

MEMORIA FINAL DEL PROYECTO EME-REEM TITULADO

Evaluación de factores solubles y de membrana como biomarcadores no invasivos en EM-PP: fase de validación

Equipo investigador: Dra. Laura Leyva (IP), Dra. Begoña Oliver, Ana Alonso, Virginia Reyes, Isabel Brichette, Jose Luis Rodriguez Bada, Jesús Ortega Pinazo

1. Objetivos

1.1. Objetivo Primario

Llevar a cabo la fase de validación de moléculas candidatas seleccionadas en sangre periférica durante la fase exploratoria y distribuidas diferencialmente en pacientes con EMPP respecto a las formas clínicas EMRR y EMSP, así como con controles sanos, en una cohorte independiente de pacientes con EM y controles:

- Confirmar su distribución diferencial en una cohorte más grande e independiente
- Evaluar si un patrón de expresión diferencial en el curso de esta enfermedad puede proporcionar información sobre alguno de los mecanismos subyacentes a la patogenia de la EMPP, a fin de mejorar el diagnóstico, predecir la evolución de la enfermedad y permitir la monitorización de la progresión de ésta.

Los marcadores seleccionados se centrarán en los receptores de citocinas o quimiocinas, así como en las proteínas implicadas en sus vías de señalización, y se validarán a nivel de **variantes de procesamiento alternativo del ARNm** mediante PCR en tiempo real, y a nivel de **proteínas** mediante citometría de flujo, ensayos de inmunoabsorción ligado a enzimas y luminometría.

1.2. Objetivos secundarios

- Validación analítica de la metodología utilizada para la identificación de aquellos biomarcadores que hayan superado las fases de validación, a fin de facilitar su traslación a entornos clínicos.
- Profundizar en el estudio de las vías de señalización más afectadas.

2. Resultados

1. Resumen de la fase exploratoria por técnicas proteómicas

Como se mencionó en la solicitud, se realizó un análisis proteómico cuantitativo en el suero de 20 pacientes con Esclerosis Múltiple clínicamente definida [7 con formas remitentes-recurrentes (RR), 7 con formas secundariamente progresivas (SP) y 6 con formas primariamente progresivas (PP)], así como en 7 sujetos sin enfermedades neurológicas o inflamatorias que sirvieron como controles sanos (HC). Estos pacientes no habían recibido tratamiento previo o se habían sometido a un período de lavado con un promedio de 2,5 meses entre el cambio de inmunomoduladores.

Las fracciones de proteínas totales se analizaron mediante cromatografía nanolíquida acoplada a espectrometría de masas en tándem (nanoLC-MS/MS) en un espectrómetro de masas MALDI-TOF/TOF

UltrafleXtreme. El análisis de datos se realizó utilizando 4 motores de búsqueda (Mascot, OMSSA, X! TANDem y Myrimatch) y una base de datos de destino construida a partir de secuencias en el proteoma usando "Homo sapiens" en la base Uniprot Knowledge como referencia. Antes de analizar las muestras, se purificaron para eliminar las proteínas mayoritarias (Top 10), se cuantificaron y se normalizaron a la misma concentración de proteínas. Para el análisis de datos, las proteínas se normalizaron en el modo "Cantidad total de péptidos" y las proporciones se calcularon utilizando el enfoque basado en la abundancia de proteínas. La prueba de hipótesis se llevó a cabo mediante un ANOVA basado en la abundancia de cada una de las proteínas.

En el análisis proteómico del suero de los pacientes en fase exploratoria se identificaron 1432 proteínas, de las cuales 393 cumplían con los siguientes criterios:

- 1) Eran proteínas "Maestras" dentro de su grupo proteico;
- 2) El porcentaje de falsos positivos era <1 ;
- 3) Se detectaron más de 2 péptidos únicos en la proteína.

Como se puede observar en la Figura 1, se observó un enriquecimiento diferencial de proteínas séricas entre los pacientes con EM y los controles sanos, así como entre las diferentes formas clínicas de EM.

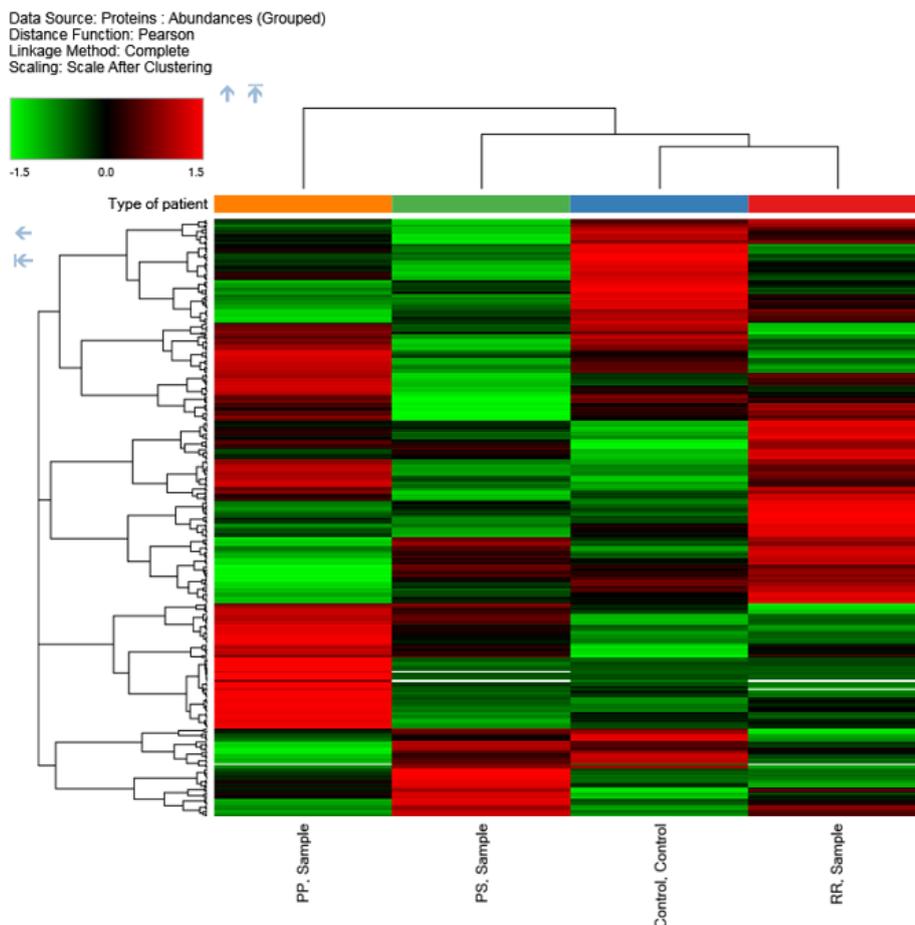


Figura 1. Mapa de calor mostrando la abundancia relativa de las 393 proteínas en suero que cumplían los criterios especificados, en cada grupo de sujetos (EMPP, EMSP, EMRR y controles).

El cociente de abundancia [*Abundance ratio* (AR)] de las proteínas que diferían significativamente entre las diferentes formas clínicas de los pacientes con EM y los controles sanos o entre las diferentes formas clínicas entre sí se detalla en las Tablas 1-2 y la Figura 2.

Tabla 1. Proteínas desreguladas en pacientes con EMPP comparado con los controles sanos y con las formas clínicas EMRR y EMSP

Acceso	Gen	Descripción de proteína [OS=Homo sapiens]	EMPP vs. HC		EMPP vs. EMRR		EMPP vs. EMSP	
			Abundance Ratio	p-valor	Abundance Ratio	p-valor	Abundance Ratio	p-valor
P06703	S100A6	Protein S100-A6	61.323	0.016	41.870	n.s.	38.541	n.s.
P08246	ELANE	Neutrophil elastase	32.889	0.018	9.408	n.s.	36.127	0.009
P30041	PRDX6	Peroxiredoxin-6	11.284	0.037	14.465	n.s.	11.605	n.s.
P18669	PGAM1	Phosphoglycerate mutase 1	4.490	0.004	3.209	0.024	3.557	n.s.
Q10588	BST1	ADP-ribosyl cyclase/cyclic ADP-ribose hydrolase 2	3.966	0.008	1.556	n.s.	1.354	n.s.
Q9BXR6	CFHR5	Complement factor H-related protein 5	0.422	0.011	0.648	n.s.	0.572	n.s.
P08637	FCGR3A	Low affinity immunoglobulin gamma Fc region receptor III-A	0.190	0.046	0.849	n.s.	0.582	n.s.
P13798	APEH	Acylamino-acid-releasing enzyme	1.174	n.s.	3.103	0.044	1.477	n.s.
Q8NBP7-1	PCSK9	Proprotein convertase subtilisin/kexin type 9	0.499	n.s.	0.481	0.034	0.557	n.s.

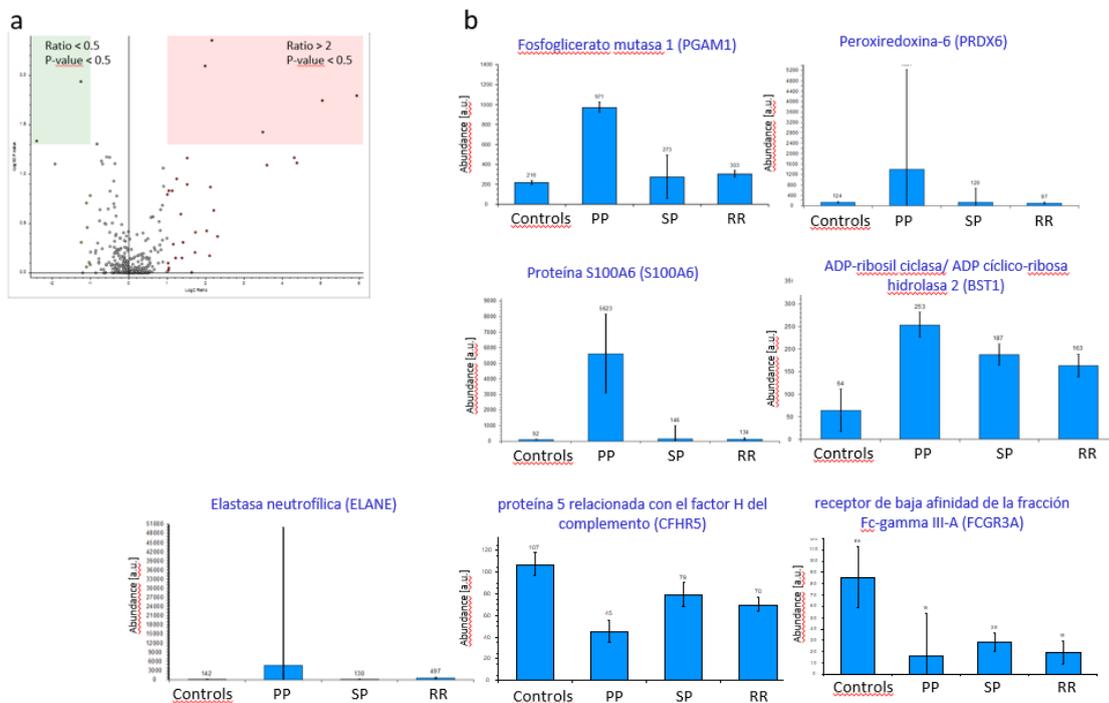


Figura 2. a) Gráfica Volcano de los datos obtenidos en la cuantificación de las proteínas con una abundancia diferencial entre pacientes con EMPP y controles. b) Abundancia de cada una de las proteínas en los diferentes grupos de pacientes y controles

Como se puede observar en la Tabla 1 y en la Figura 2, se encontraron 5 proteínas enriquecidas diferencialmente en las formas EMPP al compararlas con los controles sanos: proteína S100-A6 (S100A6), elastasa neutrofílica (ELANE), peroxiredoxina-6 (PRDX6), fosfoglicerato mutasa 1 (PGAM1) y ADP-ribosil ciclasa/ ADP cíclico-ribosa hidrolase 2 (BST1). En el caso de la proteína ELANE, uno de los pacientes con EMPP mostraba valores desorbitadamente enriquecidos, aportando mucha desviación al análisis. Por el contrario, se encontraron dos proteínas con menor enriquecimiento en el suero de los pacientes con EMPP que en el de los controles sanos: la proteína 5 relacionada con el factor H del complemento (CFHR5) y el receptor de baja afinidad de la fracción Fc-gamma III-A (FCGR3A).

