De cualquier modo nuestros resultados van en consonancia con un incremento de estas especies lipídicas oxidadas desde el momento diagnóstico en los pacientes con EM.

Por otro lado, se demostró que la síntesis intratecal de IgM lípido-específicas es un factor de pronóstico negativo en la EM (Villar et al., 2005). Estos anticuerpos, dirigidos contra especies lipídicas oxidadas predicen un avance de la enfermedad más rápido, es decir, puntuaciones de EDSS mayores en menos tiempo (Villar et al., 2014). En nuestro estudio hemos analizado de manera general la concentración de Ac contra especies lipídicas oxidadas para establecer si tienen una relación con el pronóstico de la enfermedad y hemos visto que en el LCR los pacientes con EM presentan una mayor concentración de estos Ac en el momento diagnóstico. A pesar de esto, no hemos podido establecer el poder pronóstico de este análisis ya que no hemos encontrado diferencias entre el grupo leve y el grupo agresivo de nuestro estudio. La base de la utilidad de las IgM lipidoespecíficas radica en la presencia de estos anticuerpos en LCR

pero no en plasma lo que demuestra que la síntesis es intratecal y por tanto debida a un fenómeno inflamatorio propio de la enfermedad.

Otros estudios, en la línea de nuestros resultados, han demostrado un incremento de los Ac contra especies lipídicas oxidadas en suero pero no en el momento diagnóstico sino en pacientes con tiempo de evolución de la enfermedad y dependiendo del curso de la misma (Gironi et al., 2014). También se ha demostrado un incremento en plasma de pacientes con formas secundarias progresivas (Besler & Çomog˘lu, 2003) lo que demuestra la relevancia de estos Ac en las diferentes formas de la enfermedad.

Hasta donde llega nuestro conocimiento, no se ha demostrado previamente un incremento de estos Ac en el momento diagnóstico en el LCR y por tanto no se ha explorado previamente la relevancia de estos Ac para facilitar el diagnóstico de la enfermedad. Estudios más extensos serían necesarios para evaluar el potencial de estos auto-anticuerpos desde el comienzo de la enfermedad.

CONCLUSIONES

6. CONCLUSIONES

A) Los pacientes con EM presentan en la periferia un incremento del EO y las alteraciones mitocondriales en las PBMCs junto con una disminución de la capacidad antioxidante que podrían ser de gran relevancia en la fisiopatología de la EM. Esta conclusión se extrae de las siguientes conclusiones específicas:

1ª Los pacientes con EM presentan menor concentración de la vitamina 25D3 en plasma.

2ª Los pacientes con EM presentan menor capacidad antioxidante analizada mediante FRAP y ABTS que el grupo control, en plasma.

3ª Los pacientes con EM muestran una mayor concentración de lactato en plasma.

4ª Las PBMCs de los pacientes con EM consumen más oxígeno que las de los controles en estado basal, tras la inhibición del complejo V, tras la adición de un agente desacoplante y tras la inhibición del complejo III.

5ª Las PBMCs de los pacientes con EM presentan un menor número de mitocondrias que las PBMCs de los controles.

6ª Las PBMCs de los pacientes con EM tienen menor concentración de ATP que las de los controles.

7ª Las PBMCs de los pacientes con EM no presentan diferencias en cuanto al potencial de membrana mitocondrial respecto a las PBMCs del grupo control.

8ª Los LT de los pacientes con EM al igual que las PBMCs en general, presentan una mayor producción de superóxido que los LT y las PBMCs del grupo control.

9ª En las PBMCs de los pacientes con EM existe una menor cantidad de los complejos mitocondriales I y III y del complejo V o ATPasa.

10ª Las PBMCs de los pacientes con EM no muestran cambios en las enzimas antioxidantes SOD2 y catalasa aunque sí una tendencia presentar valores superiores.

B) Las alteraciones metabólicas en la EM suceden desde el inicio de la enfermedad y se reflejan de manera diferente en el suero y en el LCR de los pacientes. Estos cambios podrían utilizarse como biomarcadores pronóstico en ambos fluidos. Esta conclusión se extrae de las siguiente conclusiones específicas:

Conclusiones

11^a El perfil metabolómico del suero predice mejor el curso de la EM que el perfil del LCR. La mayor parte de metabolitos identificados diferenciales entre los dos grupos son moléculas lipídicas.

12^a El perfil lipídico del LCR podría ser útil como biomarcador pronóstico de la EM. En concreto, el éster de colesterol 18:2 que aparece incrementado en el grupo leve en el momento diagnóstico.

13^a Los pacientes con EM presentan un perfil diferencial de AG desde el momento diagnóstico de la enfermedad que podría ser útil como perfil pronóstico para la patología. Las diferencias aparecen tanto en LCR como en suero pero siguen patrones diferentes en ambos fluidos.

14^a Los biomarcadores de daño oxidativo proteico presentan pocas diferencias entre grupos en el momento diagnóstico en LCR. Las diferencias en el daño oxidativo son mayores en suero con lo que el perfil de daño oxidativo proteico en suero sería mejor como biomarcador pronóstico respecto al LCR.

15^a Los Ac contra lipoproteínas de baja densidad oxidadas no son un buen biomarcador pronóstico ya que los pacientes con EM solo presentan diferencias respecto al grupo control. En suero no existen diferencias en la concentración de los Ac entre los grupos de estudio.

BIBLIOGRAFÍA

7. BIBLIOGRAFÍA

A)

- Adamczyk-Sowa, M., Sowa, P., Pierzchala, K., Polaniak, R., & Labuz-Roszak, B. (2012). Antioxidative enzymes activity and malondialdehyde concentration during mitoxantrone therapy in multiple sclerosis patients. *Journal of Physiology and Pharmacology: An Official Journal of the Polish Physiological Society*, 63(6), 683–690. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23388485>
- Adibhatla, R. M., & Hatcher, J. F. (2007). Role of Lipids in Brain Injury and Diseases. *Future Lipidology*, 2(4), 403–422. <https://doi.org/10.2217/17460875.2.4.403>
- Albanese, M., Zagaglia, S., Landi, D., Boffa, L., Nicoletti, C. G., Marciani, M. G., ... Centonze, D. (2016). Cerebrospinal fluid lactate is associated with multiple sclerosis disease progression. *Journal of Neuroinflammation*, 13, 36. <https://doi.org/10.1186/s12974-016-0502-1>
- Almena, M., & Mérida, I. (2011). Shaping up the membrane: diacylglycerol coordinates spatial orientation of signaling. *Trends in Biochemical Sciences*, 36(11), 593–603. <https://doi.org/10.1016/j.tibs.2011.06.005>
- Amorini, A. M., Nociti, V., Petzold, A., Gasperini, C., Quartuccio, E., Lazzarino, G., ... Tavazzi, B. (2014). Serum lactate as a novel potential biomarker in multiple sclerosis. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease*, 1842(7), 1137–1143. <https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2014.04.005>
- Armon-Omer, A., Waldman, C., Simaan, N., Neuman, H., Tamir, S., & Shahien, R. (2019). New Insights on the Nutrition Status and Antioxidant Capacity in Multiple Sclerosis Patients. *Nutrients*, 11(2), 427. <https://doi.org/10.3390/nu11020427>
- Aronov, P. A., Hall, L. M., Dettmer, K., Stephensen, C. B., & Hammock, B. D. (2008). Metabolic profiling of major vitamin D metabolites using Diels–Alder derivatization and ultra-performance liquid chromatography–tandem mass spectrometry. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 391(5), 1917–1930. <https://doi.org/10.1007/s00216-008-2095-8>
- Arranz, L., Naudí, A., De la Fuente, M., & Pamplona, R. (2013). Exceptionally old mice are highly resistant to lipoxidation-derived molecular damage. *Age (Dordrecht, Netherlands)*, 35(3), 621–635. <https://doi.org/10.1007/s11357-012-9391-0>
- Barcelos, I. P. de, Troxell, R. M., & Graves, J. S. (2019). Mitochondrial Dysfunction and Multiple Sclerosis. *Biology*, 8(2), 37. <https://doi.org/10.3390/biology8020037>
- Beesley, R., Anderson, V., Harding, K. E., Joseph, F., Tomassini, V., Pickersgill, T. P., ... Tallantyre, E. C. (2018). Impact of the 2017 revisions to McDonald criteria on the diagnosis of multiple sclerosis. *Multiple Sclerosis Journal*, 135245851877800. <https://doi.org/10.1177/1352458518778007>

- Benzie, I. F., & Strain, J. J. (1996). The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of “antioxidant power”: the FRAP assay. *Analytical Biochemistry*, 239(1), 70–76. <https://doi.org/10.1006/abio.1996.0292>
- Berezowska, M., Coe, S., & Dawes, H. (2019). Effectiveness of Vitamin D Supplementation in the Management of Multiple Sclerosis: A Systematic Review. *International Journal of Molecular Sciences*, 20(6), 1301. <https://doi.org/10.3390/ijms20061301>
- Besler, H. T., & Çomog˘lu, S. (2003). Lipoprotein Oxidation, Plasma Total Antioxidant Capacity and Homocysteine Level in Patients with Multiple Sclerosis. *Nutritional Neuroscience*, 6(3), 189–196. <https://doi.org/10.1080/1028415031000115945>
- Bhargava, P., & Calabresi, P. A. (2016). Metabolomics in multiple sclerosis. *Multiple Sclerosis Journal*, 22(4), 451–460. <https://doi.org/10.1177/1352458515622827>
- Bizzozero, O. A., DeJesus, G., Callahan, K., & Pastuszyn, A. (2005). Elevated protein carbonylation in the brain white matter and gray matter of patients with multiple sclerosis. *Journal of Neuroscience Research*, 81(5), 687–695. <https://doi.org/10.1002/jnr.20587>
- Björkhem, I. (2013). Five decades with oxysterols. *Biochimie*, 95(3), 448–454. <https://doi.org/10.1016/j.biochi.2012.02.029>
- Brundin, L., Kobelt, G., Berg, J., Capsa, D., Eriksson, J., & European Multiple Sclerosis Platform. (2017). New insights into the burden and costs of multiple sclerosis in Europe: Results for Sweden. *Multiple Sclerosis Journal*, 23(2_suppl), 179–191. <https://doi.org/10.1177/1352458517708682>
- Cadet, J. L. (1988). Free radical mechanisms in the central nervous system: an overview. *The International Journal of Neuroscience*, 40(1–2), 13–18. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2840405>
- Camandola, S., & Mattson, M. P. (2017). Brain metabolism in health, aging, and neurodegeneration. *The EMBO Journal*, 36(11), 1474–1492. <https://doi.org/10.15252/embj.201695810>
- Campbell, G., Licht-Mayer, S., & Mahad, D. (2019). Targeting mitochondria to protect axons in progressive MS. *Neuroscience Letters*, 134258. <https://doi.org/10.1016/j.neulet.2019.05.012>
- Campbell, G. R., & Mahad, D. J. (2012). Mitochondrial changes associated with demyelination: consequences for axonal integrity. *Mitochondrion*, 12(2), 173–179. <https://doi.org/10.1016/j.mito.2011.03.007>
- Campbell, G. R., Worrall, J. T., & Mahad, D. J. (2014). The central role of mitochondria in axonal degeneration in multiple sclerosis. *Multiple Sclerosis (Houndmills, Basingstoke, England)*, 20(14), 1806–1813. <https://doi.org/10.1177/1352458514544537>
- Campbell, G. R., Ziabreva, I., Reeve, A. K., Krishnan, K. J., Reynolds, R., Howell, O., ... Mahad, D. J. (2011). Mitochondrial DNA deletions and neurodegeneration in multiple sclerosis. *Annals of Neurology*,

