



Universidad de Alcalá

Departamento de Biología de Sistemas

Programa de doctorado: Señalización celular

TESIS DOCTORAL

Nuevos abordajes de cuantificación en lipidómica y su aplicación en la esclerosis múltiple

Memoria para optar al grado de doctor presentada por:

D. Jorge Luis Serna Ferrón

Directores de la Tesis:

Dr. Óscar Pastor Rojo

Dra. Rebeca Busto Durán

2019

ÓSCAR PASTOR ROJO, Facultativo Especialista de Área del Servicio de Bioquímica Clínica del Hospital Universitario Ramón y Cajal

REBECA BUSTO DURÁN, Investigadora de la Fundación Biomédica del Hospital Universitario Ramón y Cajal en el Servicio de Bioquímica-Investigación.

y EDUARDO ARILLA FERREIRO, Catedrático del Departamento de Biología de Sistemas de la Universidad de Alcalá

INFORMAN:

Que D. JORGE LUIS SERNA FERRÓN ha realizado la Tesis Doctoral titulada NUEVOS ABORDAJES DE CUANTIFICACIÓN EN LIPIDÓMICA Y SU APLICACIÓN EN LA ESCLEROSIS MÚLTIPLE bajo su dirección en el Servicio de Bioquímica Clínica y de Bioquímica-Investigación del Hospital Universitario Ramón y Cajal, dentro del programa de Doctorado SEÑALIZACIÓN CELULAR del Departamento de Biología de Sistemas de la Universidad de Alcalá.

CONSIDERAN:

Que el estudio experimental es original y los resultados satisfactorios para su defensa pública como Tesis Doctoral en el Departamento de Biología de Sistemas de la Universidad de Alcalá.

Alcalá de Henares, a 11 de noviembre de 2019

Fdo:

Óscar Pastor Rojo

Rebeca Busto Durán

Eduardo Arilla Ferreiro

Esta tesis doctoral ha sido realizada gracias a la financiación obtenida de proyectos del Ministerio de Ciencia, Innovación y Universidad (SAF2011-29951, SAF2015-70747-R, RTI2018-098113-B-100), el programa ALIBIRD S2013/ABI-2728 de la Comunidad de Madrid, a los proyectos PI18-01152 y CIBEROBN18PI03/2019 del Instituto de Salud Carlos III, cofinanciado por el Fondo Europeo de Desarrollo Regional (FEDER) y a las infraestructuras del Hospital Universitario Ramón y Cajal-IRYCIS.

ÍNDICE

ABREVIATURAS	1
LISTA DE FIGURAS	5
LISTA DE TABLAS	9
I. RESUMEN/SUMMARY	11
II. INTRODUCCIÓN.....	17
1. Lipidómica.....	19
1.1. Definición de lípido.....	19
1.2. Clasificación de los lípidos	20
1.2.1. Lípidos simples	22
1.2.2. Lípidos complejos	23
1.3. Principales clases de lípidos.....	23
1.3.1. Glicerolípidos y glicerofosfolípidos.....	23
1.3.2. Esfingolípidos	27
1.3.3. Esteranos	29
1.4. ¿Qué es la lipidómica?.....	31
1.5. Nomenclatura de los lípidos	32
1.6. Lipoproteínas	33
2. Tecnologías empleadas en lipidómica	37
2.1. Extracción de lípidos	38
2.2. Espectrometría de masas.....	39
2.2.1. Fuente de iones.....	40
2.2.2. Analizador de masa	40
2.2.3. MALDI-TOF	42
2.2.4. ESI - QqQ	43
2.3. HPLC-ELSD.....	45
2.4. Cromatografía de gases.....	46
3. Esclerosis múltiple.....	49

3.1.	Etiopatogenia	49
3.2.	Patogenia	52
3.3.	Diagnóstico y tratamiento	53
3.4.	Implicación de los lípidos en la EM.....	54
3.5.	Encefalomiелitis autoinmune experimental como modelo animal de esclerosis múltiple	55
3.6.	Ácido elágico	57
III.	HIPÓTESIS Y OBJETIVOS	59
IV.	MATERIALES Y MÉTODOS.....	63
1.	Materiales	65
2.	Modelo experimental de encefalomiелitis autoinmune experimental (EAE) y tratamiento con ácido elágico	67
3.	Pacientes con esclerosis múltiple.....	68
4.	Aislamiento de lipoproteínas del plasma.....	69
5.	Extracción de los lípidos	70
6.	Metanolisis del extracto lipídico para análisis de esfingolípidos	71
7.	Aislamiento de clases lipídicas por extracción en fase sólida	71
8.	Análisis de las clases lipídicas por HPLC-ELSD.....	71
9.	Análisis de las clases y especies lipídicas por MALDI-TOF	72
10.	Análisis LC-MS/MS del extracto lipídico	73
11.	Análisis de la composición de ácidos grasos de ésteres de colesterol mediante GC-MS.....	75
12.	Procesamiento de los datos de lipidómica	75
13.	Análisis inmunohistoquímico del cerebro	79
14.	Estudios de expresión de proteínas	80
15.	Síntesis <i>de novo</i> de ceramidas en cultivos celulares.....	80
16.	Parámetros bioquímicos.....	82
17.	RT-PCR cuantitativa a tiempo real (qRT-PCR).....	82
18.	Análisis estadístico de los resultados	83
V.	RESULTADOS.....	85
1.	Análisis lipidómico del plasma y de las lipoproteínas del plasma por MALDI-TOF	87
1.1.	Análisis de fosfolípidos y triglicéridos mediante espectrometría de masas MALDI -TOF	87
1.2.	Análisis lipidómico del plasma por MALDI-TOF/MS.....	92

1.3.	Análisis de las lipoproteínas del plasma por MALDI-TOF	101
1.4.	Distribución de especies de lípido en las lipoproteínas	103
2.	Efecto del tratamiento con ácido elágico en la encefalomiелitis autoinmune experimental.....	111
2.1.	Efecto del tratamiento con ácido elágico en las variables clínicas del modelo	111
2.2.	Análisis inmunohistoquímico del cerebro de ratas EAE	113
2.3.	Análisis de la expresión de proteína básica de mielina mediante western-blot	115
2.4.	Análisis lipídómico de cerebro y médula espinal de ratas EAE.....	116
2.5.	Estudio de la síntesis de ceramida en células gliales.....	123
2.6.	Expresión de genes implicados en la síntesis de esfingolípidos.....	124
3.	Estudio lipídómico del LCR en pacientes con esclerosis múltiple	127
VI.	DISCUSIÓN	131
1.	Análisis lipídómico del plasma y de las lipoproteínas del plasma por MALDI-TOF	133
2.	Efecto del tratamiento con ácido elágico en la encefalomiелitis autoinmune experimental.....	141
3.	Estudio lipídómico del LCR en pacientes con esclerosis múltiple	149
VII.	CONCLUSIONES.....	153
VIII.	ANEXOS	157
ANEXO I.	TABLAS COMPLEMENTARIAS.....	159
IX.	BIBLIOGRAFÍA.....	161
X.	ARTÍCULOS.....	181

ABREVIATURAS

Durante el transcurso de la tesis se emplean abreviaturas derivadas del inglés por su uso generalizado.

9-AA	9-Aminoacridina
APCI	Ionización química (<i>Atmospheric Pressure Chemical Ionization</i>)
BCA	Ácido bicontínico
BHE	Barrera hematoencefálica
BOC	Bandas oligoclonales
BOCG	Bandas oligoclonales IgG
BOCM	Bandas oligoclonales IgM
BSA	Albúmina de suero bovino (<i>Bovine Serum Albumin</i>)
cDNA	DNA complementario
CE	Éster de colesterol (<i>Cholesterol Esther</i>)
Cer	Ceramida
CFA	Adyuvante completo de Freund (<i>Freund's complete adjuvant</i>)
CID	Celda de colisión (<i>Collision-induced Dissociation</i>)
Ct	Ciclo umbral
CV	Coefficiente de variación
DG	Diglicérido
EAE	Encefalomiелitis autoinmune experimental
EI	Impacto electrónico (<i>Electronic Impact</i>)
ELSD	Detector de dispersión de luz evaporativa (<i>Evaporative Light Scattering Detector</i>)
ESI	Electrospray (<i>Electrospry Ionization</i>)
FA	Ácido graso (<i>Fatty Acid</i>)
FBS	Suero fetal bovino (<i>Fetal Bovine Serum</i>)
FC	Colesterol libre (<i>Free Cholesterol</i>)
FFA	Ácido graso libre (<i>Free Fatty Acid</i>)
FWHM	Anchura del pico a la mitad del máximo (<i>Full width at half maximum</i>)
GalCer	Galactosilceramida
GC	Cromatografía de gases (<i>Gas Chromatography</i>)
GluCer	Glucosilceramida

GPSC	Médula espinal de cobaya (<i>Guinea Pig Spinal Cord</i>)
HDL	Lipoproteína de alta densidad (<i>High Density Lipoprotein</i>)
HexCer	Hexosilceramidas
HPLC	Cromatografía líquida de alto rendimiento (<i>High Performance Liquid Chromatography</i>)
IgG	Inmunoglobulina G
IgM	Inmunoglobulina M
IS	Estándar interno (<i>Internal Standard</i>)
LacCer	Lactosilceramida
LC	Cromatografía de líquidos (<i>Liquid Chromatography</i>)
LCAT	<i>Lecitin:colesterol aciltransferasa</i>
LC-MS/MS	Cromatografía líquida con detector de espectrometría de masas
LCR	Líquido cefalorraquídeo
LDL	Lipoproteínas de baja densidad (<i>Low Density Lipoprotein</i>)
LPC	Lisofosfatidilcolina (<i>Lysophosphatidylcholine</i>)
LPDS	Suero deficiente de lipoproteínas (<i>Lipoprotein Deficient Serum</i>)
m/z	Relación masa/carga
MAG	Glicoproteína asociada a la mielina (<i>Myelin Associated Glycoprotein</i>)
MALDI	Desorción/ionización mediante láser asistida por matriz (<i>Matrix Assisted Laser Desorption/Ionization</i>)
MBP	Proteína básica de mielina (<i>Myelin Basic Protein</i>)
MG	Monoglicérido
MOG	Glicoproteína oligodendrocítica de mielina (<i>Myelin Oligodendrocyte Glycoprotein</i>)
MRM	Monitorización de reacción múltiple (<i>Multiple Reaction Monitoring</i>)
mRNA	RNA mensajero
MS	Espectrometría de masas (<i>Mass Spectrometry</i>)
MS/MS	Experimentos de masas en tándem
NLS	Experimento de pérdida de neutro (<i>Neutral Loss Scan</i>)
OSP	Proteína específica de oligodendrocitos (<i>Oligodendrocyte Specific Protein</i>)
p.i.	Post-inmunización
PA	Ácido fosfatídico (<i>Phosphatidic Acid</i>)
PC	Fosfatidilcolina (<i>Phosphatidylcholine</i>)
PC O-	Fosfatidilcolina plasmalógeno
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa (<i>Polymerase Chain Reaction</i>)

PE	Fosfatidiletanolamina (<i>Phosphatidyletanolamine</i>)
PE O-	Fosfatidiletanolamina plasmalógeno
PG	Fosfatidilglicerol (<i>Phosphatidylglycerol</i>)
PI	Fosfatidilinositol (<i>Phosphatidylinositol</i>)
PIS	Experimento de ión precursor (<i>Precursor Ion Scan</i>)
PL	Glicerofosfolípido (<i>Phospholipid</i>)
PLP	Proteína proteolípida (<i>Proteolipid Protein</i>)
PS	Fosfatidilserina (<i>Phosphatidylserine</i>)
Q	Cuadrupolo
QqQ	Triple cuadrupolo
qRT-PCR	RT-PCR cuantitativa
R2	Coefficiente de correlación de Pearson
RMN	Resonancia magnética nuclear
RR	Remitente-recurrente
RT-PCR	PCR con transcriptasa inversa (<i>Reverse Transcription PCR</i>)
S	Especie de sulfátido
S OH-	Especie de sulfátido que contienen esfingosina hidroxilada
S/N	Relación señal/ruido (<i>Signal/noise</i>)
SD	Desviación estándar (<i>Standard Deviation</i>)
SEM	Error estándar de la media (<i>Standard Error Mean</i>)
SM	Esfingomielina (<i>Sphingomyelin</i>)
SNC	Sistema nervioso central
SNP	Sistema nervioso periférico
SPE	Extracción en fase sólida (<i>Solid Phase Extraction</i>)
SRM	Monitorización de reacción seleccionada (<i>Selected Reaction Monitoring</i>)
Sulf	Sulfátido
TG	Triglicérido
TLC	Cromatografía de capa fina (<i>Thin Layer Chromatography</i>)
TOF	Tiempo de vuelo (<i>Time-Of-Flight</i>)
UPLC	Cromatografía líquida de ultra rendimiento (<i>Ultra Performance Liquid Chromatography</i>)
VLDL	Lipoproteína de muy baja densidad (<i>Very Low Density Lipoprotein</i>)

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1. Síntesis de los dos tipos de lípidos. (Pág. 20)
- Figura 2. Estructura molecular de los lípidos simples. (Pág. 22)
- Figura 3. Estructura molecular de lípidos complejos. (Pág. 23)
- Figura 4. Estructura química de los glicerolípidos y glicerofosfolípidos. (Pág. 24)
- Figura 5. Estructura química de los esfingolípidos. (Pág. 27)
- Figura 6. Estructura química del colesterol y ésteres de colesterol. (Pág. 30)
- Figura 7. Ejemplo de nomenclatura de dos especies de lípidos. (Pág. 32)
- Figura 8. Espectro de masas de la fracción de TG del plasma obtenido mediante MALDI-TOF. (Pág. 39)
- Figura 9. Esquema de los componentes principales de un espectrómetro de masas. (Pág. 41)
- Figura 10. Esquema del espectrómetro de masas MALDI-TOF. (Pág. 42)
- Figura 11. Métodos de análisis de un analizador triple cuadrupolo. (Pág. 44)
- Figura 12. Esquema de un detector de dispersión de luz polarizada (ELSD). (Pág. 46)
- Figura 13. Esquema del instrumento GC-MS. (Pág. 47)
- Figura 14. Proceso de desmielinización de una neurona por activación de linfocitos y monocitos. (Pág. 51)
- Figura 15. Inmunización activa de ratas. (Pág. 56)
- Figura 16. Ácido elágico y principales metabolitos. (Pág. 57)
- Figura 17. Inducción de la EAE en ratas Lewis y tratamiento con el ácido elágico. (Pág. 68)
- Figura 18. Esquema de procesamiento de espectros de masas. (Pág. 76)
- Figura 19. Procesado de espectros MS de lipidómica no dirigida mediante XCMS. (Pág. 77)
- Figura 20. Procesado de espectros MS de lipidómica dirigida mediante Skyline. (Pág. 78)

Figura 21. Diseño experimental de la síntesis de novo de ceramidas en cultivos celulares. (Pág. 81)

Figura 22. Análisis de estándares de PC por MALDI-TOF. (Pág. 88)

Figura 23. Análisis MALDI-TOF de estándares de PE. (Pág. 90)

Figura 24. Efecto de la longitud y grado de insaturación de la cadena de acilo en el análisis de estándares de TG mediante MALDI-TOF. (Pág. 91)

Figura 25. Análisis MALDI-TOF del extracto total y del extracto tras la SPE de los lípidos. (Pág. 93)

Figura 26. Análisis HPLC-ELSD del extracto de lípidos de las lipoproteínas. (Pág. 94)

Figura 27. Análisis MALDI-TOF de las fracciones de PC y TG. (Pág. 95)

Figura 28. Análisis MALDI-TOF de la fracción PE y Sulf del plasma. (Pág. 96)

Figura 29. Análisis MALDI-TOF de la fracción PE del plasma en modo positivo. (Pág. 97)

Figura 30. Confirmación de la identidad de especies de SM en plasma por MALDI-MS/MS. (Pág. 97)

Figura 31. Análisis MALDI-TOF de la fracción de PI del plasma. (Pág. 98)

Figura 32. Análisis ESI-MS/MS de la fracción PC de plasma. (Pág. 100)

Figura 33. Composición lipídica de las principales lipoproteínas del plasma. (Pág. 102)

Figura 34. Distribución de especies de PC en plasma y en lipoproteínas. (Pág. 103)

Figura 35. Distribución de especies de PE en plasma y lipoproteínas. (Pág. 104)

Figura 36. Distribución de especies de PI en plasma y lipoproteínas. (Pág. 105)

Figura 37. Distribución de lípidos neutros en plasma y lipoproteínas. (Pág. 106)

Figura 38. Patrón de distribución de LPC en plasma y lipoproteínas. (Pág. 107)

Figura 39. Patrón de distribución de SM en plasma y lipoproteínas. (Pág. 108)

Figura 40. Composición de Sulf en plasma y lipoproteínas. (Pág. 109)

Figura 41. Efectos de la administración de ácido elágico en la valoración clínica en ratas con encefalomiелitis autoinmune experimental (EAE). (Pág. 112)

Figura 42. Efectos del ácido elágico en células T CD3+ marcadas en ratas EAE. (Pág. 114)

Figura 43. Efectos del ácido elágico en Iba-1 marcadas en ratas EAE. (Pág. 115)

Figura 44. Efectos del tratamiento del ácido elágico en el contenido de la proteína básica de mielina (MBP) en la corteza cerebral de ratas EAE. (Pág. 116)

Figura 45. Análisis de la fracción de Sulf en corteza cerebral de ratas mediante MALDI-TOF. (Pág. 117)

Figura 46. Contenido de esfingolípidos en corteza cerebral y médula espinal en ratas EAE y efecto del tratamiento con ácido elágico. (Pág. 119)

Figura 47. Especies moleculares de esfingolípidos en corteza cerebral de ratas EAE y controles. (Pág. 120)

Figura 48. Especies moleculares de esfingolípidos en médula espinal de ratas EAE y controles. (Pág. 121)

Figura 49. Correlación entre expresión de proteína básica de mielina (MBP) y contenido de esfingolípidos en la corteza cerebral en ratas EAE. (Pág. 122)

Figura 50. Efectos del ácido elágico en la síntesis de ceramida en células C6 de glioma de rata y en células HOG de oligodendrocito humano. (Pág. 124)

Figura 51. Resultados de expresión en corteza cerebral de los genes estudiados en las vías de síntesis de esfingolípidos mediante qRT-PCR. (Pág. 125)

Figura 52. Contenido de esfingolípidos en LCR de pacientes control y con EM. (Pág. 128)

Figura 53. Composición de las principales especies de esfingolípidos en LCR de pacientes control y con EM. (Pág. 130)

Figura 54. Composición lipídica de las lipoproteínas del plasma. (Pág. 139)

Figura 55. Propuesta de mecanismo de acción del ácido elágico en ratas EAE. (Pág. 147)

Figura 56. Relación entre las concentraciones de esfingolípidos en LCR y la presencia de anticuerpos antilípido en pacientes con EM. (Pág. 152)

LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Nombre y designación de algunos de los ácidos grasos más comunes. (Pág. 21)

Tabla 2. Clases y especies posibles de glicerofosfolípidos. (Pág. 26)

Tabla 3. Clases y especies posibles de esfingolípidos. (Pág. 29)

Tabla 4. Propiedades, composición y características de las principales lipoproteínas del plasma. (Pág. 34)

Tabla 5. Resumen de las principales ventajas de las diferentes aproximaciones para trabajar con un espectrómetro de masas: la infusión directa o previa separación cromatográfica. (Pág. 38)

Tabla 6. Datos demográficos de pacientes control y pacientes con EM. (Pág. 69)

Tabla 7. Condiciones de análisis MS para cada grupo lipídico estudiado mediante LC-MS/MS. (Pág. 74)

Tabla 8. Secuencia de los cebadores/primers utilizados en las reacciones de qRT-PCR. (Pág. 83)

Tabla 9. Cuantificación de clases lipídicas en una mezcla de plasmas por HPLC-ELSD. (Pág. 94)

Tabla 10. Reproducibilidad en la cuantificación de clases lipídica en una mezcla de plasmas mediante MALDI-TOF. (Pág. 99)

Tabla 11. Distribución de las clases de lípidos en las principales lipoproteínas del plasma. (Pág. 101)

Tabla 12. Parámetros bioquímicos en suero de ratas EAE. (Pág. 113)

Tabla 13. Contenido de esfingolípidos en corteza cerebral en ratas EAE y efecto del tratamiento con ácido elágico. (Pág. 118)

Tabla 14. Concentración de Sulf, HexCer y Cer en LCR de pacientes control y con EM. (Pág. 129)

I. RESUMEN/SUMMARY

RESUMEN

El estudio del metabolismo de los lípidos tiene una larga tradición en biomedicina, baste recordar la gran variedad de funciones e implicaciones fisiopatológicas otorgadas a clases lipídicas como el colesterol y los triglicéridos. Sin embargo, durante décadas, el estudio de los lípidos se ha circunscrito a estudiar su papel como clase o grupo -en el caso de los triglicéridos, un esqueleto de glicerol sustituido por tres cadenas de ácido graso-, obviando que cada clase está formada por una enorme diversidad de especies que resultan de la combinación de diferentes ácidos grasos, con una longitud y un grado de insaturación variable. Como especies, los lípidos son las moléculas más numerosas en cantidad y variedad del metaboloma.

El abordaje experimental tradicional para estudiar la composición de ácidos grasos de una clase de lípido implica su separación mediante alguna técnica cromatográfica, su hidrólisis y el análisis posterior de la composición de ácidos grasos. Estos procedimientos son largos y con una reproducibilidad limitada. Afortunadamente, los avances realizados en la espectrometría de masas, en paralelo a la disponibilidad de herramientas bioinformáticas que permiten el análisis de gran cantidad de datos, han facilitado el estudio de las diferentes especies lipídicas presentes en una muestra, dando origen a una nueva disciplina, la lipidómica. La lipidómica es un campo esencialmente multidisciplinar, que utiliza técnicas experimentales de cierta complejidad como la espectrometría de masas, sin olvidar que responde al intento de caracterizar de manera completa el conjunto de lípidos de un organismo o sistema biológico y su relación con otros componentes y activos celulares.

En el primer trabajo de esta tesis hemos estudiado las posibilidades que la tecnología MALDI-TOF (*“Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization con detector Time-Of-Flight”*) ofrece en el campo de la lipidómica. MALDI es una técnica de espectrometría de masas ampliamente utilizada en el ámbito de la proteómica y de la glicómica, con fines cualitativos de caracterización. Sin embargo, las posibilidades como herramienta cuantitativa de MALDI, esenciales en lipidómica, han sido muy poco estudiadas. En este trabajo, hemos optimizado y validado una metodología de trabajo que permite la caracterización y la cuantificación de más de 150 especies lipídicas en plasma, pertenecientes a 7 clases: triglicéridos, fosfatidilcolina, lisofosfatidilcolina, fosfatidiletanolamina, fosfatidilinositol, esfingomielina y sulfátidos.

La abundancia y gran variedad de clases lipídicas presentes en el cerebro hace que cambios en su concentración o defectos en las rutas metabólicas tengan un impacto significativo en la función cerebral. De hecho, alteraciones en el metabolismo lipídico están presentes en varias

enfermedades neurológicas, como la enfermedad de Parkinson, la enfermedad de Alzheimer o la esclerosis múltiple (EM). La EM es una enfermedad neurodegenerativa por destrucción primaria de la mielina, afectando a la conducción nerviosa. La aplicación de la lipidómica representa una oportunidad para estudiar el papel de las diferentes especies lipídicas en la EM. En el segundo trabajo de esta tesis hemos realizado un estudio lipidómico para caracterizar el efecto del tratamiento con el polifenol ácido elágico en ratas con encefalomiелitis autoinmune experimental (EAE). La EAE es el principal modelo experimental animal utilizado para el estudio de la EM. El ácido elágico es un polifenol que se conoce por su efecto antioxidante y por sus efectos beneficiosos en la neuroinflamación. En el trabajo hemos demostrado que el tratamiento con ácido elágico reduce la pérdida de esfingolípidos en corteza cerebral y en médula espinal asociada a los brotes agudos de la EAE. Los cambios en la concentración de esfingolípidos (hexosilceramidas, sulfátidos, esfingomielina, etc.), todos ellos abundantes en la las vainas de mielina, correlacionan con los niveles de proteína básica de mielina, un marcador de integridad de esta sustancia. A la vista de estos resultados, hemos demostrado en dos modelos celulares C6 (glioma de rata) y HOG (oligodendroglioma humano) que algunos metabolitos derivados del ácido elágico aumentan la síntesis de esfingolípidos.

La EM es una patología con una presentación clínica atípica, no existiendo biomarcadores precisos de diagnóstico y evolución. En el tercer trabajo de esta tesis, hemos estudiado la utilidad de la cuantificación de esfingolípidos en líquido cefalorraquídeo en una cohorte de pacientes con EM. A tenor de nuestros resultados, la cuantificación de esfingolípidos en líquido cefalorraquídeo en pacientes en fase de remisión no es de gran utilidad en esta patología.

SUMMARY

The study of lipid metabolism has a long tradition in biomedicine, it is enough to remember the great variety of pathophysiological functions and implications granted to lipid classes such as cholesterol and triglycerides. However, for decades, the study of lipids has been limited to its study as class or group- in the case of triglycerides, a skeleton of glycerol replaced by three fatty acid chains-, obviating that each class is formed by a huge diversity of species derived from the combination of different fatty acids, with a variable length and unsaturation degree. As species, lipids are the most abundant molecules in quantity and variety of the metabolome.

The traditional experimental approach to study the fatty acid composition of a lipid class involves its separation by some chromatographic technique, its hydrolysis and the subsequent analysis of the fatty acid composition. These procedures are long and with limited reproducibility. Fortunately, the advances in mass spectrometry, in parallel to the availability of bioinformatics tools that allow the analysis of large amounts of data, have facilitated the study of the different lipid species present in a sample, giving rise to a new discipline, lipidomics. Lipidomics is essentially a multidisciplinary field, it uses experimental techniques of some complexity such as mass spectrometry, without forgetting that lipidomics responds to the attempt to fully characterize the lipid set of an organism or biological system and its relationship with other components and cellular events.

In the first work of this thesis we have studied the possibilities that MALDI-TOF technology (“Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization with Time-of-flight detector”) offers in the field of lipidomics. MALDI is a mass spectrometry technique widely used in proteomics and glycolics for characterization and identification. However, the quantitative possibilities of MALDI, which are essential in lipidomics, have been poorly studied. In this study, we have optimized and validated a working methodology that allows the characterization and quantification of more than 150 lipid species in plasma, belonging to 7 classes: triglycerides, phosphatidylcholine, lysophosphatidylcholine, phosphatidylethanolamine, phosphatidylinositol, sphingomyelin and sulfatides.

The great variety and abundance of lipids at the brain means that changes in their concentration or defects in metabolic pathways have a significant impact on brain function. In fact, the alterations in lipid metabolism are present in several neurological diseases, such as Parkinson's disease, Alzheimer's disease or Multiple Sclerosis (MS). MS is a neurodegenerative disease caused by primary destruction of myelin, affecting nerve conduction. The application of

lipidomics represents an opportunity to study the role of different lipid species in MS. In the second work of this thesis, we have conducted a lipidomic study to characterize the effect of ellagic acid treatment in rats with experimental autoimmune encephalomyelitis. Experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE) is the main animal experimental model used for the study of MS. Ellagic acid is a polyphenol that is known for its antioxidant effect and suppressive effect of neuroinflammation. In the study we show that treatment with ellagic acid reduces the loss of sphingolipids in cerebral cortex and spinal cord associated with acute outbreaks of EAE. The changes in the concentration of sphingolipids (hexosylceramides, sulfatides, sphingomyelin, etc.), all of them present in myelin sheaths, correlate with the levels of myelin basic protein, a marker of myelin integrity. In view of these results, we demonstrate in C6 (rat glioma) and HOG (human oligodendroglioma) cell models that some metabolites derived from ellagic acid increase sphingolipid synthesis.

MS is an entity with variable clinical presentation and its diagnosis is difficult. There are no precise biomarkers of diagnosis and evolution. In the third work, of this thesis we have studied if the quantification of sphingolipids in cerebrospinal fluids is of utility in a cohort of MS patients. According to our results, the quantification of sphingolipids in cerebrospinal fluid in patients in remission phase is not very useful in this pathology.

II. INTRODUCCIÓN

1. Lipidómica

1.1. Definición de lípido

Atendiendo a las características físicas de solubilidad, con el término lípido se hace referencia a un grupo de compuestos de origen sintético o natural, que tienen en común el ser insolubles en agua y solubles en disolventes orgánicos de naturaleza apolar, como cloroformo, éter y otros alcoholes. No obstante, esta clasificación de los lípidos es insatisfactoria, puesto que excluye a muchos compuestos lipídicos que, como ciertos gangliósidos y muchos de los ácidos biliares, son parcial o totalmente solubles en agua. Una definición más inclusiva del término lípido es la que, desde un punto de vista bioquímico, y atendiendo a los procesos biosintéticos que ocurren a nivel del metabolismo celular, define a los lípidos como moléculas pequeñas de carácter hidrofóbico o anfipático que se originan parcial o totalmente a partir de la condensación de carbaniones derivados de moléculas de tioéster (ácidos grasos, policétidos, etc.) y/o por la condensación de carbocationes formados a partir unidades de isopreno (isoprenoles, esteroides, etc.) (**Figura 1**) (Fahy, Subramaniam y cols. 2005). Esta definición es, en contraposición a la basada en criterios físicos de solubilidad, demasiado inclusiva, difícil de entender sin tener un conocimiento del metabolismo lipídico y clasifica como lípido a todo lo que no es aminoácido, proteína, ácido nucleico o carbohidrato. En conclusión, diremos que no existe una definición internacionalmente consensuada de lípido, si bien, atendiendo a criterios de preferencia personal, en este trabajo nos inclinamos por la siguiente:

“Los lípidos son ácidos grasos y sus derivados, y aquellas sustancias relacionadas biosintética o funcionalmente con estos compuestos” (Christie 1987 A)

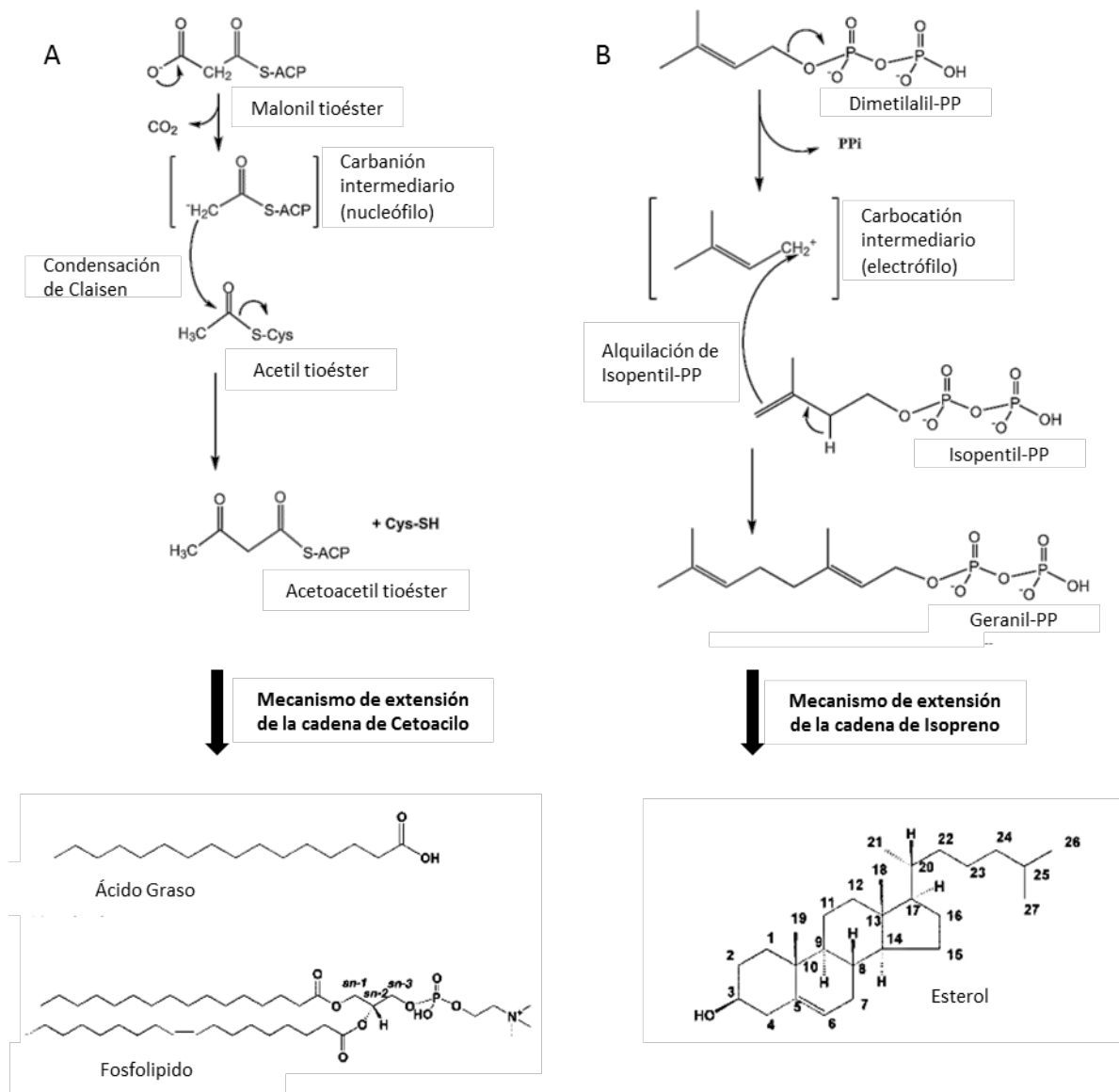


Figura 1. Síntesis de los dos tipos de lípidos. A) Reacciones de condensación de moléculas de tioéster para la síntesis de lípidos como ácidos grasos, policétidos, etc. B) Reacciones de condensación de moléculas de isopreno para la síntesis de isoprenoles, esteroides, etc.

1.2. Clasificación de los lípidos

Los lípidos pueden clasificarse en dos grupos según contengan en su estructura moléculas de ácido graso, diferenciándose de esta manera los **lípidos saponificables**, aquellos que liberan una, dos o tres moléculas de ácido graso tras la hidrólisis de un enlace amida o éster. Por el contrario, los **lípidos no saponificables**, no liberan ácidos grasos tras una reacción de hidrólisis. Ejemplos de lípidos saponificables son los triglicéridos, ésteres de colesterol, esfingomielina, etc.

Los esteroides- cuyo miembro más representativo es el colesterol-, los ácidos grasos libres, y los isoprenoides son lípidos no saponificables.

Los ácidos grasos son compuestos sintetizados por la condensación de moléculas de malonil-CoA catalizada por la *ácido graso sintasa* (Wakil, Stoops y cols. 1983). Son biomoléculas formadas por una cadena hidrocarbonada lineal de 6 a 24 átomos de carbono

Tabla 1. Nombre y designación de algunos de los ácidos grasos más comunes. El nombre sistemático de cada ácido graso se acompaña del nombre con el que es más comúnmente designado (nombre trivial) y su abreviatura, denotando el número total de átomos de carbono en la molécula separado mediante dos puntos del número total de insaturaciones. Entre paréntesis se anota la localización de la insaturación de la forma (*n*-X), siendo X el número de carbono donde se encuentra la primera insaturación, empezando desde el extremo opuesto al grupo ácido (carbono ω). FA: ácido graso (del inglés *Fatty Acid*).

Nombre sistemático	Nombre trivial	Abreviatura
Butanoico	Butírico	FA 4:0
Hexanoico	Caproico	FA 6:0
Octanoico	Caprílico	FA 8:0
Decanoico	Cáprico	FA 10:0
Dodecanoico	Láurico	FA 12:0
Tetradecanoico	Mirístico	FA 14:0
Hexadecanoico	Palmítico	FA 16:0
Octadecanoico	Esteárico	FA 18:0
Eicosanoico	Araquídico	FA 20:0
9-Hexadecenoico	Palmitoleico	FA 16:1(<i>n</i> -7)
9-Octadecenoico	Oleico	FA 18:1(<i>n</i> -9)
<i>trans</i> -9-Octadecenoico	Elaídico	
11-Octadecenoico	<i>cis</i> -Vacénico	FA 18:1(<i>n</i> -7)
9,12-Octadecadienoico	Linoleico	FA 18:2(<i>n</i> -6)
9,12,15-Octadecatrienoico	α -Linolénico	FA 18:3(<i>n</i> -3)
6,9,12-Octadecatrienoico	γ -Linolénico	FA 18:3(<i>n</i> -6)
8,11,14-Eicosatrienoico	Dihomo- γ -Linolénico	FA 20:3(<i>n</i> -6)
5,8,11,14-Eicosatetraenoico	Araquidónico	FA 20:4(<i>n</i> -6)
5,8,11,14,17-Eicosapentaenoico	EPA	FA 20:5(<i>n</i> -3)
7,10,13,16,19-Docosapentaenoico	DPA	FA 22:5(<i>n</i> -3)
4,7,10,13,16,19-Docosahexaenoico	DHA	FA 22:6(<i>n</i> -3)

unidos mediante enlaces sencillos (ácidos grasos saturados) y que puede contener un diferente número de insaturaciones o dobles enlaces (ácidos grasos insaturados, o poliinsaturados cuando tienen más de tres insaturaciones) (**Tabla 1**). Los ácidos grasos pueden aparecer en forma libre (**Figura 2C**), pero en su mayoría están unidos mediante enlaces éster o amida a otros alcoholes o polialcoholes (glicerol, colesterol y esfingosina), formando los lípidos saponificables.

Los lípidos también pueden dividirse en dos categorías: **lípidos simples** y **lípidos complejos**.

1.2.1. Lípidos simples

Son lípidos que al hidrolizarse producen uno o dos tipos de productos primarios no saponificables. Por ejemplo, los monoglicéridos (MG), diglicéridos (DG) y triglicéridos (TG) liberan ácidos grasos y glicerol al hidrolizarse (**Figura 2A**). Otra molécula que se clasifica como un lípido simple es el colesterol siendo éste un esteroide derivado del esterano, caracterizado por presentar un sistema de cuatro anillos condensados (**Figura 2B**).

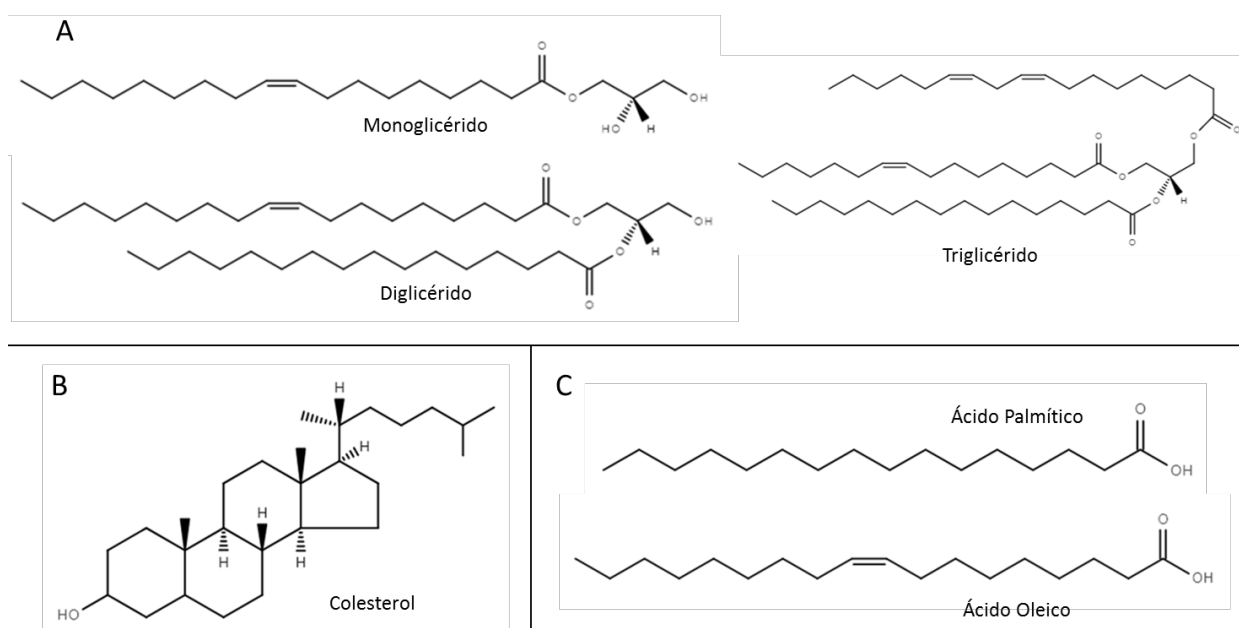


Figura 2. Estructura molecular de los lípidos simples. A) Molécula de monoglicérido MG 18:1/0:0/0:0, diglicérido DG 18:1/16:0/0:0 y triglicérido TG 18:1/16:0/18:2; B) Colesterol; C) Estructura molecular de un ácido graso saturado, el ácido palmítico (FA 16:0), y otro insaturado, el ácido oleico (FA 18:1).

1.2.2. Lípidos complejos

Son los lípidos que al hidrolizarse producen tres o más tipos de compuestos primarios no saponificables por molécula. La fosfatidilcolina (PC) es un tipo de glicerofosfolípido formado por ácidos grasos, glicerol y una molécula de colina (**Figura 3A**). La lactosilceramida (LacCer) es un esfingolípido que al hidrolizarse libera un ácido graso, lactosa y esfingosina (**Figura 3B**).

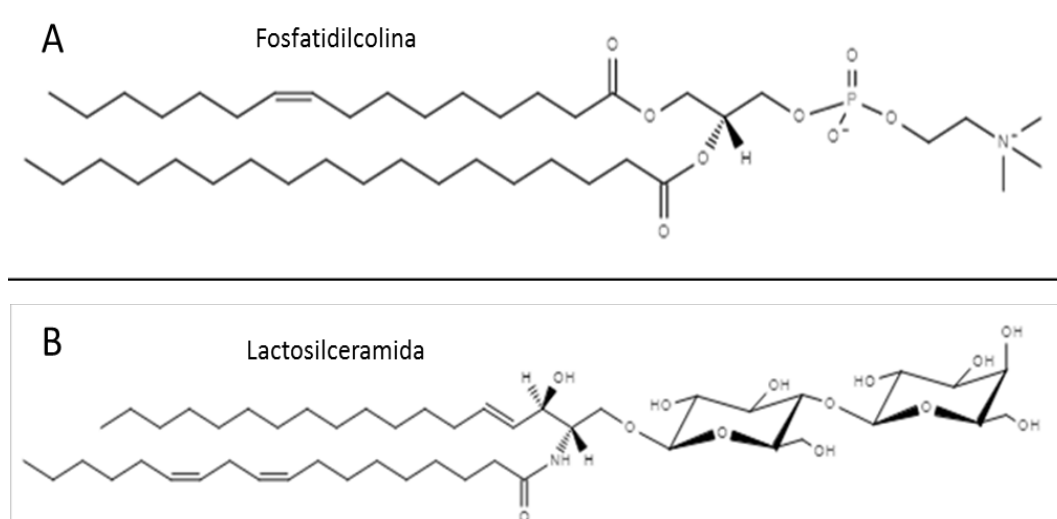


Figura 3. Estructura molecular de lípidos complejos. A) Fosfatidilcolina PC 16:1/18:0; B) Lactosilceramida LacCer d18:1/18:2.

1.3. Principales clases de lípidos

1.3.1. Glicerolípidos y glicerofosfolípidos

Se caracterizan por presentar en su estructura una molécula de glicerol, que es una cadena de tres átomos de carbono unidos a un grupo hidroxilo, al que se le enlazan los distintos sustituyentes (**Figura 4**). Los glicerolípidos contienen una, dos o tres moléculas de ácido graso de longitud de cadena comprendida entre 12-24 átomos de carbono con distintos grados de saturación, en posiciones *sn-1*, *sn-2* y *sn-3*, dando lugar, respectivamente, a las clases de MG, DG y TG. En el caso de los glicerofosfolípidos, al esqueleto de glicerol se une un grupo fosfato en posición *sn-3*, para formar un esqueleto base de ácido fosfatídico (PA), y a las otras dos posiciones libres se le unen dos moléculas de ácido graso (glicerofosfolípido) o una única molécula de ácido graso (lisoglicerofosfolípido). Dependiendo de la naturaleza del alcohol o aminoalcohol- etanolamina, colina, serina, inositol o glicerol-, al que se encuentre unida el PA se

habla de: fosfatidilcolina (PC), fosfatidiletanolamina (PE), fosfatidilserina (PS), fosfatidilinositol (PI) y fosfatidildiglicerol (PG).

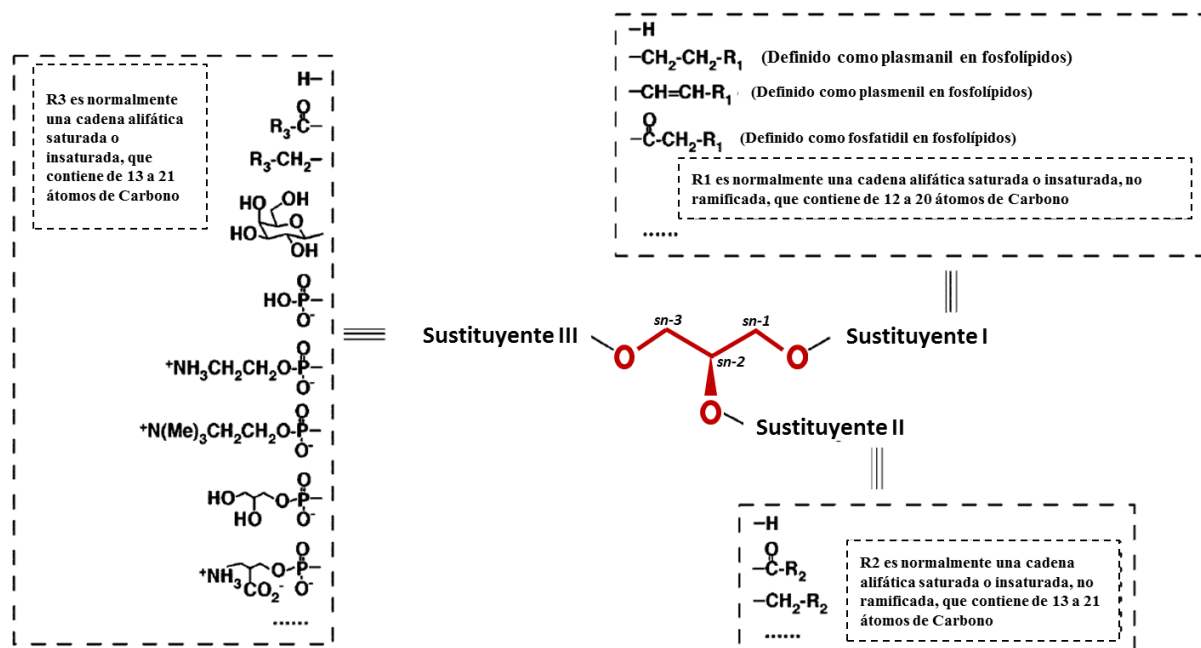


Figura 4. Estructura química de los glicerolípidos y glicerofosfolípidos. Se muestra la variabilidad de glicerolípidos y glicerofosfolípidos mediante tres sustituyentes posibles unidos a los grupos hidroxilo del esqueleto de glicerol (marcado en rojo). En cada sustituyente se muestran posibles ligandos que pueden unirse al glicerol. De esta forma, en un triglicérido (TG) los tres sustituyentes serán cadenas de ácido graso unidas al glicerol mediante enlace éster; en el caso de una fosfatidiletanolamina (PE), los ligandos de los sustituyentes I y II serán cadenas de ácido graso y el sustituyente III una fosfoetanolamina. **Imagen adaptada de “Han, X. (Mass Spectrom Rev, 2012)” (Han, Yang y cols. 2012).**

No es posible enumerar todas las funciones descritas para este grupo variado de lípidos (**Tabla 2**). A modo de ejemplo mencionaremos algunas de las más relevantes.

Funciones:

Los **TG** son esencialmente moléculas de almacenamiento de energía, localizándose sobre todo en las gotas de lípido (“*lipid droplets*”) en el citoplasma de los adipocitos (Welte y Gould 2017). Los **DG** y **MG** se encuentran en niveles trazas en tejido animal. Aunque sean componentes minoritarios cuantitativamente, son de gran importancia en el tejido animal al actuar como segundos mensajeros en muchos procesos celulares (Kumashiro, Erion y cols. 2011; Morin, Charbonneau y cols. 2017).

La **PC**, también conocida por su nombre trivial de lecitina, es normalmente el lípido de membrana más abundante del tejido animal, y el fosfolípido mayoritario del plasma y de todas las lipoproteínas del plasma (Kanno, Wu y cols. 2007). Los ácidos grasos saturados suelen ser más abundantes en posición *sn*-1 y los poliinsaturados en la *sn*-2. La PC es el precursor de otros lípidos importantes como la esfingomielina, factor de activación plaquetario, PA y PS (Voelker y Kennedy 1982). La **lisofosfatidilcolina (LPC)**, que contiene un único resto de ácido graso, es un derivado de la PC que se genera por la acción de fosfolipasas que hidrolizan el ácido graso en posición *sn*-1 o *sn*-2. Es un compuesto minoritario con propiedades proinflamatorias (Huang, Schäfer-Elinder y cols. 1999) y componente patológico de las LDL oxidadas (lipoproteínas de baja densidad) (Yang, Cai y cols. 1994).

La **PE** es, después de la PC, el fosfolípido más abundante en tejido animal (Calzada, Onguka y cols. 2016) y forma parte de las membranas celulares, siendo un importante componente regulador de su fluidez (Dawaliby, Trubbia y cols. 2016). El grupo amino puede ser metilado para producir PC, mediante el enzima hepático *etanolamina N-metiltransferasa* (DeLong, Shen y cols. 1999).

El **PG** es un constituyente traza de los tejidos animales, pero es altamente abundante y con importantes funciones antiinflamatorias en el surfactante pulmonar (Numata, Chu y cols. 2010). La cardiolipina es el nombre que recibe la estructura dimérica de la PG, que se encuentra exclusivamente en las mitocondrias de animales y plantas (Paradies, Paradies y cols. 2014).

La **PS** está presente en muchos tejidos animales, sobre todo en la mielina del tejido cerebral (Glade y Smith 2015). La concentración de PS es alta en la membrana plasmática y en los endosomas, pero muy baja en la mitocondria, y se concentra, junto con la PE, en la cara citosólica de la membrana plasmática (Martin y Pagano 1987). Está implicada en la coagulación sanguínea y en la regulación de la apoptosis, proceso en el cual la PS migra de la capa interna a la externa de la membrana (Fadok, Bratton y cols. 1998).

El **PI** es un constituyente común de los tejidos animales, y especialmente abundante en el sistema nervioso. El PI es precursor de los fosfoinosítoles, como el fosfatidilinositol 4-fosfato y fosfatidilinositol 4,5-bifosfato, importantes metabolitos implicados en señalización celular (Di Paolo y De Camilli 2006).

Tabla 2. Clases y especies posibles de glicerofosfolípidos. Variabilidad de glicerofosfolípidos, basado en su construcción mediante los sustituyentes I, II y III (como se indica en la **Figura 4**) con las variables m y n . m representa el número total de átomos de carbono de la cadena de acilo ($m= 12-26, 24-52, 36-78$ y $48-104$ para especies con una, dos, tres y cuatro cadenas de ácido graso, respectivamente) y n representa el número total de dobles enlaces de la cadena de acilo ($n= 0-7, 0-14, 0-21$ y $0-28$ para especies con una, dos, tres y cuatro cadenas de ácido graso, respectivamente). En el número total de especies posibles no se consideran los regioisómeros e isómeros resultantes de la localización de los dobles enlaces. Se considera que los ácidos grasos naturales con más alto grado de insaturación para cadenas de acilo de 12-26 átomos de carbono son 12:1, 13:1, 14:3, 15:3, 16:5, 17:3, 18:5, 19:3, 20:6, 21:5, 22:7, 23:5, 24:7, 25:6 y 26:7.

Tabla adaptada de “Han, X. (Mass Spectrom Rev, 2012)” (Han, Yang y cols. 2012).

Clase de Lípidos	Subclase de Lípidos	Esqueleto	Cabeza de grupo (Sustituyente III)	Cadenas laterales (Sustituyente I & II)	Fórmula Suma	Especies posibles
Fosfatidilcolina (PC)	diacil PC alquenil-acil PC alquil-acil PC	$C_3H_5O_3$	$C_5H_{13}O_3PN$	$C_mH_{2m-2n-2}O_2$	$C_{m+8}H_{2m-2n+16}O_8PN$	314
				$C_mH_{2m-2n-2}O$	$C_{m+8}H_{2m-2n+16}O_7PN$	314
				$C_mH_{2m-2n}O$	$C_{m+8}H_{2m-2n+18}O_7PN$	314
Fosfatidiletanol-amina (PE)	diacil PE alquenil-acil PE alquil-acil PE		$C_2H_7O_3PN$	$C_mH_{2m-2n-2}O_2$	$C_{m+5}H_{2m-2n+10}O_8PN$	314
				$C_mH_{2m-2n-2}O$	$C_{m+5}H_{2m-2n+10}O_7PN$	314
				$C_mH_{2m-2n}O$	$C_{m+5}H_{2m-2n+12}O_7PN$	314
Fosfatidilserina (PS)	diacil PS alquenil-acil PS alquil-acil PS		$C_3H_7O_5PN$	$C_mH_{2m-2n-2}O_2$	$C_{m+6}H_{2m-2n+10}O_{10}PN$	314
				$C_mH_{2m-2n-2}O$	$C_{m+6}H_{2m-2n+10}O_9PN$	314
				$C_mH_{2m-2n}O$	$C_{m+6}H_{2m-2n+12}O_9PN$	314
Fosfatidilglicerol (PG)			$C_3H_8O_5P$	$C_mH_{2m-2n-2}O_2$	$C_{m+6}H_{2m-2n+11}O_{10}P$	314
Fosfatidilinositol (PI)			$C_6H_{12}O_8P$	$C_mH_{2m-2n-2}O_2$	$C_{m+9}H_{2m-2n+15}O_{13}P$	314
Ácido Fosfatídico (PA)			H_2O_3P	$C_mH_{2m-2n-2}O_2$	$C_{m+3}H_{2m-2n+5}O_8P$	314
Lisofosfatidilcolina (LPC)	acil LPC alquenil LPC alquil LPC		$C_5H_{13}O_3PN$	$C_mH_{2m-2n}O$	$C_{m+8}H_{2m-2n+18}O_7PN$	82
				C_mH_{2m-2n}	$C_{m+8}H_{2m-2n+18}O_6PN$	82
				$C_mH_{2m-2n+2}$	$C_{m+8}H_{2m-2n+20}O_6PN$	82
Lisofosfatidiletanol-amina (LPE)	acil LPE alquenil LPE alquil LPE		$C_2H_7O_3PN$	$C_mH_{2m-2n}O$	$C_{m+5}H_{2m-2n+12}O_7PN$	82
				C_mH_{2m-2n}	$C_{m+5}H_{2m-2n+12}O_6PN$	82
				$C_mH_{2m-2n+2}$	$C_{m+5}H_{2m-2n+14}O_6PN$	82
Lisofosfatidilserina (LPS)	acil LPS alquenil LPS alquil LPS		$C_3H_7O_5PN$	$C_mH_{2m-2n}O$	$C_{m+6}H_{2m-2n+12}O_9PN$	82
				C_mH_{2m-2n}	$C_{m+6}H_{2m-2n+12}O_8PN$	82
				$C_mH_{2m-2n+2}$	$C_{m+6}H_{2m-2n+14}O_8PN$	82
Lisofosfatidilglicerol (LPG)			$C_3H_8O_5P$	$C_mH_{2m-2n}O$	$C_{m+6}H_{2m-2n+13}O_9P$	82
Lisofosfatidilinositol (LPI)			$C_6H_{12}O_8P$	$C_mH_{2m-2n}O$	$C_{m+9}H_{2m-2n+17}O_{12}P$	82
Ácido Lisofosfatídico (LPA)			H_2O_3P	$C_mH_{2m-2n}O$	$C_{m+3}H_{2m-2n+7}O_7P$	82
Cardiolipina (CL)		$(C_3H_5O_3)_2$	$C_3H_8O_7P_2$	$C_mH_{2m-2n-4}O_4$	$C_{m+9}H_{2m-2n+14}O_{17}P_2$	1081
Lisocardiolipina (mono-LCL)		$(C_3H_5O_3)_2$	$C_3H_8O_7P_2$	$C_mH_{2m-2n-2}O_3$	$C_{m+9}H_{2m-2n+16}O_{16}P_2$	622
Total						6455

1.3.2. Esfingolípidos

Los esfingolípidos son el grupo lipídico donde reside la mayor diversidad de especies. Se construyen a partir de un esqueleto que consta de una cadena de tres átomos de carbono unidos a dos grupos hidroxilo en las posiciones externas y un grupo amina en la posición interna (**Figura 5**). A este esqueleto se le une una base esfingoide (sustituyente III), que consiste en una amina alifática (de 12 a 22 átomos de carbono) que contiene de dos a tres grupos hidroxilo y, a menudo, un doble enlace trans en la posición 4. Las bases esfingoides se sintetiza mediante la condensación de una serina con un acil-CoA de cadena larga (Hanada 2003), y las mayoritarias en mamíferos son la esfingosina y la esfinganina. Por combinación de los sustituyentes I, II y III se generan clases como las ceramidas (Cer), esfingomielinas (SM) y los glicosfingolípidos

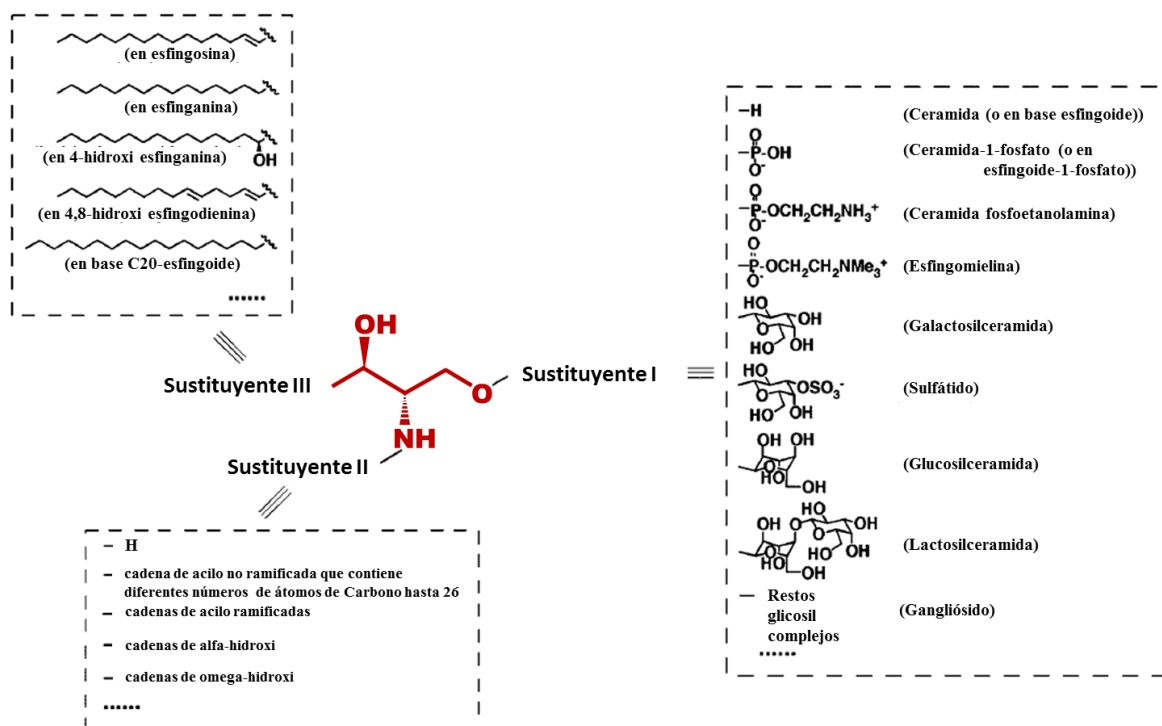


Figura 5. Estructura química de los esfingolípidos. Se muestra la variabilidad de esfingolípidos mediante tres sustituyentes posibles unidos a un esqueleto esfingoide (marcado en rojo). El sustituyente I está unido al oxígeno en posición 1 y está constituido por diferentes sustituyentes polares, y en el sustituyente II se encuentran cadenas de ácido graso unido al nitrógeno en posición 2. El sustituyente III representa una cadena alifática, que varía en longitud, grado de insaturación, ramificaciones y grupos hidroxilo, que es lo que se conoce como base esfingoide. De esta forma, la ceramida Cer d18:1/16:0 tendrá como sustituyente I un hidrógeno, como sustituyente II una cadena de ácido palmítico (FA 16:0) y como sustituyente III la base esfingoide esfingosina (designada como d18:1). **Imagen adaptada de “Han, X. (Mass Spectrom Rev, 2012)”** (Han, Yang y cols. 2012).