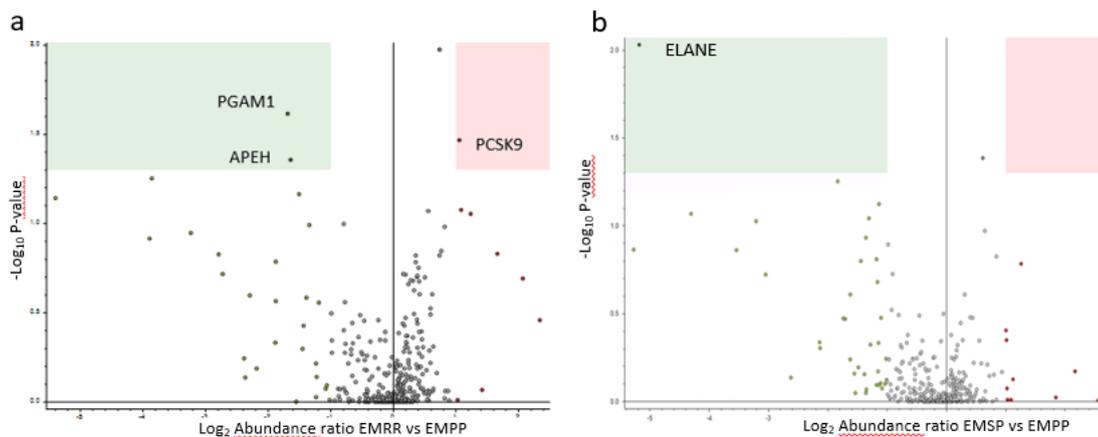


Figura 3. Gráficas Volcano de los datos obtenidos en la cuantificación de las proteínas con una abundancia diferencial a) entre pacientes con EMRR y pacientes con EMPP; b) entre pacientes con EMSP y pacientes con EMPP.

Las 5 proteínas enriquecidas en las formas EMPP al compararlas con los controles, también se encontraban enriquecidas al compararlas con pacientes con formas EMRR, aunque sólo PGAM1 alcanzó la significación estadística (Figura 3a), y con las formas EMSP, aunque sólo él enriquecimiento de ELANE era estadísticamente significativo (Figura 3b). Adicionalmente, la enzima liberadora de ácido acilamino (APEH) se encontraba enriquecida en suero de pacientes con EMPP al compararlo con pacientes con EMRR (Figura 3a). Las proteínas con un menor enriquecimiento en las formas EMPP comparadas con los controles, también estaban menos enriquecidas en los pacientes con EMPP que en los que presentaban las formas EMRR y EMSP, pero estas diferencias no alcanzaban significación estadística. También se encontró una disminución del enriquecimiento de la proproteína convertasa de la subtilisina/kesina tipo 9 (PCSK9) en el suero de los pacientes con EMPP que en los EMRR (Figura 3a).

Las proteínas diferencialmente abundantes (DAP) entre EMPP y controles estaban involucradas en vías como la “degranulación de neutrófilos” y la “regulación de la cascada del complemento”.

Tabla 2. Proteínas desreguladas en pacientes con EMRR comparando con los controles sanos

Acceso	Gen	Descripción de proteína [OS=Homo sapiens]	Abundance Ratio EMRR vs HC	p-valor
P26927	MST1 o STK4	Hepatocyte growth factor-like protein	2.547	0.009
P36980-1	CFHR2	Complement factor H-related protein 2	2.470	0.021
P04217-2	A1BG	Isoform 2 of Alpha-1B-glycoprotein	0.498	0.007
P01834	IGKC	immunoglobulin kappa constant	0.290	0.031
P08637	FCGR3A	Low affinity immunoglobulin gamma Fc region receptor III-A	0.224	0.031
P0DOX7		immunoglobulin kappa light chain	0.149	0.028

En la Tabla 2 podemos observar que se encontraron dos proteínas enriquecidas en el suero de los pacientes con EMRR cuando se comparaban con el suero de controles sanos: la serín/treonin quinasa proapoptótica activada por estrés (MST1) y la proteína 2 relacionada con el factor H del complemento (CFHR2). Por el contrario, la isoforma 2 de la glicoproteína alfa-1B (A1BG), las cadenas constantes y ligeras kappa de las inmunoglobulinas y el receptor de baja afinidad de la fracción Fc-gamma III-A (FCGR3A) presentaban un menor enriquecimiento en suero en los pacientes con EMRR que en los controles.

Las proteínas desreguladas en los pacientes con EMRR se encontraban implicadas en las siguientes vías del Reactome: “regulación de la adhesión a matriz celular”, “regulación de la activación macrofágica”, “regulación del reciclaje e internalización de receptores” y “metabolismo lipoproteico”.

Tabla 3. Proteínas desreguladas en pacientes con EMSP comparando con los controles sanos

Acceso	Gen	Descripción de proteína [OS=Homo sapiens]	Abundance Ratio EMSP vs. HC	p-valor
P08637	FCGR3A	Low affinity immunoglobulin gamma Fc region receptor III-A	0.327	0.016
P0DOX7		immunoglobulin kappa light chain	0.227	0.029
P01834	IGKC	immunoglobulin kappa constant	0.287	0.008
P12814-1	ACTN1	Alpha-actinin-1	0.401	0.004

En la Tabla 3 podemos observar como el suero de los pacientes con EMSP mostraba un menor enriquecimiento de FCGR3A, cadenas constantes y ligeras kappa de las inmunoglobulinas y alfa-actinina 1 (ACTN1), que el suero de los controles.

2. Fase de validación por enzoinmunoensayos de los marcadores encontrados diferencialmente enriquecidos en suero en la fase exploratoria, por técnicas proteómicas

La validación de la determinación de las proteínas con enriquecimiento diferencial se llevó a cabo en una cohorte independiente de 75 pacientes con EM no tratados con fármacos modificadores de la enfermedad (34 con EMRR, 21 con EMSP y 20 con EMPP), así como en 20 controles, mediante enzoinmunoensayos comerciales.

Proteínas desreguladas en las formas EMPP

De las 7 proteínas desreguladas en el análisis proteómico en las formas EMPP, sólo se validaron los resultados por ELISA, al incrementar el tamaño muestral, en el caso de la peroxiredoxina-6 (PRDX6). Mediante la prueba de Kruskal-Wallis se demostró un enriquecimiento diferencial de esta proteína entre los diferentes grupos ($p=0,004$). Al realizar las comparaciones entre parejas, se mostró un enriquecimiento en las formas EMPP y EMRR comparadas con controles ($p<0.001$ y $p= 0.016$, respectivamente), así como entre pacientes con formas EMPP y EMSP ($p= 0.028$) pero, al ajustar por comparaciones múltiples, sólo se mantuvo la significación en la comparación de las formas EMPP con los controles ($p_{adj} = 0.002$), como se puede observar en la Figura 4, donde se indican además las medianas y rangos intercuartílicos (RI) para cada grupo de sujetos.

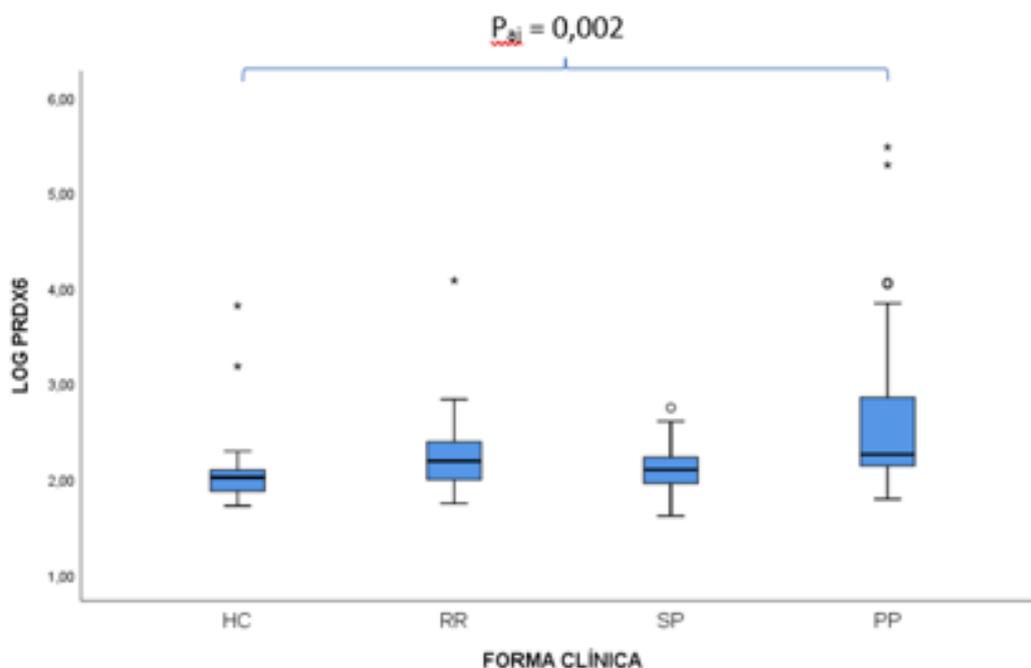


Figura 4. Distribución de la abundancia de la peroxiredoxina-6 (PRDX6) en el suero de controles, y pacientes con formas EMRR, SP y PP.

Cuando se evaluó la abundancia de proteínas desreguladas en formas EMPP al compararla con la de formas EMRR, APEH estaba enriquecida en el suero de todas las formas clínicas de EM al compararlo con el de controles ($p= 0.039$ EMRR; $p= 0.024$ EMSP; $p<0.001$ EMPP), y también era superior en las formas EMPP que en las formas EMRR ($p=0.027$), pero sólo superaba la corrección por comparaciones múltiples en el caso de la forma EMPP vs HC ($p_{adj} = 0.001$), como se puede observar en la Figura 5.