- 69(3), 481–492. <https://doi.org/10.1002/ana.22109>
- Castro-Perez, J. M., Kamphorst, J., DeGroot, J., Lafeber, F., Goshawk, J., Yu, K., ... Hankemeier, T. (2010). *Comprehensive LC-MS E lipidomic analysis using a shotgun approach and its application to biomarker detection and identification in osteoarthritis patients*. 9(5). <https://doi.org/10.1021/pr901094j>
- Cermenati, G., Mitro, N., Audano, M., Melcangi, R. C., Crestani, M., De Fabiani, E., & Caruso, D. (2015). Lipids in the nervous system: from biochemistry and molecular biology to patho-physiology. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1851(1), 51–60. <https://doi.org/10.1016/j.bbali.2014.08.011>
- Chang, J. Y., & Liu, L.-Z. (1998). Neurotoxicity of cholesterol oxides on cultured cerebellar granule cells. *Neurochemistry International*, 32(4), 317–323. [https://doi.org/10.1016/S0197-0186\(97\)00103-4](https://doi.org/10.1016/S0197-0186(97)00103-4)
- Charoenngam, N., Shirvani, A., & Holick, M. F. (2019). Vitamin D for skeletal and non-skeletal health: What we should know. *Journal of Clinical Orthopaedics and Trauma*, 10(6), 1082–1093. <https://doi.org/10.1016/j.jcot.2019.07.004>
- Chong, J., Soufan, O., Li, C., Caraus, I., Li, S., Bourque, G., ... Xia, J. (2018). MetaboAnalyst 4.0: towards more transparent and integrative metabolomics analysis. *Nucleic Acids Research*, 46(W1), W486–W494. <https://doi.org/10.1093/nar/gky310>
- Cicalini, I., Rossi, C., Pieragostino, D., Agnifili, L., Mastropasqua, L., di Iorio, M., ... Del Boccio, P. (2019). Integrated Lipidomics and Metabolomics Analysis of Tears in Multiple Sclerosis: An Insight into Diagnostic Potential of Lacrimal Fluid. *International Journal of Molecular Sciences*, 20(6). <https://doi.org/10.3390/ijms20061265>
- Cobley, J. N., Fiorello, M. L., & Bailey, D. M. (2018). 13 reasons why the brain is susceptible to oxidative stress. *Redox Biology*, 15, 490–503. <https://doi.org/10.1016/j.redox.2018.01.008>
- Colton, C. A., & Gilbert, D. L. (1987). Production of superoxide anions by a CNS macrophage, the microglia. *FEBS Letters*, 223(2), 284–288. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2822487>
- Comabella, M., & Montalban, X. (2014). Body fluid biomarkers in multiple sclerosis. *The Lancet Neurology*, 13(1), 113–126. [https://doi.org/10.1016/S1474-4422\(13\)70233-3](https://doi.org/10.1016/S1474-4422(13)70233-3)
- Compton, B., Tonwsend, J., & Pake, G. E. (1954). Free radicals in biological materials. *Nature*, 174(4432), 689–691. <https://doi.org/10.1038/174689a0>
- Compston, A., & Coles, A. (2008). Multiple sclerosis. *Lancet*, 372(9648), 1502–1517. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(08\)61620-7](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(08)61620-7)
- Connelly, J. F. (1994). Interferon Beta for Multiple Sclerosis. *Annals of Pharmacotherapy*, 28(5), 610–616. <https://doi.org/10.1177/106002809402800511>
- Dalle-Donne, I., Rossi, R., Colombo, R., Giustarini, D., & Milzani, A. (2006). Biomarkers of Oxidative

- Damage in Human Disease. *Clinical Chemistry*, 52(4), 601–623.
<https://doi.org/10.1373/clinchem.2005.061408>
- De Angelis, F., John, N. A., & Brownlee, W. J. (2018). Disease-modifying therapies for multiple sclerosis. *BMJ (Clinical Research Ed.)*, 363, k4674. <https://doi.org/10.1136/bmj.k4674>
- De Jager, P. L., Jia, X., Wang, J., de Bakker, P. I. W., Ottoboni, L., Aggarwal, N. T., ... Oksenberg, J. R. (2009). Meta-analysis of genome scans and replication identify CD6, IRF8 and TNFRSF1A as new multiple sclerosis susceptibility loci. *Nature Genetics*, 41(7), 776–782.
<https://doi.org/10.1038/ng.401>
- De Riccardis, L., Ferramosca, A., Danieli, A., Trianni, G., Zara, V., De Robertis, F., & Maffia, M. (2016). *Metabolic response to glatiramer acetate therapy in multiple sclerosis patients*.
<https://doi.org/10.1016/j.bbacli.2016.10.004>
- De Riccardis, L., Rizzello, A., Ferramosca, A., Urso, E., De Robertis, F., Danieli, A., ... Maffia, M. (2015). Bioenergetics profile of CD4 + T cells in relapsing remitting multiple sclerosis subjects. *Journal of Biotechnology*, 202, 31–39. <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2015.02.015>
- Dean, G. (1967). Annual incidence, prevalence, and mortality of multiple sclerosis in white South-African-born and in white immigrants to South Africa. *British Medical Journal*, 2(5554), 724–730.
<https://doi.org/10.1136/bmj.2.5554.724>
- Dean, G., & Kurtzke, J. F. (1971). On the risk of multiple sclerosis according to age at immigration to South Africa. *British Medical Journal*, 3(5777), 725–729. <https://doi.org/10.1136/bmj.3.5777.725>
- Del Boccio, P., Pieragostino, D., Di Iorio, M., Petrucci, F., Lugaresi, A., De Luca, G., ... Urbani, A. (2011). Lipidomic investigations for the characterization of circulating serum lipids in multiple sclerosis. *Journal of Proteomics*, 74(12), 2826–2836. <https://doi.org/10.1016/j.jprot.2011.06.023>
- Dendrou, C. A., Fugger, L., & Friese, M. A. (2015). Immunopathology of multiple sclerosis. *Nature Reviews Immunology*, 15(9), 545–558. <https://doi.org/10.1038/nri3871>
- Devadas, S., Zaritskaya, L., Rhee, S. G., Oberley, L., & Williams, M. S. (2002). Discrete generation of superoxide and hydrogen peroxide by T cell receptor stimulation: selective regulation of mitogen-activated protein kinase activation and fas ligand expression. *The Journal of Experimental Medicine*, 195(1), 59–70. <https://doi.org/10.1084/jem.20010659>
- Diestel, A., Aktas, O., Hackel, D., Häke, I., Meier, S., Raine, C. S., ... Ullrich, O. (2003). Activation of Microglial Poly(ADP-Ribose)-Polymerase-1 by Cholesterol Breakdown Products during Neuroinflammation. *The Journal of Experimental Medicine*, 198(11), 1729–1740.
<https://doi.org/10.1084/jem.20030975>
- Dobson, R., & Giovannoni, G. (2019). Multiple sclerosis - a review. *European Journal of Neurology*, 26(1), 27–40. <https://doi.org/10.1111/ene.13819>

- Dyall, S. C., & Michael-Titus, A. T. (2008). Neurological benefits of omega-3 fatty acids. *Neuromolecular Medicine*, 10(4), 219–235. <https://doi.org/10.1007/s12017-008-8036-z>
- Ebers, G. C., Sadovnick, A. D., & Risch, N. J. (1995). A genetic basis for familial aggregation in multiple sclerosis. *Nature*, 377(6545), 150–151. <https://doi.org/10.1038/377150a0>
- Errea, O., Moreno, B., Gonzalez-Franquesa, A., Garcia-Roves, P. M., & Villoslada, P. (2015). The disruption of mitochondrial axonal transport is an early event in neuroinflammation. *Journal of Neuroinflammation*, 12, 152. <https://doi.org/10.1186/s12974-015-0375-8>
- Evans, C., Beland, S.-G., Kulaga, S., Wolfson, C., Kingwell, E., Marriott, J., ... Marrie, R. A. (2013). Incidence and prevalence of multiple sclerosis in the Americas: a systematic review. *Neuroepidemiology*, 40(3), 195–210. <https://doi.org/10.1159/000342779>
- Fahy, E., Subramaniam, S., Brown, H. A., Glass, C. K., Merrill, A. H., Murphy, R. C., ... Dennis, E. A. (2005). A comprehensive classification system for lipids. *Journal of Lipid Research*, 46(5), 839–862. <https://doi.org/10.1194/jlr.E400004-JLR200>
- Fahy, E., Subramaniam, S., Murphy, R. C., Nishijima, M., Raetz, C. R. H., Shimizu, T., ... Dennis, E. A. (2009). Update of the LIPID MAPS comprehensive classification system for lipids. *Journal of Lipid Research*, 50 Suppl(Suppl), S9-14. <https://doi.org/10.1194/jlr.R800095-JLR200>
- Famularo, G., Simone, C., Trinchieri, V., & Mosca, L. (2004). Carnitines and Its Congeners: A Metabolic Pathway to the Regulation of Immune Response and Inflammation. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1033(1), 132–138. <https://doi.org/10.1196/annals.1320.012>
- Feldhaus, P., Fraga, D. B., Ghedim, F. V., De Luca, R. D., Bruna, T. D., Heluany, M., ... Zugno, A. I. (2011). Evaluation of respiratory chain activity in lymphocytes of patients with Alzheimer disease. *Metabolic Brain Disease*, 26(3), 229–236. <https://doi.org/10.1007/s11011-011-9253-y>
- Ferreira, K. P. Z., Oliveira, S. R., Kallaur, A. P., Kaimen-Maciel, D. R., Lozovoy, M. A. B., de Almeida, E. R. D., ... Simão, A. N. C. (2017). Disease progression and oxidative stress are associated with higher serum ferritin levels in patients with multiple sclerosis. *Journal of the Neurological Sciences*, 373, 236–241. <https://doi.org/10.1016/j.jns.2016.12.039>
- Flynn, J. M., & Melov, S. (2013). SOD2 in mitochondrial dysfunction and neurodegeneration. *Free Radical Biology & Medicine*, 62, 4–12. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2013.05.027>
- Friedman, J. R., & Nunnari, J. (2014). Mitochondrial form and function. *Nature*, 505(7483), 335–343. <https://doi.org/10.1038/nature12985>
- Friese, M. A., Schattling, B., & Fugger, L. (2014). Mechanisms of neurodegeneration and axonal dysfunction in multiple sclerosis. *Nature Reviews. Neurology*, 10(4), 225–238. <https://doi.org/10.1038/nrneurol.2014.37>
- Fünfschilling, U., Supplie, L. M., Mahad, D., Boretius, S., Saab, A. S., Edgar, J., ... Nave, K.-A. (2012).