(Lahiri y Futerman 2007). La Cer contienen un ácido graso (que puede ser saturado o monoinsaturado con número par o impar de átomos de carbono, y sólo en raras ocasiones son ácidos grasos poliinsaturados) unido al grupo amina de la base esfingoide mediante enlace tipo amida. La SM consiste en una unidad de Cer unida por la posición 1 a una molécula de fosforilcolina. Los glicosfingolípidos o hexosilceramidas (HexCer) se originan por condensación de una molécula de glucosa o galactosa mediante enlace o-glicosídico a la Cer. Los sulfátidos (Sulf), o sulfogalactosilceramidas, son ésteres de sulfato que se sintetizan a partir de galactosilceramida (GalCer) y lactosilceramidas (LacCer), por unión de un grupo sulfato a la posición 3 del resto de galactosa.

Dada la gran diversidad de esfingolípidos (**Tabla 3**) mencionaremos algunas de las funciones de las clases más relevantes.

Funciones:

Las **Cer** son intermediarios esenciales para la biosíntesis de esfingolípidos más complejos (Gault, Obeid y cols. 2010). Además, están implicadas en la apoptosis y en procesos de regulación del ciclo celular, diferenciación y adhesión (Bikman y Summers 2011).

Las **SM** son los esfingolípidos mayoritarios de las membranas celulares de animales (van Meer, Voelker y cols. 2008). Tiene una alta afinidad por el colesterol y tienden a asociarse en unos dominios específicos de la membrana llamados balsas lipídicas (*"lipid rafts"*) (Kraft 2016).

Las **HexCer**, que agrupa a las glucosilceramidas (GluCer) y galactosilceramidas (GalCer), fueron descritas inicialmente como constituyentes del tejido cerebral, donde la principal forma es la GalCer, también conocida por su nombre trivial de cerebrósido, y son muy abundantes en las vainas de mielina que recubren los axones de las neuronas (Stoffel y Bosio 1997). La GluCer es el precursor de las LacCer (Chatterjee y Pandey 2008).

El **Sulf** es un componente muy abundante de la mielina (Stoffel y Bosio 1997). Los Sulf se han relacionado con numerosos procesos metabólicos y patologías y se cree que están implicados en la diferenciación de los oligodendrocitos (Takahashi y Suzuki 2012).

Tabla 3. Clases y especies posibles de esfingolípidos. Variabilidad de esfingolípidos, basado en los sustituyentes I, II y III (como se indica en la **Figura 5**) con las variables x , y , m y n . La variable m representa el número total de átomos de carbono de la cadena de amida graso ($m= 12-26$), la variable n representa el número total de dobles enlaces de la cadena de amida graso ($n= 0-7$), la variable x representa el número total de átomos de carbono del esqueleto parcial esfingoide ($x= 11-19$), y la variable y representa el número total de dobles enlaces en el esqueleto parcial esfingoide ($y= 0-2$). En el número total de especies posibles no se consideran los regioisómeros e isómeros que resultan de la diferente localización de los dobles enlaces. Se considera que los ácidos grasos naturales con el más alto grado de insaturación para cadenas de acilo de entre 12-26 átomos de carbono son 12:1, 13:1, 14:3, 15:3, 16:5, 17:3, 18:5, 19:3, 20:6, 21:5, 22:7, 23:5, 24:7, 25:6 y 26:7. **Tabla adaptada de “Han, X. (Mass Spectrom Rev, 2012)”** (Han, Yang y cols. 2012).

Clase de Lípidos	Subclase de Lípidos	Esqueleto	Esqueleto esfingoide (Sustituyente III)	Cabeza de grupo (Sustituyente I)	Cadena lateral (Sustituyente II)	Fórmula Suma	Especies posibles	
Ceramida (Cer)	no-hidroxi Cer	C ₃ H ₆ O ₂ N	C _x H _{2x-2y+1}	H	C _m H _{2m-2n-1} O	C _{m+x+3} H _{2m-2n+2x-2y+7} O ₃ N	2214	
	hidroxi Cer				C _m H _{2m-2n-1} O ₂	C _{m+x+3} H _{2m-2n+2x-2y+7} O ₄ N	2214	
Esfingomielina (SM)	no-hidroxi SM			C ₅ H ₁₃ O ₃ PN	C _m H _{2m-2n-1} O	C _{m+x+8} H _{2m-2n+2x-2y+19} O ₆ PN ₂	2214	
	hidroxi SM				C _m H _{2m-2n-1} O ₂	C _{m+x+8} H _{2m-2n+2x-2y+19} O ₇ PN ₂	2214	
Ceramida fosfoetanolamina (CerPE)	no-hidroxi CerPE			C ₂ H ₆ O ₃ PN	C _m H _{2m-2n-1} O	C _{m+x+8} H _{2m-2n+2x-2y+19} O ₆ PN ₂	2214	
	hidroxi CerPE				C _m H _{2m-2n-1} O ₂	C _{m+x+8} H _{2m-2n+2x-2y+19} O ₇ PN ₂	2214	
Monohexosil-ceramida (HexCer)	no-hidroxi HexCer			C ₆ H ₁₁ O ₅	C _m H _{2m-2n-1} O ₂	C _{m+x+9} H _{2m-2n+2x-2y+17} O ₉ N	2214	
	hidroxi HexCer				C _m H _{2m-2n-1} O ₂	C _{m+x+9} H _{2m-2n+2x-2y+17} O ₉ N	2214	
Sulfátido (ST)	no-hidroxi ST			C ₆ H ₁₁ SO ₈	C _m H _{2m-2n-1} O	C _{m+x+9} H _{2m-2n+2x-2y+17} O ₁₁ NS	2214	
	hidroxi ST				C _m H _{2m-2n-1} O ₂	C _{m+x+9} H _{2m-2n+2x-2y+17} O ₁₂ NS	2214	
Lactosilceramida (LacCer)	no-hidroxi LacCer			C ₁₂ H ₂₁ O ₁₀	C _m H _{2m-2n-1} O	C _{m+x+15} H _{2m-2n+2x-2y+27} O ₁₃ N	2214	
	hidroxi LacCer				C _m H _{2m-2n-1} O ₂	C _{m+x+15} H _{2m-2n+2x-2y+27} O ₁₄ N	2214	
Lisoesfingomielina (LSM)				C ₅ H ₁₃ O ₃ PN	H	C _{x+8} H _{2x-2y+21} O ₅ PN ₂	27	
Base esfingoide					H	H	C _{x+3} H _{2x-2y+9} O ₂ N	27
Base esfingoide 1-fosfato					H ₂ O ₃ P	H	C _{x+3} H _{2x-2y+10} O ₅ PN	27
Psicosina					C ₆ H ₁₁ O ₅	H	C _{x+9} H _{2x-2y+19} O ₇ N	27
Total							26676	

1.3.3. Esteranos

Es un grupo de lípidos que derivan del ciclopentanoperhidrofenantreno (también denominado gonano), un sistema de cuatro anillos unidos, del que derivan compuestos tales como esteroides, oxisteroides, hormonas esteroideas, ácidos biliares, y sus precursores y sus metabolitos. El colesterol es el compuesto más relevante de este grupo y el más abundante en

tejido animal. Consta de un doble enlace en el anillo y un grupo hidroxilo libre, que puede estar esterificado a un ácido graso. El colesterol tiene numerosas funciones: es regulador de la rigidez de la membrana plasmática, precursor de hormonas esteroideas, ácidos biliares, vitamina D, etc., y los niveles de colesterol en plasma son un factor determinante para el desarrollo de la enfermedad cardiovascular (Kruth 2001). Los animales obtienen colesterol tanto de la dieta como de su síntesis endógena, mediante una serie compleja de al menos 30 reacciones enzimáticas diferentes (Yamauchi, Reid y cols. 2007). El HMG-CoA-reductasa (*3-hidroxi-3-metil-glutaril-CoA reductasa*) es el principal punto de control en la ruta, e inhibido por la familia de fármacos denominada estatinas (Maron, Fazio y cols. 2000).

El colesterol libre puede esterificarse a una cadena de acilo graso por su grupo hidroxilo para formar ésteres de colesterol (CE), disminuyendo su polaridad y mejorando el transporte y almacenamiento del colesterol en el organismo (**Figura 6**). Los CE son altamente abundantes en las células y en la circulación, formando parte de las lipoproteínas. Se sintetizan en plasma, principalmente en las HDL (lipoproteínas de alta densidad), por transferencia del ácido graso en posición *sn*-2 de una PC, catalizados por la *lecitin-colesterol-acil-transferasa* (Jonas 2000).

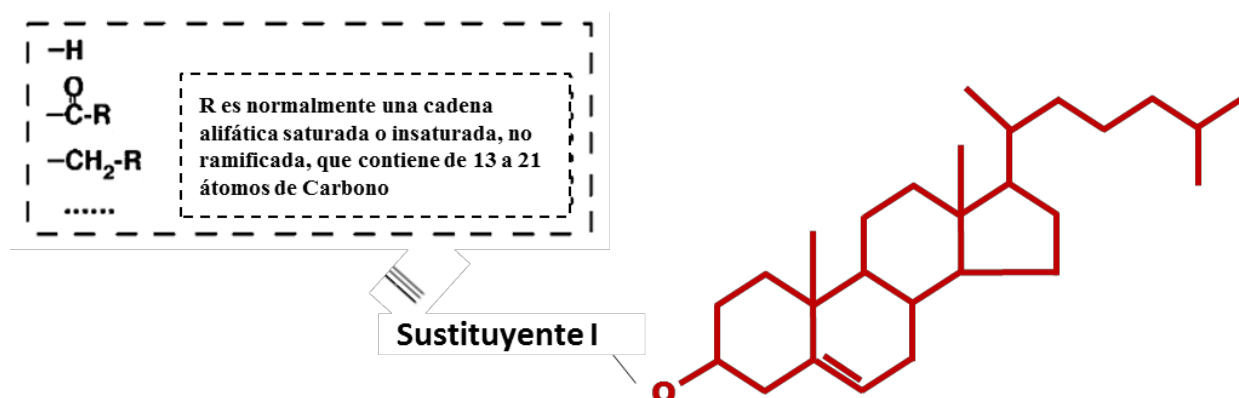


Figura 6. Estructura química del colesterol y ésteres de colesterol. Variabilidad de CE mediante la unión de un sustituyente al grupo hidroxilo del esqueleto de colesterol (marcado en rojo). El sustituyente I puede ser una cadena de ácido graso unido al colesterol mediante enlace éster.

1.4. ¿Qué es la lipidómica?

Desde la aparición del término genómica a mediados de los años 80, un número de diferentes “-ómicas”¹ han ido emergiendo en el campo de la biología. La metabolómica es una de ellas, y trata de cuantificar y caracterizar todos los metabolitos presentes en un sistema biológico, así como su interrelación con sus factores reguladores (proteínas, ARNs, genes...) (Peng, Li y cols. 2015). La lipidómica es una rama de la metabolómica especializada en el estudio de los lípidos. Como todas las -ómicas, la lipidómica huye de una visión reduccionista a la hora de estudiar los fenómenos biológicos. Es decir, en contraposición con los estudios en los que se plantea una hipótesis previa sobre la implicación de un número reducido de variables en un proceso, estudios de hipótesis dirigidos (también conocidos como “*targeted*”), la capacidad de la lipidómica para cuantificar un elevado número de lípidos aspira al análisis integral del funcionamiento de los procesos biológicos estudiados, lo que permite diseñar estudios sin hipótesis previa que, en función de los resultados, permiten la generación de nuevas hipótesis de trabajo (Wang, Wang y cols. 2016).

El estudio de los lípidos tiene una larga trayectoria en biomedicina. En general, los métodos analíticos tradicionales, como la cromatografía en sus diferentes variantes (líquido, gas y capa fina), permiten, mediante el empleo de detectores apropiados, un análisis de los lípidos a nivel de clase o grupo (Chamorro, Garcia-Cano y cols. 2013). No obstante, la validez de los métodos tradicionales para estudiar lípidos se pone a prueba cuando el objetivo es estudiar las concentraciones de moléculas individuales de lípido, siendo los métodos existentes poco productivos y, en general, con escasa reproducibilidad metodológica. El desarrollo de la espectrometría de masas ha hecho posible la cuantificación de cientos de moléculas con un esfuerzo analítico razonable, acercándonos al objetivo último de la lipidómica:

“La caracterización a nivel molecular de los lípidos en un sistema biológico, así como su función y estudiar su relación con la expresión de las enzimas y proteínas implicadas en su metabolismo y su regulación génica”

(Spener, Lagarde y cols. 2003)

¹ **Ómica** es un neologismo que proviene del inglés, que en Biología Molecular se utiliza como sufijo para referirse al estudio de la totalidad o del conjunto de algo, como genes, organismos, proteínas, lípidos, o incluso las relaciones entre ellos (Wikipedia).

1.5. Nomenclatura de los lípidos

A lo largo de este trabajo seguiremos los criterios de nomenclatura acordados por Liebisch y colaboradores (Liebisch, Vizcaino y cols. 2013). Esta nomenclatura establece diferentes niveles de identificación de los lípidos, en función del grado de certidumbre con el que se haya caracterizado la especie, lo que depende de factores como la resolución del espectrómetro de masas o la obtención de espectros de fragmentación que acrediten la identidad de la especie molecular supuesta (Liebisch, Vizcaino y cols. 2013). Los lípidos se pueden estudiar en diferentes niveles de información: clase lipídica (PC), composición suma (PC 34:1), especie molecular (PC 16:0_18:1) y estructura molecular definida (PC 16:0/18:1*n*-9) (**Figura 7**).

Los lípidos a nivel de especie se denotan con la abreviatura de su clase o grupo seguido por el número de carbonos y dobles enlaces de los ácidos grasos unidos separados por dos puntos y cada una de las cadenas separadas por “/”. Por ejemplo, en la molécula PC 16:0/18:1 de la **Figura 7A**, se utiliza las siglas PC para denotar que se trata de una fosfatidilcolina, a la que se le une un ácido graso de 16 átomos de carbono sin dobles enlaces (FA 16:0, ácido palmítico) en la posición *sn*-1, y un ácido graso de 18 átomos de carbono con un doble enlace (FA 18:1, ácido oleico) en la posición *sn*-2 del esqueleto de glicerol. Este ácido graso está acompañado del sufijo

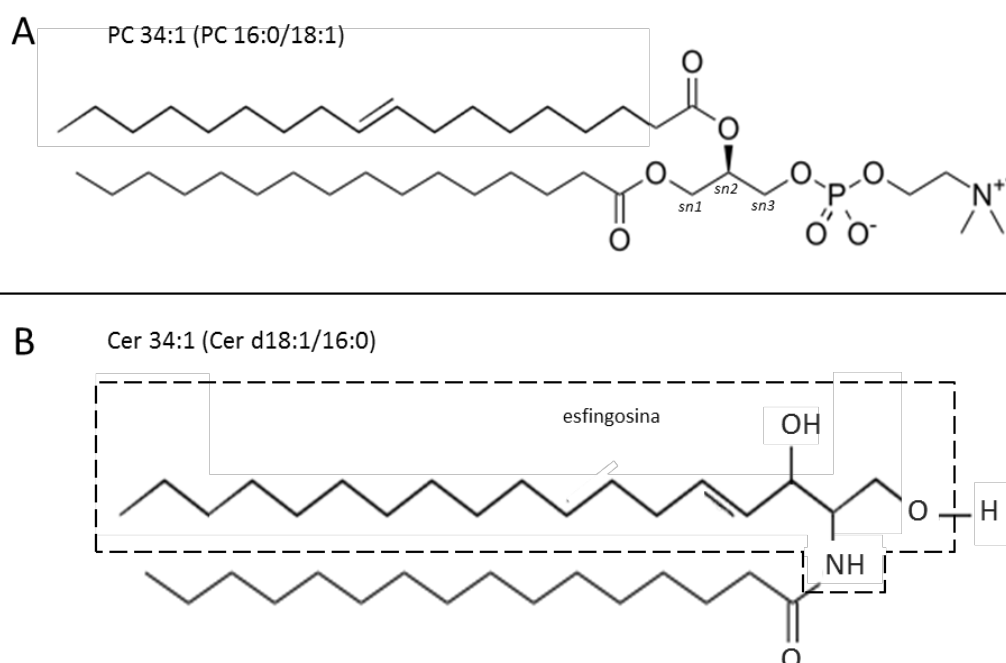


Figura 7. Ejemplo de nomenclatura de dos especies de lípidos. A) Fosfatidilcolina PC 34:1 (PC 16:0/18:1); **B)** Ceramida Cer 34:1 (Cer d18:1/16:0).

n-9, denotando que el doble enlace se encuentra en la posición entre el carbono 9 y 10 (contando por el extremo opuesto al grupo ácido). Cuando el enlace entre la molécula de glicerol y ácido graso es un enlace éter se emplea el prefijo “O-” para designar un enlace O-alkil o un enlace del tipo O-alkil-1-enil (plasmalógeno). En el caso de que no conozcamos la especie molecular de lípido, como PC 34:1 de la **Figura 7A**, 34:1 denotará a la suma de átomos de carbono y dobles enlaces de todos los ácidos grasos unidos al esqueleto de glicerol.

En el caso de los esfingolípidos, por ejemplo la ceramida de la **Figura 7B** (Cer d18:1/16:0), se denota primero la clase lipídica (Cer), y posteriormente la base esfingoide, que en este caso es la esfingosina y se denota como d18:1 (*d* designa que hay dos grupos hidroxilo en la base esfingoide). Por último, se escribe el ácido graso unido al nitrógeno indicando el número de átomos de carbono y dobles enlaces separados por dos puntos (16:0), y separado de la base esfingoide por “/”.

A modo de aclaración, se utilizará el separador “/” en la notación de ácidos grasos contenidos en un determinado lípido si se conoce su posición exacta en la estructura molecular (*sn*-1, *sn*-2 o *sn*-3). Cuando es imposible determinar su posición, se utiliza el separador “_”.

1.6. Lipoproteínas

Como ya se ha comentado con anterioridad, los lípidos son eminentemente insolubles en agua. Debido a su naturaleza apolar, deben circular en el plasma unidos a proteínas, formando las lipoproteínas. Son complejos esféricos que constan de una parte proteica, constituida por una o más proteínas, denominadas apoproteínas (Apo), y una parte lipídica que está formada principalmente por CE, TG, colesterol libre (FC) y fosfolípidos (PL). Constan de un centro hidrofóbico, en donde se sitúan los CE y TG, y que está rodeado de moléculas hidrofílicas, donde se encuentran el FC, los PL y las Apo (Christie 1987 B).

Las lipoproteínas tienen diferentes orígenes y composición, y se clasifican según su densidad y tamaño, aumentando su densidad según disminuye su tamaño (**Tabla 4**). Las principales lipoproteínas del plasma son: lipoproteína de muy baja densidad (VLDL, *Very Low Density Lipoproteins*), lipoproteína de baja densidad (LDL, *Low Density Lipoproteins*) y lipoproteína de alta densidad (HDL, *High Density Lipoproteins*) (Christie 1987 B).

Tabla 4. Propiedades, composición y características de las principales lipoproteínas del plasma. Los porcentajes de triglicéridos, éster de colesterol, colesterol libre y fosfolípidos son referenciados respecto a la cantidad de lípido total. Å: Amstrong **Tabla adaptada de www.lipidhome.co.uk** (Christie 1987 B)

	VLDL	LDL	HDL
Densidad (g/mL)	0.94-1.006	1.006-1.063	1.063-1.210
Diámetro (Å)	600	250	70-120
Origen	Hepático	Catabolismo VLDL	Hepático, intestinal
Principales apolipoproteínas	B100, C, E	B100	A, C, E
Lípidos totales (%)	91	80	44
Triglicéridos (%)	55	10	6
Éster de colesterol (%)	18	50	40
Colesterol libre (%)	7	11	7
Fosfolípidos (%)	20	29	46

Las VLDL son sintetizadas en el hígado mediante el empaquetado de FC y TG junto a PL y Apo B-100 y CE. Los TG son metabolizados en el músculo y el tejido adiposo por la *lipoproteína lipasa*, que libera ácidos grasos libres y se forman lipoproteínas de densidad intermedia (IDL, del inglés *Intermediate Density Lipoprotein*). Una parte de estas IDL pueden ser captadas por los receptores hepáticos de las LDL y eliminadas de la circulación, mientras que el resto son metabolizadas, surgiendo las LDL por transformación de las VLDL. Las LDL transportan FC, su principal componente, a los tejidos mediante receptores que reconocen a la Apo B100. En el interior de la célula las LDL son separadas en sus componentes. A su vez, se sintetiza HDL naciente en hígado e intestino, que van a captar el FC y los PL que salen de la célula, resultando en la formación de HDL, que va a ser el encargado de transportar el exceso de colesterol celular hacia el hígado para su eliminación por las vías biliares. Durante su transporte al hígado, la *lecitin-colesterol-acil-transferasa* (LCAT) esterifica el FC mediante transferencia del ácido graso en posición *sn-2* de una PC (Jonas 2000).

El colesterol es un componente clave en la patogenia de la aterosclerosis. Numerosos estudios han demostrado que los niveles elevados de colesterol en LDL y apo B100 favorecen el

depósito de FC en las placas de ateroma, desencadenando una respuesta inflamatoria que aumenta el estrés oxidativo y la secreción de citoquinas, desarrollándose la aterosclerosis. Debido al papel de las HDL en la eliminación del FC de las células, se consideran importantes partículas implicadas en la protección del desarrollo de la aterosclerosis (Wang, Garruti y cols. 2017).

2. Tecnologías empleadas en lipidómica

Un aspecto diferencial de la metabolómica, y por extensión de la lipidómica, respecto a otras ómicas, es la gran variabilidad estructural de las moléculas objetivo. Los lípidos poseen estructura y propiedades físicoquímicas muy diferentes, y por tanto, no existe una única manera de realizar lipidómica, sino diferentes aproximaciones metodológicas de resolver el problema. Son varias las tecnologías que, de manera aislada o combinada, son utilizadas en lipidómica con el fin de identificar, cuantificar y estudiar la estructura y función de los lípidos, a saber: espectrometría de masas (MS) (Han, Yang y cols. 2012), la espectroscopía de resonancia magnética nuclear (Khandelwal, Stryker y cols. 2014) y la cromatografía (Chamorro, Garcia-Cano y cols. 2013). Sin duda en la actualidad, la MS tiene un papel destacado gracias al desarrollo de las fuentes de ionización suaves como el electrospray (ESI, del inglés *Electrospray Ionization*) (Yang y Han 2011) y la desorción/ionización mediante láser asistida por matriz (MALDI, del inglés *Matrix Assisted Laser Desorption/Ionization*) (Fuchs, Suss y cols. 2010).

En esencia, existen dos abordajes experimentales para analizar los lípidos por MS. El primero de ellos, es realizar una **infusión directa** del extracto de lípidos en el espectrómetro de masas. Esta estrategia es también conocida como “*shotgun*” (Han, Yang y cols. 2012). El segundo abordaje, consiste en realizar una **separación previa del extracto de lípidos empleando cromatografía**, generalmente cromatografía líquida de alta presión (HPLC o UPLC), y acoplar el eluido que sale de la columna de cromatografía a la entrada de un MS (Han y Jiang 2009). Ambas aproximaciones son igualmente válidas y la elección de ellas dependerá del tipo de muestra, la complejidad de la mezcla de lípidos o de la profundidad del análisis que se desea realizar (**Tabla 5**). La principal ventaja que se encuentra en la infusión directa es que se dispone de un tiempo prácticamente ilimitado, dependiendo del volumen de muestra disponible, para realizar múltiples experimentos de MS y obtener muchos espectros, que posteriormente permiten elucidar con mayor detalle la composición de lípidos de la muestra. En contra, la infusión directa precisa del empleo de espectrómetros de masas de elevada resolución, que permite compensar la nula separación previa del extracto de lípidos original y beneficiarse de la

simplicidad en la introducción de la muestra. La realización de una separación cromatográfica previa a la introducción del extracto de lípidos permite la utilización de espectrómetros de masas de menor resolución y tiene como principal ventaja de que se obtienen mejores resultados cuantitativos al reducirse la confusión entre especies de lípido de igual relación masa/carga (m/z) (isóbaros) y reducirse los efectos de supresión iónica.

Infusión directa ("Shotgun")	Separación cromatográfica
Evita anomalías cromatográficas y alteraciones en la concentración, que mejoran el ratio S/N.	Mejor cuantificación de un compuesto a baja concentración al referenciarlo a su ISTD bajo las mismas condiciones experimentales
El espectro de masas se adquiere a una concentración constante	Mejora la identificación de los compuestos analizados mediante la masa y su tiempo de retención
Se pueden emplear múltiples estrategias de fragmentación (PIS, NLS, MRM...) para cada extracto inyectado	La separación previa en columna facilita la identificación de especies isoméricas que tienen la misma masa y fragmentación
Para cada infusión se pueden alterar las condiciones del espectrómetro de masas, como energías de fragmentación.	La separación cromatográfica mejora la ionización de los compuestos al eliminarse interacciones entre especies
Reduce los problemas asociados a la utilización de la cromatografía	La cromatografía permite identificar isóbaros con diferente tiempo de retención. (por ejemplo PC34:1, ...PC-0-)
Todas las especies detectadas están en el mismo entorno de ionización	No todas las especies están en el mismo entorno de ionización
El tiempo de adquisición para el espectro es mayor, lo que permite realizar identificación	El tiempo de adquisición está limitado al tiempo de elución del pico. Lo que limita la capacidad de identificación.
Problemas de supresión iónica	Reduce los problemas de supresión iónica
Mejor reproducibilidad	Mejor sensibilidad para especies poco abundantes

Tabla 5. Resumen de las principales ventajas de las diferentes aproximaciones para trabajar con un espectrómetro de masas: la infusión directa o previa separación cromatográfica. S/N: relación señal/ruido; PIS: método de ión producto (*product ion scan*); NLS: método de pérdida de neutro (*neutral loss scan*); MRM: monitorización de reacción múltiple (*multiple reaction monitoring*); IS: estándar interno.

2.1. Extracción de lípidos

Al igual que no existe un método general para el análisis de los lípidos, tampoco existe un método general para la extracción de los mismos. Las grandes diferencias en la polaridad de las distintas clases lipídicas- por ejemplo, los CE son muy apolares en comparación con las PC, cuya cabeza de fosfocolina les confiere mayor polaridad-, dificulta la existencia de un método robusto de extracción. En general, se emplean métodos tradicionales de separación líquido-líquido utilizando solventes orgánicos de distinto índice de polaridad en función de las clases lipídicas de interés. Los métodos de extracción más ampliamente utilizados son el método de Folch (Folch, Lees y cols. 1957) y el método Bligh-Dyer (Bligh y Dyer 1959), en los que se emplean

combinaciones de cloroformo y metanol; también es muy empleada la extracción con tert-butilmetiléter y combinaciones de butanol-metanol (Yang y Han 2016). Los métodos de extracción en fase sólida (SPE, del inglés *solid phase extraction*), que permiten el fraccionamiento de lípidos en clases en función de la interacción con el relleno de la columna, son también utilizados para mejorar la sensibilidad y especificidad de los análisis lipídómicos (Agren, Julkunen y cols. 1992).

2.2. Espectrometría de masas

Un espectrómetro de masas es un equipo capaz de generar iones y separarlos mediante la aplicación de un campo electromagnético en función de su relación masa/carga (m/z), y cuantificarlos según su abundancia. El espectro de masas que se obtiene es la representación de la intensidad en el eje de ordenadas frente a la relación m/z en el eje de abscisas, y la intensidad de los picos es directamente proporcional a la abundancia de las especies iónicas (**Figura 8**) (Urban 2016).

El esquema básico de la MS consta de una **fente de iones** y de un **analizador de masas** (**Figura 9**). En función de la naturaleza de dichas partes existe una familia amplia de espectrómetros de masas, que combinan estas partes para lograr mejoras en las cualidades cuantitativas (sensibilidad) y cualitativas (resolución) de los equipos.

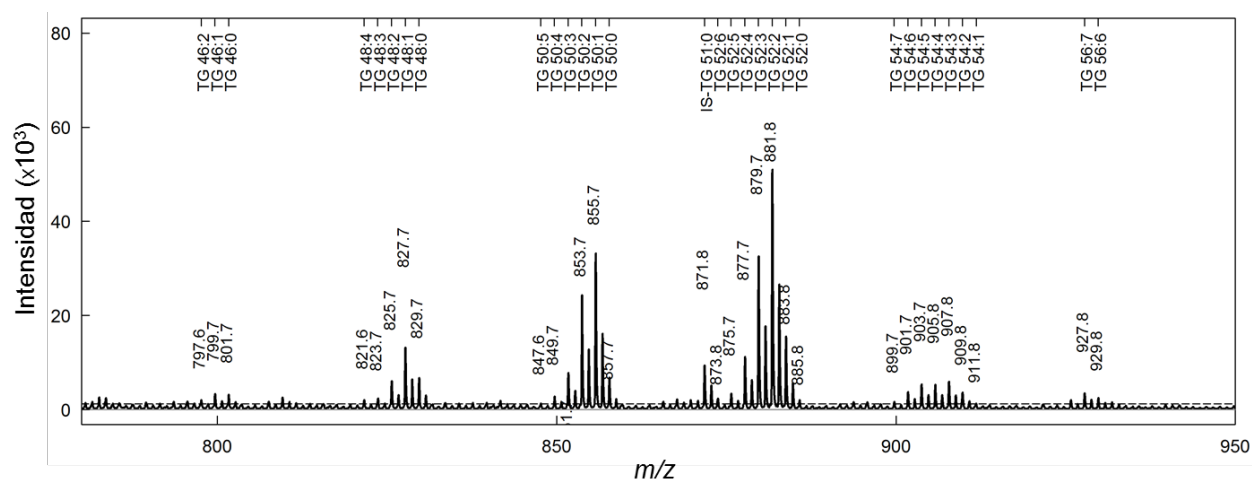


Figura 8. Espectro de masas de la fracción de TG del plasma obtenido mediante MALDI-TOF. Ejemplo de un espectro de masas, en el que se representa la intensidad de cada especie en el eje de ordenadas frente al ratio m/z en el eje de abscisas. Las especies de TG fueron detectadas en modo positivo como aductos sodiados $[M+Na]^+$.

2.2.1. Fuente de iones

Para producir iones existen diferentes formas de ionización, duras o blandas, dependiendo de si producen o no fragmentación de los compuestos estudiados. Las **fuentes de ionización duras**, como la ionización por impacto electrónico (EI), comunican energías elevadas a los iones, produciéndose una gran cantidad de fragmentos en moléculas orgánicas y espectros de masas complejos con mucha calidad informativa, lo que favorece la identificación de los compuestos. Por el contrario, las **fuentes de ionización blandas**, tales como la ionización química (APCI), la ionización mediante electrospray (ESI) y la desorción (MALDI), producen espectros con pocos fragmentos de la molécula, generalmente un solo ión, con lo que es necesario realizar fragmentaciones posteriores para generar espectros más ricos, que permitan la elucidación del compuesto (Bhardwaj y Hanley 2014).

En lipidómica se emplean sobre todos fuentes de ionización blandas. Dentro de éstas, la que provoca menor destrucción de la muestra es la fuente ESI. Este método de ionización consiste en hacer pasar la muestra por un pequeño orificio que facilita la formación de pequeñas gotas y la formación de un “*spray*”, que entra en el analizador de masas mediante la aplicación de un potencial eléctrico. También hay técnicas en las que se prescinde de la vaporización de la muestra, como en el caso de MALDI, que utiliza un láser que incide sobre una mezcla cristalizada de muestra y matriz, absorbiendo la matriz la energía y transfiriéndola a la muestra para generar iones (Bhardwaj y Hanley 2014).

2.2.2. Analizador de masa

Tras ser ionizada la muestra, los iones deben separarse en función de su relación m/z para que puedan ser detectados de forma individual. Pueden existir iones con diferencias muy pequeñas de masa, y su capacidad para distinguirlos es lo que se conoce como resolución de un espectrómetro de masas, que se mide según el parámetro FWHM (anchura del pico a la mitad del máximo, del inglés *Full Width at Half Maximum*). Las fuentes de ionización se combinan con los distintos tipos de analizadores para dar lugar a los distintos equipos comerciales de espectrómetros (**Figura 9**) (Haag 2016).

Los analizadores de tipo cuadrupolo (Q) consisten en un conjunto de cuatro barras de metal, colocadas en forma paralela, sobre las que se aplica un potencial. Los iones son acelerados e introducidos en el espacio entre las barras, donde el movimiento de los iones dependerá de su relación m/z al aplicarse unas determinadas frecuencias en las que un ion es controlado. La

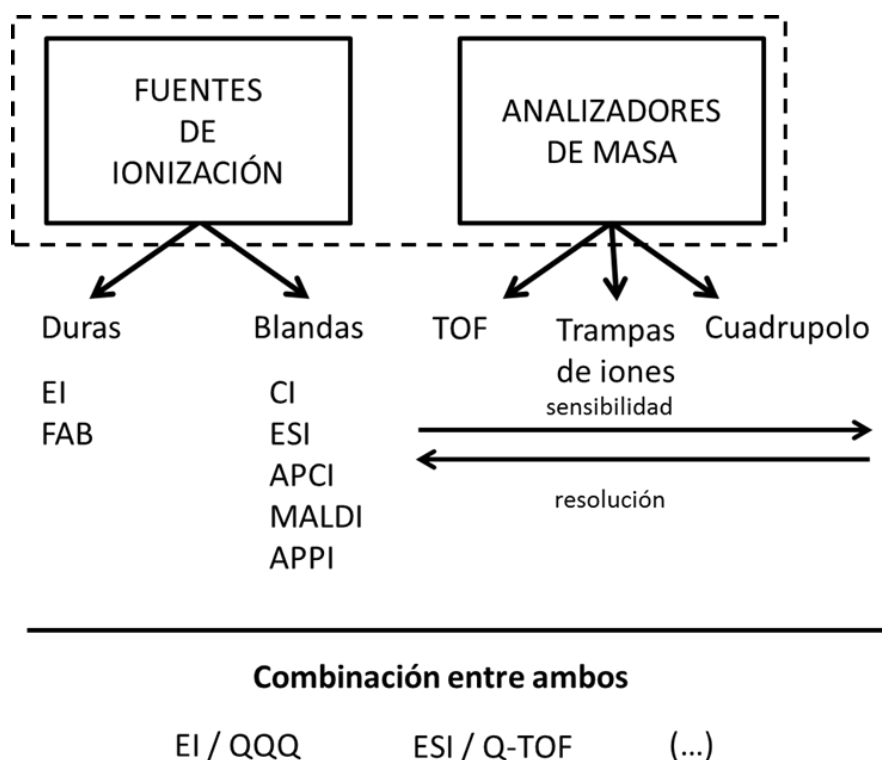


Figura 9. Esquema de los componentes principales de un espectrómetro de masas. Las fuentes de ionización pueden ser blandas o duras en función de la fragmentación que producen sobre los analitos a estudio. Existen distintos tipos de analizadores de masas cuyas características difieren en la sensibilidad y la resolución. Las fuentes de ionización y los analizadores de masas se pueden combinar de distintas formas para dar gran cantidad de espectrómetros de masas. EI: impacto electrónico; FAB: bombardeo de átomos rápidos; CI: ionización química; ESI: electrospray; APCI: ionización química a presión atmosférica; MALDI: desorción ionización mediante láser asistida por matriz; APPI: fotoionización a presión atmosférica; TOF: tiempo de vuelo; EI/QQQ: impacto electrónico con analizador triple cuadrupolo; ESI/Q-TOF: electrospray con analizador cuadrupolo y tiempo de vuelo.

principal ventaja es la rapidez con la que realiza barridos de masas y la alta sensibilidad, sacrificando la resolución (Haag 2016).

El analizador de trampa de iones es una modificación de los cuadrupolos, y está basado en un confinamiento de los iones debido a un campo magnético. Ofrece una alta sensibilidad, son robustos y más económicos que los cuadrupolo. Tienen la posibilidad de realizar fragmentaciones múltiples en el interior de la trampa, lo que permite su empleo en estudios de identificación de especies (Haag 2016).

Los analizadores de tiempo de vuelo (TOF, del inglés *time of flight*) son analizadores de alta resolución ($\text{FWHM} > 20.000$) capaz de distinguir masas con una diferencia menor de 0.01

dalton. Se basan en la dispersión de iones de diferente m/z a través de un espacio de longitud conocida. Se les aplica un potencial para que todos los iones posean la misma energía y los más ligeros se detectarán antes que los iones más pesados. Registra espectros a alta velocidad, es muy sensible y permite el análisis de un rango de masas ilimitado, por lo que es ampliamente utilizado para moléculas de elevado peso molecular. Su principal inconveniente es su elevado precio (Haag 2016).

2.2.3. MALDI-TOF

La espectrometría MALDI-TOF es un tipo de MS, cuyas principales características son que utiliza luz láser como fuente de ionización, la muestra a analizar es sólida y utiliza como detector un TOF. La ionización de las moléculas se produce por transferencia de energía tras la irradiación láser en la muestra (**Figura 10**). Para que la muestra pueda ser completamente ionizada, es necesaria la adición de una matriz. La matriz debe cumplir las siguientes características: absorber en la longitud de onda del láser, ser químicamente inerte, fotoestable, tener propiedades químicas compatible con el analito de interés (solubilidad), producir poco ruido en el espectro, debe favorecer una cristalización homogénea del analito y la muestra, y finalmente su espectro no debe interferir con la señal del analito (Fuchs, Suss y cols. 2010).

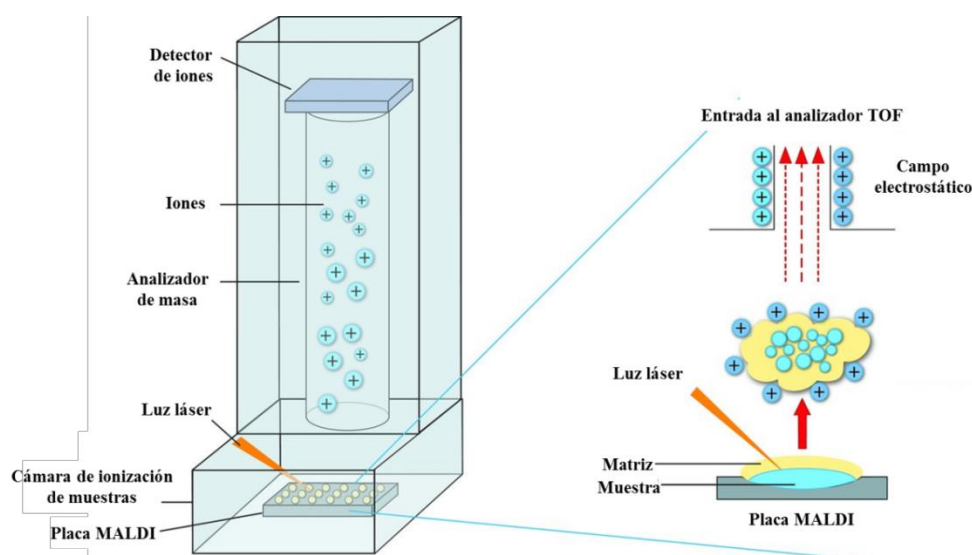


Figura 10. Esquema del espectrómetro de masas MALDI-TOF. La placa MALDI, que contiene la mezcla de muestra y matriz, es introducida en una cámara a vacío. Una luz láser incide sobre la mezcla para producir su desorción e ionización, generando una nube de moléculas ionizadas que entran en el analizador de masas TOF, donde son aceleradas y las más ligeras viajan más rápido. Se genera un espectro de masas, que representa el número de iones que golpean al detector con el tiempo. **Imagen adaptada de “Patel, R. (Clinical Chemistry, 2014)” (Patel 2015).**

MALDI-TOF es una técnica ampliamente utilizada con fines cualitativos en proteómica (Park, Bae y cols. 2012) y glicómica (Jeong, Kim y cols. 2012). En el ámbito clínico, cada vez está más ampliamente instaurado en los laboratorios de microbiología, como herramienta cualitativa para la identificación de las bacterias presentes en un cultivo (Singhal, Kumar y cols. 2015). Sin embargo, el uso cuantitativo de la espectrometría MALDI constituye un desafío en lipidómica por diversas razones (Duncan, Roder y cols. 2008). En primer lugar, los compuestos de bajo peso molecular como los lípidos, sufren la interferencia de las señales que generan las matrices MALDI más comúnmente utilizadas. En segundo lugar, la diversidad de los lípidos complica la desorción y la ionización MALDI en un extracto de lípidos complejo. Para lograr una desorción eficiente, es necesario lograr una combinación óptima entre matriz y solvente de extracción que forme cristales homogéneos en la superficie de la placa MALDI (Zenobi y Knochenmuss 1998). Estas condiciones son difíciles de obtener sin fijar las condiciones experimentales individualmente para cada clase de lípido. Recientemente, algunos autores han empleado 9-aminoacridina (9-AA) como matriz, en combinación con acetonitrilo/isopropanol, obteniendo resultados cuantitativos para fosfolípidos (PL) y TG (Sun, Yang y cols. 2008). En tercer lugar, la ionización de lípidos depende principalmente de la naturaleza química del grupo funcional, siendo la ionización muy diferente para cada clase lipídica. Existen clases lipídicas como la PC y la SM que son muy fácilmente ionizables, y además muy abundantes en muestras de tejidos y plasma, que enmascaran a otras que son menos ionizables y abundantes como PE, CE y TG. A estas dificultades hay de añadir que el ambiente químico (pH, presencia de otras especies iónicas, etc) puede afectar a la ionización de los lípidos (Kubo, Kajimura y cols. 2012).

La forma óptima de determinar la composición cuantitativa de una mezcla de lípidos complejos por MALDI es mediante la separación de clases individuales de lípido y adición de un estándar interno (IS) para cada clase. El IS debe ser lo más similar al analito de interés. Si es posible, se deben emplear estándares deuterados o, en su defecto, especies no presentes en la mezcla a valorar. Este último enfoque requiere un conocimiento anterior de la composición de las muestras para asegurar que se añaden cantidades apropiadas de IS, principalmente para evitar la adición en exceso que pueda provocar supresión de señales (Duncan, Roder y cols. 2008).

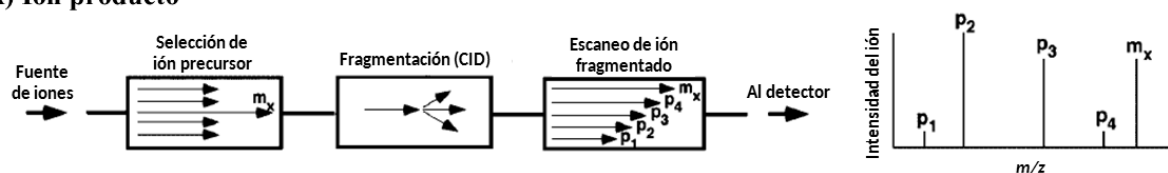
2.2.4. ESI - QqQ

En este tipo de espectrómetro de masas se acopla una fuente ESI a un analizador de masas de triple cuadrupolo (QqQ), que utiliza dos analizadores Q en serie con una celda de colisión (CID, del inglés *Collision-induced Dissociation*) acoplada entre ellos, permitiendo realizar

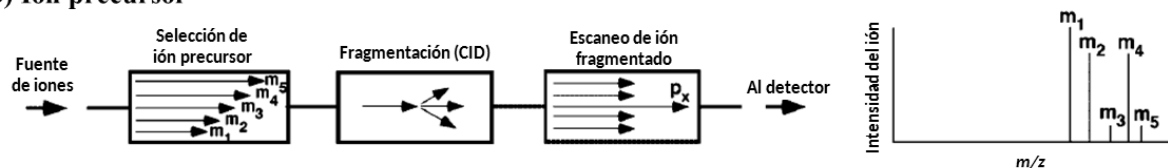
experimentos de masas en tándem (MS/MS). En la celda de colisión, los iones que llegan del primer Q colisionan con las moléculas de gas (generalmente helio, nitrógeno o argón) y se generan fragmentos hijos (Han, Yang y cols. 2012).

Existen cuatro modos principales de trabajo en experimentos MS/MS (**Figura 11**). El método de **ion producto** (*Product Ion Scan*) consiste en que el primer analizador de masas selecciona un ion con determinada m/z que es fragmentado en el CID, para analizar dichos fragmentos en el segundo analizador. Los experimentos de **ion precursor** (PIS, del inglés *Precursor Ion Scan*) son muy útiles en lipidómica para identificar la clase o grupo de lípido. En este modo, el primer analizador selecciona iones con un determinado rango de masas, que se fragmentan en el CID y se analizan en el segundo analizador, donde se monitoriza el ion

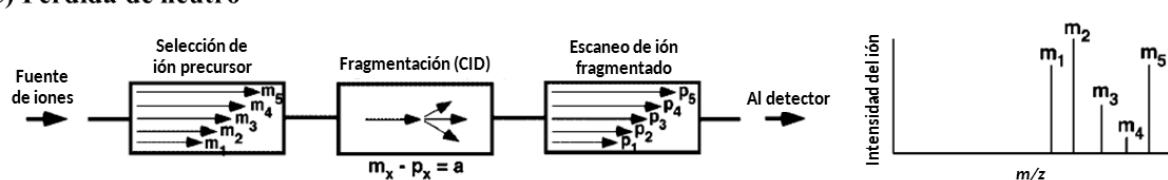
A) Ión producto



B) Ión precursor



C) Pérdida de neutro



D) Monitorización de reacción seleccionada

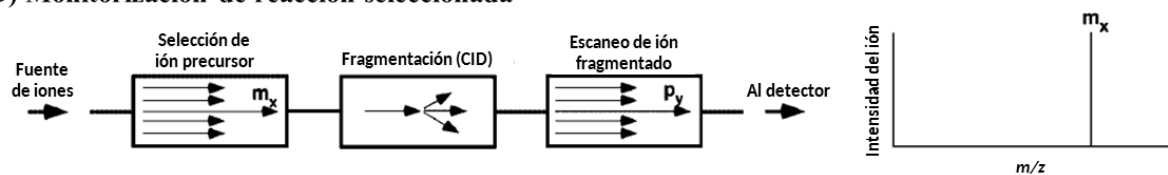


Figura 11. Métodos de análisis de un analizador triple cuadrupolo. Métodos de trabajo en un espectrómetro de masas con analizador triple cuadrupolo. A) Método de ión producto; B) Método de ión precursor; C) Método de pérdida de neutro; D) Método de monitorización de reacción seleccionada. En cada uno de los métodos se muestra la forma de trabajar en el primer cuadrupolo, la fragmentación que se produce en la celda de colisión (CID) y posterior análisis en el segundo cuadrupolo. La variable “a” en el método de pérdida de neutro denota la masa del fragmento neutro que se pierde. **Imagen adaptada de “Han, X. (Mass Spectrom Rev, 2012)”** (Han, Yang y cols. 2012).

producto de interés. En el caso de que el CID genere fragmentos neutros, los dos analizadores de masas pueden escanear diferencias de masas correspondientes a la pérdida del fragmento neutro, denominándose experimentos de **pérdida de neutro** (NLS, del inglés *Neutral-Loss Scan*). El cuarto método se denomina **monitorización de reacción seleccionada** (SRM, del inglés *Selected Reaction Monitoring*) y consiste en fijar una determinada masa en ambos analizadores (se conoce como transición). Este modo aumenta la especificidad, selectividad y sensibilidad, por lo que es un método muy empleado para realizar cuantificación. Si se quiere estudiar varios compuestos y transiciones a la vez, el método se denomina **monitorización de reacción múltiple** (MRM, del inglés *Multiple Reaction Monitoring*) (Han, Yang y cols. 2012).

Generalmente los espectrómetros de masas de triple cuadrupolo se suelen combinar con un equipo de cromatografía de líquidos (LC-MS/MS) para aprovecharse de la capacidad de separación que ofrece la cromatografía (Sommer, Herscovitz y cols. 2006).

2.3. HPLC-ELSD

La cromatografía es una técnica analítica de separación de moléculas de una mezcla compleja por la interacción de una fase móvil y una fase estacionaria (Coskun 2016). La cromatografía líquida de alto rendimiento (HPLC, del inglés *High Performance Liquid Chromatography*) consiste en una fase móvil líquida que fluye a través de una fase estacionaria sólida contenida en una columna, cuyas características de longitud, diámetro y relleno dependerán del analito de interés a separar (Bird 1989). Existen esencialmente dos tipos de estrategias para separar moléculas en HPLC, la cromatografía de **fase reversa** y la cromatografía de **fase normal**. En la primera, el relleno de la columna es apolar, los analitos quedan retenidos en orden creciente a su apolaridad (los más polares son los menos retenidos), y eluidos de la columna empleando un gradiente de apolaridad creciente (Fauland, Köfeler y cols. 2011). En la segunda, cromatografía de fase normal, el relleno de la columna es polar, los analitos quedan retenidos en orden creciente de polaridad (los más polares son los más retenidos), y eluidos de la columna en orden creciente aumentando la polaridad del gradiente de solventes utilizados (Abreu, Solgadi y cols. 2017). Ambos tipos de cromatografía se emplean masivamente en el análisis de lípidos.

Un inconveniente general con el que nos encontramos en el análisis de lípidos es la ausencia de cromóforos en las especies. Este hecho limita el empleo típico de detectores como el

ultravioleta o la fluorescencia. Por este motivo, para el análisis de lípidos es muy utilizado el detector de dispersión de luz vaporizada (ELSD, del inglés *Evaporative Light Scattering Detector*) (Roda, Cerrè y cols. 1992). El ELSD evapora el analito a la salida de la columna, mediante corriente de aire o nitrógeno, generando una respuesta proporcional a la cantidad de luz dispersada al atravesar un haz de luz (**Figura 12**). La intensidad de la luz dispersada de partículas sólidas en suspensión depende de su tamaño de partícula y de su concentración. La cromatografía de fase normal (HPLC-ELSD) es una técnica muy utilizada para analizar la composición de clases de lípidos de una muestra (Chamorro, Garcia-Cano y cols. 2013).

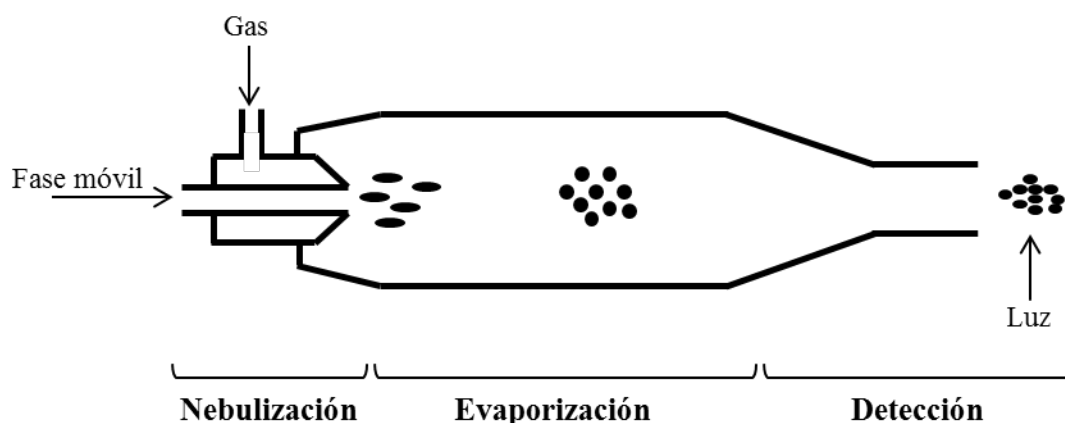


Figura 12. Esquema de un detector de dispersión de luz polarizada (ELSD). La fase móvil entra al detector, donde un gas produce gotas por acción de un gas. Posteriormente se produce la evaporación mediante calor y las moléculas resultantes finalmente se detectan mediante la dispersión de la luz.

2.4. Cromatografía de gases

En la cromatografía de gases (GC) la muestra es transportada por un gas que fluye de forma constante (**Figura 13**). Las moléculas en fase gaseosa se separan por interacción con la fase estacionaria, que desde un punto de vista fisicoquímico se considera un líquido. Los analitos son eluidos de la columna mediante un gradiente de temperatura. Además, los compuestos deben ser volatilizables en la inyección, lo que limita su empleo a compuestos térmicamente estables cerca de su punto de ebullición. Para ello, es frecuente recurrir a la realización de reacciones de derivatización de los compuestos para favorecer la volatilidad y la estabilidad. La GC es la técnica preferida para el análisis de ácidos grasos y esteroides (Aktas, Elmastas y cols. 2016).

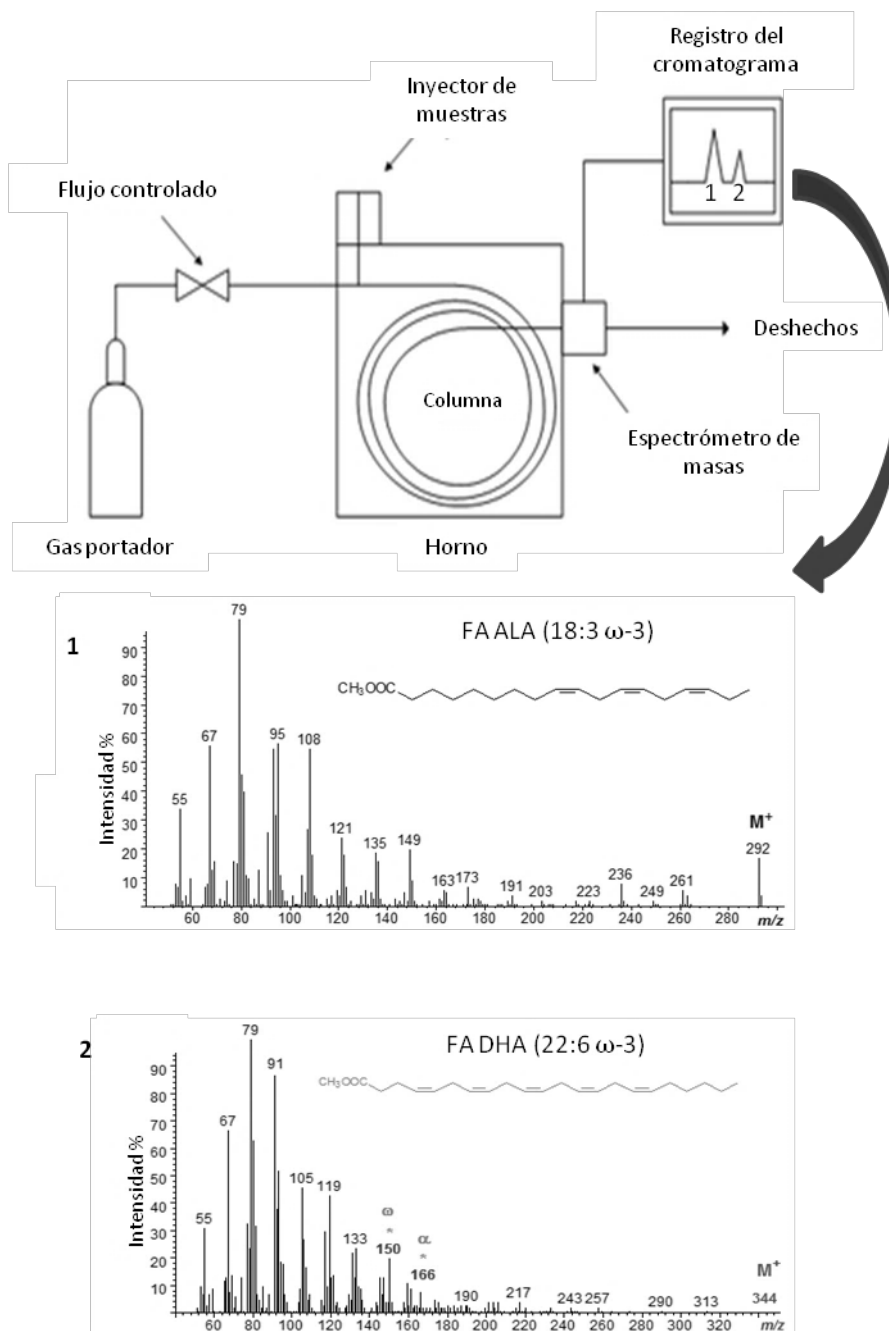


Figura 13. Esquema del instrumento GC-MS. Instrumento GC-MS compuesto por un gas portador (en nuestro caso helio), el cual tendrá un flujo controlado y constante; columna en un horno por la cual serán transportados los iones a altas temperaturas; espectrómetro de masas; salida para los desechos; y sistema de registro de datos. Se muestra un registro de un cromatograma característico de los ácidos grasos ALA (18:3 ω -3) y DHA (22:6 ω -3). FA: ácido graso.

3. Esclerosis múltiple

La esclerosis múltiple (EM) es una enfermedad autoinmune y neurodegenerativa, que se caracteriza por la presencia de inflamación y desmielinización crónica del sistema nervioso central (SNC). Es una de las causas más comunes de discapacidad neurológica en adultos jóvenes (Strober, Christodoulou y cols. 2012).

Existe una fuerte asociación entre latitud y EM, por lo que la incidencia y prevalencia de la enfermedad varían geográficamente, aumentando el riesgo de sur a norte (Leray, Moreau y cols. 2016). España se encuentra en un área de prevalencia media-alta, con 47.000 casos de EM según datos de la Asociación Española de esclerosis múltiple, estimándose una prevalencia de 90-100 casos por cada 100.000 habitantes (Otero-Romero, Roura y cols. 2013; Izquierdo, Venegas y cols. 2015), inferior a los 200 casos por cada 100.000 habitantes de las zonas del norte de Europa (Grytten, Torkildsen y cols. 2015). La Sociedad Española de Neurología estima la incidencia en 1800 nuevos casos al año. La EM afecta dos o tres veces más a mujeres que a hombres (Pender y Burrows 2014).

3.1. Etiopatogenia

La etiología de la EM es desconocida, aunque la hipótesis más aceptada es la interacción entre factores genéticos y externos (McFarland y Dhib-Jalbut 1989).

Factores genéticos. Existe un mayor riesgo de padecer EM entre familiares de primer grado cuando se compara con el de la población general. La probabilidad de padecer EM teniendo un hermano ya diagnosticado es 20 veces superior a la normal (1/1000) y aumenta hasta 300 veces si se trata de un gemelo (Didonna y Oksenberg 2015). Aunque es evidente que la EM no sigue un patrón de herencia monogénico, existen evidencias que asocian la presencia en ciertos individuos de determinados polimorfismos genéticos con un aumento en el riesgo de padecer EM. Algunos de estos polimorfismos corresponden a genes que codifican para proteínas que

participan en la respuesta inflamatoria como el complejo mayor de histocompatibilidad (HLA-DRB1 y HLA-DQB1) (Lincoln, Montpetit y cols. 2005) y a genes que codifican para receptores de las células del sistema inmunitario, como IL7RA, IL2RA (Hafler, Compston y cols. 2007), TNFRSFA1A o IRF8 (Rubio, Stankovich y cols. 2008; De Jager, Jia y cols. 2009).