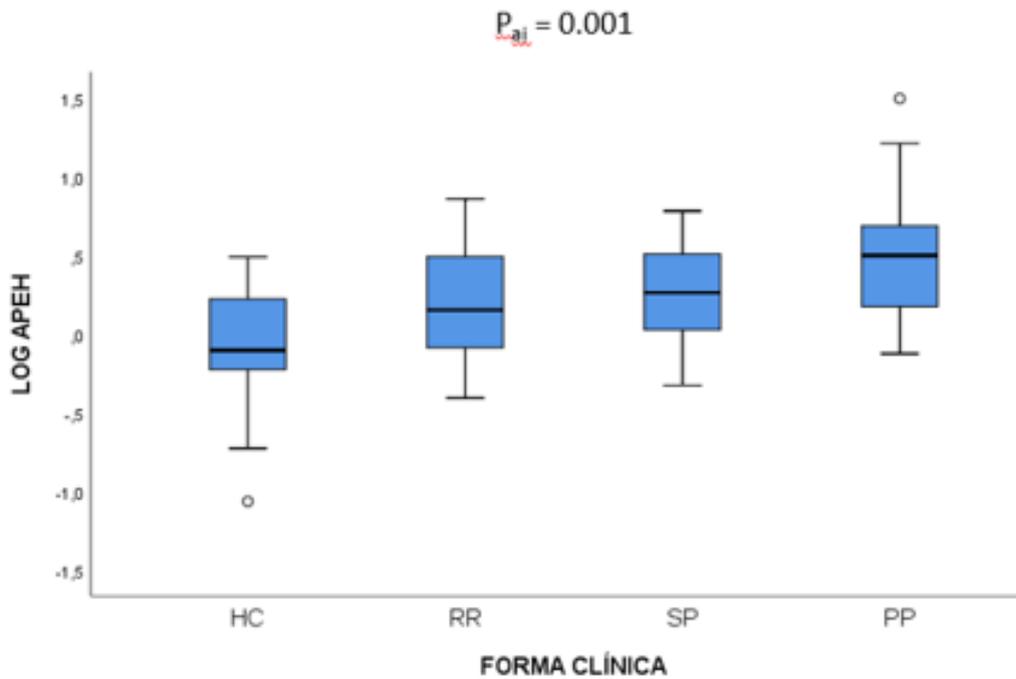


Figura 5. Distribución de la abundancia de la enzima liberadora de ácido acilamino (APEH) en el suero de controles, y pacientes con formas EMRR, SP y PP.

Los resultados de BST1 del estudio proteómico, en los que esta proteína era más abundante en las formas EMPP que en los controles sanos, no se consiguieron replicar por ELISA. Sorprendentemente, esta proteína se encontró más elevada en el suero de los pacientes con EMRR que en el de los controles ($p < 0.0001$), pacientes con EMSP ($p = 0.048$) y pacientes con EMPP ($p = 0.005$), manteniendo la significación tras corrección por Bonferroni para las comparaciones con controles ($p_{aj} < 0.0006$) y formas EMPP ($p_{aj} = 0.031$).

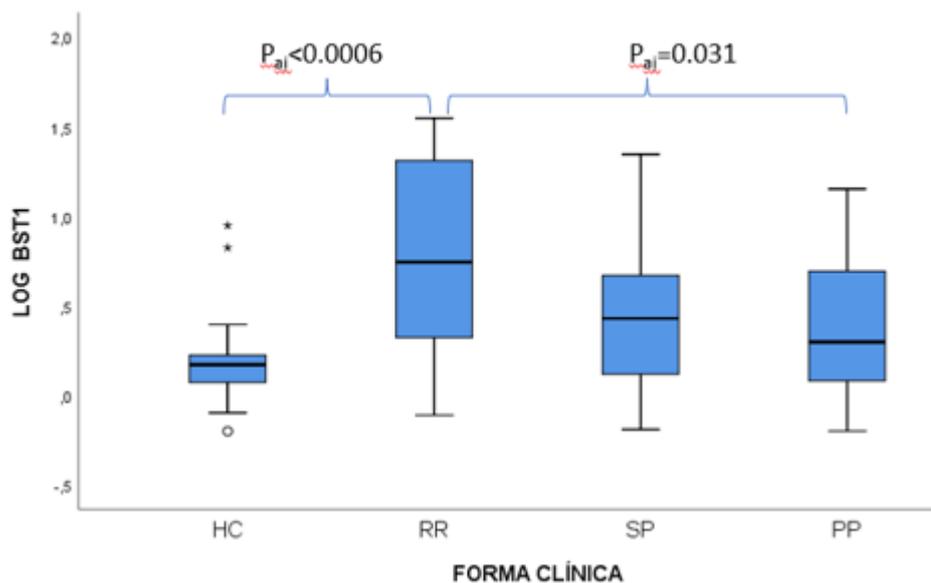


Figura 6. Distribución de la abundancia de la proteína BST1 en el suero de controles, y pacientes con formas EMRR, SP y PP.

Las otras proteínas desreguladas en pacientes con EMPP en el análisis transcriptómico: S100A6, ELANE, PGAM1, CFHR5, y FCGR3A no mostraron enriquecimiento diferencial en el suero de ninguno de los grupos analizados.

Proteínas desreguladas en las formas EMRR

De las 6 proteínas desreguladas en el suero de los pacientes con formas EMRR en el análisis proteómico, al analizar los sueros en esta cohorte con mayor tamaño muestral por enzimoimmunoensayos, sólo se encontró desregulada la MST1. Los valores de MST1 durante la validación mostraron tendencias opuestas a las del análisis proteómico, pues hubo un menor enriquecimiento de esta proteína en el suero de los pacientes con EMRR que en el de los controles ($p_{aj} < 0.001$) y en el de los pacientes con formas EMPP ($p_{aj} \leq 0.003$), como se puede observar en la Figura 7.

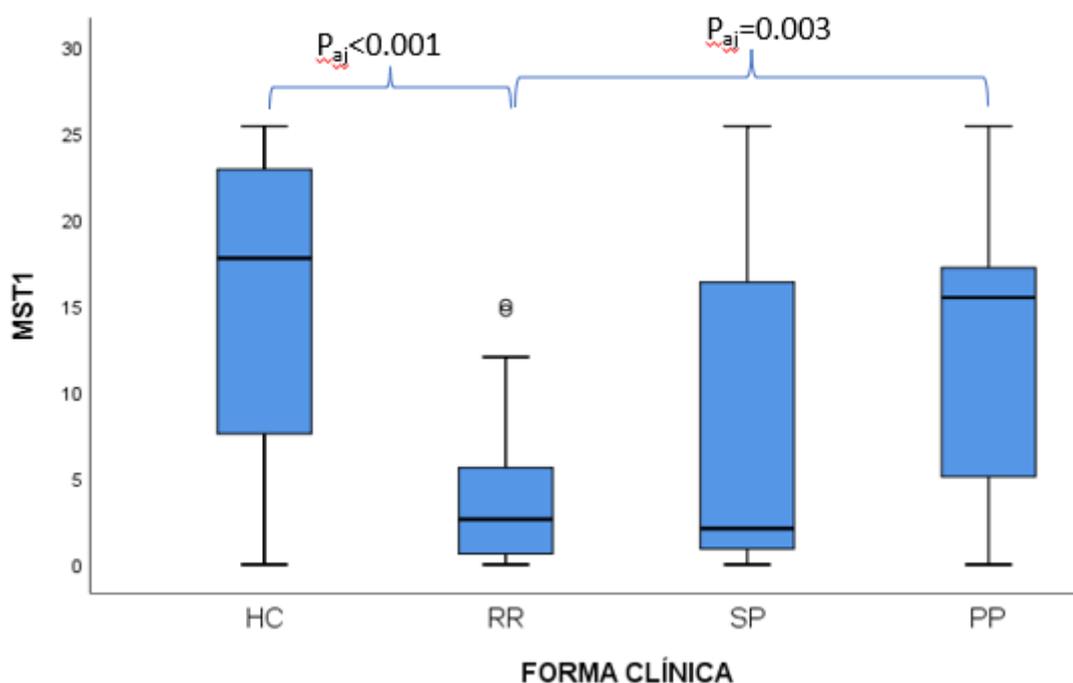


Figura 7. Distribución de la abundancia de la proteína MST1 en el suero de controles, y pacientes con formas EMRR, SP y PP.

En conclusión, encontramos un enriquecimiento diferencial de PRDX6 y APEH en el suero de pacientes con formas EMPP en comparación con los controles, un enriquecimiento de la proteína BST1 en el suero de los pacientes con formas EMRR en comparación con pacientes con formas EMPP y controles sanos, y una menor abundancia sérica de la proteína MST1 en el suero de los pacientes con formas EMRR en comparación con pacientes con formas EMPP y controles sanos. El gran valor de este estudio es la determinación de estas proteínas séricas en pacientes no sometidos a tratamientos modificadores de la enfermedad, descartando una influencia de estos últimos en las concentraciones séricas de los mencionados marcadores.

La peroxiredoxina 6 (PRDX6) es una proteína antioxidante que participa en la homeostasis redox, el recambio de fosfolípidos, el metabolismo de los glicolípidos y la señalización celular (1). Su expresión se ha encontrado marcadamente incrementada en astrocitos de la médula espinal de ratones con encefalitis autoinmune experimental, en donde parece ejercer un papel a la hora de contener la inflamación en el SNC, reducir la desmielinización y la neurodegeneración y potenciar la supervivencia de los oligodendrocitos ((Yun et al., 2015). Otros autores también han encontrado niveles elevados de esta proteína en el suero de pacientes con EM y con trastornos de espectro

neuromielitis óptica (NMOSD) al compararlo con sueros de pacientes con otras patologías neurológicas, y sugieren que, junto a la PRDX5, ambas proteínas jugarían un papel en la patogénesis de la EM y NMOSD (Uzawa et al., 2020).

La enzima liberadora de ácido acilamino (APEH) también participa en la homeostasis redox, degradando selectivamente las proteínas oxidadas y actuando como un componente de la respuesta celular al daño del ADN (4), pero su papel en la EM no se ha explorado todavía.

La proteína BST1 es una glicohidrolasa que se expresa principalmente en tejidos linfoides y en intestino y es la responsable de escindir NAD para generar nicotinamida. A través de un estudio de expresión de miRNA se identificó al gen BST1 como uno de los asociados con disfunciones cognitivas en pacientes pediátricos con EM (5). Esta proteína también se ha asociado a un mayor riesgo de enfermedad de Parkinson (6), y se ha correlacionado con trastornos depresivos mayores (Chen et al., 2022). Pero su papel en la EM todavía está por explorar.