- Glycolytic oligodendrocytes maintain myelin and long-term axonal integrity. *Nature*, 485(7399), 517–521. <https://doi.org/10.1038/nature11007>
- Fyfe, I. (2016). Multiple sclerosis: Vitamin D deficiency leads to excessive B-cell responses in multiple sclerosis. *Nature Reviews. Neurology*, 12(5), 252. <https://doi.org/10.1038/nrneuro.2016.49>
- Gan, L., & Johnson, J. A. (2013). Oxidative damage and the Nrf2-ARE pathway in neurodegenerative diseases. *Biochimica et Biophysica Acta*. <https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2013.12.011>
- Ghareghani, M., Ghanbari, A., Dokoohaki, S., Farhadi, N., Hosseini, S. M., Mohammadi, R., & Sadeghi, H. (2016). Methylprednisolone improves lactate metabolism through reduction of elevated serum lactate in rat model of multiple sclerosis. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 84, 1504–1509. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2016.11.042>
- Gironi, M., Borgiani, B., Mariani, E., Cursano, C., Mendozzi, L., Cavarretta, R., ... Furlan, R. (2014). Oxidative stress is differentially present in multiple sclerosis courses, early evident, and unrelated to treatment. *Journal of Immunology Research*, 2014, 961863. <https://doi.org/10.1155/2014/961863>
- Glass, C. K., Saijo, K., Winner, B., Marchetto, M. C., & Gage, F. H. (2010). Mechanisms underlying inflammation in neurodegeneration. *Cell*, 140(6), 918–934. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2010.02.016>
- Gonzalo, H., Brieva, L., Tatzber, F., Jové, M., Cacabelos, D., Cassanyé, A., ... Portero-Otin, M. (2012). Lipidome analysis in multiple sclerosis reveals protein lipoxidative damage as a potential pathogenic mechanism. *Journal of Neurochemistry*, 123(4), 622–634. <https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.2012.07934.x>
- Gonzalo, H., Noguerras, L., Gil-Sánchez, A., Hervás, J. V., Valcheva, P., González-Mingot, C., ... Brieva, L. (2019). Impairment of Mitochondrial Redox Status in Peripheral Lymphocytes of Multiple Sclerosis Patients. *Frontiers in Neuroscience*, 13, 938. <https://doi.org/10.3389/fnins.2019.00938>
- Gray, E., Kemp, K., Hares, K., Redondo, J., Rice, C., Scolding, N., & Wilkins, A. (2014). Increased microglial catalase activity in multiple sclerosis grey matter. *Brain Research*, 1559, 55–64. <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2014.02.042>
- Guillou, H., Zdravec, D., Martin, P. G. P., & Jacobsson, A. (2010). The key roles of elongases and desaturases in mammalian fatty acid metabolism: Insights from transgenic mice. *Progress in Lipid Research*, 49(2), 186–199. <https://doi.org/10.1016/j.plipres.2009.12.002>
- Gurr, M. I., & James, A. T. (1980). *Lipid Biochemistry: An Introduction*. <https://doi.org/10.1007/978-94-009-5907-1>
- Haider, L. (2015). Inflammation, Iron, Energy Failure, and Oxidative Stress in the Pathogenesis of Multiple Sclerosis. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2015, 725370.

<https://doi.org/10.1155/2015/725370>

- Halliwell, B. (1992). Reactive oxygen species and the central nervous system. *Journal of Neurochemistry*, 59(5), 1609–1623. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1402908>
- Hedstrom, A. K., Katsoulis, M., Hossjer, O., Bomfim, I. L., Oturai, A., Sondergaard, H. B., ... Alfredsson, L. (2017). The interaction between smoking and HLA genes in multiple sclerosis: replication and refinement. *European Journal of Epidemiology*. <https://doi.org/10.1007/s10654-017-0250-2>
- Hertz, L., Gibbs, M. E., & Dienel, G. A. (2014). Fluxes of lactate into, from, and among gap junction-coupled astrocytes and their interaction with noradrenaline. *Frontiers in Neuroscience*, 8, 261. <https://doi.org/10.3389/fnins.2014.00261>
- Hewer, S., Lucas, R., van der Mei, I., & Taylor, B. V. (2013). Vitamin D and multiple sclerosis. *Journal of Clinical Neuroscience : Official Journal of the Neurosurgical Society of Australasia*, 20(5), 634–641. <https://doi.org/10.1016/j.jocn.2012.10.005>
- Hira, S., Packialakshmi, B., & Zhou, X. (2019). EAE-induced upregulation of mitochondrial MnSOD is associated with increases of mitochondrial SGK1 and Tom20 protein in the mouse kidney cortex. *The Journal of Physiological Sciences*, 69(5), 723–732. <https://doi.org/10.1007/s12576-019-00687-4>
- Hosseini-nezhad, A., & Holick, M. F. (2013). Vitamin D for health: a global perspective. *Mayo Clinic Proceedings*, 88(7), 720–755. <https://doi.org/10.1016/j.mayocp.2013.05.011>
- Howard, J., Trevick, S., & Younger, D. S. (2016). Epidemiology of Multiple Sclerosis. *Neurologic Clinics*, 34(4), 919–939. <https://doi.org/10.1016/j.ncl.2016.06.016>
- Hulbert, A. J. (2007). Membrane fatty acids as pacemakers of animal metabolism. *Lipids*, 42(9), 811–819. <https://doi.org/10.1007/s11745-007-3058-0>
- Ibitoye, R., Kemp, K., Rice, C., Hares, K., Scolding, N., & Wilkins, A. (2016). Oxidative stress-related biomarkers in multiple sclerosis: a review. *Biomarkers in Medicine*, 10(8), 889–902. <https://doi.org/10.2217/bmm-2016-0097>
- Islam, M. T. (2017). Oxidative stress and mitochondrial dysfunction-linked neurodegenerative disorders. *Neurological Research*, 39(1), 73–82. <https://doi.org/10.1080/01616412.2016.1251711>
- Iuliano, L. (2011). Pathways of cholesterol oxidation via non-enzymatic mechanisms. *Chemistry and Physics of Lipids*, 164(6), 457–468. <https://doi.org/10.1016/j.chemphyslip.2011.06.006>
- Jackson, M., Marks, L., May, G. H. W., & Wilson, J. B. (2018). The genetic basis of disease. *Essays in Biochemistry*, 62(5), 643–723. <https://doi.org/10.1042/EBC20170053>
- Jagannath, V. A., Filippini, G., Di Pietrantonj, C., Asokan, G. V., Robak, E. W., Whamond, L., & Robinson, S. A. (2018). Vitamin D for the management of multiple sclerosis. *Cochrane Database of Systematic Reviews*. <https://doi.org/10.1002/14651858.CD008422.pub3>

- Jana, A., & Pahan, K. (2007). Oxidative stress kills human primary oligodendrocytes via neutral sphingomyelinase: implications for multiple sclerosis. *Journal of Neuroimmune Pharmacology: The Official Journal of the Society on Neuroimmune Pharmacology*, 2(2), 184–193. <https://doi.org/10.1007/s11481-007-9066-2>
- Jensen, G. E., & Clausen, J. (1984). Glutathione peroxidase and reductase, glucose-6-phosphate dehydrogenase and catalase activities in multiple sclerosis. *Journal of the Neurological Sciences*, 63(1), 45–53. [https://doi.org/10.1016/0022-510x\(84\)90107-2](https://doi.org/10.1016/0022-510x(84)90107-2)
- Juanatey, A., Blanco-Garcia, L., & Tellez, N. (2018). Ocrelizumab: its efficacy and safety in multiple sclerosis. *Revista de Neurologia*, 66(12), 423–433. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29897610>
- Karg, E., Klivényi, P., Németh, I., Bencsik, K., Pintér, S., & Vécsei, L. (1999). Nonenzymatic antioxidants of blood in multiple sclerosis. *Journal of Neurology*, 246(7), 533–539. <https://doi.org/10.1007/s004150050399>
- Karlík, M., Valkovič, P., Hančinová, V., Krížová, L., Tóthová, L., & Celec, P. (2015). Markers of oxidative stress in plasma and saliva in patients with multiple sclerosis. *Clinical Biochemistry*, 48(1–2), 24–28. <https://doi.org/10.1016/j.clinbiochem.2014.09.023>
- Katsavos, S., Artemiadis, A., Gontika, M., Skarlis, C., Markoglou, N., Davaki, P., ... Anagnostouli, M. (2019). HLA-DRB1 differences in allelic distribution between familial and sporadic multiple sclerosis in a Hellenic cohort. *Postgraduate Medicine*, 131(7), 490–495. <https://doi.org/10.1080/00325481.2019.1655382>
- Kaur, G., Guo, X.-F., & Sinclair, A. J. (2016). Short update on docosapentaenoic acid: a bioactive long-chain n-3 fatty acid. *Current Opinion in Clinical Nutrition and Metabolic Care*, 19(2), 88–91. <https://doi.org/10.1097/MCO.0000000000000252>
- Kener, K. B., Munk, D. J., Hancock, C. R., & Tessem, J. S. (2018). High-resolution Respirometry to Measure Mitochondrial Function of Intact Beta Cells in the Presence of Natural Compounds. *Journal of Visualized Experiments*, (131). <https://doi.org/10.3791/57053>
- Kingwell, E., Marriott, J. J., Jetté, N., Pringsheim, T., Makhani, N., Morrow, S. A., ... Marrie, R. A. (2013). Incidence and prevalence of multiple sclerosis in Europe: a systematic review. *BMC Neurology*, 13, 128. <https://doi.org/10.1186/1471-2377-13-128>
- Kopff, M., Zakrzewska, I., Czernicki, J., Klem, J., & Strzelczyk, M. (1993). Red cell superoxide dismutase and catalase activity in multiple sclerosis. *Acta Biochimica Polonica*, 40(1), 154–157. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8372545>
- Kouchaki, E., Afarini, M., Abolhassani, J., Mirhosseini, N., Bahmani, F., Masoud, S. A., & Asemi, Z. (2018). High-dose ω -3 Fatty Acid Plus Vitamin D3 Supplementation Affects Clinical Symptoms and Metabolic Status of Patients with Multiple Sclerosis: A Randomized Controlled Clinical Trial. *The*