Factores externos. El consumo del tabaco está relacionado con un aumento del riesgo de padecer EM (Salzer, Hallmans y cols. 2013). Las concentraciones bajas de vitamina D y la obesidad también han sido asociadas como factores que aumentan el riesgo de padecer EM (Løken-Amsrud, Lossius y cols. 2015), estando ambas relacionadas, ya que en personas obesas disminuyen los niveles de vitamina D por incremento en su distribución en el tejido adiposo. Además, el aumento en la concentración de vitamina D en tejido adiposo parece aumentar la producción de citoquinas proinflamatorias como IL-6, y favorecer la desmielinización en el SNC (Petković y Castellano 2016). Entre los factores no genéticos, las infecciones han sido ampliamente estudiadas al relacionarse con un aumento del riesgo, como las infecciones por los herpesvirus, y principalmente el virus Epstein-Barr (Ascherio, Munger y cols. 2001). Este último es la mayor causa de la mononucleosis aguda infecciosa y parece que tienen un mayor riesgo de padecer EM los individuos que han padecido dicha enfermedad (Thacker, Mirzaei y cols. 2006). También se ha encontrado asociación entre el virus de la varicela Zóster y la EM al encontrarse carga viral y ADN de dicho virus en el líquido cefalorraquídeo (LCR) de pacientes con brotes de EM (Sotelo, Martínez-Palomo y cols. 2008).

Con independencia de la etiología, los factores anteriormente citados producen una respuesta inmune anómala que desencadena un proceso inflamatorio y desmielinizante en el SNC, que provoca daño axonal, pérdida neuronal, muerte oligodendrocítica y desmielinización (**Figura 14**) (De Stefano, Narayanan y cols. 1999; Silber y Sharief 1999; Trapp, Ransohoff y cols. 1999).

El inicio de la enfermedad se debe a la activación de linfocitos T CD4⁺ autorreactivos durante la infancia. Tras un período de latencia, dichas células se reactivarían por un mecanismo de mimetismo molecular- en respuesta a algún agente infeccioso desconocido que comparte epítomos con algún componente del SNC (Sospedra y Martin 2006)- o por la presencia de superantígenos- proteínas capaces de activar los receptores celulares T de forma antígeno-independiente (Brocke, Piercy y cols. 1996)-. Una vez activados, van a ir a su vez activando a otras células inmunitarias, como linfocitos T CD8⁺ o linfocitos B, que atraviesan la barrera hematoencefálica (BHE) hacia el SNC, donde serían expuestas a células presentadoras del

antígeno (célula dendrítica, macrófago o microglía). Se produce una respuesta inmune que conduce a un proceso inflamatorio mediante la liberación de citoquinas proinflamatorias, produciéndose el daño tisular (Lassmann, Brück y cols. 2007). Como consecuencia del daño tisular, se producen nuevos antígenos ampliándose el número de dianas para las células T en el SNC (Vaughan, Peters y cols. 2014).

En principio, todas las proteínas de la mielina, y algunas asociadas a ella, son antígenos diana para las reacciones mediadas por células T CD4⁺. Las mayoritarias son: la proteína básica de mielina (MBP), la glicoproteína oligodendrocítica de mielina (MOG), la proteína proteolipídica (PLP), la glicoproteína asociada a mielina (MAG) o la proteína específica de oligodendrocitos (OSP) (Weber, Hemmer y cols. 2011). Ninguna variación en la concentración o en la secuencia de estas proteínas ha podido relacionarse como agente causante de la enfermedad (Kuhle, Pohl y cols. 2007).

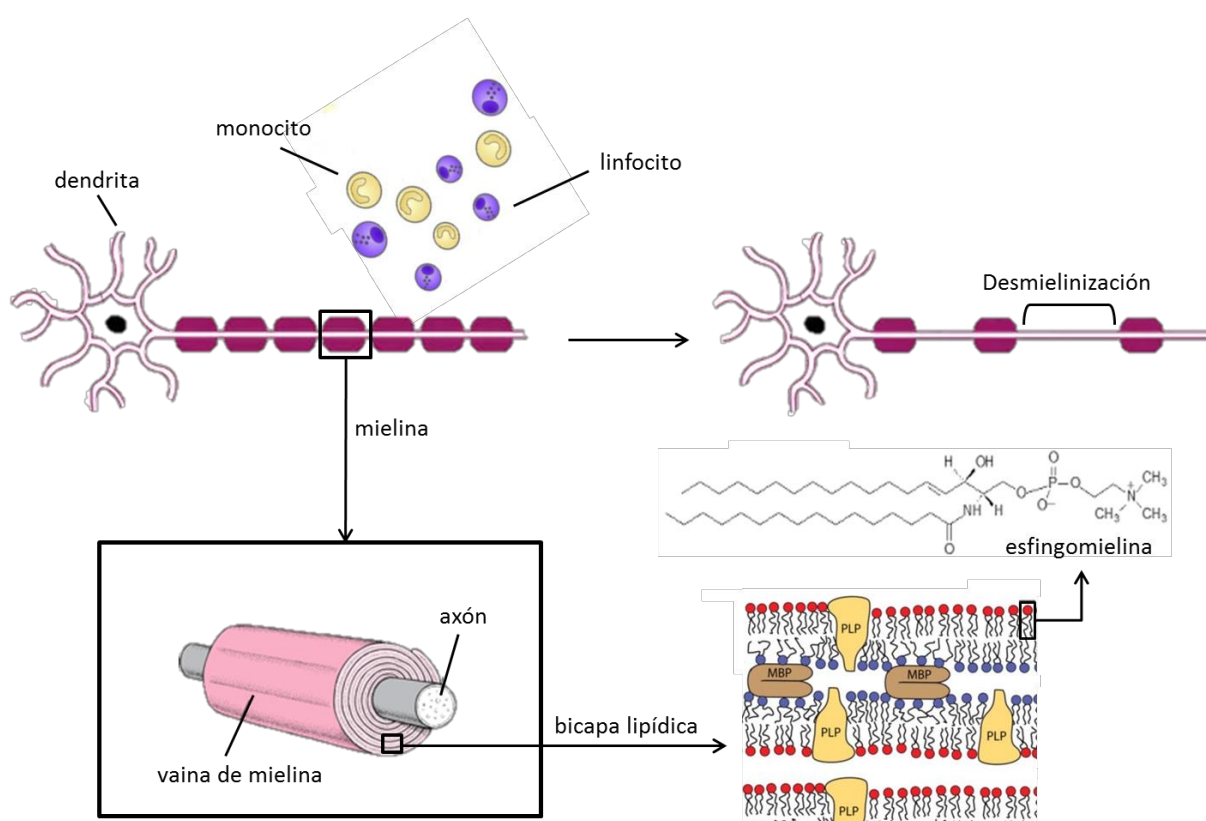


Figura 14. Proceso de desmielinización de una neurona por activación de linfocitos y monocitos. MBP, proteína básica de mielina; PLP, proteína proteolipídica.

3.2. Patogenia

El principal hallazgo patológico de la EM es la desmielinización. La vaina de mielina y los oligodendrocitos son atacados por células del sistema inmune y anticuerpos anti-mielina, con la consecuente digestión (opsonización) por parte de macrófagos. Mientras que en el inicio de la enfermedad predominan los infiltrados de células proinflamatorias en el SNC, en las fases avanzadas predominan los agregados de células inmunitarias y el daño provocado por el estrés oxidativo (Brück 2005). Durante el transcurso de la enfermedad se producen fases de remielinización promovidas por los oligodendrocitos, que aparecen en elevado número rodeando las lesiones desmielinizantes (Lassmann, Brück y cols. 1997). En estadios tempranos de la enfermedad la remielinización es altamente activa, mientras que en fases crónicas más avanzadas sólo se observa en pequeñas zonas de las lesiones. En la EM también se produce un daño axonal, que está ligado a la pérdida de mielina (Brück 2005), considerado principal determinante de la discapacidad neurológica (Bjartmar, Wujek y cols. 2003).

La EM es una enfermedad de presentación clínica heterogénea, y el diagnóstico es fundamentalmente clínico. Las manifestaciones de la enfermedad incluyen debilidad motora y sensibilidad de extremidades, ataxia, pérdida visual o alteraciones en la marcha y pérdidas de equilibrio. La primera presentación compatible con la enfermedad suele ser un síndrome clínicamente aislado, un episodio de uno o varios síntomas causados por la inflamación o desmielinización en el SNC. Posteriormente la enfermedad evoluciona en dos formas clínicas: la remitente-recurrente (RR) y la progresiva (Lublin 2014). Un 90% de los pacientes debutan con la forma RR, frente al 10% que debutan con la forma progresiva (Koch, Kingwell y cols. 2009). La EM RR se caracteriza con la aparición de episodios de exacerbación de la enfermedad, conocidos como brotes, con posterior recuperación parcial o completa, que se repiten en el tiempo. Para hablar de brote es necesario que los síntomas clínicos duren más de 24 horas, en ausencia de fiebre o infección, y para poder hablar de nuevo brote es necesario que transcurra al menos un mes entre ambos brotes (McDonald, Compston y cols. 2001). La forma progresiva de EM se caracteriza por un deterioro neurológico gradual sin relación con los brotes, con o sin periodos de remisión. Sin embargo, tras años de evolución de la enfermedad, los pacientes con la forma RR pueden evolucionar a una forma progresiva (Koch, Kingwell y cols. 2010).

3.3. Diagnóstico y tratamiento

El diagnóstico de la EM es clínico y se apoya fundamentalmente en las pruebas de imagen. En la actualidad, están vigentes los criterios de McDonald (McDonald, Compston y cols. 2001), en los que se combina el uso de pruebas de imagen con la evaluación clínica y la exclusión de otras enfermedades similares a la EM, como el lupus eritematosos sistémico, la vasculitis y la enfermedad de Sjögren, entre otras (Katz Sand y Lublin 2013). Estos criterios se han actualizado desde 2001 (Polman, Reingold y cols. 2011) para incorporar nuevas evidencias y simplificar el uso de la neuroimagen, mientras se preserva la sensibilidad y especificidad de los antiguos criterios. La resonancia magnética nuclear (RMN) es una técnica de alta sensibilidad diagnóstica, aunque tiene una baja especificidad al no distinguir entre lesiones por isquemia, edema, inflamación o desmielinización (Wattjes, Steenwijk y cols. 2015). Las lesiones sugestivas de EM son de forma ovoide y de pequeño tamaño. La RMN permite estudiar la diseminación espacial y temporal de las lesiones (aumento de lesiones en número y tamaño), hechos que requieren ser demostrados para el diagnóstico (Polman, Reingold y cols. 2011).

No existen biomarcadores específicos para el diagnóstico de la EM, aunque el estudio del líquido cefalorraquídeo (LCR) es de apoyo en el diagnóstico diferencial. La detección de bandas oligoclonales de inmunoglobulinas G (BOCG) en LCR es una prueba que orienta sobre el carácter inflamatorio del proceso (Polman, Reingold y cols. 2011). La existencia de BOCG en suero hace necesaria determinar la síntesis intratecal, evidenciada mediante el cociente de inmunoglobulina G (IgG) y albúmina en suero y LCR (McLean, Luxton y cols. 1990). El 95% de pacientes con EM presentan BOCG exclusivamente en LCR, sin presentarlas en suero (Dobson, Ramagopalan y cols. 2013). La presencia de bandas oligoclonales de inmunoglobulinas M (BOCM) se relaciona con un curso clínico más agresivo de la enfermedad (Villar, Sádaba y cols. 2005).

Existe una variedad de tratamientos paliativos dirigidos al control de los síntomas de los brotes, siendo el tratamiento de elección los corticoides a dosis altas. Posteriormente, se han desarrollado terapias con base inmunológica que disminuyen los brotes y lesiones del SNC y evitan la progresión de la discapacidad. Entre los más utilizados se encuentran los interferones- β , una familia de citoquinas con propiedades antiinflamatorias (Kieseier 2011). Entre los tratamientos recientes se encuentra un análogo de la esfingosina, el Fingolimod. El Fingolimod es un inhibidor de la *ceramida sintasa*, por lo que disminuye la formación de ceramidas, y también es un agonista de *esfingosina quinasa*. Su metabolito fosforilado (Fingolimod-1-P) es un

inmunomodulador que se une al receptor de la esfingosina-1-fosfato de los linfocitos, evitando su salida de los tejidos linfoides secundarios, manteniéndolos lejos del SNC y reduciendo la respuesta inmunitaria (La Mantia, Tramacere y cols. 2016).

3.4. Implicación de los lípidos en la EM

El SNC es muy rico en lípidos, que se localizan principalmente en las membranas de las neuronas, en las células de la glía y en la mielina (Cermenati, Mitro y cols. 2015). El contenido de lípidos de esta última oscila en torno al 70-80% del peso seco (Rinaldi, Grassivaro y cols. 2010). El colesterol y los fosfolípidos son los principales componentes lipídicos de la mielina, representando cada uno el 40% de la composición de lípidos (Cermenati, Mitro y cols. 2015), y el 25% de la cantidad total de colesterol en el cuerpo se localiza en el cerebro (Dietschy y Turley 2004). Los esfingolípidos, como otro componente lipídico de la mielina, se encuentran en una proporción aproximada de un 20%, frente al 10% que se observa en otras membranas celulares (Schmitt, Castelvetti y cols. 2015). De ellos, las galactosilceramidas y sulfátidos, sobre todo las que contienen ácidos grasos de cadena muy larga (FA 24:0 y FA 24:1), son muy abundantes en la mielina. De hecho, algunos autores emplean la medida de estos ácidos grasos en la corteza cerebral como indicadores de remielinización (Schmitt, Castelvetti y cols. 2015).

Se ha observado una estrecha relación entre los esfingolípidos y la EM. Existe un aumento de los niveles de esfingosina y sulfátidos hidroxilados en la materia blanca del cerebro, así como una acumulación de ceramidas en regiones cercanas a las placas de desmielinización. Dicho grupo lipídico está implicado en las vías de señalización de procesos como la apoptosis, diferenciación o proliferación en células del SNC (Jana y Pahan 2010).

También se ha demostrado la existencia de especies lipídicas oxidadas, principalmente fosfolípidos, en las lesiones activas de EM, además de una disminución de fosfolípidos que contienen ácidos grasos poliinsaturados, relacionado con un aumento de la peroxidación de lípidos (Haider, Fischer y cols. 2011). Algunos autores han relacionado el aumento de especies oxidadas de lípido en pacientes con EM, por lo que puede ser útil su cuantificación para el diagnóstico temprano de EM, aunque no ha sido posible establecer una asociación con estadios específicos (Koch, Mostert y cols. 2007).

El colesterol también se ha relacionado con la progresión de la EM, existiendo una correlación entre el número de lesiones evidenciadas por RMN y los niveles plasmáticos de

colesterol total y colesterol-LDL, además de un incremento de colesterol en sangre por cada lesión nueva (Quintana, Yeste y cols. 2012). Los derivados oxidados del colesterol también han sido estudiados. El 24S-hidroxicolesterol puede atravesar la BHE, y se encuentra disminuido en pacientes con EM (Leoni 2009).

En el estudio de las enfermedades neurológicas, el estudio de la composición del LCR es de gran importancia, por ser un fluido en permanente contacto con el tejido cerebral. Se especula que el contenido de lípidos del LCR es reflejo del metabolismo de estas moléculas en el cerebro (Haughey, Zhu y cols. 2013) constituyendo una biopsia líquida de este órgano. Existe una gran variedad de lípidos en el LCR, si bien su concentración sólo supone alrededor de un 0.2% con respecto al contenido en el suero (Seyer, Boudah y cols. 2016). Se han encontrado niveles elevados de esfingolípidos en LCR de enfermos de EM respecto a pacientes sanos (Haghighi, Lekman y cols. 2013). Otros autores han descrito un aumento de sulfátidos y hexosilceramidas en pacientes con EM progresiva respecto a pacientes con EM RR (Checa, Khademi y cols. 2015; Novakova, Singh y cols. 2018). Se ha hallado un aumento de oxiesteroles, muchos de ellos intermediarios en la síntesis de ácidos biliares, en LCR de pacientes con EM (Leoni y Caccia 2013; Crick, Griffiths y cols. 2017).

Por otro lado, se han identificado anticuerpos IgG en LCR dirigidos contra sulfátidos, gangliósidos GM4 y galactocerebrósidos (Quintana, Yeste y cols. 2012). Empleando una matriz (“array”) de antígenos lipídicos, se ha detectado que un 60% de pacientes de EM presentan anticuerpos reactivos, de los cuales el 75% reconocen sulfátidos y/o complejos de sulfátidos, frente a un 25% en pacientes control con otras enfermedades neurológicas (Brennan, Galban-Horcajo y cols. 2011). Además se ha relacionado el aumento de inmunoglobulina M (IgM) oligoclonal reactiva a lípidos, principalmente frente a PC, con un curso más agresivo de la enfermedad (Villar, Sádaba y cols. 2005).

3.5. Encefalomielitis autoinmune experimental como modelo animal de esclerosis múltiple

La encefalomielitis autoinmune experimental (EAE) es un modelo animal muy utilizado en investigación por la similitud que se observan en las lesiones histológicas, y también en el comportamiento clínico del modelo con las observadas en la EM (Lassmann y Wisniewski 1979). Las lesiones histológicas halladas en este modelo tanto en cerebro como en médula

espinal se caracterizan por la presencia de una infiltración de linfocitos T CD4+ y monocitos, que causan un proceso de inflamación que produce la desmielinización axonal en el SNC, dando lugar a una parálisis progresiva del animal (Miller y Karpus 2007).

La EAE se puede inducir de forma pasiva o activa. En la primera, se obtienen células T de especies inmunizadas contra péptidos del SNC, y se transfieren tras una activación en presencia de citoquinas y células presentadoras de antígeno cargadas con péptidos de la mielina. Mientras que en la activa se administra una solución que contiene proteínas de la mielina (MBP, PLP o MOG) y otros antígenos lipídicos- pudiéndose administrar un extracto de médula espinal de cobaya (GPSC), que ya contiene estos compuestos-, empleando como vehículo una solución de adyuvante completo de Freund (CFA), permitiendo una mayor reproducibilidad (**Figura 15**) (Gold, Hartung y cols. 2000). No todas las especies de animales son susceptibles a la inducción de la EAE, siendo la rata la más utilizada al poder inducir diferentes tipos de EAE en base al curso clínico: EAE aguda, EAE remitente-recurrente (RR) y EAE crónicamente progresiva (Gold, Linington y cols. 2006). La primera se caracteriza por la aparición de un único brote al que le sigue una remisión tras un período de tiempo concreto. Para este tipo se suele utilizar la inmunización con MBP de ratas Lewis (Pitarokoili, Ambrosius y cols. 2017). Por el contrario, existen dos o más brotes en la EAE RR, y se suele utilizar ratones SJL inmunizados con PLP (Klaren, Stasula y cols. 2016). Por último, en la EAE crónicamente progresiva no existen brotes y la enfermedad sigue un curso progresivo, utilizándose para ello ratas inmunizadas con MOG (Weissert, Wallström y cols. 1998).

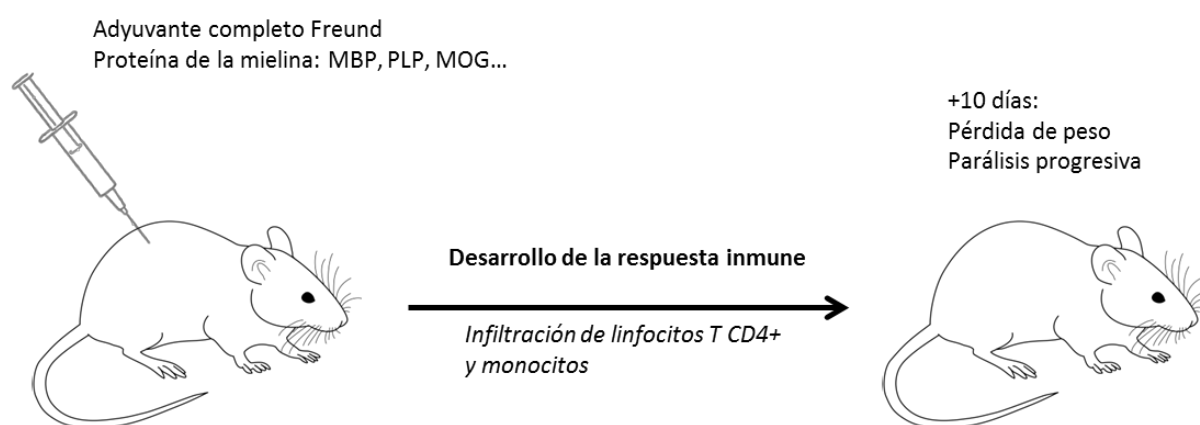


Figura 15. Inmunización activa de ratas. MBP, proteína básica de mielina; PLP, proteína proteolipídica; MOG, glicoproteína oligodendrocitaria de la mielina.

Una vez se produce la inmunización, aparecen los signos clínicos característicos de la EAE, que suelen ir precedidos de un descenso del peso corporal (**Figura 15**). Los signos clínicos consisten en el desarrollo de parálisis que empieza en la cola y que va ascendiendo, provocando la parálisis progresiva del animal, pudiendo causar, en algunos casos, su muerte (Pender, Tabi y cols. 1995).

3.6. Ácido elágico

Los polifenoles son biomoléculas orgánicas caracterizadas por poseer más de un grupo fenol en su estructura. El ácido elágico es un polifenol que se encuentra principalmente en frutas (granadas, uvas, bayas) y nueces, como parte de moléculas poliméricas denominadas elagitaninos. Se ha reportado que la administración oral de alguno de estos polifenoles presenta multitud de propiedades biológicas, incluyendo actividades antioxidantes (Tomás-Barberán, González-Sarrias y cols. 2017), antiinflamatorias (Rosillo, Sánchez-Hidalgo y cols. 2012), antiateroscleróticas (Rosenblat, Volkova y cols. 2006) y anticancerígenas (Larrosa, Tomás-Barberán y cols. 2006) en modelos experimentales, habiendo sido propuestos como alternativa terapéutica en enfermedades neurodegenerativas (Bhullar y Rupasinghe 2013).

Los elagitanos no son directamente absorbidos, sino que primero son hidrolizados en el sistema digestivo a ácido elágico, el cual es metabolizado por la microflora bacteriana para producir otros derivados, principalmente urolitinas A y B (**Figura 16**) (Cerdá, Espín y cols. 2004).

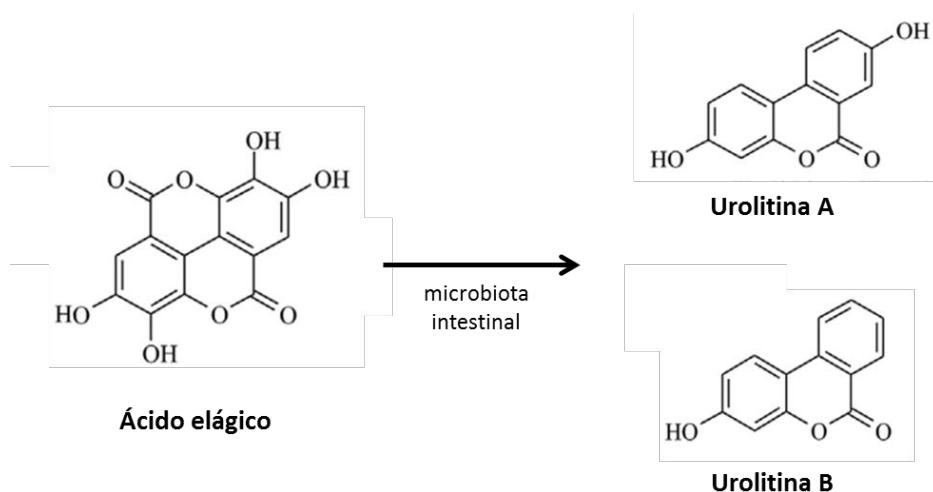


Figura 16. Ácido elágico y principales metabolitos. El ácido elágico es transformado en sus derivados urolitina A y B por acción de la microflora bacteriana en el sistema digestivo.

Los datos de los efectos de la suplementación con antioxidantes en pacientes con EM son muy escasos y no se ha demostrado claramente que exista un beneficio al administrar antioxidantes exógenos. Se ha reportado que los niveles de vitamina E son bajos en las placas desmielinizadas (Langemann, Kabiersch y cols. 1992) y en el suero de pacientes de EM (Langemann, Kabiersch y cols. 1992); sin embargo, no se observó correlación entre los signos clínicos (Jiménez-Jiménez, de Bustos y cols. 1998). La suplementación diaria con un cocktail de antioxidantes (vitamina C, vitamina E y selenito sódico) incrementa y normaliza la actividad glutatión peroxidasa en células sanguíneas, pero sin lograrse ningún efecto en la gravedad de la EM (Jensen y Clausen 1986). Tampoco los estudios epidemiológicos han arrojado datos concluyentes sobre si una mayor ingesta de frutas y verduras ricas en carotenos, vitamina C o vitamina E reduce el riesgo de EM (Ghadirian, Jain y cols. 1998; Zhang, Hernán y cols. 2001).

III.HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

El estudio del metabolismo de los lípidos es importante en muchos procesos biológicos, y sus alteraciones están asociadas a enfermedades de alta prevalencia. Por ello, nos planteamos valorar la utilidad de la tecnología MALDI-TOF para realizar lipidómica cuantitativa, y compararla con otras tecnologías más extendidas en lipidómica cuantitativa, como es LC-MS/MS-ESI.

Por otro lado, la EM es una enfermedad neurodegenerativa donde se observa una destrucción primaria de la mielina, afectando a la conducción nerviosa. El metabolismo lipídico es de gran trascendencia para un buen funcionamiento del SNC, por lo que planteamos que la EM cursa con alteraciones en la composición lipídica del SNC, y que este fenómeno puede ser paliado por el tratamiento con ácido elágico.

Por último, nuestra hipótesis es que una vez identificados los lípidos clave relacionados con el avance de la enfermedad, la cuantificación de estas moléculas en LCR de pacientes podría ser de utilidad en el diagnóstico y en el pronóstico de la misma.

Los objetivos del presente trabajo son:

Primero. Optimizar y validar la metodología de espectrometría de masas por MALDI-TOF para identificar y cuantificar especies lipídicas en diferentes muestras biológicas.

Segundo. Estudiar la composición de lípidos de la corteza cerebral y de la médula espinal en ratas con encefalomiелitis autoinmune experimental (EAE).

Tercero. Analizar la efectividad del tratamiento con el polifenol ácido elágico en la EAE.

Cuarto. Valorar la utilidad de la cuantificación de especies lipídicas en LCR como biomarcador en la esclerosis múltiple.

IV. MATERIALES Y MÉTODOS

1. Materiales

Material	Proveedor	Referencia
<i>Estándares</i>		
Heptadecanoato de colesterol (CE 17:0)	Nu-Chek Prep	CH-816
Triheptadecanoin (TG 51:0)	Nu-Chek Prep	T-155
Ácido heptadecanoico (FA 17:0)	Nu-Chek Prep	N-17-A
1,2-dimiristoleil-sn-glicero-3-fosfolina (PC 28:2)	Avanti Polar Lipids	850346
1,2-dipalmitoleil-sn-glicero-3-fosfoetanolamina (PE 32:2)	Avanti Polar Lipids	850706
1-heptadecanoil-2-hidroxi-sn-glicero-fosfolina (LPC 17:0)	Avanti Polar Lipids	855676
N-dodecanoil-esfingosilfosforilcolina (SM 30:1)	Avanti Polar Lipids	Im2312
N-dodecanoil-sulfátido (S 30:1)	Matreya	1938
N-nonadecanoil-D-eritro-esfingosina (Cer 37:1)	Matreya	2039
N-heptadecanoil-D-eritro-esfingosina (DhCer35:1)	Matreya	2038
N-pentadecanoil-psicosina (HexCer 33:1)	Matreya	1335
N-heptadecanoil-lactosilceramida (LacCer 35:1)	Matreya	1538
Mix Ácidos Grasos	Nu-Chek Prep	GLC-462
1-O-octadecilglicerol (Alcohol Batílico)	Sigma-Aldrich	B-402
<i>Reactivos</i>		
9-Aminoacridina (9-AA)	Sigma-Aldrich	92817
Isooctano	Merck-Millipore	1047272500
2-propanol (Isopropanol)	Merck-Millipore	1002722500
Acetona	Merck-Millipore	1000132500
Diclorometano	Merck-Millipore	1060502500
Cloroformo	Merck-Millipore	1070242500
Acetato de sodio	Sigma-Aldrich	73594
Formiato amónico	Sigma-Aldrich	70221
Aminopropil sílica (Discovery DSC-NH ₂)	Sigma-Aldrich	52640-U
Ácido Elágico	Alfa Aesar, Thermo Fisher	A15722
Urolitina A	Sigma-Aldrich	SML1791
Urolitina B	Sigma-Aldrich	SML1649
³ H-palmitato	Perkin-Elmer	NET043005MC
Líquido Centelleo (Ultima-FLO)	Perkin-Elmer	6013579

Piruvato sódico	Thermo Fisher	11360039
L-Glutamina	Thermo Fisher	25030032

Material cromatografía

Columna Kinetex-HILIC (2.6 μ m, 100×4.6 mm)	Phenomenex	00D-4461-E0
Columna Kinetex C18 (1.7 μ m, 100x2.1 mm)	Phenomenex	00D-4726-AN
Columna J&W HP-INNOWAX (0.20 μ m, 25×0.20 mm)	Agilent	19091N-102I

Valoración proteína

Ensayo del ácido bicínico (BCA)	Thermo Fisher	23227
---------------------------------	---------------	-------

Modelo experimental EAE

Adyuvante completo de Freund (CFA)	Difco	11824071
Mycobacterium tuberculosis (cepa H37RA)	Difco	10218823
Inhibidor de proteasas	Pierce Biotechnology	87786

Material inmunohistoquímica

Anticuerpo Anti-CD3	Sigma-Aldrich	C7930
Anticuerpo Anti-Iba1	Wako Chemicals GmbH	012-26723

Western-blot

Membranas de nitrocelulosa	GE Millipore Corp	IPSN07852
Dodecilsulfato sódico	Sigma-Aldrich	L3771
Anti-MBP	Abcam plc	ab7349
Anti- β -actina	Santa Cruz Biotech.	sc-69879
Anticuerpos secundarios IRDye 800CW	Li-Cor	926-32219
Anticuerpos secundarios IRDye 680LT	Li-Cor	926-68029

Cultivos celulares

Medio HAM'S F12	Life Tech. Corp.	21765029
Medio DMEM	Life Tech. Corp.	41965039

RT-PCR cuantitativa a tiempo real

TRI Reagent	Molecular Research Center	TR 118
PrimeScript RT	Takara Bio	RR037B
SYBR Green I Master	Roche	04707516001

2. Modelo experimental de encefalomiелitis autoinmune experimental (EAE) y tratamiento con ácido elágico

Los protocolos experimentales fueron aprobados por el Comité de Ética de Investigación y Experimentación Animal de la Universidad de Alcalá (Madrid, España). Las ratas hembra Lewis de ocho semanas de edad fueron adquiridas de Harlan Interfauna Ibérica, S.L. (Barcelona, España). Las ratas fueron alojadas bajo condiciones controladas estándar de luz y clima con acceso libre a agua y comida. Se tomaron grandes cuidados para minimizar el sufrimiento animal y reducir el número de animales usados.

Un total de 48 ratas hembra Lewis fueron usadas en este estudio. Las ratas fueron divididas en cuatro grupos experimentales: ratas control, ratas control tratadas con ácido elágico (control+elágico), ratas con EAE y ratas con EAE tratadas con ácido elágico (EAE+elágico) (**Figura 17**). Para la inducción de la EAE, las ratas fueron ligeramente narcotizadas con halotano e inmunizadas mediante inyección en las almohadillas del miembro posterior de un extracto de médula espinal de cobaya (GPSC) a una concentración final de 290 mg/mL en tampón PBS con un volumen igual de adyuvante completo de Freund (CFA), conteniendo 11 mg/mL de *Mycobacterium tuberculosis* (cepa H37RA) en un volumen final de 100 μ L (Feurer, Prentice y cols. 1985). Las ratas controles fueron inyectadas sólo con PBS/CFA, sin GPSC (Matsumoto, Kawai y cols. 1990; Aguado-Llera, Puebla-Jiménez y cols. 2011). El ácido elágico fue disuelto en agua a 10 mg/Kg/día y administrado únicamente en el agua de beber dos días antes de la inmunización y hasta el final del experimento. Las ratas control recibieron agua. Los animales fueron pesados y se monitorizó diariamente el consumo de comida y agua así como los signos clínicos de la enfermedad usando el siguiente criterio: 0, sin signos clínicos; 0.5, cola flácida distal; 1, cola flácida; 2, cola flácida y debilidad en patas traseras; 3, cola flácida y parálisis completa de patas traseras; y 4, cola flácida, parálisis completa en patas traseras e incontinencia (Gold, Schroder y cols. 1997). Se sacrificaron cinco o seis ratas de cada grupo en el día 11-12 después de la inducción en el primer brote, y en el día 17-18 después de la inducción, en la fase de remisión. Las muestras de sangre fueron extraídas mediante punción intracardiaca. Los cerebros de las ratas sacrificadas fueron separados en las diferentes regiones del cerebro en hielo, los tejidos (corteza cerebral y médula espinal) se congelaron en nitrógeno líquido para su almacenamiento a -80°C hasta su utilización.

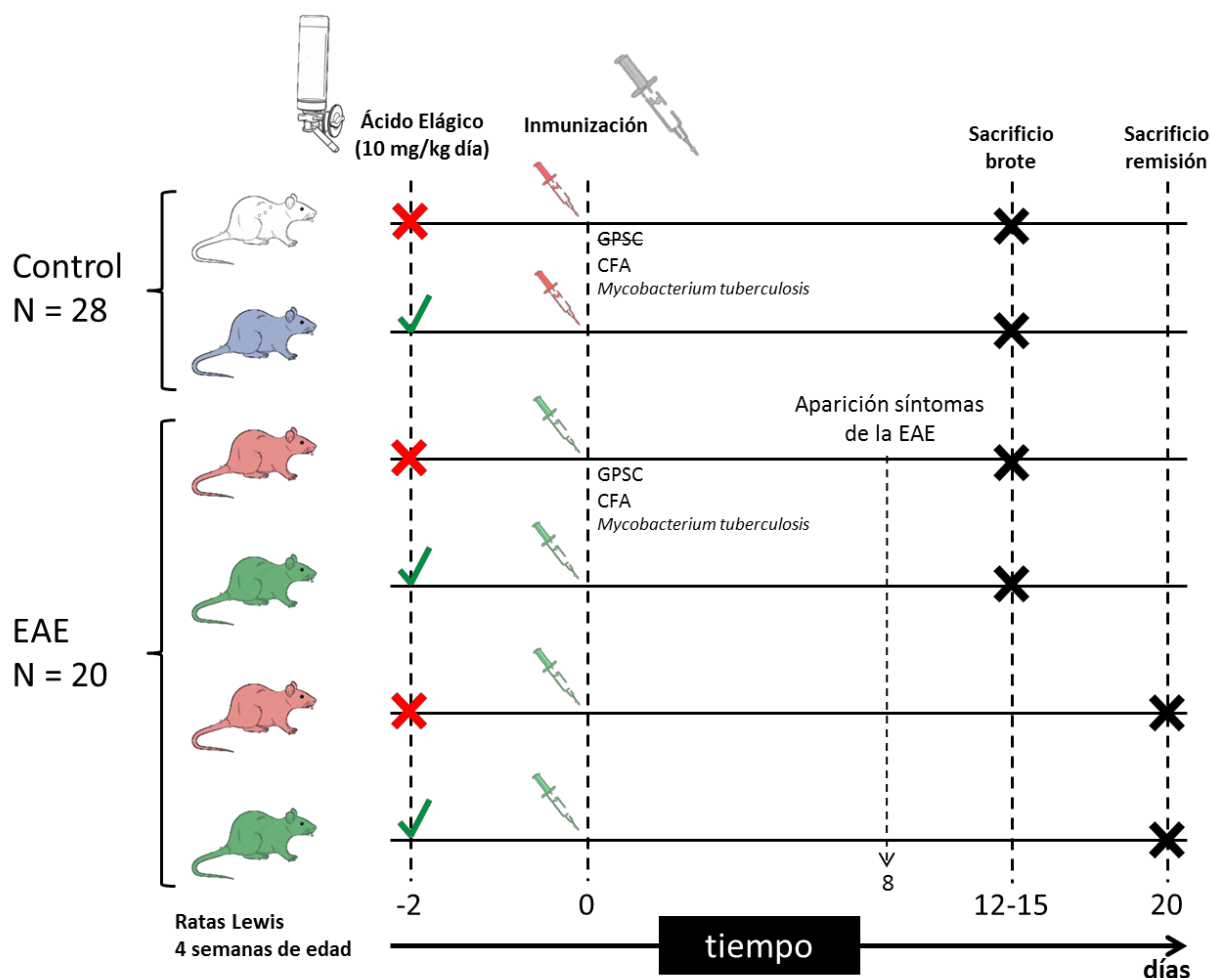


Figura 17. Inducción de la EAE en ratas Lewis y tratamiento con el ácido elágico. El ácido elágico se administró en el agua de beber dos días antes de la inmunización, y las ratas que no recibieron tratamiento bebieron agua simple durante todo el estudio. Las ratas EAE fueron inyectadas con un extracto de médula espinal de cobaya (GPSC) y adyuvante completo de Freund (CFA), que contenía *Mycobacterium tuberculosis* (cepa H37RA). Los controles fueron inyectados sólo con CFA, sin GPSC.

3. Pacientes con esclerosis múltiple

El estudio fue autorizado por el comité ético del Hospital Universitario Ramón y Cajal y se obtuvo el consentimiento expreso de cada paciente previa a la obtención de la muestra. Para el estudio se reclutaron un total de 61 pacientes del Servicio de Inmunología del Hospital Ramón y Cajal (Madrid). De los pacientes reclutados, 40 son pacientes diagnosticados de EM remitente-recurrente (RR) (**Tabla 6**). El resto de los pacientes fueron controles que presentaban síntomas neurológicos- como déficit de vitamina B1, mielopatía, ictus, disfunción del sistema nervioso

autónomo, pseudotumor cerebral, hidrocefalia arreactiva, epilepsia o neuritis óptica- a los que se les descartó un diagnóstico de EM. Se obtuvo LCR mediante punción de la médula espinal durante un examen de rutina y se almacenaron a -20°C hasta el momento del estudio. Los LCR se extrajeron en el momento en el que los pacientes estaban en remisión de los síntomas, excepto 3 pacientes de EM en los que se les extrajo el LCR en el momento del brote, que fueron finalmente excluidos del estudio. Se realizó un análisis de bandas oligoclonales IgG (BOCG) e IgM (BOCM) en el LCR mediante isoelectroenfoque e inmunotransferencia, de los cuales 29 pacientes con EM y 6 controles tenían BOCG y 14 pacientes y 3 controles obtuvieron un estudio positivo BOCM, a los que se les determinó el grupo de lípidos a los que eran reactivos mediante isoelectroenfoque e inmunotransferencia, observándose una reactividad mayoritaria a los grupos fosfatidilcolina, esfingomielina, gangliósido o sulfátido, y sus combinaciones.

Tabla 6. Datos demográficos de pacientes control y pacientes con EM. Datos de los pacientes incluidos en el estudio. IgG e IgM es el estudio de bandas oligoclonales que se realizó al total de los pacientes del estudio, dividiendo en los que presentaban (+) y los que no (-). Los datos se representan como el número absoluto de casos de cada grupo y entre paréntesis el porcentaje por sexo, IgG e IgM, y en la edad el rango de edad mínima y máxima.

		Control (n=21)	EM (n=37)
Sexo	<i>Mujer</i>	15 (71%)	25 (68%)
	<i>Hombre</i>	6 (29%)	12 (32%)
Edad		42.4 (32.8-50.2)	47.7 (29.2-56.3)
IgG	+	6 (29%)	29 (78%)
	-	15 (71%)	8 (22%)
IgM	+	3 (14%)	14 (38%)
	-	18 (86%)	23 (62%)

4. Aislamiento de lipoproteínas del plasma

La sangre (10 mL) de 10 sujetos sanos normolipidémicos (5 mujeres y 5 hombres) se extrajo por flebotomía después de 12 horas de ayuno, en tubos que contenían 1g/L de K₃EDTA como anticoagulante. El plasma fue separado de los eritrocitos por centrifugación (1900x g, 15 min, 4°C) y congelado a -80°C hasta su uso. Las lipoproteínas de muy baja, baja y alta densidad: VLDL (d<1.006 kg/L), LDL (d=1.006-1.063 kg/L) y HDL (d=1.063-1.210 kg/L) fueron aisladas

a partir de 2 mL de plasma por ultracentrifugación secuencial en un rotor Beckman 50.2 Ti, como se ha descrito previamente (Montelongo, Lasuncion y cols. 1992).

5. Extracción de los lípidos

Los lípidos del plasma y de las lipoproteínas del plasma se extrajeron siguiendo el método de Folch, con pequeñas modificaciones (Folch, Lees y cols. 1957). De forma breve, 200 μ L de plasma fueron mezclados vigorosamente durante 2 horas, con 300 μ L de solución 0.88% de cloruro sódico y 2 mL de cloroformo/metanol (2:1). Después de centrifugar (1900x g, 5 min, 4°C), la fase inferior fue extraída con una pipeta Pasteur y lavada con 1 mL de metanol/agua (1:1). Después de agitar durante 2 minutos y centrifugar (1900x g, 5 min, 4°C), la fase inferior fue colectada en un nuevo tubo y evaporado bajo corriente de nitrógeno. Para las lipoproteínas HDL, LDL y VLDL, 500 μ L de la correspondiente fracción de lipoproteína fue extraída directamente sin la adición de salino siguiendo el mismo protocolo.

La extracción de lípidos de la corteza cerebral y de la médula espinal de las ratas se realizó partiendo de 500 μ g de proteína del lisado de los tejidos, valorado mediante el ensayo del ácido bicontínico (BCA), completando hasta el volumen hasta 500 μ L con solución 0.88% de cloruro sódico. Los tejidos de las ratas se homogeneizaron en tampón de lisis (50 mM Tris-HCl pH 7.5, 125 mM NaCl, 5 mM NaF, 1.4 mM $\text{Na}_4\text{O}_7\text{P}_2$, 1mM Na_3VO_4) e inhibidor de proteasas, con una homogeneizador Polytron (setting 5, 15 s), y posteriormente se centrifugaron (600x g, 5 min, 4°C). Para la extracción de lípidos del líquido cefalorraquídeo (LCR) se emplearon 400 μ L, completando hasta un volumen de 500 μ L con solución 0.88% cloruro sódico. Se realizó la extracción de lípidos como se ha descrito anteriormente.

Cuando la cuantificación de las clases lipídicas se realizó por HPLC-ELSD, como se describe en el apartado de **MÉTODOS 8**, previamente a la extracción se añadieron a las muestras 20 μ L de alcohol batílico (1 μ g/mL en cloroformo) como estándar interno (IS) para corregir las pérdidas durante la extracción. Cuando se realizaba análisis lipidómicos, se añadieron 50 μ L de IS para la cuantificación de las especies individuales de lípidos de cada clase, que contenía 400 pmol/ μ L PC 28:2, 100 pmol/ μ L PE 32:2, 400 pmol/ μ L TG 51:0, 400 pmol/ μ L SM 30:1, 200 pmol/ μ L LPC 17:0, 600 fmol/ μ L S 30:1, 5 pmol/ μ L PI 37:4, 100 pmol/ μ L Cer 37:1, 100 pmol/ μ L DhCer 35:1, 100 pmol/ μ L HexCer 33:1 y 100 pmol/ μ L LacCer 35:1.

6. Metanolisis del extracto lipídico para análisis de esfingolípidos

Tras la extracción de lípidos por el método de Folch de los tejidos y el LCR, se realizó una metanolisis para el análisis de esfingolípidos por LC-MS/MS (Jiang, Cheng y cols. 2007). Brevemente, el extracto total de lípidos es evaporado en corriente de nitrógeno y se incuba 1 h a 37°C con 650 µL de metanol y 25 µL de hidróxido potásico (50% w/w). Se añaden 50 µL de ácido acético 4.5M y 200 µL de agua, ajustando el pH a 5-7. Una vez ajustado el pH, se completa con agua hasta los 500 µL y se añade 1325 µL de cloroformo, y tras dejar mezclar durante 30 min, se centrifuga (1900x g, 5min, 4°C) para extraer la fase orgánica. La fase acuosa se reextrae con 1500 µL de cloroformo y, después de centrifugar (1900x g, 5 min, 4°C), la fase orgánica fue colectada a un tubo que contiene el extracto del primer paso. El extracto resultante se analiza mediante LC-MS/MS, como se describe en el apartado de **MÉTODOS 10**.

7. Aislamiento de clases lipídicas por extracción en fase sólida

En alguno de los estudios fue necesario realizar el aislamiento de clases lipídicas empleando extracción en fase sólida (SPE). Para ello, se emplearon columnas de 3 mL rellenas con 500 mg de aminopropil sílica. La separación de lípidos neutros (TG y CE), ácidos grasos no esterificados y fosfolípidos (PE, LPC, PI, PC y SPM), se realiza siguiendo un protocolo descrito previamente (Agren, Julkunen y cols. 1992). Brevemente, se acondiciona la columna añadiendo 1000 µL de hexano, seguido de 1000 µL de cloroformo/isopropanol (2:1), evitando durante todo el proceso el secado de la columna. Tras cargar el extracto lipídico disuelto en 100 µL de cloroformo, se colectan secuencialmente las distintas fracciones de lípidos mediante la adición de 1000 µL de cloroformo/isopropanol (2:1) para la extracción de lípidos neutros, seguido de 1000 µL de acético 2% en éter etílico para los ácidos grasos no esterificados. Por último, se extraen los fosfolípidos mediante la adición de 1500 µL de metanol.

8. Análisis de las clases lipídicas por HPLC-ELSD

Los extractos lipídicos, a los que previamente se les añadieron 20 µL de alcohol batílico (1 µg/mL en cloroformo) como estándar interno (IS) para corregir las pérdidas durante el procedimiento de extracción de lípidos, se separaron por HPLC (1260 LC, Agilent) y las

diferentes clases de lípido fueron detectadas por medio de un detector ELSD (Chamorro, García-Cano y cols. 2013). Se realizó una cromatografía en fase normal empleando una columna Kinetex-HILIC, que se mantuvo a 60°C durante todo el análisis. Las clases de lípido se separaron a un flujo constante de 1.5 mL/min mediante la programación de un gradiente cuaternario formado por las siguientes fases móviles: A) isooctano/tetrahidrofurano (99:1); B) acetona/diclorometano (4:1); C) isopropanol/cloroformo (4:1); D) isopropanol/agua (1:1), que contiene ácido acético (10 mM), etanolamina (5 mM) y trietilamina (5 mM), a pH=5. Las condiciones del detector ELSD fueron fijadas según los siguientes parámetros: ganancia de 4, tubo de deriva de temperatura de 45° y presión interna de nitrógeno a 3.0 bar.

Los extractos lipídicos secos de plasma y lipoproteínas fueron disueltos en 100 µL de cloroformo antes de inyectar en HPLC-ELSD, y se inyectaron 5 µL para la cuantificación de clases, seguido por dos inyecciones consecutivas de 30 µL para la colección de fracciones. La colección de fracciones lipídicas se realizó mediante una división del flujo saliente de la columna a 1:15, con la ayuda de un splitter post-columna (ASI, modelo 6000-PO10-06).

La obtención de la concentración de cada una de las clases de lípido en las muestras se realizó mediante interpolación del área de cada pico en curvas patrón obtenidas a partir de diluciones de estándares para cada clase de lípido (Chamorro, García-Cano y cols. 2013).

9. Análisis de las clases y especies lipídicas por MALDI-TOF

Las fracciones de lípidos del plasma y las lipoproteínas, obtenidas usando HPLC-ELSD, fueron evaporadas en corriente de nitrógeno. Las fracciones de PC y LPC fueron disueltas en 2000 µL de isopropanol/acetonitrilo (60/40). Las fracciones de PI, PE y SPM fueron disueltas en 60 µL de isopropanol/acetonitrilo (60/40), y la fracción de TG en 200 µL de cloroformo. Las fracciones reconstituidas fueron mezcladas con un ratio 1:1 con una disolución de 9-aminoacridina (9AA) de 10 mg/mL en isopropanol/acetonitrilo (60/40). Para las fracciones de TG se añadió acetato sódico 15 mM en la disolución de 9-AA.

La mezcla de matriz-fracción fue depositada (0.65 µL) en una placa MALDI 384 well-plate, y se adquirió el espectro de masa en un espectrómetro MALDI-TOF (Autoflex III, Bruker). La resolución del espectrómetro de masas en el rango de m/z de 500-1000 fue superior a 10,000 FWHM, con una exactitud de masa de 5 ppm en el mismo rango. El espectro fue adquirido en el modo positivo o negativo promediando 2000 disparos láser consecutivos (100

disparos por zona con un total de 20 adquisiciones subespectrales), empleando el modo reflector en las adquisiciones.

La calibración de la masa fue realizada antes de cada adquisición usando una mezcla de glicerofosfatidilcolinas (PC 26:0, PC 28:2, PC 30:0, PC 34:0, PC 36:0) adquirida en el modo positivo, y una mezcla de glicerofosfatidiletanolaminas (PE 30:0, PE 32:2, PE 32:0, PE 34:0, PE 36:0) en el modo negativo. La potencia del láser se estableció entre 60-80% de su potencia máxima durante las adquisiciones.

Para el análisis de masas en tandem (MS/MS), los espectros fueron adquiridos en modo positivo (LPC, SM, PC, TG) y modo negativo (PI, PE, S), usando una celda de colisión (CID), con argón a presión de 4 bar para inducir la fragmentación. Se adquirió la suma de 500 disparos láser (100 disparos con un total de 5 adquisiciones subespectrales). Los voltajes de las dos fuentes de iones fueron 6.01 y 5.31 kV, reflector a 27.07 y 11.93 kV y voltajes de fragmentación de 19.04 y 4.71 kV. Los picos de iones con una relación S/N>5 se consideraron fragmentos lipídicos.

10. Análisis LC-MS/MS del extracto lipídico

Los lípidos de los extractos de tejido (corteza cerebral y médula espinal) fueron separados cromatográficamente empleando una columna Kinetex C18 mantenida a 55°C. Se realizó un gradiente binario de fase A (60% acetonitrilo en agua, 10 mM formiato amónico) en B (90% isopropanol en acetonitrilo, 10 mM formato amónico) de 60% de A a 100% de B en 12 min, con 8 minutos adicionales de re-equilibrado para condiciones iniciales, a un flujo de 0.4 mL/min. La detección y análisis de las especies lipídicas se realizó en un QTrap 4000 (ABSciex). Se utilizó nitrógeno como gas secante a una temperatura de 500°C. El volumen de inyección empleado para fosfolípidos y lípidos neutros fue de 5 µL y para el análisis de esfingolípidos fueron necesarios 10 µL.

Las especies de lípidos fueron identificadas según su tiempo de retención cromatográfico y su patrón de fragmentación MS/MS (**Tabla 7**) (Christie y Han 2010). Mediante ionización electrospray (ESI) en modo positivo, las especies de PC y LPC fueron detectadas como iones moleculares protonados y realizando experimentos de ion precursor (PIS) siguiendo la pérdida de la cabeza de grupo fosfocolina de m/z 184. La PE fue detectada en modo positivo siguiendo la pérdida de un fragmento neutro (NLS) de m/z 141 de iones $[M+H-141]^+$, correspondiente a la

fosfoetanolamina. Los TG fueron detectados mediante NLS a m/z 299, que conduce a la formación de iones $[M+H-299]^+$, por lo que nuestro análisis sólo cubre las especies de TG que contienen ácido oleico (FA 18:1).

El análisis de esfingolípidos se realizó usando las mismas condiciones cromatográficas, después de realizar una hidrólisis alcalina de las especies de glicerofosfolípido en el extracto lipídico con hidróxido potásico metanólico, como se describe en el apartado de **MÉTODOS 4** (Jiang, Cheng y cols. 2007). Las especies de SM fueron detectadas de forma similar a las especies de PC, mientras que Cer, HexCer y LacCer fueron detectadas mediante experimentos NLS a m/z 264, por lo que sólo se analizaron las especies derivadas de esfingosina (d18:1). Finalmente, los Sulf fueron analizados en el modo positivo mediante experimentos NLS siguiendo la pérdida del fragmento m/z 97, correspondiente a la pérdida de un ión sulfato.

Tabla 7. Condiciones de análisis MS para cada grupo lipídico estudiado mediante LC-MS/MS. LC-MS/MS: cromatografía líquida con detector de espectrometría de masas; HPLC-ELSD: cromatografía líquida de alta presión con detector de dispersión de luz evaporativa; PIS: método de ión precursor; NLS: método de pérdida de neutro. PI y PS se analizaron mediante infusión directa al espectrómetro de masas.

Clase	Técnica	Experimento	Modo	Fragmento estudiado	m/z
PC	LC-MS/MS	PIS	Positivo	Fosfocolina	184
LPC	LC-MS/MS	PIS	Positivo	Fosfocolina	184
PE	LC-MS/MS	NLS	Positivo	Fosfoetanolamina	141
TG	LC-MS/MS	NLS	Positivo	Monooleilglicérido	299
SM	LC-MS/MS	PIS	Positivo	Fosfocolina	184
Cer	LC-MS/MS	NLS	Positivo	Esfingosina	264
HexCer	LC-MS/MS	NLS	Positivo	Esfingosina	264
LacCer	LC-MS/MS	NLS	Positivo	Esfingosina	264
PI	MS/MS	PIS	Negativo	Fosfoinositol	241
PS	MS/MS	NLS	Positivo	Fosfoserina	185
Sulf	LC-MS/MS	NLS	Positivo	Sulfato	97

Los análisis de especies lipídicas de PI y PS se realizaron por infusión directa de los extractos lipídicos (Han, Yang y cols. 2012). Primero, el extracto de lípido total fue separado en fracciones que contienen las especies de interés mediante HPLC-ELSD, como se ha descrito en el apartado de **MÉTODOS 8**. Segundo, las fracciones de lípido fueron evaporadas y disueltas en

cloroformo/metanol (1:1) con 5 mM de formato amónico a una concentración final de 10-50 pmol de lípido total/ μ L e inyectado a un flujo de 10 μ L/min en el espectrómetro de masas. Las especies de PS fueron detectadas mediante NLS a m/z 185 en modo positivo y las especies de PI fueron analizadas mediante experimentos PIS en modo negativo siguiendo el fragmento m/z 241. Se empleó un período promedio de señal de dos minutos en cada espectro de MS/MS.

Para el análisis lipidómico mediante LC-MS/MS de los extractos de LCR, únicamente se analizaron los grupos Cer, HexCer y Sulf, después de la metanolisis de glicerofosfolípidos con hidróxido potásico metanólico y bajo las mismas condiciones experimentales de cromatografía y MS empleadas para analizar los tejidos de los animales.

11. Análisis de la composición de ácidos grasos de ésteres de colesterol mediante GC-MS

El perfil de ácidos grasos de las fracciones de CE fue obtenido empleando GC-MS (Casado, Pastor y cols. 2013). Brevemente, las fracciones de CE, separadas mediante HPLC-ELSD acoplado a un colector de fracciones, como se ha descrito en el apartado de **MÉTODOS 8**, fueron mezcladas con 40 μ g/mL del ácido graso FA 23:0 (ácido tricosanoico) como IS y secado bajo atmósfera de nitrógeno. Después, los extractos fueron transesterificados a 80°C durante 2 h con cloruro de acetilo en metanol (1:20) y extraído dos veces con hexano (1 mL). Los extractos combinados de hexano fueron evaporados, disueltos en 500 μ L de hexano, y se inyectaron 0.2 μ L, en modo sin split, en un cromatógrafo de gases (Agilent 6890N GC) con un detector de masas (Agilent 5975 MS) y en una columna capilar HP-INNOWAX (25m x 0.2mm x 0.2 μ m).

12. Procesamiento de los datos de lipidómica

Como en otras disciplinas “-ómicas”, el análisis es fundamental para la comprensión de los datos lipidómicos. Los experimentos de lipidómica generan gran cantidad de información tanto en la fase previa de análisis o de procesamiento como en la fase de análisis estadístico que conduce a la interpretación de los resultados. La fase de procesamiento implica la aplicación de diferentes rutinas informáticas, que son aplicadas a los espectros de masas para garantizar la calidad de los mismos (**Figura 18**). En el caso de los espectros procedentes de los experimentos

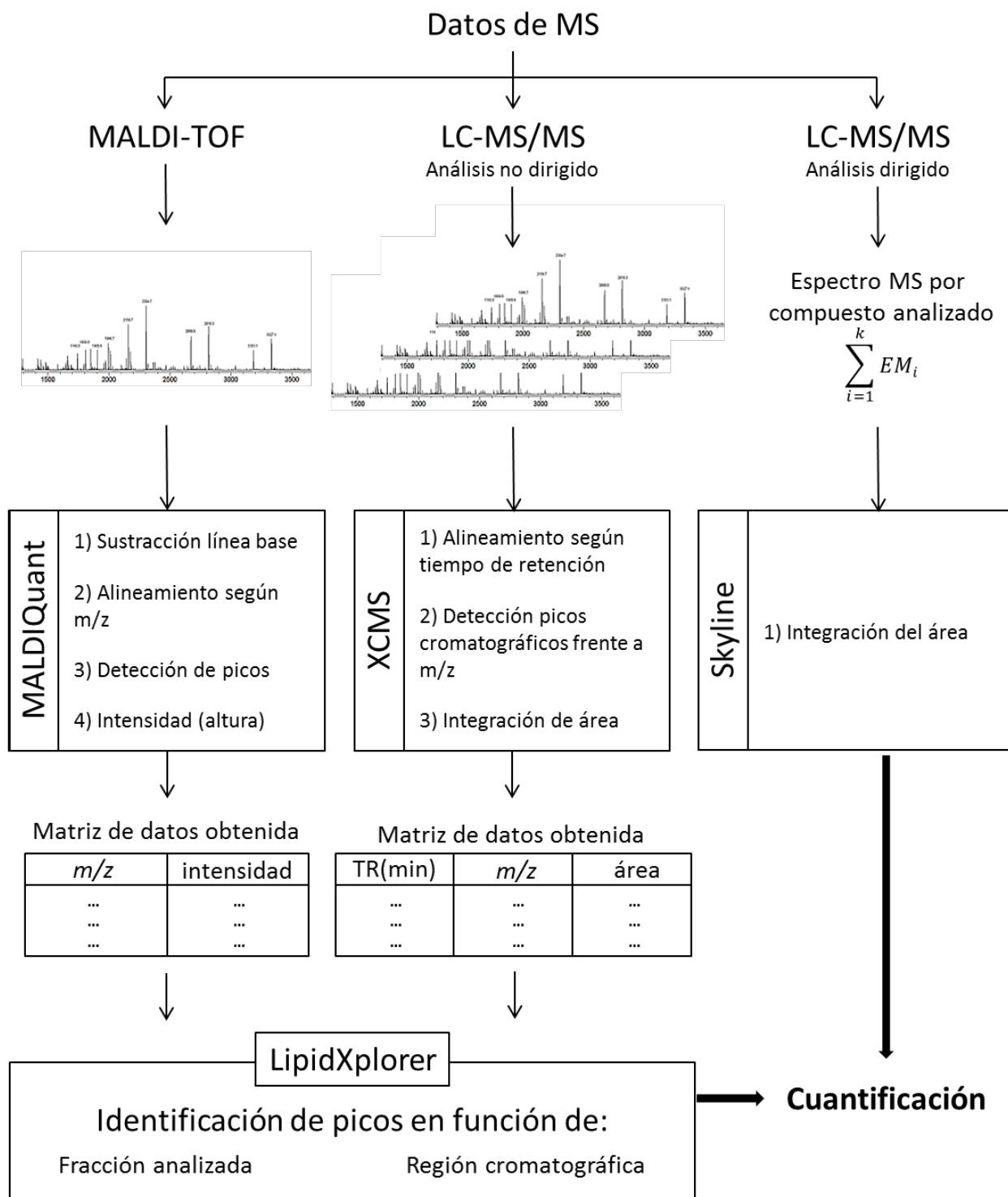


Figura 18. Esquema de procesamiento de espectros de masas. Resumen del flujo de trabajo que se realiza para el procesamiento de los espectros de masas hasta obtener datos de cuantificación para cada una de las especies observadas, según el espectro de masas utilizado en el experimento y la aproximación metodológica empleada. TR: tiempo de retención.