La proteína similar al factor de crecimiento de hepatocitos 1 (MST1 o STK4) es un miembro de la superfamilia de proteín-quinasas activadas por mitógenos (MAPK), que promueve la apoptosis a través de la fosforilación de los factores de transcripción Forkhead box O (FOXO). En el daño cerebral agudo, suprime la expresión de genes antiapoptóticos mediante la inhibición de la vía de señalización MAPK-ERK (8). Su gen se encontró expresado diferencialmente en LCR de pacientes con EM al compararlos con controles, en un análisis basado en redes de genes y fue uno de los identificados como posibles genes candidatos para EM (9). Sin embargo, en nuestro estudio, su abundancia sérica se encuentra disminuida en los pacientes con EMRR frente a controles sanos y pacientes con formas EMPP. La señalización de MST1 a través de su receptor (MST1R) en células macrofágicas juega un doble papel en la regulación de la inflamación; inicialmente estimula la quimiotaxis y la fagocitosis (activación de células de estirpe macrofágica) y luego ejerce amplios efectos inhibitorios sobre los macrófagos, lo que limita el alcance de las respuestas inflamatorias (10).

Estas 4 proteínas con enriquecimiento diferencial frente a controles podrían ser potenciales biomarcadores para la EM, pero necesitan estudios de replicación, así como estudios funcionales que evalúen su papel en la patogénesis de la EM.

3. Resumen de la fase exploratoria por técnicas transcriptómicas

En la fase exploratoria se realizó un análisis detallado de las isoformas solubles y de membrana, generadas por procesamiento alternativo de ARNm, de receptores de citocinas, receptores de quimiocinas y proteínas involucradas en sus vías de señalización intracelular, mediante RNAseq con tecnología Illumina. Se prepararon bibliotecas de Illumina del tipo "ARNm trenzado" para conservar la información sobre la cadena de origen del ARNm y se secuenciaron las bibliotecas en un kit HiSeq 2000 en modo de extremo emparejado 2x75. Se obtuvo una profundidad de secuencia mínima de 65 millones de lecturas por biblioteca, para realizar estudios de empalme alternativo en humanos. Las lecturas de buena calidad se alinearon con el transcriptoma humano con la herramienta TopHat2 y la expresión diferencial se evaluó con CuffDiff. La detección y análisis de eventos de splicing alternativo se realizó mediante el software RNASeq-Mats. Este estudio se llevó a cabo en 19 pacientes con EM; 7 con formas EMRR, 7 con formas EMSP y 5 con formas EMPP, así como en un grupo de 7 individuos control sin patología neurológica o inflamatoria conocida y 2 individuos con

otras enfermedades neurológicas inflamatorias (OIND). Todos los pacientes con EM estaban sin tratamiento modificador de la enfermedad en el momento de la extracción de la muestra, bien porque no lo habían recibido nunca o bien porque habían completado su periodo de lavado para proceder a un cambio de tratamiento.

En el análisis transcriptómico de variantes de procesamiento alternativo mediante RNAseq en células mononucleares de sangre periférica, encontramos 1475 isoformas expresadas diferencialmente en pacientes con EM frente a controles (387 subexpresadas y 1088 sobreexpresadas), correspondientes a 960 genes diferentes. Cuando se analizaron por forma clínica, los pacientes con EMRR mostraron 1182 variantes expresadas diferencialmente (VED) con respecto a los controles, los pacientes con EMSP mostraron 8347 VED y los pacientes con EMPPS mostraron 52 VED.

En los mapas de calor de agrupación de las isoformas de procesamiento alternativo o “splicing”, los pacientes con EMPP se agruparon de manera diferente a los controles (Figura 8), a los pacientes con OIND (Figura 9) y a los pacientes con EMSP (Figura 10). Sin embargo, cuando se analizaron las variantes splicing entre pacientes con EMRR y EMPP, se encontró una heterogeneidad llamativa de los pacientes con EMRR: aquellos pacientes con EMRR clínicamente activa, muestreados al final del período de lavado y listos para cambiar su tratamiento debido a una respuesta subóptima, se agruparon en un lado, mientras que los pacientes con EMRR que nunca habían recibido tratamiento se agruparon junto con los pacientes con EMPP (Figura 11).

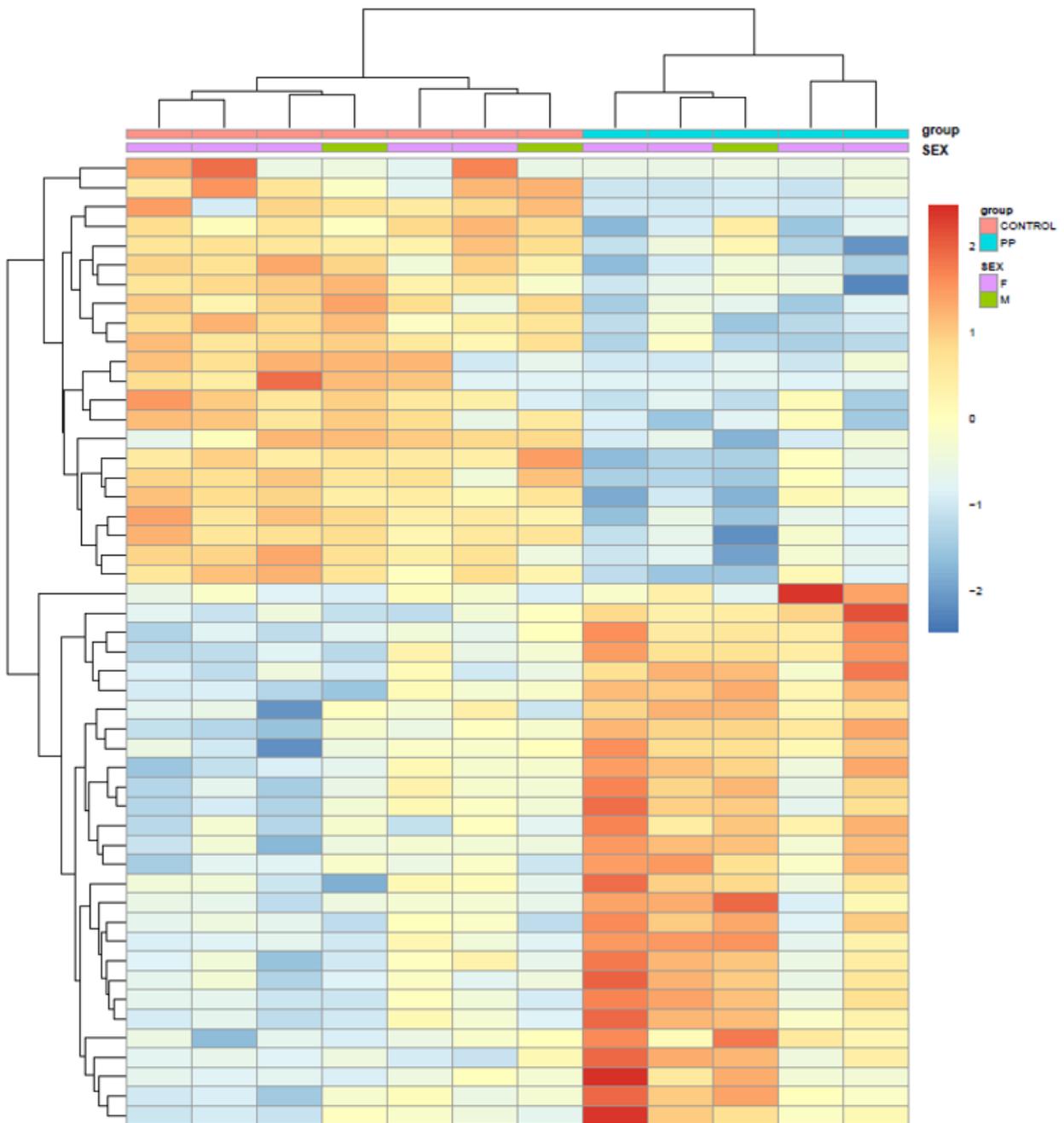


Figura 8. Mapas de calor de las 50 variantes de splicing con mayor expresión diferencial en la comparación de pacientes con EMPP y controles.

Cuando se analizaron las VDE entre Controles y EMPP por Reactome, las vías más afectadas fueron las involucradas en la "reparación del ADN"

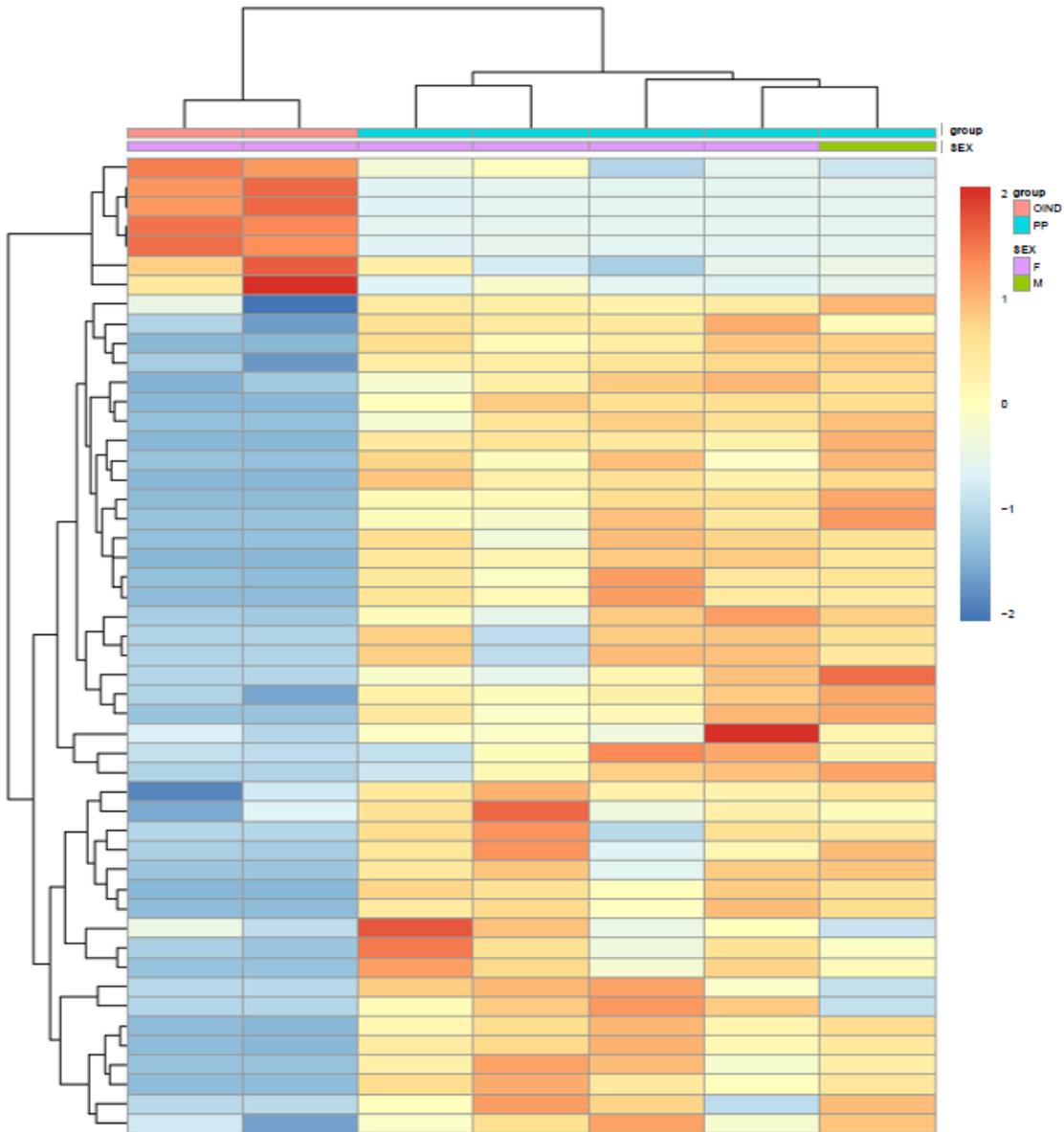


Figura 9. Mapas de calor de las 50 variantes de splicing con mayor expresión diferencial en la comparación de pacientes con EMPP y OIND.