- Journal of Nutrition*, 148(8), 1380–1386. <https://doi.org/10.1093/jn/nxy116>
- Ladd, A. C., Keeney, P. M., Govind, M. M., & Bennett, J. P. (2014). Mitochondrial Oxidative Phosphorylation Transcriptome Alterations in Human Amyotrophic Lateral Sclerosis Spinal Cord and Blood. *NeuroMolecular Medicine*, 16(4), 714–726. <https://doi.org/10.1007/s12017-014-8321-Y>
- Larosa, V., & Remacle, C. (2018). Insights into the respiratory chain and oxidative stress. *Bioscience Reports*, 38(5). <https://doi.org/10.1042/BSR20171492>
- Lazzarino, G., Amorini, A. M., Petzold, A., Gasperini, C., Ruggieri, S., Quartuccio, M. E., ... Tavazzi, B. (2016). Serum Compounds of Energy Metabolism Impairment Are Related to Disability, Disease Course and Neuroimaging in Multiple Sclerosis. *Molecular Neurobiology*. <https://doi.org/10.1007/s12035-016-0257-9>
- Lebrun, C., Alchaar, H., Candito, M., Bourg, V., & Chatel, M. (2006). Levocarnitine administration in multiple sclerosis patients with immunosuppressive therapy-induced fatigue. *Multiple Sclerosis (Houndmills, Basingstoke, England)*, 12(3), 321–324. <https://doi.org/10.1191/135248506ms1275oa>
- Lee, G., Hasan, M., Kwon, O.-S., & Jung, B. H. (2019). Identification of Altered Metabolic Pathways during Disease Progression in EAE Mice via Metabolomics and Lipidomics. *Neuroscience*, 416, 74–87. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2019.07.029>
- Lee, J. Y., Taghian, K., & Petratos, S. (2014). Axonal degeneration in multiple sclerosis: can we predict and prevent permanent disability? *Acta Neuropathologica Communications*, 2(1), 97. <https://doi.org/10.1186/s40478-014-0097-7>
- Lee, Y., Morrison, B. M., Li, Y., Lengacher, S., Farah, M. H., Hoffman, P. N., ... Rothstein, J. D. (2012). Oligodendroglia metabolically support axons and contribute to neurodegeneration. *Nature*, 487(7408), 443–448. <https://doi.org/10.1038/nature11314>
- Lehmann, H. C., Compston, A., & Hartung, H.-P. (2018). 150th anniversary of clinical description of multiple sclerosis. *Neurology*, 90(22), 1011–1016. <https://doi.org/10.1212/WNL.0000000000005613>
- Leoni, V., Lütjohann, D., & Masterman, T. (2005). Levels of 7-oxocholesterol in cerebrospinal fluid are more than one thousand times lower than reported in multiple sclerosis. *Journal of Lipid Research*, 46(2), 191–195. <https://doi.org/10.1194/jlr.C400005-JLR200>
- Li, B., He, X., Jia, W., & Li, H. (2017). Novel Applications of Metabolomics in Personalized Medicine: A Mini-Review. *Molecules*, 22(7), 1173. <https://doi.org/10.3390/molecules22071173>
- Liebisch, G., Vizcaíno, J. A., Köfeler, H., Trötz Müller, M., Griffiths, W. J., Schmitz, G., ... Wakelam, M. J. O. (2013). Shorthand notation for lipid structures derived from mass spectrometry. *Journal of Lipid*

- Research*, 54(6), 1523–1530. <https://doi.org/10.1194/jlr.M033506>
- Liu, Q., Wu, D., Ni, N., Ren, H., Luo, C., He, C., ... Su, H. (2014). Omega-3 polyunsaturated fatty acids protect neural progenitor cells against oxidative injury. *Marine Drugs*, 12(5), 2341–2356. <https://doi.org/10.3390/md12052341>
- Ljubisavljevic, S., Stojanovic, I., Vojinovic, S., Stojanov, D., Stojanovic, S., Cvetkovic, T., ... Pavlovic, D. (2013). The patients with clinically isolated syndrome and relapsing remitting multiple sclerosis show different levels of advanced protein oxidation products and total thiol content in plasma and CSF. *Neurochemistry International*, 62(7), 988–997. <https://doi.org/10.1016/j.neuint.2013.02.025>
- Ljubisavljevic, S., Stojanovic, I., Vojinovic, S., Stojanov, D., Stojanovic, S., Kocic, G., ... Pavlovic, D. (2013). Cerebrospinal fluid and plasma oxidative stress biomarkers in different clinical phenotypes of neuroinflammatory acute attacks. Conceptual accession: from fundamental to clinic. *Cellular and Molecular Neurobiology*, 33(6), 767–777. <https://doi.org/10.1007/s10571-013-9944-5>
- Louapre, C., Papeix, C., Lubetzki, C., & Maillart, E. (2017). Multiple sclerosis and aging. *Gériatrie et Psychologie Neuropsychiatrie Du Vieillessement*, 15(4), 402–408. <https://doi.org/10.1684/pnv.2017.0685>
- Lublin, F. D., & Reingold, S. C. (1996a). Defining the clinical course of multiple sclerosis: results of an international survey. National Multiple Sclerosis Society (USA) Advisory Committee on Clinical Trials of New Agents in Multiple Sclerosis. *Neurology*, 46(4), 907–911. <https://doi.org/10.1212/wnl.46.4.907>
- Lublin, F. D., & Reingold, S. C. (1996b). Defining the clinical course of multiple sclerosis: results of an international survey. National Multiple Sclerosis Society (USA) Advisory Committee on Clinical Trials of New Agents in Multiple Sclerosis. *Neurology*, 46(4), 907–911. <https://doi.org/10.1212/wnl.46.4.907>
- Lublin, F. D., Reingold, S. C., Cohen, J. A., Cutter, G. R., Sorensen, P. S., Thompson, A. J., ... Polman, C. H. (2014). Defining the clinical course of multiple sclerosis: The 2013 revisions. *Neurology*, 83(3), 278–286. <https://doi.org/10.1212/WNL.0000000000000560>
- Lushchak, V. I. (2014). Free radicals, reactive oxygen species, oxidative stress and its classification. *Chemico-Biological Interactions*, 224, 164–175. <https://doi.org/10.1016/j.cbi.2014.10.016>
- Lutskii, M. A., & Esaulenko, I. E. (2007). Oxidant stress in the pathogenesis of multiple sclerosis. *Neuroscience and Behavioral Physiology*, 37(3), 209–213. <https://doi.org/10.1007/s11055-007-0003-x>
- Mähler, A., Steiniger, J., Bock, M., Brandt, A. U., Haas, V., Boschmann, M., & Paul, F. (2012). Is metabolic flexibility altered in multiple sclerosis patients? *PloS One*, 7(8), e43675. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0043675>

- Mangalam, A., Poisson, L., Nemetlu, E., Datta, I., Denic, A., Dzeja, P., ... Giri, S. (2013). Profile of Circulatory Metabolites in a Relapsing-remitting Animal Model of Multiple Sclerosis using Global Metabolomics. *Journal of Clinical & Cellular Immunology*, 4. <https://doi.org/10.4172/2155-9899.1000150>
- Mao, P., & Reddy, P. H. (2010). Is multiple sclerosis a mitochondrial disease? *Biochimica et Biophysica Acta*, 1802(1), 66–79. <https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2009.07.002>
- McDonald, W. I., Compston, A., Edan, G., Goodkin, D., Hartung, H. P., Lublin, F. D., ... Wolinsky, J. S. (2001). Recommended diagnostic criteria for multiple sclerosis: guidelines from the International Panel on the diagnosis of multiple sclerosis. *Annals of Neurology*, 50(1), 121–127. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11456302>
- McFarland, H. F., & Martin, R. (2007). Multiple sclerosis: a complicated picture of autoimmunity. *Nature Immunology*, 8, 913–919. <https://doi.org/10.1038/ni1507>
- Michalak, S., Florczak-Wyspiańska, J., Rybacka-Mossakowska, J., Ambrosius, W., Osztynowicz, K., Baszczuk, A., ... Wysocka, E. (2017). Mitochondrial Respiration in Intact Peripheral Blood Mononuclear Cells and Sirtuin 3 Activity in Patients with Movement Disorders. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2017, 9703574. <https://doi.org/10.1155/2017/9703574>
- Miller, H., Newell, D. J., & Ridley, A. (1961). Multiple sclerosis. Trials of maintenance treatment with prednisolone and soluble aspirin. *Lancet (London, England)*, 1(7169), 127–129. [https://doi.org/10.1016/s0140-6736\(61\)91308-3](https://doi.org/10.1016/s0140-6736(61)91308-3)
- Miller, N. J., Rice-Evans, C., Davies, M. J., Gopinathan, V., & Milner, A. (1993). A novel method for measuring antioxidant capacity and its application to monitoring the antioxidant status in premature neonates. *Clinical Science (London, England : 1979)*, 84(4), 407–412. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8482045>
- Murray, T. J. (2009). The history of multiple sclerosis: the changing frame of the disease over the centuries. *Journal of the Neurological Sciences*, 277 Suppl 1, S3-8. [https://doi.org/10.1016/S0022-510X\(09\)70003-6](https://doi.org/10.1016/S0022-510X(09)70003-6)
- Naudí, A., Cabré, R., Jové, M., Ayala, V., Gonzalo, H., Portero-Otín, M., ... Pamplona, R. (2015). Lipidomics of Human Brain Aging and Alzheimer's Disease Pathology. In *International review of neurobiology* (Vol. 122, pp. 133–189). <https://doi.org/10.1016/bs.irn.2015.05.008>
- Naudí, A., Jové, M., Ayala, V., Portero-Otín, M., Barja, G., & Pamplona, R. (2013). Membrane lipid unsaturation as physiological adaptation to animal longevity. *Frontiers in Physiology*, 4, 372. <https://doi.org/10.3389/fphys.2013.00372>
- Nikić, I., Merkler, D., Sorbara, C., Brinkoetter, M., Kreutzfeldt, M., Bareyre, F. M., ... Kerschensteiner, M. (2011). A reversible form of axon damage in experimental autoimmune encephalomyelitis and multiple sclerosis. *Nature Medicine*, 17(4), 495–499. <https://doi.org/10.1038/nm.2324>