MALDI-TOF, la fase de procesamiento incluye diferentes rutinas: sustracción de línea base, suavizado, alineamiento de las señales de m/z para cada muestra (para evitar la deriva de masa entre los espectros de las distintas muestras), y detección de los picos de interés fijando un determinado umbral de señal/ruido (S/N). Finalmente se obtiene una matriz de dos entradas que relaciona las señales m/z con las intensidades de señal para cada una de las muestras analizadas. En este trabajo, hemos empleado el paquete de rutinas MALDIquant (versión 1.8) (Gibb y Strimmer 2012) incluidas en el software estadístico R (<http://www.r-project.org>, versión 3.0.2). Este software está originalmente pensado para el análisis de datos proteómicos (Tammen y Hess 2018), por lo que fue preciso realizar una adaptación de los ficheros (“scripts”) para analizar nuestros experimentos.

En el caso de los experimentos LC-MS/MS **no dirigidos** (“*untargeted*”) (Figura 19), los espectros de masas se generan a lo largo de la cromatografía en función de la velocidad de

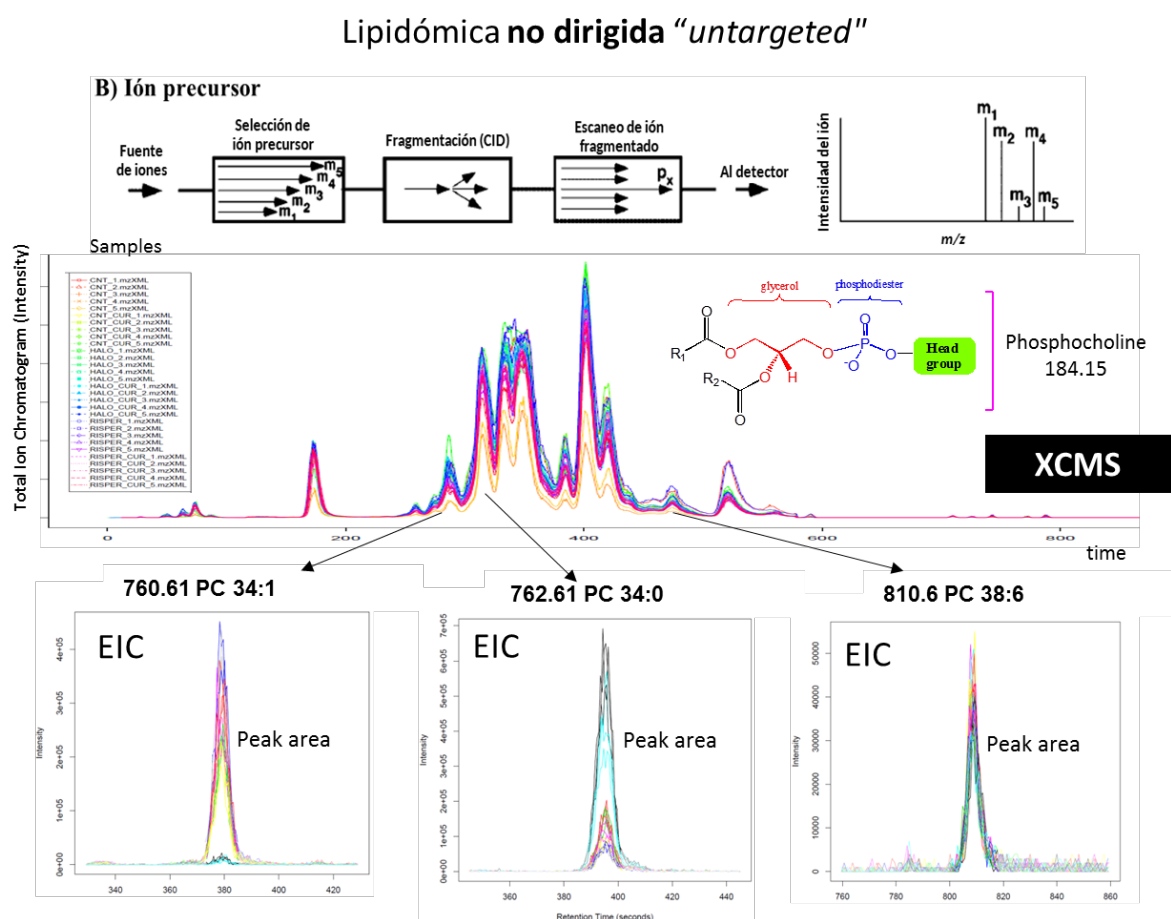


Figura 19. Procesado de espectros MS de lipidómica no dirigida mediante XCMS. Las señales m/z de cada pico cromatográfico se integran y alinean entre las diferentes muestras, obteniéndose una matriz que relaciona el área del pico con su relación m/z y su tiempo de retención para cada muestra analizada. La identificación de especies se realiza empleando LipidXplorer. EIC: *Extrated ion chromatogram*.

adquisición del instrumento. El espectrómetro fue programado para generar un espectro cada dos segundos, lo que resulta en aproximadamente 600 espectros de masa por experimento. Las señales m/z que definen cada pico cromatográfico deben integrarse y alinearse entre las diferentes muestras. Se obtiene una matriz que relaciona el área del pico que dibuja cada señal m/z en el tiempo con su tiempo de retención (correctamente alineado) para cada muestra analizada. En este trabajo se adaptó el paquete de software XCMS (versión 1.44), incluida en R, para analizar los datos lipidómicos (Tautenhahn, Patti y cols. 2012). En los análisis no dirigidos (MALDI-TOF y LC-MS/MS), la identificación de las especies de lípido y el deisotopado-corrección de las intensidades para tener en cuenta la proporción de ^{13}C presente en las moléculas (Herzog, Schuhmann y cols. 2012)- se realiza a partir de las matrices de datos mencionadas, emplando el software LipidXplorer (Schwudke, Shevchenko y cols. 2017).

En los análisis lipidómicos **dirigidos** (“*targeted*”) (**Figura 20**) las tareas de procesamiento se simplifican, siendo sólo necesaria la integración de los picos cromatográficos, puesto que

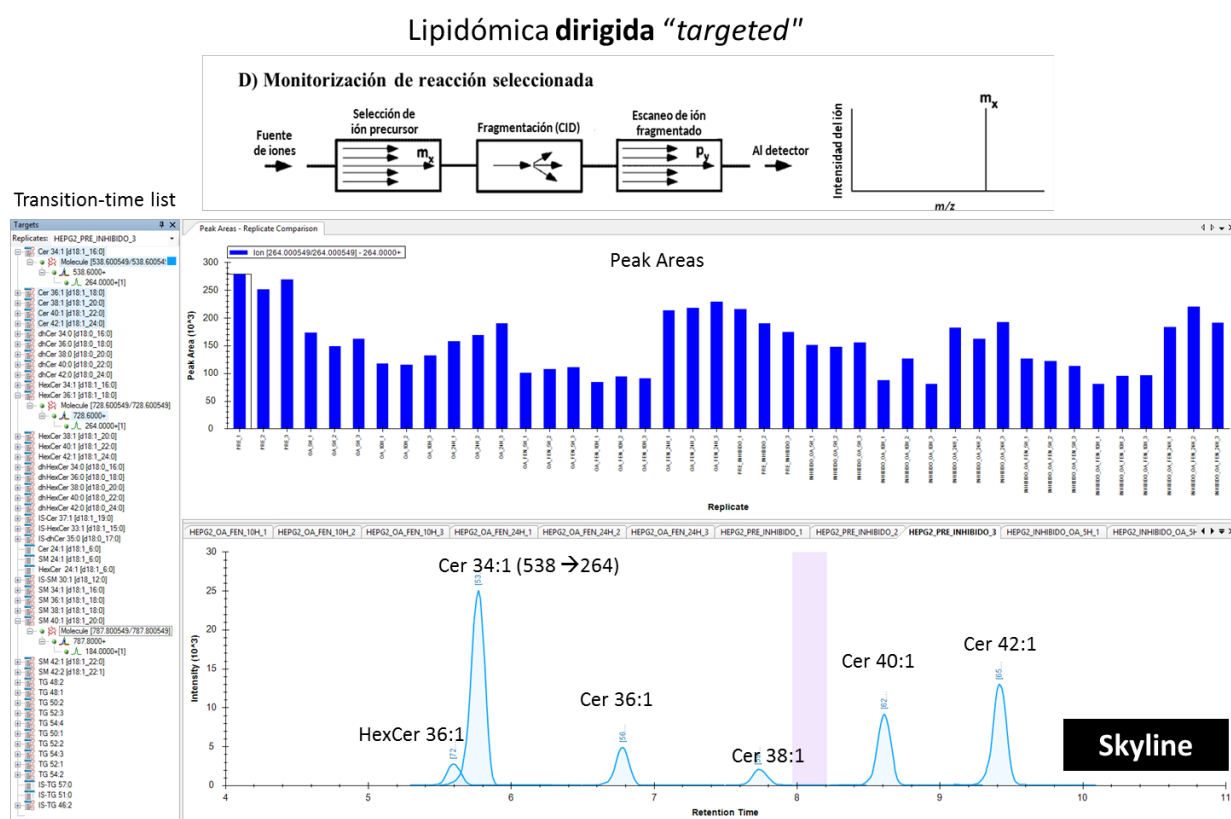


Figura 20. Procesado de espectros MS de lipidómica dirigida mediante Skyline. En los análisis lipidómicos dirigidos se efectúa la integración de los picos cromatográficos y se fijan las transiciones MRM para cada especie lipídica en un tiempo de retención conocido. Para estos experimentos se utilizó el programa de software Skyline.

conocemos *a priori* las especies de lípido que queremos analizar, y fijamos las transiciones MRM para cada especie lipídica en un tiempo de retención conocido. Los experimentos de lipidómica dirigida fueron analizados mediante el programa de software Skyline (MacLean, Tomazela y cols. 2010).

La cuantificación de las especies de lípido perteneciente a una clase i , se realiza multiplicando el factor de respuesta de cada clase, que es la relación entre la concentración y la señal obtenida para el estándar interno de cada clase añadida, por la intensidad (altura de pico en el caso de los espectros MALDI y área del pico en caso de los experimentos LC-MS/MS), según la siguiente fórmula:

$$[A]_i = RF_i * Intensidad_A;$$

$$RF_i = \frac{[IS]_i}{Intensidad_{IS}} * Deriva_A;$$

donde $[A]_i$ representa la concentración de una especie lipídica A de una clase i . RF_i es el factor de respuesta de la clase i y la $Intensidad_A$ es la intensidad o área de pico de la especie A. $[IS]_i$ es la concentración añadida de estándar interno de la clase i . La deriva de la especie ($Deriva_A$) sólo se aplica en el caso de los espectros de MALDI, que es el factor de corrección para cada especie A, que fue calculado como se explica en el apartado de **RESULTADOS 1.1**.

13. Análisis inmunohistoquímico del cerebro

Para el análisis inmunohistoquímico, los animales fueron perfundidos intracardialmente bajo anestesia profunda con 50 mL de solución salina isotónica, seguido por 250 mL de paraformaldehído al 4% en tampón PBS. Posteriormente, los cerebros fueron incluidos en parafina. Para el análisis histológico, una sección de 5 μ L de grosor fue desparafinado y rehidratado para el desenmascaramiento del antígeno usando un tampón de citrato en caliente. Las secciones fueron después bloqueadas en 3% de suero normal de cabra, e incubado con anticuerpo anti-CD3 (1:1000) o anticuerpo anti-Iba1 (1:1500) toda la noche. El UltraVision™ Quanto HRP DAB (Thermo Fisher Scientific) fue utilizado para visualizar los linfocitos T CD3 positivo y las células de la microglía Iba1 positivas. Después de la reacción, las secciones fueron teñidas con hematoxilina Carazzi. Las secciones fueron fotografiadas con un microscopio Nikon D Eclipse C1.

14. Estudios de expresión de proteínas

La corteza cerebral fue homogeneizada en tampón de lisis (50 mM Tris-HCl pH 7.5, 125 mM NaCl, 1% Nonidet P40, 5 mM NaF, 1.4 mM Na₄O₇P₂, 1mM Na₃VO₄) e inhibidor de proteasas, con una homogeneizador Polytron (setting 5, 15 s), y posteriormente fue centrifugada (600x g, 5 min, 4°C). La valoración de proteínas se realizó usando el ensayo BCA. Los lisados de la corteza total (20-30 µg de proteína total) fueron cargados en geles de poliacrilamida al 12% y sometidos a electroforesis. Una vez realizada la electroforesis, los geles fueron transferidos a membranas de nitrocelulosa. Una vez bloqueadas con caseína (1 g/L) en TBS 1X (10 mM Trizma base pH 7.4 y 0.15 M NaCl), fueron incubados con anticuerpos primarios anti-MBP y anti-β-actina, seguido del conjugado de anticuerpos secundarios IRDye 800CW o IRDye 680LT. Las membranas fueron analizadas usando el Odyssey Infrared Imaging System (LI-COR Bioscience). El análisis densiométrico fue realizando usando el Odyssey Infrared Imaging System V.3.0. (LI-COR Bioscience).

15. Síntesis *de novo* de ceramidas en cultivos celulares

Se cultivaron células C6 de glioma de rata (ATCC® CCL-107TM) en medio HAM'S F12 con L-glutamina suplementado con aminoácidos no esenciales, 10% de suero fetal bovino (FBS) y antibióticos, a 37°C en una atmósfera al 5% de CO₂. El suero deficiente en lipoproteínas (LPDS) fue preparado a partir de medio FBS por ultracentrifugación a densidad de 1.21 kg/L. Las células C6 fueron cultivadas en medio LPDS a un 10% durante 2 h, y después incubadas durante 4 h con ácido elágico (50 µM), urolitina A (50 µM) o urolitina B (50 µM) (**Figura 21**).

La línea celular humana HOG, que se obtuvo quirúrgicamente de un oligodendroglioma humano (Post y Dawson 1992), fueron cedidos por el Dr. Bello-Morales y el Dr. López-Guerrero (Universidad Autónoma de Madrid, UAM), con el consentimiento del Dr. Campagnoni (Universidad de California, UCLA). Las células fueron cultivadas en un medio mínimo esencial de Dulbecco (DMEM) con 10% de FBS, 2 mM L-Glutamina y antibióticos. El medio fue intercambiado 24 h después de la siembra por DMEM/F12 (1:1) suplementado con 2 mM L-Glutamina, 1.1 mM piruvato sódico, 25 µg/mL insulina, 100 µg/mL transferrina, 60 nM putresceína, 20 nM progesterona, 20 nM selenito sódico y 40 nM biotina, y después fue incubado durante 4 h con ácido elágico (50 µM), urolitina A (50 µM) o urolitina B (50 µM)

(Figura 21). Las urolitinas fueron disueltas en dimetilsulfóxido (DMSO: concentración final en el medio de 0.044%). Las células control fueron expuestas únicamente al DMSO.

Simultáneamente al tratamiento con el ácido elágico y las urolitinas, se añadieron 2 $\mu\text{Ci/mL}$ de ^3H -palmitato como trazador radioactivo, acompañado con albúmina de suero bovino (BSA). Al final del período de incubación, las células fueron colectadas y se añadió tampón de lisis (50mM Tris-HCl pH 7.5, 125 mM NaCl, 5 mM NaF, 1.4 mM $\text{Na}_4\text{O}_7\text{P}_2$, 1 mM Na_3VO_4 , 1 mM EDTA) y se sonicó durante 30 segundos. La concentración de proteína fue medida mediante el ensayo BCA.

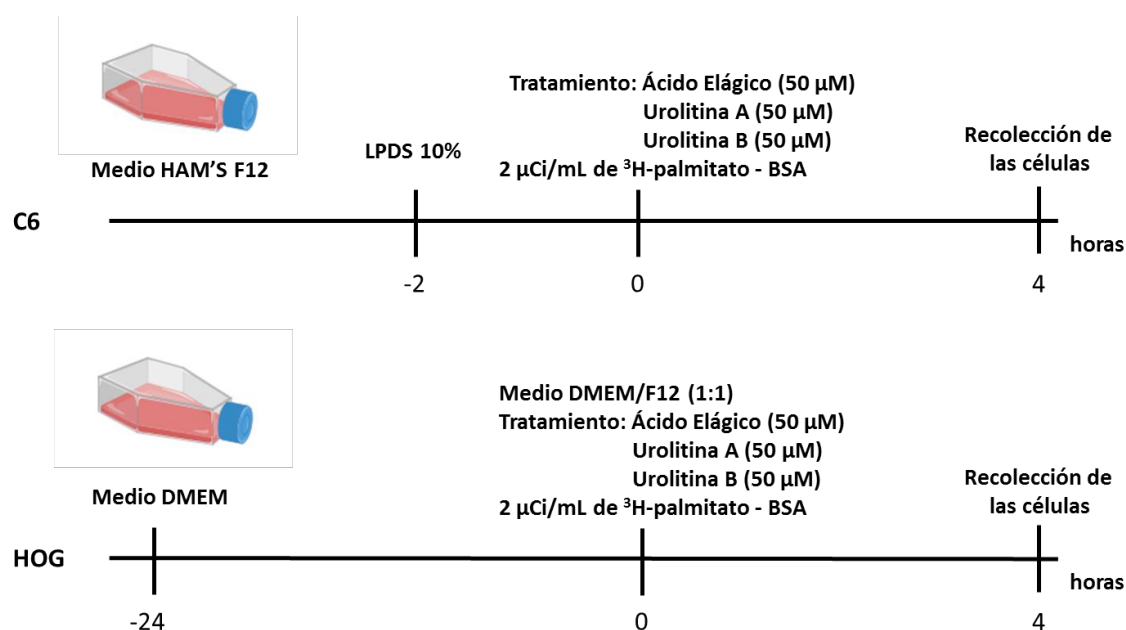


Figura 21. Diseño experimental de la síntesis *de novo* de ceramidas en cultivos celulares. Las líneas celulares C6 y HOG fueron cultivadas en condiciones y medios específicos, y tratadas durante 4 h con ácido elágico (50 μM), urolitina A (50 μM) o urolitina B (50 μM) en presencia de 2 $\mu\text{Ci/mL}$ de ^3H -palmitato. LPDS: suero deficiente en lipoproteínas; BSA: albúmina de suero bovino; DMEM: medio mínimo esencial de Dulbecco.

La síntesis *de novo* de ceramidas fue medida por incorporación de ^3H -palmitato a las ceramidas. Los lípidos totales de las células fueron hidrolizados con hidróxido potásico metanólico y extraídos con solventes orgánicos (cloroformo/metanol, 2:1), el extracto de lípido resultante se secó bajo corriente de nitrógeno y se disolvió en 100 μL de cloroformo. Las clases de ceramidas fueron separadas mediante HPLC-ELSD, como se describe en el apartado de **MÉTODOS 8**, empleando diclorometano en lugar de cloroformo como solvente. La señal de radiación fue monitorizada con un detector de radiación (Berthold LB-503), separando el flujo

de salida que viene de la columna entre los dos detectores a un ratio 1:8 y mezclando 1.2 mL del flujo de salida con 3 mL de líquido de centelleo. El volumen de inyección del extracto lipídico de las células fue de 30 μ L.

16. Parámetros bioquímicos

El análisis de los parámetros bioquímicos de las muestras de suero o plasma de pacientes o ratas se realizaron en un autoanalizador ARCHITECT c16000 (Abbott).

17. RT-PCR cuantitativa a tiempo real (qRT-PCR)

El RNA total se extrajo utilizando el reactivo TRI Reagent (de acuerdo con las recomendaciones del fabricante), y se transcribió inversamente con hexámeros aleatorios utilizando el kit de reactivos PrimeScript RT (Takara Bio Inc., Kusatsu, Shiga, Japón). La expresión de los genes de interés (qRT-PCR) se realizó en un sistema LightCycler 480 (Roche) utilizando el kit SYBR Green I Master mediante el uso de cebadores específicos para cada mRNA (**Tabla 8**). Se amplificaron 2 μ L de una dilución 1/100 del DNA complementario (cDNA) resultante de las reacciones de retrotranscripción en un volumen final de reacción de 10 μ L. El protocolo de amplificación consistió en un paso de desnaturalización inicial a 95°C durante 5 min, seguido de 45 ciclos a 95°C durante 10 s, 60°C durante 10 s y 72°C durante 10 s. Se evaluaron las curvas de fusión para cada gen, y los productos de amplificación se separaron en geles de agarosa al 2% para confirmar la presencia de una sola banda. La eficacia de la reacción se evaluó amplificando diluciones en serie de cDNA (1:10, 1:100, 1:1000 y 1:10000). Nos aseguramos de que la relación entre el ciclo umbral (Ct) y el logRNA fuera lineal ($-3.6 < \text{pendiente} < 3.2$). Todos los análisis se realizaron por triplicado, y el número de copias del gen estudiado se normalizó frente al gen la proteína ribosomal rRNA 18S. El análisis de los resultados se realizó con el programa LightCycler Relative Quantification Software (RelQuant) de Roche.

Tabla 8. Secuencia de los cebadores/primers utilizados en las reacciones de qRT-PCR. NCBI: número de identificación del *National Center for Biotechnology Information*.

	Nombre	NCBI	Secuencia 5'→3'
Ugt8	<i>UDP glicosiltransferasa 8</i>	50555	Sentido: TGGAACCAAACCAAAGAACC Antisentido: CCATGGCTTAGGAAGGCTCT
B4galt6	<i>beta-1,4-galactosiltransferasa 6</i>	65196	Sentido: GCAGTTCTCATCCCCCTCCG Antisentido: GGCACGATTGAACGGTTGTG
B4galt5	<i>beta-1,4-galactosiltransferasa 5</i>	362275	Sentido: GGAGAGGCTCCCTTCCATGA Antisentido: CCAGTGTCTCCAAGCCTGA
Glb1	<i>galactosidasa, beta 1</i>	316033	Sentido: CCGGATACCCGATTCTACT Antisentido: CGGTCCCCAGAAAAGTCATA
Arsa	<i>arilsulfatasa A</i>	315222	Sentido: CCCAATATCACCTTGGATGG Antisentido: ACTCCATGGATCTCGTCTGG
Gal3st1	<i>galactosa-3-O-sulfotransferasa 1</i>	683713	Sentido: ACGCTGCTCAACATCCTCCT Antisentido: GTGCCAAGTACGATGGGTAGT
Ugcg	<i>UDP-glucosa ceramida glucosiltransferasa</i>	83626	Sentido: TCCGATGGGATATCATGGTT Antisentido: TGAACCAAGCCACAGCATAA

18. Análisis estadístico de los resultados

Los análisis estadísticos fueron realizados en el software estadístico R (<http://www.r-project.org>, versión 3.0.2), los resultados expresados como media y error estándar (SD) o error estándar de la media (SEM) (según se indique en cada caso), y las medias entre grupos fueron consideradas significativamente diferentes cuando el p-valor era menor a 0.05.

Las comparaciones entre clases y especies de lípidos entre las diferentes lipoproteínas se realizaron por ANOVA de un factor (tipo de lipoproteína). En el trabajo de las ratas EAE, las comparaciones estadísticas para los distintos grupos de ratas se realizaron por ANOVA de tres factores: inmunización, tratamiento y momento del sacrificio (brote y remisión). Los test de comparaciones post-hoc se hicieron empleando el test de Tukey-HSD. Otras comparaciones (cuando se indique) se realizaron empleando la t-Student.

V. RESULTADOS

1. Análisis lipidómico del plasma y de las lipoproteínas del plasma por MALDI-TOF

La espectrometría de masas de desorción/ionización mediante láser asistida por matriz (MALDI-TOF) es una tecnología que ofrece una alta sensibilidad y rendimiento, bajo riesgo de reactividad cruzada entre muestras, y alta robustez frente a impurezas presentes en los extractos biológicos. Por ello, se ha convertido en una herramienta prometedora para estudios lipidómicos, con fines de caracterización aplicada a la obtención de imágenes de distribución espacial de moléculas en tejido (Berry, Hankin y cols. 2011). Sin embargo, el uso cuantitativo de la espectrometría MALDI sigue siendo un desafío dada la variedad estructural de los lípidos (Duncan, Roder y cols. 2008).

En este trabajo nos hemos propuesto valorar la utilidad de la tecnología MALDI-TOF para realizar lipidómica cuantitativa, en comparación con otras tecnologías más ampliamente extendidas en lipidómica cuantitativa como es la tecnología ESI-MS/MS.

1.1. Análisis de fosfolípidos y triglicéridos mediante espectrometría de masas MALDI -TOF

Para determinar la idoneidad del MALDI-TOF como herramienta cuantitativa en el análisis de lípidos, analizamos una mezcla de estándares de fosfatidilcolina (PC) usando 9-aminoacridina (9-AA) como matriz. Las especies de PC fueron detectadas como aductos de la forma $[M+H]^+$ en el modo positivo, sin formación de aductos sodiados $[M+Na]^+$ de las mismas especies ni interferencias de matriz en la región de interés (**Figura 22A**).

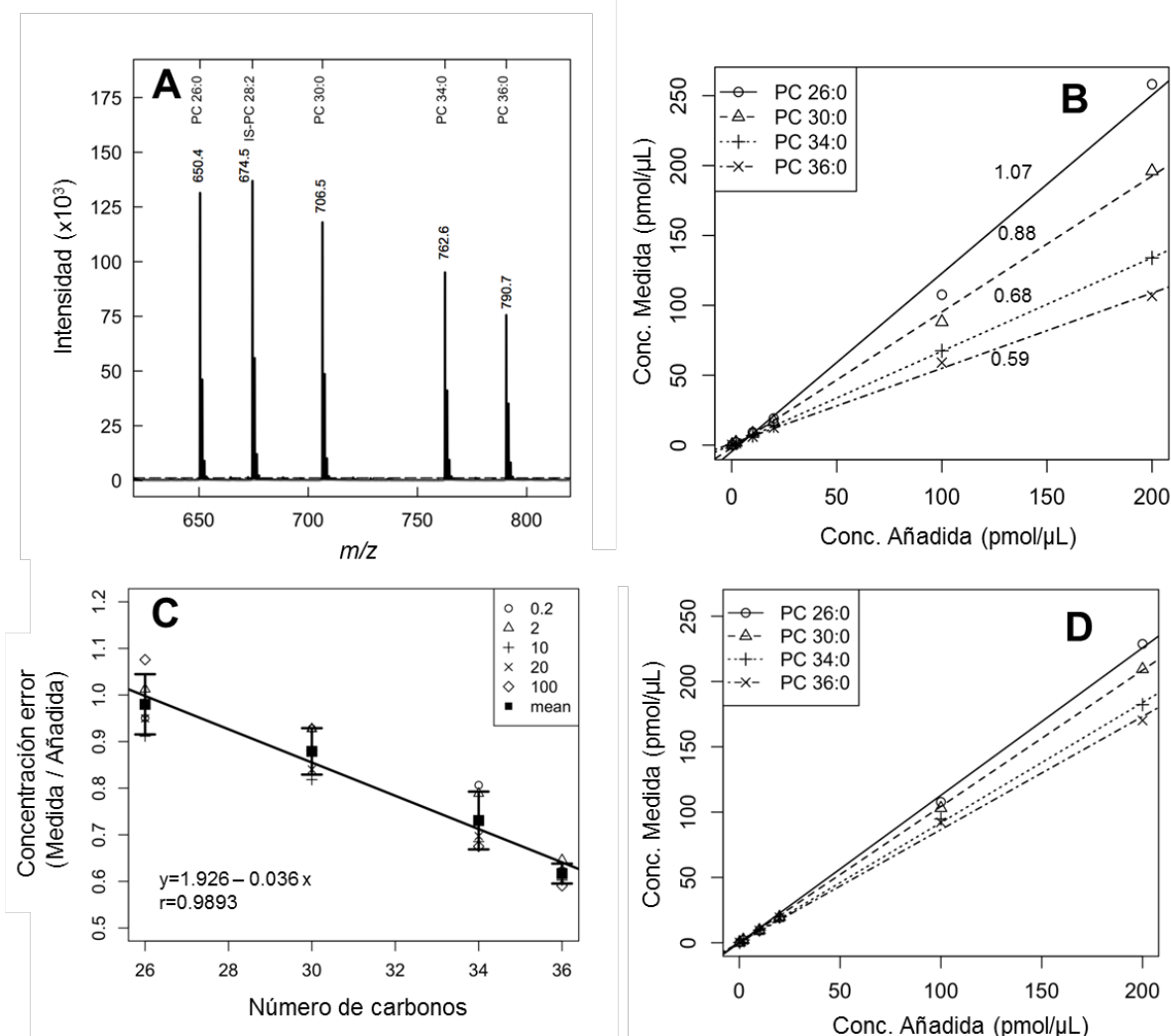


Figura 22. Análisis de estándares de PC por MALDI-TOF. **A)** Espectro de masas MALDI de una mezcla (20 pmol/ μ L de cada uno) de PC-13:0/13:0 (PC 26:0), PC-15:0/15:0 (PC 30:0), PC-17:0/17:0 (PC 34:0), PC-18:0/18:0 (PC 36:0) y PC-14:1/14:1 (IS-PC 28:2). El espectro se adquirió en el modo de ion positivo. Los estándares fueron disueltos en isopropanol/acetonitrilo (60/40, v/v) y mezclado (1:1) con matriz 9-AA (10 mg/mL) y depositado en la placa MALDI. Las especies de PC fueron detectadas como aductos $[M+H]^+$. Se muestra el espectro representativo de 3 experimentos independientes **B)** Curvas de calibración obtenidas de estándares de PC usando PC 28:2 como estándar interno (IS), los valores de concentración fueron obtenidos siguiendo el procedimiento, sin corrección de deriva. **C)** Desviación de los valores de concentración medidos para los estándares de PC respecto a la concentración suma en función del número de átomos de carbono presentes en la cadena de acilo. Los valores del error se representan como media $\pm$ SD de tres calibraciones independientes. **D)** Curvas de calibrado obtenidas de los estándares de PC después de aplicar la corrección de deriva como se explicó en el apartado de **MÉTODOS 12**. Cada punto representa el promedio de 3 calibraciones independientes.

La linealidad de la cuantificación de PC se determinó mediante la preparación de mezclas de estándares moleculares a diferentes concentraciones (rango de 0.2 a 200 pmol/ μ L) en presencia de una cantidad fija de PC 28:2 como estándar interno (IS). Los coeficientes de correlación para el análisis de especies de PC fueron superiores a 0.99, lo que demuestra que MALDI es una herramienta cuantitativa. El rango dinámico para la cuantificación de PC fue de 0.2 a 200 pmol/ μ L (**Figura 22B**). Sin embargo, se observó una clara dependencia de la ionización de las moléculas de PC con la masa, resultando en una menor intensidad de señal de la especie PC 36:0 frente a PC 26:0 a la misma concentración (**Figura 22C**). Esta desviación se aprecia claramente cuando se representa el valor esperado de la concentración respecto al valor medido que muestra para las diferentes especies de PC, muy próximos a la unidad (1.07) para PC 26:0, pero que se alejan de la unidad para PC 36:0 hasta 0.59. La deriva de intensidad mostró una dependencia lineal dependiente de la relación m/z , expresado como el número de carbonos presentes en la cadena alifática. Por ello, decidimos aplicar una transformación lineal a los valores de concentración obtenidos para ganar exactitud en la cuantificación de PC, como se muestra en la **Figura 22D**.

Para establecer si la estrategia de cuantificación por MALDI de PC era aplicable para el análisis de otras clases de lípidos, se realizaron experimentos similares con estándares de fosfatidiletanolamina (PE) y triglicéridos (TG). Las especies de PE pueden ser detectadas tanto en el modo positivo como negativo en MALDI (Fuchs, Bischoff y cols. 2009) pero, dado que en el plasma la concentración de PC es muy superior a la de PE existe la posibilidad real de confundir las especies de PE con las de PC en modo positivo, por ello nos inclinamos por realizar su análisis en modo negativo. Las moléculas de PE fueron detectadas como aductos de la forma $[M-H]^-$ (**Figura 23A**) sin que se apreciase interferencia de la matriz de 9-AA. Como en el caso de la PC, observamos una tendencia similar en la dependencia de ionización de las moléculas de PE con la masa (**Figura 23B**). Encontramos también que la linealidad y el rango dinámico para la cuantificación de PE fueron similares a los de PC (**Figura 23C**).

Los TG son moléculas neutras sin carga. Por lo que para analizar este grupo fue necesaria la adición de una sustancia dopante a la matriz, en nuestro caso el acetato de sodio, para favorecer la ionización (Sun, Yang y cols. 2008). Obtuvimos una buena reproducibilidad y una buena linealidad en un rango de 1-250 pmol/ μ L para las especies de TG, similar a lo observado para PC y PE (**Figuras 24A y B**). Cuando examinamos el efecto del grado de insaturación de los residuos de acilo de los TG (**Figuras 24C y D**) encontramos una relación entre la ionización de las especies de TG y el número de dobles enlaces presentes en las cadenas de acilo.

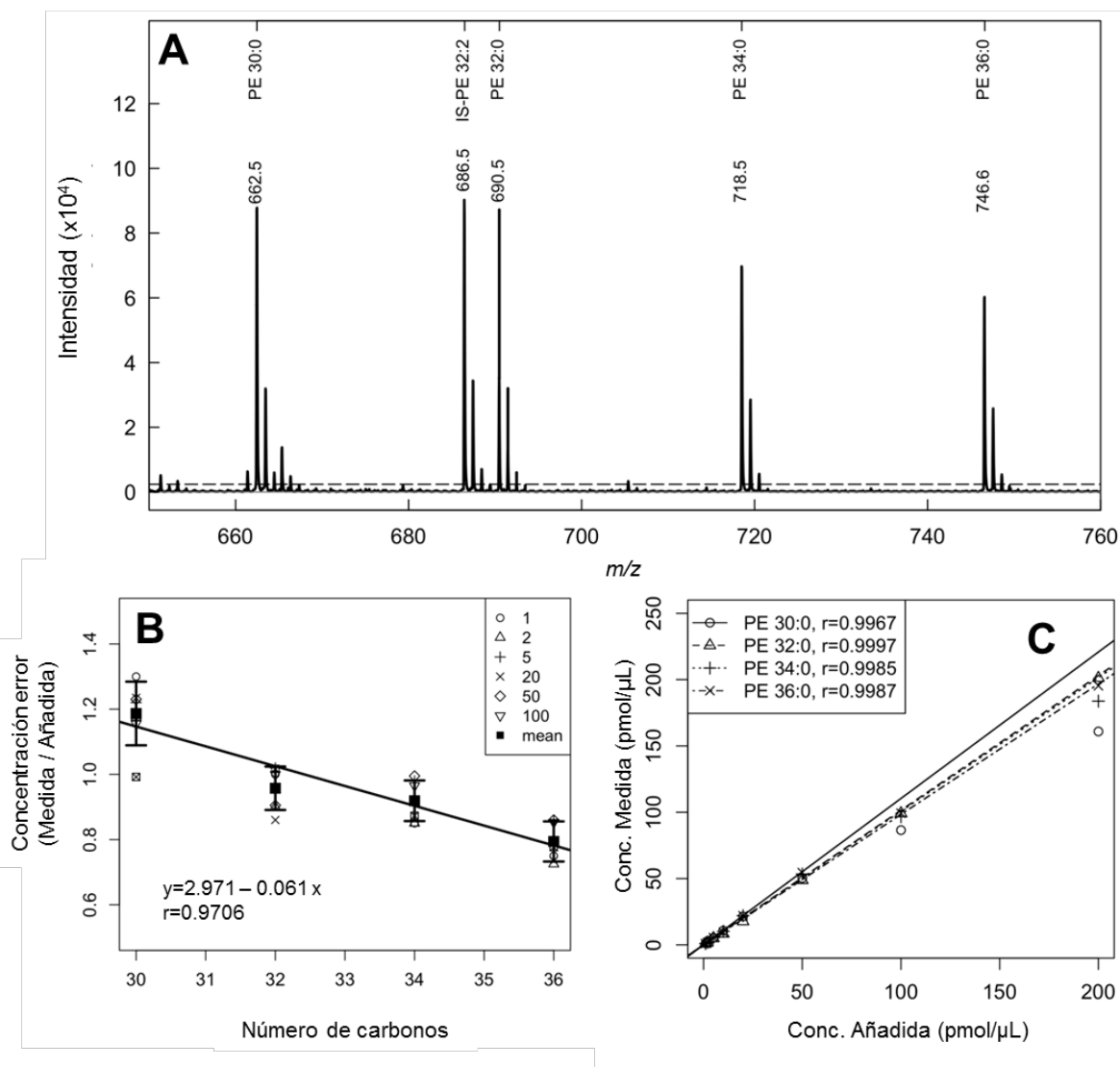


Figura 23. Análisis MALDI-TOF de estándares de PE. **A)** Espectro de masas MALDI de una mezcla (20 pmol/ μ L de cada uno) de PE-15:0/15:0 (PE 30:0), PE-16:0/16:0 (PE 32:0), PE-17:0/17:0 (PE 34:0), PE-18:0/18:0 (PE 36:0) y PE-16:1/16:1 (IS-PE 32:2). El espectro se adquirió en el modo de ion negativo. Los estándares fueron disueltos en isopropanol/acetonitrilo, mezclado (1:1) con la matriz 9-AA y depositado en la placa MALDI. Las especies de PE fueron detectadas como aductos $[M-H]^-$. El espectro es representativo de 3 experimentos independientes. **B)** Desviación de los valores de concentración medidos para los estándares de PE respecto a la concentración suma en función del número de átomos de carbono presentes en la cadena de acilo de PE. Cada punto representa el promedio de 3 experimentos independientes. **C)** Curvas de calibrado obtenidas de los estándares de PE después de aplicar la corrección de deriva como se explicó en el apartado de **MÉTODOS 12**. Cada punto representa el promedio de 3 experimentos independientes.

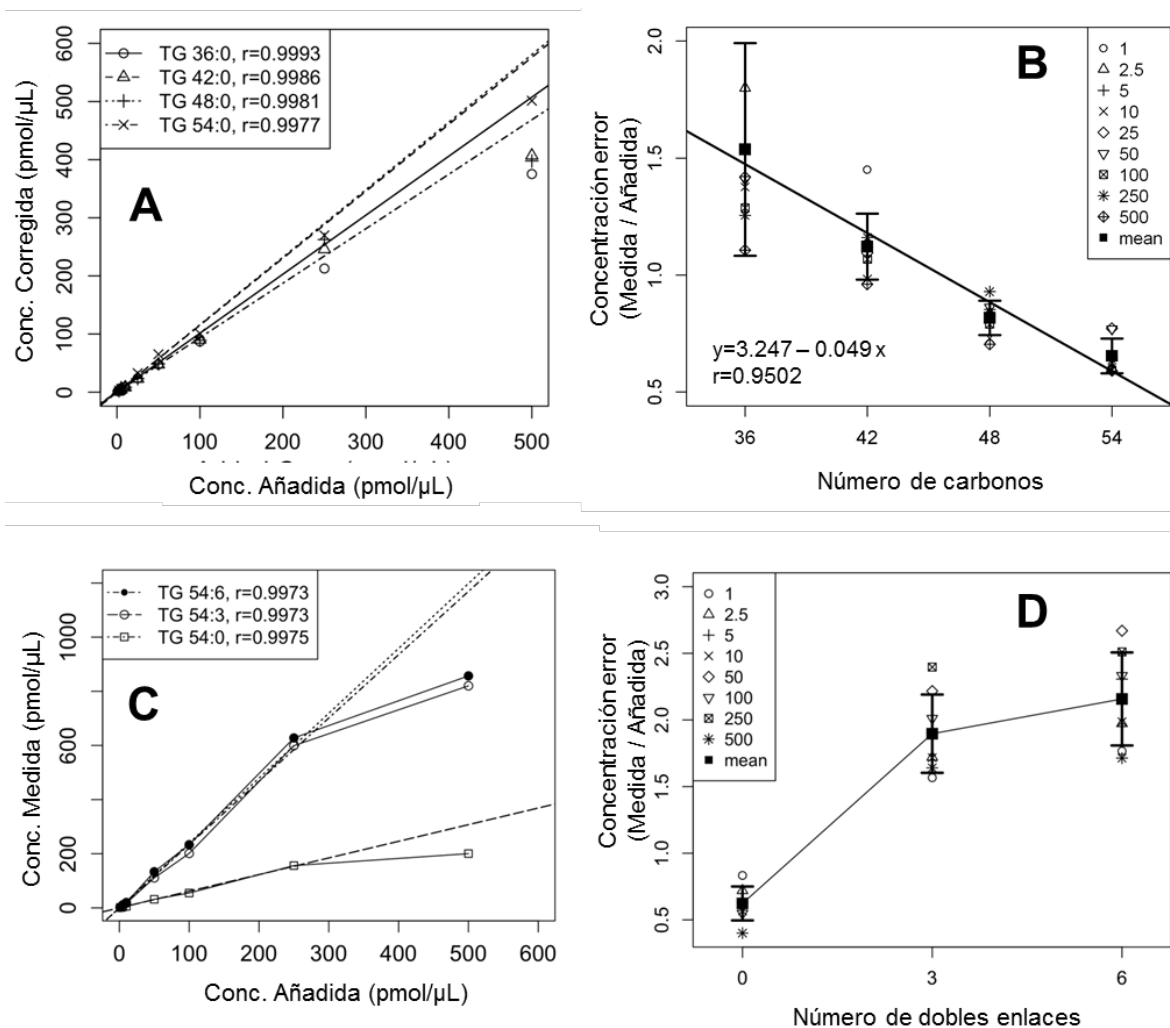


Figura 24. Efecto de la longitud y grado de insaturación de la cadena de acilo en el análisis de estándares de TG mediante MALDI-TOF. A) Efecto de la longitud de la cadena de acilo en el análisis de TG. Una mezcla de estándares, TG-12:0/12:0/12:0 (TG 36:0), TG-14:0/14:0/14:0 (TG 42:0), TG-16:0/16:0/16:0 (TG 46:0), TG-18:0/18:0/18:0 (TG 54:0), fue analizada en concentraciones en el rango 1-500 pmol/μL, y las curvas de calibrado resultantes se representaron después de aplicar el factor de corrección como se explicó en el apartado de **MÉTODOS 12**. **B)** Desviación de los valores de concentración medidos para los estándares de TG respecto a la concentración suma como una función del número de átomos de carbono presentes en las cadenas de acilo de los TG. **C)** Efecto del número de dobles enlaces presentes en la cadena de acilo en el análisis de TG. Una mezcla de estándares de especies con la misma longitud de cadena, TG-18:0/18:0/18:0 (TG 54:0), TG-18:1/18:1/18:1 (TG 54:3) y TG-18:2/18:2/18:2 (TG 54:6), fue analizada en concentraciones en el rango 1-500 pmol/uL, y se representaron las curvas de calibrado resultantes. **D)** Desviación de valores de concentración medidos para estándares de TG respecto a la concentración suma en función del número de dobles enlaces presentes en las cadenas de acilo. Cada punto representa el promedio de 3 experimentos independientes.

Estos resultados confirmaron la idoneidad de la espectrometría MALDI-TOF para la cuantificación de especies moleculares de lípidos, y por ello la metodología se aplicó para explorar su potencial para el análisis de la composición lipídica del plasma y de las lipoproteínas presentes en el mismo.

1.2. Análisis lipidómico del plasma por MALDI-TOF/MS

El plasma humano contiene una gran cantidad de especies de fosfolípidos, especialmente PC, que son fácilmente ionizables. Por ello, es difícil analizar otras clases de lípido del plasma, menos ionizables o menos abundantes, como las especies de TG, PE y esfingomielina (SM) (Fuchs, Nimptsch y cols. 2009). Así, cuando analizamos un extracto total de lípidos de plasma en el modo positivo, sólo detectamos especies de PC y lisofosfatidilcolina (LPC), mientras que las PE y SM no fueron detectadas (**Figura 25A**). La adición de acetato sódico a la matriz permitió la detección de especies de TG, pero con poca reproducibilidad debido a la presencia de mucha interferencia del fondo. En modo negativo, únicamente detectamos especies de fosfatidilinositol (PI). Para resolver el problema de interferencia de señal ocasionada por PC, realizamos una separación de las especies apolares de TG y ésteres de colesterol (CE) realizando una extracción con solventes poco polares empleando extracción en fase sólida (SPE) (Agren, Julkunen y cols. 1992), como se describe en el apartado **MÉTODOS 7**. Si bien, la detección de TG mejoró, no observamos mejora en la identificación de especies de PE y PI (**Figura 25B**).

Descartado el empleo de SPE, decidimos separar las distintas clases lipídicas empleando una metodología de cromatografía líquida de alta presión acoplada a un detector de dispersión de luz evaporativa (HPLC-ELSD), según se describe en el apartado de **MÉTODOS 8**. Para evaluar la reproducibilidad de este método, se extrajeron los lípidos de una mezcla de plasma humano, se cuantificaron las clases lipídicas (**Tabla 9**) y se colectaron las fracciones correspondientes a los tiempos de elución de CE, TG, PE, PI, PC, SM y LPC (**Figura 26**) para ser analizadas por MALDI-TOF.

El aislamiento de las clases por HPLC-ELSD eliminó la supresión iónica de PC sobre otras especies y fuimos capaces de identificar 31 especies de PC y 29 especies de TG en plasma (**Figura 27**). Inesperadamente, el análisis de la fracción de PE en el modo negativo produjo un espectro significativamente más complejo, con picos de masas que eran difíciles de asignar con especies individuales de PE. De hecho, muchas de las especies con una relación m/z por encima

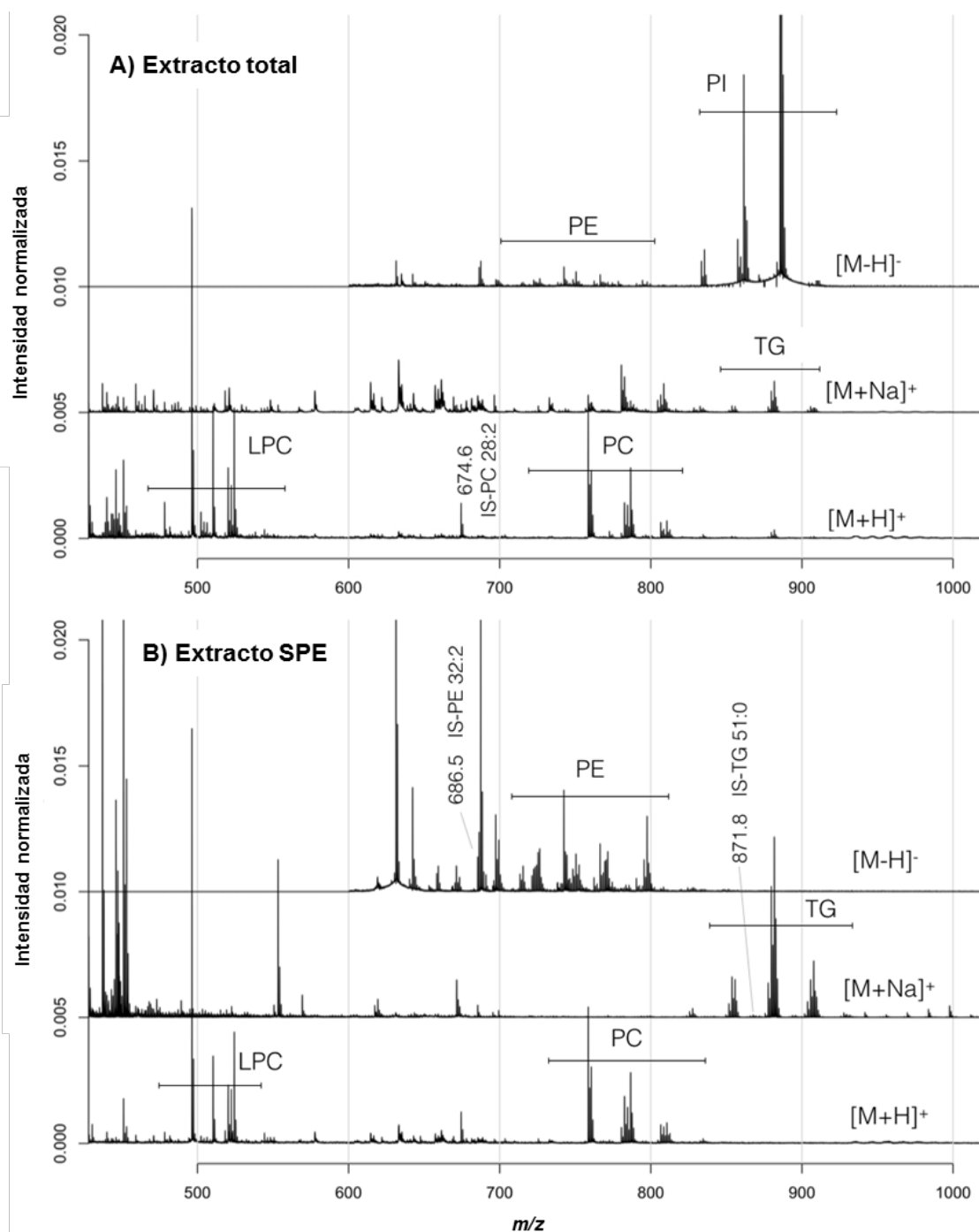


Figura 25. Análisis MALDI-TOF del extracto total y del extracto tras la SPE de los lípidos. A) Espectro de masas MALDI de un extracto total de lípidos del plasma. Una mezcla de plasmas con una mezcla de IS se extrajo y analizó por MALDI usando las mismas condiciones descritas en el apartado de **MÉTODOS 9** para las fracciones PC, TG y PE (en modo negativo). **B)** Espectro de masas MALDI de fracciones obtenidas por SPE de lípidos neutros (TG y CE) y fosfolípidos. El extracto lipídico del plasma fue fraccionado por SPE como se describe en el apartado **MÉTODOS 7**. Las fracciones de lípidos neutros (TG y CE) y los fosfolípidos fueron evaporados y analizados por MALDI usando el mismo protocolo descrito para TG, PC y PE (modo negativo). Las intensidades fueron normalizadas por intensidad total del ion para cada espectro. Cada espectro representa el promedio de 3 experimentos independientes.

Tabla 9. Cuantificación de clases lipídicas en una mezcla de plasmas por HPLC-ELSD. El plasma de 5 sujetos fue mezclado, se extrajeron los lípidos y se cuantificaron por HPLC-ELSD como se describe en el apartado de **MÉTODOS 8**. Los valores de media y desviación estándar (SD) corresponden a 5 replicados de la misma mezcla. CV: coeficiente de variación.

Clase	media (pmol/ μ L)	SD	CV (%)
Ésteres de colesterol (CE)	2616	52	2
Triglicéridos (TG)	1405	10.3	0.7
Colesterol libre (FC)	1591	28.1	1.8
Ácidos grasos libres (FFA)	215	14.8	6.9
Fosfatidiletanolamina (PE)	20	0.4	2.1
Fosfatidilcolina (PC)	1649	64.5	3.9
Esfingomielina (SM)	370	27.3	7.4
Lisofosfatidilcolina (LPC)	228	19.9	8.7

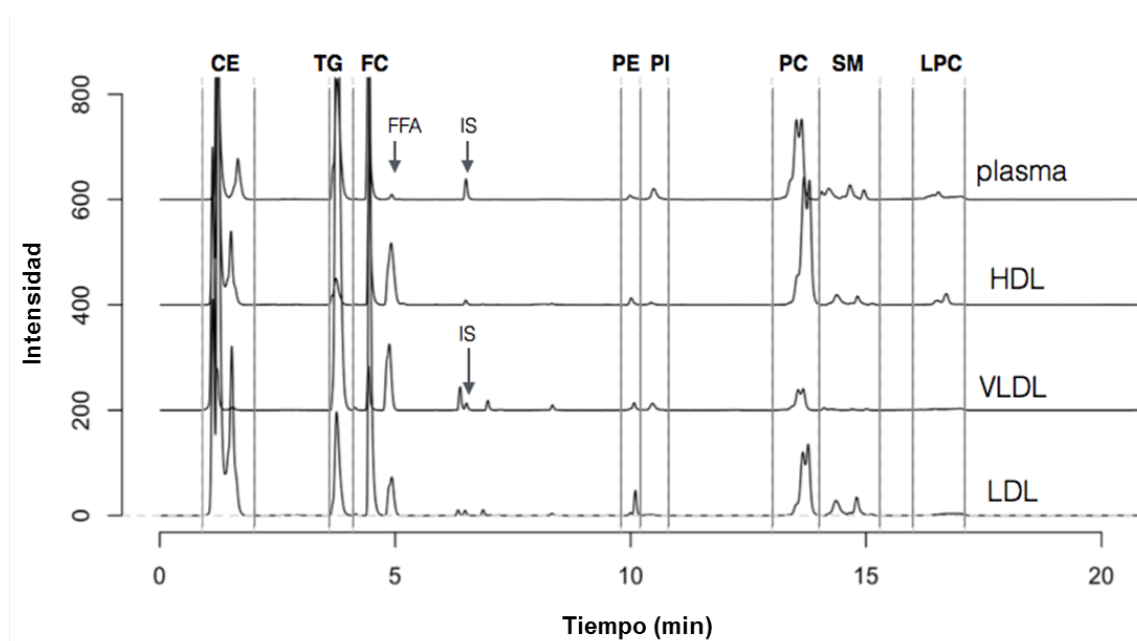


Figura 26. Análisis HPLC-ELSD del extracto de lípidos de las lipoproteínas. Cromatograma de una inyección de 5 μ L del extracto lipídico del plasma y de las lipoproteínas de sujetos sanos (VLDL, LDL y HDL). Los lípidos del plasma y lipoproteínas fueron extraídos, cuantificados y fraccionados por HPLC-ELSD como se describe en el apartado de **MÉTODOS 8**. El estándar interno añadido fue alcohol batílico. Los ácidos grasos libres no fueron analizados. Cada cromatograma representa el promedio de 3 experimentos independientes. IS: estándar interno; FFA: ácidos grasos libres.

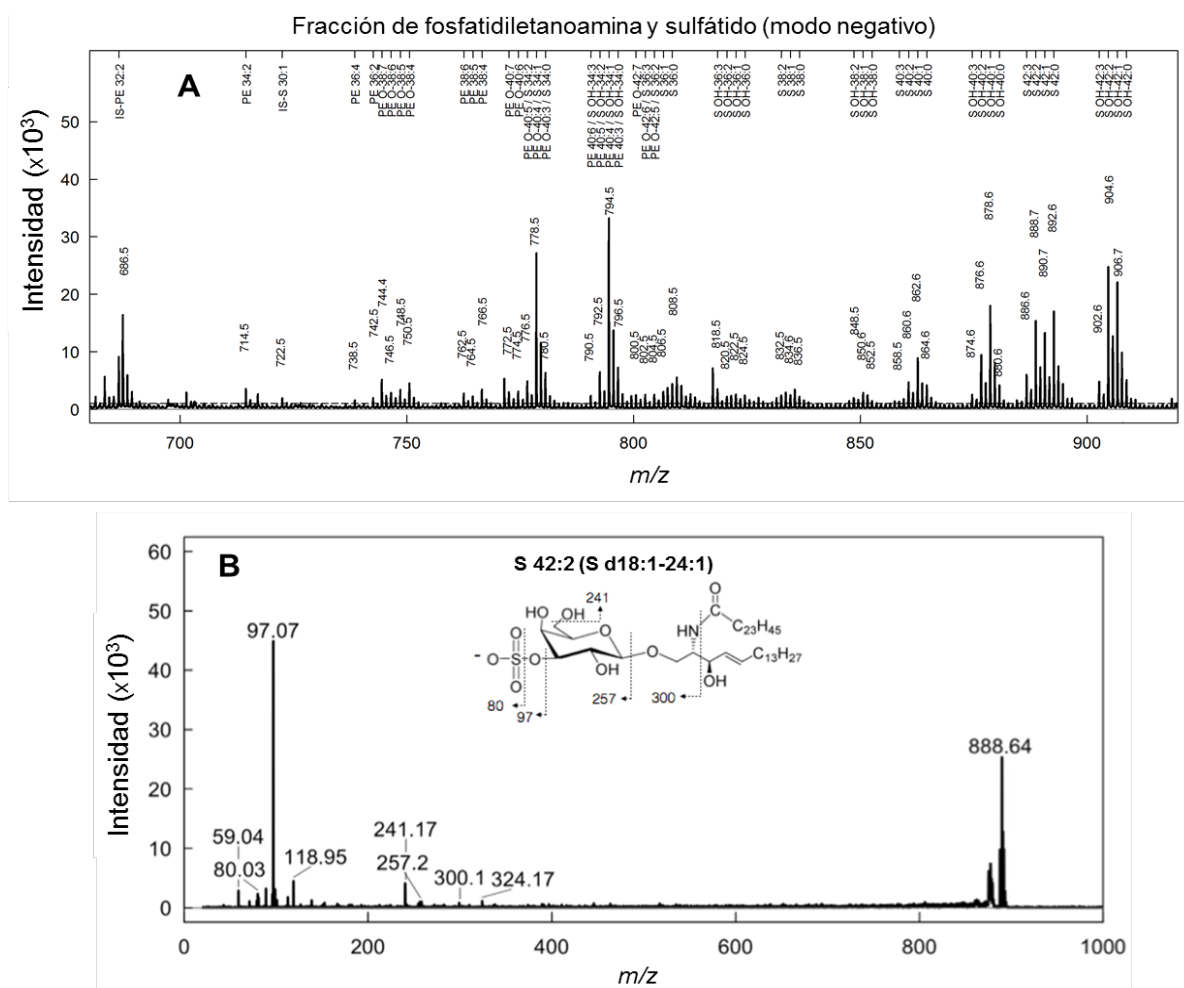


Figura 28. Análisis MALDI-TOF de la fracción PE y Sulf del plasma. Los lípidos del plasma fueron extraídos y fraccionados por HPLC-ELSD y posteriormente analizados por MALDI-TOF según se describe en el apartado de **MÉTODOS 9**. **A)** Espectro de masas MALDI de la fracción PE en el modo negativo. Las especies de PE y Sulf fueron detectadas como aductos $[M-H]^-$. **B)** Espectro de masas MALDI-MS/MS de S 42:2 (888.6 m/z). El espectro MALDI-MS/MS fue adquirido en el modo negativo. El espectro fue adquirido usando una celda de colisión (CID) con argón a presión de 4 bar. Los voltajes de las fuentes fueron 6.01 y 5.31 kV, reflector a 27.07 y 11.93 kV, y voltajes de fragmentación 19.04 y 4.71 kV. PE O- identifica las especies de PE-plasmalógenos con residuos con enlace O-alquilo u O-alquil-1-enil, S representa las moléculas de Sulf que contienen esfingosina (d18:1) y S OH- si contiene esfingosina hidroxilada (t18:1). Se muestran los espectros representativos de 3 experimentos independientes.

Para evitar confusión con las especies de Sulf decidimos analizar las especies de PE en modo positivo, emplando como dopante acetato sódico. Esta aproximación nos permitió analizar las especies de PE como aductos de la forma $[M-H+2Na]^+$ sin confusión con las especies de Sulf y con una sensibilidad superior a la demostrada en modo negativo (**Figura 29**).

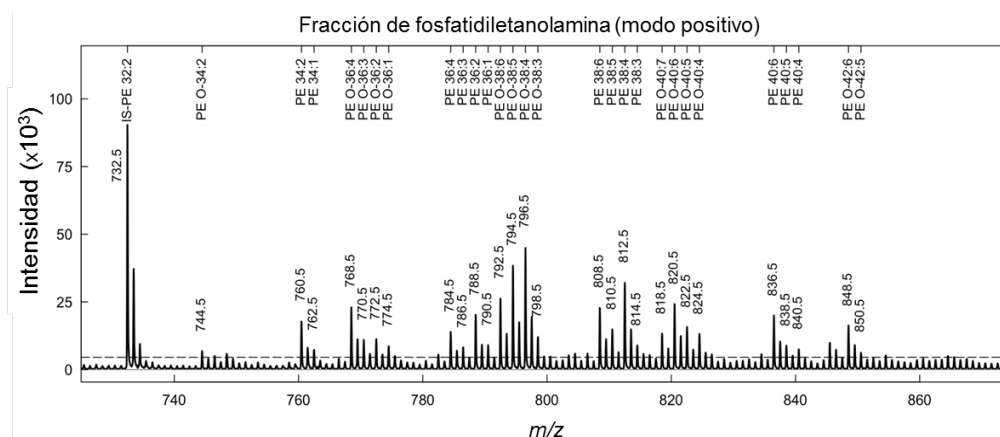


Figura 29. Análisis MALDI-TOF de la fracción PE del plasma en modo positivo. Espectro de masas MALDI de la fracción PE en modo positivo. Las especies fueron detectadas como aductos $[M-H+2Na]^+$. PE O- identifica las especies de PE-plasmalógenos con residuos con enlace O-alquilo u O-alquil-1-enil. Se muestra el espectro representativo de 3 experimentos independientes.