Cuando se analizaron las VDE entre EMPP y OIND por Reactome, las vías más afectadas fueron las involucradas en la "transcripción estimulada por NGF (factor de crecimiento nervioso)"

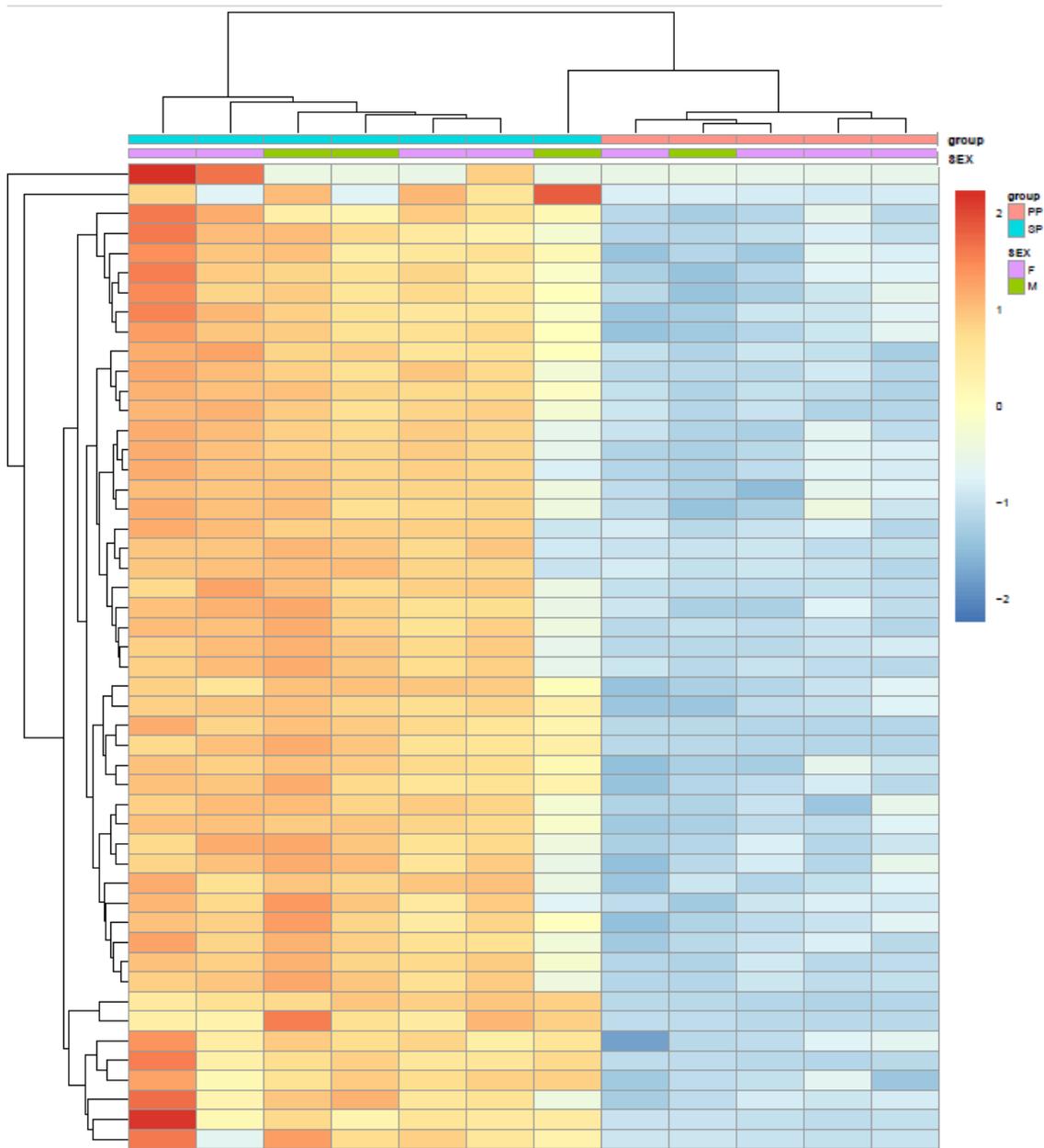


Figura 10. Mapas de calor de las 50 variantes de splicing con mayor expresión diferencial en la comparación de pacientes con EMPP y EMSP.

Cuando se analizaron las VDE entre EMSP y EMPP por Reactome, las vías más afectadas fueron la “vía endosomal/vacuolar”, la “vía del interferón gamma”, la “vía de presentación de antígenos”, la “señalización de interferón alfa/beta” y la “señalización por IL-10”.

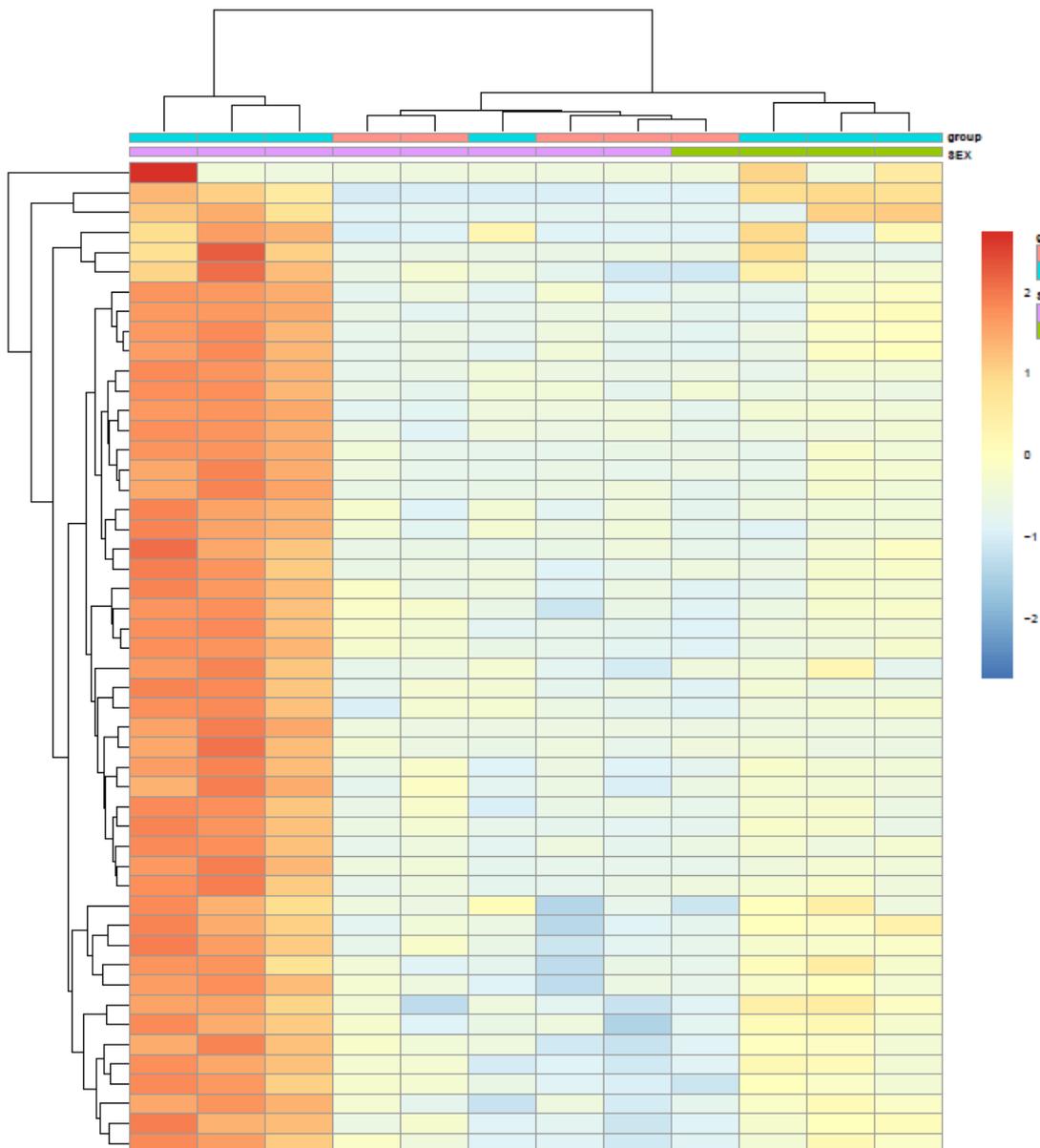


Figura 11. Mapas de calor de las 50 variantes de splicing con mayor expresión diferencial en la comparación de pacientes con EMPP y EMRR.

Cuando se analizaron las VDE entre EMRR y EMPP por Reactome, las vías más afectadas fueron “Vía endosomal/vacuolar”, “Vía del interferón gamma”, “Señalización de interferón alfa/beta”, “Señalización de IL-10”, “Vía de presentación de antígenos”, “Señalización de IL-4 e IL-13”, “Unión de receptores de quimiocinas a quimiocinas” y “Señalización de la familia IL-1”.

3.1. Isoformas desreguladas de pacientes con EM frente a sujetos control en el análisis proteómico

Como primera aproximación para reducir el número de variantes seleccionadas para trasladarlas al proceso de validación, elegimos todos los genes desregulados en el conjunto de pacientes con EM (RRMS, SPMS y PPMS) con respecto a los controles y agrupamos las variantes génicas en función de los procesos biológicos comunes en los que intervienen, encontrando un conjunto de isoformas con alto valor discriminativo para pacientes con EM, que están implicadas en la vía de señalización del inflammasoma NLRP3, que decidimos trasladar al estudio de validación. Entre ellas, caben destacar las siguientes:

Tabla 4. Isoformas de procesamiento alternativo sobreexpresadas en pacientes con EM frente a controles e implicadas en la vía del inflammasoma NLRP3.

Isoforma	EM vs HC p adj.	Isoforma	EM vs HC p adj.	Isoforma	EM vs HC p adj.
IL-1 β -201	9,0E-06	NF-kB1-214	4,6E-04	NF-kBIZ-206	3,8E-04
IL-1 β -206	8,5E-05	NF-kB2-203	5,6E-04	NF-kBIZ-209	0,035
IL1RN-202	1,3E-04	NF-kBIA-204	0,021	NLRP3-203	4,1E-05
IL1RN-205	2,8E-04	NF-kBIA-205	0,009	TNF-208	1,1E-04
IL1R1-205	0,036	NF-kBIA-206	0,007	CASP1-205	0,006
IL-18-206	0,026	NF-kBIA-207	0,037	CASP1-213	0,045
ICAM1-201	0,003	NF-kBIA-208	0,003	PLAUR-214	8,8E-04
ICAM1-203	0,002				

Dentro de estas isoformas, en el grupo de pacientes, algunas presentaban una expresión más elevada en las formas clínicas EMSP, que en las formas EMRR, lo que nos hacía pensar no sólo que pueden ser potenciales marcadores diagnósticos, sino que además podrían estar jugando un papel importante en la evolución de la enfermedad.