- Noga, M. J., Dane, A., Shi, S., Attali, A., van Aken, H., Suidgeest, E., ... Hankemeier, T. (2012). Metabolomics of cerebrospinal fluid reveals changes in the central nervous system metabolism in a rat model of multiple sclerosis. *Metabolomics : Official Journal of the Metabolomic Society*, 8(2), 253–263. <https://doi.org/10.1007/s11306-011-0306-3>
- Nogueras, L., Gonzalo, H., Jové, M., Sol, J., Gil-Sanchez, A., Hervás, J. V., ... Brieva, L. (2019). Lipid profile of cerebrospinal fluid in multiple sclerosis patients: a potential tool for diagnosis. *Scientific Reports*, 9(1). <https://doi.org/10.1038/s41598-019-47906-x>
- Noy, N. (2015). Signaling by retinol and its serum binding protein. *Prostaglandins, Leukotrienes, and Essential Fatty Acids*, 93, 3–7. <https://doi.org/10.1016/j.plefa.2014.10.004>
- O'Brien, J. S., & Sampson, E. L. (1965). Lipid composition of the normal human brain: gray matter, white matter, and myelin. *Journal of Lipid Research*, 6(4), 537–544. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/5865382>
- Oh, J., Vidal-Jordana, A., Montalban, X., Cotsapas, C., Mitrovic, M., Hafler, D., ... Montalban, X. Multiple sclerosis. , 31 *Current Opinion in Neurology* § (2018).
- Ohl, K., Tenbrock, K., & Kipp, M. (2016). Oxidative stress in multiple sclerosis: Central and peripheral mode of action. *Experimental Neurology*, 277, 58–67. <https://doi.org/10.1016/j.expneurol.2015.11.010>
- Oliveira, Sayonara R., Simão, A. N. C., Alfieri, D. F., Flauzino, T., Kallaur, A. P., Mezzaroba, L., ... Reiche, E. M. V. (2017). Vitamin D deficiency is associated with disability and disease progression in multiple sclerosis patients independently of oxidative and nitrosative stress. *Journal of the Neurological Sciences*, 381, 213–219. <https://doi.org/10.1016/j.jns.2017.07.046>
- Oliveira, Sayonara Rangel, Kallaur, A. P., Simão, A. N. C., Morimoto, H. K., Lopes, J., Panis, C., ... Reiche, E. M. V. (2012). Oxidative stress in multiple sclerosis patients in clinical remission: association with the expanded disability status scale. *Journal of the Neurological Sciences*, 321(1–2), 49–53. <https://doi.org/10.1016/j.jns.2012.07.045>
- Ordenstein, L. (1868). *Sur la paralysie agitante et la sclérose en plaques généralisée*. Retrieved from <https://archive.org/details/b22272288/page/n2>
- Pamplona, R. (2008). Membrane phospholipids, lipoxidative damage and molecular integrity: a causal role in aging and longevity. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1777(10), 1249–1262. <https://doi.org/10.1016/j.bbabi.2008.07.003>
- Pamplona, R., Barja, G., & Portero-Otín, M. (2002). Membrane fatty acid unsaturation, protection against oxidative stress, and maximum life span: a homeoviscous-longevity adaptation? *Annals of the New York Academy of Sciences*, 959, 475–490. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11976221>

- Pantzaris, M. C., Loukaides, G. N., Ntzani, E. E., & Patrikios, I. S. (2013). A novel oral nutraceutical formula of omega-3 and omega-6 fatty acids with vitamins (PLP10) in relapsing remitting multiple sclerosis: a randomised, double-blind, placebo-controlled proof-of-concept clinical trial. *BMJ Open*, 3(4). <https://doi.org/10.1136/bmjopen-2012-002170>
- Parker, N., Crichton, P. G., Vidal-Puig, A. J., & Brand, M. D. (2009). Uncoupling protein-1 (UCP1) contributes to the basal proton conductance of brown adipose tissue mitochondria. *Journal of Bioenergetics and Biomembranes*, 41(4), 335–342. <https://doi.org/10.1007/s10863-009-9232-8>
- Patergnani, S., Fossati, V., Bonora, M., Giorgi, C., Marchi, S., Missiroli, S., ... Pinton, P. (2017). Mitochondria in Multiple Sclerosis: Molecular Mechanisms of Pathogenesis. In *International review of cell and molecular biology* (Vol. 328, pp. 49–103). <https://doi.org/10.1016/bs.ircmb.2016.08.003>
- Patti, G. J., Yanes, O., & Siuzdak, G. (2012). Innovation: Metabolomics: the apogee of the omics trilogy. *Nature Reviews. Molecular Cell Biology*, 13(4), 263–269. <https://doi.org/10.1038/nrm3314>
- Pennisi, G., Cornelius, C., Cavallaro, M. M., Salinaro, A. T., Cambria, M. T., Pennisi, M., ... Calabrese, V. (2011). Redox regulation of cellular stress response in multiple sclerosis. *Biochemical Pharmacology*, 82(10), 1490–1499. <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2011.07.092>
- Pieragostino, D., D'Alessandro, M., di Ioia, M., Rossi, C., Zucchelli, M., Urbani, A., ... Del Boccio, P. (2015). An integrated metabolomics approach for the research of new cerebrospinal fluid biomarkers of multiple sclerosis. *Molecular BioSystems*, 11(6), 1563–1572. <https://doi.org/10.1039/c4mb00700j>
- Pierrot-Deseilligny, C., & Souberbielle, J.-C. (2017). Vitamin D and multiple sclerosis: An update. *Multiple Sclerosis and Related Disorders*, 14, 35–45. <https://doi.org/10.1016/j.msard.2017.03.014>
- Pizarro, C., Arenzana-Rámila, I., Pérez-del-Notario, N., Pérez-Matute, P., & González-Sáiz, J.-M. (2013). Plasma lipidomic profiling method based on ultrasound extraction and liquid chromatography mass spectrometry. *Analytical Chemistry*, 85(24), 12085–12092. <https://doi.org/10.1021/ac403181c>
- Polman, C. H., Reingold, S. C., Banwell, B., Clanet, M., Cohen, J. A., Filippi, M., ... Wolinsky, J. S. (2011). Diagnostic criteria for multiple sclerosis: 2010 revisions to the McDonald criteria. *Annals of Neurology*, 69(2), 292–302. <https://doi.org/10.1002/ana.22366>
- Poser, C. M., Paty, D. W., Scheinberg, L., McDonald, W. I., Davis, F. A., Ebers, G. C., ... Tourtellotte, W. W. (1983). New diagnostic criteria for multiple sclerosis: Guidelines for research protocols. *Annals of Neurology*, 13(3), 227–231. <https://doi.org/10.1002/ana.410130302>
- Pucino, V., Bombardieri, M., Pitzalis, C., & Mauro, C. (2017). Lactate at the crossroads of metabolism, inflammation, and autoimmunity. *European Journal of Immunology*, 47(1), 14–21. <https://doi.org/10.1002/eji.201646477>

- Putri, S. P., Yamamoto, S., Tsugawa, H., & Fukusaki, E. (2013). Current metabolomics: technological advances. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 116(1), 9–16. <https://doi.org/10.1016/j.jbiosc.2013.01.004>
- Quintana, F. J., Farez, M. F., Viglietta, V., Iglesias, A. H., Merbl, Y., Izquierdo, G., ... Weiner, H. L. (2008). Antigen microarrays identify unique serum autoantibody signatures in clinical and pathologic subtypes of multiple sclerosis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 105(48), 18889–18894. <https://doi.org/10.1073/pnas.0806310105>
- Re, R., Pellegrini, N., Proteggente, A., Pannala, A., Yang, M., & Rice-Evans, C. (1999). Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radical Biology & Medicine*, 26(9–10), 1231–1237. [https://doi.org/10.1016/S0891-5849\(98\)00315-3](https://doi.org/10.1016/S0891-5849(98)00315-3)
- Reich, D. S., Lucchinetti, C. F., & Calabresi, P. A. (2018). Multiple Sclerosis. *New England Journal of Medicine*, 378(2), 169–180. <https://doi.org/10.1056/NEJMra1401483>
- Reinke, S. N., Broadhurst, D. L., Sykes, B. D., Baker, G. B., Catz, I., Warren, K. G., & Power, C. (2014). Metabolomic profiling in multiple sclerosis: insights into biomarkers and pathogenesis. *Multiple Sclerosis (Houndmills, Basingstoke, England)*, 20(10), 1396–1400. <https://doi.org/10.1177/1352458513516528>
- Sadovnick, A. D., Armstrong, H., Rice, G. P., Bulman, D., Hashimoto, L., Paty, D. W., ... Murray, T. J. (1993). A population-based study of multiple sclerosis in twins: update. *Annals of Neurology*, 33(3), 281–285. <https://doi.org/10.1002/ana.410330309>
- Sadowska-Bartosz, I., Adamczyk-Sowa, M., Gajewska, A., & Bartosz, G. (2014). Oxidative modification of blood serum proteins in multiple sclerosis after interferon or mitoxantrone treatment. *Journal of Neuroimmunology*, 266(1–2), 67–74. <https://doi.org/10.1016/j.jneuroim.2013.11.005>
- Sadowska-Bartosz, I., Adamczyk-Sowa, M., Galiniak, S., Mucha, S., Pierzchala, K., & Bartosz, G. (2013). Oxidative modification of serum proteins in multiple sclerosis. *Neurochemistry International*, 63(5), 507–516. <https://doi.org/10.1016/j.neuint.2013.08.009>
- Saleem, S., Anwar, A., Fayyaz, M., Anwer, F., & Anwar, F. (2019). An Overview of Therapeutic Options in Relapsing-remitting Multiple Sclerosis. *Cureus*, 11(7), e5246. <https://doi.org/10.7759/cureus.5246>
- Schmitt, S., Castelvetti, L. C., & Simons, M. (2015). Metabolism and functions of lipids in myelin. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1851(8), 999–1005. <https://doi.org/10.1016/j.bbailip.2014.12.016>
- Schumacher, G. A. (1960). Multiple Sclerosis. *Postgraduate Medicine*, 27(5), 569–580. <https://doi.org/10.1080/00325481.1960.11712912>
- Serafini, B., Rosicarelli, B., Magliozzi, R., Stigliano, E., & Aloisi, F. (2004). Detection of ectopic B-cell follicles with germinal centers in the meninges of patients with secondary progressive multiple sclerosis. *Brain Pathology (Zurich, Switzerland)*, 14(2), 164–174. Retrieved from