Por otro lado, las especies de LPC y SM fueron detectadas como aductos $[M+H]^+$ y $[M+Na]^+$, respectivamente. La confirmación de la identidad de LPC y PC se realizó mediante experimentos MS/MS, por la presencia del fragmento de $m/z +184$ correspondiente al fragmento de fosfocolina (Sun, Yang y cols. 2008), mientras que las especies de SM fueron identificadas por un fragmentos de m/z de 666 ($[M+Na]^+ - N(CH_3)_3$) y 542 ($[M+Na]^+ - 183$), que están relacionados con la pérdida de la cabeza polar de grupo, además de otros iones a 147 (ciclofosfano sodiado) y a 86 ($CH_2=CH-N(CH_3)_3^+$) (Figura 30) (Hsu y Turk 2000).

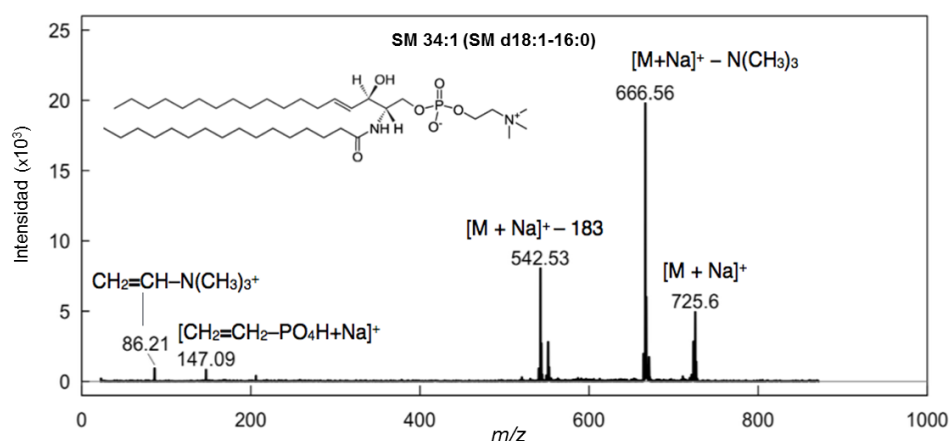


Figura 30. Confirmación de la identidad de especies de SM en plasma por MALDI-MS/MS. Espectro de masas MALDI-MS/MS de la especie sodiada SM 34:1 (724.6 m/z). El espectro MALDI-MS/MS fue adquirido en el modo positivo usando una celda de colisión (CID) con argón a presión de 4 bar. Los voltajes de las fuentes fueron 6.01 y 5.31 kV, reflector a 27.07 y 11.93 kV, y voltajes de fragmentación 19.04 y 4.71 kV. Se muestra el espectro representativo de 3 experimentos independientes.

Se obtuvieron también buenos resultados para el análisis de la fracción correspondiente a las especies de PI, que fueron detectados como aductos $[M-H]^-$ en el modo negativo. Se sabe, por experimentos previos, que el tiempo de retención para especies de PS es cercano a PI (Chamorro, Garcia-Cano y cols. 2013), por lo que se confirmó la identidad de PI mediante experimentos MS/MS en modo negativo (**Figura 31**). A pesar de poder analizar una mezcla de estándares de PS en el modo negativo, no se detectó la presencia de PS en el plasma

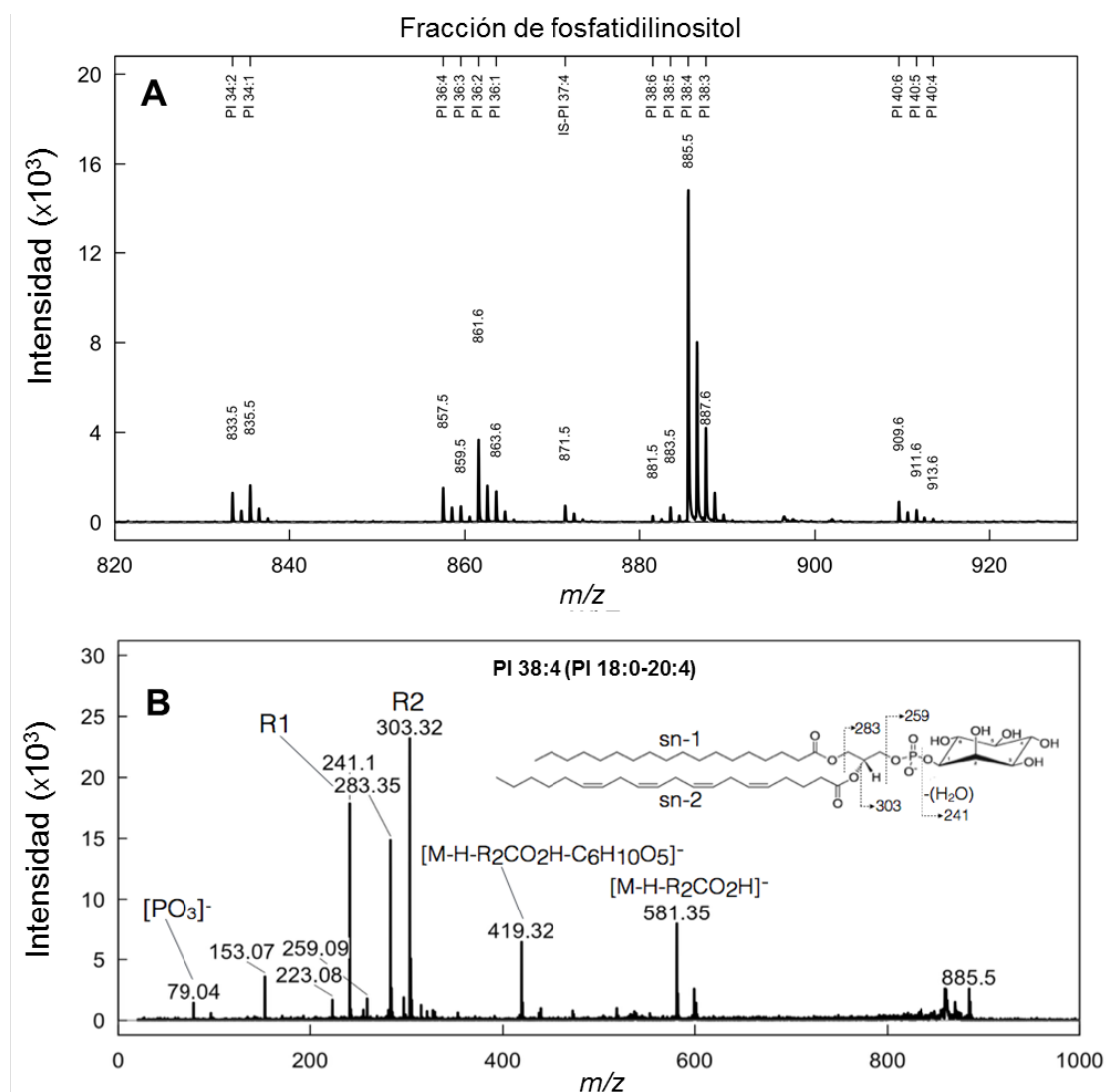


Figura 31. Análisis MALDI-TOF/MS de la fracción de PI del plasma. Los lípidos del plasma fueron extraídos y fraccionados por HPLC-ELSD, y después analizados por MALDI como se describe en el apartado de **MÉTODOS 9**. **A)** Espectro de masas MADI de la fracción PI del plasma. Las especies de PI fueron detectadas como aductos $[M-H]^-$ **B)** Espectro masas MALDI-MS/MS de PI 38:4 (885.5 m/z). El MALDI-MS/MS fue adquirido en el modo negativo usando una celda de colisión (CID) con argón a presión de 4 Bar para inducir la fragmentación. Los voltajes de las fuentes de iones fueron 6.01 y 5.31 kV, reflector a 27.07 y 11.93 kV, y voltajes de fragmentación 19.04 y 4.71 kV. Se muestran los espectros representativos de 3 experimentos independientes.

Empleando la metodología descrita cuantificamos las especies (**Tabla C1**, en Anexo) y las clases lipídicas (**Tabla 10**) presentes en una mezcla de plasma de varios controles. Los resultados obtenidos por MALDI-TOF mostraron una buena concordancia con los valores obtenidos por HPLC-ELSD (**Tabla 9**). Por desgracia, nos resultó imposible fijar unas condiciones experimentales para el análisis de las especies de CE, a pesar del intento con diferentes combinaciones de matriz (9-AA, 2,5-dihidroxibenzoico, ditranol o α -ciano-4-hidroxicinámico), solvente y dopante (acetato de plata, de sodio o de amonio).

Tabla 10. Reproducibilidad en la cuantificación de clases lipídica en una mezcla de plasmas mediante MALDI-TOF. El plasma de 5 sujetos fue mezclado, se extrajeron los lípidos, se colectaron fracciones por HPLC-ELSD y se analizaron (5 replicados) mediante MALDI-TOF como se describe en el apartado de **MÉTODOS 9**. Los datos de clases fueron calculados por suma de los datos de cada especie lipídica. CV: coeficiente de variación

Clase	Media $\pm$ SD (pmol/ μ L)	CV (%)
Triglicéridos (TG)	1799 $\pm$ 81.0	4.5
Fosfatidiletanolamina (PE)	54 $\pm$ 4.4	8.1
Fosfatidiletanolamina-plasmalógeno (PE O-)	78 $\pm$ 3.9	5.0
Fosfatidilinositol (PI)	83 $\pm$ 4.1	4.9
Fosfatidilcolina (PC)	1409 $\pm$ 64.4	4.6
Fosfatidilcolina-plasmalógeno (PC O-)	43 $\pm$ 6.8	16.0
Esfingomielina (SM)	135 $\pm$ 41.4	30.8
Lisofosfatidilcolina (LPC)	212 $\pm$ 16.4	7.7
Sulfátido (S) (fmol/ μ L)	74 $\pm$ 4.1	5.5
Sulfátido-OH (S OH-) (fmol/ μ L)	81 $\pm$ 5.0	6.1

Finalmente, analizamos si los resultados cuantitativos de especies lipídicas obtenidos mediante MALDI-TOF eran consistentes con los obtenidos mediante ionización con electrospray (ESI). Para ello, se colectó la fracción de PC de seis muestras de plasma distintas y se comparó el resultado obtenido por MALDI-TOF con el resultado de la misma fracción analizada mediante infusión directa del extracto por ESI. Como se observa en la **Figura 32**, obtuvimos unos resultados cualitativos y cuantitativos prácticamente idénticos ($R^2=0.990$).

1.3. Análisis de las lipoproteínas del plasma por MALDI-TOF

Para demostrar que nuestra metodología es aplicable al análisis de la composición de las lipoproteínas del plasma, aislamos las lipoproteínas (VLDL, LDL, y HDL) procedentes del plasma de 10 pacientes normolipidémicos. Empleamos un método de ultracentrifugación en gradiente de densidad. Como MALDI-TOF no permite el análisis de colesterol libre (FC) y CE, se tomó el valor de cuantificación obtenido por HPLC-ELSD.

La distribución de cada clase lipídica en cada lipoproteína respecto a su concentración total en el plasma se muestra en la **Tabla 11**. Las HDL son muy ricas en fosfolípidos (más del 79% de LPC y 56% de PC del plasma), mientras que, como era de esperar, las VLDL son muy ricas en lípidos neutros, contribuyendo los TG presentes en el plasma hasta un 66% del total en plasma.

Tabla 11. Distribución de las clases de lípidos en las principales lipoproteínas del plasma. Las lipoproteínas fueron aisladas por ultracentrifugación, los lípidos se extrajeron y analizaron por HPLC-ELSD y MALDI-TOF como se describe en el apartado de **MÉTODOS 9**. Se muestra las concentraciones totales de las clases de lípidos en plasma en pmol/μL y su porcentaje de distribución en cada clase de lipoproteína (media ± SD, n=10 sujetos normolipidémicos, 5 hombres y 5 mujeres). ^a La fracción de HDL también contiene LPC unida a albúmina. * Los valores de concentración de CE y FC corresponden a la cuantificación por HPLC-ELSD.

Clase	Plasma (pmol/μL)	VLDL (%)	LDL (%)	^a HDL (%)
Ésteres de colesterol (CE)*	1683 ± 189	20 ± 8	57 ± 4	23 ± 6
Triglicéridos (TG)	675 ± 224	66 ± 16	26 ± 14	7 ± 3
Colesterol libre (FC)*	671 ± 90	7 ± 2	69 ± 7	24 ± 7
Fosfatidiletanolamina (PE)	24 ± 7	22 ± 9	32 ± 12	47 ± 12
PE-plasmalógeno (PE O-)	60 ± 9	6 ± 2	38 ± 8	56 ± 9
Fosfatidilinositol (PI)	97 ± 17	10 ± 4	34 ± 6	56 ± 9
Fosfatidilcolina (PC)	1017 ± 173	5 ± 2	39 ± 8	56 ± 9
PC-plasmalógeno (PC O-)	68 ± 15	2 ± 1	38 ± 13	59 ± 13
Esfingomielina (SM)	147 ± 23	4 ± 2	81 ± 6	15 ± 6
Lisofosfatidilcolina (LPC)	170 ± 30	4 ± 3	17 ± 3	79 ± 4
Sulfátido (S) (fmol/μL)	51 ± 17	6 ± 5	52 ± 10	42 ± 9
Sulfátido -OH (S OH-) (fmol/μL)	103 ± 40	5 ± 5	57 ± 11	38 ± 10

Por otro lado, las LDL son ricas en FC (69%), SM (81%) y CE (57%). Los resultados son similares cuando se expresan porcentualmente la contribución de los grupos lipídicos en cada lipoproteína, en relación a su cantidad total de lípidos (**Figura 33**).

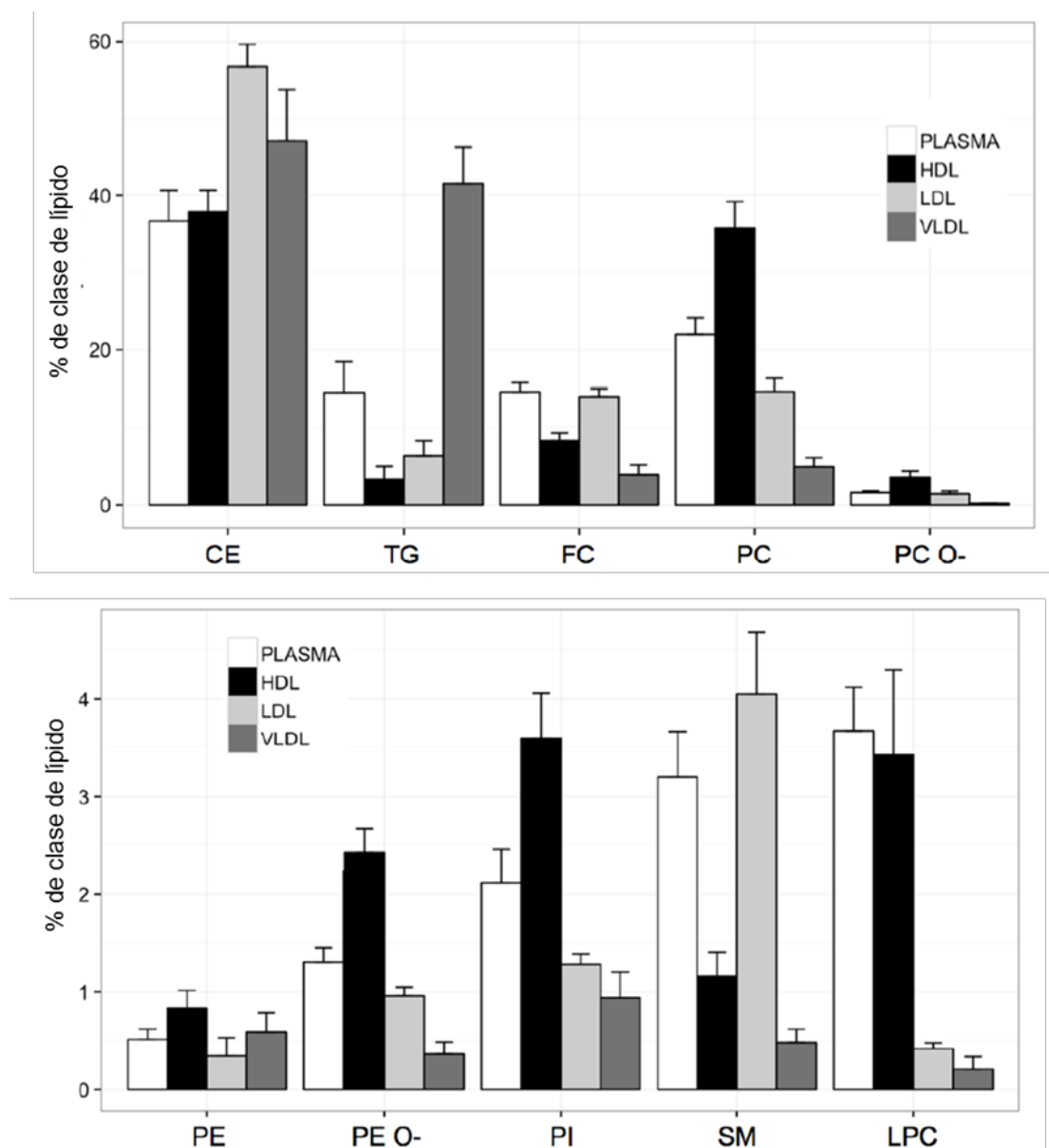


Figura 33. Composición lipídica de las principales lipoproteínas del plasma. Se representa el porcentaje de moles de clase de lípido respecto a cantidad de lípido total para cada lipoproteína (media $\pm$ SD, n=10 sujetos normolipidémicos, 5 hombres y 5 mujeres). CE: ésteres de colesterol; TG: triglicéridos; FC: colesterol libre; PC: fosfatidilcolina; PC O-: PC-plasmalógeno; PE: fosfatidiletanolamina; PE O-: PE-plasmalógeno; PI: fosfatidilinositol; SM: esfingomielina; LPC: lisofosfatidilcolina.

1.4. Distribución de especies de lípido en las lipoproteínas

Estudios previos han demostrado que la composición de especies de lípidos es importante para la funcionalidad de las lipoproteínas (Camont, Lhomme y cols. 2013). Sin embargo, el conocimiento exacto de la composición en especies lipídicas de las lipoproteínas es muy limitado (Liebisch, Vizcaino y cols. 2013). Nosotros observamos que la identidad de las especies pertenecientes a las clases PC y PC O- fue similar entre las distintas lipoproteínas (**Figura 34**),

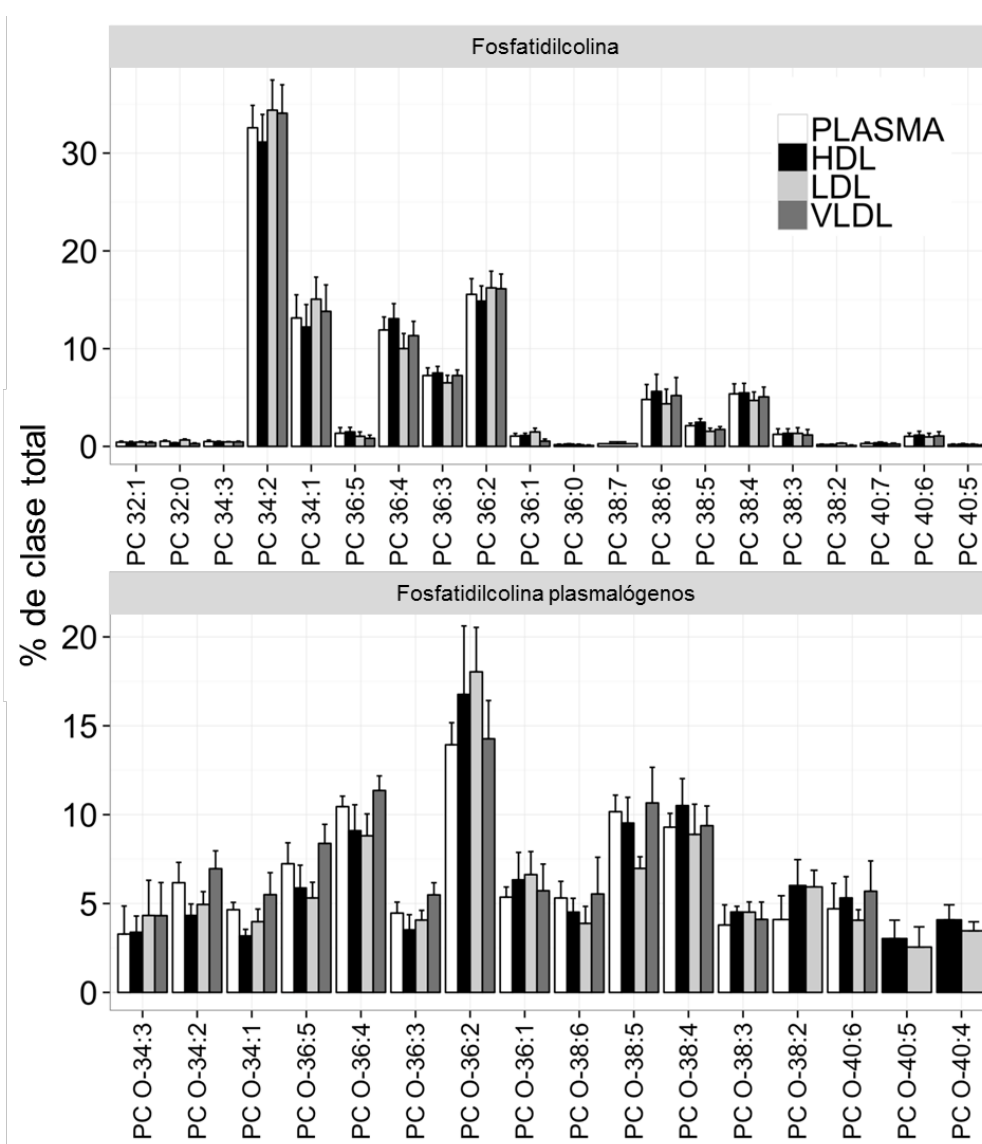


Figura 34. Distribución de especies de PC en plasma y en lipoproteínas. La distribución de especies lipídicas fue calculada como porcentaje de moles para cada especie respecto a la concentración de lípido de su clase en cada lipoproteína (media $\pm$ SD, n=10 sujetos normolipidémicos, 5 hombres y 5 mujeres). PC O- (plasmalógenos con residuos de O-alquilo u O-alquil-1-enil) fue considerado una clase separada.

pero detectamos variaciones en la distribución. Se observa una cierta preferencia a incorporar ácidos grasos poliinsaturados (cuatro o más dobles enlaces, 30% frente al 23%, $P<0.01$) respecto a los ácidos grasos con menor grado de insaturación (mono-, di- o tri-insaturadas, 70% frente a 77%, $P<0.01$) en PC para las HDL en comparación con las LDL. Una tendencia similar se observa para las especies para la clase PC O- en HDL respecto a las LDL (poliinsaturadas: 55% frente al 44%, $P<0.01$; y saturadas: 45% frente a 56%, $P<0.01$). Se observó una alta variabilidad en la distribución de PE y PE O- (**Figura 35**) y un enriquecimiento de PE 38:4 y PE 36:2 en

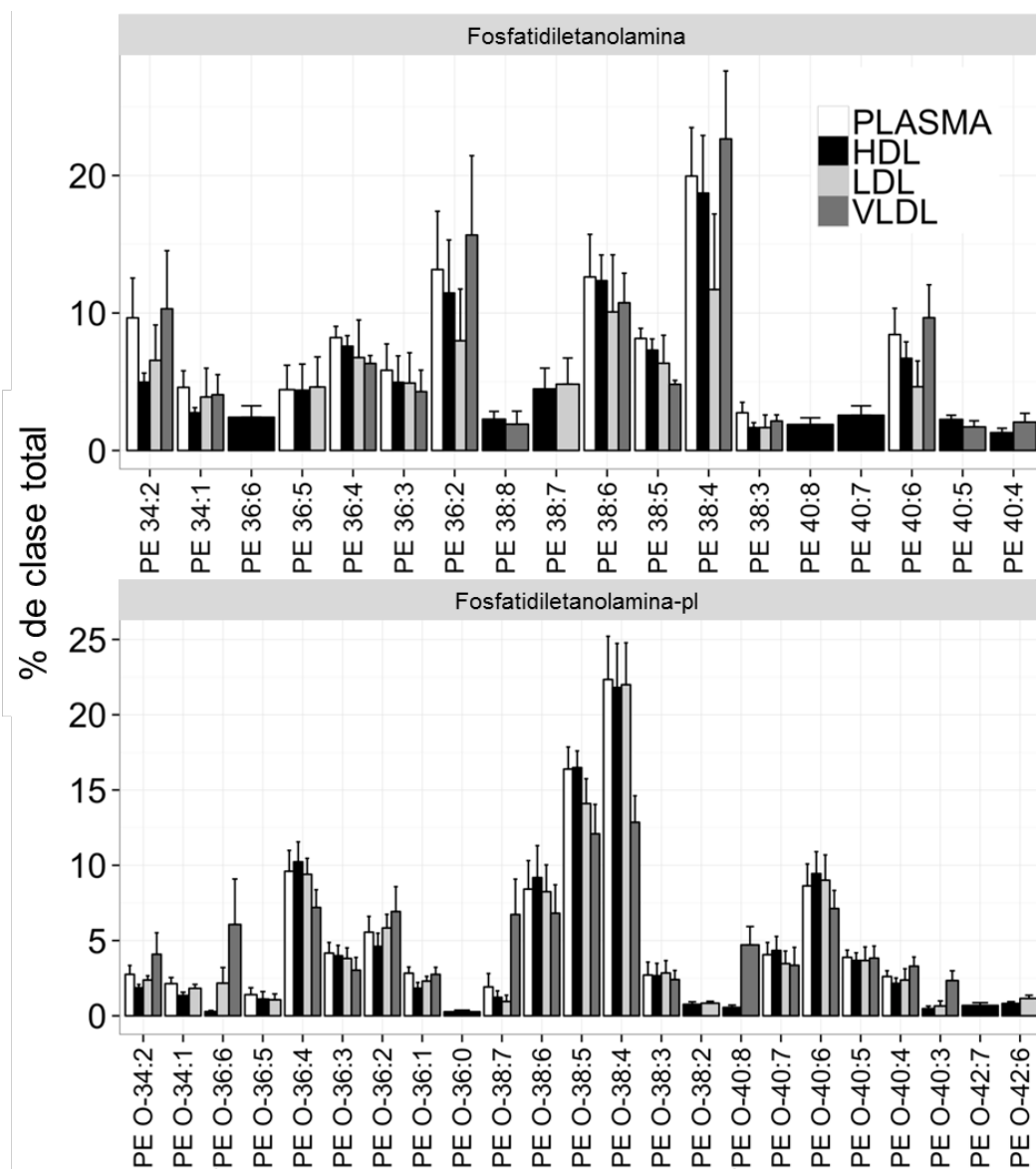


Figura 35. Distribución de especies de PE en plasma y lipoproteínas. La distribución de especies lipídicas fue calculada como porcentaje de moles de cada especie respecto a la concentración total de clase de lípido en cada lipoproteínas (media $\pm$ SD, $n=10$ sujetos normolipidémicos, 5 hombres y 5 mujeres). Los PE-pl (plasmalógenos O-alquilo u O-alquil-1-enil) fueron considerados como una clase separada. (*) PE-O 36:6 y PE-O 40:8 fueron especies indistinguibles de PE 34:0 y PE 38:2

VLDL en comparación al observado en LDL y HDL ($P<0.01$), al contrario que para los plasmalógenos (PE O-38:4 y PE O-36:2, $P<0.05$). Finalmente, las especies de PI 38:4 (18:0-20:4) y PI 36:2 (18:0-18:2), cuya identidad fue confirmada por experimentos MS/MS, contribuyen la mayoría de las presentes en las lipoproteínas, representando el 70-80% de la clase (Figura 36).

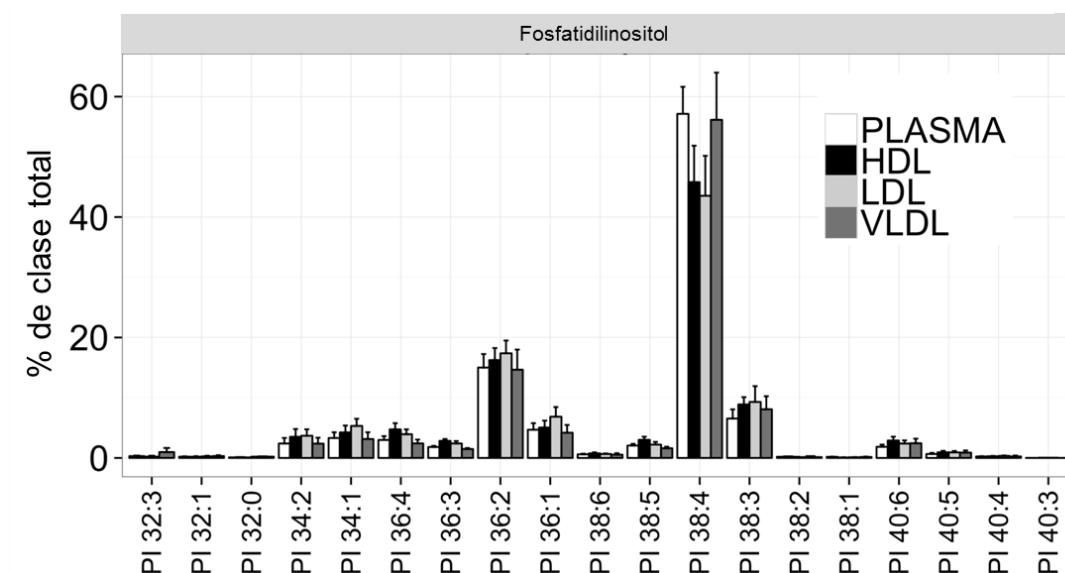


Figura 36. Distribución de especies de PI en plasma y lipoproteínas. La distribución de especies lipídicas fue calculada como porcentaje de moles de cada especie respecto a la concentración total de clase en cada lipoproteínas (media $\pm$ SD, $n=10$ sujetos normolipídicos, 5 hombres y 5 mujeres).

Los principales lípidos neutros detectados fueron el TG 52:2 y el TG 52:3, aportando más del 50% de los TG encontrados en plasma y lipoproteínas (Figura 37). A pesar de que algunas especies de TG sólo fueron detectadas en VLDL y LDL, se observó una distribución similar de los TG en las diferentes lipoproteínas del plasma. Por otro lado, CE 16:0, CE 18:1 $n-9$ y CE 18:2 $n-6$ fueron las especies predominantes en plasma y lipoproteínas con una menor proporción de CE 18:2 $n-6$ ($P<0.01$) y mayor contenido de CE 16:0, CE 18:1 $n-9$ en VLDL respecto a las demás lipoproteínas ($P<0.01$) (Figura 37).

Las principales diferencias en la distribución de especies en lipoproteínas se observaron en las clases LPC, SM y Sulf. Como se ha mencionado anteriormente (Tabla 11, en página 101), las HDL son grandes portadoras de LPC. Detectamos un alto contenido de especies poliinsaturadas en la LPC de las HDL. Por el contrario, las LDL tienen una mayor proporción de ácidos grasos saturados y monoinsaturados (Figura 38). Las especies de SM fueron muy abundantes en las LDL. Sólo se detectó la especie SM 34:1 en VLDL y HDL (Figura 39).

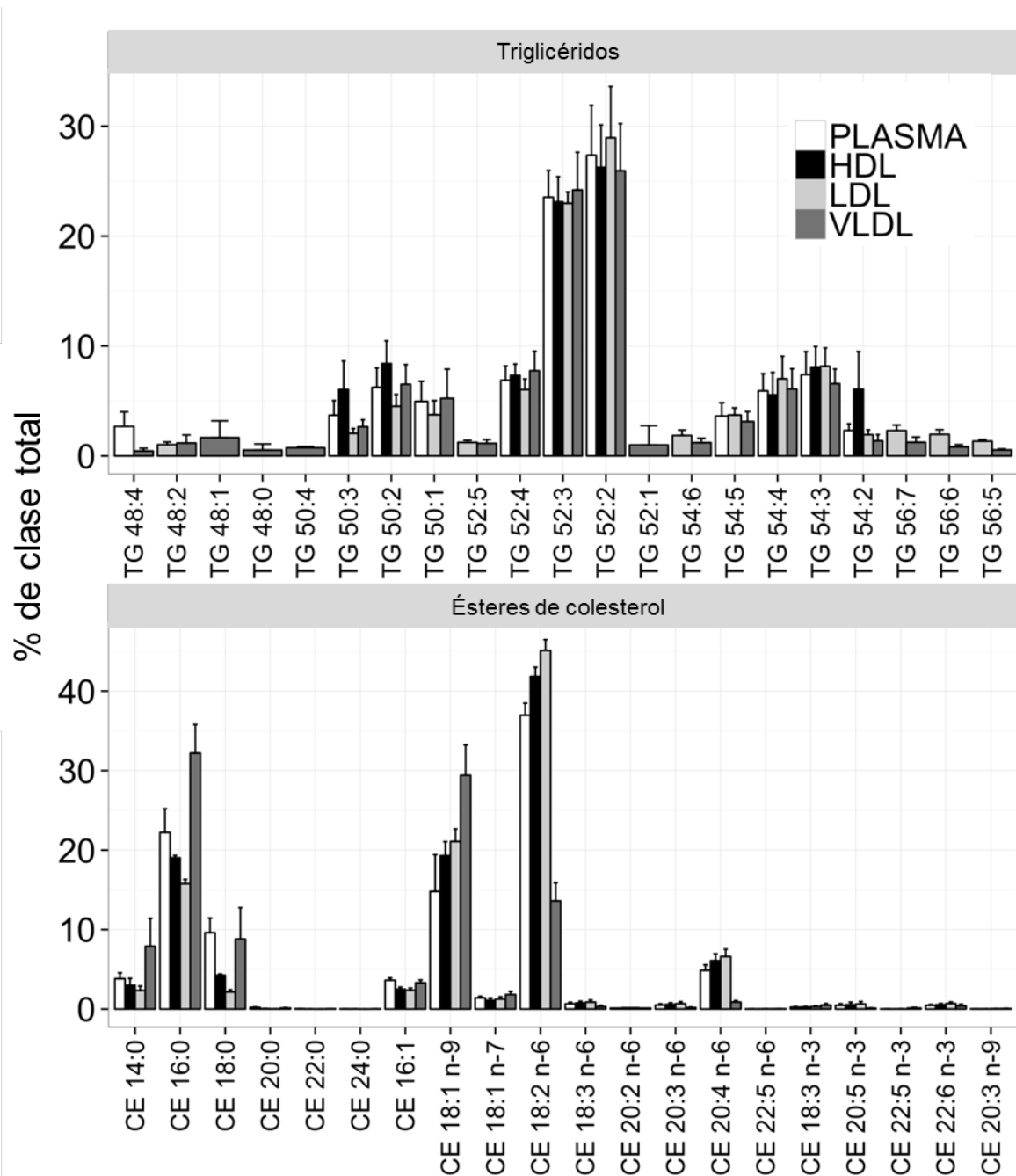


Figura 37. Distribución de lípidos neutros en plasma y lipoproteínas. La distribución de especies lipídicas fue calculada como porcentaje de moles de cada especie respecto a la concentración total de clase de lípido en cada lipoproteínas (media $\pm$ SD, n=10 sujetos normolipidémicos, 5 hombres y 5 mujeres). Los TG fueron analizados por MALDI-TOF/MS y el perfil de CE se obtuvo mediante GC-MS, en ambos casos previo aislamientos de fracciones con HPLC-ELSD.

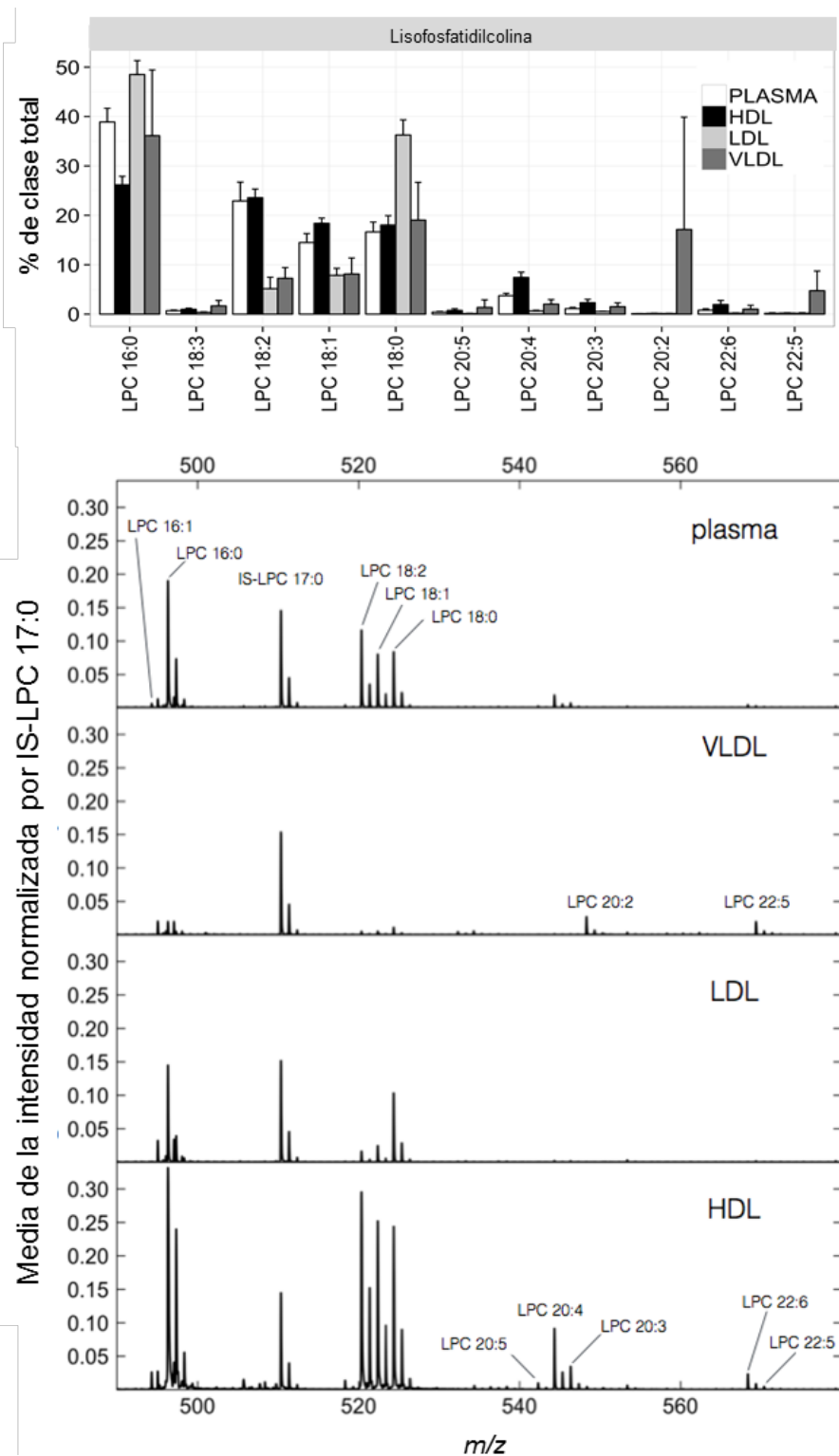


Figura 38. Patrón de distribución de LPC en plasma y lipoproteínas. A) La distribución de especies lipídicas fue calculada como porcentaje de moles de cada especie en relación a concentración de clase de lípido total en las lipoproteínas (media $\pm$ SD, n=10 sujetos normolipidémicos, 5 hombres y 5 mujeres). **B)** Promedio de la intensidad normalizada (n=10), respecto al estándar interno IS-LPC 17:0, para plasma y lipoproteínas. La normalización se realizó con el paquete ChemoSpec versión 2.0.2 en R. Las especies de LPC fueron detectadas como aductos $[M+H]^+$.

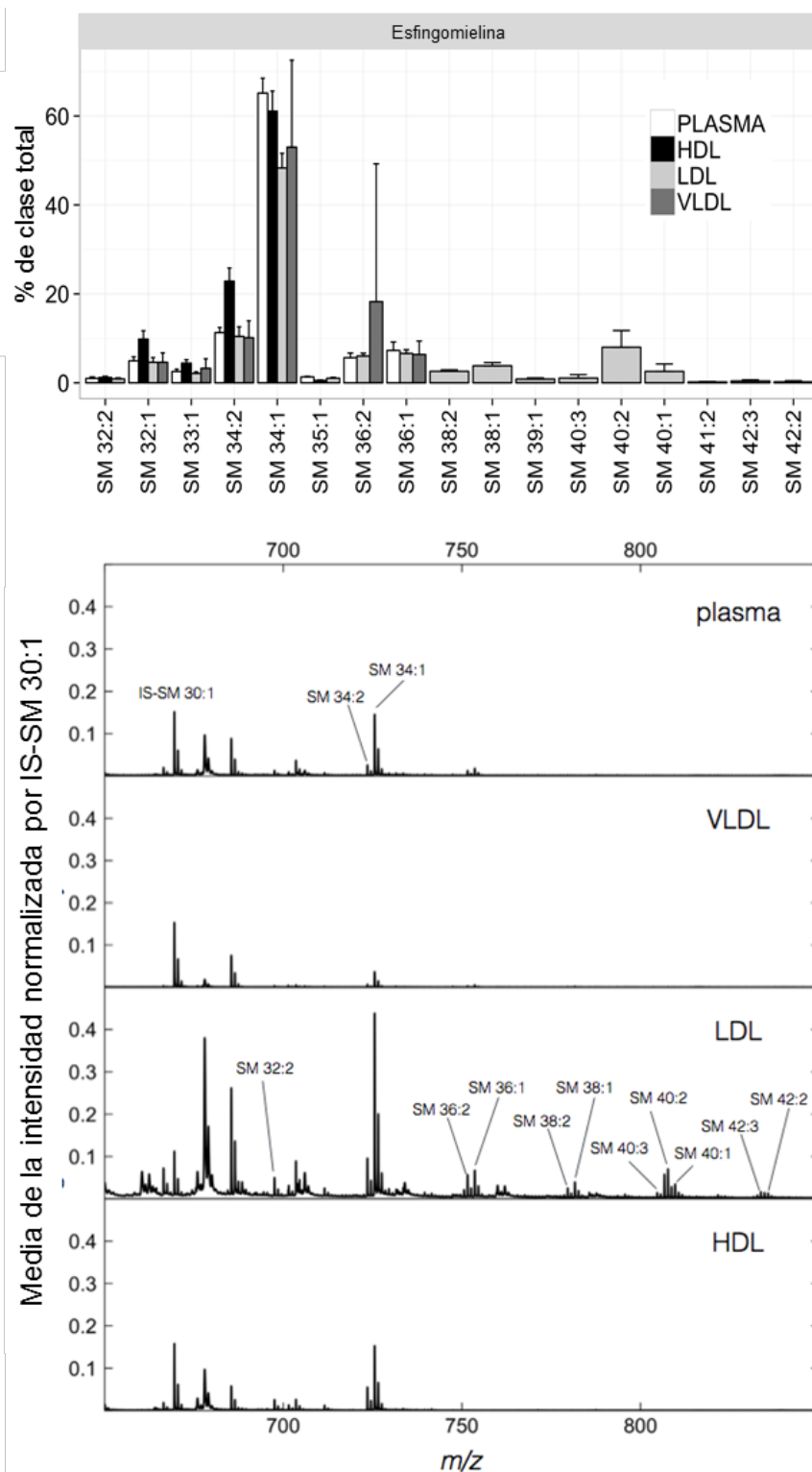


Figura 39. Patrón de distribución de SM en plasma y lipoproteínas. A) La distribución de especies lipídicas fue calculada como porcentaje de moles de cada especie respecto a la concentración total de clase de lípido en cada lipoproteínas (media $\pm$ SD, n=10 sujetos normolipidémicos, 5 hombres y 5 mujeres). **B)** Promedio de la intensidad normalizada (n=10), respecto al estándar interno IS-SM 30:1, de plasma y lipoproteínas. La normalización se llevó a cabo con el paquete ChemoSpec v2.0.2 en R. Las especies fueron detectadas como aductos $[M+Na]^+$.

Finalmente, aún siendo un componente minoritario, menos del 0.01% de los lípidos presentes en las lipoproteínas (**Figura 40A**), MALDI es capaz de analizar Sulf con mucha sensibilidad. Entre las especies de Sulf, se detectó una alta proporción de S 34:1 y S OH- 34:1, muy similar a la distribución de especies descrita para SM (**Figura 40B**).

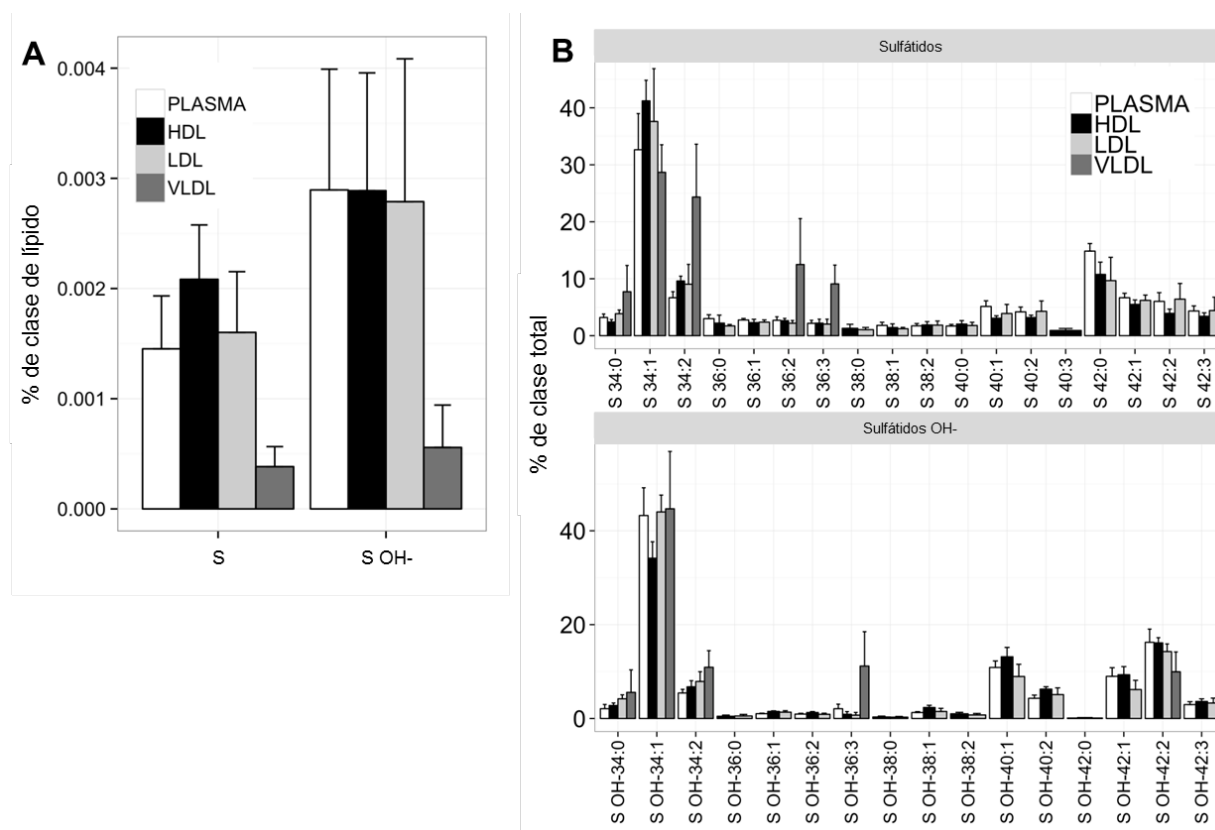


Figura 40. Composición de Sulf en plasma y lipoproteínas. **A)** Se representa el porcentaje de moles de Sulf (S y S OH-) en relación al contenido total de lípido de cada lipoproteína (media $\pm$ SD, n=10 sujetos normolipidémicos, 5 hombres y 5 mujeres). **B)** La distribución de especies de Sulf fue calculada como porcentaje de moles de cada especie en relación a concentración de clase de lípido total en lipoproteínas. Se identificaron las especies de Sulf (S) con su ácido graso unido al nitrógeno, y la base esfingoide, normalmente esfingosina (d18:1), mientras que S OH- representa la incorporación de un α -hidroxiácido graso a la esfingosina o la presencia de una esfingosina hidroxilada (t18:1).

2. Efecto del tratamiento con ácido elágico en la encefalomiелitis autoinmune experimental

La encefalomiелitis autoinmune experimental (EAE) es un modelo animal de uso frecuente para estudiar la esclerosis múltiple (EM). Las lesiones histológicas y el comportamiento clínico observado en ratas Lewis con EAE se caracterizan por la aparición de inflamación y la presencia de desmielinización en el sistema nervioso central (SNC), acompañada de infiltración de linfocitos T CD4+ y macrófagos (Miller y Karpus 2007). En el presente trabajo hemos estudiado los efectos de la administración oral de ácido elágico a ratas a las que se les ha inducido EAE. Se examinaron los cambios en los signos clínicos, la presencia de infiltración de células proinflamatorias en el SNC, así como los efectos sobre la mielina analizando la concentración de proteínas y lípidos.

2.1. Efecto del tratamiento con ácido elágico en las variables clínicas del modelo

Tras la inmunización con un extracto de médula espinal de cobaya (GPSC) y adyuvante completo de Freund (CFA), que contiene *M. tuberculosis*, las ratas desarrollaron un brote monofásico agudo de encefalitis. En las ratas sometidas a inmunización tratadas con placebo (grupo EAE), los signos clínicos empezaron al octavo día post-inmunización (p.i.), alcanzando el pico de actividad a los 11 días (**Figura 41A**). La aparición de los signos neurológicos coincidió con la pérdida de peso corporal (**Figura 41D**). En las ratas tratadas con ácido elágico (EAE+Elágico), los cambios en el peso corporal no fueron diferentes a los del grupo control, pero la aparición de los signos clínicos se retrasó un día (**Figura 41B**), siendo las valoraciones

clínicas en los días 9-11 p.i. significativamente menores que en los controles. Para comparar mejor el curso de la enfermedad, se calculó el área bajo la curva, que resultó ser menor en el grupo EAE+elágico respecto al grupo EAE (**Figura 41C**). Justo después de alcanzarse el pico de la enfermedad, tanto las ratas EAE como las EAE+elágico se recuperaron progresivamente desapareciendo los síntomas de enfermedad entre los días 17-18 p.i. La administración del ácido

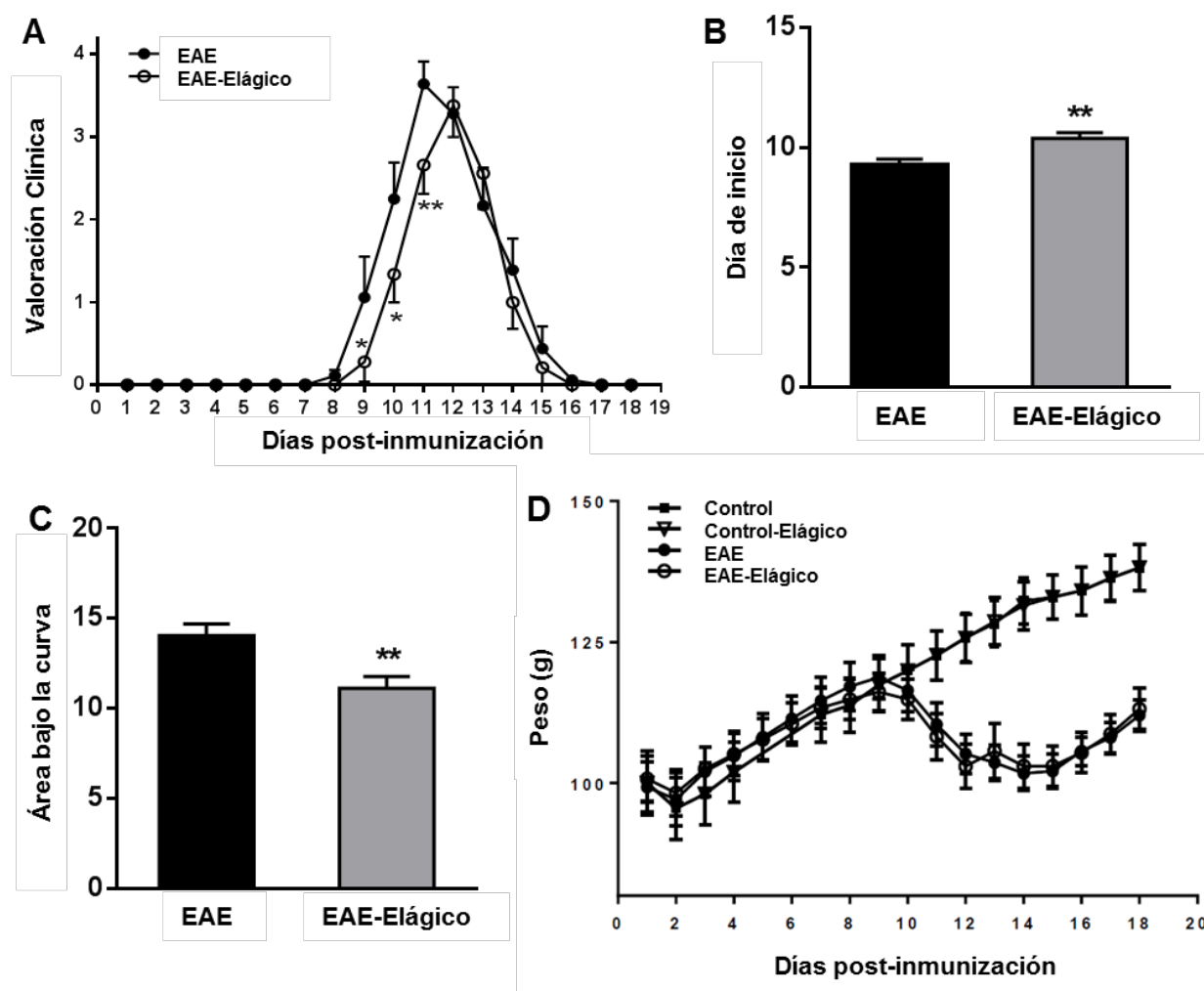


Figura 41. Efectos de la administración de ácido elágico en la valoración clínica en ratas con encefalomiелitis autoinmune experimental (EAE). Se inmunizaron ratas hembra Lewis como se indica en el apartado de **MÉTODOS 2**. Se administró diariamente ácido elágico (10 mg/Kg) desde 2 días antes de la inmunización hasta 18 días después mediante administración oral. Los grupos experimentales fueron: control, control tratado con ácido elágico (control+elágico), EAE, y EAE tratado con ácido elágico (EAE+elágico). **(A)** valoración clínica diaria, **(B)** día de aparición de signos neurológicos, **(C)** área bajo la curva de ratas EAE tratadas o no con ácido elágico y **(D)** efecto en el peso. Los resultados se expresan como media $\pm$ SEM, n=7. La valoración clínica fue analizada mediante un ANOVA de dos variables y un test post-hoc de Bonferroni. Las comparaciones estadísticas mostradas son EAE frente EAE+Elágico (*p<0.05 y **p<0.01).

elágico en las ratas control no afectó al peso corporal ni a la aparición de efectos adversos (Figura 41D).

El análisis bioquímico del plasma de las ratas inmunizadas en las fases de brote y remisión de la enfermedad se muestra en la **Tabla 12**. Se evidenciaron pequeños cambios en algunos de estos parámetros: aumento en la concentración de proteínas, urea y colesterol en los grupos EAE y EAE+elágico en el momento del brote, y disminución de los triglicéridos en el grupo EAE+elágico, tanto en el momento del brote como de la remisión.

Tabla 12. Parámetros bioquímicos en suero de ratas EAE. Se inmunizaron ratas hembra Lewis como se indica en el apartado de **MÉTODOS 2** para inducir EAE. Se administró diariamente ácido elágico (10 mg/Kg) desde 2 días antes de la inmunización hasta 18 días después mediante administración oral. Los grupos experimentales fueron ratas EAE (brote y remisión) y EAE tratado con ácido elágico (EAE+elágico) (brote y remisión). Los valores son media $\pm$ SEM, n=6. Los datos fueron analizados mediante un test ANOVA de dos variables. Las medias dentro de una fila que no comparten una letra superíndice común son significativamente diferentes ($p < 0.05$). ALT, *alanina amino transferasa*; AST, *aspartato amino transferasa*; LDH, *lactato deshidrogenasa*.

	Brote		Remisión	
	EAE	EAE+elágico	EAE	EAE+elágico
Glucosa (mg/dL)	165.8 $\pm$ 5.0	159.7 $\pm$ 5.4	158.2 $\pm$ 8.2	161.3 $\pm$ 5.7
Calcio (mg/dL)	9.7 $\pm$ 0.4	9.0 $\pm$ 0.3	9.4 $\pm$ 0.1	9.7 $\pm$ 0.2
Creatinina (mg/dL)	0.41 $\pm$ 0.02	0.37 $\pm$ 0.02	0.37 $\pm$ 0.01	0.41 $\pm$ 0.01
Proteínas totales (mg/dL)	5.8 $\pm$ 0.3 ^a	5.5 $\pm$ 0.1 ^a	4.8 $\pm$ 0.3 ^b	5.3 $\pm$ 0.2 ^b
Albúmina (mg/dL)	1.0 $\pm$ 0.07	1.0 $\pm$ 0.06	0.9 $\pm$ 0.04	1.0 $\pm$ 0.06
Urea (mg/dL)	33.3 $\pm$ 1.5 ^a	30.4 $\pm$ 1.9 ^a	23.5 $\pm$ 3.0 ^b	27.9 $\pm$ 4.0 ^b
AST (U/L)	97.3 $\pm$ 25.1	77.9 $\pm$ 12.1	76.8 $\pm$ 2.0	87.0 $\pm$ 10.0
ALT (U/L)	28.5 $\pm$ 5.6	23.0 $\pm$ 2.1	26.4 $\pm$ 2.8	27.2 $\pm$ 1.2
Fosfatasa alcalina (U/L)	142.3 $\pm$ 19.8	132.0 $\pm$ 14.3	161.0 $\pm$ 16.5	159.9 $\pm$ 26.9
LDH (U/L)	351.6 $\pm$ 49.2	350.6 $\pm$ 66.7	310.2 $\pm$ 99.8	322.1 $\pm$ 59.7
Triglicéridos (mg/dL)	52.8 $\pm$ 8.7 ^a	40.4 $\pm$ 4.4 ^b	71.8 $\pm$ 8.7 ^a	62.4 $\pm$ 7.3 ^b
Colesterol (mg/dL)	98.38 $\pm$ 5.3 ^a	89.6 $\pm$ 5.1 ^a	73.8 $\pm$ 5.6 ^b	80.7 $\pm$ 4.3 ^b

2.2. Análisis inmunohistoquímico del cerebro de ratas EAE

Para evaluar la infiltración de células inflamatorias (linfocitos T) en el SNC, se empleó un anticuerpo anti-CD3. En ratas inmunizadas, el análisis reveló un incremento en la infiltración de células T CD3+, en la médula oblongada y en el cerebelo, en la fase aguda de la enfermedad con

respeco a las ratas no inmunizadas (**Figura 42**). La infiltración se localizó preferentemente en áreas perivasculares. La infiltración linfocitaria persistió en la fase de remisión, en las dos áreas del cerebro examinadas y no observamos que el ácido elágico redujera la presencia de células T (**Figura 42**).