Tabla 5. Isoformas de procesamiento alternativo sobreexpresadas en pacientes con EMSP frente a EMRR e implicadas en la vía de señalización del inflammasoma NLRP3.

Isoforma	RR vs SP (p adj.)
IL-1 β -205	0,028
IL-1 β -207	0,035
NLRP3-04	2,3E ⁻⁰⁴
NF-kBIZ-203	0,006
NF-kBIZ-205	0,014
NF-kBIZ-210	0,024

3.2. Isoformas desreguladas de pacientes con EMPP frente a sujetos control en el análisis proteómico

En la Tabla 6 se muestran las 20 variantes splicing más desreguladas entre pacientes con EMPP y controles. Como se puede observar, la mayoría de las variantes sobreexpresadas codificaban proteínas.

Tabla 6. Las 20 variantes de splicing con mayor expresión diferencial en la comparación de pacientes con EMPP y controles.

Entrada	Isoforma	Biotipo	Gen	Shrunken FC	p adj.
ENST00000586113.1	FOSB-205	retained_intron	FOSB	2,9185	0,0005
ENST00000371279.4	PARS2-201	protein_coding	PARS2	1,6646	0,0501
ENST00000494066.1	NMRK1-207	nonsense_mediated_decay	NMRK1	1,6489	0,0396
ENST00000324787.10	MRPS33-201	protein_coding	MRPS33	1,5141	0,0045
ENST00000240055.8	NFYB-201	protein_coding	NFYB	1,5017	0,0264
ENST00000219207.10	PLLP-201	protein_coding	PLLP	1,4428	0,0296
ENST00000474802.1	PREB-209	retained_intron	PREB	1,4026	0,0249
ENST00000283122.8	CETN3-201	protein_coding	CETN3	1,4008	0,0408
ENST00000392232.7	ZNF181-201	protein_coding	ZNF181	1,3559	0,0408
ENST00000333926.6	CISD1-201	protein_coding	CISD1	1,3005	0,0466
ENST00000438666.7	SPART-202	protein_coding	SPART	1,2377	0,0460
ENST00000332349.5	JRKL-201	protein_coding	JRKL	1,2158	0,0466
ENST00000331327.5	PURA-201	protein_coding	PURA	1,1640	0,0301
ENST00000227349.7	JHY-201	protein_coding	JHY	1,1454	0,0396
ENST00000231948.8	CRBN-201	protein_coding	CRBN	1,1396	0,0494
ENST00000358812.9	MANEA-201	protein_coding	MANEA	1,1324	0,0398
ENST00000269466.8	ELAC1-201	protein_coding	ELAC1	1,1146	0,0264
ENST00000367559.7	RNASEL-201	protein_coding	RNASEL	1,0804	0,0006
ENST00000264689.11	UFSP2-201	protein_coding	UFSP2	1,0688	0,0264
ENST00000368636.8	BNIP3-201	protein_coding	BNIP3	1,0058	0,0249

Los resultados significativos en la comparación de los distintos transcritos de splicing alternativo de los pacientes con EMPP frente a sujetos control tras el análisis RNA-seq, se analizaron en la plataforma Reactome para identificar las rutas biológicas sobre las que actúan dichas isoformas, encontrando la ruta de “Reparación de ADN” y, en concreto, la de “Reparación de escisión de bases defectuosas asociadas con MUTYH” como la más involucrada. La variante génica que aparece involucrada en más rutas es MUTYH. Uniprot recoge 21 isoformas splicing para MUTYH y Ensembl recoge 47 isoformas diferentes, 18 de ellas codificantes de proteína. La isoforma infra-expresada de forma significativa en nuestro análisis de RNA-seq es la MUTYH-209, una variante con 1706 pares de bases, que codifica proteína. Además de MUTYH, otras variantes involucradas en las rutas con mayor nivel de significación son: PTPN12-206, ERCC4-201, RAD52-202, PREB-209, NFYB-201, CPNE8-204, PURA-201, GMIP-207, TIAM2-205, STK10-216, RPL15-210, y RNASEL-201.

3.3. Isoformas desreguladas de pacientes con EMPP frente a EMRR en el análisis proteómico

el paciente no hubiese estado sometido nunca a tratamiento o porque hubiera completado el periodo de lavado después de un tratamiento.

4.2 Toma de muestras y extracción de ARN total

A cada sujeto incluido en el estudio se le extrajeron 6 ml de sangre venosa periférica en 2 tubos Tempus, que se criopreservaron hasta la extracción de ARN mediante el kit de aislamiento de ARN Tempus Spin (Applied Biosystems). Se cuantificó la cantidad de ARN extraída mediante espectrofotómetro NanoDrop 2000 (Thermo Scientific®) y la integridad con Qubit™ RNA IQ Assay Kits (Invitrogen).

4.3 Obtención de ADN complementario mediante retrotranscripción inversa (RT-qPCR)

La retrotranscripción a ADN complementario (ADNc) de estas muestras se llevó a cabo con la enzima MMLV, ajustando a una concentración final de ADNc de 50 ng/μl.

4.4 Validación por qPCR a tiempo real.

4.4.1 Diseño de primers

Nuestro estudio se basó en la validación de isoformas de procesamiento alternativo de ARN mensajero, por lo que era muy importante diseñar primers específicos para esas isoformas, que no hibridaran con ninguna otra, para no perder sensibilidad en el análisis.

Para ello, se emplearon las herramientas informáticas disponibles en la red. Se buscaron los transcritos de interés en <http://www.ensembl.org> y se accedió a sus secuencias y alineamiento. Se diseñaron los primer exclusivos de cada isoforma con la herramienta Primer Blast, del Nacional Center for Biotechnological Information (NCBI) <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>.

Una vez diseñados, se comprobó mediante estas mismas herramientas, que los primers hibridaban en una región concreta y eran específicos y exclusivos de la isoforma que queríamos amplificar.

El diseño de los primers específicos de isoforma ha sido una de las mayores dificultades del proyecto y, en algunas ocasiones hemos tenido que diseñar hasta 3 parejas de primers diferentes por isoforma y no hemos conseguido una amplificación con un único pico de melting y una adecuada eficiencia, por lo que, para evitar sesgos, esas isoformas no se han incluido en el análisis.

Hubo un grupo de isoformas de splicing, desreguladas significativamente en la comparación entre pacientes con EMPP y los controles, que no se han podido incluir en el estudio de validación ya que no se han conseguido diseñar primers exclusivos que amplificaran un fragmento con un único pico de melting y una adecuada eficiencia. Entre ellos cabe mencionar: **MUTYH-209** (47 isoformas diferentes), **CETN3-201** (en el

fragmento exclusivo no se pudieron diseñar primers adecuados), **FAM200B-201** (22 isoformas diferentes), **FBLN2-201** (La temperatura de melting era demasiado baja), **JHY-201** (No se pudieron diseñar primers exclusivos), **NFYB-201** (No se pueden diseñar primers exclusivos) y **AGK-212** (25 Isoformas diferentes)

4.4.2 qPCR a tiempo real

La cuantificación de la expresión relativa de las diferentes isoformas de procesamiento alternativo por PCR a tiempo real se realizó, en duplicado, en un equipo Light Cycler 480, de Roche mediante la solución SsoFast™ EvaGreen® Supermix. Además del ciclo de preincubación a 95°C durante 5 min y los 40 ciclos de Amplificación (desnaturalización a 95 °C durante 5 seg + hibridación a 60 °C durante 5 seg + elongación a 72°C durante 25 segs), se añadió una curva de melting con adquisición continua de la señal de fluorescencia para discriminar los productos no específicos (primer-dimers o cualquier otro producto no buscado) de los amplicones específicos. Así mismo, se analizaron por electroforesis los productos de amplificación de PCR en gel de agarosa al 2%, para comprobar que el tamaño del amplicón se correspondía con el esperado. Para la cuantificación relativa de la expresión de estas variantes de splicing se utilizaron 2 genes constitutivos: Gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (GADPH) y la Enzima conjugadora de la ubiquitina E2D2 (UBE2D2).

El cálculo de la ratio de expresión se calculó mediante dos métodos: el método $2^{-\Delta\Delta Ct}$ ($2^{-\Delta\Delta Ct}$) y el método E, que incluye la eficiencia (E) de la reacción de PCR como factor de corrección. Para calcular la eficiencia de la reacción con los primers diseñados para cada isoforma, se realizaron curvas estándares a partir de 7 diluciones seriadas (8 puntos), con 3 réplicas por dilución. Sólo se incluyeron en el análisis aquellas isoformas cuyos primers mostraban una eficiencia de reacción en torno a 2. Adicionalmente, como calibrador de las placas se incluyó un ADNc formado por un “pool” de muestras, que permitía corregir los efectos causados por las diferencias de amplificación entre placas.

Las diferencias de expresión de las variantes entre las distintas formas clínicas de EM, controles y OIND, se realizaron mediante el test no paramétrico de Kruskal-Wallis. Para establecer las diferencias entre dos grupos de individuos se utilizó la comparación por pares y se ajustaron para pruebas múltiples con la corrección de Bonferroni (p adj.). En este caso, el análisis estadístico se realizó con el software GraphPad Prism versión 6. Los niveles de significación se establecieron como * p < 0,05, **p < 0.01, ***p < 0.001 y ****p < 0.0001.

En las tablas 7 y 8 se muestran las características de los primers diseñados para 42 isoformas hasta la fecha. Bajo observaciones se indican las isoformas para las que no se han conseguido diseñar primers específicos porque o bien hibridaban con otra isoforma del mismo gen, o bien en otra zona del genoma.

Tabla 7. Diseño y puesta a punto de los primers diseñados para las isoformas implicadas en la vía de señalización del inflammasoma NLRP3.