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15193029>

- Sghaier, R., Nury, T., Leoni, V., Caccia, C., Pais De Barros, J.-P., Cherif, A., ... Zarrouk, A. (2019). Dimethyl fumarate and monomethyl fumarate attenuate oxidative stress and mitochondrial alterations leading to oxiaoptophagy in 158N murine oligodendrocytes treated with 7 β -hydroxycholesterol. *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, 194, 105432. <https://doi.org/10.1016/j.jsbmb.2019.105432>
- Shevchenko, A., & Simons, K. (2010). Lipidomics: coming to grips with lipid diversity. *Nature Reviews. Molecular Cell Biology*, 11(8), 593–598. <https://doi.org/10.1038/nrm2934>
- Silaidos, C., Pilatus, U., Grewal, R., Matura, S., Lienerth, B., Pantel, J., & Eckert, G. P. (2018). Sex-associated differences in mitochondrial function in human peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) and brain. *Biology of Sex Differences*, 9(1), 34. <https://doi.org/10.1186/s13293-018-0193-7>
- Simental-Mendía, E., Simental-Mendía, L. E., & Guerrero-Romero, F. (2017). Serum uric acid concentrations are directly associated with the presence of benign multiple sclerosis. *Neurological Sciences : Official Journal of the Italian Neurological Society and of the Italian Society of Clinical Neurophysiology*. <https://doi.org/10.1007/s10072-017-3043-1>
- Simpson Jr, S., der Mei, I. van, & Taylor, B. (2018). The Role of Vitamin D in Multiple Sclerosis: Biology and Biochemistry, Epidemiology and Potential Roles in Treatment. *Medicinal Chemistry*, 14(2), 129–143. <https://doi.org/10.2174/1573406413666170921143600>
- Sintzel, M. B., Rametta, M., & Reder, A. T. (2018). Vitamin D and Multiple Sclerosis: A Comprehensive Review. *Neurology and Therapy*, 7(1), 59–85. <https://doi.org/10.1007/s40120-017-0086-4>
- St-Pierre, J., Buckingham, J. A., Roebuck, S. J., & Brand, M. D. (2002). Topology of Superoxide Production from Different Sites in the Mitochondrial Electron Transport Chain. *Journal of Biological Chemistry*, 277(47), 44784–44790. <https://doi.org/10.1074/jbc.M207217200>
- Steinberg, D., & Witztum, J. L. (2010). Oxidized Low-Density Lipoprotein and Atherosclerosis. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 30(12), 2311–2316. <https://doi.org/10.1161/ATVBAHA.108.179697>
- Stephenson, D. J., Hoeflerlin, L. A., & Chalfant, C. E. (2017). Lipidomics in translational research and the clinical significance of lipid-based biomarkers. *Translational Research*, 189, 13–29. <https://doi.org/10.1016/j.trsl.2017.06.006>
- Stoessel, D., Schulte, C., Teixeira dos Santos, M. C., Scheller, D., Rebollo-Mesa, I., Deuschle, C., ... Maetzler, W. (2018). Promising Metabolite Profiles in the Plasma and CSF of Early Clinical Parkinson's Disease. *Frontiers in Aging Neuroscience*, 10, 51. <https://doi.org/10.3389/fnagi.2018.00051>

- Storey, K. B. (1996). Oxidative stress: animal adaptations in nature. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research = Revista Brasileira de Pesquisas Medicas e Biologicas*, 29(12), 1715–1733. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9222437>
- Tasset, I., Agüera, E., Sánchez-López, F., Feijóo, M., Giraldo, A. I., Cruz, A. H., ... Túnez, I. (2012). Peripheral oxidative stress in relapsing-remitting multiple sclerosis. *Clinical Biochemistry*, 45(6), 440–444. <https://doi.org/10.1016/j.clinbiochem.2012.01.023>
- Terrazzano, G., Rubino, V., Damiano, S., Sasso, A., Petrozziello, T., Ucci, V., ... Ruggiero, G. (2014). T cell activation induces CuZn superoxide dismutase (SOD)-1 intracellular re-localization, production and secretion. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1843(2), 265–274. <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2013.10.020>
- Teunissen, C. E., Koel-Simmelink, M. J. A., Pham, T. V., Knol, J. C., Khalil, M., Trentini, A., ... Jimenez, C. R. (2011). Identification of biomarkers for diagnosis and progression of MS by MALDI-TOF mass spectrometry. *Multiple Sclerosis (Houndmills, Basingstoke, England)*, 17(7), 838–850. <https://doi.org/10.1177/1352458511399614>
- Thompson, A. J., Banwell, B. L., Barkhof, F., Carroll, W. M., Coetzee, T., Comi, G., ... Cohen, J. A. (2018). Diagnosis of multiple sclerosis: 2017 revisions of the McDonald criteria. *The Lancet Neurology*, 17(2), 162–173. [https://doi.org/10.1016/S1474-4422\(17\)30470-2](https://doi.org/10.1016/S1474-4422(17)30470-2)
- Torkildsen, O., Wergeland, S., Bakke, S., Beiske, A. G., Bjerve, K. S., Hovdal, H., ... Myhr, K.-M. (2012). ω -3 fatty acid treatment in multiple sclerosis (OFAMS Study): a randomized, double-blind, placebo-controlled trial. *Archives of Neurology*, 69(8), 1044–1051. <https://doi.org/10.1001/archneurol.2012.283>
- Torre, A. M. de la. (2004). *Nutrición y metabolismo en trastornos de la conducta alimentaria*. Retrieved from <http://books.google.com/books?id=ZPkU0ou-Mg4C&pgis=1>
- Trapp, B. D., & Stys, P. K. (2009). Virtual hypoxia and chronic necrosis of demyelinated axons in multiple sclerosis. *The Lancet. Neurology*, 8(3), 280–291. [https://doi.org/10.1016/S1474-4422\(09\)70043-2](https://doi.org/10.1016/S1474-4422(09)70043-2)
- Trépanier, M.-O., Hildebrand, K. D., Nyamoya, S. D., Amor, S., Bazinet, R. P., & Kipp, M. (2018). Phosphatidylcholine 36:1 concentration decreases along with demyelination in the cuprizone animal model and in post-mortem multiple sclerosis brain tissue. *Journal of Neurochemistry*, 145(6), 504–515. <https://doi.org/10.1111/jnc.14335>
- Trpkovic, A., Resanovic, I., Stanimirovic, J., Radak, D., Mousa, S. A., Cenic-Milosevic, D., ... Isenovic, E. R. (2015). Oxidized low-density lipoprotein as a biomarker of cardiovascular diseases. *Critical Reviews in Clinical Laboratory Sciences*, 52(2), 70–85. <https://doi.org/10.3109/10408363.2014.992063>
- Turrens, J. F. (2003). Mitochondrial formation of reactive oxygen species. *The Journal of Physiology*, 552(2), 335–344. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.2003.049478>

- Ueda, Y., Ishitsuka, R., Hullin-Matsuda, F., & Kobayashi, T. (2014). Regulation of the transbilayer movement of diacylglycerol in the plasma membrane. *Biochimie*, *107 Pt A*, 43–50. <https://doi.org/10.1016/j.biochi.2014.09.014>
- Uttara, B., Singh, A. V., Zamboni, P., & Mahajan, R. T. (2009). Oxidative stress and neurodegenerative diseases: a review of upstream and downstream antioxidant therapeutic options. *Current Neuropharmacology*, *7*(1), 65–74. <https://doi.org/10.2174/157015909787602823>
- van der Goes, A., Brouwer, J., Hoekstra, K., Roos, D., van den Berg, T. K., & Dijkstra, C. D. (1998). Reactive oxygen species are required for the phagocytosis of myelin by macrophages. *Journal of Neuroimmunology*, *92*(1–2), 67–75. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9916881>
- van Meeteren, M. E., Teunissen, C. E., Dijkstra, C. D., & van Tol, E. A. F. (2005). Antioxidants and polyunsaturated fatty acids in multiple sclerosis. *European Journal of Clinical Nutrition*, *59*(12), 1347–1361. <https://doi.org/10.1038/sj.ejcn.1602255>
- Vance, D. E., & Vance, J. E. (1996). *Biochemistry of lipids, lipoproteins, and membranes*. Retrieved from [https://books.google.es/books?hl=es&lr=&id=EGMuwXqDbkcC&oi=fnd&pg=PP1&dq=Vance+DE,+Vance+JE+\(2008\)+Biochemistry+of+lipids,+lipoproteins+and+membranes.+Elsevier&ots=pSOVtS_nSQ&sig=5ZpCJvjnnaVGEHnpuGrQo_2nxNI#v=onepage&q&f=false](https://books.google.es/books?hl=es&lr=&id=EGMuwXqDbkcC&oi=fnd&pg=PP1&dq=Vance+DE,+Vance+JE+(2008)+Biochemistry+of+lipids,+lipoproteins+and+membranes.+Elsevier&ots=pSOVtS_nSQ&sig=5ZpCJvjnnaVGEHnpuGrQo_2nxNI#v=onepage&q&f=false)
- Vidaurre, O. G., Haines, J. D., Katz Sand, I., Adula, K. P., Huynh, J. L., McGraw, C. A., ... Casaccia, P. (2014). Cerebrospinal fluid ceramides from patients with multiple sclerosis impair neuronal bioenergetics. *Brain*, *137*(8), 2271–2286. <https://doi.org/10.1093/brain/awu139>
- Villar, L. M., Casanova, B., Ouamara, N., Comabella, M., Jalili, F., Leppert, D., ... Bar-Or, A. (2014). Immunoglobulin M oligoclonal bands: Biomarker of targetable inflammation in primary progressive multiple sclerosis. *Annals of Neurology*, *76*(2), 231–240. <https://doi.org/10.1002/ana.24190>
- Villar, L. M., Costa-Frossard, L., Masterman, T., Fernandez, O., Montalban, X., Casanova, B., ... Álvarez-Cermeño, J. C. (2015). Lipid-specific immunoglobulin M bands in cerebrospinal fluid are associated with a reduced risk of developing progressive multifocal leukoencephalopathy during treatment with natalizumab. *Annals of Neurology*, *77*(3), 447–457. <https://doi.org/10.1002/ana.24345>
- Villar, L. M., Sádaba, M. C., Roldán, E., Masjuan, J., González-Porqué, P., Villarrubia, N., ... Álvarez-Cermeño, J. C. (2005). Intrathecal synthesis of oligoclonal IgM against myelin lipids predicts an aggressive disease course in MS. *The Journal of Clinical Investigation*, *115*(1), 187–194. <https://doi.org/10.1172/JCI22833>
- Villoslada, P., Alonso, C., Agirrezabal, I., Kotelnikova, E., Zubizarreta, I., Pulido-Valdeolivas, I., ... Castro, A. (2017). Metabolomic signatures associated with disease severity in multiple sclerosis. *Neurology(R) Neuroimmunology & Neuroinflammation*, *4*(2), e321.