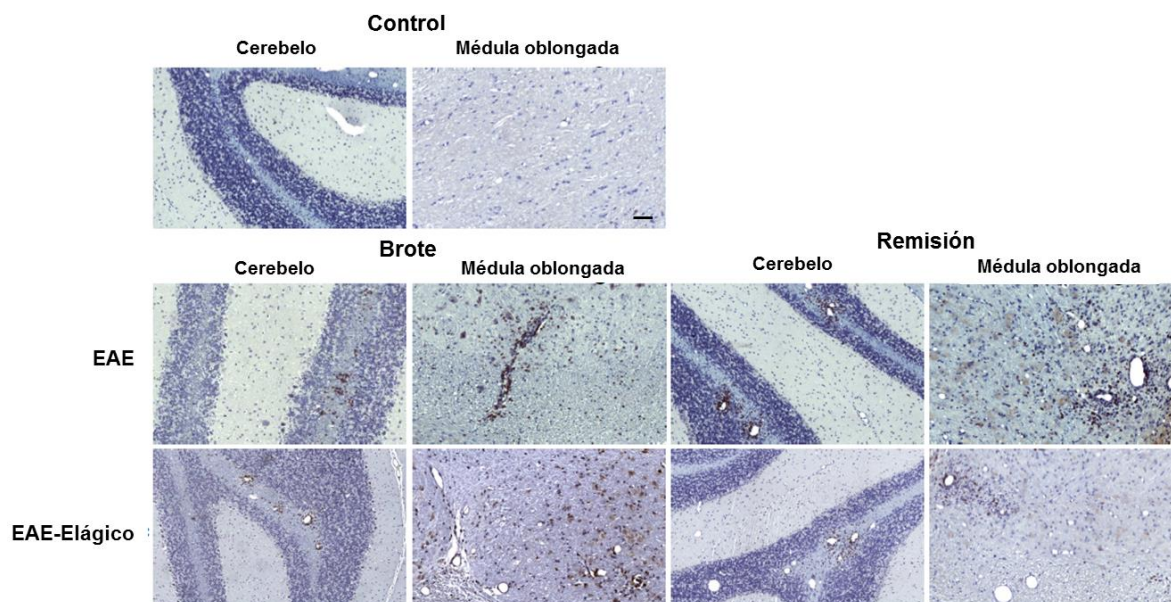


Figura 42. Efectos del ácido elágico en células T CD3+ marcadas en ratas EAE. El cerebelo y la médula oblongada de controles, EAE (brote y remisión) y ratas EAE tratadas con ácido elágico (EAE+elágico) (brote y remisión), fue inmunodetectado por células T CD3+ (áreas teñidas de marrón) como se indica en el apartado de **MÉTODOS 13**. Los datos son representativos de tres animales por grupo. Escala de la barra = 100 μ m.

Como resultado de la activación inmune, se produce una activación de la microglía (macrófagos residentes en el SNC) (Howell, Rundle y cols. 2010). Para monitorizar esta activación, examinamos en cortes de cerebelo y médula la inmunoreactividad frente a Iba1, un marcador de activación de la microglía. Se observó un alto nivel de microglía activada tanto en la fase aguda como de remisión de la enfermedad en las ratas inmunizadas comparadas con las ratas control, en ambas regiones del cerebro examinadas (**Figura 43**). No se encontraron diferencias cuantitativas en la expresión de microglía activada entre EAE tratadas y no tratadas con ácido elágico, independientemente de la región analizada en la fase de la enfermedad (no se muestran los datos).

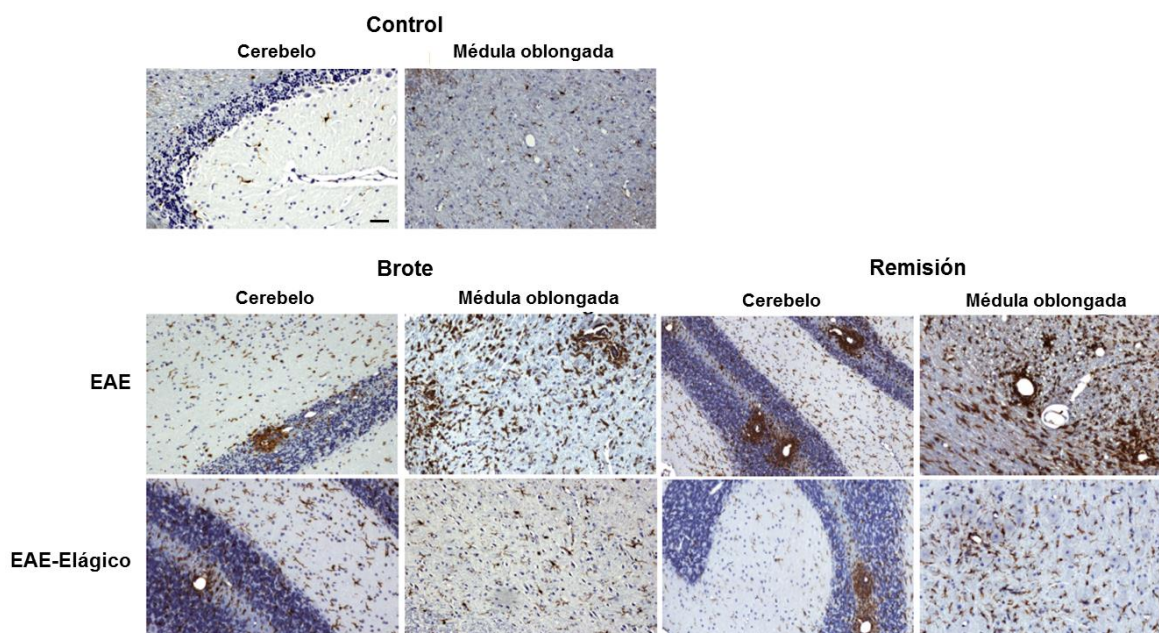


Figura 43. Efectos del ácido elágico en Iba-1 marcadas en ratas EAE. El cerebelo y la médula oblongada de controles, EAE (brote y remisión) y ratas EAE tratadas con ácido elágico (EAE+elágico) (brote y remisión), fue inmunodetectado para Iba-1 (áreas teñidas de marrón) como se indica en el apartado de **MÉTODOS 13**. Los datos son representativos de tres animales por grupo. Escala de la barra = 100 μ m.

2.3. Análisis de la expresión de proteína básica de mielina mediante western-blot

El contenido de proteína básica de mielina (MBP) en el tejido del cerebro es considerado un indicador cuantitativo de la integridad de la mielina (Slavin, Bucher y cols. 1996). Por ello realizamos el western-blot de lisados totales de corteza cerebral y posterior inmunodetección con un anticuerpo anti-MBP. La concentración de MBP fue significativamente menor durante el período de brote de la enfermedad, recuperándose en el período de remisión, a pesar de que no se alcanzaron los valores normales encontrados en los controles (**Figura 44**). El contenido de MBP en la EAE en la fase de brote fue menor que el detectado en las ratas no-inmunizadas control. Es destacable que en las ratas tratadas con ácido elágico el contenido de MBP no experimentó un descenso, y fue significativamente superior al observado en ratas no tratadas con el polifenol tanto en el periodo de brote y como en el de remisión. En ratas no-inmunizadas (control), la administración oral de ácido elágico no afectó a los contenidos de MBP (**Figura 44**).

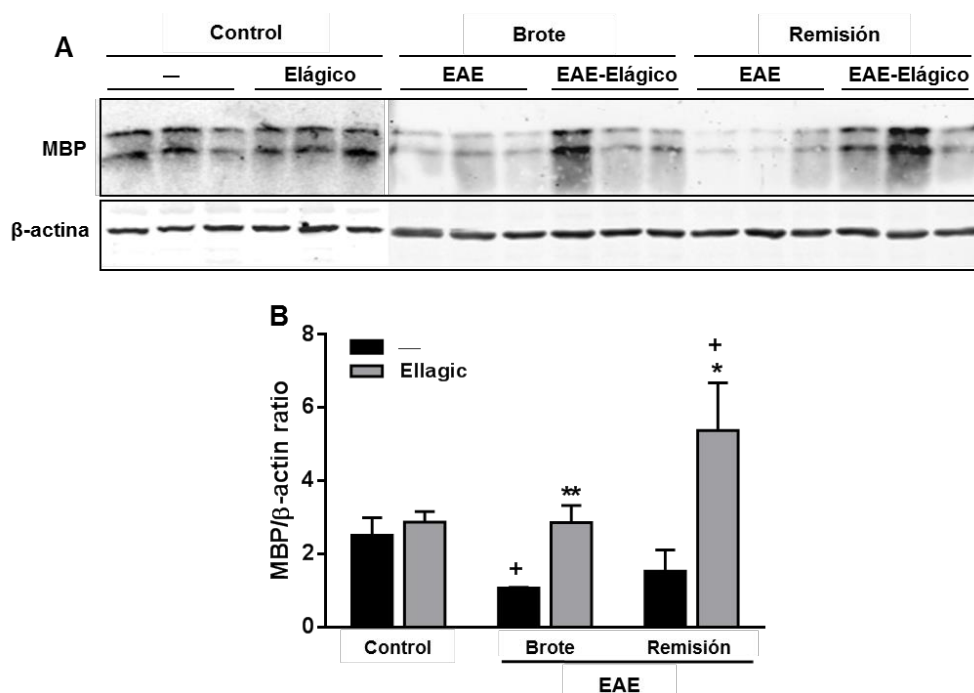


Figura 44. Efectos del tratamiento del ácido elágico en el contenido de la proteína básica de mielina (MBP) en la corteza cerebral de ratas EAE. (A) Analisis por western-blot de MBP en lisados totales de la corteza cerebral en ratas control, control+elágico, EAE (brote y remisión) y EAE+elágico (brote y remisión). Se muestran los resultados de 3 ratas representativas de los 5 animales sacrificados por grupo. (B) Análisis densitométrico de MBP normalizado por el valor de β -actina de la corteza cerebral de los 5 animales sacrificados para cada grupo. Los resultados se expresan como media $\pm$ SEM de cinco ratas por grupo analizado por triplicado. La comparación estadística mostrada es EAE frente EAE+elágico (* $p < 0.05$ y ** $p < 0.01$); y controles frente EAE (brote y remisión) o control+elágico frente EAE+elágico (brote y remisión) (+ $p < 0.05$).

2.4. Análisis lipidómico de cerebro y médula espinal de ratas EAE

Como se menciona en la introducción, la mielina es rica en esfingolípidos (Cermenati, Mitro y cols. 2015). Por ello, examinamos la composición de Sulfátidos (Sulf) de la corteza de cerebro por MALDI-TOF, aprovechándonos de la excelente sensibilidad demostrada para esta clase de lípidos. Se observó un aumento de Sulf por acción del tratamiento con ácido elágico en los distintos grupos de ratas (**Figura 45**). Animados por los resultados, realizamos un análisis más exhaustivo de la composición de lípidos empleando LC-MS/MS.

El análisis lipidómico en corteza cerebral y médula espinal de fosfatidilcolina (PC), lisofosfatidilcolina (LPC), fosfatidiletanolamina (PE), fosfatidilserina (PS), fosfatidilinositol

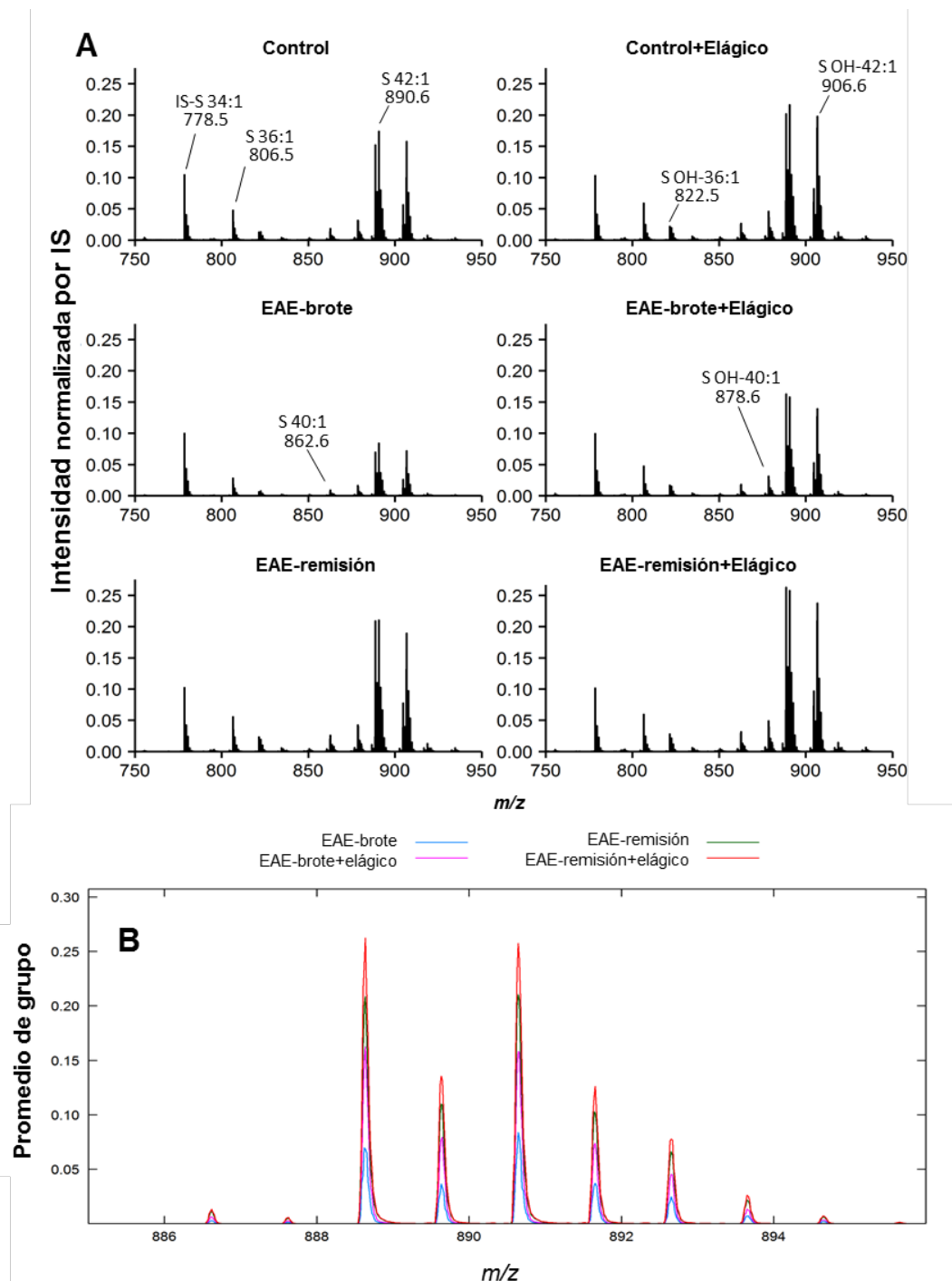


Figura 45. Análisis de la fracción de Sulf en corteza cerebral de ratas mediante MALDI-TOF. Los lípidos de la corteza cerebral fueron extraídos, fraccionados por HPLC-ELSD y posteriormente analizados por MALDI según se describe en el apartado de **MÉTODOS 9**. **(A)** Espectros MALDI de la fracción de Sulf de 5 animales por grupo: ratas control y EAE (EAE-brote y EAE-remisión) con o sin tratamiento de ácido elágico. Las especies de Sulf fueron detectadas en el modo negativo como aductos $[M-H]^-$. **(B)** Comparación del promedio de las señales de 5 animales por cada grupo: EAE (brote y remisión) con o sin tratamiento. S representa las moléculas de Sulf que contienen esfingosina (d18:1) mientras que S OH- es para la presencia de esfingosina hidroxilada (t18:1).

Tabla 13. Análisis de lípidos en corteza cerebral en ratas EAE tras tratamiento con ácido elágico.

Lípidos del cerebro de ratas control y EAE (EAE-brote y EAE-remisión) con o sin tratamiento de ácido elágico. Los niveles de clase de lípido (nmol/mg de proteína) de fosfatidilcolina (PC), lisofosfatidilcolina (LPC), fosfatidiletanolamina (PE), fosfatidilserina (PS), fosfatidilinositol (PI), triglicéridos (TG) hexosilceramidas (HexCer), esfingomielinas (SM), ceramida (Cer), lactosilceramida (LacCer) y sulfátidos (Sulf) fueron obtenidos de medidas individuales de especies lipídicas de las misma clase medidas por LC-MS. El colesterol libre (FC) fue medido por HPLC.ELSD. Los resultados (media $\pm$ SEM) son representativos de 5 animales de cada grupo. La comparación estadística mostrada es de EAE-brote frente a control (^ap<0.05), EAE-brote frente a EAE-remisión (^bp<0.05); EAE-brote+Elágico frente a EAE-brote (^cp<0.05) y EAE-remisión+Elágico frente a EAE-remisión (^dp<0.05).

	Control	EAE-brote	EAE-remisión	Control	EAE-brote	EAE-remisión
Elágico	-	-	-	+	+	+
FC	507.68 $\pm$ 35.42	468.57 $\pm$ 49.37	633.56 $\pm$ 70.31	514.92 $\pm$ 36.45	661.96 $\pm$ 129.38	555.04 $\pm$ 44.28
PC	288.78 $\pm$ 9.21	263.93 $\pm$ 29.14	321.02 $\pm$ 25.81	314.47 $\pm$ 14.89	275.87 $\pm$ 30.89 ^c	303.67 $\pm$ 14.6
LPC	2.87 $\pm$ 0.11	2.58 $\pm$ 0.26	3.56 $\pm$ 0.19 ^b	2.99 $\pm$ 0.15	3.21 $\pm$ 0.35	3.13 $\pm$ 0.15
PE	249.31 $\pm$ 12.04	191.82 $\pm$ 22.27	259.55 $\pm$ 20.75 ^b	274.72 $\pm$ 18.12	230.53 $\pm$ 34.35	237.65 $\pm$ 13.16
PS	163.8 $\pm$ 12.52	129.88 $\pm$ 13.92	193.53 $\pm$ 21.65 ^b	170.53 $\pm$ 13.08	134.71 $\pm$ 26.05	178.3 $\pm$ 11.98
PI	11.38 $\pm$ 0.95	14.15 $\pm$ 2.35	14.25 $\pm$ 1.39	14.8 $\pm$ 0.43	9.96 $\pm$ 1.29 ^c	13.45 $\pm$ 1.43
TG	1.31 $\pm$ 0.07	1.52 $\pm$ 0.14	1.35 $\pm$ 0.05	1.36 $\pm$ 0.06	1.31 $\pm$ 0.05	1.31 $\pm$ 0.1
HexCer	42.27 $\pm$ 3.96	31.37 $\pm$ 5.87 ^a	57.02 $\pm$ 14.23	50.13 $\pm$ 6.31	53.5 $\pm$ 4.1 ^c	81.52 $\pm$ 4.94
SM	16.95 $\pm$ 1.94	10.74 $\pm$ 2.29 ^a	26.29 $\pm$ 8.27 ^b	20.48 $\pm$ 3.55	21.59 $\pm$ 3.72 ^c	33.81 $\pm$ 6.01
Cer	10.28 $\pm$ 0.97	6.39 $\pm$ 0.88 ^a	9.34 $\pm$ 0.84 ^b	9.84 $\pm$ 0.85	7.47 $\pm$ 1.17	6.86 $\pm$ 0.52 ^d
LacCer	2.06 $\pm$ 0.45	0.59 $\pm$ 0.09 ^a	2.02 $\pm$ 0.53 ^b	1.16 $\pm$ 0.2	2.3 $\pm$ 0.9	1.81 $\pm$ 0.45
Sulf	6.5 $\pm$ 0.58	3.79 $\pm$ 0.59 ^a	8.96 $\pm$ 2.25 ^b	7.41 $\pm$ 1.07	7.49 $\pm$ 1.01 ^c	11.74 $\pm$ 2.36

(PI), colesterol libre (FC) y triglicéridos (TG) no detectó diferencias entre las ratas EAE y las ratas control (**Tabla 13**). Tampoco se encontraron diferencias entre el periodo de brote y el de remisión en las ratas inmunizadas. Sin embargo, el contenido de esfingolípidos cambió notablemente durante la fase aguda de la enfermedad. Así, el contenido en corteza cerebral de todas las clases de esfingolípidos medidos, hexosilceramidas (HexCer), esfingomielinas (SM), Sulf, ceramidas (Cer) y lactosilceramidas (LacCer) disminuyó durante la fase aguda (EAE-brote) comparado con las ratas control, volviendo a valores normales en la fase de remisión (EAE-remisión), alcanzándose valores similares a los de las ratas no-inmunizadas (**Figura 46A**).

La concentración de esfingolípidos en la médula espinal disminuyó durante la fase aguda de EAE y se mantuvo en valores bajos en la fase de remisión de la EAE (**Figura 46B**), con la excepción del contenido de Cer, que aumentó en lugar de disminuir, durante la fase aguda de EAE en la médula espinal respecto a los controles.

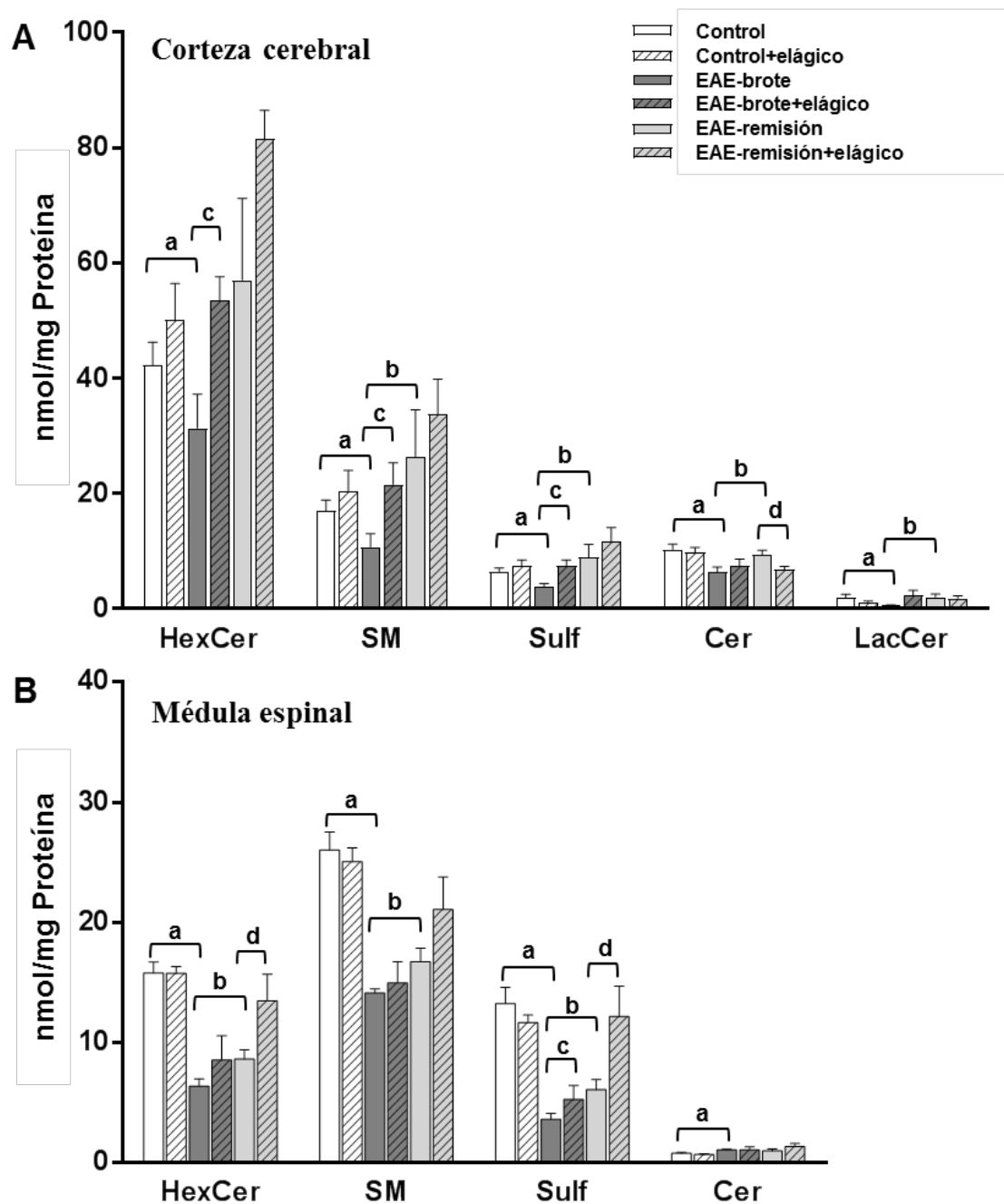


Figura 46. Contenido de esfingolípidos en corteza cerebral y médula espinal en ratas EAE y efecto del tratamiento con ácido elágico. Contenido de esfingolípidos en la corteza cerebral (A) o en la médula espinal (B) de control y ratas EAE (EAE-brote y EAE-remisión) tratadas o no con ácido elágico. Los esfingolípidos, hexosilceramidas (HexCer), sulfátidos (Sulf), ceramidas (Cer), esfingomielina (SM) y lactosilceramidas (LacCer) fueron medidos mediante LC-MS/MS como se describe en el apartado de **MÉTODOS 10**. Los resultados son media $\pm$ SEM de 5 animales por grupo. La comparación estadística mostradas es de control frente a EAE-brote (a, $p < 0.05$); EAE-brote frente a EAE-remisión (b, $p < 0.05$); EAE-brote frente a EAE-brote+elágico (c, $p < 0.05$) y EAE-remisión frente a EAE-remisión+elágico (d, $p < 0.05$).

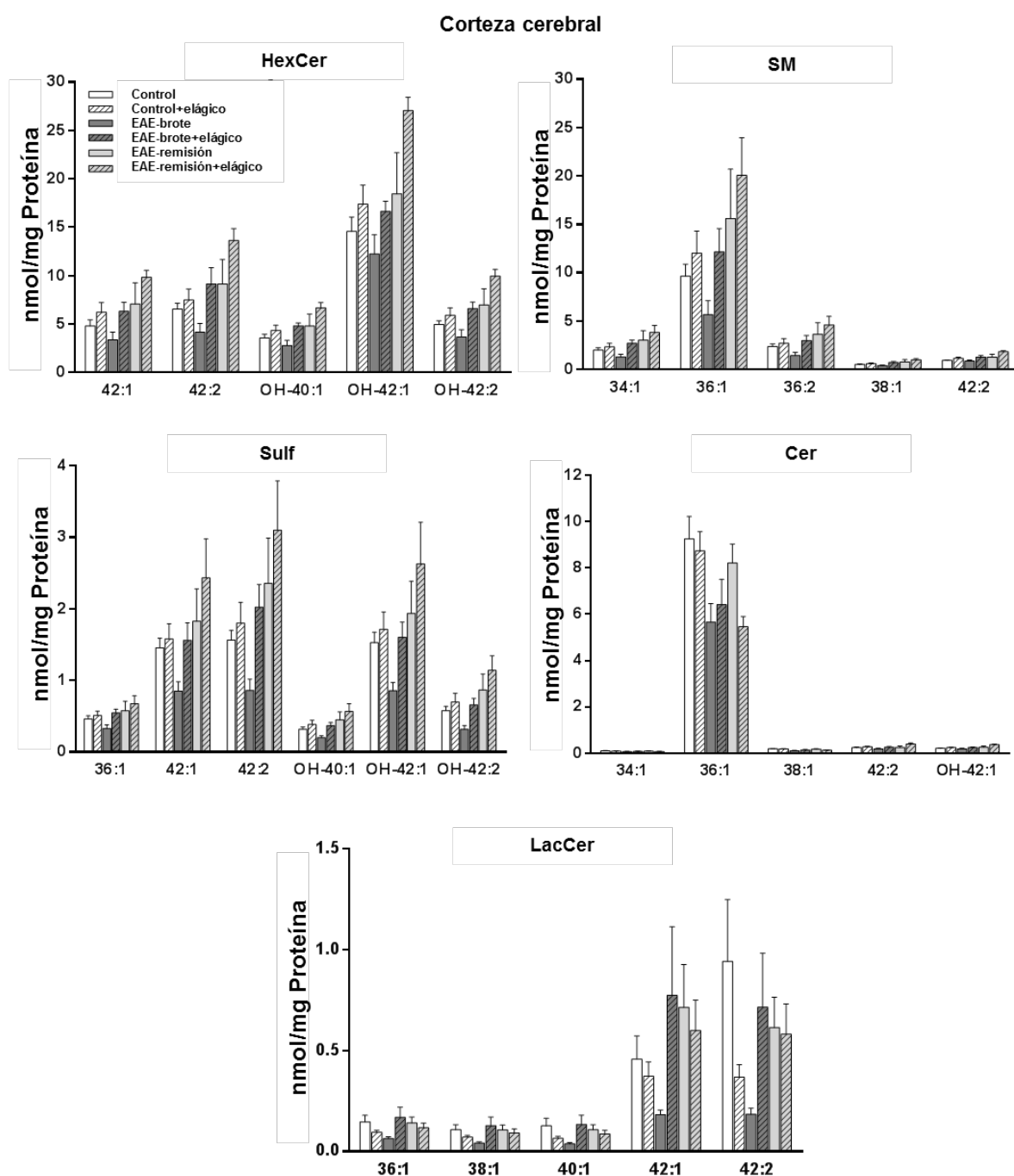


Figura 47. Especies moleculares de esfingolípidos en corteza cerebral de ratas EAE y controles. Se midieron las especies moleculares de esfingolípidos en corteza cerebral de controles y ratas EAE (brote y remisión), tratadas o no con ácido elágico, mediante LC-MS/MS como se describe en el apartado de **MÉTODOS 10**. Los resultados son media $\pm$ SEM, n=5 animales por grupo.

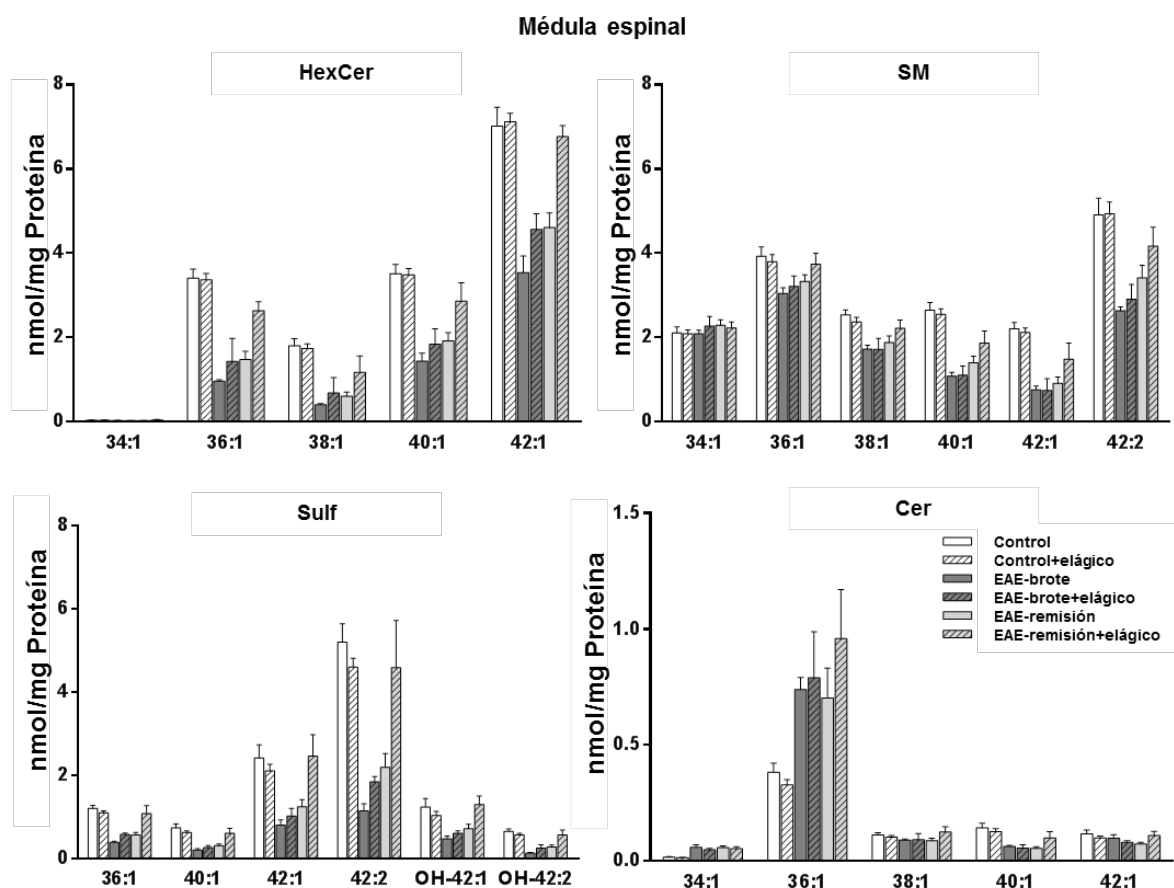


Figura 48. Especies moleculares de esfingolípidos en médula espinal de ratas EAE y controles. Se midieron las especies moleculares de esfingolípidos en médula espinal de controles y ratas EAE (brote y remisión), tratadas o no con ácido elágico, mediante LC-MS/MS como se describe en el apartado de **MÉTODOS 10**. Los resultados son media $\pm$ SEM, $n=5$ animales por grupo.

En las ratas no-inmunizadas, el tratamiento con ácido elágico no indujo cambios en los niveles de esfingolípidos en el cerebro. Es notable el efecto del ácido elágico en ratas EAE, de hecho, en la corteza cerebral durante la fase aguda de la enfermedad el contenido de SM, Sulf y HexCer fue superior al de las ratas EAE que no recibieron ácido elágico (**Figura 46A**).

Los cambios observados a nivel de grupo lipídico tanto por la inmunización como por el ácido elágico fueron similares a los observados en todas las especies moleculares pertenecientes a cada clase de esfingolípidos estudiado (**Figuras 47 y 48**, y **Tabla C2** en Anexo).

Finalmente, observamos una estrecha correlación entre el contenido de MBP en la corteza cerebral y las concentraciones de HexCer, Sulf y SM (**Figura 49**). Dicha correlación se mantuvo

cuando cada grupo fue analizado por separado teniendo en cuenta la inmunización, la fase de la enfermedad y el tratamiento con ácido eláxico. Este hallazgo sugiere que los efectos de la inmunización y del tratamiento con ácido eláxico están asociados a los cambios observados en el contenido de MBP y esfingolípidos.

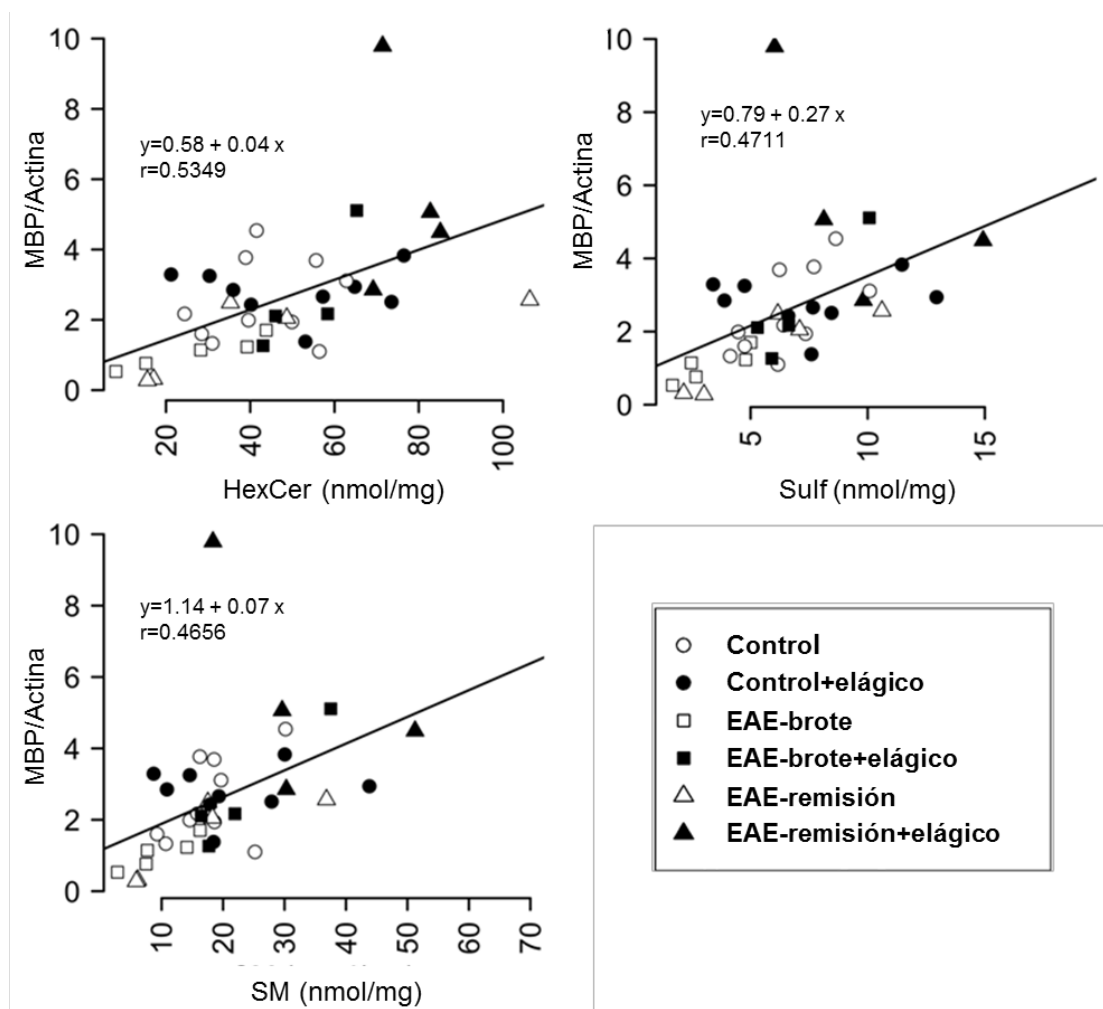


Figura 49. Correlación entre expresión de proteína básica de mielina (MBP) y contenido de esfingolípidos en la corteza cerebral en ratas EAE. Niveles de expresión de MBP normalizado por actina (MBP/Actina) y el contenido de esfingolípidos [hexosilceramidas (HexCer), sulfátidos (Sulf) y esfingomielina (SM)] en la corteza cerebral. Control, control+Eláxico, EAE (brote y remisión) y EAE+Eláxico (brote y remisión). r: coeficiente de correlación de Pearson.

2.5. Estudio de la síntesis de ceramida en células gliales

Motivados por la estrecha relación observada entre el incremento de los niveles de esfingolípidos y el tratamiento con ácido elágico, decidimos investigar si este compuesto o alguno de sus derivados aumentan la síntesis de esfingolípidos.

Al no disponer de un modelo celular de neurona, empleamos las líneas celulares de glioma de rata C6 y de oligodendrocitos humanos (oligodendroglioma), células HOG, que son modelos de tumores cerebrales, previamente utilizados en estudios para evaluar la eficacia de tratamientos (Barth y Kaur 2009).

Parece lógico utilizar modelos de glía y oligodendrocito, dos tipos celulares encargados de proteger y mantener la estructura de la mielina y las neuronas, puesto que el efecto de ácido elágico en los niveles de esfingolípidos podría estar relacionado con estas estructuras. Las células HOG son un modelo de oligodendrocito, donde se expresan proteínas características de la mielina, como MBP o MOG (Buntinx, Vanderlocht y cols. 2003). La célula C6 es un astrocito, el cual no sólo juega un papel muy importante en la homeostasis neuronal sino también en los procesos de inflamación, relacionados con la patogenia de la EM (Rajabi, Parinejad y cols. 2011).

En ninguno de los modelos celulares empleados, el ácido elágico tuvo efecto en la síntesis de Cer (**Figura 50**). Sin embargo, en células C6, el tratamiento con urolitinas A y B, el principal compuesto soluble derivado del metabolismo bacteriano del ácido elágico dentro del intestino, incrementó la síntesis de ceramidas, haciéndolo más intensamente las urolitinas A que las urolitinas B. En las células HOG, sólo el tratamiento con urolitinas A estimuló significativamente la síntesis de Cer.

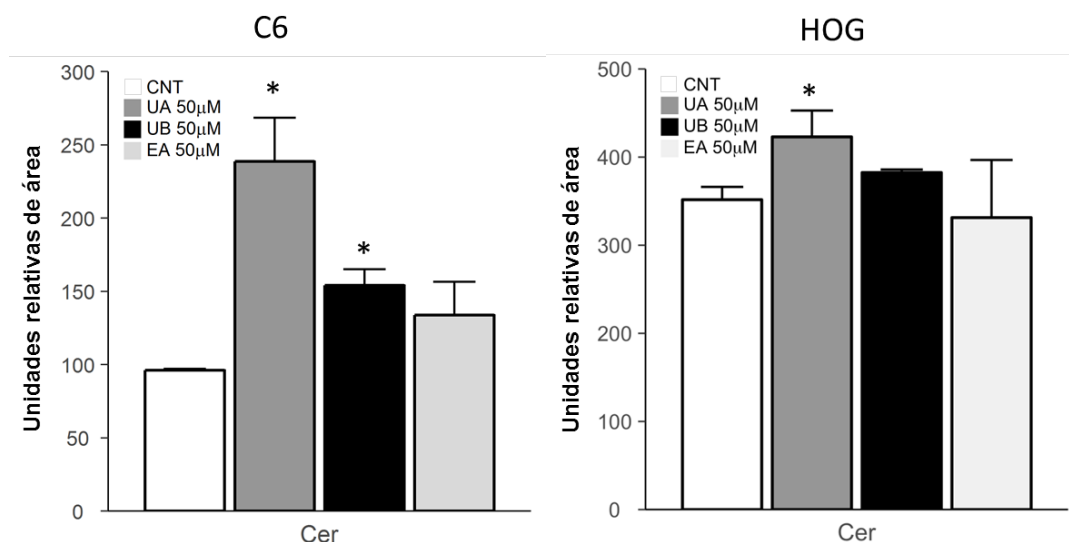


Figura 50. Efectos del ácido elágico en la síntesis de ceramida en células C6 de glioma de rata y en células HOG de oligodendrocito humano. Las células fueron incubadas durante 4h con ácido elágico (EA, 50 µM), urolitina A (UA, 50 µM) o urolitina B (UB, 50 µM), en presencia de 2 µCi/mL de ^3H -palmitato acomplejado con albúmina de suero bovino (BSA). Las células control fueron expuestas a ^3H -palmitato complejado con BSA. La incorporación del ^3H -palmitato (precursor de ceramidas) a ceramida fue monitorizado mediante HPLC acoplado a un detector de radiación, como se describe en el apartado de **MÉTODOS 15**. Las trazas de radioactividad fueron integradas y corregidas por la proteína total y expresada en unidades relativas de área. Los resultados son media $\pm$ SEM de tres experimentos independientes. La comparación estadística mostrada son tratamiento frente a control (* $p < 0.05$).

2.6. Expresión de genes implicados en la síntesis de esfingolípidos.

Los cambios observados en la concentración de ceramidas en los modelos celulares empleados (C6 y HOG) sugieren un efecto del ácido elágico sobre la actividad de las enzimas responsables de su síntesis (*ceramida sintasa*, *serin palmitoil transferasa* y *dihidroceramida desaturasa-1*). Decidimos explorar la posibilidad de que el aumento en la concentración de esfingolípidos en el cerebro pudiera deberse a cambios en la expresión de las enzimas responsables de su síntesis (**Figura 51**). No se analizó la expresión de *ceramida sintasa*, *serin palmitoil transferasa* y *dihidroceramida desaturasa-1*, pues es conocido que no son reguladas por expresión (Laviad, Kelly y cols. 2012).

. No se obtuvieron diferencias significativas en los genes estudiados en función de la enfermedad y del tratamiento con ácido elágico (**Figura 51**).

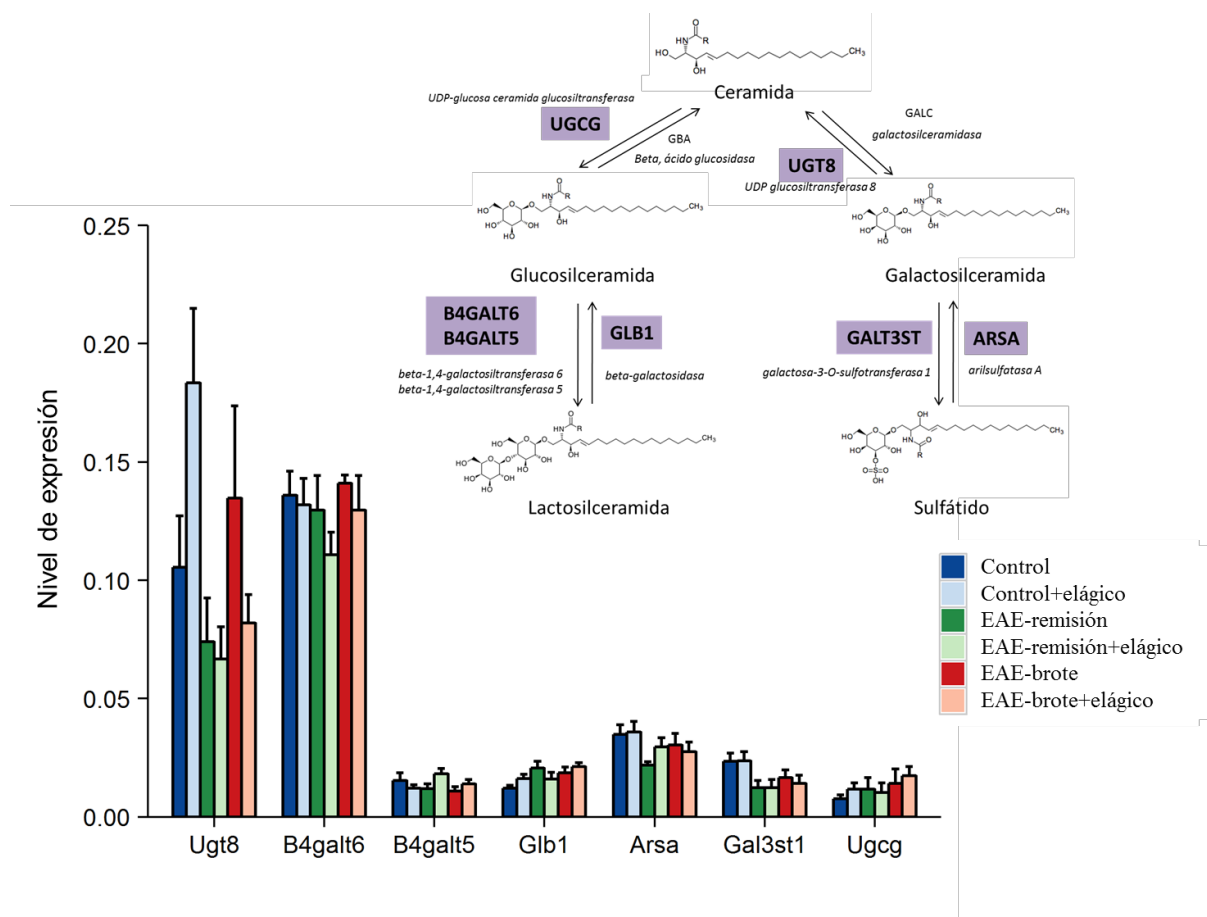


Figura 51. Resultados de expresión en corteza cerebral de los genes estudiados en las vías de síntesis de esfingolípidos mediante qRT-PCR. El RNA total se extrajo y se transcribió. La expresión de los genes de interés se realizó en un sistema LightCycler 480 mediante el uso de cebadores específicos para cada mRNA. Todos los análisis se realizaron por triplicado, y el número de copias del gen estudiado se normalizó frente al gen la proteína ribosomal rRNA 18S. Los resultados se expresan como media $\pm$ SEM de cuatro animales por grupo.

3. Estudio lipidómico del LCR en pacientes con esclerosis múltiple

En el estudio previo realizado en animales con EAE, modelo experimental de esclerosis múltiple (EM), observamos una estrecha correlación entre las concentraciones de las especies de esfingolípidos más abundantes en la mielina y la fase de brote en la enfermedad. Motivados por estos resultados, nos planteamos si la concentración de esfingolípidos medida en el líquido cefalorraquídeo (LCR), al ser por motivos obvios inaccesible la obtención de una muestra de cerebro, pudiera ser un marcador de desmielinización en estos pacientes. Para ello, realizamos un análisis lipidómico por LC-MS/MS de las especies de sulfátidos (Sulf), hexosilceramidas (HexCer) y ceramidas (Cer) en LCR, en pacientes con EM y controles.

Para el estudio se reclutaron un total de 61 pacientes del Servicio de Inmunología del Hospital Ramón y Cajal (Madrid), de los cuales 40 son pacientes diagnosticados de EM remitente-recurrente (RR) (**Tabla 6**). Los pacientes control fueron elegidos con diagnóstico de enfermedades que podrían estar relacionadas con EM por su sintomatología, como mielopatía, ictus, pseudotumor cerebral, epilepsia, etc. Se obtuvo el LCR mediante punción de la médula espinal durante un examen de rutina en el momento de la remisión de los síntomas, excepto 3 pacientes de EM en los que se les extrajo el LCR en el momento del brote, que fueron finalmente excluidos. Se realizó un estudio de bandas oligoclonales IgG (BOCG) e IgM (BOCM) en el LCR mediante isoelectroenfoque, de los cuales 29 pacientes con EM y 6 controles tenían BOCG, mientras que 14 pacientes y 3 controles obtuvieron un estudio positivo BOCM. A los que presentaron BOCM se les determinó el grupo de lípidos a los que eran reactivos mediante isoelectroenfoque y posterior inmunotransferencia, observándose una reactividad mayoritaria a las clases fosfatidilcolina, esfingomielina, gangliósidos o Sulf, y sus combinaciones. Como se observa en la **Tabla 6**, mientras que la proporción en la variable del sexo se mantiene estable entre los diferentes grupos de pacientes, existe un claro aumento en el porcentaje de pacientes con EM que presentan BOCG en el LCR, y en menor medida los que presentan BOCM.

Tabla 6. Datos demográficos de pacientes control y pacientes con EM. Datos de los pacientes incluidos en el estudio. IgG e IgM es el estudio de bandas oligoclonales que se realizó al total de los pacientes del estudio, dividiendo en los que presentaban (+) y los que no (-). Los datos se representan como el número absoluto de casos de cada grupo y entre paréntesis el porcentaje por sexo, IgG e IgM, y en la edad el rango de edad mínima y máxima.

		Control (n=21)	EM (n=37)
Sexo	<i>Mujer</i>	15 (71%)	25 (68%)
	<i>Hombre</i>	6 (29%)	12 (32%)
Edad		42.4 (32.8-50.2)	47.7 (29.2-56.3)
IgG	+	6 (29%)	29 (78%)
	-	15 (71%)	8 (22%)
IgM	+	3 (14%)	14 (38%)
	-	18 (86%)	23 (62%)

En el estudio lipídico de esfingolípidos (Cer, HexCer y Sulf) mediante LC-MS/MS, las concentraciones tanto de Sulf como de Cer permanecen estables, 52.8 ± 25.2 nmol/L frente a 52.8 ± 22.8 nmol/L en pacientes con EM para Sulf y 12.2 ± 4.6 nmol/L frente a 12.2 ± 3.5 nmol/L en pacientes con EM para Cer. En el caso de HexCer hubo un descenso de los niveles en pacientes

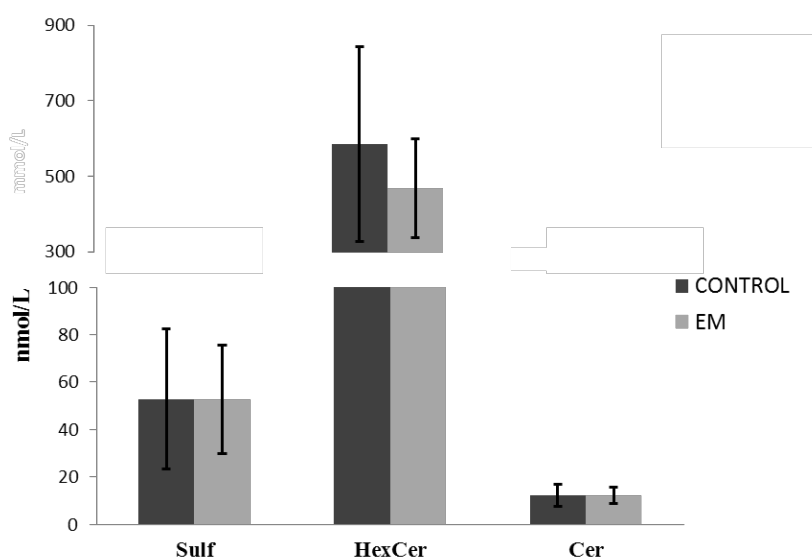


Figura 52. Contenido de esfingolípidos en LCR de pacientes control y con EM. Los resultados de cada grupo lipídico fueron calculados por suma de las distintas especies lipídicas para cada grupo en nmol/L, y se expresa como media $\pm$ SD (n control = 21; n EM = 37). No existen diferencias estadísticamente significativas.

con EM, de 586.2 ± 256.7 nmol/L a 468.8 ± 130.3 nmol/L. En cualquier caso, no se obtuvieron diferencias significativas estadísticamente para ninguno de los tres grupos lipídicos estudiados (**Figura 52**).

Puesto que la presencia de bandas oligoclonales IgM (BOCM) en LCR de pacientes con EM está relacionado con una evolución más agresiva de la enfermedad (Villar, Sádaba y cols. 2005) y la presencia de bandas oligoclonales de IgG (BOCG) con procesos inflamatorios intratecales (Bonnan 2015), analizamos los niveles de esfingolípidos en función de la presencia de BOCG y/o BOCM reactivas a lípidos en pacientes con EM. Sin embargo, no observamos diferencias significativa en los grupos lipídicos estudiados a este respecto (**Tabla 14**).

Tabla 14. Concentración de Sulf, HexCer y Cer en LCR de pacientes control y con EM. Los resultados de cada grupo lipídico fueron calculados por suma de las distintas especies lipídicas para cada grupo en nmol/L, y se expresa como media $\pm$ SD (n control = 21; n EM = 37). EM IgG son pacientes que presentan (+) o no (-) BOCG y EM IgM los pacientes que presentan (+) o no (-) BOCGM. No existen diferencias significativas.

	CONTROL	EM (IgG)		EM (IgM)	
		Positivo	Negativo	Positivo	Negativo
Sulf (nmol/L)	52.8 $\pm$ 25.2	54.3 $\pm$ 24.3	44.8 $\pm$ 11.7	52.5 $\pm$ 25.2	52.9 $\pm$ 21.8
HexCer (nmol/L)	586.2 $\pm$ 256.7	479.9 $\pm$ 128.0	401.3 $\pm$ 80.2	508.2 $\pm$ 196.3	451.8 $\pm$ 94.7
Cer (nmol/L)	12.2 $\pm$ 4.6	12.7 $\pm$ 2.9	8.8 $\pm$ 2.7	12.0 $\pm$ 3.7	12.3 $\pm$ 3.6

Se analizaron 48 especies estudiadas de las clases lipídicas estudiadas: 12 especies de Sulf, 13 de Cer y 23 HexCer. No se observaron diferencias significativas de las especies de Sulf, HexCer y Cer entre los dos grupos de pacientes (**Figura 53A**). Del mismo modo, se estudió si alguna especie lipídica variaba en función de la presencia de BOCG y BOCM, no evidenciándose diferencias significativas para ninguna de las 48 especies analizadas de los tres grupos lipídicos (**Figura 53B**).

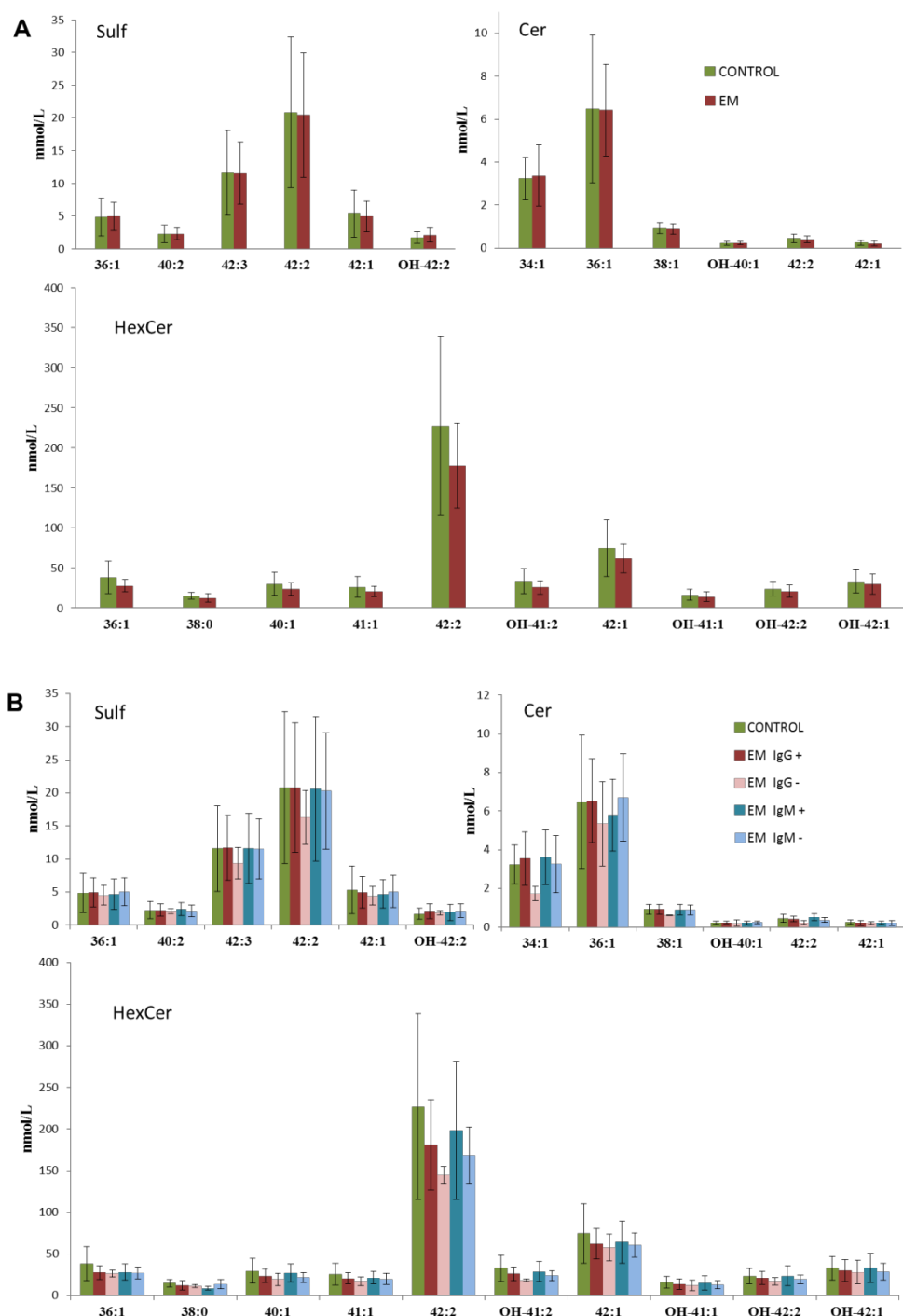


Figura 53. Composición de las principales especies de esfingolípidos en LCR de pacientes control y con EM. A) Especies mayoritarias de Sulf, HexCer y Cer en pacientes con EM y controles. **B)** Efecto de la presencia de BOCG y BOCM en las especies mayoritarias de Sulf, HexCer y Cer en pacientes con EM y controles. Los resultados se expresan como media $\pm$ SD (n control = 21; n EM = 37). No existen diferencias significativas. EM IgG + son los pacientes con EM con bandas oligoclonales IgG y EM IgG - los que no las presentaban. EM IgM + son los pacientes con EM que presentan bandas oligoclonales IgM y EM IgM - los que no las presentaban.