	Isoforma	Biotipo	Ta	Autohibridación	Autohibridación 3'	Longitud producto	Amplificación de otras zonas no deseadas	Observaciones	Electroforesis	Tm
IL1B	201	protein_coding	60,18	2	0	113	CNP, longitud 2446 pb		113 pb	1 pico a 82,4
			59,75	3	0					
	206	retained_intron	60,49	4	0	78	No		78 pb	1 pico a 80,5
			60,31	4	0					
207	processed_transcr	61,33	4	1	175	No		175 pb	1 pico a 80	
		60,07	4	0						
208	retained_intron	60,59	4	2	99	No		99 pb	1 pico a 81,5	
		60,04	3	1						
IL1R1	205	protein_coding	60,11	3	0	541			541 pb	No amplificó
			59,96	4	0					
IL1RN	202	protein_coding						No primers exclusivos		
			205	protein_coding	59,48	4	2	263	No	263 pb
IL18	206	retained_intron	60,25	4	2	174	No		174 pb	No amplificó
			59,96	2	0					
NF-kB2	203	protein_coding	60,82	3	0	92	No		92 pb	1 pico a 86,4
			61,43	2	0					
NF-kB1	214	nonsense_mediate	58,24	5	2	120	No		120 pb y banda inespecifica	1 pico a 80
			59,97	4	2					
NF-kBIA	201	protein_coding						No primers exclusivos		
			204	retained_intron	59,61	2	0	71	No	71 pb
	205	retained_intron	58,77	4	2	88	No		88 pb	1 pico a 79,7
			60,27	3	0					
	206	retained_intron	57,73	2	2	70	No		70 pb	1 pico a 80,1
			59,33	3	1					
	207	processed_transcr	59,87	4	0	103	No		103 pb	1 pico
			57,5	5	2					
	208	protein_coding	59,52	3	3	155	No		155 pb	1 pico a 84,7
			59,31	5	3					
209	protein_coding	60,11	3	1	90	No		90 pb	No pico	
		60,39	4	1						
210	retained_intron	60,46	4	1	129	No				
		60,42	4	0						
58,22	4	1								
NF-kBIZ	202	protein_coding						No primers exclusivos		
			203	protein_coding	61,18	5	0	263	No	263 pb
	206	protein_coding	62,73	6	6	167	No		167 pb	1 pico a 81
			60,61	4	0					
	209	protein_coding	60,32	5	2	109	No		109 pb	1 pico a 76
			59,43	2	0					
	201	protein_coding	58,96	2	2	205	No		205 pb	No amplificó
			55,5	6	0					
205	retained_intron	58,31	3	0	72	No		72 pb	1 pico a 77,7	
		59,51	4	2						
210	retained_intron	60,3	3	2	86	No		86 pb	1 pico a 78,2	
		58,81	4	0						
59,1	3	2								
ICAM1	201	protein_coding	60,61	4	0	150	No		150 pb y banda inespecifica	2 picos
			60,33	4	0					
CASP1	205	retained_intron	60,61	4	0	153	No		153 pb	1 pico a 75,5
			58,21	5	0					
	208	protein_coding	58,76	5	0	112	No			
			60,07	4	1					
213	protein_coding	57,37	4	0	141	No			No pico Sólo a baja concentración.	
		59,86	3	0						
TNF	208	protein_coding	60,18	4	2	177	No		177 pb	1 pico a 81,8
			59,68	5	1					
NLRP3	201	protein_coding						No primers exclusivos		
	202	protein_coding						No primers exclusivos		
	203	protein_coding						No primers exclusivos		
	204	protein_coding						No primers exclusivos		
	205	protein_coding						No primers exclusivos		
	206	protein_coding	58,64	4	3	106	No			1 pico a 80,2
			57,77	4	4					
	208	retained_intron							No primers exclusivos	
59,51			2	0						
209	nonsense_mediate	59,96	3	2	291	No		291 pb	A baja concentr. salen 2 picos.	
PLAUR	204	retained_intron						No primers exclusivos		
	214	protein_coding	62,63	6	0	75	SLC2A11, longitud 2849bp		75 pb	1 pico a 79,5
			60,11	5	1					

Ta es la temperatura de hibridación de los primers y Tm es la temperatura de *melting*, ambas en grados centígrados. En la columna de Electroforesis se indica el tamaño de la banda amplificada, en pares de bases.

Tabla 8. Diseño y puesta a punto de los primers diseñados para las isoformas diferencialmente expresadas en pacientes con EMPP.

Nombre oligo	Biotipo	Ta	GC%	Self compl.	Self 3' compl.	Longitud producto	Observaciones
C2orf88-202-F	protein_coding	59.19	48	6	1	193	Curva de melting con hombros
C2orf88-202-R		59.10	55	3	0		
RPL15-210-F	retained_intron	60.27	52	4	1	225	Tm 1 pico a 75,6
RPL15-210-R		60,68	60	2	0		
ELAC1-201-F	protein_coding	60,32	55	4	0	80	Tm 1 pico a 76,6
ELAC1-201-R		56,59	50	4	1		
PURA-201-F	protein_coding	60.03	55	2	1	138	Tm 1 pico a 77,6
PURA-201-R		58,96	55	3	2		
SLC35A5-206-F	protein_coding	58.81	46	3	0	206	Primer-Blast los alinea con otros genes
SLC35A5-206-R		59.44	52	4	0		
CCL4-202-F	protein_coding						No primers exclusivos
CCL4-202-R							
ICAM1-201-F	protein_coding	60,61	52	4	0	150	Tm 1 pico a 79,0
ICAM1-201-R		60,33	55	4	0		
ICAM1-203-F	processed_transcript	57.95	50	4	1	199	Tm 1 pico a 79,5
ICAM1-203-R		60.06	57	4	2		
CCL3-204F	protein_coding	60.34	52	4	3	191	Tm 1 pico a 81,7
CCL3-204R		60.07	52	3	2		
CCL3L3-203-F	protein_coding CDS not defined	60.41	57	4	4	107	Tm 1 pico a 82,2
CCL3L3-203-R		60.32	55	3	1		
CXCL8-202-F	protein_coding	60.12	47	4	1	89	Tm 1 pico a 77,0
CXCL8-202-R		60.43	50	6	2		
CXCL2-202-F	protein_coding	57.49	41	3	1	76	Tm 1 pico a 73,4
CXCL2-202-R		57.20	37	5	2		
CXCL2-203-F	retained_intron	60.38	57	3	2	119	Tm 1 pico a 79,1
CXCL2-203-F		60.35	50	5	2		
CXCL3-204-F	protein_coding CDS not defined	60,08	57	5	2	231	Tm 1 pico a 77,1
CXCL3-204-R		61,60	48	5	3		
CXCL3-201-F	protein_coding	60.20	52	4	1	77	No amplifica en nuestras condiciones
CXCL3-201-R		59.22	48	3	2		
IL1A-201-F	protein_coding	59.44	52	3	0	71	Salen distintas Tm
IL1A-201-R		60.16	45	6	2		
CXCL1-201-F	protein_coding	60.27	52	4	1	112	Tm 1 pico a 73,9
CXCL1-201-R		59.96	50	4	0		
PLAU-201-F	protein_coding	60.49	75	7	1	120	No amplifica en nuestras condiciones
PLAU-201-R		58.00	45	3	0		
IL1B-205-F	retained_intron	57.19	50	4	1	86	Tm 1 pico a 77,7
IL1B-205-R		59.96	50	4	0		
RNASEL-201-F	protein_coding	59,17	45	4	2	242	Tm 1 pico a 78,4
RNASEL-201-R		59,87	52	2	0		

Ta es la temperatura de hibridación de los primers y Tm es la temperatura de melting, ambas en grados centígrados

4.5 Resultados

Los resultados de la validación hasta la fecha se presentan en la tabla 9.

Tabla 9. Resultados de validación de aquellas variantes diferencialmente expresadas entre pacientes con EM y controles en el análisis RNAseq dentro de la vía del inflammasoma NLRP3, o dentro de las vías de señalización por quimioquinas, así como de aquellas variantes que se encontraban desreguladas en los pacientes con formas EMPP al compararlas con controles o con pacientes con formas EMRR.

Isoforma	Kruskal-Wallis p	Comparación por parejas corregida para comparaciones múltiples (p adj.)								
		HC vs RR	HC vs SP	HC vs PP	HC vs OIND	RR vs SP	PP vs SP	PP vs RR	OIND vs SP	OIND vs PP
IL1B-201	0,147									
IL1B-205	0,0002					***				
IL1B-206	0,0011		*			**	*		*	
IL1B-207	0,0004		**			*			**	
IL1B-208	< 0,0001		**			***	****		****	
IL1RN-205	0,0016	**	**							
NF-kB2-203	0,0018					**				
NF-kBIA-204	0,2543									
NF-kBIA-205	0,0876									
NF-kBIA-206	0,0006	*	***							
NF-kBIZ-206	< 0,0001	**				****				
TNF-208	0,0001			*	*	*	*		**	
NLRP3-206	0,8789									
PLAUR-214	< 0,0001			****	*		***	***		
ICAM1-201	< 0,0001			****				*		*
ICAM1-203	0,0065					**				
CCL3-204	< 0,0001					****	***			
CCL3L3-203	0,0391									
CXCL1-201	< 0,0001					**	*		*	
CXCL2-202	< 0,0001	****		***		****	****		**	
CXCL2-203	< 0,0001		*			*	****		***	
CXCL3-204	< 0,0001	**		****	****	**	****		***	
CXCL8-202	0,0004						**	*	*	
RNASEL-201	< 0,0001	****		****		***	****			
RPL15-210	< 0,0001	****		****	**	****	****	*	**	
ELAC1-201	0,0001	***		****	***	****	****		****	
PURA-201	< 0,0001	***				***				

* p_{aj} ≤ 0.05, ** p_{aj} ≤ 0.01, *** p_{aj} ≤ 0.001, **** p_{aj} ≤ 0.0001

Entre las variantes de procesamiento alternativo implicadas en la vía del inflamasoma NLRP3 también son numerosas las diferencias encontradas en el estudio de replicación por enzimoimmunoensayo.

Variantes de procesamiento alternativo de la IL1 β y asociados

Encontramos diferencias de expresión en todas las isoformas estudiadas salvo en la IL1B-201. Estas isoformas, en general, se encuentran infraexpresadas en las formas clínicas con mayor tiempo de evolución (EMSP). Así, la IL1B-205 está infraexpresada en las formas EMSP en comparación con las formas RR. Las variantes IL1B-206, ILB1-207 e ILB1-208 se encuentran infraexpresadas en los pacientes con EMSP en comparación con los controles (HC), los pacientes con EMRR y las OIND y la IL1B-206 e ILB1-208 también están infraexpresadas en la forma secundariamente progresiva al compararlas con las formas EMPP.

Además, la isoforma 205 del antagonista del receptor de la IL1 (IL1RN-205) se encontraba sobreexpresada en las dos formas clínicas de inicio en brotes (EMRR y EMSP) en comparación con los HC.

Variantes de procesamiento alternativo del complejo factor de transcripción nuclear-kappa-B y asociados

La variante 203 de la subunidad 2 del factor nuclear-kappa-B (NF-kB2-203) también se encontraba significativamente sobreexpresada en las formas EMRR frente a las formas EMSP.

La variante 206 del inhibidor Alpha del factor NF-kB (NF-kBIA-206) se encontraba significativamente sobreexpresada en las formas EMRR y SP en comparación con controles y la variante 206 del inhibidor Zeta del factor NF-kB (NF-kBIZ-206) estaba intensamente expresada en los pacientes con formas EMRR al compararlos con los HC y las formas EMSP.

Otras variantes relacionadas con el inflamasoma

La variante 208 del factor de necrosis tumoral (TNF-208) se sobreexpresa en las formas EMPP y OIND frente a controles y en las formas EMRR, EMPP y OIND frente a las formas EMSP. La variante 214 del receptor de plasminógeno (PLAUR-214) se sobreexpresa en las formas EMPP frente a HC y a las otras dos formas clínicas de EM. También lo hace en las OIND frente a los HC.