- <https://doi.org/10.1212/NXI.0000000000000321>
- Wallace, D. C., Fan, W., & Procaccio, V. (2010). Mitochondrial Energetics and Therapeutics. *Annual Review of Pathology: Mechanisms of Disease*, 5(1), 297–348. <https://doi.org/10.1146/annurev.pathol.4.110807.092314>
- Wang, L., Hu, W., Wang, J., Qian, W., & Xiao, H. (2016). Low serum uric acid levels in patients with multiple sclerosis and neuromyelitis optica: An updated meta-analysis. *Multiple Sclerosis and Related Disorders*, 9, 17–22. <https://doi.org/10.1016/j.msard.2016.05.008>
- Wang, P., Xie, K., Wang, C., & Bi, J. (2014). Oxidative Stress Induced by Lipid Peroxidation Is Related with Inflammation of Demyelination and Neurodegeneration in Multiple Sclerosis. *European Neurology*, 72(3–4), 249–254. <https://doi.org/10.1159/000363515>
- Wekerle, H. (2017). B cells in multiple sclerosis. *Autoimmunity*, 50(1), 57–60. <https://doi.org/10.1080/08916934.2017.1281914>
- Wergeland, S., Torkildsen, Ø., Bø, L., & Myhr, K.-M. (2012). Polyunsaturated fatty acids in multiple sclerosis therapy. *Acta Neurologica Scandinavica. Supplementum*, (195), 70–75. <https://doi.org/10.1111/ane.12034>
- Wheeler, D., Bandaru, V. V. R., Calabresi, P. A., Nath, A., & Haughey, N. J. (2008). A defect of sphingolipid metabolism modifies the properties of normal appearing white matter in multiple sclerosis. *Brain: A Journal of Neurology*, 131(Pt 11), 3092–3102. <https://doi.org/10.1093/brain/awn190>
- Wishart, D. S., Feunang, Y. D., Marcu, A., Guo, A. C., Liang, K., Vázquez-Fresno, R., ... Scalbert, A. (2018). HMDB 4.0: the human metabolome database for 2018. *Nucleic Acids Research*, 46(D1), D608–D617. <https://doi.org/10.1093/nar/gkx1089>
- Wishart, D. S., Lewis, M. J., Morrissey, J. A., Flegel, M. D., Jeroncic, K., Xiong, Y., ... Li, L. (2008). The human cerebrospinal fluid metabolome. *Journal of Chromatography B*, 871(2), 164–173. <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2008.05.001>
- Wu, R., & Lefvert, A. K. (1995). Autoantibodies against oxidized low density lipoproteins (oxLDL): characterization of antibody isotype, subclass, affinity and effect on the macrophage uptake of oxLDL. *Clinical and Experimental Immunology*, 102(1), 174–180. Retrieved from <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=1553342&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
- Wuolikainen, A., Jonsson, P., Ahnlund, M., Antti, H., Marklund, S. L., Moritz, T., ... Trupp, M. (2016). Multi-platform mass spectrometry analysis of the CSF and plasma metabolomes of rigorously matched amyotrophic lateral sclerosis, Parkinson's disease and control subjects. *Molecular BioSystems*, 12(4), 1287–1298. <https://doi.org/10.1039/c5mb00711a>
- Yan, G., Li, L., Zhu, B., & Li, Y. (2016). Lipidome in colorectal cancer. *Oncotarget*, 7(22), 33429–33439.

- <https://doi.org/10.18632/oncotarget.7960>
- Yang, Z., Matteson, E. L., Goronzy, J. J., & Weyand, C. M. (2015). T-cell metabolism in autoimmune disease. *Arthritis Research & Therapy*, *17*(1), 29. <https://doi.org/10.1186/s13075-015-0542-4>
- Youdim, K. A., Martin, A., & Joseph, J. A. (2000). Essential fatty acids and the brain: possible health implications. *International Journal of Developmental Neuroscience: The Official Journal of the International Society for Developmental Neuroscience*, *18*(4–5), 383–399. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10817922>
- Young, I. R., Hall, A. S., Pallis, C. A., Legg, N. J., Bydder, G. M., & Steiner, R. E. (1981). Nuclear magnetic resonance imaging of the brain in multiple sclerosis. *Lancet (London, England)*, *2*(8255), 1063–1066. [https://doi.org/10.1016/s0140-6736\(81\)91273-3](https://doi.org/10.1016/s0140-6736(81)91273-3)
- Yousefi, B., Ahmadi, Y., Ghorbanihaghjo, A., Faghfoori, Z., & Irannejad, V. S. (2014). Serum Arsenic and Lipid Peroxidation Levels in Patients with Multiple Sclerosis. *Biological Trace Element Research*. <https://doi.org/10.1007/s12011-014-9956-0>
- Zarrouk, A., Debbabi, M., Bezine, M., Karym, E. M., Badreddine, A., Rouaud, O., ... Lizard, G. (2018). Lipid Biomarkers in Alzheimer's Disease. *Current Alzheimer Research*, *15*(4), 303–312. <https://doi.org/10.2174/1567205014666170505101426>

ANEXOS

8. ANEXOS

Anexo 1 Diferencias en los metabolitos de la vitamina D entre controles suplementados y no suplementados

	Suplemento	N	Rango promedio
VitD3	NO suplement	52	28,90
	Suplementado	6	34,67
	Total	58	
Vit25D3	NO suplement	55	29,18
	Suplementado	5	45,00
	Total	60	
V24.25d3	NO suplement	55	29,24
	Suplementado	5	44,40
	Total	60	
V1.25d3	NO suplement	52	27,63
	Suplementado	6	45,67
	Total	58	
VitD2	NO suplement	9	5,00
	Total	9 ^a	
Vit25D2	NO suplement	54	31,61
	Suplementado	6	20,50
	Total	60	

Estadísticos de prueba ^{a,b}					
	VitD3	Vit25D3	V24.25d3	V1.25d3	Vit25D2
Chi-cuadrado	,626	3,760	3,455	6,134	2,186
gl	1	1	1	1	1
Sig. asintótica	,429	,052	,063	,013	,139
a. Prueba de Kruskal Wallis					
b. Variable de agrupación: Suplemento					

Anexo 2 Metabolitos no identificados significativamente diferentes del LCR

Compuesto	M/z	Retention Time	p -valor
180.020@0.673	181.020	0.673	0.035
194.116@1.600	195.116	1.600	0.033
114.068@3.066	115.068	3.066	0.049
185.989@0.366	186.989	0.366	0.030
432.376@11.969	433.376	11.969	0.040
186.119@5.291	187.119	5.291	0.034
103.986@0.366	104.986	0.366	0.034
198.162@8.306	199.162	8.306	0.013
201.209@4.635	202.209	4.635	0.001
226.198@9.238	227.198	9.238	0.013
232.976@0.254	233.976	0.254	0.025
238.073@0.678	239.073	0.678	0.013
265.134@7.731	266.134	7.731	0.001
274.251@10.631	275.251	10.631	0.013
278.092@7.902	279.092	7.902	0.000
294.187@9.111	295.187	9.111	0.036
328.261@9.766	329.261	9.766	0.041
412.259@0.344	413.259	0.344	0.012
412.261@0.380	413.261	0.380	0.018
431.999@0.366	432.999	0.366	0.035
437.371@11.146	438.371	11.146	0.038
449.395@11.955	450.395	11.955	0.047
459.306@5.838	460.306	5.838	0.007
491.431@12.889	492.431	12.889	0.000
497.394@5.902	498.394	5.902	0.047
503.331@6.179	504.331	6.179	0.001
507.448@12.318	508.448	12.318	0.021
514.003@0.365	515.003	0.365	0.034
526.395@12.431	527.395	12.431	0.041
534.392@12.108	535.392	12.108	0.043
555.960@0.324	556.960	0.324	0.046
591.382@6.735	592.382	6.735	0.001
595.501@12.348	596.501	12.348	0.036
611.978@0.368	612.978	0.368	0.026
614.567@13.455	615.567	13.455	0.040
623.230@13.196	624.230	13.196	0.012
633.998@0.361	634.998	0.361	0.029
635.409@7.091	636.409	7.091	0.001
672.549@13.854	673.549	13.854	0.012
678.009@0.364	679.009	0.364	0.035
680.509@7.568	681.509	7.568	0.021
712.578@13.566	713.578	13.566	0.015
717.512@12.971	718.512	12.971	0.012
721.634@14.388	722.634	14.388	0.011
734.577@13.499	735.577	13.499	0.030
767.699@14.234	768.699	14.234	0.013
771.276@13.529	772.276	13.529	0.001
790.654@13.830	791.654	13.830	0.002
801.247@13.367	802.247	13.367	0.018
828.716@14.785	829.716	14.785	0.032
831.446@7.320	832.446	7.320	0.036

834.231@13.527	835.231	13.527	0.013
887.976@0.368	888.976	0.368	0.034
905.250@13.665	906.250	13.665	0.039
1035.763@12.422	1036.763	12.422	0.001
1246.000@0.361	1247.000	0.361	0.036
1249.004@0.361	1250.004	0.361	0.035
1280.995@0.366	1281.995	0.366	0.039

Anexo 3 Metabolitos no identificados significativamente diferentes del suero

Compuesto	m/z	Tiempo de retención	p-valor
752.429@7.339	753.429	7.339	0.045
388.122@7.510	389.122	7.510	0.031
605.416@10.708	606.416	10.708	0.031
468.350@12.545	469.350	12.545	0.049
793.594@13.820	794.594	13.820	0.034
836.767@14.522	837.767	14.522	0.044
921.003@0.357	922.003	0.357	0.036
453.341@6.310	454.341	6.310	0.049
176.047@6.929	177.047	6.929	0.049
807.730@14.425	808.730	14.425	0.031
470.730@4.754	471.730	4.754	0.033
604.271@10.857	605.271	10.857	0.031
958.987@0.362	959.987	0.362	0.010