VI. DISCUSIÓN

1. Análisis lipidómico del plasma y de las lipoproteínas del plasma por MALDI-TOF

Los avances en la espectrometría de masas (MS) han facilitado la cuantificación de cientos de especies lipídicas en plasma (Quehenberger, Armando y cols. 2010). La aproximación más común para la generación de datos cuantitativos de especies lipídicas es el uso de técnicas de ionización suaves, como la ionización electrospray (ESI), ya sea mediante la infusión directa del extracto de lípidos al espectrómetro de masas o realizando una separación previa por cromatografía de líquidos (LC). Ambos métodos presentan ventajas y desventajas específicas, como se mencionó en el apartado de **INTRODUCCIÓN 2 (Tabla 5, en página 38)** (Han, Yang y cols. 2012, Cajka y Fiehn 2014). La ionización MALDI-TOF es una técnica de ionización suave muy utilizada en proteómica (Park, Bae y cols. 2012) y glicómica (Jeong, Kim y cols. 2012) para establecer la identidad de una proteína o la secuencia concreta de restos glucosídicos anclados a la misma. También se ha utilizado para la caracterización de los lípidos, sobre todo para estudiar la distribución de lípidos en tejidos (empleando la técnica de imagen MALDI) (Berry, Hankin y cols. 2011). Debido a su fácil manejo, alta sensibilidad y rendimiento, bajo riesgo de contaminación cruzada entre muestras y su robustez frente a la presencia de impurezas presentes en los extractos de tejidos o fluidos corporales, MALDI-TOF es una herramienta prometedora para la realización de estudios lipidómicos, pero pocos trabajos han explorado su potencial como una herramienta de cuantificación (Fuchs, Suss y cols. 2010). Además, MALDI ofrece algunas ventajas prácticas sobre el ESI, ya que es una tecnología ampliamente extendida en laboratorios clínicos hospitalarios para la identificación de bacterias (Clark, Kaleta y cols. 2013), lo que representa un atractivo con vistas a su difusión en el campo de los biomarcadores.

Primero, confirmamos que la técnica MALDI-TOF era una herramienta reproducible y cuantitativa, usando una matriz y un diluyente apropiados. Basándonos en artículos previos (Sun,

Yang y cols. 2008), seleccionamos 9-aminoacridina (9-AA) en combinación con acetonitrilo/isopropanol (60/40) como la condición óptima para el análisis de lípidos tanto en el modo de ion positivo como negativo. Estudios anteriores habían empleado ácido 2,5-dihidroxibenzoico como matriz para el análisis de especies de fosfolípidos (Schiller, Suss y cols. 2007), pero nosotros observamos un mejor rendimiento en términos de relación señal/ruido (S/N) cuando empleamos 9-AA. Esta mejora se aprecia especialmente en valores de m/z por debajo de 650, lo que permite un análisis de especies de LPC, que tienen un intervalo de m/z de 480-600. La eficiente solubilización del analito y la matriz es fundamental para obtener resultados reproducibles con la metodología de MALDI. Como las especies de TG eran insolubles en acetonitrilo/isopropanol, las disolvimos en cloroformo y se mezcló en proporción 1:1 con matriz disuelta en acetonitrilo/isopropanol (60/40) dopada con acetato sódico, lo que permite una cristalización homogénea y un análisis preciso de los TG. Con nuestras condiciones experimentales, la linealidad de MALDI fue de tres órdenes de magnitud (0.2 a 200 unidades) y los resultados fueron reproducibles para siete clases de lípidos en plasma (TG, PC, LPC, PE, PI, SM y Sulf).

Si bien algunos estudios han mostrado datos cuantitativos obtenidos con MALDI-TOF para algunos lípidos como Sulf (Cheng, Sun y cols. 2010), PI (Johanson y Berry 2009), cardiolipinas (Angelini, Vitale y cols. 2012), esfingolípidos (Fujiwaki, Tasaka y cols. 2008) y ácidos biliares (Mims y Hercules 2003), nuestro trabajo es el primero en mostrar un análisis cuantitativo exhaustivo de las lipoproteínas del plasma por esta técnica. Para realizar una cuantificación de las distintas especies lipídicas, empleamos un estándar interno (IS) por clase. Como detectamos un claro descenso de la intensidad al aumentar la masa (asociado al aumento de la longitud de las cadenas de acilo), un fenómeno que ya ha sido descrito previamente para ESI-MS/MS (Koivusalo, Haimi y cols. 2001), se aplicó un factor de corrección para obtener resultados más precisos para PC, PE y TG. Sin embargo, en el análisis de TG también observamos una relación entre la ionización y el grado de insaturación de la cadena de acilo. Este efecto ha sido descrito para otras clases lipídicas analizadas por ESI-MS/MS (Koivusalo, Haimi y cols. 2001). Creemos que el aumento de sensibilidad de MALDI para los lípidos que contienen cadenas de acilo más cortas e insaturadas puede ser debido a una menor interacción molecular de las cadenas de acilo más cortas e insaturadas en la superficie de la placa MALDI (Koivusalo, Haimi y cols. 2001). Es importante señalar que debido a que el factor de corrección no corrige las diferencias en el grado de insaturación de la cadena de acilo de las especies lipídicas, la cuantificación realizada por MALDI es una cuantificación relativa. Este hecho no afecta a la

precisión ni a su utilidad comparativa cuando el objetivo es el de detectar las diferencias entre condiciones experimentales.

El análisis directo mediante MALDI-TOF del extracto lipídico total de plasma (sin fraccionar) sólo detectó especies de PC y LPC en el modo positivo y especies de PI en el modo negativo. El fraccionamiento entre lípidos neutros (CE y TG) y fosfolípidos empleando SPE, permitió el análisis de TG y la detección de especies de PE, aunque los resultados no fueron reproducibles. No obstante, concluimos que la fracción de fosfolípidos después de SPE no permitía el análisis de especies de PE pues, como han reflejado otros autores (Fuchs, Bischoff y cols. 2009), la alta presencia de PC interfiere en el análisis por la formación de aductos de PC en el forma $[M-CH_3]^+$. Por este motivo, decidimos separar las diferentes clases de lípido por HPLC-ELSD. La separación del extracto de lípido original con otras técnicas, como la cromatografía en capa fina (TLC) han sido aplicadas previamente para el análisis de mezclas complejas de lípidos por MALDI (Fuchs, Suss y cols. 2011). En la actualidad, existe un equipo comercial para realizar TLC-MALDI que permite eluir automáticamente las bandas de TLC y acoplar su análisis a un equipo MALDI (Luftmann, Aranda y cols. 2007). HPLC-ELSD permite realizar una colección guiada de fracción de lípidos sin la necesidad de procedimientos intermedios de tinción. Esto es importante en el análisis de PE, cuya detección en el plasma por TLC es difícil de lograr debido a su baja concentración en el plasma. Además, HPLC-ELSD permite obtener directamente la concentración de algunas de las clases de lípidos y compararlas con las obtenidas por MALDI. En general, la concentración de las clases en plasma obtenida mediante HPLC-ELSD y las obtenidas por MALDI fueron similares, con la excepción de las obtenidas para PE, para la cual se observaron diferencias notables (20 ± 0.4 y 132 ± 4.0 , respectivamente). Atribuimos las diferencias a la contaminación por especies de Sulf en el análisis de la fracción PE por MALDI.

Las concentraciones de las especies de TG, PC, PI, SM y LPC fueron similares a las encontradas en otros trabajos, realizados por más de diez metodologías diferentes (Quehenberger, Armando y cols. 2010). Por ejemplo, la suma de especies TG 52:2 más TG 52:3 representa el 55% en nuestro estudio frente al 33% en el estudio de Quehenberger y cols, PC 34:2 más PC 36:2 representan el 47% frente al 23%, PI 38:4 más PI 36:2 son el 75% frente al 49% y LPC 18:0 el 54% en nuestro estudio frente al 51% respecto al estudio de Quehenberger y cols (Quehenberger, Armando y cols. 2010). Sin embargo, ha de señalarse que la contribución de especies lipídicas respecto a su clase es siempre menor en experimentos LC-MS/MS debido al mayor número de moléculas detectadas mediante esta tecnología (Köfeler, Fauland y cols. 2012).

Colectivamente nuestros resultados apoyan la utilidad de la metodología mediante MALDI-TOF desarrollada en este trabajo para cuantificar el perfil lipídico del plasma y otros extractos lipídicos.

En la práctica clínica, el colesterol-HDL y colesterol-LDL son variables importantes para la evaluación del riesgo cardiovascular. La determinación del perfil de las especies lipídicas presentes en las lipoproteínas puede aportar información adicional para aclarar la implicación de los lípidos en algunas enfermedades y su posible utilización como biomarcadores. En este sentido, algunos estudios han demostrado que la función de las LDL está regulada por su contenido en glicerofosfolípidos y esfingolípidos (Lee, Lesimple y cols. 2006), apoyando la importancia de cuantificar estas especies en lipoproteínas del plasma de pacientes. Sin embargo, pocos son los estudios que han analizado cuantitativamente la composición lipídica de las lipoproteínas usando técnicas de MS (Schiller, Zschornig y cols. 2001; Wiesner, Leidl y cols. 2009). En este trabajo, hemos examinado cuantitativamente la composición de lípidos en las lipoproteínas de sujetos sanos. La mayoría de los glicerofosfolípidos del plasma (PC, PE, PE O-) fueron detectados en la fracción de HDL, representando el 47-59% del total de glicerofosfolípidos (PL) circulantes en plasma, comparado con el 60-62% descrito en estudios anteriores (Wiesner, Leidl y cols. 2009). Las LPC del plasma también fueron detectadas principalmente en HDL [79% en el presente estudio frente al 87% en el estudio de Wiesner y cols (Wiesner, Leidl y cols. 2009)]. Por el contrario, los CE y SM circulantes son predominantemente transportadas por las LDL [57% y 81%, respectivamente, comparado con el 50% y 60% respectivamente descrito en el estudio de Wiesner y cols (Wiesner, Leidl y cols. 2009)]. Los TG fueron el principal componente de las VLDL, con un 66% en el presente estudio frente al 45% en el trabajo de Montelongo y cols (Montelongo, Lasuncion y cols. 1992), una contribución que aumenta en pacientes hipertrigliceridémicos (Montelongo, Lasuncion y cols. 1992). En general, nuestros resultados son equiparables a los obtenidos por otros métodos de análisis (GC y LC-MS/MS-ESI) (Montelongo, Lasuncion y cols. 1992; Wiesner, Leidl y cols. 2009).

En términos de distribución de la proporción de clase de lípidos presente en cada lipoproteína, Wiesner y cols describieron que para las LDL un 26% del total son PL, 54% de CE y 19% de FC (Wiesner, Leidl y cols. 2009). En nuestro estudio hemos detectado: 19% PL, 59% CE y 15% FC. Para las HDL, la distribución en proporción fue 48% PL, 42% de CE y 10% de FC (Wiesner, Leidl y cols. 2009). En nuestro trabajo hemos detectado: 48% PL, 40% CE y 9% FC. En cuanto a la distribución de las clases de lípidos respecto a las LDL y las HDL

encontramos grandes similitudes entre nuestros resultados y los que describen Wiesner y col. (Wiesner, Leidl y cols. 2009). La principal discrepancia que encontramos fue en la proporción de las clases en las VLDL. Wiesner y cols reseña que el 40% son PL, 35% CE y 24% FC (Wiesner, Leidl y cols. 2009), en comparación con nuestro estudio donde el 7% son PL, 47% CE y 4% de FC. Hay que hacer notar que el contenido de TG en lipoproteínas no fue medido en el estudio de Wiesner y cols (Wiesner, Leidl y cols. 2009), y por ello, la contribución de PL puede estar sobreestimada en este estudio, especialmente en el caso de las VLDL. En las VLDL la cantidad de TG supera el 42% en nuestro trabajo y 54% en el estudio de Myher y cols (Myher, Kuksis y cols. 1981). Según nuestros datos, las VLDL y HDL difieren considerablemente de las LDL en cuanto a su proporción de SM, siendo significativamente más elevada esta proporción en estas últimas ($18 \pm 2\%$ en relación a los PL analizados, incluyendo plasmalógenos, LPC y SM). El dato es similar al dado en estudios previos, como por ejemplo 25% de SM en LDL (Wiesner, Leidl y cols. 2009). Sorprende la alta proporción de PE (incluyendo PE O-) en las VLDL ($12 \pm 2\%$), el doble que en las LDL y las HDL, lo que puede estar relacionado con su origen hepático (Kuksis, Myher y cols. 1981).

La PC es el fosfolípido más abundante del plasma y también el principal componente de las lipoproteínas, sobre todo de las HDL (Wiesner, Leidl y cols. 2009). Las dos especies mayoritarias fueron PC 34:2 y PC 36:2, que siguen patrones similares de distribución entre las distintas lipoproteínas (PC 34:2: VLDL 33%, LDL 33%, HDL 31%; y PC 36:2: VLDL 16%, LDL 16%, HDL 15%). Estos resultados coinciden con los mostrados en el estudio de Wiesner y cols [27-28% y 12-13% respectivamente (Wiesner, Leidl y cols. 2009)]. La proporción de especies de PC y LPC poliinsaturadas en las HDL fue ligeramente superior al resto, por ejemplo, PC 36:4 (HDL 13%, VLDL 11.5%, LDL 10%) y PC 38:4 (HDL 5.3%, VLDL 5.0%, LDL 4.9%), también en consonancia con trabajos previos (Myher, Kuksis y cols. 1981).

La especie mayoritaria de SM fue SM 34:1 (VLDL 54%, LDL 48%, HDL 62%). Otros estudios han descrito la presencia de otras especies de SM, además de la SM 34:1, en las lipoproteínas (Wiesner, Leidl y cols. 2009).

A pesar de que nuestra metodología no proporciona información sobre la localización de las cadenas de acilo en las especies de PC, debido a la baja eficiencia de fragmentación observada en los experimentos MS/MS, la PC 38:4 detectada en HDL es muy probable que sea PC 18:0/20:4 (1-octadecanoil-2-araquidonil-sn-glicero-fosfocolina), puesto que en eucariotas la posición sn-1 tiende a ser ocupada por cadenas saturadas o mono/di- insaturadas y las cadenas

poliinsaturadas ocupan la posición sn-2 (Marai y Kuksis 1969). La actividad de la *lecitin:colesterol aciltransferasa* (LCAT), que transfiere un ácido graso desde la posición sn-1 de PC al colesterol con la formación de una molécula de CE, es la responsable de la formación de las especies de CE y LPC de las HDL (Subbaiah, Sowa y cols. 2004). Paradójicamente, las especies de LPC más abundantes fueron LPC 20:4 y LPC 22:6. Para explicar esta paradoja, se ha propuesto que la estereoespecificidad de la LCAT cambia con las especies moleculares de PC que contienen los ácidos araquidónico (FA 20:4) o docosahexanoico (FA 22:6), por lo que LCAT genera sn-2-lisofosfatidilcolinas que contienen LPC 20:4 y LPC 22:6 y especies saturadas de CE (Subbaiah, Sowa y cols. 2004).

La interpretación del perfil lipídico de las especies de TG obtenidas por MALDI-TOF es un desafío debido a las muchas especies que pueden formarse por combinación de los distintos ácidos grasos y posiciones en el esqueleto de glicerol. Por ejemplo, en mamíferos, TG 52:1 puede tener cerca de 90 especies moleculares estructuralmente diferentes (Ekroos 2012). Observamos un patrón de especies de TG muy similar en las lipoproteínas, siendo la concentración total de TG en VLDL 12 veces superior a las de HDL. Las especies mayoritarias detectadas son las que contienen un número total de 50, 52 y 54 átomos de carbono en los acilo, que se combinan formando cadenas saturadas [palmítico (FA 16:0) y esteárico (FA 18:0)] y cadenas mono/di-insaturadas [oleico (FA 18:1), linoleico (FA 18:2) y palmitoleico (FA 16:1)] (Lay, Liyanage y cols. 2006). Esta distribución de TG concuerda con la descrita por otros métodos de análisis (Kuksis, Myher y cols. 1981; Quehenberger, Armando y cols. 2010).

Un inconveniente de nuestra metodología es que no es posible cuantificar la fracción de CE mediante MALDI-TOF. Si bien obtuvimos señales detectables de especies de CE, empleando 2,5-dihidroxibenzoico como matriz en combinación con acetato de plata, como aductos de la forma $[M+Ag]^+$, la sensibilidad fue muy baja, insuficiente para realizar una buena cuantificación. Recientemente se han hecho progresos en esta dirección mediante la deposición de mezclas de CE directamente sobre nanoestructuras de grafito que contiene átomos de plata y detección mediante ionización por desorción láser sin matriz (Jirasko, Holcapek y cols. 2014). Por ello, en este estudio analizamos la composición de CE en lipoproteínas usando GC-MS. La concentración de especies de CE fue similar a la hallada en otros trabajos previos (Kuksis, Myher y cols. 1981; Wiesner, Leidl y cols. 2009).

Un hallazgo novedoso de nuestro estudio es que los Sulf (S y S OH-), aún siendo especies muy minoritarias en las lipoproteínas, son fácilmente analizables por MALDI en modo negativo.

Los Sulf son esfingolípidos abundantes en cerebro y riñón, pero prácticamente ausentes en el hígado (Cheng, Sun y cols. 2010). Por tanto, los Sulf deben proceder del SNC o del riñón, por lo que MALDI es una técnica interesante para poder profundizar en el metabolismo de los lípidos del cerebro para estudiar patologías neurológicas, como la esclerosis múltiple (EM).

En resumen, los resultados del análisis de los lípidos en las lipoproteínas del plasma realizados por la metodología MALDI (**Figura 54**) son similares a los reportados por otras metodologías lipidómicas (LC-MS/MS-ESI). Por tanto, la técnica MALDI puede ser empleada para la determinación de la huella lipidómica del plasma y otros tejidos con un razonable esfuerzo analítico.

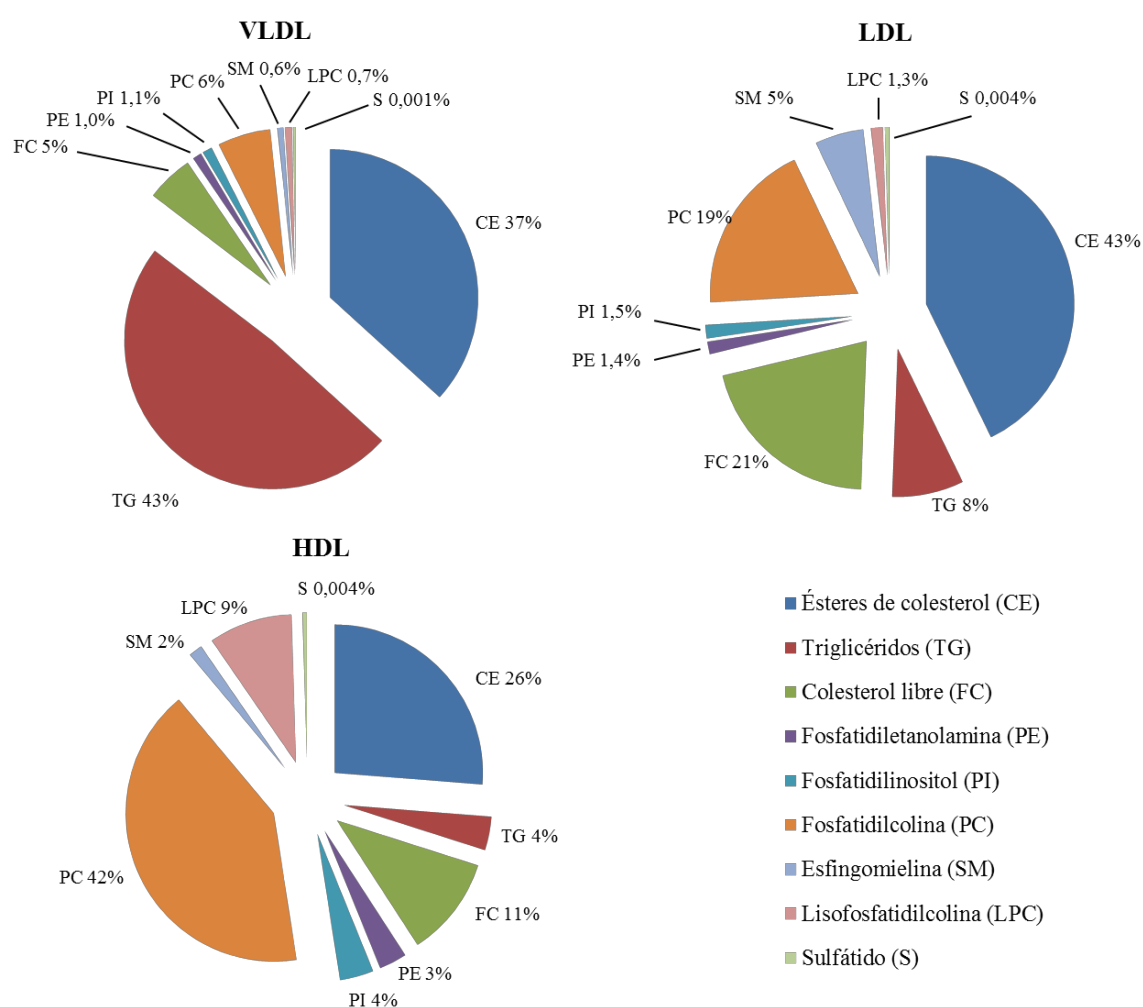


Figura 54. Composición lipídica de las lipoproteínas del plasma. Porcentaje por clase lipídica respecto a la cantidad de lípido total en cada una de las lipoproteínas.

2. Efecto del tratamiento con ácido elágico en la encefalomiелitis autoinmune experimental

En este trabajo hemos investigado los efectos neuroprotectores del ácido elágico en un modelo animal que reproduce las fases de brote de la EM. La administración oral del ácido elágico retrasa el comienzo y reduce objetivamente los signos clínicos de la progresión de la enfermedad. En la fase de brote de la enfermedad, las ratas no tratadas mostraron una reducción del contenido en la corteza cerebral tanto de MBP como de esfingolípidos, mientras que aquellas que recibieron ácido elágico mantuvieron la concentración comparadas con el control, ratas no inmunizadas. En médula espinal, se observó un efecto similar de preservación en el contenido de esfingolípidos en la fase de remisión de la EAE. Estos resultados sugieren que la administración de ácido elágico puede prevenir la desmielinización durante la EAE.

El ácido elágico es un derivado del ácido tánico que se encuentra en la naturaleza en frutas (granadas, uvas, bayas) y nueces principalmente, como parte de moléculas poliméricas denominadas elagitaninos. Se ha reportado que la administración oral de elagitanos tiene efectos antioxidantes (Tomás-Barberán, González-Sarriás y cols. 2017), antiinflamatorios (Rosillo, Sánchez-Hidalgo y cols. 2012), antiateroscleróticos (Rosenblat, Volkova y cols. 2006) y anticancerígenos (Larrosa, Tomás-Barberán y cols. 2006) en diversos modelos experimentales. Los elagitanos no son directamente absorbidos, sino que primero son hidrolizados en el sistema digestivo a ácido elágico, el cual es metabolizado por la microflora bacteriana para producir derivados del compuesto, principalmente urolitinas A y B (Cerdá, Espín y cols. 2004). Las urolitinas tienen mucho menos actividad antioxidante pero su biodisponibilidad es mayor que la de sus precursores, y son éstas y sus derivados glicosilados los que han sido detectados en la circulación sistémica tras la administración oral de elagitanos, ácido elágico o urolitinas (Cerdá, Espín y cols. 2004; Gilgun-Sherki, Melamed y cols. 2004).

El incremento del estrés oxidativo ha sido involucrado en la patogénesis tanto de la EM como de la EAE (Gilgun-Sherki, Melamed y cols. 2004; Mirshafiey y Mohsenzadegan 2009). Se han hallado niveles aumentados de estrés oxidativo y niveles bajos de antioxidantes en la sangre y líquido cefalorraquídeo (LCR) en pacientes con EM (Gilgun-Sherki, Melamed y cols. 2004; van Horssen, Witte y cols. 2011). La administración de polifenoles (Natarajan y Bright 2002; Hendriks, de Vries y cols. 2003; Muthian y Bright 2004; Giacoppo, Galuppo y cols. 2015; Mohajeri, Sadeghizadeh y cols. 2015) reducen las alteraciones neurológicas de la EAE en roedores, lo que corrobora la hipótesis de que el estrés oxidativo interviene tanto en el comienzo como en la progresión de la EAE (Miller, Wachowicz y cols. 2013; Mohajeri, Sadeghizadeh y cols. 2015). Se ha reivindicado la prevención de la apoptosis como uno de los mecanismos que contribuyen a los efectos beneficiosos de los antioxidantes (Giacoppo, Galuppo y cols. 2015). No obstante, no podemos descartar que otros mecanismos, no directamente relacionados con la defensa antioxidante, estén implicados en los efectos neuroprotectores del ácido elágico.

La desmielinización es el sello de la EM. Estudios recientes han mostrado que la pérdida de mielina en la médula espinal lumbar en diferentes escenarios de la EAE (Sadler, Sommer y cols. 1991; Pender, Tabi y cols. 1995) y, en menor medida, en el SNC (Slavin, Bucher y cols. 1996), dependen de la susceptibilidad del modelo animal. En base a los exámenes histológicos, es raro la aparición de placas de desmielinización en el SNC en ratas Lewis con EAE aguda (Pender, Nguyen y cols. 1989). Sin embargo, incluso en estados tempranos de la enfermedad, subfracciones aisladas de mielina del tejido cerebral mostraron alteraciones en comparación con las ratas sanas, incluyendo una disminución del contenido de proteínas básicas, así como cambios ultraestructurales en las fracciones ligeras de mielina (Salvati, D'Urso y cols. 1986). Estos cambios en la composición y morfología de la mielina, junto con la presencia de células inflamatorias, fueron consideradas un indicativo del comienzo del proceso de desmielinización en el cerebro ya en estadios tempranos de la enfermedad (Salvati, D'Urso y cols. 1986). En el presente estudio, medimos MBP mediante western-blot como un indicador de la integridad de la mielina, demostramos que la desmielinización afecta al SNC durante la fase aguda de la EAE.

La mielina contiene una gran cantidad de lípidos (70-75%), siendo los glicoesfingolípidos (30%), colesterol (25%) y glicerofosfolípidos las principales clases (Vos, Lopes-Cardozo y cols. 1994; Aggarwal, Yurlova y cols. 2011). Además, las vainas de mielina contienen una gran cantidad de cerebrósidos y sus derivados sulfatados, los sulfátidos (Sulf). Los Sulf son sintetizados principalmente en oligodendrocitos y células de Schwann en el SNC y periférico, respectivamente (Vos, Lopes-Cardozo y cols. 1994), representan el 30% de los

glicosfingolípidos de la mielina y suelen presentar ácidos grasos hidroxilados y ácidos grasos de longitud de cadena larga (Aggarwal, Yurlova y cols. 2011).

Los glicosfingolípidos han sido implicados en la patogénesis tanto de la EM como de la EAE (Halder, Jahng y cols. 2007). En pacientes de EM se han descrito altos niveles en suero de glicosfingolípidos (Lubetzki, Thuillier y cols. 1989) y anticuerpos anti-glicosfingolípidos (Stevens, Weller y cols. 1992). La inmunización combinada con sulfátidos y anticuerpos sulfátido-específicos empeoran la EAE en ratones (Kanter, Narayana y cols. 2006). Por otro lado, se ha demostrado que la lactosilceramida (LacCer) activa astrocitos y neuroinflamación (Won, Singh y cols. 2007; Mayo Trauger y cols. 2014).

Nuestro estudio reveló que, comparado con las ratas control, los animales con EAE tuvieron un descenso en las principales clases de esfingolípidos, incluyendo HexCer, SM y particularmente Sulf, tanto en corteza cerebral como médula espinal. Los Sulf, de carácter ácido, interaccionan fuertemente con MBP y tienen un papel esencial en la estabilización y función de la mielina (Schmitt, Castelvetti y cols. 2015; Palavicini, Wang y cols. 2016). Aparentemente, el contenido de Cer se comportó de manera diferente, disminuyendo en el brote de la EAE en la corteza cerebral mientras que aumentó en la médula espinal. Midiendo fracciones de lípidos mediante un método de cromatografía en capa fina (TLC), Slavin y cols. encontraron una reducción en el contenido de Sulf del cerebro durante la fase aguda de la EAE en ratas Wistar (Slavin, Bucher y cols. 1996). En línea con estos resultados, también se ha demostrado que había una reducción en el contenido de Sulf en biopsias postmortem procedentes del tejido cerebral de pacientes con enfermedad de Alzheimer (Han, M Holtzman y cols. 2002; Cheng, Xu y cols. 2003), y en las placas de tejido cerebral de pacientes con EM se observó una pérdida sustancial de galacosilceramida (Miller, Young y cols. 2017). En cuanto a Cer, se ha reportado un descenso en su contenido en la médula espinal de ratas Lewis en estadios de brote de la EAE (Miller, Young y cols. 2017). Otros autores describieron un incremento en Cer en médula espinal en el inicio de la enfermedad, que persiste después en las fases agudas (Schiffmann, Ferreiros y cols. 2012).

La fagocitosis de los componentes de la mielina y posterior degradación de sus constituyentes se realiza por la microglía (macrófagos residentes en el SNC), que son activados por los linfocitos T. Este proceso es facilitado por la presencia de anticuerpos anti-MBP (Lyman, Kadish y cols. 1983; Sadler, Sommer y cols. 1991). La presencia de anticuerpos contra componentes lipídicos también pueden contribuir a la desmielinización (Raine, Traugott y cols.

1981), como lo demuestra el hecho de que la detección de bandas IgG e IgM positivas frente a lípidos en LCR es un signo de mal pronóstico en la EM. Sin embargo, no existe correlación entre la gravedad del brote de la enfermedad y la presencia de anticuerpos en LCR (Whitham, Nilaver y cols. 1988; Jones, Bourdette y cols. 1990; Sadler, Sommer y cols. 1991; Slavin, Bucher y cols. 1996). Por tanto, otros mecanismos distintos a la presencia de anticuerpos antilípido podrían ser determinantes para la desmielinización, como el grado de actividad de células inmunes infiltradas, el transporte lipídico mediado por apolipoproteína E (Kiebish, Young y cols. 2012) y el mantenimiento de la homeostasis de los lípidos en la mielina.

El objetivo principal de este trabajo era estudiar los efectos de la suplementación de ácido elágico en la EAE. El ácido elágico es un compuesto polifenólico con propiedades antioxidantes y antiinflamatorias, entre otras actividades de interés biológico (Rosenblat, Volkova y cols. 2006; Kang, Buckner y cols. 2016; Tomás-Barberán, González-Sarriás y cols. 2017). Sus efectos en la EAE no habían sido estudiados. Mientras realizábamos el presente trabajo, Sanadgol y cols demostraron que la administración de ácido elágico aumenta la población de oligodendrocitos y reduce los niveles de neuroinflamación inducida por cuprizona, un modelo que imita la patofisiología de la EM progresiva (Sanadgol, Golab y cols. 2017). A tenor de nuestros resultados, la administración oral continua de ácido elágico dos días antes de la inducción activa de la EAE protege y retrasa la desmielinización, pero no evita la aparición de los síntomas clínicos. El ácido elágico fue administrado a la dosis de 10 mg/Kg/día, aproximadamente, cantidades farmacológicas suficientes para alcanzar concentraciones plasmáticas significativas y similares a las empleadas en otros estudios (Hassoun, Vodhanel y cols. 2006; Kannan y Quine 2013; Panchal, Ward y cols. 2013). El tratamiento con ácido elágico no tuvo efectos apreciables en las ratas control, sin embargo, en ratas EAE amortiguó la pérdida de esfingolípidos de la corteza cerebral y, en menor medida, en la médula espinal, tanto en el brote como en la fase de remisión. Las causas del retraso en la recuperación del contenido de esfingolípidos en la médula espinal, comparado con la corteza cerebral, son desconocidas, pero podría deberse a la diferente composición de ambos tejidos (Pender 1989). La evidente correlación entre el contenido de MBP con la concentración de Sulf, HexCer y SM, es consistente con que el ácido elágico tiene un efecto sobre las vainas de mielina que recubren la neurona.

Resulta intrigante que las ratas con EAE tratadas con ácido elágico en la fase de brote, a pesar de tener un contenido, tanto de MBP como de esfingolípidos, similar a los de las ratas no tratadas, sufran alteraciones neurológicas. Este hecho está en la línea con la hipótesis de que no sólo la desmielinización, sino también el grado de desmielinización, es relevante en la

etiopatogenia de la EAE (Hashim 1985; Wekerle 1993; Slavin, Bucher y cols. 1996). De hecho, es común en ratas Lewis con EAE encontrar animales con síntomas neurológicos graves incluso sin áreas de desmielinización claras. Por otro lado, la recuperación neurológica del brote es demasiado rápida para ser el resultado de la remielinización, lo cual sugiere que estos factores no están casualmente relacionados (Panitch y Ciccone 1981; Simmons, Bernard y cols. 1981). Una disociación similar fue observada en cobayas Hartley, en la que la inmunización con MBP induce brotes agudos de EAE en ausencia de desmielinización (Raine, Traugott y cols. 1981). Existe, no obstante, la posibilidad de que algunos de los signos clínicos observados en la EAE sean debidos a la existencia de focos de desmielinización en áreas específicas, como ha sido propuesto por diversos autores (Pender y Sears 1982). En realidad, en otros modelos de EAE la recuperación neuronal está asociada con la restauración de la conducción nerviosa en el sistema nervioso periférico (SNP) y en el SNC, simultáneamente a la remielinización de los axones por las células de Schwann y oligodendrocitos (Pender 1989).

En pacientes con EM, se ha descrito correlación entre la desmielinización y la muerte de los oligodendrocitos (Henderson, Barnett y cols. 2009; Qin, Berdyshev y cols. 2010). En lo que respecta a los lípidos, se ha demostrado la elevación en los contenidos de esfingosina en la médula espinal pero no en el cerebro durante el curso de la EAE en ratas Lewis, mostrándose afectaciones selectivas de diferentes áreas del sistema nervioso (Miller, Young y cols. 2017). En el presente trabajo, mientras el contenido de los principales esfingolípidos disminuyó en el brote de la EAE tanto en corteza cerebral como en médula espinal, la recuperación inducida por el tratamiento con ácido elágico fue más rápida en corteza que en médula espinal. En resumen, los resultados sugieren que la acción protectora del ácido elágico en oligodendrocitos es anterior al que se ejerce en células de Schwann, una posibilidad que merece ser explorada en futuros estudios.

Dado que el efecto protector *in vivo* del consumo de ácido elágico en el contenido de mielina puede ser el resultado tanto de la inhibición de la degradación de la mielina por parte de la microglía como por el incremento de la síntesis de esfingolípidos, estudiamos los efectos del ácido elágico y sus derivados metabólicos en la síntesis de esfingolípidos en células C6 de glioma de rata y en células HOG de oligodendroglioma humano. La glía es un tipo celular dedicado al mantenimiento de la homeostasis, la estructura de la mielina, y a la protección a las neuronas del SNC (Philips y Rothstein 2017). Se ha demostrado que el ácido elágico es absorbido directamente en el estómago o en el intestino delgado proximal (Seeram, Henning y cols. 2006; Del Rio, Rodriguez-Mateos y cols. 2013). Sin embargo, muchos de los elagitanos

presentes en comida y el ácido elágico puro después de la ingestión alcanzan la parte distal del intestino delgado y el colon y son metabolizados por la microbiota, produciendo urolitinas A y B, que son después absorbidos y posteriormente metabolizados (Espín, González-Barrio y cols. 2007; Tomás-Barberán, González-Sarriás y cols. 2017). Como las urolitinas son mucho mejor absorbidas que sus precursores, se ha sugerido que estos metabolitos son los responsables de los efectos del consumo de comida que contiene elagitanos y ácido elágico (Espín, González-Barrio y cols. 2007; Tomás-Barberán, González-Sarriás y cols. 2017). Es interesante señalar que estos metabolitos tienen una pobre capacidad antioxidante comparada con el ácido elágico (Cerdá, Espín y cols. 2004). Por otro lado, las características químicas de las urolitinas cumplen los criterios requeridos para penetrar tras la barrera hematoencefálica BHE (Yuan, Ma y cols. 2016) y, de hecho, las urolitinas han sido detectadas en cerebro tras su administración oral e intravenosa en roedores (Seeram, Henning y cols. 2006; Gasperotti, Passamonti y cols. 2015).

Nosotros demostramos que las urolitinas aumentan la síntesis de Cer, el precursor inmediato de HexCer y otros cerebrósidos. Según nuestro conocimiento, ésta es la primera vez que se describe que los metabolitos biodisponibles del ácido elágico pueden modular la biosíntesis de esfingolípidos. La curcumina, otro polifenol, también estimula la biosíntesis de ceramidas favoreciendo la dimerización de la *ceramida sintasa* (Laviad, Kelly y cols. 2012), y su administración en ratas Lewis con EAE también atenúa los síntomas neurológicos y mejora la remielinización de médula espinal (Mohajeri, Sadeghizadeh y cols. 2015). El mecanismo por el que las urolitinas afectan al metabolismo lipídico todavía no es conocido, y merece estudios futuros. Con independencia del mecanismo involucrado, los presentes resultados nos permiten sugerir que la prevención de la pérdida de lípidos de la mielina en ratas EAE producida por la ingestión de ácido elágico es mediada por urolitinas.

En resumen, los presentes resultados muestran que la administración oral continua de ácido elágico mejora los signos clínicos causados en ratas con EAE activa. Asociado a estos efectos encontramos una preservación de los componentes de la mielina, MBP y particularmente esfingolípidos, comparado con ratas EAE no tratadas con ácido elágico. Finalmente, basado en la acción de las urolitinas en la estimulación de la biosíntesis de esfingolípidos, lo cual se ha demostrado por primera vez, proponemos que la acción neuroprotectora del consumo de ácido elágico en la dieta puede deberse, al menos en parte, por efecto de sus metabolitos (urolitinas) en el metabolismo de esfingolípidos en los oligodendrocitos (**Figura 55**).

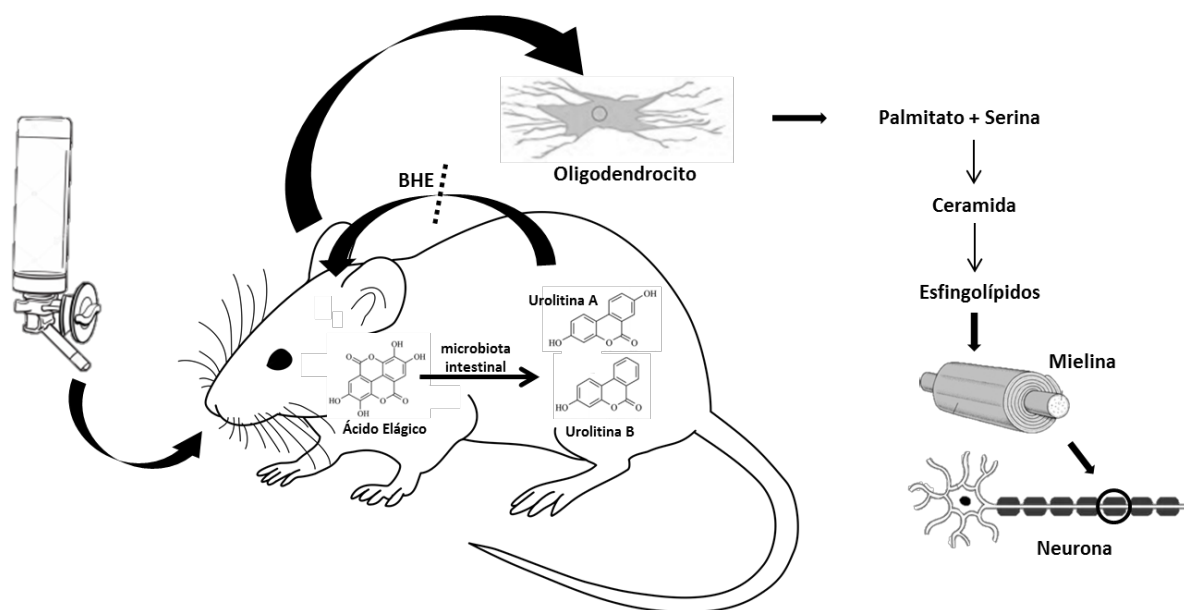


Figura 55. Propuesta de mecanismo de acción del ácido elágico en ratas EAE. El ácido elágico es bebido por las ratas EAE, inmunizadas como se indica en el apartado de **MÉTODOS 2**, transformándose en sus derivados urolitinas A y B en el intestino por acción de la microbiota. Las urolitinas pasan la barrera hematoencefálica y llegan al cerebro, donde activan la síntesis de esfingolípidos en los oligodendrocitos, regenerando la vaina de mielina de las neuronas.

3. Estudio lipidómico del LCR en pacientes con esclerosis múltiple

En el estudio realizado en animales con EAE observamos una estrecha correlación entre las concentraciones de las especies de esfingolípidos más abundantes en la mielina y la fase de brote en la enfermedad. Motivados por este hallazgo, nos plantemos si la concentración de esfingolípidos medida en el LCR (siendo por obvios motivos éticos inaccesible la obtención de una muestra de cerebro) pudiera ser un marcador de desmielinización en pacientes con EM. Además, algunos de los esfingolípidos relacionados con la desmielinización en el modelo de EAE como los Sulf, son fácilmente medibles con poco esfuerzo por MALDI-TOF. Avanzando que en el caso de que la medida de esfingolípidos en LCR fueran biomarcadores de la enfermedad, la cuantificación mediante MALDI tendría una sencilla traslación a la práctica clínica.

Como se mencionó en el capítulo anterior, aproximadamente el 10% de los lípidos de la vaina de mielina son Sulf (30% de los glicoesfingolípidos) y sus precursores galactosilceramidas (GalCer) (Illingworth y Glover 1971; Norton y Cammer 1984; Vos, Lopes-Cardozo y cols. 1994; Aggarwal, Yurlova y cols. 2011). Estos galactolípidos juegan un papel crítico en el mantenimiento de la estructura y funciones de la mielina (Marcus y Popko 2002, Schmitt, Castelvetti y cols. 2015; Palavicini, Wang y cols. 2016). La BHE separa el SNC de la circulación sanguínea periférica, impidiendo la libre circulación de sustancias anfipáticas como fosfolípidos, ácidos grasos libres, colesterol y esfingolípidos, que precisan de transportadores específicos para llegar y salir del SNC (Björkhem y Meaney 2004; Guemez-Gamboa, Nguyen y cols. 2015). El LCR ayuda a mantener la homeostasis del tejido nervioso, proporcionando nutrientes y retirando productos metabólicos de desecho del SNC, por lo que la composición del LCR sería un reflejo del metabolismo del SNC (Seyer, Boudah y cols. 2016). Debido a este hecho, el LCR es el fluido de elección para estudiar los cambios en el metabolismo cerebral en las enfermedades con algún componente neurológico (Mattsson 2011). Además, las determinaciones en sangre son sensibles

a cambios metabólicos ajenos al SNC (Tumani, Teunissen y cols. 2008). Finalmente mencionar que en las enfermedades en las que se producen alteraciones de la composición de lípidos en el cerebro, como la leucodistrofia metalocromática, que acumula Sulf debido a la actividad reducida de la *arilsulfatasa A* (Belli, Bartolini y cols. 2018), o la xantomatosis cerebrotendinosa, que acumula colestanol en respuesta al déficit de actividad de la enzima *esterol 27-hidroxilasa* (Pilo-de-la-Fuente, Jimenez-Escrig y cols. 2011), han evidenciado valores elevados de ambos compuestos en LCR (Salen, Berginer y cols. 1987).

En general, existen pocos estudios aplicados al análisis de los lípidos del LCR como marcadores en EM, casi siempre desde una perspectiva de grupo lipídico y no de las especies (Tourtellotte y Haerer 1969). Pocos estudios han analizado cuantitativamente la composición de especies de esfingolípidos en el LCR. Nuestros datos totales de concentración de Sulf concuerdan en orden de magnitud por los reportados por otros estudios en LCR, 53 ± 25 nmol/L frente a 71 ± 18 nmol/L (Blomqvist, Borén y cols. 2017) y 77 ± 4 nmol/L (Novakova, Singh y cols. 2018), en pacientes con enfermedad de Alzheimer y EM. La diferencia en la cuantificación puede ser debida a que los estudios citados detectaron un mayor número de especies (12 especies en nuestro estudio frente a las 20 analizadas por los dos autores citados anteriormente), lo que incrementa la suma total de la clase. En el caso de las Cer y HexCer, no existen datos de cuantificación exactos en LCR, los únicos estudios examinaron diferencias relativas respecto al grupo control, sin detallar la concentración medida (Vidaurre, Haines y cols. 2014; Checa, Khademi y cols. 2015). Creemos que nuestra cuantificación de Cer (12 ± 5 nmol/L) y HexCer (586 ± 257 nmol/L) en LCR de pacientes con EM es la más fiable realizada hasta el momento.

En nuestro estudio no encontramos diferencias significativas en los esfingolípidos medidos en el LCR entre pacientes con EM y controles. Haghighi y cols estudiaron las especies de Sulf y GalCer en el LCR de pacientes controles y con EM, no encontrando tampoco diferencias significativas (Haghighi, Lekman y cols. 2013). Estos resultados podrían ser debido a la elección de los grupos de pacientes, ya que en el estudio de Haghighi y cols reclutaron sujetos sanos, mientras que en este trabajo se seleccionaron pacientes control con clínica neurológica susceptible de ser EM a los que se les descartó la enfermedad tras el estudio correspondiente, pero que fueron diagnosticados de otras patologías como mielopatía, deficiencia de vitamina B1, pseudotumor cerebral o hidrocefalia arreabsortiva. Además, en el estudio de Haghighi y cols analizaron GalCer mediante cromatografía en cafa fina (TLC), mientras que en nuestro análisis, con la tecnología de la que disponemos, no somos capaces de diferenciar si el resto glucídico de la HexCer corresponde a glucosa o galactosa. Excluimos de nuestros análisis los pacientes en

brote al ser el tamaño muestral muy pequeño ($n=3$) para sacar conclusiones. Por otro lado, Gonzalo y cols realizan un estudio metabolómico no dirigido donde analizaron un total de 2202 metabolitos en el LCR de pacientes controles y con EM (Gonzalo, Brieva y cols. 2012). No encontraron un perfil lipidómico claro entre ambos grupos y sólo hallando diferencias significativas en 10 señales de aductos con un determinado valor de m/z (“*features*”) a las que no se les asignó una especie lipídica concreta, si bien algunas de ellas pueden ser compatibles con esfingolípidos (Gonzalo, Brieva y cols. 2012).

La presencia de BOC IgM es un marcador pronóstico de severidad de la EM (Villar, Sádaba y cols. 2005). La presencia de anticuerpos anti-Sulf se relaciona con procesos de inflamación y desmielinización del SNC (Kanter, Narayana y cols. 2006), y se han encontrado concentraciones elevadas de anticuerpos anti-Sulf en el LCR de pacientes con EM (Ilyas, Chen y cols. 2003; Moyano, Pituch y cols. 2013). Las muestras analizadas en nuestro trabajo fueron obtenidas en la fase de remisión, y no encontramos asociación entre las concentraciones de los lípidos y la existencia de bandas IgG o IgM en los pacientes. Por tanto, podemos concluir que la presencia de anticuerpos frente a lípidos de la mielina no se relaciona con la concentración de especies de esfingolípidos en el LCR. Una posible explicación es que las especies de esfingolípidos aparecen en el LCR en las fases de brote de la enfermedad, estimulando la producción de anticuerpos reactivos a las mismas, que permanecen en el LCR e inducen respuesta inflamatoria y degradación de mielina en las fases de brote, sin observarse este hecho en la remisión (**Figura 56**). Algunos autores han encontrado diferencias significativas en los niveles de HexCer (Checa, Khademi y cols. 2015) y Sulf (Novakova, Singh y cols. 2018) en el LCR entre pacientes con EM con fenotipos remitente-recurrente (RR) y progresivo. En su estudio, Checa y cols observaron un aumento en las concentraciones de algunas especies de SM y HexCer (HexCer d18:1/16:0) en pacientes con fenotipo RR a cinco años respecto a los de fenotipo progresivo (Checa, Khademi y cols. 2015). Estas conclusiones son similares a las alcanzadas en el estudio de Novakova y cols (Novakova, Singh y cols. 2018), que determinó que los Sulf podrían ser marcadores pronósticos a la hora de diferenciar los fenotipos RR y progresivo en la EM. Nuestros resultados no permiten alcanzar ninguna conclusión a este respecto dado que todos los pacientes incluidos en este trabajo correspondieron a un fenotipo RR.

En resumen, nuestros datos no muestran que la cuantificación de Sulf, Cer y HexCer tenga interés diagnóstico o guarde relación con la presencia de BOC en el LCR de pacientes con EM

en fase de remisión. Aunque no podemos descartar que la concentración de esfingolípidos en el LCR esté elevada en pacientes con EM en la fase de brote.

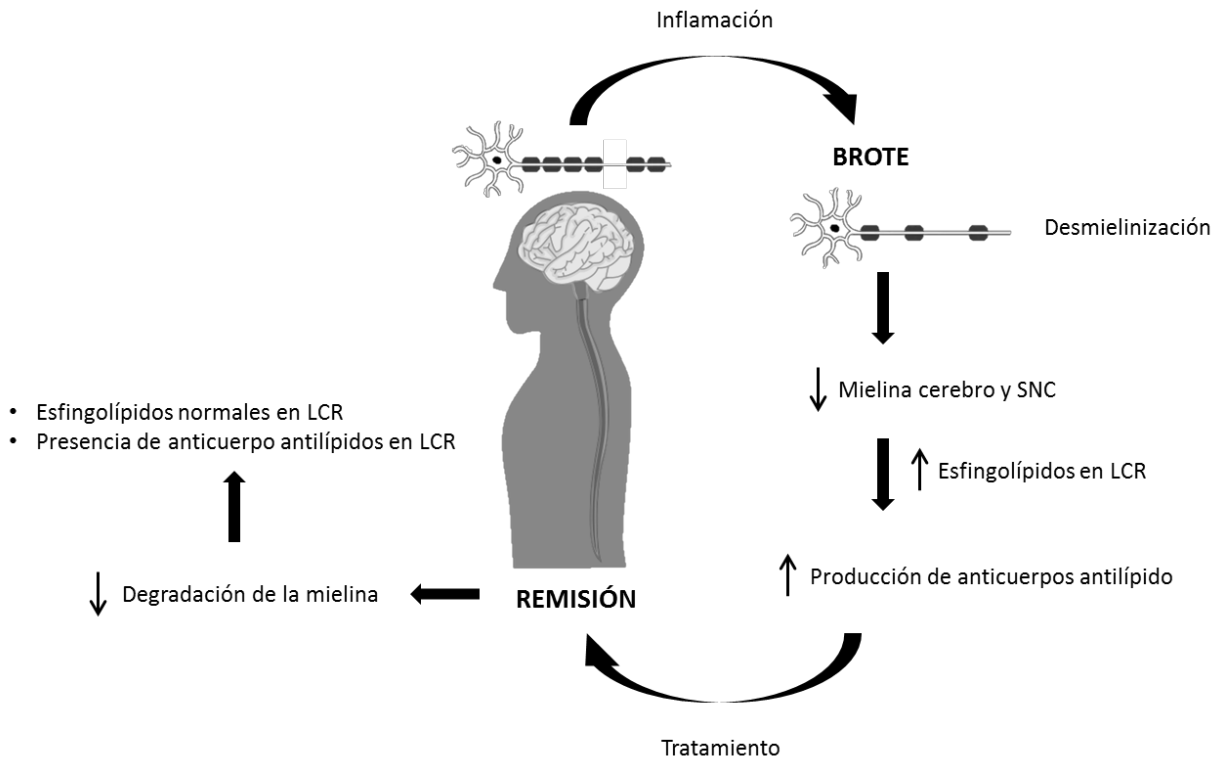


Figura 56. Relación entre las concentraciones de esfingolípidos en LCR y la presencia de anticuerpos antilípido en pacientes con EM. Se produce una respuesta inflamatoria que desencadena la desmielinización de las neuronas y un brote de los síntomas de la EM. Aumentan los esfingolípidos en LCR y se producen anticuerpos anti-lípido. Una vez tratados, el paciente entra en una fase de remisión de los síntomas, donde disminuye la degradación de la mielina, evidenciando una concentración normal de esfingolípidos en LCR y manteniendo la presencia de anticuerpos anti-lípido.

VII. CONCLUSIONES

Primera. La aplicación de la tecnología MALDI-TOF en lipidómica permite la obtención de resultados de las especies y de las clases de lípido desde un punto de vista cualitativo y cuantitativo.

Segunda. El análisis de las especies lipídicas presentes en las lipoproteínas del plasma en humanos mediante MALDI-TOF confirma la gran diversidad en la composición de lípidos de las diferentes lipoproteínas (VLDL, LDL y HDL).

Tercera. La tecnología MALDI-TOF es muy sensible para el análisis de especies lipídicas con carga negativa como los sulfátidos.

Cuarta. La administración oral continua del polifenol ácido elágico mejora los signos clínicos y aminora la desmielinización tanto a nivel proteico como lipídico causados en ratas con encefalomiелitis autoinmune experimental activa, modelo experimental de la esclerosis múltiple.

Quinta. Los metabolitos del ácido elágico, las urolitinas, estimulan la biosíntesis de esfingolípidos. Lo cual indica una acción neuroprotectora del consumo de ácido elágico en la dieta, que puede deberse al efecto de sus metabolitos en el metabolismo de esfingolípidos en los oligodendrocitos.

Sexta. La cuantificación de esfingolípidos (ceramida, sulfátidos y hexosilceramida) en el líquido cefalorraquídeo de pacientes con esclerosis múltiple en fase de remisión no tiene interés diagnóstico de la enfermedad. Sin embargo, no podemos descartar que su cuantificación, en la fase de brote, pueda tener una utilidad diagnóstica.

Séptima. La cuantificación de esfingolípidos en el líquido cefalorraquídeo de pacientes con esclerosis múltiple en fase remisión no guarda relación con la presencia de bandas oligoclonales en el líquido cefalorraquídeo de pacientes con esclerosis múltiple.

VIII. ANEXOS

ANEXO I. TABLAS COMPLEMENTARIAS

Tabla C1. Reproducibilidad en la cuantificación de especies lipídicas en un mix de plasma por MALDI-TOF/MS. El plasma de 5 sujetos fueron mezclados, se extrajeron los lípidos, se fraccionaron por HPLC-ELSD y las fracciones se analizaron por MALDI-TOF como se describe en el apartado de **MÉTODOS 9**. Se presentan los valores de especies de media y desviación estándar (SD) de 5 replicados. *EN FORMATO ELECTRÓNICO*

Tabla C2. Cuantificación de especies moleculares de esfingolípidos en corteza cerebral y espina dorsal de ratas EAE y efecto del tratamiento. Especies de esfingolípidos de la corteza cerebral (**A**) y médula espinal (**B**) de ratas control y EAE (EAE-brote y EAE-remisión) con o sin tratamiento de ácido elágico. Los resultados de cada especie (nmol/mg de proteína) se presentan como media $\pm$ SEM, y los resultados de la comparación estadística entre diferentes grupos se muestra cuando hay diferencias significativas ($p < 0.05$). *EN FORMATO ELECTRÓNICO*

IX. BIBLIOGRAFÍA

- Abreu, S., A. Solgadi and P. Chaminade (2017). "Optimization of normal phase chromatographic conditions for lipid analysis and comparison of associated detection techniques." J Chromatogr A **1514**: 54-71.
- Aggarwal, S., L. Yurlova and M. Simons (2011). "Central nervous system myelin: structure, synthesis and assembly." Trends Cell Biol **21**(10): 585-593.
- Agren, J. J., A. Julkunen and I. Penttila (1992). "Rapid separation of serum lipids for fatty acid analysis by a single aminopropyl column." J Lipid Res **33**(12): 1871-1876.
- Aguado-Llera, D., L. Puebla-Jiménez, V. Barrios, A. Hernández-Pinto and E. Arilla-Ferreiro (2011). "Role of ethanolamine phosphate in the hippocampus of rats with acute experimental autoimmune encephalomyelitis." Neurochem Int **58**(1): 22-34.
- Aktas, M., M. Elmastas, F. Ozcicek and N. Yilmaz (2016). "Erythrocyte Membrane Fatty Acid Composition in Premenopausal Patients with Iron Deficiency Anemia." J Oleo Sci **65**(3): 225-231.
- Angelini, R., R. Vitale, V. A. Patil, T. Cocco, B. Ludwig, M. L. Greenberg and A. Corcelli (2012). "Lipidomics of intact mitochondria by MALDI-TOF/MS." J Lipid Res **53**(7): 1417-1425.
- Ascherio, A., K. L. Munger, E. T. Lennette, D. Spiegelman, M. A. Hernán, M. J. Olek, S. E. Hankinson and D. J. Hunter (2001). "Epstein-Barr virus antibodies and risk of multiple sclerosis: a prospective study." JAMA **286**(24): 3083-3088.
- Barth, R. F. and B. Kaur (2009). "Rat brain tumor models in experimental neuro-oncology: the C6, 9L, T9, RG2, F98, BT4C, RT-2 and CNS-1 gliomas." J Neurooncol **94**(3): 299-312.
- Belli, G., E. Bartolini, A. Bianchi, M. Mascalchi and S. Stagi (2018). "Central Precocious Puberty in a Child With Metachromatic Leukodystrophy." Front Endocrinol (Lausanne) **9**: 497.
- Berry, K. A., J. A. Hankin, R. M. Barkley, J. M. Spraggins, R. M. Caprioli and R. C. Murphy (2011). "MALDI imaging of lipid biochemistry in tissues by mass spectrometry." Chem Rev **111**(10): 6491-6512.
- Bhardwaj, C. and L. Hanley (2014). "Ion sources for mass spectrometric identification and imaging of molecular species." Nat Prod Rep **31**(6): 756-767.
- Bhullar, K. S. and H. P. Rupasinghe (2013). "Polyphenols: multipotent therapeutic agents in neurodegenerative diseases." Oxid Med Cell Longev **2013**: 891748.
- Bikman, B. T. and S. A. Summers (2011). "Ceramides as modulators of cellular and whole-body metabolism." J Clin Invest **121**(11): 4222-4230.
- Bird, I. M. (1989). "High performance liquid chromatography: principles and clinical applications." BMJ **299**(6702): 783-787.
- Bjartmar, C., J. R. Wujek and B. D. Trapp (2003). "Axonal loss in the pathology of MS: consequences for understanding the progressive phase of the disease." J Neurol Sci **206**(2): 165-171.
- Björkhem, I. and S. Meaney (2004). "Brain cholesterol: long secret life behind a barrier." Arterioscler Thromb Vasc Biol **24**(5): 806-815.
- Bligh, E. G. and W. J. Dyer (1959). "A rapid method of total lipid extraction and purification." Can J Biochem Physiol **37**(8): 911-917.