Variantes de procesamiento relacionadas con moléculas de adhesión o quimioquinas

La isoforma 201 de la molécula de adhesión intercelular 1 (ICAM1-201) se encontraba infraexpresada en los pacientes con formas PP en comparación con HC, RR y OIND. Sin embargo, la variante ICAM1-203 sólo se encontraba infraexpresada en las formas SP frente a las RR.

La variante 204 del ligando 3 de quimioquinas o MIP1-alpha (CCL3-204) presenta una expresión preferencial en las formas PP y RR comparada con las formas SP, al igual que la variante 201 del ligando 1 de quimioquinas con motivo CXC (CXCL1-201). En el caso de la isoforma CXCL2-202 tanto las formas EMRR como las PP mostraban una mayor expresión que los controles y las formas SP. Los pacientes con otras enfermedades neurológicas inflamatorias también tenían una expresión significativamente mayor que las formas SP. En la variante CXCL2-203 también se producía una menor expresión en las formas SP que en el resto de los grupos (HC, RR, PP y OIND). De forma similar, la variante CXCL3-204 se encontraba sobreexpresada en las formas RR y PP, así como en las OIND al compararlas con controles y con formas SP. Por último, dentro de las quimioquinas, la variante CXCL8-202 se sobreexpresaba en las formas PP en comparación a formas RR y SP y en las OIND en comparación con las formas EMSP.

Variantes que se encontraban sobreexpresadas en el estudio transcriptómico en formas Primarias Progresivas

En este caso se replica que la máxima expresión de la variante 201 de la ribonucleasa L (RNASEL-201), una proteína con funciones antivirales y antiproliferativas que participa en la cascada de señalización de los interferones, se produce en las formas PP siendo estas diferencias significativas con HC y formas SP. Las formas RR la expresan en menor medida, pero también de forma significativamente superior a los HC y formas SP.

Algo similar ocurre con la variante 210 de la proteína ribosómica L15 (RPL15-210) cuya máxima expresión también ocurre en las formas PP y en las OIND, siendo estas diferencias significativas con HC, formas RR y formas SP. Adicionalmente, las formas RR también presentan una mayor expresión que las formas SP.

La variante 201 de la ribonucleasa Z1 (ELAC1-201) también se expresa en menor medida en los HC y las formas SP que en las formas RR, PP y en las OIND.

Por el contrario, la variante 201 de la proteína A de unión a elementos ricos en purina (PURA-201) que se encontraba sobreexpresada en el RNAseq en las formas PP, en los estudios de validación sólo se sobreexpresa en las formas RR con respecto a controles y formas SP.

Es difícil adelantar conclusiones, porque aún no hemos finalizado la replicación de todas las variantes seleccionadas, pero podemos resumir que existen algunas variantes que se perfilan como biomarcadores adecuados para las formas primarias progresivas, entre

ellos PLAUR-14, ICAM1-201, RPL15-210 y RNASEL-201, no sólo porque se expresen diferencialmente con los controles, sino porque lo hacen con las otras formas clínicas de la EM. Tres de estos genes están implicados en mecanismos de regulación del sistema inmune (ICAM1, RNASEL y PLAUR), en concreto ICAM-1 y RNASEL en la señalización por interferones tipo I y tipo II y en cascadas de señalización de otras citoquinas. Por otra parte, RPL15 parece jugar un papel en la elongación de las cadenas peptídicas y en la traducción del ARN viral

Como ya mencionamos en la memoria de solicitud, más del 90% de todos los genes humanos producen transcritos primarios (11,12) que se someten a un proceso de procesamiento o splicing alternativo, especialmente en los genes expresados en los sistemas nervioso e inmunológico (13). Muchos de estos genes pertenecen a familias o grupos funcionales, y pueden ser puntos de control en la respuesta inmunitaria mediante cambios en la maduración del ARN hacia formas que codifiquen proteínas o isoformas que no lo hagan. Son varios los grupos que han evaluado el papel de las variantes de procesamiento alternativo en la EM

McKay y colaboradores demostraron una disminución en la proporción de la expresión de la isoforma transmembrana frente a la soluble de IL7R en muestras de sangre de pacientes con PPMS y RRMS, y que la sobreexpresión de sIL7R se correlacionó con un haplotipo particular de IL7R que era más común en los pacientes con PPMS, lo que respalda el desarrollo de una hipótesis en la que una señalización aberrante a través de rIL7R, y por lo tanto, la supervivencia y proliferación de células T, contribuyen a la etiología de la EM (14).

Por otra parte, otros autores han demostrado que los niveles plasmáticos de TNF están relacionados positivamente con el diagnóstico de EM y, lo que es más interesante, se ha demostrado que los niveles elevados de receptor 1 de TNF soluble (solTNFR1) y los bajos niveles del receptor de TNF 2 soluble (solTNFR2) son buenos marcadores pronósticos de la progresión de la enfermedad en PPMS. Los niveles de TNF en sangre periférica están incrementados en PPMS y se correlacionan con la progresión de la enfermedad (15–17). En nuestro estudio, la variante TNF-208, se sobreexpresa en las formas PP y está infraexpresada en controles y formas SP.

Esperamos que el estudio posterior de las isoformas de procesamiento alternativo expresadas diferencialmente en este estudio pueda arrojar luz sobre la patogenia de la EM primaria progresiva.

Difusión de resultados

Los resultados del análisis proteómico: exploración y validación, se presentaron en el XXIX congreso anual Charcot, en noviembre de 2021, con la defensa del póster titulado

“Analysis of serum protein biomarkers in clinical forms of Multiple Sclerosis”.

Las primeras variantes analizadas en el estudio transcriptómico: exploración y validación, se presentaron en el XXX congreso anual Charcot, en noviembre de 2022, con la defensa del póster titulado “Alternative spliced genes in peripheral blood mononuclear cells of Multiple Sclerosis patients”.

Bibliografía

1. Liao J, Zhang Y, Chen X, Zhang J. The Roles of Peroxiredoxin 6 in Brain Diseases. *Mol Neurobiol* [Internet]. 2021 Sep 1 [cited 2023 Apr 24];58(9):4348–64. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34013449/>
2. Yun HM, Park KR, Kim EC, Hong JT. PRDX6 controls multiple sclerosis by suppressing inflammation and blood brain barrier disruption. *Oncotarget* [Internet]. 2015 [cited 2023 Apr 24];6(25):20875–84. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26327204/>
3. Uzawa A, Mori M, Masuda H, Ohtani R, Uchida T, Aoki R, et al. Peroxiredoxins are involved in the pathogenesis of multiple sclerosis and neuromyelitis optica spectrum disorder. *Clin Exp Immunol* [Internet]. 2020 Nov 1 [cited 2023 Apr 24];202(2):239–48. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32643149/>
4. Zeng Z, Rulten SL, Breslin C, Zlatanou A, Coulthard V, Caldecott KW. Acylpeptide hydrolase is a component of the cellular response to DNA damage. *DNA Repair (Amst)* [Internet]. 2017 Oct 1 [cited 2023 Apr 24];58:52–61. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28866241/>
5. Liguori M, Nuzziello N, Simone M, Amoroso N, Viterbo RG, Tangaro S, et al. Association between miRNAs expression and cognitive performances of Pediatric Multiple Sclerosis patients: A pilot study. *Brain Behav*. 2019 Feb 1;9(2).
6. Yi M, Li J, Jian S, Li B, Huang Z, Shu L, et al. Quantitative and causal analysis for inflammatory genes and the risk of Parkinson’s disease OPEN ACCESS EDITED BY. *Front Immunol*. 2023;14:1119315.
7. Chen DTL, Cheng SW, Chen T, Chang JPC, Hwang BF, Chang HH, et al. Identification of Genetic Variations in the NAD-Related Pathways for Patients with Major Depressive Disorder: A Case-Control Study in Taiwan. *J Clin Med* [Internet]. 2022 Jul 1 [cited 2023 Apr 24];11(13):3622. Available from: [/pmc/articles/PMC9267440/](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/3622/)
8. Wang Y, Yang Q, Shen S, Zhang L, Xiang Y, Weng X. Mst1 promotes mitochondrial dysfunction and apoptosis in oxidative stress-induced rheumatoid arthritis synoviocytes. *Aging* [Internet]. 2020 [cited 2023 Apr 24];12(16):1–13. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32692720/>

9. Rezaei-Tavirani M, Safari-Alighiarloo N, Taghizadeh M, Tabatabaei SM, Namaki S. Network-based analysis of differentially expressed genes in cerebrospinal fluid (CSF) and blood reveals new candidate genes for multiple sclerosis. *PeerJ* . 2016;4(e2775).
10. Wang MH, Zhou YQ, Chen YQ. Macrophage-stimulating protein and RON receptor tyrosine kinase: Potential regulators of macrophage inflammatory activities. *Scand J Immunol*. 2002;56(6):545–53.
11. Evsyukova I, Somarelli JA, Gregory SG, Garcia-Blanco MA. Alternative splicing in multiple sclerosis and other autoimmune diseases. *RNA Biol* [Internet]. 2010 [cited 2023 Apr 25];7(4):462–73. Available from: <https://www.tandfonline.com/action/journalInformation?journalCode=krnb20>
12. Hecker M, Rüge A, Putscher E, Boxberger N, Rommer PS, Fitzner B, et al. Aberrant expression of alternative splicing variants in multiple sclerosis - A systematic review. *Autoimmun Rev* [Internet]. 2019 Jul 1 [cited 2023 Apr 25];18(7):721–32. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31059848/>
13. Lynch KW. Consequences of regulated pre-mRNA splicing in the immune system. *Nat Rev Immunol*. 2004 Dec;4(12):931–40.
14. McKay FC, Swain LI, Schibeci SD, Rubio JP, Kilpatrick TJ, Heard RN, et al. Haplotypes of the interleukin 7 receptor alpha gene are correlated with altered expression in whole blood cells in multiple sclerosis. *Genes Immun* [Internet]. 2008 Jan [cited 2023 Apr 25];9(1):1–6. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17928869/>
15. Kallaur AP, Oliveira SR, Simão ANC, Alfieri DF, Flauzino T, Lopes J, et al. Cytokine Profile in Patients with Progressive Multiple Sclerosis and Its Association with Disease Progression and Disability. *Mol Neurobiol* [Internet]. 2017 May 1 [cited 2023 Apr 25];54(4):2950–60. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27023227/>
16. Ribeiro CM, Oliveira SR, Alfieri DF, Flauzino T, Kaimen-Maciel DR, Simão ANC, et al. Tumor necrosis factor alpha (TNF- α) and its soluble receptors are associated with disability, disability progression and clinical forms of multiple sclerosis. *Inflamm Res* [Internet]. 2019 Dec 1 [cited 2023 Apr 25];68(12):1049–59. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31559449/>
17. Fresegna D, Bullitta S, Musella A, Rizzo FR, De Vito F, Guadalupi L, et al. Re-Examining the Role of TNF in MS Pathogenesis and Therapy. *Cells* [Internet]. 2020 Oct 14 [cited 2023 Apr 25];9(10). Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33066433/>