Anexo 4 Lípidos no identificados significativamente diferentes del LCR

Compuesto	m/z	Tiempo de retención	p-valor
697.5671@7.742	698.567	7.742	<0.001
444.2531@0.913	445.253	0.913	<0.001
528.3827@528.383	529.383	0.913	0.001
1055.923@10.270	1056.923	10.270	0.001
869.7462@9.793	870.746	9.793	0.001
945.8383@10.101	946.838	10.101	0.001
658.9717@0.910	659.972	0.910	0.002
433.3099@2.765	434.310	2.765	0.002
577.3868@2.487	578.387	2.487	0.002
433.3102@3.207	434.310	3.207	0.002
444.2275@0.908	445.228	0.908	0.003
523.3847@3.856	524.385	3.856	0.003
901.7429@8.670	902.743	8.670	0.003
446.3401@6.566	447.340	6.566	0.004
266.9601@0.745	267.960	0.745	0.004
640.2987@6.769	641.299	6.769	0.004
560.382@0.910	561.382	0.910	0.005
662.4499@7.946	663.450	7.946	0.005
740.6461@9.848	741.646	9.848	0.006
738.6284@9.193	739.628	9.193	0.006
842.7561@10.301	843.756	10.301	0.006
928.7886@9.747	929.789	9.747	0.006
612.6015@9.373	613.602	9.373	0.006
884.5595@0.907	885.560	0.907	0.008
1547.313@7.936	1548.313	7.936	0.008
905.7673@9.056	906.767	9.056	0.008
813.4384@9.410	814.438	9.410	0.009
755.7384@7.016	756.738	7.016	0.009
762.6136@8.145	763.614	8.145	0.010
873.6561@0.920	874.656	0.920	0.011
1098.757@0.900	1099.757	0.900	0.013
1142.784@0.898	1143.784	0.898	0.013
550.3845@0.904	551.385	0.904	0.013
837.6288@8.526	838.629	8.526	0.013
1709.467@10.092	1710.467	10.092	0.013
875.6373@0.914	876.637	0.914	0.014
595.5217@8.265	596.522	8.265	0.014
711.5826@5.404	712.583	5.404	0.015
9087.114@3.494	9088.114	3.494	0.016
556.4318@5.061	557.432	5.061	0.017
4904.395@0.879	4905.395	0.879	0.017
1701.578@10.412	1702.578	10.412	0.017
507.4506@5.250	508.451	5.250	0.018
1739.519@10.261	1740.519	10.261	0.019
1548.832@9.091	1549.832	9.091	0.019
523.4453@4.200	524.445	4.200	0.019
811.5032@2.448	812.503	2.448	0.022
813.4384@9.410	814.438	9.410	0.023
617.2207@6.340	618.221	6.340	0.023
294.2219@9.180	295.222	9.180	0.023
579.5066@5.855	580.507	5.855	0.023

679.4743@7.944	680.474	7.944	0.023
1034.804@6.390	1035.804	6.390	0.023
777.5545@7.921	778.555	7.921	0.024
556.4296@4.331	557.430	4.331	0.024
399.295@0.901	400.295	0.901	0.024
604.4477@7.372	605.448	7.372	0.025
931.7911@9.109	932.791	9.109	0.025
795.6152@8.591	796.615	8.591	0.025
561.4417@7.030	562.442	7.030	0.025
1494.4241@7.458	1495.424	7.458	0.026
696.3606@7.963	697.361	7.963	0.026
572.4262@4.039	573.426	4.039	0.027
589.681@7.005	590.681	7.005	0.027
772.6452@9.029	773.645	9.029	0.028
452.3637@3.849	453.364	3.849	0.028
749.6622@9.356	750.662	9.356	0.028
791.7087@6.574	792.709	6.574	0.028
306.1863@6.474	307.186	6.474	0.029
1407.1306@9.148	1408.131	9.148	0.029
651.9692@0.907	652.969	0.907	0.030
1156.3748@7.380	1157.375	7.380	0.030
1094.3173@9.573	1095.317	9.573	0.031
710.567@9.250	711.567	9.250	0.031
435.3933@4.603	436.393	4.603	0.032
216.042@0.852	217.042	0.852	0.033
1367.1342@9.230	1368.134	9.230	0.033
773.3503@8.758	774.350	8.758	0.036
173.1414@0.796	174.141	0.796	0.037
619.4313@0.908	620.431	0.908	0.037
611.4969@3.899	612.497	3.899	0.038
852.5342@3.025	853.534	3.025	0.038
166.0271@6.311	167.027	6.311	0.039
412.2633@5.925	413.263	5.925	0.039
579.607@9.476	580.607	9.476	0.040
998.6639@0.909	999.664	0.909	0.040
887.7509@8.958	888.751	8.958	0.040
858.6052@6.560	859.605	6.560	0.041
972.882@10.590	973.882	10.590	0.041
388.2494@0.880	389.249	0.880	0.041
848.8249@10.526	849.825	10.526	0.041
610.4539@0.930	611.454	0.930	0.042
656.515@6.363	657.515	6.363	0.042
954.7443@8.590	955.744	8.590	0.042
834.5913@0.908	835.591	0.908	0.042
816.7668@10.106	817.767	10.106	0.043
756.6438@9.154	757.644	9.154	0.045
305.3186@3.099	306.319	3.099	0.047
672.5777@10.656	673.578	10.656	0.047
889.7681@9.155	890.768	9.155	0.047
1032.7596@4.749	1033.760	4.749	0.048
832.4308@2.451	833.431	2.451	0.048
765.6868@9.658	766.687	9.658	0.048
688.4883@0.909	689.488	0.909	0.049
532.4763@5.966	533.476	5.966	0.050
588.5239@8.410	589.524	8.410	0.050

Anexo 5 Lípidos no identificados significativamente diferentes del suero

Compuesto	m/z	Tiempo de retención	p-valor
396.296@2.073	397.296	2.073	0.012
407.305@6.183	408.305	6.183	0.005
412.262@5.831	413.262	5.831	0.044
435.393@4.508	436.393	4.508	0.004
440.326@0.928	441.326	0.928	0.015
446.341@6.390	447.341	6.390	0.003
448.331@4.396	449.331	4.396	0.004
465.526@8.135	466.526	8.135	0.001
468.322@6.164	469.322	6.164	0.005
468.323@5.951	469.323	5.951	0.001
476.419@4.509	477.419	4.509	0.014
479.419@3.683	480.419	3.683	0.014
479.419@4.291	480.419	4.291	0.009
484.353@0.926	485.353	0.926	0.012
505.381@4.400	506.381	4.400	0.005
507.450@5.161	508.450	5.161	0.046
507.574@10.310	508.574	10.310	0.000
511.404@0.929	512.404	0.929	0.043
512.405@4.559	513.405	4.559	0.003
516.361@0.910	517.361	0.910	0.024
516.486@7.148	517.486	7.148	0.019
528.400@4.107	529.400	4.107	0.003
533.905@0.925	534.905	0.925	0.024
537.459@3.569	538.459	3.569	0.005
555.918@0.923	556.918	0.923	0.042
561.440@6.031	562.440	6.031	0.001
561.440@6.394	562.440	6.394	0.005
563.505@6.680	564.505	6.680	0.043
563.917@0.927	564.917	0.927	0.034
564.472@4.107	565.472	4.107	0.011
565.686@6.942	566.686	6.942	0.043
566.694@6.946	567.694	6.946	0.005
567.470@3.096	568.470	3.096	0.006
567.471@3.947	568.471	3.947	0.018
567.699@7.327	568.699	7.327	0.010
567.700@6.941	568.700	6.941	0.002
570.445@4.669	571.445	4.669	0.032
579.607@9.456	580.607	9.456	0.003
585.930@0.925	586.930	0.925	0.022
588.523@8.392	589.523	8.392	0.038
608.497@3.947	609.497	3.947	0.021
612.601@9.353	613.601	9.353	0.021
617.221@6.241	618.221	6.241	0.040
620.527@5.777	621.527	5.777	0.005
625.451@0.924	626.451	0.924	0.008
625.753@6.953	626.753	6.953	0.018
625.754@7.335	626.754	7.335	0.012
651.560@5.810	652.560	5.810	0.024
665.985@0.922	666.985	0.922	0.007
667.559@5.442	668.559	5.442	0.018
668.331@7.319	669.331	7.319	0.038

674.671@10.700	675.671	10.700	0.009
685.532@0.936	686.532	0.936	0.038
687.996@0.924	688.996	0.924	0.003
699.551@3.570	700.551	3.570	0.019
699.618@9.851	700.618	9.851	0.030
702.511@0.920	703.511	0.920	0.009
720.483@3.570	721.483	3.570	0.048
721.697@5.880	722.697	5.880	0.001
724.506@0.924	725.506	0.924	0.029
724.625@9.148	725.625	9.148	0.014
740.648@9.845	741.648	9.845	0.018
743.572@0.934	744.572	0.934	0.010
747.720@7.407	748.720	7.407	0.003
770.582@0.939	771.582	0.939	0.035
776.566@8.951	777.566	8.951	0.001
786.740@10.284	787.740	10.284	0.039
789.766@7.947	790.766	7.947	0.007
791.703@0.926	792.703	0.926	0.021
792.541@0.919	793.541	0.919	0.002
811.503@2.912	812.503	2.912	0.005
811.504@2.367	812.504	2.367	0.016
813.686@6.362	814.686	6.362	0.027
831.622@0.924	832.622	0.924	0.005
836.566@0.918	837.566	0.918	0.030
845.642@0.933	846.642	0.933	0.018
852.530@2.909	853.530	2.909	0.013
852.531@2.366	853.531	2.366	0.009
861.784@10.416	862.784	10.416	0.037
875.647@0.923	876.647	0.923	0.004
886.771@9.966	887.771	9.966	0.016
889.670@0.930	890.670	0.930	0.015
895.767@9.823	896.767	9.823	0.030
897.855@10.416	898.855	10.416	0.026
909.705@6.017	910.705	6.017	0.019
912.742@9.240	913.742	9.240	0.013
912.745@8.950	913.745	8.950	0.000
933.696@0.930	934.696	0.930	0.015
940.770@9.234	941.770	9.234	0.012
948.814@8.952	949.814	8.952	0.003
954.747@8.195	955.747	8.195	0.001
954.901@10.419	955.901	10.419	0.030
976.771@7.346	977.771	7.346	0.009
1004.802@7.354	1005.802	7.354	0.029
1021.746@0.929	1022.746	0.929	0.004
1049.779@0.926	1050.779	0.926	0.024
1065.775@0.928	1066.775	0.928	0.005
1093.802@0.925	1094.802	0.925	0.042
1119.625@7.232	1120.625	7.232	0.028
1337.272@10.697	1338.272	10.697	0.014
1537.393@7.409	1538.393	7.409	0.038

Anexo 6 Correlación entre EDSS y concentración de lactato

		EDSS	Lactato
EDSS	Correlación de Pearson	1	-,164
	Sig. (bilateral)		,191
	N	98	65
Lactato	Correlación de Pearson	-,164	1
	Sig. (bilateral)	,191	
	N	65	115