- Blomqvist, M., J. Borén, H. Zetterberg, K. Blennow, J. E. Månsson and M. Ståhlman (2017). "High-throughput analysis of sulfatides in cerebrospinal fluid using automated extraction and UPLC-MS/MS." J Lipid Res **58**(7): 1482-1489.
- Bonnan, M. (2015). "Intrathecal IgG synthesis: a resistant and valuable target for future multiple sclerosis treatments." Mult Scler Int **2015**: 296184.
- Brennan, K. M., F. Galban-Horcajo, S. Rinaldi, C. P. O'Leary, C. S. Goodyear, G. Kalna, A. Arthur, C. Elliot, S. Barnett, C. Linington, J. L. Bennett, G. P. Owens and H. J. Willison (2011). "Lipid arrays identify myelin-derived lipids and lipid complexes as prominent targets for oligoclonal band antibodies in multiple sclerosis." J Neuroimmunol **238**(1-2): 87-95.
- Brocke, S., C. Piercy and L. Steinman (1996). "Superantigens in demyelinating disease." Springer Semin Immunopathol **18**(1): 51-56.
- Brück, W. (2005). "The pathology of multiple sclerosis is the result of focal inflammatory demyelination with axonal damage." J Neurol **252 Suppl 5**: v3-9.
- Buntinx, M., J. Vanderlocht, N. Hellings, F. Vandenabeele, I. Lambrechts, J. Raus, M. Ameloot, P. Stinissen and P. Steels (2003). "Characterization of three human oligodendroglial cell lines as a model to study oligodendrocyte injury: morphology and oligodendrocyte-specific gene expression." J Neurocytol **32**(1): 25-38.
- Cajka, T. and O. Fiehn (2014). "Comprehensive analysis of lipids in biological systems by liquid chromatography-mass spectrometry." Trends Analyt Chem **61**: 192-206.
- Calzada, E., O. Onguka and S. M. Claypool (2016). "Phosphatidylethanolamine Metabolism in Health and Disease." Int Rev Cell Mol Biol **321**: 29-88.
- Camont, L., M. Lhomme, F. Rached, W. Le Goff, A. Negre-Salvayre, R. Salvayre, C. Calzada, M. Lagarde, M. J. Chapman and A. Kontush (2013). "Small, dense high-density lipoprotein-3 particles are enriched in negatively charged phospholipids: relevance to cellular cholesterol efflux, antioxidative, antithrombotic, anti-inflammatory, and antiapoptotic functionalities." Arterioscler Thromb Vasc Biol **33**(12): 2715-2723.
- Casado, M. E., O. Pastor, P. Mariscal, A. Canfran-Duque, J. Martinez-Botas, F. B. Kraemer, M. A. Lasuncion, A. Martin-Hidalgo and R. Busto (2013). "Hormone-sensitive lipase deficiency disturbs the fatty acid composition of mouse testis." Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids **88**(3): 227-233.
- Cerdá, B., J. C. Espín, S. Parra, P. Martínez and F. A. Tomás-Barberán (2004). "The potent in vitro antioxidant ellagitannins from pomegranate juice are metabolised into bioavailable but poor antioxidant hydroxy-6H-dibenzopyran-6-one derivatives by the colonic microflora of healthy humans." Eur J Nutr **43**(4): 205-220.
- Cermenati, G., N. Mitro, M. Audano, R. C. Melcangi, M. Crestani, E. De Fabiani and D. Caruso (2015). "Lipids in the nervous system: from biochemistry and molecular biology to pathophysiology." Biochim Biophys Acta **1851**(1): 51-60.
- Chamorro, L., A. Garcia-Cano, R. Busto, J. Martinez-Gonzalez, A. Albillos, M. A. Lasuncion and O. Pastor (2013). "Quantitative profile of lipid classes in blood by normal phase chromatography with evaporative light scattering detector: application in the detection of lipid class abnormalities in liver cirrhosis." Clin Chim Acta **421**: 132-139.
- Chatterjee, S. and A. Pandey (2008). "The Yin and Yang of lactosylceramide metabolism: implications in cell function." Biochim Biophys Acta **1780**(3): 370-382.

Checa, A., M. Khademi, D. G. Sar, J. Z. Haeggström, J. O. Lundberg, F. Piehl, T. Olsson and C. E. Wheelock (2015). "Hexosylceramides as intrathecal markers of worsening disability in multiple sclerosis." Mult Scler **21**(10): 1271-1279.

Cheng, H., G. Sun, K. Yang, R. W. Gross and X. Han (2010). "Selective desorption/ionization of sulfatides by MALDI-MS facilitated using 9-aminoacridine as matrix." J Lipid Res **51**(6): 1599-1609.

Cheng, H., J. Xu, D. W. McKeel and X. Han (2003). "Specificity and potential mechanism of sulfatide deficiency in Alzheimer's disease: an electrospray ionization mass spectrometric study." Cell Mol Biol (Noisy-le-grand) **49**(5): 809-818.

Christie, W. W. (1987, April 27 - 2019) (A). "Lipids: Definitions, Classification and Nomenclature." Retrieved October 16- 2019, from <https://www.lipidhome.co.uk/lipids/basics/Nomen/index.htm>.

Christie, W. (1987, October 2- 2019) (B). "Plasma Lipoproteins." Retrieved October 24- 2019, from <https://www.lipidhome.co.uk/lipids/simple/lipoprot/>.

Christie, W. W. and X. Han (2010). Lipid Analysis - Isolation, Separation, Identification and Lipidomic Analysis: 446.

Clark, A. E., E. J. Kaleta, A. Arora and D. M. Wolk (2013). "Matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry: a fundamental shift in the routine practice of clinical microbiology." Clin Microbiol Rev **26**(3): 547-603.

Coskun, O. (2016). "Separation techniques: Chromatography." North Clin Istanb **3**(2): 156-160.

Crick, P. J., W. J. Griffiths, J. Zhang, M. Beibel, J. Abdel-Khalik, J. Kuhle, A. W. Sailer and Y. Wang (2017). "Reduced Plasma Levels of 25-Hydroxycholesterol and Increased Cerebrospinal Fluid Levels of Bile Acid Precursors in Multiple Sclerosis Patients." Mol Neurobiol **54**(10): 8009-8020.

Dawaliby, R., C. Trubbia, C. Delporte, C. Noyon, J. M. Ruyschaert, P. Van Antwerpen and C. Govaerts (2016). "Phosphatidylethanolamine Is a Key Regulator of Membrane Fluidity in Eukaryotic Cells." J Biol Chem **291**(7): 3658-3667.

de Arriba Zerpa, G. A., M. C. Saleh, P. M. Fernández, F. Guillou, A. Espinosa de los Monteros, J. de Vellis, M. M. Zakin and B. Baron (2000). "Alternative splicing prevents transferrin secretion during differentiation of a human oligodendrocyte cell line." J Neurosci Res **61**(4): 388-395.

De Jager, P. L., X. Jia, J. Wang, P. I. de Bakker, L. Ottoboni, N. T. Aggarwal, L. Piccio, S. Raychaudhuri, D. Tran, C. Aubin, R. Briskin, S. Romano, S. E. Baranzini, J. L. McCauley, M. A. Pericak-Vance, J. L. Haines, R. A. Gibson, Y. Naeglin, B. Uitdehaag, P. M. Matthews, L. Kappos, C. Polman, W. L. McArdle, D. P. Strachan, D. Evans, A. H. Cross, M. J. Daly, A. Compston, S. J. Sawcer, H. L. Weiner, S. L. Hauser, D. A. Hafler, J. R. Oksenberg and I. M. G. Consortium (2009). "Meta-analysis of genome scans and replication identify CD6, IRF8 and TNFRSF1A as new multiple sclerosis susceptibility loci." Nat Genet **41**(7): 776-782.

De Stefano, N., S. Narayanan, P. M. Matthews, G. S. Francis, J. P. Antel and D. L. Arnold (1999). "In vivo evidence for axonal dysfunction remote from focal cerebral demyelination of the type seen in multiple sclerosis." Brain **122** (Pt 10): 1933-1939.

- Del Rio, D., A. Rodriguez-Mateos, J. P. Spencer, M. Tognolini, G. Borges and A. Crozier (2013). "Dietary (poly)phenolics in human health: structures, bioavailability, and evidence of protective effects against chronic diseases." Antioxid Redox Signal **18**(14): 1818-1892.
- DeLong, C. J., Y. J. Shen, M. J. Thomas and Z. Cui (1999). "Molecular distinction of phosphatidylcholine synthesis between the CDP-choline pathway and phosphatidylethanolamine methylation pathway." J Biol Chem **274**(42): 29683-29688.
- Di Paolo, G. and P. De Camilli (2006). "Phosphoinositides in cell regulation and membrane dynamics." Nature **443**(7112): 651-657.
- Didonna, A. and J. R. Oksenberg (2015). "Genetic determinants of risk and progression in multiple sclerosis." Clin Chim Acta **449**: 16-22.
- Dietschy, J. M. and S. D. Turley (2004). "Thematic review series: brain Lipids. Cholesterol metabolism in the central nervous system during early development and in the mature animal." J Lipid Res **45**(8): 1375-1397.
- Dobson, R., S. Ramagopalan, A. Davis and G. Giovannoni (2013). "Cerebrospinal fluid oligoclonal bands in multiple sclerosis and clinically isolated syndromes: a meta-analysis of prevalence, prognosis and effect of latitude." J Neurol Neurosurg Psychiatry **84**(8): 909-914.
- Duncan, M. W., H. Roder and S. W. Hunsucker (2008). "Quantitative matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry." Brief Funct Genomic Proteomic **7**(5): 355-370.
- Ekroos, K. (2012). Lipidomics Perspective: From Molecular Lipidomics to Validated Clinical Diagnostics. Lipidomics: Technologies and Applications. K. Ekroos, Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA.: 356.
- Espín, J. C., R. González-Barrio, B. Cerdá, C. López-Bote, A. I. Rey and F. A. Tomás-Barberán (2007). "Iberian pig as a model to clarify obscure points in the bioavailability and metabolism of ellagitannins in humans." J Agric Food Chem **55**(25): 10476-10485.
- Fadok, V. A., D. L. Bratton, S. C. Frasch, M. L. Warner and P. M. Henson (1998). "The role of phosphatidylserine in recognition of apoptotic cells by phagocytes." Cell Death Differ **5**(7): 551-562.
- Fahy, E., S. Subramaniam, H. A. Brown, C. K. Glass, A. H. Merrill, R. C. Murphy, C. R. Raetz, D. W. Russell, Y. Seyama, W. Shaw, T. Shimizu, F. Spener, G. van Meer, M. S. VanNieuwenhze, S. H. White, J. L. Witztum and E. A. Dennis (2005). "A comprehensive classification system for lipids." J Lipid Res **46**(5): 839-861.
- Fauland, A., H. Köfeler, M. Trötz Müller, A. Knopf, J. Hartler, A. Eberl, C. Chitraju, E. Lankmayr and F. Spener (2011). "A comprehensive method for lipid profiling by liquid chromatography-ion cyclotron resonance mass spectrometry." J Lipid Res **52**(12): 2314-2322.
- Feurer, C., D. E. Prentice and S. Cammisuli (1985). "Chronic relapsing experimental allergic encephalomyelitis in the Lewis rat." J Neuroimmunol **10**(2): 159-166.
- Folch, J., M. Lees and G. H. Sloane Stanley (1957). "A simple method for the isolation and purification of total lipides from animal tissues." J Biol Chem **226**(1): 497-509.
- Fuchs, B., A. Bischoff, R. Suss, K. Teuber, M. Schurenberg, D. Suckau and J. Schiller (2009). "Phosphatidylcholines and -ethanolamines can be easily mistaken in phospholipid mixtures: a negative ion MALDI-TOF MS study with 9-aminoacridine as matrix and egg yolk as selected example." Anal Bioanal Chem **395**(8): 2479-2487.

- Fuchs, B., A. Nimptsch, R. Suss and J. Schiller (2009). "Capabilities and drawbacks of phospholipid analysis by MALDI-TOF mass spectrometry." Methods Mol Biol **579**: 103-125.
- Fuchs, B., R. Suss and J. Schiller (2010). "An update of MALDI-TOF mass spectrometry in lipid research." Prog Lipid Res **49**(4): 450-475.
- Fuchs, B., R. Suss, K. Teuber, M. Eibisch and J. Schiller (2011). "Lipid analysis by thin-layer chromatography--a review of the current state." J Chromatogr A **1218**(19): 2754-2774.
- Fujiwaki, T., M. Tasaka and S. Yamaguchi (2008). "Quantitative evaluation of sphingomyelin and glucosylceramide using matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry with sphingosylphosphorylcholine as an internal standard. Practical application to tissues from patients with Niemann-Pick disease types A and C, and Gaucher disease." J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci **870**(2): 170-176.
- Gasperotti, M., S. Passamonti, F. Tramer, D. Masuero, G. Guella, F. Mattivi and U. Vrhovsek (2015). "Fate of microbial metabolites of dietary polyphenols in rats: is the brain their target destination?" ACS Chem Neurosci **6**(8): 1341-1352.
- Gault, C. R., L. M. Obeid and Y. A. Hannun (2010). "An overview of sphingolipid metabolism: from synthesis to breakdown." Adv Exp Med Biol **688**: 1-23.
- Ghadirian, P., M. Jain, S. Ducic, B. Shatenstein and R. Morisset (1998). "Nutritional factors in the aetiology of multiple sclerosis: a case-control study in Montreal, Canada." Int J Epidemiol **27**(5): 845-852.
- Giacoppo, S., M. Galuppo, G. E. Lombardo, M. M. Ulaszewska, F. Mattivi, P. Bramanti, E. Mazzon and M. Navarra (2015). "Neuroprotective effects of a polyphenolic white grape juice extract in a mouse model of experimental autoimmune encephalomyelitis." Fitoterapia **103**: 171-186.
- Gibb, S. and K. Strimmer (2012). "MALDIquant: a versatile R package for the analysis of mass spectrometry data." Bioinformatics **28**(17): 2270-2271.
- Gilgun-Sherki, Y., E. Melamed and D. Offen (2004). "The role of oxidative stress in the pathogenesis of multiple sclerosis: the need for effective antioxidant therapy." J Neurol **251**(3): 261-268.
- Glade, M. J. and K. Smith (2015). "Phosphatidylserine and the human brain." Nutrition **31**(6): 781-786.
- Gold, D. P., K. Schroder, H. C. Powell and C. J. Kelly (1997). "Nitric oxide and the immunomodulation of experimental allergic encephalomyelitis." Eur J Immunol **27**(11): 2863-2869.
- Gold, R., H. P. Hartung and K. V. Toyka (2000). "Animal models for autoimmune demyelinating disorders of the nervous system." Mol Med Today **6**(2): 88-91.
- Gold, R., C. Linington and H. Lassmann (2006). "Understanding pathogenesis and therapy of multiple sclerosis via animal models: 70 years of merits and culprits in experimental autoimmune encephalomyelitis research." Brain **129**(Pt 8): 1953-1971.
- Gonzalo, H., L. Brieva, F. Tatzber, M. Jové, D. Cacabelos, A. Cassanyé, L. Lanau-Angulo, J. Boada, J. C. Serrano, C. González, L. Hernández, S. Peralta, R. Pamplona and M. Portero-Otin (2012). "Lipidome analysis in multiple sclerosis reveals protein lipoxidative damage as a potential pathogenic mechanism." J Neurochem **123**(4): 622-634.

- Grytten, N., Ø. Torkildsen and K. M. Myhr (2015). "Time trends in the incidence and prevalence of multiple sclerosis in Norway during eight decades." Acta Neurol Scand **132**(199): 29-36.
- Guemez-Gamboa, A., L. N. Nguyen, H. Yang, M. S. Zaki, M. Kara, T. Ben-Omran, N. Akizu, R. O. Rosti, B. Rosti, E. Scott, J. Schroth, B. Copeland, K. K. Vaux, A. Cazenave-Gassiot, D. Q. Quek, B. H. Wong, B. C. Tan, M. R. Wenk, M. Gunel, S. Gabriel, N. C. Chi, D. L. Silver and J. G. Gleeson (2015). "Inactivating mutations in MFSD2A, required for omega-3 fatty acid transport in brain, cause a lethal microcephaly syndrome." Nat Genet **47**(7): 809-813.
- Haag, A. M. (2016). "Mass Analyzers and Mass Spectrometers." Adv Exp Med Biol **919**: 157-169.
- Hafler, D. A., A. Compston, S. Sawcer, E. S. Lander, M. J. Daly, P. L. De Jager, P. I. de Bakker, S. B. Gabriel, D. B. Mirel, A. J. Ivinson, M. A. Pericak-Vance, S. G. Gregory, J. D. Rioux, J. L. McCauley, J. L. Haines, L. F. Barcellos, B. Cree, J. R. Oksenberg, S. L. Hauser and I. M. S. G. Consortium (2007). "Risk alleles for multiple sclerosis identified by a genomewide study." N Engl J Med **357**(9): 851-862.
- Haghighi, S., A. Lekman, S. Nilsson, M. Blomqvist and O. Andersen (2013). "Increased CSF sulfatide levels and serum glycosphingolipid antibody levels in healthy siblings of multiple sclerosis patients." J Neurol Sci **326**(1-2): 35-39.
- Haider, L., M. T. Fischer, J. M. Frischer, J. Bauer, R. Höftberger, G. Botond, H. Esterbauer, C. J. Binder, J. L. Witztum and H. Lassmann (2011). "Oxidative damage in multiple sclerosis lesions." Brain **134**(Pt 7): 1914-1924.
- Halder, R. C., A. Jahng, I. Maricic and V. Kumar (2007). "Mini review: immune response to myelin-derived sulfatide and CNS-demyelination." Neurochem Res **32**(2): 257-262.
- Han, X. and X. Jiang (2009). "A review of lipidomic technologies applicable to sphingolipidomics and their relevant applications." Eur J Lipid Sci Technol **111**(1): 39-52.
- Han, X., D. M. Holtzman, D. W. McKeel, J. Kelley and J. C. Morris (2002). "Substantial sulfatide deficiency and ceramide elevation in very early Alzheimer's disease: potential role in disease pathogenesis." J Neurochem **82**(4): 809-818.
- Han, X., K. Yang and R. W. Gross (2012). "Multi-dimensional mass spectrometry-based shotgun lipidomics and novel strategies for lipidomic analyses." Mass Spectrom Rev **31**(1): 134-178.
- Hanada, K. (2003). "Serine palmitoyltransferase, a key enzyme of sphingolipid metabolism." Biochim Biophys Acta **1632**(1-3): 16-30.
- Hashim, G. A. (1985). "Neural antigens and the development of autoimmunity." J Immunol **135**(2 Suppl): 838s-842s.
- Hassoun, E. A., J. Vodhanel, B. Holden and A. Abushaban (2006). "The effects of ellagic acid and vitamin E succinate on antioxidant enzymes activities and glutathione levels in different brain regions of rats after subchronic exposure to TCDD." J Toxicol Environ Health A **69**(5): 381-393.
- Haughey, N. J., X. Zhu and V. V. Bandaru (2013). "A biological perspective of CSF lipids as surrogate markers for cognitive status in HIV." J Neuroimmune Pharmacol **8**(5): 1136-1146.
- Henderson, A. P., M. H. Barnett, J. D. Parratt and J. W. Prineas (2009). "Multiple sclerosis: distribution of inflammatory cells in newly forming lesions." Ann Neurol **66**(6): 739-753.

- Hendriks, J. J., H. E. de Vries, S. M. van der Pol, T. K. van den Berg, E. A. van Tol and C. D. Dijkstra (2003). "Flavonoids inhibit myelin phagocytosis by macrophages; a structure-activity relationship study." Biochem Pharmacol **65**(5): 877-885.
- Herzog, R., K. Schuhmann, D. Schwudke, J. L. Sampaio, S. R. Bornstein, M. Schroeder and A. Shevchenko (2012). "LipidXplorer: a software for consensual cross-platform lipidomics." PLoS One **7**(1): e29851.
- Howell, O. W., J. L. Rundle, A. Garg, M. Komada, P. J. Brophy and R. Reynolds (2010). "Activated microglia mediate axoglia disruption that contributes to axonal injury in multiple sclerosis." J Neuropathol Exp Neurol **69**(10): 1017-1033.
- Hsu, F. F. and J. Turk (2000). "Structural determination of sphingomyelin by tandem mass spectrometry with electrospray ionization." J Am Soc Mass Spectrom **11**(5): 437-449.
- Huang, Y. H., L. Schäfer-Elinder, R. Wu, H. E. Claesson and J. Frostegård (1999). "Lysophosphatidylcholine (LPC) induces proinflammatory cytokines by a platelet-activating factor (PAF) receptor-dependent mechanism." Clin Exp Immunol **116**(2): 326-331.
- Illingworth, D. R. and J. Glover (1971). "The composition of lipids in cerebrospinal fluid of children and adults." J Neurochem **18**(5): 769-776.
- Ilyas, A. A., Z. W. Chen and S. D. Cook (2003). "Antibodies to sulfatide in cerebrospinal fluid of patients with multiple sclerosis." J Neuroimmunol **139**(1-2): 76-80.
- Izquierdo, G., A. Venegas, C. Sanabria and G. Navarro (2015). "Long-term epidemiology of multiple sclerosis in the Northern Seville District." Acta Neurol Scand **132**(2): 111-117.
- Jana, A. and K. Pahan (2010). "Sphingolipids in multiple sclerosis." Neuromolecular Med **12**(4): 351-361.
- Jensen, G. E. and J. Clausen (1986). "Glutathione peroxidase activity, associated enzymes and substrates in blood cells from patients with multiple sclerosis--effects of antioxidant supplementation." Acta Pharmacol Toxicol (Copenh) **59 Suppl 7**: 450-453.
- Jeong, H. J., Y. G. Kim, Y. H. Yang and B. G. Kim (2012). "High-throughput quantitative analysis of total N-glycans by matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry." Anal Chem **84**(7): 3453-3460.
- Jiang, X., H. Cheng, K. Yang, R. W. Gross and X. Han (2007). "Alkaline methanolysis of lipid extracts extends shotgun lipidomics analyses to the low-abundance regime of cellular sphingolipids." Anal Biochem **371**(2): 135-145.
- Jiménez-Jiménez, F. J., F. de Bustos, J. A. Molina, C. de Andrés, T. Gasalla, M. Ortí-Pareja, M. Zurdo, J. Porta, F. Castellano-Millán, J. Arenas and R. Enríquez de Salamanca (1998). "Cerebrospinal fluid levels of alpha-tocopherol in patients with multiple sclerosis." Neurosci Lett **249**(1): 65-67.
- Jirasko, R., M. Holcapek, J. Macak and J. Gutwirth (2014). Comparison of selected matrices, nanostructures and other materials in (MALDI) analysis of lipids. 4th European Lipidomic Meeting, Graz, Austria.
- Johanson, R. A. and G. T. Berry (2009). "Brain phosphoinositide extraction, fractionation, and analysis by MALDI-TOF MS." Methods Mol Biol **579**: 189-200.
- Jonas, A. (2000). "Lecithin cholesterol acyltransferase." Biochim Biophys Acta **1529**(1-3): 245-256.

- Jones, R. E., D. N. Bourdette, H. Offner and A. A. Vandenbark (1990). "Myelin basic protein-specific T cells induce demyelinating experimental autoimmune encephalomyelitis in Buffalo rats." J Neuroimmunol **30**(1): 61-69.
- Kang, I., T. Buckner, N. F. Shay, L. Gu and S. Chung (2016). "Improvements in Metabolic Health with Consumption of Ellagic Acid and Subsequent Conversion into Urolithins: Evidence and Mechanisms." Adv Nutr **7**(5): 961-972.
- Kannan, M. M. and S. D. Quine (2013). "Ellagic acid inhibits cardiac arrhythmias, hypertrophy and hyperlipidaemia during myocardial infarction in rats." Metabolism **62**(1): 52-61.
- Kanno, K., M. K. Wu, E. F. Scapa, S. L. Roderick and D. E. Cohen (2007). "Structure and function of phosphatidylcholine transfer protein (PC-TP)/StarD2." Biochim Biophys Acta **1771**(6): 654-662.
- Kanter, J. L., S. Narayana, P. P. Ho, I. Catz, K. G. Warren, R. A. Sobel, L. Steinman and W. H. Robinson (2006). "Lipid microarrays identify key mediators of autoimmune brain inflammation." Nat Med **12**(1): 138-143.
- Katz Sand, I. B. and F. D. Lublin (2013). "Diagnosis and differential diagnosis of multiple sclerosis." Continuum (Minneap Minn) **19**(4 Multiple Sclerosis): 922-943.
- Khandelwal, P., S. Stryker, H. Chao, N. Aranibar, R. M. Lawrence, M. Madireddi, W. Zhao, L. Chen and M. D. Reily (2014). "1H NMR-based lipidomics of rodent fur: species-specific lipid profiles and SCD1 inhibitor-related dermal toxicity." J Lipid Res **55**(7): 1366-1374.
- Kiebish, M. A., D. M. Young, J. J. Lehman and X. Han (2012). "Chronic caloric restriction attenuates a loss of sulfatide content in PGC-1 α -/- mouse cortex: a potential lipidomic role of PGC-1 α in neurodegeneration." J Lipid Res **53**(2): 273-281.
- Kieseier, B. C. (2011). "The mechanism of action of interferon- β in relapsing multiple sclerosis." CNS Drugs **25**(6): 491-502.
- Klaren, R. E., U. Stasula, A. J. Steelman, J. Hernandez, B. D. Pence, J. A. Woods and R. W. Motl (2016). "Effects of exercise in a relapsing-remitting model of experimental autoimmune encephalomyelitis." J Neurosci Res **94**(10): 907-914.
- Koch, M., E. Kingwell, P. Rieckmann and H. Tremlett (2009). "The natural history of primary progressive multiple sclerosis." Neurology **73**(23): 1996-2002.
- Koch, M., E. Kingwell, P. Rieckmann, H. Tremlett and U. M. C. Neurologists (2010). "The natural history of secondary progressive multiple sclerosis." J Neurol Neurosurg Psychiatry **81**(9): 1039-1043.
- Koch, M., J. Mostert, A. V. Arutjunyan, M. Stepanov, A. Teelken, D. Heersema and J. De Keyser (2007). "Plasma lipid peroxidation and progression of disability in multiple sclerosis." Eur J Neurol **14**(5): 529-533.
- Koivusalo, M., P. Haimi, L. Heikinheimo, R. Kostinen and P. Somerharju (2001). "Quantitative determination of phospholipid compositions by ESI-MS: effects of acyl chain length, unsaturation, and lipid concentration on instrument response." J Lipid Res **42**(4): 663-672.
- Kraft, M. L. (2016). "Sphingolipid Organization in the Plasma Membrane and the Mechanisms That Influence It." Front Cell Dev Biol **4**: 154.
- Kruth, H. S. (2001). "Lipoprotein cholesterol and atherosclerosis." Curr Mol Med **1**(6): 633-653.

- Kubo, A., M. Kajimura and M. Suematsu (2012). "Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization (MALDI) Imaging Mass Spectrometry (IMS): A Challenge for Reliable Quantitative Analyses." Mass Spectrom (Tokyo) **1**(1): A0004.
- Kuhle, J., C. Pohl, M. Mehling, G. Edan, M. S. Freedman, H. P. Hartung, C. H. Polman, D. H. Miller, X. Montalban, F. Barkhof, L. Bauer, S. Dahms, R. Lindberg, L. Kappos and R. Sandbrink (2007). "Lack of association between antimyelin antibodies and progression to multiple sclerosis." N Engl J Med **356**(4): 371-378.
- Kuksis, A., J. J. Myher, K. Geher, W. C. Breckenridge, G. J. Jones and J. A. Little (1981). "Lipid class and molecular species interrelationships among plasma lipoproteins of normolipemic subjects." J Chromatogr **224**(1): 1-23.
- Kumashiro, N., D. M. Erion, D. Zhang, M. Kahn, S. A. Beddow, X. Chu, C. D. Still, G. S. Gerhard, X. Han, J. Dziura, K. F. Petersen, V. T. Samuel and G. I. Shulman (2011). "Cellular mechanism of insulin resistance in nonalcoholic fatty liver disease." Proc Natl Acad Sci U S A **108**(39): 16381-16385.
- Köfeler, H. C., A. Fauland, G. N. Rechberger and M. Trötz Müller (2012). "Mass spectrometry based lipidomics: an overview of technological platforms." Metabolites **2**(1): 19-38.
- La Mantia, L., I. Tramacere, B. Firwana, I. Pacchetti, R. Palumbo and G. Filippini (2016). "Fingolimod for relapsing-remitting multiple sclerosis." Cochrane Database Syst Rev **4**: CD009371.
- Lahiri, S. and A. H. Futerman (2007). "The metabolism and function of sphingolipids and glycosphingolipids." Cell Mol Life Sci **64**(17): 2270-2284.
- Langemann, H., A. Kabiersch and J. Newcombe (1992). "Measurement of low-molecular-weight antioxidants, uric acid, tyrosine and tryptophan in plaques and white matter from patients with multiple sclerosis." Eur Neurol **32**(5): 248-252.
- Larrosa, M., F. A. Tomás-Barberán and J. C. Espín (2006). "The dietary hydrolysable tannin punicalagin releases ellagic acid that induces apoptosis in human colon adenocarcinoma Caco-2 cells by using the mitochondrial pathway." J Nutr Biochem **17**(9): 611-625.
- Lassmann, H., W. Brück, C. Lucchinetti and M. Rodriguez (1997). "Remyelination in multiple sclerosis." Mult Scler **3**(2): 133-136.
- Lassmann, H., W. Brück and C. F. Lucchinetti (2007). "The immunopathology of multiple sclerosis: an overview." Brain Pathol **17**(2): 210-218.
- Lassmann, H. and H. M. Wisniewski (1979). "Chronic relapsing experimental allergic encephalomyelitis: clinicopathological comparison with multiple sclerosis." Arch Neurol **36**(8): 490-497.
- Laviad, E. L., S. Kelly, A. H. Merrill and A. H. Futerman (2012). "Modulation of ceramide synthase activity via dimerization." J Biol Chem **287**(25): 21025-21033.
- Lay, J. O., Jr., R. Liyanage, B. Durham and J. Brooks (2006). "Rapid characterization of edible oils by direct matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry analysis using triacylglycerols." Rapid Commun Mass Spectrom **20**(6): 952-958.
- Lee, C. Y., A. Lesimple, M. Denis, J. Vincent, A. Larsen, O. Mamer, L. Krimbou, J. Genest and M. Marcil (2006). "Increased sphingomyelin content impairs HDL biogenesis and maturation in human Niemann-Pick disease type B." J Lipid Res **47**(3): 622-632.

- Leoni, V. (2009). "Oxysterols as markers of neurological disease--a review." Scand J Clin Lab Invest **69**(1): 22-25.
- Leoni, V. and C. Caccia (2013). "Potential diagnostic applications of side chain oxysterols analysis in plasma and cerebrospinal fluid." Biochem Pharmacol **86**(1): 26-36.
- Leray, E., T. Moreau, A. Fromont and G. Edan (2016). "Epidemiology of multiple sclerosis." Rev Neurol (Paris) **172**(1): 3-13.
- Liebisch, G., J. A. Vizcaino, H. Köfeler, M. Trotzmüller, W. J. Griffiths, G. Schmitz, F. Spener and M. J. Wakelam (2013). "Shorthand notation for lipid structures derived from mass spectrometry." J Lipid Res **54**(6): 1523-1530.
- Lincoln, M. R., A. Montpetit, M. Z. Cader, J. Saarela, D. A. Dyment, M. Tiislar, V. Ferretti, P. J. Tienari, A. D. Sadovnick, L. Peltonen, G. C. Ebers and T. J. Hudson (2005). "A predominant role for the HLA class II region in the association of the MHC region with multiple sclerosis." Nat Genet **37**(10): 1108-1112.
- Lubetzki, C., Y. Thuillier, A. Galli, O. Lyon-Caen, F. Lhermitte and B. Zalc (1989). "Galactosylceramide: a reliable serum index of demyelination in multiple sclerosis." Ann Neurol **26**(3): 407-409.
- Lublin, F. D. (2014). "New multiple sclerosis phenotypic classification." Eur Neurol **72 Suppl 1**: 1-5.
- Luftmann, H., M. Aranda and G. E. Morlock (2007). "Automated interface for hyphenation of planar chromatography with mass spectrometry." Rapid Commun Mass Spectrom **21**(23): 3772-3776.
- Lyman, W. D., A. S. Kadish, C. F. Brosnan and C. S. Raine (1983). "Antigen-induced suppression of mitogen responses and resistance to experimental autoimmune encephalomyelitis." Cell Immunol **78**(1): 43-55.
- Løken-Amsrud, K. I., A. Lossius, Ø. Torkildsen and T. Holmøy (2015). "Impact of the environment on multiple sclerosis." Tidsskr Nor Lægeforen **135**(9): 856-860.
- MacLean, B., D. M. Tomazela, N. Shulman, M. Chambers, G. L. Finney, B. Frewen, R. Kern, D. L. Tabb, D. C. Liebler and M. J. MacCoss (2010). "Skyline: an open source document editor for creating and analyzing targeted proteomics experiments." Bioinformatics **26**(7): 966-968.
- Marai, L. and A. Kuksis (1969). "Molecular species of lecithins from erythrocytes and plasma of man." J Lipid Res **10**(2): 141-152.
- Marcus, J. and B. Popko (2002). "Galactolipids are molecular determinants of myelin development and axo-glial organization." Biochim Biophys Acta **1573**(3): 406-413.
- Maron, D. J., S. Fazio and M. F. Linton (2000). "Current perspectives on statins." Circulation **101**(2): 207-213.
- Martin, O. C. and R. E. Pagano (1987). "Transbilayer movement of fluorescent analogs of phosphatidylserine and phosphatidylethanolamine at the plasma membrane of cultured cells. Evidence for a protein-mediated and ATP-dependent process(es)." J Biol Chem **262**(12): 5890-5898.
- Matsumoto, Y., K. Kawai, Y. Tomita and M. Fujiwara (1990). "Limiting-dilution analysis of the frequency of myelin basic protein-reactive T cells in Lewis, PVG/c and BN rats. Implication for susceptibility to autoimmune encephalomyelitis." Immunology **69**(2): 215-221.

- Mattsson, N. (2011). "CSF biomarkers in neurodegenerative diseases." Clin Chem Lab Med **49**(3): 345-352.
- Mayo, L., S. A. Trauger, M. Blain, M. Nadeau, B. Patel, J. I. Alvarez, I. D. Mascalfroni, A. Yeste, P. Kivisäkk, K. Kallas, B. Ellezam, R. Bakshi, A. Prat, J. P. Antel, H. L. Weiner and F. J. Quintana (2014). "Regulation of astrocyte activation by glycolipids drives chronic CNS inflammation." Nat Med **20**(10): 1147-1156.
- McDonald, W. I., A. Compston, G. Edan, D. Goodkin, H. P. Hartung, F. D. Lublin, H. F. McFarland, D. W. Paty, C. H. Polman, S. C. Reingold, M. Sandberg-Wollheim, W. Sibley, A. Thompson, S. van den Noort, B. Y. Weinshenker and J. S. Wolinsky (2001). "Recommended diagnostic criteria for multiple sclerosis: guidelines from the International Panel on the diagnosis of multiple sclerosis." Ann Neurol **50**(1): 121-127.
- McFarland, H. F. and S. Dhib-Jalbut (1989). "Multiple sclerosis: possible immunological mechanisms." Clin Immunol Immunopathol **50**(1 Pt 2): S96-105.
- McLean, B. N., R. W. Luxton and E. J. Thompson (1990). "A study of immunoglobulin G in the cerebrospinal fluid of 1007 patients with suspected neurological disease using isoelectric focusing and the Log IgG-Index. A comparison and diagnostic applications." Brain **113** (Pt 5): 1269-1289.
- Miller, E., B. Wachowicz and I. Majsterek (2013). "Advances in antioxidative therapy of multiple sclerosis." Curr Med Chem **20**(37): 4720-4730.
- Miller, L. G., J. A. Young, S. K. Ray, G. Wang, S. Purohit, N. L. Banik and S. Dasgupta (2017). "Sphingosine Toxicity in EAE and MS: Evidence for Ceramide Generation via Serine-Palmitoyltransferase Activation." Neurochem Res.
- Miller, S. D. and W. J. Karpus (2007). "Experimental autoimmune encephalomyelitis in the mouse." Curr Protoc Immunol **Chapter 15**: Unit 15.11.
- Mims, D. and D. Hercules (2003). "Quantification of bile acids directly from urine by MALDI-TOF-MS." Anal Bioanal Chem **375**(5): 609-616.
- Mirshafiey, A. and M. Mohsenzadegan (2009). "Antioxidant therapy in multiple sclerosis." Immunopharmacol Immunotoxicol **31**(1): 13-29.
- Mohajeri, M., M. Sadeghizadeh, F. Najafi and M. Javan (2015). "Polymerized nano-curcumin attenuates neurological symptoms in EAE model of multiple sclerosis through down regulation of inflammatory and oxidative processes and enhancing neuroprotection and myelin repair." Neuropharmacology **99**: 156-167.
- Montelongo, A., M. A. Lasuncion, L. F. Pallardo and E. Herrera (1992). "Longitudinal study of plasma lipoproteins and hormones during pregnancy in normal and diabetic women." Diabetes **41**(12): 1651-1659.
- Morin, C., L. Charbonneau, N. Ouellet, H. Ouellet, P. U. Blier, F. Dufresne and S. Fortin (2017). "Eicosapentaenoic acid monoglyceride resolves inflammation in an ex vivo model of human peripheral blood mononuclear cell." Eur J Pharmacol **807**: 205-211.
- Moyano, A. L., K. Pituch, G. Li, R. van Breemen, J. E. Mansson and M. I. Givogri (2013). "Levels of plasma sulfatides C18 : 0 and C24 : 1 correlate with disease status in relapsing-remitting multiple sclerosis." J Neurochem **127**(5): 600-604.

Muthian, G. and J. J. Bright (2004). "Quercetin, a flavonoid phytoestrogen, ameliorates experimental allergic encephalomyelitis by blocking IL-12 signaling through JAK-STAT pathway in T lymphocyte." J Clin Immunol **24**(5): 542-552.

Myher, J. J., A. Kuksis, J. Shepherd, C. J. Packard, J. D. Morrisett, O. D. Taunton and A. M. Gotto (1981). "Effect of saturated and unsaturated fat diets on molecular species of phosphatidylcholine and sphingomyelin of human plasma lipoproteins." Biochim Biophys Acta **666**(1): 110-119.

Natarajan, C. and J. J. Bright (2002). "Curcumin inhibits experimental allergic encephalomyelitis by blocking IL-12 signaling through Janus kinase-STAT pathway in T lymphocytes." J Immunol **168**(12): 6506-6513.

Norton, W. and W. Cammer (1984). Isolation and Characterization of Myelin. Myelin M. P.: 147-195.

Novakova, L., A. K. Singh, M. Axelsson, M. Ståhlman, M. Adiels, C. Malmeström, H. Zetterberg, J. Borén, J. Lycke, S. L. Cardell and M. Blomqvist (2018). "Sulfatide isoform pattern in cerebrospinal fluid discriminates progressive MS from relapsing-remitting MS." J Neurochem **146**(3): 322-332.

Numata, M., H. W. Chu, A. Dakhama and D. R. Voelker (2010). "Pulmonary surfactant phosphatidylglycerol inhibits respiratory syncytial virus-induced inflammation and infection." Proc Natl Acad Sci U S A **107**(1): 320-325.

Otero-Romero, S., P. Roura, J. Solà, J. Altimiras, J. Sastre-Garriga, C. Nos, J. Vaqué, X. Montalban and E. Bufill (2013). "Increase in the prevalence of multiple sclerosis over a 17-year period in Osona, Catalonia, Spain." Mult Scler **19**(2): 245-248.

Palavicini, J. P., C. Wang, L. Chen, S. Ahmar, J. D. Higuera, J. L. Dupree and X. Han (2016). "Novel molecular insights into the critical role of sulfatide in myelin maintenance/function." J Neurochem **139**(1): 40-54.

Panchal, S. K., L. Ward and L. Brown (2013). "Ellagic acid attenuates high-carbohydrate, high-fat diet-induced metabolic syndrome in rats." Eur J Nutr **52**(2): 559-568.

Panitch, H. and C. Ciccone (1981). "Induction of recurrent experimental allergic encephalomyelitis with myelin basic protein." Ann Neurol **9**(5): 433-438.

Paradies, G., V. Paradies, V. De Benedictis, F. M. Ruggiero and G. Petrosillo (2014). "Functional role of cardiolipin in mitochondrial bioenergetics." Biochim Biophys Acta **1837**(4): 408-417.

Park, K. M., Y. J. Bae, S. H. Ahn and M. S. Kim (2012). "A simple method for quantification of peptides and proteins by matrix-assisted laser desorption ionization mass spectrometry." Anal Chem **84**(23): 10332-10337.

Patel, R. (2015). "MALDI-TOF MS for the diagnosis of infectious diseases." Clin Chem **61**(1): 100-111.

Pender, M. P. (1989). "Recovery from acute experimental allergic encephalomyelitis in the Lewis rat. Early restoration of nerve conduction and repair by Schwann cells and oligodendrocytes." Brain **112** (Pt 2): 393-416.

Pender, M. P. and S. R. Burrows (2014). "Epstein-Barr virus and multiple sclerosis: potential opportunities for immunotherapy." Clin Transl Immunology **3**(10): e27.

- Pender, M. P., K. B. Nguyen and D. O. Willenborg (1989). "Demyelination and early remyelination in experimental allergic encephalomyelitis passively transferred with myelin basic protein-sensitized lymphocytes in the Lewis rat." J Neuroimmunol **25**(2-3): 125-142.
- Pender, M. P. and T. A. Sears (1982). "Conduction block in the peripheral nervous system in experimental allergic encephalomyelitis." Nature **296**(5860): 860-862.
- Pender, M. P., Z. Tabi, K. B. Nguyen and P. A. McCombe (1995). "The proximal peripheral nervous system is a major site of demyelination in experimental autoimmune encephalomyelitis induced in the Lewis rat by a myelin basic protein-specific T cell clone." Acta Neuropathol **89**(6): 527-531.
- Peng, B., H. Li and X. X. Peng (2015). "Functional metabolomics: from biomarker discovery to metabolome reprogramming." Protein Cell **6**(9): 628-637.
- Petković, F. and B. Castellano (2016). "The role of interleukin-6 in central nervous system demyelination." Neural Regen Res **11**(12): 1922-1923.
- Philips, T. and J. D. Rothstein (2017). "Oligodendroglia: metabolic supporters of neurons." J Clin Invest **127**(9): 3271-3280.
- Pilo-de-la-Fuente, B., A. Jimenez-Escrig, J. R. Lorenzo, J. Pardo, M. Arias, A. Ares-Luque, J. Duarte, S. Muñoz-Pérez and M. J. Sobrido (2011). "Cerebrotendinous xanthomatosis in Spain: clinical, prognostic, and genetic survey." Eur J Neurol **18**(10): 1203-1211.
- Pitarokoili, K., B. Ambrosius and R. Gold (2017). "Lewis Rat Model of Experimental Autoimmune Encephalomyelitis." Curr Protoc Neurosci **81**: 9.61.61-69.61.20.
- Polman, C. H., S. C. Reingold, B. Banwell, M. Clanet, J. A. Cohen, M. Filippi, K. Fujihara, E. Havrdova, M. Hutchinson, L. Kappos, F. D. Lublin, X. Montalban, P. O'Connor, M. Sandberg-Wollheim, A. J. Thompson, E. Waubant, B. Weinshenker and J. S. Wolinsky (2011). "Diagnostic criteria for multiple sclerosis: 2010 revisions to the McDonald criteria." Ann Neurol **69**(2): 292-302.
- Post, G. R. and G. Dawson (1992). "Characterization of a cell line derived from a human oligodendroglioma." Mol Chem Neuropathol **16**(3): 303-317.
- Qin, J., E. Berdyshev, J. Goya, V. Natarajan and G. Dawson (2010). "Neurons and oligodendrocytes recycle sphingosine 1-phosphate to ceramide: significance for apoptosis and multiple sclerosis." J Biol Chem **285**(19): 14134-14143.
- Quehenberger, O., A. M. Armando, A. H. Brown, S. B. Milne, D. S. Myers, A. H. Merrill, S. Bandyopadhyay, K. N. Jones, S. Kelly, R. L. Shaner, C. M. Sullards, E. Wang, R. C. Murphy, R. M. Barkley, T. J. Leiker, C. R. Raetz, Z. Guan, G. M. Laird, D. A. Six, D. W. Russell, J. G. McDonald, S. Subramaniam, E. Fahy and E. A. Dennis (2010). "Lipidomics reveals a remarkable diversity of lipids in human plasma." J Lipid Res **51**(11): 3299-3305.
- Quintana, F. J., A. Yeste, H. L. Weiner and R. Covacu (2012). "Lipids and lipid-reactive antibodies as biomarkers for multiple sclerosis." J Neuroimmunol **248**(1-2): 53-57.
- Raine, C. S., U. Traugott, M. Farooq, M. B. Bornstein and W. T. Norton (1981). "Augmentation of immune-mediated demyelination by lipid haptens." Lab Invest **45**(2): 174-182.
- Rajabi, A., N. Parinejad, K. Ahmadi, M. R. Khorramizadeh and M. Raza (2011). "Anti-inflammatory effects of serum isolated from animals on intermittent feeding in C6 glioma cell line." Neurosci Lett **487**(1): 32-35.

Rinaldi, L., F. Grassivaro and P. Gallo (2010). Lipids in Multiple Sclerosis. Handbook of Neurochemistry and Molecular Neurobiology: Neural Lipids. A. Lajtha, G. Tettamanti and G. Goracci. Boston, MA, Springer US: 593-602.

Roda, A., C. Cerrè, P. Simoni, C. Polimeni, C. Vaccari and A. Pistillo (1992). "Determination of free and amidated bile acids by high-performance liquid chromatography with evaporative light-scattering mass detection." J Lipid Res **33**(9): 1393-1402.

Rosenblat, M., N. Volkova, R. Coleman and M. Aviram (2006). "Pomegranate byproduct administration to apolipoprotein e-deficient mice attenuates atherosclerosis development as a result of decreased macrophage oxidative stress and reduced cellular uptake of oxidized low-density lipoprotein." J Agric Food Chem **54**(5): 1928-1935.

Rosillo, M. A., M. Sánchez-Hidalgo, A. Cárdeno, M. Aparicio-Soto, S. Sánchez-Fidalgo, I. Villegas and C. A. de la Lastra (2012). "Dietary supplementation of an ellagic acid-enriched pomegranate extract attenuates chronic colonic inflammation in rats." Pharmacol Res **66**(3): 235-242.

Rubio, J. P., J. Stankovich, J. Field, N. Tubridy, M. Marriott, C. Chapman, M. Bahlo, D. Perera, L. J. Johnson, B. D. Tait, M. D. Varney, T. P. Speed, B. V. Taylor, S. J. Foote, H. Butzkueven and T. J. Kilpatrick (2008). "Replication of KIAA0350, IL2RA, RPL5 and CD58 as multiple sclerosis susceptibility genes in Australians." Genes Immun **9**(7): 624-630.

Sadler, R. H., M. A. Sommer, L. S. Forno and M. E. Smith (1991). "Induction of anti-myelin antibodies in EAE and their possible role in demyelination." J Neurosci Res **30**(4): 616-624.

Salen, G., V. Berginer, V. Shore, I. Horak, E. Horak, G. S. Tint and S. Shefer (1987). "Increased concentrations of cholestanol and apolipoprotein B in the cerebrospinal fluid of patients with cerebrotendinous xanthomatosis. Effect of chenodeoxycholic acid." N Engl J Med **316**(20): 1233-1238.

Salvati, S., D. D'Urso, L. Conti Devirgiliis and G. Serlupi Crescenzi (1986). "Biochemical changes in central nervous system membranes in experimental allergic encephalomyelitis." J Neurochem **47**(1): 239-244.

Salzer, J., G. Hallmans, M. Nyström, H. Stenlund, G. Wadell and P. Sundström (2013). "Smoking as a risk factor for multiple sclerosis." Mult Scler **19**(8): 1022-1027.

Sanadgol, N., F. Golab, Z. Tashakkor, N. Taki, S. Moradi Kouchi, A. Mostafaie, M. Mehdizadeh, M. Abdollahi, G. Taghizadeh and M. Sharifzadeh (2017). "Neuroprotective effects of ellagic acid on cuprizone-induced acute demyelination through limitation of microgliosis, adjustment of CXCL12/IL-17/IL-11 axis and restriction of mature oligodendrocytes apoptosis." Pharm Biol **55**(1): 1679-1687.

Schiffmann, S., N. Ferreiros, K. Birod, M. Eberle, Y. Schreiber, W. Pfeilschifter, U. Ziemann, S. Pierre, K. Scholich, S. Grösch and G. Geisslinger (2012). "Ceramide synthase 6 plays a critical role in the development of experimental autoimmune encephalomyelitis." J Immunol **188**(11): 5723-5733.

Schiller, J., R. Suss, B. Fuchs, M. Muller, M. Petkovic, O. Zschornig and H. Waschipky (2007). "The suitability of different DHB isomers as matrices for the MALDI-TOF MS analysis of phospholipids: which isomer for what purpose?" Eur Biophys J **36**(4-5): 517-527.

- Schiller, J., O. Zschornig, M. Petkovic, M. Muller, J. Arnhold and K. Arnold (2001). "Lipid analysis of human HDL and LDL by MALDI-TOF mass spectrometry and (31)P-NMR." J Lipid Res **42**(9): 1501-1508.
- Schmitt, S., L. C. Castelvetti and M. Simons (2015). "Metabolism and functions of lipids in myelin." Biochim Biophys Acta **1851**(8): 999-1005.
- Schwudke, D., A. Shevchenko, N. Hoffmann and R. Ahrends (2017). "Lipidomics informatics for life-science." J Biotechnol **261**: 131-136.
- Seeram, N. P., S. M. Henning, Y. Zhang, M. Suchard, Z. Li and D. Heber (2006). "Pomegranate juice ellagitannin metabolites are present in human plasma and some persist in urine for up to 48 hours." J Nutr **136**(10): 2481-2485.
- Seyer, A., S. Boudah, S. Broudin, C. Junot and B. Colsch (2016). "Annotation of the human cerebrospinal fluid lipidome using high resolution mass spectrometry and a dedicated data processing workflow." Metabolomics **12**: 91.
- Silber, E. and M. K. Sharief (1999). "Axonal degeneration in the pathogenesis of multiple sclerosis." J Neurol Sci **170**(1): 11-18.
- Simmons, R. D., C. C. Bernard, K. T. Ng and P. R. Carnegie (1981). "Hind-limb motor ability in Lewis rats during the onset and recovery phases of experimental autoimmune encephalomyelitis." Brain Res **215**(1-2): 103-114.
- Singhal, N., M. Kumar, P. K. Kanaujia and J. S. Viridi (2015). "MALDI-TOF mass spectrometry: an emerging technology for microbial identification and diagnosis." Front Microbiol **6**: 791.
- Slavin, D. A., A. E. Bucher, A. L. Degano, N. W. Soria and G. A. Roth (1996). "Time course of biochemical and immunohistological alterations during experimental allergic encephalomyelitis." Neurochem Int **29**(6): 597-605.
- Sommer, U., H. Herscovitz, F. K. Welty and C. E. Costello (2006). "LC-MS-based method for the qualitative and quantitative analysis of complex lipid mixtures." J Lipid Res **47**(4): 804-814.
- Sospedra, M. and R. Martin (2006). "Molecular mimicry in multiple sclerosis." Autoimmunity **39**(1): 3-8.
- Sotelo, J., A. Martínez-Palomo, G. Ordoñez and B. Pineda (2008). "Varicella-zoster virus in cerebrospinal fluid at relapses of multiple sclerosis." Ann Neurol **63**(3): 303-311.
- Spener, F., M. Lagarde, A. Gélôën and M. Redord (2003). "Editorial: What is lipidomics?" Eur. J. Lipid Sci. Technol.
- Stevens, A., M. Weller and H. Wiethölter (1992). "CSF and serum ganglioside antibody patterns in MS." Acta Neurol Scand **86**(5): 485-489.
- Stoffel, W. and A. Bosio (1997). "Myelin glycolipids and their functions." Curr Opin Neurobiol **7**(5): 654-661.
- Strober, L. B., C. Christodoulou, R. H. Benedict, H. J. Westervelt, P. Melville, W. F. Scherl, B. Weinstock-Guttman, S. Rizvi, A. D. Goodman and L. B. Krupp (2012). "Unemployment in multiple sclerosis: the contribution of personality and disease." Mult Scler **18**(5): 647-653.
- Subbaiah, P. V., J. M. Sowa and M. H. Davidson (2004). "Evidence for altered positional specificity of LCAT in vivo: studies with docosahexaenoic acid feeding in humans." J Lipid Res **45**(12): 2245-2251.

- Sun, G., K. Yang, Z. Zhao, S. Guan, X. Han and R. W. Gross (2008). "Matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometric analysis of cellular glycerophospholipids enabled by multiplexed solvent dependent analyte-matrix interactions." Anal Chem **80**(19): 7576-7585.
- Takahashi, T. and T. Suzuki (2012). "Role of sulfatide in normal and pathological cells and tissues." J Lipid Res **53**(8): 1437-1450.
- Tammen, H. and R. Hess (2018). "Data Preprocessing, Visualization, and Statistical Analyses of Nontargeted Peptidomics Data from MALDI-MS." Methods Mol Biol **1719**: 187-196.
- Tautenhahn, R., G. J. Patti, D. Rinehart and G. Siuzdak (2012). "XCMS Online: a web-based platform to process untargeted metabolomic data." Anal Chem **84**(11): 5035-5039.
- Thacker, E. L., F. Mirzaei and A. Ascherio (2006). "Infectious mononucleosis and risk for multiple sclerosis: a meta-analysis." Ann Neurol **59**(3): 499-503.
- Tomás-Barberán, F. A., A. González-Sarrias, R. García-Villalba, M. A. Núñez-Sánchez, M. V. Selma, M. T. García-Conesa and J. C. Espín (2017). "Urolithins, the rescue of "old" metabolites to understand a "new" concept: Metabotypes as a nexus among phenolic metabolism, microbiota dysbiosis, and host health status." Mol Nutr Food Res **61**(1).
- Tourtellotte, W. W. and A. F. Haerer (1969). "Lipids in cerebrospinal fluid. XII. In multiple sclerosis and retrobulbar neuritis." Arch Neurol **20**(6): 605-615.
- Trapp, B. D., R. Ransohoff and R. Rudick (1999). "Axonal pathology in multiple sclerosis: relationship to neurologic disability." Curr Opin Neurol **12**(3): 295-302.
- Tumani, H., C. Teunissen, S. Süssmuth, M. Otto, A. C. Ludolph and J. Brettschneider (2008). "Cerebrospinal fluid biomarkers of neurodegeneration in chronic neurological diseases." Expert Rev Mol Diagn **8**(4): 479-494.
- Urban, P. L. (2016). "Quantitative mass spectrometry: an overview." Philos Trans A Math Phys Eng Sci **374**(2079).
- van Horssen, J., M. E. Witte, G. Schreibelt and H. E. de Vries (2011). "Radical changes in multiple sclerosis pathogenesis." Biochim Biophys Acta **1812**(2): 141-150.
- van Meer, G., D. R. Voelker and G. W. Feigenson (2008). "Membrane lipids: where they are and how they behave." Nat Rev Mol Cell Biol **9**(2): 112-124.
- Vaughan, K., B. Peters, K. C. O'Connor, R. Martin and A. Sette (2014). "A molecular view of multiple sclerosis and experimental autoimmune encephalitis: what can we learn from the epitope data?" J Neuroimmunol **267**(1-2): 73-85.
- Vidaurre, O. G., J. D. Haines, I. Katz Sand, K. P. Adula, J. L. Huynh, C. A. McGraw, F. Zhang, M. Varghese, E. Sotirchos, P. Bhargava, V. V. Bandaru, G. Pasinetti, W. Zhang, M. Inglese, P. A. Calabresi, G. Wu, A. E. Miller, N. J. Haughey, F. D. Lublin and P. Casaccia (2014). "Cerebrospinal fluid ceramides from patients with multiple sclerosis impair neuronal bioenergetics." Brain **137**(Pt 8): 2271-2286.
- Villar, L. M., M. C. Sádaba, E. Roldán, J. Masjuan, P. González-Porqué, N. Villarrubia, M. Espiño, J. A. García-Trujillo, A. Bootello and J. C. Alvarez-Cermeño (2005). "Intrathecal synthesis of oligoclonal IgM against myelin lipids predicts an aggressive disease course in MS." J Clin Invest **115**(1): 187-194.

- Voelker, D. R. and E. P. Kennedy (1982). "Cellular and enzymic synthesis of sphingomyelin." Biochemistry **21**(11): 2753-2759.
- Vos, J. P., M. Lopes-Cardozo and B. M. Gadella (1994). "Metabolic and functional aspects of sulfogalactolipids." Biochim Biophys Acta **1211**(2): 125-149.
- Wakil, S. J., J. K. Stoops and V. C. Joshi (1983). "Fatty acid synthesis and its regulation." Annu Rev Biochem **52**: 537-579.
- Wang, H. H., G. Garruti, M. Liu, P. Portincasa and D. Q. Wang (2017). "Cholesterol and Lipoprotein Metabolism and Atherosclerosis: Recent Advances In reverse Cholesterol Transport." Ann Hepatol **16**(Suppl. 1: s3-105.): s27-s42.
- Wang, M., C. Wang, R. H. Han and X. Han (2016). "Novel advances in shotgun lipidomics for biology and medicine." Prog Lipid Res **61**: 83-108.
- Wattjes, M. P., M. D. Steenwijk and M. Stangel (2015). "MRI in the Diagnosis and Monitoring of Multiple Sclerosis: An Update." Clin Neuroradiol **25 Suppl 2**: 157-165.
- Weber, M. S., B. Hemmer and S. Cepok (2011). "The role of antibodies in multiple sclerosis." Biochim Biophys Acta **1812**(2): 239-245.
- Weissert, R., E. Wallström, M. K. Storch, A. Stefferl, J. Lorentzen, H. Lassmann, C. Linington and T. Olsson (1998). "MHC haplotype-dependent regulation of MOG-induced EAE in rats." J Clin Invest **102**(6): 1265-1273.
- Wekerle, H. (1993). "Experimental autoimmune encephalomyelitis as a model of immune-mediated CNS disease." Curr Opin Neurobiol **3**(5): 779-784.
- Welte, M. A. and A. P. Gould (2017). "Lipid droplet functions beyond energy storage." Biochim Biophys Acta Mol Cell Biol Lipids **1862**(10 Pt B): 1260-1272.
- Whitham, R. H., G. Nilaver, D. N. Bourdette and F. J. Seil (1988). "Serum anti-myelin antibodies in chronic relapsing experimental allergic encephalomyelitis." J Neuroimmunol **18**(2): 155-170.
- Wiesner, P., K. Leidl, A. Boettcher, G. Schmitz and G. Liebisch (2009). "Lipid profiling of FPLC-separated lipoprotein fractions by electrospray ionization tandem mass spectrometry." J Lipid Res **50**(3): 574-585.
- Won, J. S., A. K. Singh and I. Singh (2007). "Lactosylceramide: a lipid second messenger in neuroinflammatory disease." J Neurochem **103 Suppl 1**: 180-191.
- Yamauchi, Y., P. C. Reid, J. B. Sperry, K. Furukawa, M. Takeya, C. C. Chang and T. Y. Chang (2007). "Plasma membrane rafts complete cholesterol synthesis by participating in retrograde movement of precursor sterols." J Biol Chem **282**(48): 34994-35004.
- Yang, K. and X. Han (2011). "Accurate quantification of lipid species by electrospray ionization mass spectrometry - Meet a key challenge in lipidomics." Metabolites **1**(1): 21-40.
- Yang, K. and X. Han (2016). "Lipidomics: Techniques, Applications, and Outcomes Related to Biomedical Sciences." Trends Biochem Sci **41**(11): 954-969.
- Yang, X., B. Cai, R. R. Sciacca and P. J. Cannon (1994). "Inhibition of inducible nitric oxide synthase in macrophages by oxidized low-density lipoproteins." Circ Res **74**(2): 318-328.

Yuan, T., H. Ma, W. Liu, D. B. Niesen, N. Shah, R. Crews, K. N. Rose, D. A. Vatter and N. P. Seeram (2016). "Pomegranate's Neuroprotective Effects against Alzheimer's Disease Are Mediated by Urolithins, Its Ellagitannin-Gut Microbial Derived Metabolites." ACS Chem Neurosci **7**(1): 26-33.

Zenobi, R. and R. Knochmuss (1998). "Ion formation in MALDI mass spectrometry." Mass Spectrometry Reviews **17**(5): 337-366.

Zhang, S. M., M. A. Hernán, M. J. Olek, D. Spiegelman, W. C. Willett and A. Ascherio (2001). "Intakes of carotenoids, vitamin C, and vitamin E and MS risk among two large cohorts of women." Neurology **57**(1): 75-80.

X. ARTÍCULOS
